

HPLC-FosfoChip una nueva tecnología para el análisis selectivo de fosfopéptidos mediante LC/MS

Isidro Masana¹, Reinout Raijmakers², Shabaz Mohammed², Albert Heck², Dayin Lin³

¹Agilent Technologies–Barcelona. ²Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics Group, Bijvoet Center and Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences –Utrecht–Netherlands. ³Agilent Technologies Waldbronn-Germany

La fosforilación de proteínas es uno de los más importantes mecanismos de modificación post-traduccional (PTM) para regular la función de las proteínas en las células. Miles de procesos biológicos, incluyendo la proliferación, migración y apoptosis celular, implican pasos de fosforilación. Uno de los principales esfuerzos en proteómica va dirigido a la identificación y comprensión de los fosfoproteomas en las células.

El enriquecimiento selectivo de péptidos y proteínas fosforiladas es necesario para conseguir una mejor cobertura del fosfoproteoma. El enfoque

necesarios crean retos en cuanto a su fiabilidad, robustez y reproducibilidad. La automatización de las etapas de enriquecimiento y de separación analítica, son la mejor manera de conseguir una buena reproducibilidad, inyección a inyección y entre distintos laboratorios. El nuevo chip microfluídico: Phospho-chip es un HPLC-Chip reutilizable diseñado para enriquecimiento y análisis fosfopeptídico [1-2] que permite la automatización de ese flujo de trabajo.

El chip consiste en una multicapa de poliimida laminada que contiene una zona de enriquecimiento-

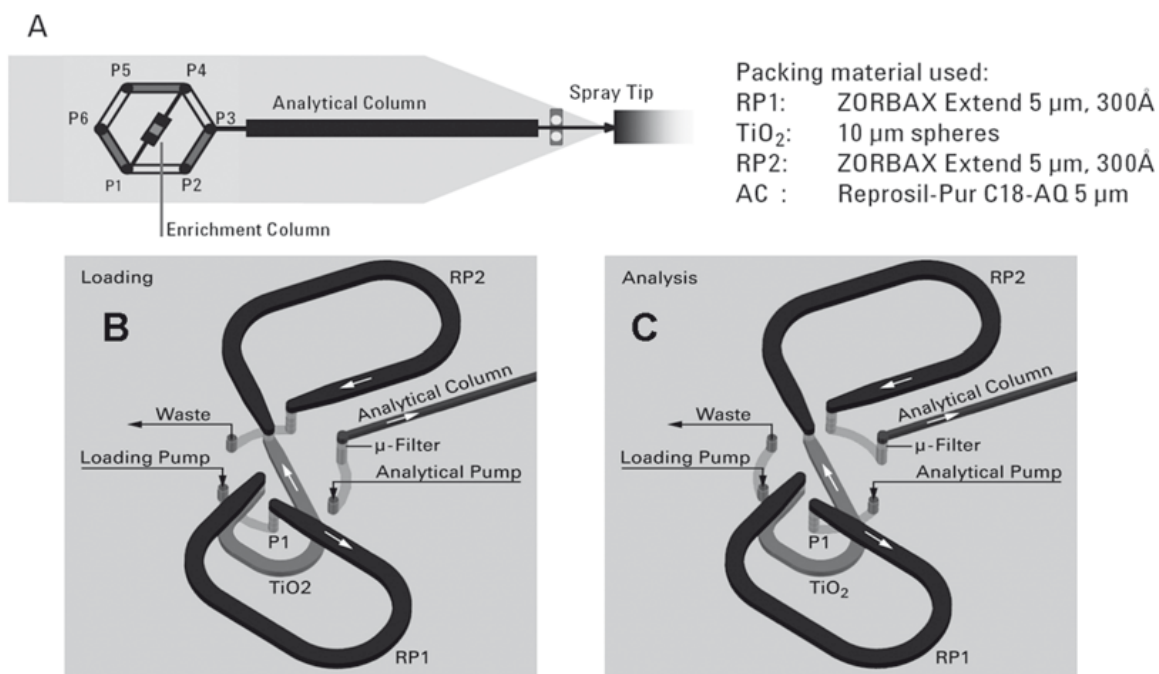


Figura 1. Diseño del FosfoChip: (A). El FosfoChip incorpora una columna de enriquecimiento encapsulada con: RP-TiO₂-RP. (B). Posición de carga para enriquecimiento de péptidos. (C). Etapa de separación de péptidos a través de columna analítica.

basado en dióxido de titanio es un método particularmente robusto y automatizable con una gran afinidad por los fosfopéptidos. No obstante, las múltiples micro-válvulas, conexiones y micro-capilares

to con partículas de dióxido de titanio (TiO₂), flanqueada a ambos lados por material de fase reversa C18 (ver Figura 1). La zona de enriquecimiento está conectada a la columna de separación

de fase reversa que acaba en una punta integrada de nanoelectrospray.

A través del “Chip-cube” (la interfase al MS del HPLC-Chip), una micro-válvula conecta directamente el nano-cromatógrafo con la superficie del chip. Ello crea un sello de alta presión y cero volumen muerto, y permite la automatización de la carga de muestras, desalinización, elución desde la pre-columna de enriquecimiento, y separación final en la columna analítica mediante un gradiente de la concentración de solvente orgánico del eluyente. El FosfoChip se complementa con un kit de reactivos para el análisis de fosfopéptidos en cualquier sistema HPLC-Chip/MS (Agilent QTOF/QqQ/TOF/Q). El kit incluye una mezcla acondicionadora y un estándar para saturar todos los potenciales puntos de adsorción de fosfopéptidos del HPLC.

El conjunto de columna de enriquecimiento empaquetada con RP1-TiO₂-RP2, permite en un sólo experimento la retención y análisis por separado de péptidos fosforilados y no fosforilados. El chip puede operar en dos modos diferentes, según interesen o no los péptidos no fosforilados. En el primer modo, cuando sólo interesan fosfopéptidos, la gran mayoría de los péptidos se atraparán inicialmente en RP1. La elución posterior de péptidos con solvente orgánico los arrastrará hasta la fase TiO₂, donde sólo se retendrán los fosfopéptidos, desechándose los péptidos no fosforilados (no retenidos). En la

siguiente etapa, los fosfopéptidos se desorben del TiO₂ con un tampón de elución básico, atrapándose en RP2. Finalmente, se realiza un gradiente para separar los fosfopéptidos en la columna analítica.

En el modo dual (fosforilados y no fosforilados), previamente a la separación de los fosfopéptidos, se lleva a cabo un gradiente de elución de los péptidos retenidos en RP1 dirigiéndolos a la columna analítica para separar los péptidos no fosforilados (los fosforilados permanecen retenidos en el TiO₂). Finalmente en un segundo gradiente se realiza la separación de los péptidos fosforilados (previa elución de estos de la columna de TiO₂ a la RP2 como se indicaba en el párrafo anterior).

Parte experimental

Un lisado de proteínas de células de osteosarcoma U2OS humano se redujo, alquiló y se digirió con tripsina. Los péptidos resultantes se fraccionaron por cromatografía SCX y 200µg de la fracción que teóricamente contenía la mayoría de péptidos ionizados con 1 sola carga neta (conocida por contener la mayoría de fosfopéptidos), se analizó con un Agilent HPLC-Chip/MS conectado a un Q-TOF Agilent-6520 y se compararon los resultados obtenidos mediante el FosfoChip y un HPLC-Chip standard mediante MS/MS automático.

El 90% de la señal total se encontró en el “flowthrough” (Figura 2), la fracción no retenida

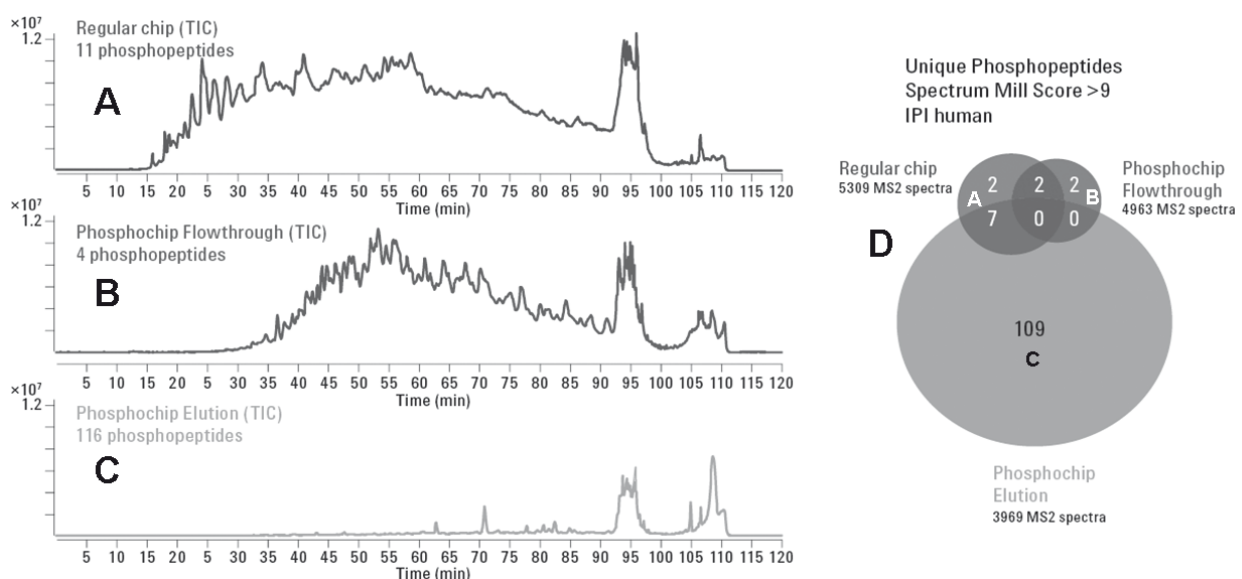


Figura 2. Comparación análisis de fosfopéptidos fracción SCX de péptidos mono-cargados de osteosarcoma U2OS humano: (A) con HPLC-Chip estándar; (B) FosfoChip: fracción no retenida en TiO₂; (C) FosfoChip: Fracción retenida en TiO₂ (fosfopéptidos). (D) Número de fosfopéptidos únicos identificados con Spectrum Mill.

en TiO₂. El análisis de la fracción retenida en TiO₂, con el motor Spectrum Mill y la base de datos humana IPI, permitió la identificación de 116 fosfopéptidos. En contraste, sólo 11 fosfopéptidos se identificaron cuando la misma muestra se analizó con el HPLC-Chip estándar. Como era de esperar, los componentes mayoritarios no fosforilados, enmascararon la identificación de los fosfopéptidos en muestras en las que no se realizó el paso de enriquecimiento/ separación en TiO₂. Ello es debido a la falta de tiempo para adquirir en un pico cromatográfico, los espectros de MS/MS de péptidos minoritarios (como los fosforilados), cuando estos coeluyen con diversos péptidos mayoritarios y se trabaja en Auto-MS/MS.

Referencias

- [1] Mohammed S, et al. Chip-Based Enrichment and NanoLC/MS/MS Analysis of Phosphopeptides from Whole Lysates. *J Proteome Res* 2008; 7(4): 1565-71.
- [2] Raijmakers R, Mohammed S, J.R Heck A. Lin D., Masana I., HPLC-FosfoChip: análisis selectivo de Fosfopéptidos por LC/MS. *Lifescienceslab* 2009; 5 :30-35.

Identification of a new phosphorylation site in E2F1 transcription factor

Nerea Osinalde¹, Miren Josu Omaetxebarria¹, Kerman Aloria², Ana M. Zubiaga³, Asier Fullaondo³, Jesus M. Arizmendi¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of the Basque Country, Leioa, Spain.

²Proteomics Core Facility-SGIker (ProteoRed), University of the Basque Country, Leioa, Spain.

³Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, University of the Basque Country, Leioa, Spain.

The E2F transcription factor family (E2F1-8) is required for the regulation of a number of genes involved in several essential cellular processes. It is for that reason that the activity of E2Fs must be carefully controlled. Reversible phosphorylation is one of the main regulatory mechanisms controlling the activity of proteins that has also been described for E2Fs. Several phosphorylation events have already been described for E2F1 but the ones described so far are insufficient to completely understand how this transcription factor is regulated. In order to identify new phosphorylation sites, E2F1 was immunoprecipitated and following protease mediated digestion was loaded onto TiO₂ microcolumns. The enriched fractions were analyzed by LC-MS/MS. This methodology allowed the identification of a new E2F1 phosphorylation site not described to date.

Introduction

E2Fs (E2F1-8) play a central role in cell cycle progression, DNA damage repair, apoptosis, cell differentiation and development. Each of this family members are known to regulate more than one cellular process depending on the stimuli they are subjected to. For instance, E2F1-dependent transcription is essential for cell proliferation but depending on the cellular context can also trigger cell death. That is why E2F-dependent transcription needs to be tightly regulated. Transcriptional activity of each E2F is modulated at various levels. Not only protein-protein interaction and subcellular localization but also post-translational modifications such as acetylation and phosphorylation have been proven to regulate and determine the specific roles of E2Fs. For instance, it is known that the DNA binding capacity