Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 6, с. 668-676.

УДК 577.15.08
©Коллектив авторов

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕПТИДНОГО СТАНДАРТА ДЛЯ SRM МЕТОДА С ПОМОЩЬЮ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ *IN VITRO*

М.Г. Завьялова[1], В.Г. Згода[1]*, О.Н. Харыбин[1], Е.Н. Николаев[1,2]

[1]Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул. 10; эл. почта: victor.zgoda@gmail.com
[2]Институт энергетических проблем химической физики РАН

Фосфорилирование является самой распространенной и наиболее значимой пост-трансляционной модификацией (ПТМ) белков. Исследование фосфоформ белков значительно затруднено из-за их низкой концентрации в биологических образцах в сравнении с нативными белками. Применение методов мониторинга выбранных реакций (SRM) позволяет проводить направленный анализ ПТМ с высокой специфичностью и чувствительностью. На примере основного белка миелина (MBP) продемонстрирован методический подход, основанный на получении фосфорилированного белка в реконструированной киназной системе и дальнейшем использовании его триптических фосфопептидов в качестве стандартов для SRM метода. Разработанный метод был успешно применен для определения сайтов фосфорилирования в ткани глиомы мозга человека.

Ключевые слова: протеомика, мониторинг выбранных реакций (SRM), посттрансляционные модификации (ПТМ), фосфорилирование белков.

ВВЕДЕНИЕ

Фосфорилирование является одной из самых распространённых пост-трансляционных модификаций (ПТМ) белков [1]. Множество процессов в клетке контролируется посредством обратимого фосфорилирования-дефосфорилирования белков [2-4]. Таким образом, фосфорилирование в клетке является динамическим процессом. Доля модифицированного белка на несколько порядков ниже его немодифицированной формы [5, 6]. Именно низкая концентрация фосфоформ белков в клеточных культурах, тканях и биологических жидкостях затрудняет обнаружение и анализ этой ПТМ. Наиболее распространенными подходами для поиска и количественного измерения пост-трансляционных модификаций белков являются иммунологические методы, в частности ELISA и Western-Blot, но они требуют предварительного получения антител, специфичных к модифицированным белкам. Однако белки часто фосфорилируются по нескольким аминокислотным позициям. При этом, селективность и специфичность антител, как правило, не позволяют различить изоформы белка с разными фосфосайтами. Множественность фосфорилирования характерна для таких функционально значимых белков, как p53 [7], SMAD [8], Hsp27 [9] и др., причём для некоторых фосфосайтов показана зависимость уровня ПТМ от развития таких заболеваний, как рак.

Применение тандемной масс-спектрометрии позволяет идентифицировать и локализовать положение ПТМ в аминокислотной последовательности белка [6]. Фосфорилирование увеличивает массу белка и соответствующих фрагментов на 79,97 Да на модификацию, и ПТМ можно идентифицировать по разнице между точно измеренной и теоретической (определённой из аминокислотной последовательности) массами белков и их фрагментов [10]. Кроме того, при диссоциации, индуцируемой соударением, у образующихся дочерних ионов может происходить потеря молекулы H_3PO_4 с уменьшением массы на 97,98 Да или дефосфорилирование с уменьшением на 79,97 Да, что приводит к появлению

* - адресат для переписки

дополнительных характерных пиков в масс-спектре вторичных ионов (продуктов МС/МС), по которым можно локализовать сайт модификации.

Как упоминалось выше, концентрация фосфорилированных белков в живой системе, как правило, очень низка, поэтому для увеличения интенсивности масс-спектрометрического сигнала применяют различные методы селективного обогащения и фракционирования фосфопептидов, такие как хроматография на хроматографических смолах со связанными металлами (IMAC) или оксидами металлов (например, на TiO_2), катион-обменная хроматография (SCX) и обратимое ковалентное связывание [11]. Применение направленных (таргетных) масс-спектрометрических методов анализа (SRM/MRM/PRM) позволяет обнаруживать в клеточном гидролизате и количественно оценивать пептиды, содержащие ПТМ, без дополнительного обогащения [12, 13]. Принцип SRM метода заключается в селективном мониторинге в узком массовом диапазоне ионной пары "родительский ион – ион-фрагмент". За счёт этого достигается высокая чувствительность и специфичность в отношении анализируемых веществ. Данные методы широко применяются для анализа небольших молекул (метаболитов, интермедиатов химического синтеза), и в последнее время активно внедряются в протеомные исследования благодаря увеличению чувствительности и динамического диапазона по сравнению с обычным ВЭЖХ-МС/МС, в котором используется режим "полного сканирования" [14]. В основном SRM/MRM подходы реализуются на масс-спектрометрах с тройным квадруполем, но также была показана высокая эффективность применения LTQ-Orbitrap (pSRM) [15] и Q-Orbitrap (PRM) [16, 17] для реализации этих методов.

В настоящей работе мы предложили методический подход для создания таргетного метода анализа фосфопептидов. Мы использовали *in vitro* фосфорилирование основного белка миелина для получения стандартов фосфопептидов для разработки SRM метода. Исследуемый белок фосфорилировали *in vitro* в киназной системе и подвергали гидролизу трипсином. Полученную относительно простую смесь пептидов анализировали на ВЭЖХ-МС/МС с CID фрагментированием для идентификации образовавшихся фосфопептидов. Для этих фосфопептидов определяли характеристические параметры для SRM анализа: время удерживания на хроматографической колонке (RT), массы родительских ионов, оптимальная энергия столкновительной диссоциации и массы характеристических b- и y-фрагментов. Чувствительность и селективность разработанного SRM метода была продемонстрирована для образцов фосфорилированного MBP при добавлении белковой матрицы – лизата клеточной культуры. На примере ткани глиомы мозга показано, что данный подход может быть применим для направленного анализа фосфорилирования белков в биологических образцах.

МЕТОДИКА

Реагенты и буферные растворы, используемые в работе

Буфер для проведения киназной реакции *in vitro* (40 мМ Tris pH 7,5, 20 мМ $MgCl_2$, 0,1 мг/мл BSA, 50 мкМ DTT, 1% DMSO ("Promega", США)); фосфатно-солевой буфер PBS pH 7,4 (1 мМ KH_2PO_4, 3 мМ Na_2HPO_4-$7H_2O$, 155 мМ NaCl ("Gibco", США)); лизирующий буфер (50 мМ Tris pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS, 1% (вес/объём) ингибитор фосфатаз ("Sigma", США), 1% (вес/объём) ингибитор протеаз ("Pierce", США)); буфер щелочной фосфатазы (50 мМ Трис-HCl pH 7,6, 10 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaCl, 1 мМ DTT ("Sigma")); ATP, Трис-HCl, йодацетамид, тетраэтиламмония бикарбонат, Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 были получены от "Sigma", Protease Inhibitor Cocktail ("Pierce"), ацетонитрил и TFA ("Merck", Германия), муравьиная кислота ("Acros Organics", США), вода Milli-Q (ИБМХ).

Белки и ферменты

MBP из мозга свиньи ("Promega"), рекомбинантная киназа человека ERK2 ("Promega"), Фосфатаза из кишечника теленка ("Sigma"), Трипсин модифицированный, для секвенирования ("Promega").

Клеточные культуры и ткани: клеточная линия HUH7 была предоставлена лабораторией клеточной биологии ИБМХ, глиомная ткань была предоставлена НИИ нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко.

Для модельного эксперимента фосфорилирования *in vitro* был выбран основной белок миелина (MBP), который является субстратом для MAP киназ (MAPK). Фосфорилирование MBP проводилось по протоколу [18] с добавлением в соотношении 1/100 (по массе) киназы ERK2, которая является членом семейства MAPK. Концентрация MBP в реакционной смеси составила 0,1 мкг/мкл.

Чтобы подтвердить то, что белок фосфорилируется именно в ходе киназной реакции, мы проводили дефосфорилирование продукта. Реакцию дефосфорилирования MBP проводили при температуре 37°C в течение 60 мин в буфере щелочной фосфатазы с добавлением фосфатазы 1 а.е./1 мкг белка. Концентрация фосфо-MBP в реакционной смеси составила 0,1 мкг/мкл.

Нативный MBP и его модифицированные формы, полученные в ходе реакции фосфорилирования и дефосфорилирования, подвергали сравнительному масс-спектрометрическому ВЭЖХ-МС/МС анализу. Нативный MBP растворяли в 20% водном ацетонитриле с 0,1% муравьиной кислотой в концентрации 0,1 мг/мл. Для фосфорилированного и дефосфорилированного MBP смену буфера на водный раствор 20% ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой проводили на фильтре Microcon 10 (“Millipore”, США) при 10000 g. Масс-спектры интактных белков измерялись в широкополосном режиме на масс-спектрометре ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием ApexUltra (“Bruker”, США). Раствор белка вводили со шприца в электроспрейный источник ионизации со скоростью 1,5 мкл/мин. Температура входного капилляра составила 200°C, ионизирующая разность потенциалов – 4 кВ.

Для идентифицикации ПТМ нативный и фосфорилированный MBP подвергали сравнительному ВЭЖХ-МС/МС анализу. Триптический гидролиз образцов (по 1 мкг белка) проводили по методике FASP [19] с использованием фильтра Microcon 10 (“Millipore”). Полученную пептидную фракцию высушивали на центрифужном испарителе SpeedVac (“Eppendorf”, Германия) и растворяли в 20 мкл 5% TFA. Триптические пептиды анализировали методом тандемной хромато-масс-спектрометрии на масс-спектрометре OrbiTrap Elite (“Thermo Scientific”, США) с CID фрагментированием, NCE = 25%. Хроматографическое разделение проводилось на колонке с обращённой фазой Zorbax C18-300SB (“Agilent”, США) на хроматографе UltiMate 3000 (“Dionex”, США) при скорости потока растворителя 0,4 мкл/мин. Градиент: 5%-15% B (A – вода с 0,1% муравьиной кислотой, B – водный 80% ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислотой) 23 мин, 15%-60% B 25 минут и 60%-99% B 5 мин. Идентификацию белка и сопутствующих ПТМ проводили с помощью поисковой системы Mascot. Для идентифицированных фосфопептидов определили время удержания (RT), *m/z* родительского иона. Эти данные были использованы для разработки метода направленного ВЭЖХ-МС анализа. Спектры направленного ВЭЖХ-МС анализа анализировали с помощью компьютерной программы SkyLine для поиска оптимальных фрагментов для SRM метода.

Для определения чувствительности и селективности SRM метода проводили поиск фосфопептидов в присутствии матрицы, в качестве которой использовали клеточный лизат HUH7. Его получали следующим способом: 3 млн. клеток HUH7 дважды промывали ледяным фосфатно-солевым буфером PBS. Затем добавляли 200 мкл лизирующего буфера и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Полученный лизат центрифугировали при 15000 g и отбирали супернатант. Концентрацию общего белка в супернатанте измеряли как описано в [20].

Фосфорилированный *in vitro* MBP добавляли в разных количествах к лизату HUH7: от 1 пг/мкл (~ 50 амоль/мкл) до 4 нг/мкл (~ 200 фмоль/ мкл) при концентрации общего белка лизата HUH7 1 мкг/мкл. Концентрацию фосфо-MBP считали равной концентрации MBP до киназной реакции. В контрольном образце к лизату HUH7 не добавляли MBP. Триптический гидролиз смеси (по 20 мкг общего белка) и экстракцию пептидов проводили аналогично упомянутой выше методике. Присутствие фосфопептида в смеси считалось достоверным при обнаружении не менее трёх его фрагментов.

Для валидации разработанного SRM метода поиска фосфопептидов в биологическом образце использовали глиомную ткань. Биоптат глиомной ткани 2 мм^3 дважды промывали ледяным PBS, добавляли 50 мкл лизирующего буфера и гомогенизировали ультразвуком пятью циклами при 90% мощности по 5 с. Лизат центрифугировали при 15000 g, супернатант отбирали. Концентрацию общего белка в супернатанте измеряли как описано в [20]. Триптический гидролиз 20 мкг общего белка проводился аналогично упомянутой выше методике. Пептидная фракция высушивалась на центрифужном испарителе SpeedVac и растворялась в 20 мкл 5% TFA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе масс-спектрометрического анализа целых интактных белков (Top-down) были измерены точные массы MBP в нативной, фосфорилированной и дефосфорилированной *in vitro* формах (рис. 1). Анализ нативного MBP показал, что субстрат содержит три модифицированные формы миелина с массами 18630,57 Да, 18646,56 Да, 18660,57 Да.

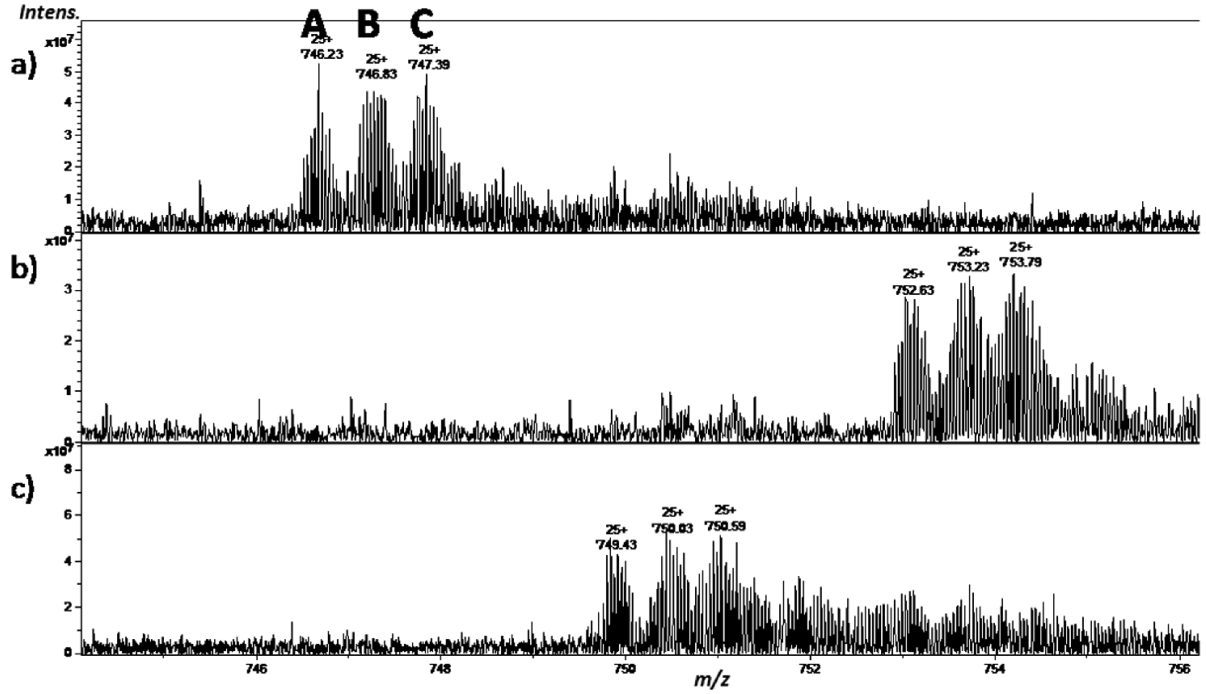

Рисунок 1. Масс-спектры интактных белков $(M+25H)^{25+}$: **a**) нативного MBP, **b**) фосфорилированного *in vitro* MBP (фосфо-MBP), **c**) дефосфорилированного фосфо-MBP. В нативном MBP присутствуют 3 модифицированные формы белка: A - 18630,57 Да, B - 18646,56 Да, C - 18660,57 Да.

Сравнение масс-спектров интактного нативного белка и его фосфорилированной формы (pMBP) показало, что масса белка увеличилась на 160 Да, что соответствует фосфорилированию белка по двум аминокислотным остаткам. Согласно литературным данным MAP киназы фосфорилируют MBP по треонинам –KNIVT*PRT*PPPSQGK– [21]. Данная область аминокислотной последовательности является высоко консервативной для MBP млекопитающих [21]. При дефосфорилировании pMBP происходил обратный сдвиг пиков, однако масса уменьшалась только на 80 Да. Таким образом, под воздействием фосфатазы происходит отщепление фосфатной группы с одной модифицированной аминокислоты, тогда как модификация на другом сайте сохраняется, вероятно, из-за изменения конформации белка, которое препятствует ферментативной реакции. Данный вывод согласуется с результатами исследования Vassall и соавторов [21].

В ходе анализа триптических пептидов BMP было обнаружено, что часть нативного MBP была изначально фосфорилирована по серинам 17, 116 (S17, S116) и треонину 99 (T99). На рисунке 2 представлен спектр фрагментации пептида [N93-IVTPR(pT)PPPSQG-K106]. Сайты фосфорилирования определяли по наличию в спектре фрагментации пептидов пиков фрагментов с потерей H_3PO_4 массой 98 Да. Фосфорилирование T99 косвенно подтверждается наличием фрагментов b_4, b_7,y_7, y_{10}, $^{y}{}_{10}$-98.

После фосфорилирования *in vitro* кроме тех сайтов, которые были идентифицированы в нативной форме MBP, был обнаружен сайт модификации треонина 96 (T96). В ходе ВЭЖХ-МС анализа гидролизата фосфорилированного белка был обнаружен дважды фосфорилированный пептид [N93-IV(pT)PR(pT)PPPSQG-K106], с сайтами модификации T96 и T99. Данные сайты фосфорилирования подтверждаются изменением родительской массы пептида и наличием фрагментов b_4, b_4-98, b_7, y_7, y_{10}, y_{10}-98 на спектре фрагментации (рис. 3).

Для разработки SRM метода и отработки условий фрагментации были выбраны родительские ионы m/z=786,401^{2+}, который соответствует пептиду с одним фосфосайтом, и m/z=826,384^{2+}, который соответствует пептиду с двумя сайтами фосфорилирования. Энергия столкновительной диссоциации подбиралась для каждой массы индивидуально таким образом, чтобы получить максимальную интенсивность фрагментов b_4, b_7, y_7, y_{10} и при наличии b_4-98, y_{10}-98, по которым можно локализовать сайты фосфорилирования. Нормализованная энергия столкновения (NCE)

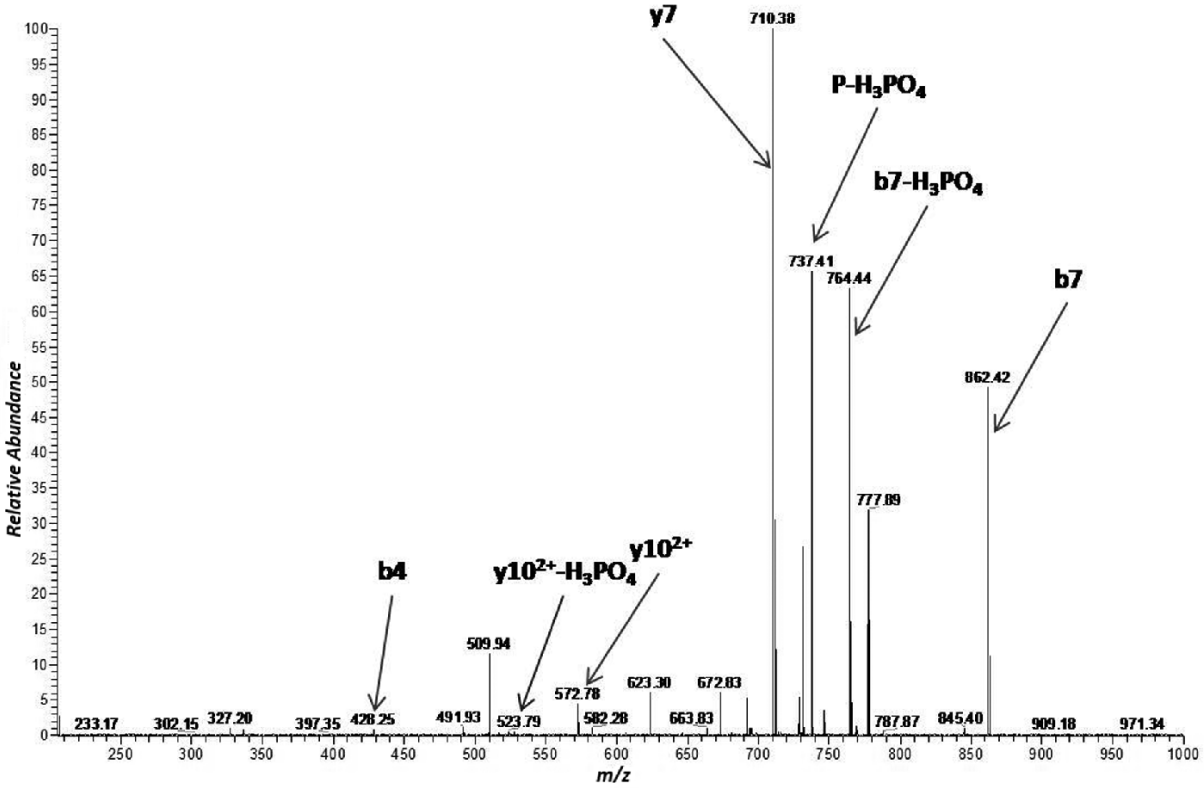

Рисунок 2. Масс-спектр фрагментации иона m/z=786,401^{2+} пептида [N93-IVTPR(pT)PPPSQG-K106].

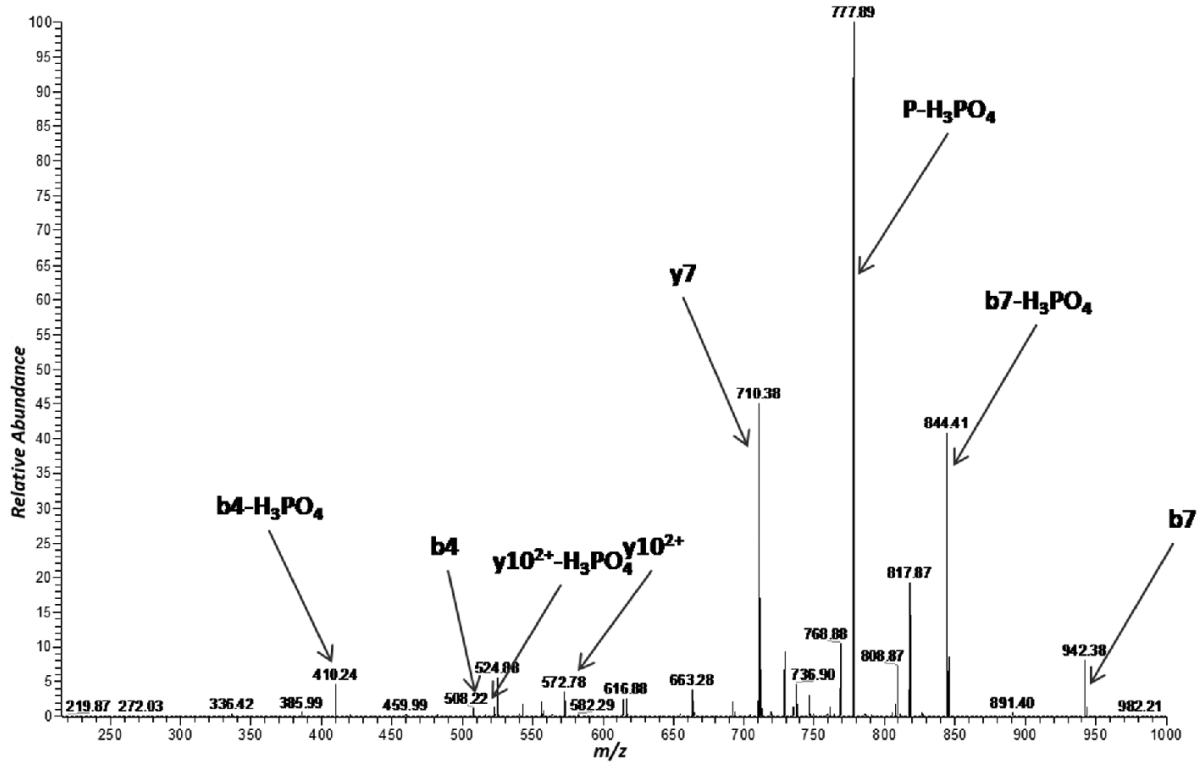

Рисунок 3. Масс-спектр фрагментации родительского иона m/z=826,384^{2+} пептида [N93-IV(pT)PR(pT)PPPSQG-K106].

составила 25%, и 27% для m/z=786,401^{2+} и m/z=826,384^{2+}, соответственно. Кроме того, при анализе спектров фрагментации m/z=786,401^{2+} были обнаружены фрагменты b_4, y_{10}, которые соответствуют фосфопептиду [N93-IV(pT)PRTPPPSQG-K106].

Для валидации и определения концентрационных границ применения разработанного метода регистрации ПТМ основного белка миелина использовали триптический гидролизат клеток HUH7. В контрольном образце лизата HUH7 пиков, соответствующих целевым фосфопептидам, обнаружено не было, тогда как при добавлении фосфо-MBP они были обнаружены (рис. 4). Предел чувствительности метода составил 3 пг (~150 амоль) для фосфорилированного пептида [N93-K106] и 12 пг (~0,6 фмоль) для дважды фосфорилированного пептида [N93-K106]. Таким образом, в экспериментах с добавлением белковой матрицы мы подтвердили, что разработанный SRM метод для фосфопептидов MBP [N93-IV(pT)PR(pT)PPPSQG-K106] и [N93-IVTPR(pT)PPPSQG-K106] обладает высокой селективностью и специфичностью.

С помощью созданного SRM метода была проанализирована глиомная ткань мозга человека. Из целевых пептидов MBP образца ткани мозга был обнаружен фосфопептид NIVTPR(pT)PPPSQGK (рис. 5). Достоверный сигнал для дважды фосфорилированного пептида зарегистрировать не удалось, что может быть связано с отсутствием данного паттерна ПТМ *in vivo*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Преимущества целевых подходов по сравнению со стандартными методами, применяемыми в протеомном анализе, были продемонстрированы во многих работах. По сравнению с shotgun подходом SRM имеет больший динамический диапазон (5 порядков против 2-3) и лучшую воспроизводимость идентификации. Высокая селективность и специфичность SRM методов достигается за счёт применения двойного масс-фильтра в квадруполях Q1 и Q3 в приборах QqQ. Предел чувствительности может достигать нескольких аттомолей вещества [22]. Применение

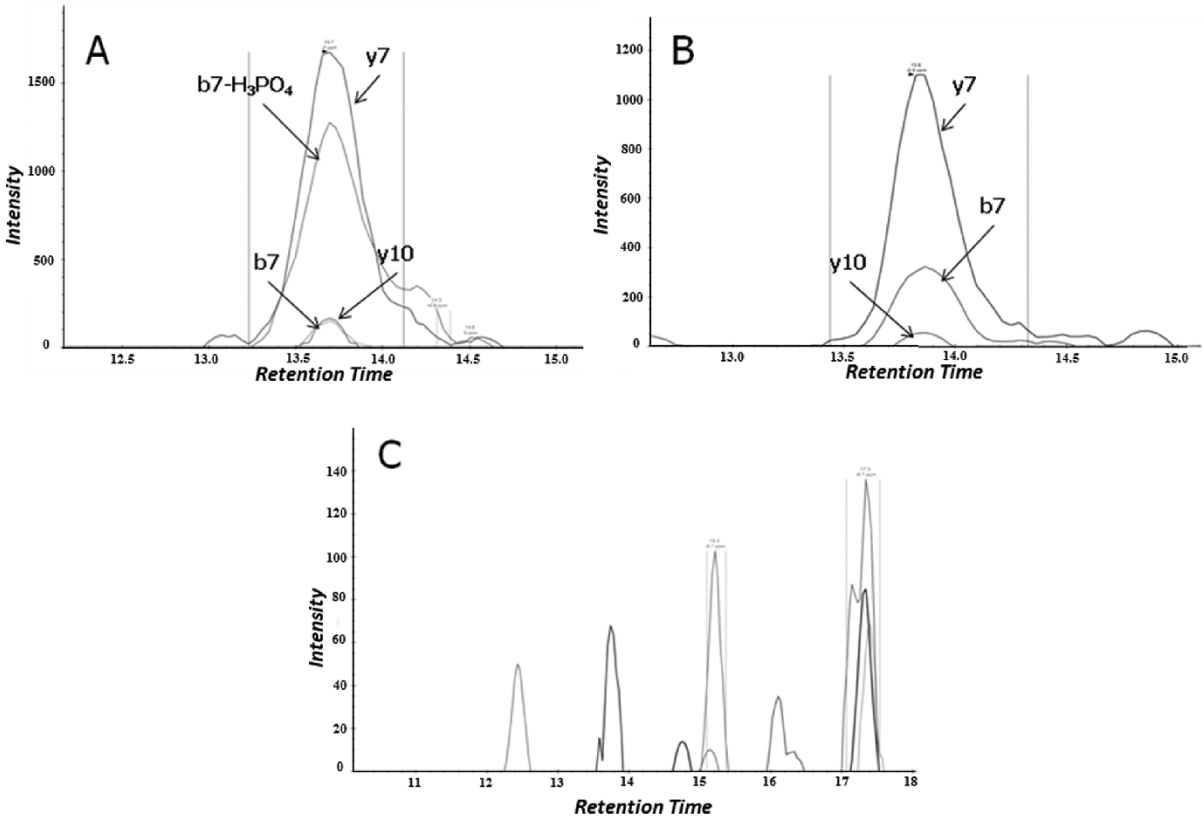

Рисунок 4. Хроматограммы выбранных фрагментарных ионов при SRM анализе фосфорилированного MBP в белковой матрице триптического гидролизата клеток HUH7 (1 фмоль MBP/ 1мкг HUH7). A -фосфопептид [N93-IV(pT)PR(pT)PPPSQG-K106], B - фосфопептид [N93-IVTPR(pT)PPPSQG-K106], C - контрольный образец HUH7 без добавления MBP.

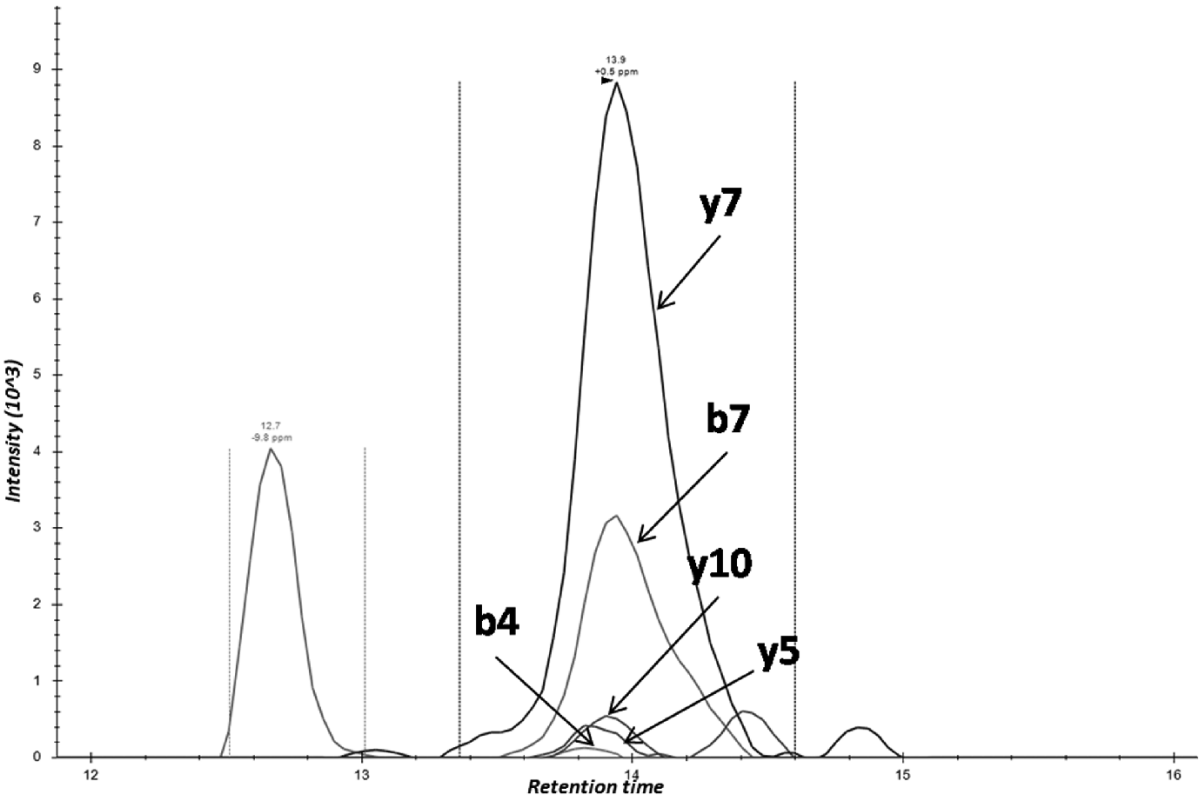

Рисунок 5. Хроматограммы выбранных фрагментарных ионов при SRM анализе фосфопептида [N93-IVTPR(pT)PPPSQG-K106] в ткани глиомы мозга.

масс-анализаторов типа OrbiTrap позволяет увеличить достоверность идентификации, за счёт того, что измеряются сигналы от всех дочерних фрагментов с высоким разрешением, что позволяет избежать интерференции с сигналами "химического шума". Поскольку сигналы от ионов-фрагментов измеряются одновременно, а не последовательно, как в тройных квадруполях, скорость измерения увеличивается. В ряде работ была показана эффективность SRM метода для анализа фосфорилированных белков. Одним из важнейших этапов при разработке SRM методов было получение пептидного стандарта для определения характеристических параметров, таких как время удержания на хроматографической колонке, масса родительского иона, массы фрагментов, энергия столкновительной диссоциации с максимальной интенсивностью фрагментов. Sherrod и соавторы использовали в качестве стандарта синтетические фосфопептиды [15]. Недостаток этого метода состоит в том, что пептиды, образующиеся при триптическом гидролизе, могут отличаться от синтетических. Присутствие фосфоаминокислоты может препятствовать гидролизу по сайтам, находящимся рядом с сайтом модификации, и способствовать получению стабильных пептидов с пропущенным сайтом расщепления. Кроме того, если синтезируемые пептиды будут иметь низкую растворимость и низкую эффективность ионизации, то они будут непригодны для SRM. Другой подход предложили Wolf-Yadlin и соавторы [13]. Они идентифицировали фосфопептиды на предварительном поисковом этапе при shotgun анализе триптического лизата клеток HMEC. Для найденных фосфопептидов на основе полученных масс-спектрометрических данных ими был предложен метод SRM. Однако, поскольку shotgun анализ обладает низким динамическим диапазоном, им пришлось предварительно фракционировать фосфопептиды методом иммунопреципитации на антителах к фосфотирозинам и удалять неспецифично связанные нефосфорилированные белки на IMAC. Нами был предложен альтернативный метод получения фосфопептидов для стандарта – фосфорилирование *in vitro* белков в искусственной киназной системе с последующим триптическим гидролизом. Достоинства данного метода заключаются в том, что при фосфорилировании *in vitro* можно быстро получить достаточное для масс-спектрометрического анализа количество фосфопептидов, без дополнительного

фракционирования и обогащения. При гидролизе белка, фосфорилированного *in vitro*, образуются пептиды аналогичные пептидам фосфоформ белков, содержащихся в биологических образцах. На примере MBP мы продемонстрировали, что при фосфорилировании *in vitro* могут появляться дополнительные сайты модификации, которые не были обнаружены в природных образцах. Таким образом, мы получаем дополнительную информацию о ПТМ белка. Варьируя киназы или используя клеточный лизат, мы можем получить пептиды с определёнными сайтами модификации, и для каждого разработать SRM метод. Для анализа ПТМ определенного сайта можно подобрать наиболее специфичную киназу, используя различные вычислительные методы предсказания, например NetPhosK. Поскольку SRM является полуколичественным методом анализа, то можно проводить оценку относительного содержания определённой фосфоформы белка в различных биологических объектах. Применение синтетических фосфопептидов в качестве внутреннего стандарта даст возможность абсолютной количественной оценки уровня модификации и поиска клинически значимых сайтов фосфорилирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан и реализован метод SRM для трёх фосфопептидов MBP NIVTPR(pT)PPPSQGK, NIV(pT)PRTPPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK, которые идентичны пептидам MBP человека. Фосфорилирование этой области имеет биологическую и медицинскую значимость. В исследованиях Kim и соавторов показано, что уменьшение уровня фосфорилирования данной области ассоциировано с демиелинизацией нервных волокон и развитием рассеянного склероза [23]. В дальнейшем разработанный нами SRM метод может быть применен в исследовании патофизиологических процессов при рассеянном склерозе.

Работа поддержана грантом РНФ № 14-25-00132.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Khoury G.A., Baliban R.C., Floudas C.A.* (2011) Scientific reports, **1**, 90. doi:10.1038/srep00090
2. *Cohen P.* (2000) Trends Biochem. Sci., **25**, 596–601. doi:10.1016/S0968-0004(00)01712-6
3. *Hunter T.* (2000) Cell, **100**, 113–127. doi:10.1016/S0092-8674(00)81688-8.
4. *Wrighton K.H., Feng X.-H.* (2008) Cellular Signalling, **20**, 1579–91. doi:10.1016/j.cellsig.2008.02.003
5. *Olsen J.V, Blagoev B., Gnad F., Macek B., Kumar C., Mortensen P., Mann M.* (2006) Cell, **127**, 635–648. doi:10.1016/j.cell.2006.09.026
6. *Mann M., Ong S.-E., Grønborg M., Steen H., Jensen O.N., Pandey A.* (2002) Trends Biotech., **20**, 261–268. doi:10.1016/S0167-7799(02)01944-3
7. *Gu B., Zhu W.-G.* (2012) Intern. J. Biol. Sci., **8**, 672–684. doi:10.7150/ijbs.4283
8. *Wrighton K.H., Lin X., Feng X.-H.* (2009) Cell Res., **19**, 8–20. doi:10.1038/cr.2008.327
9. *Katsogiannou M., Andrieu C., Rocchi P.* (2014) Frontiers in genetics, **5**, 346. doi:10.3389/fgene.2014.00346
10. *Kelleher N.L.* (2004) Peer Reviewed: Top-Down Proteomics. Analyt.Chem., **76**, 196 A–203 A. doi:10.1021/ac0415657
11. *Dunn J.D., Reid G.E., Bruening M.L.* (n.d.) Mass Spectrometry Rev., **29**, 29–54. doi:10.1002/mas.20219
12. *Jin L.L., Tong J., Prakash A., Peterman S.M., St-Germain J.R., Taylor P., Moran M.F.* (2010) J. Proteome Res., **9**, 2752–2761. doi:10.1021/pr100024a
13. *Wolf-Yadlin A., Hautaniemi S., Lauffenburger D.A., White F.M.* (2007) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **104**, 5860–5865. doi:10.1073/pnas.0608638104
14. *Anderson L., Hunter C.L.* (2006) Mol. Cell Proteomics: MCP, **5**, 573–588. doi:10.1074/mcp.M500331-MCP200
15. *Sherrod S.D., Myers M.V., Li M., Myers J.S., Carpenter K.L., Maclean B., Ham A.-J.L.* (2012) J. Proteome Res., **11**, 3467–3479. doi:10.1021/pr201240a
16. *Peterson A.C., Russell J.D., Bailey D.J., Westphall M.S., Coon J.J.* (2012) Mol. Cell Proteomics: MCP, **11**, 1475–1488. doi:10.1074/mcp.O112.020131
17. *Gallien S., Duriez E., Crone C., Kellmann M., Moehring T., Domon B.* (2012) Mol. Cell Proteomics MCP, **11**, 1709–1723. doi:10.1074/mcp.O112.019802
18. http://worldwide.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/n/erk2-kinase-enzyme-system-protocol/
19. https://www.biochem.mpg.de/226356/FASP
20. *Walker J.M.* (2002) The Protein Protocols Handbook, pp. 11-14. doi: 10.1385/1-59259-169-8:11
21. *Vassall K.A., Bessonov K., De Avila M., Polverini E., Harauz G.* (2013) PloS one, **8**, e68175. doi:10.1371/journal.pone.0068175
22. *Liu Y., Hüttenhain R., Collins B., Aebersold R.* (2013) Expert Rev. Mol. Diagn., **13**, 811–825. doi:10.1586/14737159.2013.845089
23. *Kim J.K., Mastronardi F.G., Wood D.D., Lubman D.M., Zand R., Moscarello M.A.* (2003) Mol. Cell Proteomics: MCP, **2**, 453–462. doi:10.1074/mcp.M200050-MCP200

Поступила: 03. 11. 2014.

IN VITRO PROTEIN PHOSPHORYLATION AS A TEMPLATE FOR SRM METHOD DEVELOPMENT

M.G. Zavialova[1], V.G. Zgoda[1], O.N. Kharybin[1], E.N. Nikolayev[1,2]

[1]Institute of Biomedical Chemistry (IBMC),
10, Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: victor.zgoda@gmail.com
[2]Institute for Energy Problems of Chemical Physics RAS, Moscow, Russia

Phosphorylation is one of the most common posttranslational modification (PTM) of proteins. Main challenge of phosphoprotein detection is their low abundance comparing to abundance of unmodified proteins. The method of selected reactions monitoring (SRM) allows to perform very sensitive and selective analysis of desired PTMs. Using myelin basic protein (MBP) as a model we have developed a method for phosphoprotein detection by SRM. The method is based on obtaining of phosphoproteins in a reconstituted kinase system and following usage these phosphorylated protein as a template for the development of the SRM method. The developed method was successfully applied for detection of phosphopeptides of myelin basic protein in the samples of human brain glioma.

Key words: proteomics, selected reaction monitoring (SRM), post-translational modifications (PTM), protein phosphorylation.