

Fosfoproteomik Uygulama Basamaklarına Genel Bakış

An Overview of The Phosphoproteomic Workflow

Mustafa Gani Sürmen¹ , Saime Sürmen¹ , Sadrettin Pençe^{1,2} 

¹Istanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Sürmen MG, Sürmen S, Pençe S. An overview of the phosphoproteomic workflow. Experimed 2018; 8(1): 23-32.

ÖZ

Proteomik çalışmalar, kütle spektrometresi ve kromatografi alanındaki teknolojik gelişmeler sayesinde patolojik ya da fizyolojik olayları daha detaylı olarak değerlendirebilmemize imkan sağlamaktadır. Kütle spektrometresi tabanlı proteomik çalışmaların önemli bir araştırma alanı olan protein fosforilasyonları, hücresel işleyişin patolojik değişiminde moleküler aktivitenin dinamik belirteçleri olarak etkin rol oynar. Bu nedenle hastalıkların moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasında ve etkin tanı-tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde fosfoproteomik çalışmalar artan öneme sahiptir. Fosfoproteinlerin tanımlanması ve miktar analizlerinin yapılabilmesi oldukça verimli tekrarlanabilir yöntemlerin kullanılmasını gerektirir. Bu amaçla fosfoproteomik uygulamalardaki verimliliğin en üst düzeye çıkarılmasında mevcut yöntemler geliştirilmeye devam etmektedir. Kütle spektrometresi tabanlı fosfoproteomik araştırmaların temel metodolojisinin anlatıldığı ve uygulamalarda karşılaşılan zorlukların tartışıldığı bu çalışmanın, MS tabanlı fosfoproteomik alanına ilgi duyan araştırmacılara yardımcı olacağını umuyoruz.

Anahtar Kelimeler: Fosfoproteomik, örnek hazırlığı, zenginleştirme, niceliksel fosfoproteomik, kütle spektrometresi

ABSTRACT

Proteomic studies permit the evaluation of pathological or physiological events in more detail through technological developments in the fields of mass spectrometry and chromatography. Protein phosphorylation, an important research area of mass spectrometry-based proteomic studies, plays an active role as a dynamic marker of molecular activity in the pathological alteration of cellular processes. Therefore, phosphoproteomic studies are gaining importance in the elucidation of molecular mechanisms of diseases and the development of effective diagnostic and treatment methods. Identification and quantitative analysis of phosphoproteins requires the use of highly efficient and reproducible methods. The development of existing methods is ongoing in order to maximize the efficiency of phosphoproteomic applications. We hope that this study, which explains the basic methodology of mass spectrometry-based phosphoproteomic research and discusses its practical challenges, will be useful for researchers interested in MS-based phosphoproteomics.

Keywords: Phosphoproteomics, sample preparation, enrichment, quantitative phosphoproteomics, mass spectrometry

GİRİŞ

İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla birlikte - protein kodlayan yaklaşık 20.000 gen ortaya çıkarılmış, bu genlere ait mutasyonlar ve ekspresyon farklılıkları ortaya konulmuştur (1). İnsan genomunun haritalanması hastalıkların moleküler mekanizmasının anlaşılmasında, erken tespitinde ve tedavisinde büyük umut kaynağı olmuştur. Kapsamlı genomik çalışmalarla tespit edilen mutasyonlar ve ekspresyon farklılıkları çeşitli hastalıklarda rol oynayan sinyal yollarına olan bakış açımızın gelişmesini sağlarken kanser gibi moleküler mekanizması kompleks olan heterojen hastalıkların araştırılmasında sadece genomik analizlerin yeterli olmadığı da anlaşılmıştır. Bununla birlikte yaşanan genomik

devrim; protein, transkript, metabolit veya lipid profillerinin biyoinformatik destekle topluca değerlendirildiği genom sonrası "omik" platformlarının gelişmesine zemin hazırlamıştır (2, 3). Hücrenin fonksiyonel makromolekülleri olan proteinlerin; fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rolünü daha iyi anlamaya yönelik yapılan proteomik çalışmalar son onbeş yıl içerisinde özellikle kanser araştırmalarında önem kazanmıştır (4, 5). Post translasyonel değişiklikler (PTM'ler) ve izoform varyasyon nedeniyle genomun aksine çok daha çeşitli olan proteom aynı zamanda dinamik yapıdadır. Genellikle geri dönüşümlü modifikasyonlar olan fosforilasyonlar, proteinleri aktif ya da inaktif formlarına dönüştürürler. Buna bağlı olarak sinyal iletimi, büyüme ve apoptoz gibi hücrenel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayan fosforilasyonlar,

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mustafa Gani Sürmen **E-mail:** mtsurmen@gmail.com

Geliş Tarihi/Received Date: 17.04.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 24.04.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

en sık çalışılan modifikasyonlar arasında yer alır. Ancak belirli bir protein popülasyonunda yalnızca küçük bir bölüm, belirli bir zaman aralığında ve kısa süreli olarak fosforile olur. Bu nedenle fosfoproteinler, bir hücre lizatı içinde bulunan tüm proteinlerin küçük bir bölümünü temsil eder. Bu durum ise fosfoproteomik analizleri zorlaştıran çok hassas ve spesifik stratejiler gerektirir (6-8). Günümüzde gerçekleştirilen fosfoproteomik çalışmaların ışığı; kütle spektrometresi tabanlı analizler için kritik bir adım olarak kabul edilen zenginleştirme basamağının uygulandığı örnek hazırlığı aşaması, MS analizi ve informatik analiz olmak üzere üç ana başlıkta toplanır (9).

FOSFOPROTEOMİK

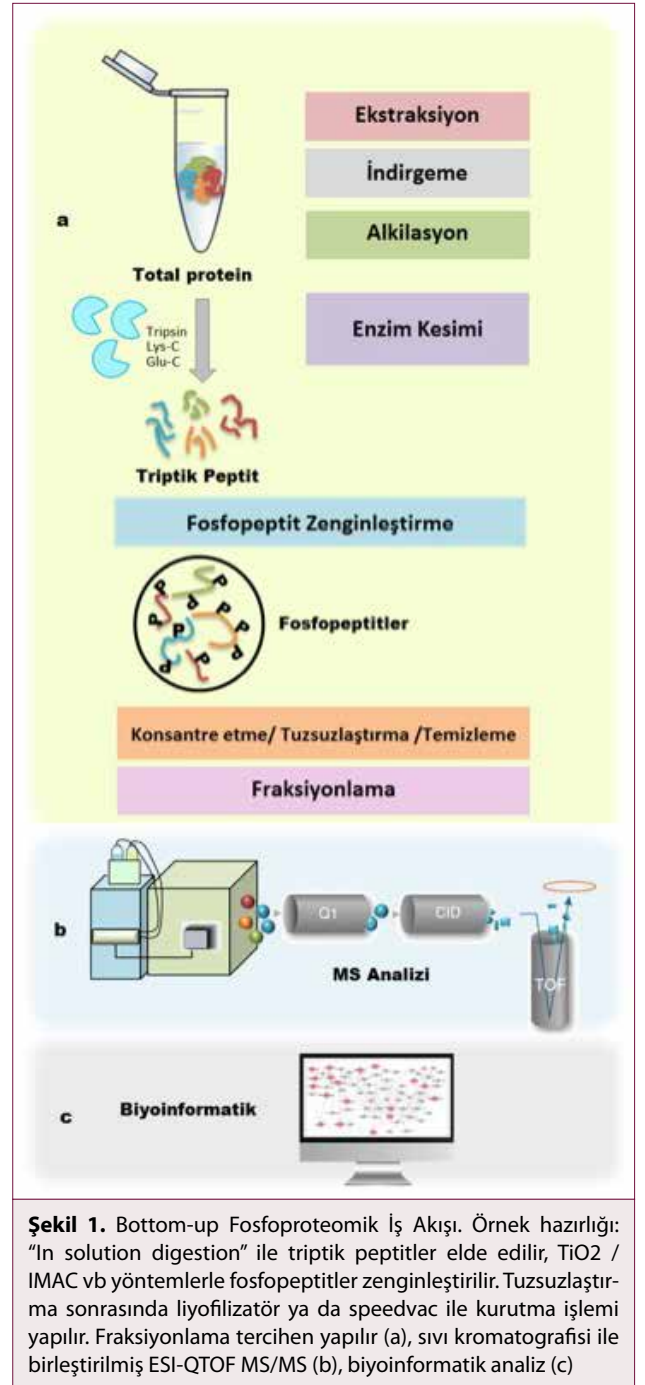
Hücrenin başlıca fonksiyonel makromolekülleri olan proteinler buldukları doku, hücre ve hücresel kompartmanlara göre farklılıklar göstermekle birlikte organizmanın fizyolojik ya da patolojik olan faaliyetleri boyunca dinamik bir profil sergilemektedir. Proteinlerin fonksiyonlarının, ifade farklılıklarının ya da etkileşimlerinin bir bütün halinde incelendiği proteomik çalışmalar; bu dinamik profili, sürekli olarak gelişen MS tabanlı teknolojiler ve preparasyon yöntemleri sayesinde her geçen gün daha net ve daha detaylı bir şekilde açığa çıkarmaktadır. Günümüzde tek bir örnekte binlerce proteini profillemeye kabiliyeti olan bu güçlü teknoloji, fosforile proteinlerin karakterizasyonunda büyük ölçekli çalışmaların önünü açmıştır (8, 10).

MS tabanlı fosfoproteomik çalışmalar için zorunlu bir adım olarak kabul edilen zenginleştirme teknikleri ile ön fraksiyonlama yöntemlerinin kombinasyonel kullanımı; fosfoproteomun kapsamlı profillerinin elde edilmesini sağlayarak proliferasyon, migrasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi temel hücresel süreçlerdeki fosforilasyonların kritik rollerinin ortaya çıkarılmasını kolaylaştırmaktadır. Ancak düşük stokiyometri, geniş dinamik aralık ve fosforile proteinlerin çeşitli izoformları nedeniyle geniş ölçekli bir fosfoproteomik çalışmanın farklı basamaklarında aşılması gereken çeşitli zorluklar ortaya çıkmaktadır (11-13).

Geniş ölçekli fosfoproteomik stratejilerde genellikle, ters faz sıvı kromatografisi ile birleştirilmiş elektrosprey iyonizasyonu (ESI) ve tandem MS kullanımı tercih edilmektedir (14-16). Kütle spektrometresi tabanlı bir çok çalışmadaki fosfoproteomik iş akışı, genellikle kompleks biyolojik örneklerin hazırlanması, örnek içindeki bazı bileşenlerin zenginleştirilmesi ve konsantre edilmesi, LC-MS/MS analizi ve biyoinformatik basamaklarından oluşur (Şekil 1). Örnek hazırlığı ve uygulama adımları, deneyin sonraki tüm basamaklarını telafi edilemez bir şekilde etkilediği için tanımlama, doğrulama ve miktar analizlerinin net bir şekilde yapılabilmesinde kritik öneme sahiptir. Bu nedenle aşağıda belirtilen protein ekstraksiyonu, enzim kesimi, fraksiyonlama (isteğe bağlı), zenginleştirme ve temizleme (clean up, desalting vb.) basamakları örnek hazırlığı başlığı altında daha detaylı olarak incelenecektir.

Örnek Hazırlığı

Proteomik çalışmaların yıllar içerisindeki gelişim sürecinde amaca yönelik olarak Bottom-up ve Top-down yaklaşımları benimsenmiştir. Bu yaklaşımlar iş akışı ve örnek hazırlığı süreçlerinde temel farklılıklar gösterir. MS tabanlı fosfoproteomik ça-

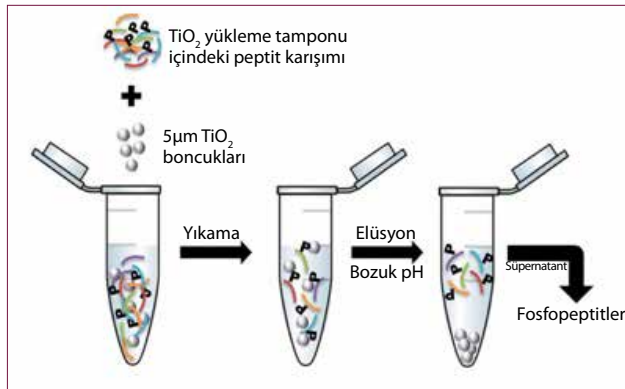


Şekil 1. Bottom-up Fosfoproteomik İş Akışı. Örnek hazırlığı: "In solution digestion" ile triptik peptitler elde edilir, TiO₂ / IMAC vb yöntemlerle fosfopeptitler zenginleştirilir. Tuzsuzlaştırma sonrasında liyofilizatör ya da speedvac ile kurutma işlemi yapılır. Fraksiyonlama tercihen yapılır (a), sıvı kromatografisi ile birleştirilmiş ESI-QTOF MS/MS (b), biyoinformatik analiz (c)

ışmalarda özellikle Bottom-up yaklaşımına ait iş akışı uygulanır (Şekil 1). Fosfopeptitlerin MS analizi sürecine katıldığı ve bunun için proteolitik sindirimin yapıldığı Bottom-up yaklaşımda, triptik peptitler 3 farklı şekilde elde edilir. Bunlar: proteolitik sindirimin ve protein ayırımının jelde gerçekleştirildiği "in gel digestion", triptik peptitlerin sıvı ortamda elde edildiği "in solution" ve filtre destekli örnek hazırlığı olarak bilinen FASP (Filter-aided sample preparation) yöntemleridir (17-20).

Örnek Toplama ve Protein Ekstraksiyonu

Fosfoproteinlerin incelenmesindeki ilk adım numunenin doğ-



Şekil 2. TiO₂ Zenginleştirme İş Akışı. a) TiO₂ boncukları ile zenginleştirme: TFA-Asetonitril-Glikolik asit içeren TiO₂ yüklemeye tamponuna triptik peptitler ve TiO₂ boncukları alınır. 5-10 dk inkübasyondan sonra santrifüj yapılır. Süpernatant temiz bir tüpe alınarak daha az miktarda TiO₂ boncuklarıyla tekrar inkübasyon ve santrifüj yapılır. Bu işlem istenirse birkaç kez tekrarlanabilir. Süpernatant atılarak tüm TiO₂ boncukları toplanır. TFA ve asetonitrilden oluşan yıkama tamponu ile 2 kez yıkama yapılır. TiO₂ boncukları kısa bir süre kurutulur ve son olarak amonyum hidroksit ile elüsyon yapılır (39).

ru şekilde toplanması ve tüm hücre lizatından veya özel olarak hücresel alt birimlerden proteinlerin izolasyonunun gerçekleştirilmesidir. Burada dikkat edilmesi gereken çok önemli bir nokta, biyolojik sistemdeki orijinal durumun korunması için enzimatik aktivitenin durdurulmasıdır. Bu nedenle toplanan numune, gerekli işlemler yapılarak hızlı bir şekilde dondurulur ve -80°C'de saklanır. Protein ekstraksiyonu aşaması ise istenmeyen protein degradasyonlarının önlenmesi için enzimatik aktivitenin minimum olduğu +4°C'lik bir ortamda ya da buz üzerinde gerçekleştirilir. Çünkü hücrenin lizis aşamasında proteaz ve fosfatazlar aktifleşir ve gerekli önlemler alınmadığı takdirde proteinler bozulabilir ve değişen pH'la birlikte fosfoproteinler üzerindeki fosfat grupları kaybolabilir (21). Bununla birlikte en iyi korumanın sağlanması için örneğin çözündürülmesinde ve ekstraksiyonun ilk adımlarında, kullanılan tamponlara proteaz ve fosfataz inhibitörleri eklenir (22). Hem proteaz hem de fosfataz inhibitörlerini uygun oranlarda içeren hepsi bir arada kokteyller ticari olarak satılmaktadır.

Triptik Peptit Eldesi

Rastgele degradasyonun önlenmesi MS analizinde elde edilen sonuçlara net bir şekilde yansımaktadır. Enzim kesiminin yeterli verimlilikte gerçekleşmemesi durumunda MS spektrumundan yeterli ürün bilgisi elde edilemez. Proteaz enziminin kesim bölgesine ulaşabilmesi için polipeptit zincir primer hale getirilir. Polipeptit zincirindeki arjinin ve lizin kalıntılarını kesen tripsin, bu süreçte en sık kullanılan proteazdır. Bunların dışında Asp-N, Glu-C ve Lys-C olarak adlandırılan çeşitli proteazlar da kullanılmaktadır (23).

Tuzsuzlaştırma-Konsantr Etme

Lizis aşamasında protein dışı makromoleküller ve iyonlar, proteinlerle aynı ortamı paylaşır. Ayrıca homojenizasyon ve triptik

peptidin elde edilmesinde kullanılan çeşitli kimyasallar da kirliliğe neden olur. Sonuçların verimliliğini etkileyen bu kontaminant moleküller analiz öncesinde doğru bir şekilde uzaklaştırılmalıdır. Bu amaçla, farklı uygulama yolları olan temizleme, tuzsuzlaştırma ve konsantr etme işlemleri zenginleştirme öncesinde ya da zenginleştirme sonrasında yapılabilmektedir. Bu işlemlerin bir arada ya da ayrı ayrı yapıldığı C18 materyal içeren çeşitli yöntemler ve ticari ürünler mevcuttur (24, 25). Kontaminantları uzaklaştırmak üzere zenginleştirme sonrasında grafit kolonları kullanılabildiği gibi örnek, analiz cihazına verildikten sonra analitik kolon öncesi trapping kolonu ve metodu kullanılarak da uzaklaştırma yapılabilmektedir (26). MS analizi öncesinde fosfoproteinlerin uzun süre saklanabilmesi ve konsantr edilmesi için genellikle liyofilizatör ya da vakum konsantratör (speedvac) cihazları kullanılır. Liyofilizasyon sonrasında örnekler -80°C'de analiz sürecine kadar saklanabilir.

Zenginleştirme Stratejileri

Kompleks biyolojik numunelerde çok düşük ve çok yüksek miktarda bulunan proteinlerin MS analiz sürecine birlikte katılması, protein profilinin doğru bir şekilde oluşturulmasında önemli bir sorun teşkil eder. Çok düşük miktarda bulunan fosfoproteinlerin genellikle peptit seviyesinde zenginleştirildiği bu basamak bu nedenle kritik öneme sahiptir. Fosfat grubunun kimyasal özellikleri temel alınarak geliştirilen çeşitli zenginleştirme stratejileri; immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC), metal oksit afinite kromatografisi (MOAC), immun afinite ve kimyasal türevlendirme şeklinde gruplandırılır (27-33). En eski zenginleştirme stratejilerinden olan IMAC yönteminde, genellikle Fe⁺³, Al⁺³ ve Ga⁺³ metal iyonları bir matriks ortamında (kromatografik kolon, MALDI plate ya da manyetik boncuklar gibi) şelatlanmış olarak bulunur ve pozitif yüklü bu metal iyonlarının, negatif yüklü fosfat gruplarını yakalaması esasına dayanır. Kuvvetli asidik tamponların kullanıldığı MOAC yönteminde de benzer prensipten faydalanılır ancak TiO₂, ZrO₂, Fe₃O₄ gibi metal oksitler fosfoproteinlere kovalent bağlanır. Farklı asit türleri ve farklı pH'da tamponlar kullanılarak IMAC ve MOAC yöntemlerinin çok sayıda modifiye formu geliştirilmiştir (34-38). Şekil 2'de temel adımları anlatılan TiO₂ ile zenginleştirme global fosfoproteomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Her iki fosfoprotein zenginleştirme yöntemiyle ilgili temel sorunlardan birisi, negatif yüklü karboksil grupları ile pozitif yüklü metal iyonları arasındaki zayıf afiniteden dolayı fosforile olmamış asidik peptidlerin spesifik olmayan tutunmasıdır (39). Fosforile serin ve treonin kalıntılarında kimyasal grubun eklendiği türevlendirme yöntemlerinin hassasiyeti ise IMAC ve MOAC yöntemlerinden çok daha düşüktür. Türevlendirme basamaklarında oluşabilecek yan reaksiyonlar ve düşük hassasiyet nedeniyle bu yöntem fosfoproteomik çalışmalarda çok az tercih edilmektedir (39, 40). Literatürde reseptör tirozin kinazların hedef alındığı çok sayıda fosfoproteomik çalışma mevcuttur. Bu tür çalışmalarda serin ve treonin kalıntılarındaki fosforilasyona göre çok daha az görülen tirozin fosforilasyonu için spesifik antikörlerin geliştirildiği immün afinite zenginleştirme yöntemi kullanılır (27, 41).

Bu temel yöntemler daha verimli bir zenginleştirme protokolünün geliştirilmesi amacıyla çeşitli fraksiyonlama yöntemleriyle

kombine edilmiştir. Ayrıca SIMAC, PolyMAC ve Phostag gibi geliştirilen farklı yöntemler de bulunmaktadır (42-44).

Fraksiyonlama

Ters faz, SAX (Güçlü Anyon Değişimi), HILIC (Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi), SCX (Güçlü Katyon Değişimi) ve ERLIC (Elektrostatik İtme Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi) gibi tercihen kullanılan kromatografik yöntemler zenginleştirme basamağının verimliliğini arttırmaktadır. Özgünlükleri farklılık gösteren bu yöntemler, biyolojik örneğin karmaşık içeriğinin sadeleştirilmesinde farklı avantajlar sunar. Bu nedenle kullanılacak ön-fraksiyonlama yöntemi, çalışmanın amacına ve tercih edilecek diğer uygulama tekniklerine göre değişkenlik gösterir (45-50).

Kütle Spektrometresi Analizi

İyonizasyon: Binlerce fosfopeptidin ya da fosforilasyon bölgesinin tanımlanması, yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrelerinin yine yüksek basınçlı sıvı kromatografileriyle birleştirilmesiyle sağlanır. Zenginleştirme sonrası analize hazır hale getirilen fosfopeptit preparatları, kromatografi sistemlerinde polaritelemine göre ayrılır. Daha sonra yumuşak iyonizasyon sağlayan bir iyonizasyon kaynağı ile gaz faz iyonlar elde edilir. Fosfoproteomik çalışmalarda genellikle ESI kullanılmakla birlikte MALDI ve DESI gibi farklı iyonizasyon kaynakları da vardır.

Elektrosprey iyonizasyonu, sıvı kromatografisinden gelen faz ile örnek enjeksiyonundan oluşan karışımın, MS cihazı öncesinde iyonizasyon kaynağına alınarak, pozitif veya negatif yüklü iyonlar elde etmek üzere şartlandırılması esasına dayanır. Sıvı fazı spreyleyecek olan iğne, izole bölmenin duvarlarına ve spreyleyecek içeriğinin dağılımını yönlendirmeye yardımcı olan geniş silindirik elektroda karşı yüksek voltajla yüklenmiş olarak uzanır. İğne ucunda oluşan elektriksel alan, spreylene sıvının yüklenmesini sağlar. Elektrik alanına maruz kalan damlacıkların çapı, iğne etrafından bölme içine verilen basınçlı sıcak gazın yardımıyla giderek küçülür. Damlacıklar belirli bir süre sonra bir patlama şeklinde çok daha küçük taneciklere ayrılarak iyonik moleküllerden oluşan bir buhar haline gelirler ve yayılan iyonlar ince bir hattan (cone) geçerek MS cihazının iç kısımlarına yönlendirilirler. İyonlar daha sonra kütle analizöründen geçerek, kütle/yük (m/z) oranına göre dedektöre ulaşır. Oluşan sinyaller m/z oranına bağlı olarak göreceli bolluklarını temsil eden bir kütle spektrumu grafiği şeklinde görüntülenir. Elektrosprey iyonizasyon tekniği, karmaşık biyolojik örnekleri oldukça etkin bir şekilde analiz edilebilecek forma getirerek MS sistemlerinin klinik çalışmalarda kullanılmasına büyük katkı sağlamıştır (51, 52). Ancak ESI kaynağının bazı sınırlamaları vardır. Kontaminant madde içeren ve göreceli olarak düşük konsantrasyonda olan örneklerin iyonizasyon verimliliği düşük olur ve buna bağlı olarak analiz sonrası sekans bilgisinin ve dolayısıyla tanımlanacak protein sayısının da düşük olmasına neden olur. Analiz gücündeki yetersizliğin üstesinden gelmek üzere triptik peptit karışımı halinde örneklerde fosfopeptitlerin zenginleştirilmesi amacıyla zaman içinde birçok yeni metot geliştirilmiş ya da metot iyileştirmeleri yapılmıştır. Bu bağlamda ilgili olmayan peptitler büyük ölçüde ortamdaki uzaklaştırılmış ve sinyal güçleri artan

fosfopeptitlerin daha fazla sayıda ve daha doğru bir şekilde tanımlanması hedeflenmiştir (53-55).

Yaklaşık 30 yıl önce biyolojik örneklerin analizinde kullanılmaya başlanan MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) teknolojisi, yapılan çeşitli iyileştirmelerle fosfoproteomik çalışmalar dahil olmak üzere günümüzde de kullanılmaya devam etmektedir (56, 57). MALDI-TOF kütle spektrometresi, analit moleküllerini içinde barındıran ve iyonizasyonu sağlayan kimyasal bir matriksin lazerle vurulması yoluyla gaz fazına geçmiş iyonik moleküllerin MS analizörlerine yönlendirilmesi esasına göre çalışır (58). MALDI çalışmalarında fosforile peptidlerin iyonizasyon verimliliğini arttırmak amacıyla çeşitli kimyasallardan oluşan kombinasyonlarla yeni matriksler oluşturulmaya çalışılmıştır. Matriks kombinasyonu olarak metandifosfonik asit ve 2,5-dihidroksibenzoik asitin uygulandığı bir çalışmada hem fosfopeptit sinyallerinin anlamlı bir şekilde yükseltildiği hem de ortamdaki başka iyonik ürünlere dair sinyal gürültülerinin temizlendiği bildirilmiştir (59, 60).

Yöntemlerin verimliliğini arttırmak ve örnek hazırlığı sırasındaki uzun ve zahmetli süreçleri kısaltmak için farklı zamanlarda iyon kaynağıyla ilgili çeşitli alternatif çalışmalar yapılmıştır. Karmaşık matrislerden çok çeşitli moleküllerin analizine imkan sağlayan DESI-MS (Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry) metotlarında elektrosprey voltajı, solvent infüzyon oranı ve kompozisyonu gibi enstrümental değerler analiz gücünü etkilemektedir (61). 2013 yılında yayınlanan bir çalışmada fosfopeptitlerin etkili bir şekilde iyonlaştırılmasında nispeten hızlı bir metot geliştirilmiştir. Çalışmada peptit zincirleri üzerindeki fosfat gruplarının deprotonasyonunu baskılamak amacıyla, hazırlanan örnek preparatının pH değeri oldukça düşürülmüş ve desorpsiyon elektrosprey iyonlaştırma kütle spektrometresi kullanılarak doğrudan analiz yapılmıştır (62). Biyolojik örneklerin analizinde DESI kullanımına olan ilgi son yıllarda yapılan çalışmalarda da görülmektedir (63, 64).

Fragment iyonların elde edilmesi: İyonize olan peptitler önce analizöre ardından da parçalanma hücrelerine gönderilirler. Peptitler, enerji yüklenmiş inert gaz yardımıyla spektrumları verecek fragmentlere parçalanırlar. Peptit iskeletinin parçalanmasında çarpışma kaynaklı ayrışmanın (Collision-induced dissociation; CID) kullanımı fosfat gruplarının kaybına neden olabilir. Buna bağlı olarak oluşan nötr kayıplar, parçalanma verimliliğini düşürür ve peptit dizisinin doğru bir şekilde yorumlanmasını zorlaştırır. Alternatif olarak daha az nötr kayıpların gözlemlendiği elektron transfer ayrımı (electron transfer dissociation; ETD), elektron yakalama ayrımı (electron capture dissociation; ECD) ve ışın tipi CID (beam-type CID veya high-energy collision dissociation; HCD) gibi farklı parçalanma türleri de kullanılmaktadır. Birbirini tamamlayan iki teknik olarak ETD ve CID'in birlikte kullanımı, parçalanma verimliliğini arttırabilmektedir (65-68).

Spektrumların elde edilmesi: Parçalanma sonrasında peptit fragmentleri kütle ve iyonik yüklerine göre belirli bir hızla yol alarak detektörün önündeki plakaya çarparlar ve elektrovolt

cinsinden bir enerji üretilmesine sebep olurlar. MS analizi sonucunda fragmentlerden, kütle/yük (m/z) oranlarına göre spektrumlar oluşturulur (69-71).

Diğer proteomik çalışmalarda olduğu gibi fosfoproteomik çalışmalarda da cihazın çözünürlük gücü, kütle doğruluğu, dinamik aralık, hassasiyet ve parçalanma teknikleri gibi özellikler, elde edilecek sonuçları dolayısıyla da MS analizlerini de içine alan bütün bir çalışmanın gidişatını doğrudan etkileyen önemli parametrelerdir (72).

Biyoinformatik

MS analizi sürecinde elde edilen spektrumlardan oluşan ham verilerin analizi, güçlü yazılımlarla yapılmaktadır. PLGS (Waters Corp., Milford, MA), Progenesis (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK), Mascot (Matrix Science, London, UK), Proteome Discoverer (ThermoScientific, Bremen, Germany) ve MaxQuant (<http://www.maxquant.org>) gibi programlar, ham verilerin dijital olarak belirli filtrelerle göre değerlendirilmesini sağlamaktadır (73, 74). Phospho.ELM (<http://phospho.elm.eu.org/>), PhosidaPHOSIDA (<http://www.phosida.com/>) UniprotKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org>) ise fosfoproteomik çalışmalarda veritabanı olarak en çok kullanılan araçlardır. Genel olarak internet üzerinden erişilebilen veri tabanlarından yola çıkarak tanımlanan proteinlerin etkileşimlerini, hangi yolakta bulduklarını ve ne tür görevlere sahip olduklarını belirlemek için Reactome (<http://www.reactome.org/>), IPA (IPA, QIAGEN, Redwood City, CA, USA, www.qiagen.com/ingenuity), Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) ve KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) gibi programlar kullanılabilir (75-78).

NİCELİKSEL FOSFOPROTEOMİK

Niceliksel fosfoproteomik çalışmalar, protein ya da peptit seviyesinde olabilir. Protein seviyesinde yapılan miktar tayinlerinde jelli sistemler kullanılır. Geleneksel proteomik olarak adlandırılan 1D (Tek boyutlu jel elektroforezi), 2D-PAGE (iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi) ve 2D-DIGE (diferansiyel jel elektroforezi) gibi jelli sistemlerde proteinler polarite ve moleküler büyüklüklerine göre ayrılır. 2D yaklaşımda fosfoproteinler öncelikle pozitif ya da negatif yüklerine göre belirli bir pH yönünde hareket eder. Her bir fosfoprotein net yükünün sıfır olduğu izoelektrik noktasında (pI) göç tamamlanır. İkinci boyutta ise proteinler, SDS gibi denatüre eden ajan içeren bir tampon içerisinde moleküler büyüklüklerine göre ayrılır. Daha sonra comasie mavisi ve gümüş nitrat gibi çeşitli boyaların kullanılmasıyla proteinlerin spotlar halinde görüntülenmesi sağlanır. Floresan boyamanın yapıldığı 2D-DIGE yöntemiyle tek bir jelde daha fazla sayıda proteinin daha hassas miktar analizi yapılabilmektedir (78-81). Bununla birlikte miktar analizi için western-blot gibi antikor tabanlı yöntemler de kullanılmaktadır. MS tabanlı bir fosfoproteomik çalışmanın sonucunda bulunan belirli proteinlerin doğrulanması bu yöntemlerle yapılabilir (82).

Uzun yıllar boyunca protein kantifikasyonu çalışmalarında kullanılan temel yöntemler, proteinleri izoelektrik değerlerine ve moleküler ağırlıklarına göre ayıran jelli sistemler olmuştur. Ancak jel tabanlı yöntemler; belirli molekül ağırlığına veya pl

değerlerine sahip proteinlerin tespitinin zorluğu, bir tek nokta üzerinde farklı proteinlerin bulunabilmesi ve görece az sayıda örneğin çalışılabilmesi gibi sınırlılıklara sahiptir (83, 84).

MS yöntem ve teknolojilerindeki gelişmelere bağlı olarak büyük ölçekli protein ekspresyonu ve karakterizasyonu çalışmalarını gerçekleştirme imkanı sunan "shotgun" proteomik teknikleri jelli yöntemlerin yerini almaya başlamıştır. MS tabanlı kantitatif proteomik uygulamaları içerisinde yer alan kararlı izotop etiketli yöntemler, izotopların kütle dışındaki özelliklerinin ortak olması nedeniyle gelişmiş kütle dedektörlerinin kullanıldığı MS tabanlı kantitatif çalışmalarda büyük avantaj sağlamıştır. Ancak etiketli kantifikasyon çalışmalarında da, kullanılan tekniklere göre değişen bazı zorluklar söz konusudur. Etiketlemenin tam olarak gerçekleşmemesi, metabolik olaylar ile etiketli molekülün başka bir moleküle dönüşebilmesi, bazı yöntemlerde etiketlemenin gerçekleşmesi için örnek materyalinin metabolik olarak aktif olması gerekliliği, sadece az sayıda örneğin bir arada çalışılabilmesi, preparasyon sürecinin çok uzun sürmesi, maliyetlerin yüksek olması ve informatik yazılımlarının yeteri kadar güvenilir olmaması gibi zorluklar, etiketli yöntemlere dair sınırlılıkların önemli bir kısmını oluşturmaktadır (85, 86).

Bu bağlamda hasta-kontrol eşleştirmesi yapılarak çok sayıda numunenin analiz edildiği biyobelirteç çalışmalarında etiketsiz yöntemlerin tercih edildiği görülmektedir. Örnek hazırlığı aşamasındaki bir takım kolaylıklar, gelişmiş hesaplama araçlarıyla informatik programlarının daha güçlü hale gelmesi, özellikle global protein ekspresyon farklılıklarının araştırıldığı çok sayıda numune içeren çalışmalarda etiketsiz yöntemlerin tercih edilmesini sağlamıştır (87).

Etiketli Yöntemler

Etiketlemeler metabolik, enzimatik ve kimyasal olarak gerçekleştirilebilir. Fosfoproteomik çalışmalarda, en çok metabolik etiketlemenin yapıldığı SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture) yöntemi kullanılır (88). Bu yöntemde etiketleme, hücrelerin iki farklı hücre kültürü ortamında büyütilmesiyle gerçekleştirilir (89). Hücre popülasyonlarından birinin besiyerine hafif diğer bir deyişle doğal ¹²C, ¹⁴N atomlarına sahip arjinin ve lizin aminoasitleri eklenirken diğerine ağır izotop (¹³C, ¹⁵N) etiketli arjinin ve lizin aminoasitleri eklenir. Hücre ortamlarından biri 5-6 pasaj sonrasında, ağır izotoplu aminoasitlerle etiketlenmiş olur. Etiketleme sürecinin tamamlanmasından sonra her iki ortamdaki hücreler birleştirilerek kesim ve zenginleştirme basamakları uygulanır. Etiketli peptit çiftleri arasındaki pik yoğunluklarının (intensity) oranı, fosfoproteinlerin miktar değişimlerinin göreceli olarak belirlenmesini sağlar. Yüksek etiketleme oranına sahip SILAC yönteminin en önemli avantajlarından biri, etiketli örneklerin iş akışının ilk basamaklarında birleştirilmesiyle yapılan hataların en aza indirgenmesidir. Bu nedenle güvenilir, doğru ve tekrarlanabilir bir miktar tayini için oldukça sık tercih edilen kolay uygulanabilir kantitatif yöntemdir. SILAC uygulamalarında genellikle iki farklı hücresel durumun karşılaştırması yapılır. Bununla birlikte üç farklı izotop formlarının kullanıldığı 3-pleks ya da 5-pleks SILAC ile tek bir deneyde ikiden fazla hücresel du-

Tablo 1. Fosfoproteomik çalışmalarda kullanılan yöntem, teknik ve yaklaşımlar

Sindirim işlemi	Sıvı içinde (In-solution) kesim, Jelde kesim, Filtre-destekli örnek hazırlığı (FASP)
Zenginleştirme Yöntemleri	IMAC, MOAC, SIMAC, Antikor tabanlı Immünoafinite, Kimyasal türevlendirme, PolyMAC, PhosTag
Tuzsuzlaştırma (Desalting)	ZipTip, Katı-Faz Ekstraksiyon (SPE), Spin-tip kolon, Trapping kolon
Fraksiyonlama	SCX, SAX, HILIC, ERLIC, Ters faz sıvı kromatografisi
Niceliksel Analiz	Etiketli (SILAC, ITRAQ, TMT) , Etiketsiz
İyonizasyon Kaynağı	ESI, MALDI, DESI
Parçalanma Türü	CID/CAD, ETD, ECD, HCD
Analiz Programları	Mascot, Progenesis, PLGS, X!TANDEM, MaxQuant
Veri tabanları	PHOSIDA, Phospho.ELM, NetworkKIN, Motif-X, KEGG, IPA, DAVID, STRING, Cytoscape
<p>IMAC: immobilized metal affinity chromatography; MOAC: metal-oxide affinity chromatography; SIMAC: sequential elution from IMAC; SCX: strong cationic ion-exchange chromatography; SAX: strong anionic ion-exchange chromatography; HILIC: hydrophilic interaction liquid chromatography; ERLIC: electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography; SILAC: stable isotope labeling with amino acids in cell culture; ITRAQ: isobaric tags for absolute and relative quantification; TMT: tandem mass tag; ESI: electrospray ionization; MALDI: matrix-associated laser desorption/ionization; DESI: desorption electrospray ionization mass spectrometry; CID/CAD: collision-induced dissociation; ETD: electron transfer dissociation; ECD: electron capture dissociation; HCD: high-energy collision dissociation</p>	

rum karşılaştırılabilmektedir (90, 91). SILAC yönteminin, hücre hatları dışında zebrafish, drosophila, nematod ve fare gibi organizmalarda da uygulaması yapılmıştır (92-95). Ancak bu organizmalardaki metabolik hızın düşük olması nedeniyle etiketleme verimliliği azdır. Sınırlı sayıda hücresel durumun karşılaştırdığı SILAC yönteminin bu nedenle en büyük dezavantajı doku ya da biyolojik sıvılar için uygulanabilirliğinin düşük olmasıdır. Dahili standartların kullanıldığı Pulsed-SILAC ve Super-SILAC tekniklerinin geliştirilmesiyle bu dezavantajların önüne geçilmeye çalışılmaktadır (92, 96).

Fosfoproteomik çalışmalarda kullanılan diğer etiketli yöntemler ise ITRAQ (Isobaric tags for absolute and relative quantification) ve TMT (tandem mass tag)'dir. SILAC yöntemine alternatif olarak ITRAQ ve TMT yöntemleri daha fazla sayıda örneği etiketleme imkanı sunar (88, 97). Bununla birlikte doku ve biyolojik sıvılar gibi farklı biyolojik numunelerde uygulanabilir olması önemli bir avantaj sağlar. SILAC ve diğer etiketli yöntemler ilaç hedeflerinin, ilaç direncinin, hücre döngüsü gelişiminin ya da sinyal yollarının araştırıldığı çalışmalarda kullanılabilir (6, 98).

Etiketsiz Yöntemler

Etiketli yöntemlerin aksine etiketsiz kantitatif yöntemlerde numunelerin preparasyonu ayrı ayrı yapılır ve preparatlar tek tek MS analizine tabi tutulurlar. Protein kantifikasyonunda kromatografideki pik yüksekliği veya peptit pik alanları gibi bolluğu ifade eden parametrelerin değişimi üzerinden hesaplama yapılabilmektedir. Kantifikasyonun diğer bir aracı ise MS analizi sonrasında tanımlanan proteinlerin spektral sayımıdır. Bu araçların kullanımı ile belirli bir biyolojik örnek içindeki her bir proteinin bolluğu, diğer örneklerdekine göre etiketsiz olarak tespit edilebilmektedir (99). Etiketsiz kantifikasyon; preparasyon aşamasının nispeten daha ucuz, kolay, hızlı olması ve analiz sırasında

etiketleme verimliliğine bağlı varyasyonların görülmemesi nedeniyle ciddi avantajlar sağlamaktadır (100).

Pik Yoğunluğu ve Spektral Sayım

MS analizi sonucu elde edilen kromatogramlardaki belirli bir analite ait nispi yoğunluk ile aynı analitin örnek preparatındaki konsantrasyonu arasında doğrusal bir ölçütün bulunması, pik yoğunluğu hesabı ile yapılan rölatif kantifikasyonun temelini oluşturmaktadır. Protein bolluğundaki bir artış doğal olarak preparatta bulunan ilgili proteinin triptik peptitlerinin artışına ve MS/MS spektrumlarının artışına neden olacaktır (101). Temel olarak örnek içerisinde daha bol bulunan proteinin, daha fazla peptit ile ifade edileceği prensibine dayanan spektral sayım tekniği; protein abundance index (PAI ve emPAI), absolute protein expression (APEX), normalized spectral index (SIN) gibi hesaplama araç ve stratejilerinin geliştirilmesiyle hem rölatif hem de mutlak kantifikasyonun aynı örneklerle uygulanabilmesine imkan verir. Spektral sayıma dayalı kantifikasyon, pik yoğunluğu hesaplamasına göre geniş ölçekli proteomik çalışmalara daha uygun ve daha tekrarlanabilir özelliktedir (102, 103).

SONUÇ

Fosfoproteinlere ait ifade farklılıklarının, fonksiyonel özelliklerin ya da etkileşimlerin yüksek verimlilikle değerlendirilmesinde kütle spektrometreleri popüler araçlar haline gelmiştir. Çalışmaların hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği için numune seçimi, toplama süreci ve kullanılan yöntemler dikkat edilmesi gereken önemli unsurlardır. Örnek hazırlığının her bir aşaması farklı yöntemler kullanılarak yapılabilir de genel eğilim belirli teknikleri öne çıkarmaktadır. Örneğin; çok sayıda zenginleştirme yöntemi olmasına rağmen fosfopeptitler genellikle TiO₂ ile zenginleştirilmektedir. Diğer fosfopeptitlere nazaran düşük miktarda bulunan fosfotirozin içeren peptitler için de immünoafinite zenginleştirme yöntemi kullanılmaktadır.

Farklı hücrel koşulların bilgisini taşıyan her bir örneğin protein çeşitliliğini doğru nicel değerlendirmelerle ortaya koyabilmek moleküler olayların aydınlatılmasında, hastalıklara dair biyobelirteçlerin tespit edilmesinde veya geliştirilecek ilaç hedeflerini bulmada büyük önem taşımaktadır. Proteomik alanında istenilen bu doğru nicel değerlendirmeleri elde edebilmek için etiketsiz yöntemlerin yanısıra çeşitli etiketleme teknikleri halen geliştirilmeye devam etmektedir. Etiketsiz yöntemler büyük ölçekli kantitatif proteomik çalışmalarda avantaj sağlasa da özellikle numune hazırlığı sırasında meydana gelebilecek olumsuzluklar analiz gücünü etkileyebilen bazı sınırlamalara sebep olmaktadır. Ağır ve hafif etiketli numunelerle göreceli kantifikasyonun gerçekleştirildiği kararlı izotop etiketleme ise yaygın bir yöntem haline gelmiştir. Çalışmalarda hücre hatlarının kullanılması, hem verilerin daha doğru yorumlanmasında hem de daha öncesinde bahsettiğimiz fosfoproteomik örnek hazırlığı aşamasında büyük avantajlar sağlamaktadır. Bu nedenle çalışmaların büyük çoğunluğunda özellikle kantifikasyonda kolaylık sağlaması açısından hücre hatları kullanılmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında protein ekspresyon farklılıkları genellikle SILAC ile değerlendirilirken doku ve serum gibi biyolojik örneklerin kullanıldığı çalışmalarda TMT, ITRAQ ve etiketsiz yöntemler avantaj sağlamaktadır (Tablo 1).

Son on yılda yapılan yoğun araştırmalar, fosfoproteomik çalışmalarda özellikle fosfopeptit zenginleştirme için daha spesifik tekniklerin geliştirilmesine katkı sağlamıştır. Ancak geliştirilen çok sayıda yöntem ve ekipmana rağmen kompleks numunelerle yapılan geniş ölçekli çalışmalardaki birinci sınırlayıcı faktör, oldukça spesifik ve tekrarlanabilir bir fosfoproteomik iş akışının olmamasıdır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - M.G.S., S.S.; Tasarım - M.G.S., S.S.; Denetleme - S.P.; Kaynaklar - M.G.S., S.S.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - M.G.S., S.S.; Analiz ve/veya Yorum - S.P., M.G.S., S.S.; Literatür Taraması - M.G.S., S.S.; Yazıyı Yazan - M.G.S., S.S.; Eleştirel İnceleme - S.P.

Teşekkür: Yazarlar, destekleri için Prof. Dr. Nesrin Emekli'ye teşekkür ederler.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - M.G.S., S.S.; Design - M.G.S., S.S.; Supervision - S.P.; Resource - M.G.S., S.S.; Data Collection and/or Processing - M.G.S., S.S.; Analysis and/or Interpretation - S.P., M.G.S., S.S.; Literature Search - M.G.S., S.S.; Writing - M.G.S., S.S.; Critical Reviews - S.P.

Acknowledgements: The authors would like to thank Prof. Dr. Nesrin Emekli for her supports.

Conflict of Interest: Authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931-45. [CrossRef]
2. Ram PT, Mendelsohn J, Mills GB. Bioinformatics and systems biology. *Mol Oncol* 2012; 6: 147-54. [CrossRef]
3. Li L, Wei Y, To C, et al. Integrated omic analysis of lung cancer reveals metabolism proteome signatures with prognostic impact. *Nat Commun* 2014; 5: 5469. [CrossRef]
4. Kisluk J, Ciborowski M, Niemira M, Kretowski A, Niklinski J. Proteomics biomarkers for non-small cell lung cancer. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 101: 40-9. [CrossRef]
5. Shukla HD, Vaitiekunas P, Cotter RJ. Advances in membrane proteomics and cancer biomarker discovery: current status and future perspective. *Proteomics* 2012; 12: 3085-104. [CrossRef]
6. Harsha HC, Pandey A. Phosphoproteomics in cancer. *Mol Oncol* 2010; 4: 482-95. [CrossRef]
7. Zhang Z, Wu S, Stenoien DL, Paša-Tolić L. High-throughput proteomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 2014; 7: 427-54. [CrossRef]
8. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*. 2016; 537: 347-55. [CrossRef]
9. Leitner A. Enrichment strategies in phosphoproteomics. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 105-21. [CrossRef]
10. de Hoog CL, Mann M. Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004; 5: 267-93. [CrossRef]
11. Piersma SR, Knol JC, de Reus I, et al. Feasibility of label-free phosphoproteomics and application to base-line signaling of colorectal cancer cell lines. *J Proteomics* 2015; 127(Pt B): 247-58.
12. Herring LE, Grant KG, Blackburn K, Haugh JM, Goshe MB. Development of a tandem affinity phosphoproteomic method with motif selectivity and its application in analysis of signal transduction networks. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2015; 988: 166-74. [CrossRef]
13. Macek B, Mann M, Olsen JV. Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009; 49: 199-221. [CrossRef]
14. Zhang Y, Zhang Y, Yu Y. Global Phosphoproteomic Analysis of insulin/Akt/mTORC1/S6K Signaling in Rat Hepatocytes. *J Proteome Res* 2017; 16: 2825-35. [CrossRef]
15. Rolland D, Basrur V, Conlon K, et al. Global phosphoproteomic profiling reveals distinct signatures in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Am J Pathol* 2014; 184: 1331-42. [CrossRef]
16. Zahari MS, Wu X, Pinto SM, et al. Phosphoproteomic profiling of tumor tissues identifies HSP27 Ser82 phosphorylation as a robust marker of early ischemia. *Sci Rep* 2015; 5: 13660. [CrossRef]
17. Han C, Yang P. Two dimensional gel electrophoresis-based plant phosphoproteomics. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 213-23. [CrossRef]
18. Grandjean M, Sermeus A, Branders S, et al. Hypoxia integration in the serological proteome analysis unmasks tumor antigens and fosters the identification of anti-phospho-eEF2 antibodies as potential cancer biomarkers. *PLoS One* 2013; 8: e76508. [CrossRef]
19. Zawadzka AM, Schilling B, Cusack MP, et al. Phosphoprotein secretome of tumor cells as a source of candidates for breast cancer biomarkers in plasma. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13: 1034-49. [CrossRef]

20. Zhang H, Xu Y, Filipovic A, et al. SILAC-based phosphoproteomics reveals an inhibitory role of KSR1 in p53 transcriptional activity via modulation of DBC1. *Br J Cancer* 2013; 109: 2675-84. [\[CrossRef\]](#)
21. Espina V, Edmiston KH, Heiby M, et al. A portrait of tissue phosphoprotein stability in the clinical tissue procurement process. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 1998-2018. [\[CrossRef\]](#)
22. Rothenberg DA, Gordon EA, White FM, Lourido S. Identification of direct kinase substrates using analogue-sensitive alleles. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 71-84. [\[CrossRef\]](#)
23. Wiśniewski JR, Mann M. Consecutive proteolytic digestion in an enzyme reactor increases depth of proteomic and phosphoproteomic analysis. *Anal Chem* 2012 20; 84: 2631-7. [\[CrossRef\]](#)
24. Bath TS, Olsen JV. Offline High pH reversed-phase peptide fractionation for deep phosphoproteome coverage. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 179-92. [\[CrossRef\]](#)
25. Jersie-Christensen RR, Sultan A, Olsen JV. Simple and reproducible sample preparation for single-shot phosphoproteomics with high sensitivity. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 251-60. [\[CrossRef\]](#)
26. Premsler T, Lewandowski U, Sickmann A, Zahedi RP. Phosphoproteome analysis of the platelet plasma membrane. *Methods Mol Biol* 2011; 728: 279-90. [\[CrossRef\]](#)
27. Rush J, Moritz A, Lee KA, et al. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 94-101. [\[CrossRef\]](#)
28. Boersema PJ, Foong LY, Ding VM, et al. In-depth qualitative and quantitative profiling of tyrosine phosphorylation using a combination of phosphopeptide immunoaffinity purification and stable isotope dimethyl labeling. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 84-99. [\[CrossRef\]](#)
29. Thaler F, Valsasina B, Baldi R, et al. A new approach to phosphoserine and phosphothreonine analysis in peptides and proteins: chemical modification, enrichment via solid-phase reversible binding, and analysis by mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2003; 376: 366-73. [\[CrossRef\]](#)
30. Tsumoto H, Ra M, Samejima K, Taguchi R, Kohda K. Chemical derivatization of peptides containing phosphorylated serine/threonine for efficient ionization and quantification in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22: 965-72. [\[CrossRef\]](#)
31. Negroni L, Claverol S, Rosenbaum J, Chevet E, Bonneau M, Schmitter JM. Comparison of IMAC and MOAC for phosphopeptide enrichment by column chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012; 891-892: 109-12. [\[CrossRef\]](#)
32. 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: 219-31. [\[CrossRef\]](#)
33. Ruprecht B, Koch H, Medard G, Mundt M, Kuster B, Lemeer S. Comprehensive and reproducible phosphopeptide enrichment using iron immobilized metal ion affinity chromatography (Fe-IMAC) columns. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14: 205-15. [\[CrossRef\]](#)
34. Tsai CF, Hsu CC, Hung JN, et al. Sequential phosphoproteomic enrichment through complementary metal-directed immobilized metal ion affinity chromatography. *Anal Chem* 2014; 86: 685-93. [\[CrossRef\]](#)
35. Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jørgensen TJ. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 873-86. [\[CrossRef\]](#)
36. Wan H, Yan J, Yu L, et al. Zirconia layer coated mesoporous silica microspheres used for highly specific phosphopeptide enrichment. *Talanta* 2010; 82: 1701-7. [\[CrossRef\]](#)
37. Blacken GR, Volný M, Diener M, et al. Reactive landing of gas-phase ions as a tool for the fabrication of metal oxide surfaces for in situ phosphopeptide enrichment. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009; 20: 915-26. [\[CrossRef\]](#)
38. Chen SY, Juang YM, Chien MW, Li KI, Yu CS, Lai CC. Magnetic iron oxide nanoparticle enrichment of phosphopeptides on a radiate microstructure MALDI chip. *Analyst* 2011; 136: 4454-9. [\[CrossRef\]](#)
39. Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR. Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* 2009; 9: 1451-68. [\[CrossRef\]](#)
40. McLachlin DT, Chait BT. Improved beta-elimination-based affinity purification strategy for enrichment of phosphopeptides. *Anal Chem* 2003; 75: 6826-36. [\[CrossRef\]](#)
41. van der Mijl JC, Labots M, Piersma SR, et al. Evaluation of different phospho-tyrosine antibodies for label-free phosphoproteomics. *J Proteomics* 2015; 127(Pt B): 259-63.
42. Thingholm TE, Jensen ON, Robinson PJ, Larsen MR. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 661-71. [\[CrossRef\]](#)
43. Iliuk A, Jayasundera K, Schluttenhofer R, Tao WA. Functionalized soluble nanopolymers for phosphoproteome analysis. *Methods Mol Biol* 2011; 790: 277-85. [\[CrossRef\]](#)
44. Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Koike T. Phosphopeptide detection with biotin-labeled phos-tag. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 17-29. [\[CrossRef\]](#)
45. Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJ. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2008; 391: 151-9. [\[CrossRef\]](#)
46. Edelman MJ. Strong cation exchange chromatography in analysis of posttranslational modifications: innovations and perspectives. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 936508. [\[CrossRef\]](#)
47. Han G, Ye M, Zhou H, et al. Large-scale phosphoproteome analysis of human liver tissue by enrichment and fractionation of phosphopeptides with strong anion exchange chromatography. *Proteomics* 2008; 8: 1346-61. [\[CrossRef\]](#)
48. Zarei M, Sprenger A, Metzger F, Gretzmeier C, Dengjel J. Comparison of ERLIC-TiO₂, HILIC-TiO₂, and SCX-TiO₂ for global phosphoproteomics approaches. *J Proteome Res* 2011; 10: 3474-83. [\[CrossRef\]](#)
49. Zarei M, Sprenger A, Gretzmeier C, Dengjel J. Rapid combinatorial ERLIC-SCX solid-phase extraction for in-depth phosphoproteome analysis. *J Proteome Res* 2013; 12: 5989-95. [\[CrossRef\]](#)
50. Zarei M, Sprenger A, Rackiewicz M, Dengjel J. Fast and easy phosphopeptide fractionation by combinatorial ERLIC-SCX solid-phase extraction for in-depth phosphoproteome analysis. *Nat Protoc* 2016; 11: 37-45. [\[CrossRef\]](#)
51. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246: 64-71. [\[CrossRef\]](#)
52. Ho CS, Lam CW, Chan MH, et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* 2003; 24: 3-12.
53. Dunn JD, Reid GE, Bruening ML. Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2010; 29: 29-54.
54. Beltran L, Cutillas PR. Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics. *Amino Acids* 2012; 43: 1009-24. [\[CrossRef\]](#)
55. Carruthers NJ, Rosenspire AJ, Caruso JA, Stemmer PM. Low level Hg(2+) exposure modulates the B-cell cytoskeletal phosphoproteome. *J Proteomics* 2018; 173: 107-14. [\[CrossRef\]](#)

56. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 1997; 69: 4751-60. [\[CrossRef\]](#)
57. Jiang J, Sun X, Li Y, Deng C, Duan G. Facile synthesis of Fe(3)O(4)@PDA core-shell microspheres functionalized with various metal ions: A systematic comparison of commonly-used metal ions for IMAC enrichment. *Talanta* 2018; 178: 600-7. [\[CrossRef\]](#)
58. Karas M, Krüger R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem Rev* 2003; 103: 427-40. [\[CrossRef\]](#)
59. Stensballe A, Jensen ON. Phosphoric acid enhances the performance of Fe(III) affinity chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry for recovery, detection and sequencing of phosphopeptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004; 18: 1721-30. [\[CrossRef\]](#)
60. Kuyama H, Sonomura K, Nishimura O. Sensitive detection of phosphopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: use of alkylphosphonic acids as matrix additives. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22: 1109-16. [\[CrossRef\]](#)
61. Chen H, Talaty NN, Takáts Z, Cooks RG. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput analysis of pharmaceutical samples in the ambient environment. *Anal Chem* 2005; 77: 6915-27. [\[CrossRef\]](#)
62. Pan N, Liu P, Cui W, Tang B, Shi J, Chen H. Highly efficient ionization of phosphopeptides at low pH by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst* 2013; 138: 1321-24. [\[CrossRef\]](#)
63. Carson RH, Lewis CR, Erickson MN, et al. Imaging regiospecific lipid turnover in mouse brain with desorption electrospray ionization mass spectrometry. *J Lipid Res* 2017; 58: 1884-92. [\[CrossRef\]](#)
64. Honarvar E, Venter AR. Ammonium bicarbonate addition improves the detection of proteins by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2017; 28: 1109-17. [\[CrossRef\]](#)
65. Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods* 2007; 4: 709-12. [\[CrossRef\]](#)
66. Zubarev RA. Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 12-6. [\[CrossRef\]](#)
67. Qi Y, Volmer DA. Electron-based fragmentation methods in mass spectrometry: An overview. *Mass Spectrom Rev* 2017; 36: 4-15. [\[CrossRef\]](#)
68. Nardiello D, Palermo C, Natale A, Quinto M, Centonze D. Strategies in protein sequencing and characterization: multi-enzyme digestion coupled with alternate CID/ETD tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2015; 854: 106-17. [\[CrossRef\]](#)
69. Choudhary C, Mann M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 427-39. [\[CrossRef\]](#)
70. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 437-73. [\[CrossRef\]](#)
71. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207. [\[CrossRef\]](#)
72. Silva AM, Vitorino R, Domingues MR, Spickett CM, Domingues P. Post-translational modifications and mass spectrometry detection. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 925-41. [\[CrossRef\]](#)
73. Ravikumar V, Macek B, Mijakovic I. Resources for assignment of phosphorylation sites on peptides and proteins. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 293-306. [\[CrossRef\]](#)
74. Hoos MD, Richardson BM, Foster MW, et al. Longitudinal study of differential protein expression in an Alzheimer's Mouse model lacking inducible nitric oxide synthase. *J Proteome Res* 2013; 12: 4462-77. [\[CrossRef\]](#)
75. Song L, Wang F, Dong Z, Hua X, Xia Q. Label-free quantitative phosphoproteomic profiling of cellular response induced by an insect cytokine paralytic peptide. *J Proteomics* 2017; 154: 49-58. [\[CrossRef\]](#)
76. Kanshin E, Giguère S, Jing C, Tyers M, Thibault P. Machine learning of global phosphoproteomic profiles enables discrimination of direct versus indirect kinase substrates. *Mol Cell Proteomics* 2017; 16: 786-98. [\[CrossRef\]](#)
77. Jünger MA, Aebersold R. Mass spectrometry-driven phosphoproteomics: patterning the systems biology mosaic. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2014; 3: 83-112. [\[CrossRef\]](#)
78. Croft D, Mundo AF, Haw R, et al. The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: D472-7. [\[CrossRef\]](#)
79. May C, Brosseron F, Chartowski P, Meyer HE, Marcus K. Differential proteome analysis using 2D-DIGE. *Methods Mol Biol* 2012; 893: 75-82. [\[CrossRef\]](#)
80. May C, Brosseron F, Pfeiffer K, Meyer HE, Marcus K. Proteome analysis with classical 2D-PAGE. *Methods Mol Biol* 2012; 893: 37-46. [\[CrossRef\]](#)
81. Dyballa N, Metzger S. Fast and sensitive coomassie staining in quantitative proteomics. *Methods Mol Biol* 2012; 893: 47-59. [\[CrossRef\]](#)
82. Li R, Liao G, Nirujogi RS, et al. phosphoproteomic profiling reveals Epstein-Barr virus protein kinase integration of DNA damage response and mitotic signaling. *PLoS Pathog* 2015; 11: e1005346. [\[CrossRef\]](#)
83. Wang G, Wu WW, Zeng W, Chou CL, Shen RF. Label-free protein quantification using LC-coupled ion trap or FT mass spectrometry: Reproducibility, linearity, and application with complex proteomes. *J Proteome Res* 2006; 5: 1214-23. [\[CrossRef\]](#)
84. Abdallah C, Dumas-Gaudot E, Renaut J, Sergeant K. Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. *Int J Plant Genomics* 2012; 2012: 494572. [\[CrossRef\]](#)
85. Gouw JW, Krijgsveld J, Heck AJ. Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 11-24. [\[CrossRef\]](#)
86. van der Wal L, Demmers JAA. Quantitative Mass Spectrometry-based Proteomics. Mahdeldin S (ed). *Recent Advances in Proteomics Research*. London: InTech Open; 2015.
87. Zhao Z, Wu F, Ding S, et al. Label-free quantitative proteomic analysis reveals potential biomarkers and pathways in renal cell carcinoma. *Tumour Biol* 2015; 36: 939-51. [\[CrossRef\]](#)
88. Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal Bioanal Chem* 2012; 404: 939-65. [\[CrossRef\]](#)
89. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 376-86. [\[CrossRef\]](#)
90. Ong SE, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol* 2005; 1: 252-62. [\[CrossRef\]](#)
91. Chen X, Wei S, Ji Y, Guo X, Yang F. Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *Proteomics* 2015; 15: 3175-92. [\[CrossRef\]](#)
92. Nolte H, Hölper S, Housley MP, et al. Dynamics of zebrafish fin regeneration using a pulsed SILAC approach. *Proteomics* 2015; 15: 739-51. [\[CrossRef\]](#)
93. Sury MD, Chen JX, Selbach M. In vivo stable isotope labeling by amino acids in *Drosophila melanogaster*. *Methods Mol Biol* 2014; 1188: 85-93. [\[CrossRef\]](#)
94. Fredens J, Færgeman NJ. Quantitative proteomics by amino acid labeling identifies novel NHR-49 regulated proteins in *C. elegans*. *Worm* 2012; 1: 66-71. [\[CrossRef\]](#)

95. Geiger T, Velic A, Macek B, et al. Initial quantitative proteomic map of 28 mouse tissues using the SILAC mouse. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12: 1709-22. [\[CrossRef\]](#)
96. Shenoy A, Geiger T. Super-SILAC: current trends and future perspectives. *Expert Rev Proteomics* 2015; 12: 13-9. [\[CrossRef\]](#)
97. Wang J, Gao L, Lee YM, et al. Target identification of natural and traditional medicines with quantitative chemical proteomics approaches. *Pharmacol Ther* 2016; 162: 10-22. [\[CrossRef\]](#)
98. Harsha HC, Pinto SM, Pandey A. Proteomic strategies to characterize signaling pathways. *Methods Mol Biol* 2013; 1007: 359-77. [\[CrossRef\]](#)
99. Yu F, F. Qiu, and J. Meza. Design and statistical analysis of mass-spectrometry-based quantitative proteomics data. Ciburowski P, Silberring J (eds). *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads*. New York: Elsevier Inc; 2016: p.211. [\[CrossRef\]](#)
100. Drabovich AP, Pavlou MP, Batruch I, Diamandis EP. Proteomic and mass spectrometry technologies for biomarker discovery. Issaq HJ, Veenstra TD (eds). *Proteomic and metabolomic approaches to biomarker discovery*. Boston: Elsevier/AP; 2013: pp.17-37. [\[CrossRef\]](#)
101. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 1265-72. [\[CrossRef\]](#)
102. Martins-de-Souza D, ed. *Shotgun Proteomics*. *Methods in Molecular Biology* 1156. Berlin: Springer; 2014.
103. Silberring JA, Ciburowski P. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads* New York: Elsevier Inc; 2016: p.145.