

(DDNL) for phosphopeptide analysis, we identified a differential phosphorylation pattern before and after the formation of the protein complex. The analysis of the individual proteins showed that Cyclin-A2 is phosphorylated on two Ser residues (Ser14 and Ser421) and CDK2 on a single residue (Thr160). After the formation of the heterodimer Cyclin-A2 was phosphorylated only on Ser14 whereas CDK2 presented two Thr residues (Thr39 and Thr160). These results suggest that baculovirus expression represents an efficient system for the production of functional proteins and the analysis of authentic phosphorylation sites in regulatory proteins.

References

- Abbas, T., Jha, S., Sherman, N.E., Dutta, A. *Cell Cycle*. 2007. 6: 843-852.
- Casado-Vela, J., Ruiz, E.J., Nebreda, A., Casal, I. *Proteomics*. 2007: 7, 2522-2529.
- Malumbres, M., Barbacid, M. *Nature Reviews in Cancer*. 2002. 1: 222-231.
- Ortega, S, Prieto, I., Odajima, J., Martin, A., et al. *Nature Genetics*. 2003. 35: 25-37.

Identificación de fosfopéptidos en células T humanas primarias mediante IMAC y TiO_2 secuencial

Casas V, Carrascal M, Ovelleiro D, Gay M, Abián J.

LP-CSIC/UAB, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Rosellón 161, 7 Planta, 08036 Barcelona, Spain.

Introducción

La fosforilación de proteínas es uno de los principales mecanismos para la regulación de la función celular en eucariotas. El conjunto de proteínas fosforiladas de una célula, tejido u organismo constituye el denominado fosfoproteoma. Un mal funcionamiento de los mecanismos de fosforilación proteica puede tener graves implicaciones patológicas y pueden ser la causa o la consecuencia de enfermedades autoinmunes como la diabetes o la artritis reumatoide o de enfermedades que, como el cáncer, implican fallos en la regulación de la proliferación o diferenciación celular. Fármacos como la ciclosporina o la rapamicina son inhibidores de cinasas y fosfatasas. La identificación de nuevos sustratos de fosforilación y la caracterización de sus funciones así como de sus niveles en diversas condiciones son pasos necesarios tanto para mejorar la comprensión de los mecanismos celulares como para el desarrollo de nuevos fármacos. Con este objetivo en este trabajo se han puesto a punto tecnologías combinadas de purificación haciendo uso de columnas IMAC y TiO_2 para la purificación de fosfopéptidos a partir de células T humanas purificadas de sangre periférica.

Material y métodos

- *Preparación de las muestras*: los pellets enriquecidos en linfocitos T se obtuvieron a partir de concentrados leucoplaquetarios mediante centrifugación en gradiente de Ficoll, se lisaron en 6M urea, 50 mM Tris pH 7.4, DTT, inhibidores de fosfatasas y proteasas y las proteínas se precipitaron con 10% TCA y lavado con acetona y se separaron mediante SDS-PAGE. El gel se tiñó con Coomassie y se cortó en 11 bandas que se digirieron con tripsina. El extracto peptídico se evaporó y se redisolvió en 100 μl de 250 mM AcOH/30% ACN
- *Purificación con IMAC y TiO_2* : se adicionaron 20 μl de fase Phos-Select a la mezcla de péptidos y se incubó durante 90 min. Los fosfopéptidos se eluyeron con 1% NH_4OH (1) El material no retenido se diluyó en 1M ácido glicólico, 5% TFA, 80% ACN y se cargó en una columna de TiO_2 preparada en una punta de pipeta Gel Loader Tip (2). Los fosfopéptidos se eluyeron con NH_4OH , pH 10.5 y con ACN al 30%.

- *PC-capLC- μ ESI-IT-MS/MS*: las muestras se inyectaron en un sistema cromatográfico conectado *on-line* a un espectrómetro de masas de trampa iónica lineal (LTQ, ThermoFisher). El análisis se realizó en modo dependiente, adquiriéndose un espectro de barrido completo y 8 MS/MS de las señales más abundantes. En el caso de los fosfopéptidos que perdían el grupo fosfato, se realizó un tercer barrido de MS³ sobre el ión derivado de dicha pérdida. Se utilizó el software SEQUEST para la búsqueda en bases de datos.

únicos correspondientes a 247 proteínas. Alrededor de la mitad de estos puntos de fosforilación no se encuentran anotados en SwissProt. Esta colección deriva de espectros de fragmentación de alta fiabilidad seleccionados en condiciones muy restrictivas en las que no se obtenía ningún falso positivo cuando la búsqueda se realizaba sobre el conjunto de las bases de datos SwissProt y Trembl humanas mezcladas con las mismas bases de datos invertidas. En el caso de fosforilación en Ser se han podido definir al menos 4 motivos claros de fosforilación. Esta colección es la única existente hasta el momento en linfocitos T primarios humanos.

Resultados

El análisis de estos extractos nos ha permitido caracterizar 331 puntos de fosforilación (279 pSer, 49 pThr y 8 pTyr) en un total de 322 fosfopéptidos

Bibliografía

Bodenmiller et al. Nat. Methods 4, 231-237 (2007);
(2) Thingholm et al. Nat. Protoc. 1, 1929-1935 (2007).

Phosphoproteomics: analytical strategies and computational data analysis

López Villar E. *, Nombela C. §, Hjernø K. *, Jensen ON*

* Biochemistry & Molecular Biology, Protein Research Group, Odense University, Southern Denmark. § Microbiology II, Pharmacy Faculty, Complutense University of Madrid, Spain.

In order to achieve high-sensitivity analysis of phosphoproteomes with a high dynamic range, it is crucial to couple complementary methods for separation and sequencing of (phospho) peptides. Large-scale phosphoproteomic strategies (Ficarro *et al.*, 2002; Gruhler *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007) typically include enrichments on phosphopeptides using IMAC or TiO₂ resin or Calcium phosphate precipitation (Connor *et al.*, 1999; Larsen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Thingholm *et al.*, 2007) followed by reverse-phase liquid-chromatography (LC) coupled to ESI tandem mass spectrometry (MSⁿ). In addition, the combination of CID and ETD fragmentation in MS/MS is a very promising approach for phosphoproteomic studies (Gruhler *et al.*, 2005). Quantitative methods (i.e. SILAC and iTRAQ) in phosphoproteomics provide new insights into functional phosphorylation events.

Various strategies for functional phosphoproteomic analysis of signaling pathways are being

established in biological and biomedical research, for example for the identification of novel drug targets and for the understanding of disease pathogenesis.

We will discuss several strategies for large-scale phosphoproteomics, focusing on critical steps which could increase the number of identified phosphorylated sites, especially those which belong to low abundance proteins. We will also discuss the importance of using bioinformatic tools and validation of MS/MS spectra in order to avoid errors in the assignments phosphorylation sites (Kjærnø 2002, Mann *et al.*, 2002, Jensen 2006), e.g. using Mascot, MS Quant, VEMS, and ProteinCenter (Schulze *et al.*, 2003; Matthiesen 2007, Ingrell *et al.*, 2007).

References

Jensen ON. Curr Opin Chem Biol. 2004 Feb;8:33-41.