

STRESZCZENIE

Fosforylacja i defosforylacja pełnią fundamentalną rolę w większości ścieżek sygnałowych, mogąc bezpośrednio regulować różne aspekty funkcji białka. Szacuje się, że w białkach kodowanych przez ludzki genom znajduje się około 100 000 potencjalnych miejsc fosforylacji, a około 30–50% wszystkich białek w komórce może być fosforylowane, co wiąże się bezpośrednio z pełnionymi przez nie funkcjami. W celu ustalenia, czy dane białko ulega fosforylacji, bada się ewentualne zmiany w jego ruchliwości wywołane przez tę modyfikację, w żelu poliakrylamidowym podczas elektroforezy (PAGE) jedno- i/lub dwukierunkowej. Natomiast tandemowa spektrometria mas (MS/MS) umożliwia określenie w nim konkretnego miejsca fosforylacji. Analiza *in silico*, czyli przeszukiwania dostępnych baz danych pozwala na przewidywanie, które kinazy mogą fosforylować konkretne miejsce w badanym białku, następnie tak uzyskane dane są weryfikowane na drodze doświadczalnej: *in vitro* i/lub *in vivo*.

WPROWADZENIE

Identyfikacja i następujące po niej bliższe zdefiniowanie miejsc fosforylacji białek, jak i całego proteomu, stanowią istotny krok ku lepszemu zrozumieniu złożonej sieci przekazywania sygnału w komórce [1]. Fosforylacja i defosforylacja pełnią fundamentalną rolę w większości ścieżek sygnałowych, mogąc bezpośrednio regulować różne aspekty funkcji białka. Mają one znaczenie między innymi w degradacji i stabilizacji białek, ich lokalizacji komórkowej, a także w oddziaływaniach zachodzących między nimi [2,3]. Fosforylacja nie jest zatem jedynie swoistym przełącznikiem aktywności białek, lecz także istotną modyfikacją odpowiadającą za szereg procesów zachodzących w organizmach.

W 1932 roku Phoebus A. Levene i Fritz A. Lipmann wyizolowali fosfoserynę, dając początek badaniom nad fosforylacją białek. Dziś wiadomo, że modyfikacja ta ma ogromne znaczenie biologiczne jako jedna z najważniejszych, jakim poddawane są białka, wpływając na ich strukturę trzeciorzędową, a także pełnione przez nie funkcje [4].

Fosforylacja jest potranslacyjną modyfikacją katalizowaną przez rodzinę enzymów zwanych kinazami białkowymi. Polega ona na przyłączeniu do białka reszty fosforanowej i jest odwracalna, co w znaczący sposób usprawnia procesy, w jakie zaangażowane są ufosforylowane białka. Komórka może bowiem szybko zmieniać ich aktywność bez potrzeby produkcji i transportu nowych białek, co ma ogromne znaczenie dla jej funkcjonowania. Bez modyfikacji potranslacyjnych inaktywacja białka, którego funkcjonowanie nie jest w danym momencie potrzebne komórce (np. enzymu lub czynnika transkrypcyjnego), wymagałaby jego degradacji, zaś aktywacja – jego syntezy, zaczynającej się od transkrypcji i translacji. Oba te procesy są długotrwałe i kosztowne energetycznie. Natomiast dodanie lub usunięcie konkretnej grupy fosforanowej wymaga katalizy tylko jednej reakcji chemicznej, jest procesem bardzo szybkim i zużywającym wielokrotnie mniej energii niż synteza lub degradacja białek.

Szacuje się, że w białkach kodowanych przez ludzki genom znajduje się około 100 000 potencjalnych miejsc fosforylacji [5], a około 30–50% wszystkich białek w komórce może być fosforylowane [6], co wiąże się bezpośrednio z pełnionymi przez nie funkcjami. Zmieniony poziom fosforylacji białka może być przyczyną, bądź następstwem wystąpienia poważnych chorób, takich jak nowotwory, cukrzyca, czy reumatoidalne zapalenie stawów [7]. Kinazy białkowe stanowią drugą co do znaczenia grupę białek docelowych dla opracowywania nowych leków (po receptorach sprzężonych z białkami G) i to na nie kieruje się 20–30% wysiłków firm farmaceutycznych, zmierzających do opracowania nowych leków. Znanych jest wiele bardzo obiecujących przykładów zastosowania inhibitorów kinaz białkowych do leczenia różnych chorób nowotworowych, takich jak

Agnieszka Taracha

Grzegorz Kotarba

Tomasz Wilanowski✉

Pracownia Przekazywania Sygnału, Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

✉Pracownia Przekazywania Sygnału, Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Marcelego Nenckiego, ul. Ludwika Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (22) 58 92 311; e-mail: t.wilanowski@nencki.gov.pl

Słowa kluczowe: fosforylacja białek, kinazy białkowe, elektroforeza w żelu poliakrylamidowym, punkt izoelektryczny, spektrometria mas

Wykaz skrótów: PVDF – polifluorek winylidenu; [γ - 32 P]ATP – adenozyntrifosforan znakowany grupą fosforanową 32 P w pozycji gamma; MS – spektrometria mas; MS/MS – tandemowa spektrometria mas; HA – hemaglutynina; GST – S-transferaza glutationowa

Podziękowania: Badania prowadzone przez autorów niniejszej pracy przeglądowej są finansowane ze środków na naukę przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki na realizację w latach 2017–2020 projektu 2016/21/B/NZ1/00279 oraz przez Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN.

przewlekła białaczka szpikowa i niedrobnokomórkowy rak płuc [8]. Te przykłady dodatkowo podkreślają kluczową rolę fosforylacji białek w organizmie człowieka.

Wszystko to sprawia, że badania fosforylacji białek i poznawanie szlaków przekazywania sygnału, które tę fosforylację regulują, oraz biologicznego znaczenia tych modyfikacji dla funkcjonowania białek i całego organizmu są niezwykle istotne, a także mają duże znaczenie społeczne i ekonomiczne. Mogą się one okazać praktycznie przydatne w przyszłości, przyczyniając się do opracowania nowych leków i innych metod terapii

Próba kompleksowego zbadania fosforylacji interesującego nas białka powinna rozpocząć się od ustalenia, czy w ogóle jest ono fosforylowane. Następny krok stanowi ustalenie konkretnych reszt aminokwasowych, które ulegają fosforylacji. Na końcu należy zidentyfikować kinazy i fosfatazy zaangażowane w proces fosforylacji i defosforylacji badanego białka oraz podjąć próbę poznania biologicznych następstw wprowadzenia w nim takiej modyfikacji.

CZY BADANE BIAŁKO JEST FOSFOROLOWANE?

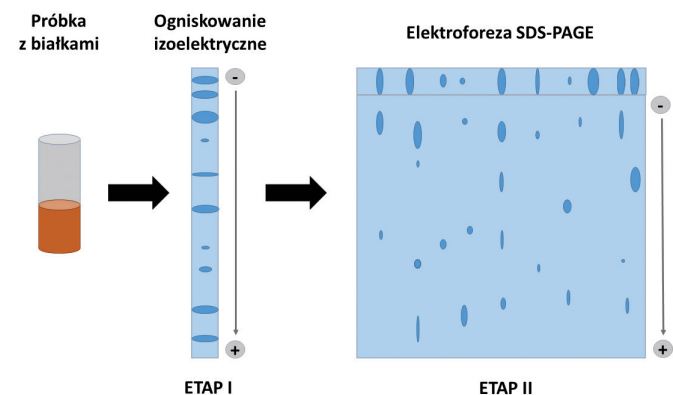
W celu ustalenia, czy interesujące nas białko ulega fosforylacji, bada się ewentualne zmiany w jego ruchliwości wywołane przez tę modyfikację w żelu poliakryloamidowym podczas elektroforezy (PAGE, ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*) jedno- i/lub dwukierunkowej. Żel poliakryloamidowy składa się z łańcuchów poliakryloamidu połączonych między sobą w wyniku działania sieciującego N,N' -metyleno-bis-akryloamidu. Łańcuchy te tworzą gęstą sieć umożliwiającą migrację rozdzielanych na żelu cząsteczek, które różnią się wielkością i ładunkiem elektrycznym. W trakcie trwania elektroforezy naładowane cząsteczki przemieszczają się w polu elektrycznym w kierunku przeciwnie naładowanej elektrody i w efekcie ulegają rozdzielaniu. Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) przeprowadzana jest z wykorzystaniem soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS), będącego anionowym detergentem. SDS wiąże się z hydrofobowymi grupami aminokwasów w rozdzielanych białkach, nadając im ładunek ujemny, przez co podczas trwania elektroforezy przesuwają się one w kierunku elektrody dodatniej. Ponieważ ilość SDS przyłączonego do badanych białek jest w tym przypadku proporcjonalna do ich wielkości, możliwe jest rozdzielanie tych cząsteczek pod względem masy (większe przemieszczają się w żelu poliakryloamidowym wolniej od mniejszych) [9]. Białka ufosforylowane zazwyczaj charakteryzują się inną ruchliwością w żelu niż pozbawione tej modyfikacji. Po przeprowadzeniu elektroforezy białka przenoszone są na membranę z nitrocelulozy lub polifluorku winylidenu (PVDF) pod wpływem napięcia elektrycznego. Metoda ta, zwana Western-blot pozwala na późniejszą identyfikację badanych białek z wykorzystaniem technik immunodetekcyjnych. Głównym ograniczeniem SDS-PAGE jest fakt, że nie każda fosforylacja powoduje przesunięcie w ruchliwości elektroforetycznej cząsteczek białkowych w żelu, więc wynik nie zawsze jest wiarygodny [1]. Z tego względu wykorzystuje się także elektroforezę dwuwymiarową, będącą jedną z najskuteczniejszych metod

jeśli chodzi o wykrywanie potranslacyjnych modyfikacji białek [10].

W przypadku elektroforezy dwukierunkowej (2-DE) analiza przeprowadzana jest dwustopniowo. Najczęściej wykorzystuje się rozdział białek w zależności od ich punktu izoelektrycznego (pI), który jest pierwszym etapem elektroforezy. Jest to możliwe ze względu na amfoteryczny charakter białek. Następnie cząsteczki białkowe o podobnym punkcie izoelektrycznym rozdzielane są w elektroforezie SDS-PAGE pod względem masy cząsteczkowej. Niewątpliwą zaletą elektroforezy dwukierunkowej jest możliwość przeprowadzenia jednoczesnego rozdzielania nawet kilku tysięcy białek, z których część mogła nie zostać wcześniej scharakteryzowana.

Metodę tę rozpoczyna ogniskowanie izoelektryczne (IEF, ang. *isoelectric focusing*) w żelu poliakryloamidowym, będące pierwszym wymiarem elektroforezy (oś X), w którym cząsteczki rozdzielane są ze względu na ich punkt izoelektryczny. Wykorzystywany jest żel o zróżnicowanym pH (wartość pH wzrasta ku katodzie), do którego przyłożone jest napięcie elektryczne. Można przygotować go samodzielnie lub kupić w postaci komercyjnie dostępnych pasków IPG (ang. *immobilized pH gradient*). Cząsteczki białkowe migrują w żelu, aż dotrą do miejsca gdzie pH jest równe ich punktowi izoelektrycznemu i tam się zatrzymują. W celu przeprowadzenia rozdziału elektroforetycznego w drugim wymiarze (oś Y) żel lub paski o ustalonych gradientach pH mocuje się na żelu poliakryloamidowym i przeprowadza elektroforezę SDS-PAGE. Plamy reprezentujące interesujące nas białko wizualizuje się z wykorzystaniem techniki Western-blot przy użyciu specyficznych przeciwciał. Mimo znaczących postępów w rozwoju metod badania proteomu elektroforeza dwukierunkowa wciąż pozostaje jedną z najważniejszych metod analizy potranslacyjnych modyfikacji białek [11-13].

Każda dodatkowa grupa fosforanowa powoduje zmianę ładunku elektrycznego białka, a tym samym jego pozycji. Można zatem zaobserwować szereg plam na żelu odpowiadających cząsteczkom białkowym o różnej liczbie grup fosforanowych, co daje nam obraz złożoności procesu fosforylacji zachodzącego w komórce [1] (Ryc. 1).



Rycina 1. Schemat rozdzielania białek z wykorzystaniem elektroforezy dwuwymiarowej. W pierwszym etapie białka są rozdzielane ze względu na ich punkt izoelektryczny (pI), w drugim etapie ze względu na masę cząsteczkową. Opracowano na podstawie [12].

Badania fosforylacji białek prowadzone są od dziesięcioleci, jednakże ostatnie postępy w spektrometrii mas (MS, ang. *mass spectrometry*) zrewolucjonizowały analizę sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, umożliwiając precyzyjną i szybką identyfikację miejsc fosforylacji. Spektrometria mas jest podstawową metodą umożliwiającą określenie dokładnej masy cząsteczkowej białka. Jednakże, w kontekście analizy fosforylacji białek, tandemowa spektrometria mas (MS/MS) jest narzędziem znacznie bardziej precyzyjnym. W podstawowym eksperymencie mapowania miejsc fosforylacji z użyciem MS/MS, oczyszczone białko trawione jest specyficzną proteazą (np. trypsyną) w celu wytworzenia mieszaniny peptydów, zaś równolegle za pomocą algorytmów komputerowych oraz baz danych sekwencji białkowych przeprowadza się teoretyczne przewidywania widm MS/MS. Mapowanie ufosforylowanych peptydów odbywa się poprzez przyrównanie uzyskanych danych do widm teoretycznych, które rozpatrują wszystkie możliwe fosforylowane wersje każdego peptydu [15, 16]. Ciekawą modyfikacją metody MS/MS jest zastosowanie jej w układzie: chromatograf ciekowy - tandemowy spektrometr mas LC MALDI/ToF/ToF (desorpcja laserowa z udziałem matrycy, MALDI, ang. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*; czas przelotu, ToF, ang. *Time of Flight*). W tym układzie poddane uprzedniemu trawieniu proteolitycznemu mieszaniny modyfikowanych i niemodyfikowanych peptydów są przed wykonaniem widm masowych rozdzielane chromatograficznie, co znacznie zwiększa wydajność i precyzję metody [17,18] (Ryc. 2).

Ciągły rozwój spektrometrii mas doprowadził do opracowania kilku technik służących do oznaczania względnej ilości białka, takich jak: etykietowanie izotopowe (ang. *isotopic labelling*) (SILAC [19], ICAT [20], iTRAQ [21], SRM [22], liczenie spektralne (ang. *spectral counting*) [23] lub pomiar natężenia jonu (ang. *Ion intensity measurement*) [23]. Techniki te umożliwiają bezpośrednie porównanie poziomów białka pomiędzy próbkami, dzięki temu dostarczając większej ilości danych na temat ekspresji genu kodującego to białko w układach biologicznych. Obecnie, z technik wymienionych powyżej, dużą popularnością cieszy się metoda znakowania stabilnym izotopem w hodowli komórkowej (SILAC, ang. *stable isotope labeling in cell culture*), bazująca na włączaniu przez komórki do syntezy własnych białek znakowanych izotopowo, nieradioaktywnych aminokwasów dodanych uprzednio do hodowli. Aminokwasy takie jak arginina czy lizyna, które nie mogą być zsyntetyzowane przez komórki ssacze, znakowane są izotopami węgla, azotu lub wodoru, a następnie próby wyznaczone są z próbą kontrolną i poddawane analizie spektrometrycznej, a uzyskane widma mas umożliwiają określenie ewentualnych różnic. Metoda SILAC może być wykorzystana do identyfikacji kinaz białkowych oddziałujących na określone miejsce fosforylacji (znakowanie aminokwasów tworzących miejsca wiązania) bez wcześniejszej wiedzy o szlakach sygnalizacyjnych w komórce, ponadto jest ona techniką niezwykle praktyczną, gdyż nie wymaga zastosowania dodatkowych reakcji chemicznych z wyjątkiem przygotowania pożywki z wyznaczanymi aminokwasami [24].

Po zbadaniu, iż interesujące nas białko ulega fosforylacji, a przede wszystkim po uzyskaniu informacji, które konkretnie reszty aminokwasowe są fosforylowane, kolejnym krokiem jest identyfikacja kinazy lub kinaz bezpośrednio oddziałujących na badane białko. Zastosowanie od początku podejścia eksperymentalnego może okazać się pewnym wyzwaniem. Dzieje się tak po pierwsze dlatego, że wiele kinaz białkowych posiada podobną do siebie domeną katalityczną w obrębie 250–300 reszt aminokwasowych ją tworzących, powoduje fosforylowaniem przez te enzymy tego samego specyficznego motywu peptydowego w białku substratowym. Po drugie wydajność fosforylacji może być na tyle niska, iż bardzo trudno będzie ją wykryć; domeny katalityczne kinaz wykazują niewielkie powinowactwo do miejsc substratowych, a wiele kinaz wiąże się ze swoimi białkami substratowymi poprzez dodatkowe miejsca dokowania (ang. *Secondary docking sites*) [25-28]. Dlatego też badania, które kinazy mogą fosforylować konkretne miejsce w badanym białku, dobrze jest rozpocząć od analizy *in silico*, czyli przeszukiwania dostępnych baz danych takich jak: Motif Scan, PhosphoMotif Finder, NetPhosK oraz KinasePhos. Na podstawie takiej analizy można wytypować na przykład, że fosforylacja reszty serynowej lub treoninowej poprzedzającej w sekwencji białka resztę prolinową (motyw Ser/Thr-Pro) może być katalizowana przez kinazy aktywowane mitogenami (MAPK, ang. *Mitogen-activated protein kinase*), kinazy zależne od cyklin (CDK, ang. *Cyclin-dependent kinase*) oraz kinazę syntazy glikogenu 3 (GSK-3, ang. *Glycogen synthase kinase 3*) [29]. Kolejnym etapem jest weryfikacja uzyskanych z baz danych informacji na drodze eksperymentalnej. Najlepsze wyniki mapowania czyli poszukiwania miejsca fosforylacji w interesującym nas białku pochodzą z podejścia łączącego dane uzyskane zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Korzystne jest zatem opracowanie systemu *in vitro* do generowania fosforylowanego białka potrzebnego do analizy. Ilość materiału wyjściowego wymagana do pomyślnej analizy będzie się prawdopodobnie różnić, ale powinna mieć zastosowanie zasada „im więcej tym lepiej”. W celu ustalenia, czy wytypowane kinazy są bezpośrednio odpowiedzialne za fosforylację badanego białka, przy planowaniu doświadczenia *in vitro* należy pamiętać o zastosowaniu odpowiedniej kontroli negatywnej (reakcji bez dodatku badanej kinazy). Ponadto właściwie przeprowadzona fosforylacja *in vitro* wymaga, aby oczyszczona kinaza była zdolna do skutecznego i umożliwiającego detekcję fosforylowania docelowego białka. Jeśli fosforylacja *in vitro* wymaga wielokrotnego nadmiaru kinazy i długiego czasu reakcji, natomiast ta sama kinaza *in vivo* katalizuje reakcję w ciągu kilku minut, to badane białko może nie być specyficznym substratem lub wymagane są dodatkowe czynniki poprawiające siłę oddziaływania enzym-substrat. Reakcje fosforylacji *in vitro* przeprowadza się najczęściej z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów, a detekcję ufosforylowanego białka można przeprowadzić za pomocą specyficznego przeciwciała lub metodą izotopową [1].

W doświadczeniu *in vivo*, należy najpierw zdefiniować warunki fizjologiczne, w których badane białko jest fosforylowane. Może to obejmować stymulowanie komórek bodźcem aktywowującym sygnalizację lub synchronizację komórek

w odpowiedniej fazie cyklu komórkowego. Prawidłowo zaprojektowane doświadczenie *in vivo* powinno umożliwić uzyskanie białka substratowego z komórek kontrolnych, komórek w których interesująca nas kinaza jest hiperaktywowana oraz komórek z inaktywowaną badaną kinazą. Następnie badane białko substratowe powinno być oczyszczone w warunkach, które pozwalają na zachowanie jego fosforylacji oraz zapewniają uzyskanie wystarczającej jego ilości. Oczyszczanie badanego białka powinno odbywać się za pomocą metod pozwalających na jego specyficzne uwalnianie. Dobrym przykładem jest sprzęgnięcie badanego białka substratowego z metką hemaglutyniny (HA) lub FLAG, a następnie jego oczyszczanie stosując przeciwciała lub elucję nadmiarem peptydu HA lub FLAG [30, 31]. Możliwe jest również oczyszczanie badanego białka poprzez wprowadzenie do niego znacznika TAP (ang. *tandem affinity purification*) lub z innymi znacznikami opartymi na powinowactwie [32, 33].

Kolejnym etapem w prowadzonej analizie fosforylacji może być sprawdzenie wiązania się interesującego nas białka z wytypowanymi kinazami. W tym celu dobrze jest zastosować metody umożliwiające badanie oddziaływań białko-białko, takie jak drożdżowy system dwuhybrydowy [34] lub metoda GST pull-down [35].

PODSUMOWANIE

Fosforylacja białek jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych i różnorodnych modyfikacji potranslacyjnych występujących w naturze, a przede wszystkim jest ona jednym z kluczowych mechanizmów regulacyjnych w komórce. Spektrometria mas, a następnie eksperymentalna walidacja miejsc fosforylacji, a także ich znaczenia dostarczają niezbędnych informacji poszerzających wiedzę o procesach biologicznych. Rozwój technik eksperymentalnych umożliwia badaczowi skupienie się na pojedynczych białkach, co przekłada się na określenie specyficznej roli tych białek oraz nowych miejsc fosforylacji w kaskadzie sygnalizacyjnej. Ponadto analiza fosforylacji poszczególnych białek oraz wpływanie na jej przebieg za pomocą konkretnych związków chemicznych może w niedalekiej przyszłości przyczynić się do opracowania wielu nowych leków na choroby nowotworowe i inne choroby cywilizacyjne.

PIŚMIENNICTWO

1. Dephore N, Gould KL, Gygi SP, Kellogg DR (2013) Mapping and analysis of phosphorylation sites: a quick guide for cell biologists. *Mol Biol Cell* 24: 535-542
2. Whitmarsh AJ, Davis RJ (2000) Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci* 57: 1172-1183
3. Marczak Ł (2009) Oznaczanie modyfikacji potranslacyjnych białek metodami spektrometrii mas. *Biotechnologia* 2: 27-38
4. Paradela A, Albar JP (2008) Advances in the analysis of protein phosphorylation. *J Proteome Res* 7: 1809-1818
5. Zhang H, Zha X, Tan Y, Hornbeck PV, Mastrangelo AJ, Alessi DR, Polakiewicz RD, Comb MJ (2002) Phosphoprotein Analysis Using Antibodies Broadly Reactive against Phosphorylated Motifs. *J Biol Chem* 277: 39379-39387
6. Kalume DE, Molina H, Pandey A (2003) Tackling the phosphoproteome: tools and strategies. *Curr Opin Chem Biol* 7: 64-69
7. Cohen P (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation—a 25 year update. *Trends Biochem Sci* 25: 596-601

8. Guo M, Huang BX (2013) Integration of phosphoproteomic, chemical, and biological strategies for the functional analysis of targeted protein phosphorylation. *Proteomics* 13: 424-437
9. (2013) UMCS, Ćwiczenia z biologii molekularnej (załącznik do ćwiczeń) dla studentów II roku biologii oraz III roku mikrobiologii i biotechnologii. Lublin 1.2
10. Cerny M, Skalak J, Cerna H, Brzobohaty B (2013) Advances in purification and separation of posttranslationally modified proteins. *J Proteomics* 92: 2-27
11. Adams LD, Gallagher SR (2004) Two-dimensional gel electrophoresis. *Curr Protoc Mol Biol* 10.4.1-10.4.23
12. Suchwalko A, Podbielska H (2010) Dwuwymiarowa elektroforeza żelowa: od eksperymentu po profile ekspresji. Część pierwsza – eksperyment. *Acta Bio-Optica et Inf Med* 16(3): 285-292
13. Celis J (ed) (2012) Two-dimensional gel electrophoresis of proteins: methods and applications. Elsevier
14. Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T (2006) Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics* 5: 749-757
15. Geer LY, Markey SP, Kowalak JA, Wagner L, Xu M, Maynard DM, Yang X, Shi W, Bryant SH (2004) Open mass spectrometry search algorithm. *J Proteome Res* 3: 958-964
16. Tabb DL, Fernando CG, Chambers MC (2007) MyriMatch: highly accurate tandem mass spectral peptide identification by multivariate hypergeometric analysis. *J Proteome Res* 6: 654-661
17. Baruthio F, Quadroni M, Rügge C, Mariotti A (2008) Proteomic analysis of membrane rafts of melanoma cells identifies protein patterns characteristic of the tumor progression stage. *Proteomics* 8: 4733-4747
18. Hortin GL (2006) The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptide clinical chemistry. *Clin Chem* 52: 1223-1237
19. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1: 376-386
20. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 17: 994-999
21. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ (2004) Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3: 1154-1169
22. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 4: 222
23. Zhu W, Smith JW, Huang CM (2010) Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Biomed Biotechnol* 2010: 1-6
24. Kupcova Skalnikova H (2013) Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie* 95: 2196-2211
25. Choi KY, Satterberg B, Lyons DM, Elion EA (1994) Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* 78: 499-512
26. Mortensen E, McDonald H, Yates J, Kellogg DR (2002) Cell cycle-dependent assembly of a Gin4-septin complex. *Mol Biol Cell* 13: 2091-2105
27. Harvey SL, Charlet A, Haas W, Gygi SP, Kellogg DR (2005) Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. *Cell* 122: 407-420
28. Dard N, Peter M (2006) Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms. *BioEssays* 28: 146-156
29. Lu KP, Liou YC, Zhou XZ (2002) Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol* 12: 164-172
30. Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutillier K et al (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415: 180-183

31. Harvey SL, Enciso G, Dephoure NE, Gygi SP, Gunawardena J, Kellogg DR (2011) A phosphatase threshold sets the level of Cdk1 activity in early mitosis. *Mol Biol Cell* 22: 3595-3608
32. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17: 1030-1032
33. Ma H, McLean JR, Chao LF, Mana-Capelli S, Paramasivam M, Hagstrom KA, Gould KL, McCollum D (2012) A highly efficient multi-functional tandem affinity purification approach applicable to diverse organisms. *Mol Cell Proteomics* 11: 501-511
34. Joung J, Ramm E, Pabo C (2000) A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(13): 7382-7
35. Vikis HG, Guan KL (2004) Glutathione-s-transferase-fusion based assays for studying protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* 261: 175-86

Methods of analysis of protein phosphorylation

Agnieszka Taracha, Grzegorz Kotarba, Tomasz Wilanowski✉

Laboratory of Signal Transduction, Department of Cell Biology, Nencki Institute of Experimental Biology of Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland

✉e-mail: t.wilanowski@nencki.gov.pl

Key words: protein phosphorylation, protein kinases, polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric point, mass spectrometry

ABSTRACT

Phosphorylation and dephosphorylation play a fundamental role in most signaling pathways, as these processes can directly regulate various aspects of protein function. It is estimated that there are about 100,000 potential phosphorylation sites in proteins encoded by the human genome and about 30–50% of all proteins in the cell can be phosphorylated, which is directly related to the functions they perform. To determine whether a given protein is phosphorylated, any changes in its mobility caused by this modification are examined during PAGE electrophoresis. Concurrently, tandem mass spectrometry (MS/MS) allows to identify specific phosphorylation sites. The next step involves the prediction (using *in silico* analysis) which kinases can phosphorylate a specific site in the given protein. Then, in order to verify the information obtained from databases, *in vitro* and/or *in vivo* experiments are carried out.