

PTM-Omics, 떠오르는 단백질체학의 트렌드

PTM 이란 Post-transcriptional modification, 즉 단백질의 번역 후 변형을 말한다. PTM 을 통해 세포는 가역적으로 단백질 기능을 조절하고 신호를 변환하며 인체 내의 작은 변화에 반응할 수 있다. PTM 은 또한 단백질 기능과 다양성을 확장하여 단백질체의 복잡성을 증가시킨다. 이러한 PTM 의 크로스토크는 동일하거나 다른 단백질에 대한 여러 PTM 의 조합 작용을 설명한다. 최신 연구에서 단백질체 분석 데이터들의 해석에 있어, 많은 PTM 이 암, 신경퇴행성 질환, 대사질환, 면역질환 등 다양한 질병의 표지자, 혹은 특정 치료법을 개발하기 위한 분자 표적으로 사용되고 있다. 최근 급속도로 늘어나고 있는 PTM 분석에 대한 수요가 이러한 흐름을 잘 설명해준다. 단백질의 PTM 종류 및 아미노산 잔기 위치의 민감하고 정교한 측정을 통해 현재의 단백질체 기술, 질량분석 기기의 성능 및 생물정보학 알고리즘과 프로그램 툴이 얼마나 PTM 크로스토크를 다양화시켰는지, Total protein profiling 에 어떻게 박차를 가했는지 알아보려고 한다 [1].

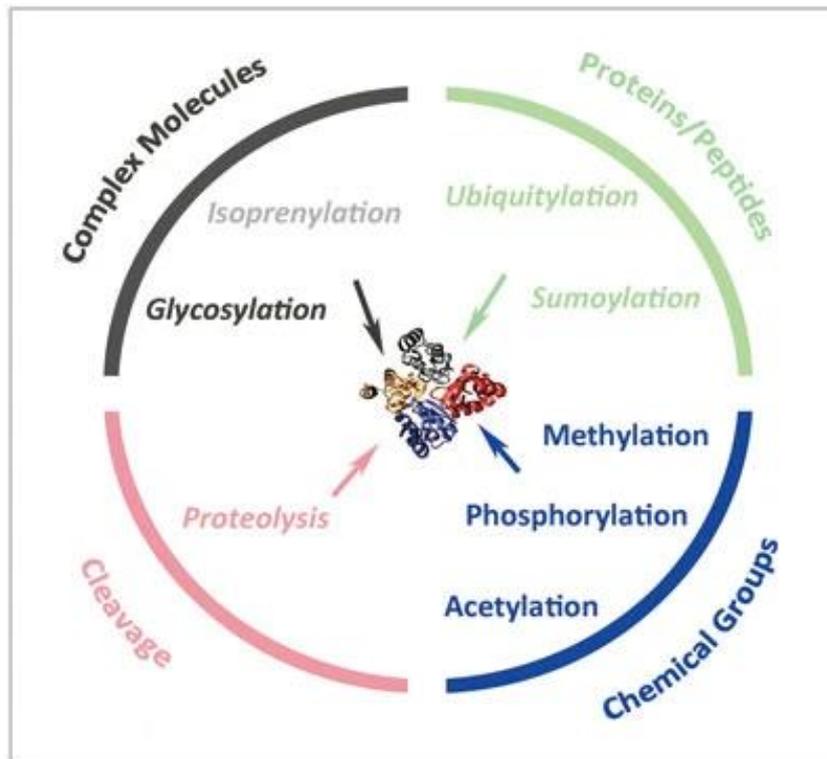


그림 1. Types of protein post-translational modifications [2]

1 개의 유전자에서 1 개의 단백질이 나온다는 가설에 따라서 유전자 번역후에 약 20,000 개의 표준적인 단백질이 생성된다. 이러한 단백질에는 다양한 isoform 즉 "proteform"이 존재하는데 이는 splicing, polymorphism, PTM 에 의해 일어난다 [3]. PTM 의 종류에는 대표적으로 phosphorylation, glycosylation, acetylation, methylation, ubiquitination, SUMOylation 이 있고 지금 이 시점에도 계속 새롭게 발견되고 있다. 단백질 종합 데이터베이스인 Swiss-Prot 에 따르면 가장 많이 발생하는 PTM 은 Phosphorylation 이다 [4]. 자세한 Frequency Top10 은 아래의 그림 2 를 참고하기 바란다. 또한 가장 자주 PTM 이 일어나는 아미노산 잔기는 serine 과 lysine 이며, lysine 의 경우에는 15 개 정도의 다른 PTM 이 일어난다고 알려져 있다 [4]. 특정 PTM 은 질병에 대한 유병률 또는 탐지 방법의 가용성을 주도하는 데 중요하기 때문에 다른 PTM 보다 더 많은 관심을 받는다. 연구와

임상적 중요성을 모두 가지고 있는 관련성이 높은 PTM 마커에 대한 분석 방법은 현재까지 몇 가지가 알려져 있으며, 계속해서 발전하고 있다.

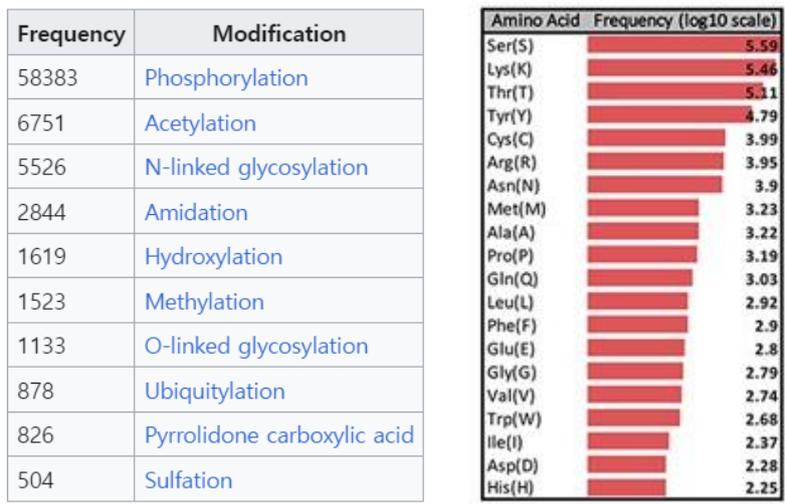


그림 2. Most Frequent Types of Modification & Amino acid residues [4]

PTM types

PTM 분석을 알아보기에 앞서 대표적인 PTM 종류를 설명하고자 한다.

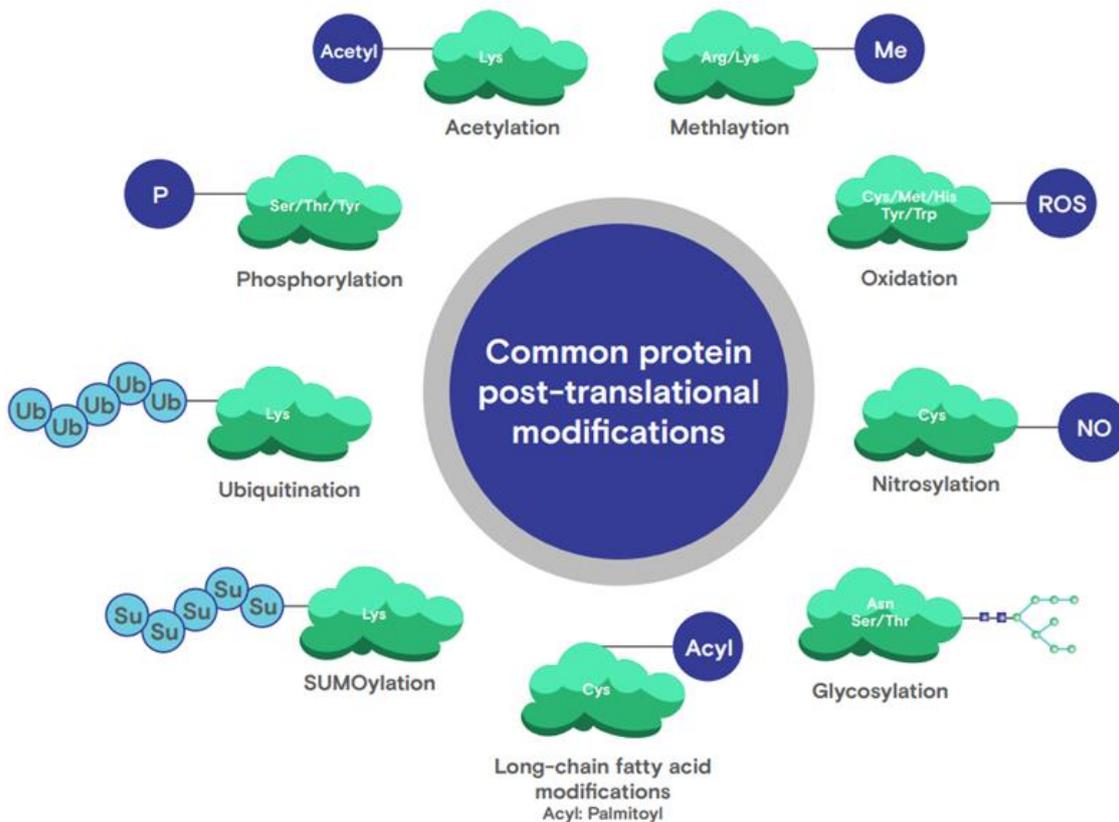


그림 3. Common protein post-translational modifications [3]

Phosphorylation

Phosphorylation (단백질 인산화)는 가장 풍부하게 존재하는 PTM 으로 세포내 기본적인 과정에 대부분 영향을 미친다. 대부분의 phosphorylation 은 STY(serine, threonine, tyrosine) 아미노산 잔기에서 발생되며 단백질 kinase 와 phosphatase 에 의한 인산화 및 탈인산화 상호전환에 의해 조절된다 [18]. Kinase 는 단백질에 음이온성 인산기를 붙여 인산화하고 phosphatase 는 이와 반대로 인산기를 가수분해하여 단백질과 분리한다. Phosphorylation 은 세포주기 진행, DNA 손상반응, 세포 성장, 분화 사멸 등 다양한 세포과정에 관여한다 [3, 20].

Glycosylation

Glycosylation (단백질 글리코실화)는 세포 내부 또는 외부의 단백질에 글리칸이나 당류가 가역적으로 공유 결합된 PTM 을 지칭한다. 주로 외부에 분비된 단백질이나 ECM 단백질에서 일어나는 PTM 이며 세포 소포체와 골지체에서 발생한다. Glycosylation 은 N-결합 glycosylation (asparagine 잔기에 글리칸 binding)과 O-결합 glycosylation (serine/threonine 잔기에 글리칸 binding)의 두 가지 유형으로 크게 분류된다 [5]. 인체내 다양한 생물학적 세포/대사 과정 중에서도 세포 부착, 단백질-ligand 상호작용에 주로 관여한다. 또한 기능적 장애가 있는 글리칸은 암, 선천성 당화장애, 만성 염증질환, 자가면역질환을 포함한 많은 질병과 연결된다.

Ubiquitination

유비퀴틴은 76 개의 보존된 아미노산 서열로 이루어져 있는 물질로, 진핵세포에 널리 존재한다. Ubiquitination(단백질 유비퀴틴화) 과정은 세포내 단백질의 분해 신호로써 작용하며, 타겟 단백질의 Lysine 잔기에 유비퀴틴 단백질이 공유결합하는 것을 말한다. 이 과정은 세가지 유비퀴틴 활성화 효소인 E1, E2, E3 효소에 의해서 촉진된다 [6]. 이에 대한 결과로 하나의 유비퀴틴이 연결된 monoubiquitination 또는 여러 개의 유비퀴틴이 연결된 polyubiquitination 이 일어나게 되는데, 어떤 Lysine 잔기에 ubiquitination 이 일어나는지에 따라 다양한 세포과정에 관여하게 된다. Monoubiquitination 은 전사조절, DNA 복구, membrane trafficking 에 관여하며, Polyubiquitination 은 링크되어 기질 단백질의 분해를 유도한다. K48-linked, K63-linked ubiquitination 이 그 대표이다. 스트레스 및 면역반응과 관련된 다양한 기능에 관여하므로, 유비퀴틴화 조절장애가 있으면 알츠하이머, 파킨슨병과 같은 신경퇴행성 장애와 강하게 연결된다 [3].

Acetylation

Acetylation(단백질 아세틸화)는 단백질의 Lysine 잔기에 아세틸기를 추가하는 복잡한 과정으로 주로 히스톤 단백질의 N-말단 꼬리에서 발생한다. 히스톤 단백질의 acetylation 은 풀어진 염색질 구조(open chromatin state)와 연관이 있는데 이러한 히스톤의 아세틸화 상태 변화는 DNA 에서 전사과정을 더욱 용이하도록 하며, 세포 주기 조절, DNA 복구, 세포 분화 및 세포사멸 등에도 관여하고 있다 [1]. 전사인자를 비롯한 샤페론(chaperone)이나 효소 단백질도 아세틸화 시킴으로써 세포내 항상성에 큰 영향을 끼친다. 최근 연구에서 단백질 아세틸화 과정은 질병의 전박적인 병태생리학에 크게 기여한다는 사실이 밝혀졌다. 그 중 활성산소에 반응한 세포골격 미세소관 단백질 아세틸화와 이에 따른 SIRT2 의 억제자 CPEO(만성진행성 외안근마비) 증후군환자의 미토콘드리아 기능장애를 악화시켰다. 다양한 유형의 흑색종 및 백혈병의 치료개발 도구로서 표면 종양항원의 N-아세틸화 및 O-아세틸화를 표적으로 사용한다 [17].

Methylation

Methylation(단백질 메틸화)는 단백질의 특정 아미노산 잔기 (주로 lysine 과 arginine)에 메틸기(-CH₃)를 추가하는 PTM 이다. 이 과정에서 단백질 메틸전달효소(methyltransferase)는 메틸기 공여 화합물에서 표적 아미노산으로 메틸화를 촉진한다. 이러한 Methylation 은 단백질 내의 여러 부위에서 mono-, di-, tri-methylation 으로 발생하는데. 이것은 다양한 단백질 조절을 통해 염색질 구조, 유전자 발현 및 DNA 복구 과정에 영향을 미친다 [2]. 예를 들어 히스톤 단백질의 메틸화는 유전자 발현의 후성유전학적 조절에 관여하는데, 특정 위치의 메틸화는 유전자 활성화 또는 억제를 조절한다. 또한 lysine 잔기의 히스톤이 아닌 단백질을 메틸화하는 lysine 메틸전달효소 (lysine methyltransferase)가 지속적으로 발견되고 있는데 이들은 p53, ER α , NF- κ B, and pCAF 및 종양 형성 및 염증 면역반응과 같은 기타 대사장애에 연루된 기타 전사인자를 메틸화할 수 있다 [17]. Methylation 은 유전자 발현 조절 외에도 단백질과 단백질의 상호작용(protein-protein interaction, PPI)과 단백질의 안정성에 영향을 줄 수 있다 [18].

Oxidation

Oxidation (단백질 산화)는 세포와 조직 내의 단백질이 산화적으로 손상되는 과정을 말한다. 이는 단백질이 활성산소(Reactive Oxygen Species)나 세포 대사 과정에서 발생하는 활성질소 또는 다양한 환경 스트레스 요인에 반응하여 발생한다. 산화가 많이 일어나는 아미노산 잔기는 cysteine, histidine, methionine, tryptophan, tyrosine 등이 있는데, H₂O₂, O₂⁻, -OH 와 같은 환원자를 포함하는 반응성 높은 분자인 활성산소는 oxidation 을 통해 단백질의 3 차 구조를 변화시키고 단백질 folding 손상을 일으키며 효소 활동을 뒤바꿔 단백질간 상호작용 (PPI)에 부정적인 영향을 끼친다 [3]. 이러한 변화는 단백질 기능의 상실로 이어질 수 있으며 세포 기능 장애와 노화를 촉진한다.

Nitrosylation

Nitrosylation (단백질 니트로실화)는 NO 기가 주로 cysteine 아미노산 잔기에 붙어 SNO 그룹(S-nitrosothiol)을 형성하는 단백질 PTM 이다. NO 는 반응성이 높은 자유 라디칼로, 산화질소 합성효소에 의해 생성되거나 아질산염(NO₂)과 질산염(NO₃)의 대사 과정에서 생성될 수 있다 [7]. 주로 세포 신호 전달 과정과 세포 항상성 유지 등에 관여한다.

Palmitoylation (Acylation)

Palmitoylation(단백질 팔미토일화)/Acylation 은 단백질의 cysteine 잔기에 팔미테이트(16-C fatty acid)를 추가하는 과정 즉 단백질에 지질(lipid)이 붙는 PTM 이다. 주로 골지체와 소포체에 있는 타겟 단백질에 팔미테이트가 전달된 S-Palmitoylation 은 protein localization 과 더불어 단백질 조절을 통해 세포막 상호전달에 관여한다. [7].

SUMOylation

SUMOylation (단백질 수모화)는 SUMO(Small Ubiquitin-like Modifier)라는 작은 단백질 구조가 타겟 단백질의 lysine 잔기에 공유 결합하는 PTM 이다 [3]. SUMOylation 은 단백질 활성, 안정성, 세포내 protein localization 및 단백질간 상호작용(PPI)에 영향을 끼친다. SUMOylation 조절에 문제가 생기면 암, 신경퇴행성 장애 및 바이러스 감염을 포함한 다양한 질병에 영향을 미칠 수 있다 [2].

위에 언급된 9 개의 주요 PTM 이외에도 수많은 종류의 PTM 이 있으며, 아직 역할이 명확하게 연구되지 않은 Protein PTM 도 많이 존재한다. 인체의 다양한 질병 원인 규명을 위해 해당 PTM 의 연구는 지속적으로 필요할 것으로 보인다.

PTM-omics by LC-MS/MS

최근까지 많은 신규 기술이 소개되었지만, 인체내의 PTM 역할 규명과 정밀한 PTM 정량 실험에는 여전히 한계가 있다. 생물학계에서 현재까지 Profiling level 의 단백질 PTM 을 분석하기 위한 방법은 크게 2 가지이다. 첫번째는 LC-MS 로 분석하는 것이고 두번째는 Antibody array 이다.

PTM 분야에서 특정 변형을 특정 기질의 한 위치에서 감지할 수 있는 anti-PTM 항체는 IP(Immunoprecipitation), WB (Western blot), IF(Immunofluorescence)에 사용되어 중요한 역할을 계속하고 있다. 하지만 고처리량의 Mass spectrometry(MS)를 이용한 PTM 분석이 현재까지는 가장 강력한 테크닉으로 여겨진다. Human Proteoform 프로젝트는 현재까지 약 5000 개의 인간 유전자에서 유래한 60,000 개 이상의 독특한 종을 검출했지만, 총 proteoform 수는 수십만 개 이상일 것으로 추정된다 [18]. 이러한 다양성은 제한된 유전자 수로는 설명하기 어려운 인간 유기체의 놀라운 복잡성을 보여준다. MS 를 통한 PTM 분석은 세포 내에서 자연적으로 발생하는 단백질 변형을 검출하는 데 최고의 도구로 기능한다. PTM 변형된 단백질의 동정(정성) 및 정량을 위해 가장 많이 이용되는 MS 방법은 bottom-up proteomics 방식의 LC-MS/MS 이고 Electron spray ionization(ESI) MS 가 PTM 분석에 적합하다. 장비로는 Thermo Orbitrap 계열의 tandem MS (MS/MS)가 DDA 방법으로 많이 쓰이고 있고 라벨없는 정량법 (Label-free) 또는 TMT isobaric tag(Thermo Fisher, USA)를 이용한 라벨링 방법이 주로 적용된다. 이러한 정량법을 통해 PTM 수준을 비교하고 특정 조건이나 자극과 관련된 PTM 의 변화를 감지할 수 있다.

분석 단계에서 PTM 을 식별하는 방법 중 가장 간단한 방법은 분자량 차이를 이용하는 것이다. 같은 protein 에서 PTM 변형만 다를 경우, 해당 부분의 분자량이 달라져 특정 peak 에서 커지기 때문에 이것의 차이를 이용해 대략적인 추정이 가능하다 [6]. 하지만 해당 방법에서는 여러가지 PTM 이 유사한 사이즈이기 때문에 정확히 어떤 PTM 변형인지 파악이 어렵다. 여러 PTM 중 하나의 후보(Candidate)로 생각할 수 있다. 또한 PTM 은 상대적으로 적고 효소적, 화학적 및 분해 민감도가 다르기 때문에, 이 분야의 새로운 발전은 MS 장비와 소프트웨어의 지속적인 일반적 개선 외에도 맞춤형 추출, 농축 및 분해 프로토콜과 관련이 있다.

이를 보완하기 위해 전처리 단계에서 PTM site 를 캡처할 수 있는 "PTM Enrichment" 방법이 개발되었다. Phosphorylation enrichment 방법으로는 대표적으로 IMAC(Immobilized metal affinity chromatography) 방법을 이용하는데[8], 이 enrichment 방식은 IDA(iminodiacetic acid)나 NTA(nitrilotriacetic acid)를 킬레이트제(chelating agent)로 이용하여 Fe³⁺ 등의 금속을 고리형 화합물로 고정한 후 captured phosphopeptide 를 NH₄OH 와 같은 elution buffer 에 내려서 LC-MS 에 적합한 형태로 만든 후 분석하게 된다. 최근에는 TiO₂를 이용한 MOAC(Metal oxide affinity chromatography) 방법을 취하기도 하며, 꾸준한 연구를 통해 MOAC 방법에서 추가 보완된 새로운 IMAC 방법들이 계속해서 나오고 있다 [8, 20].

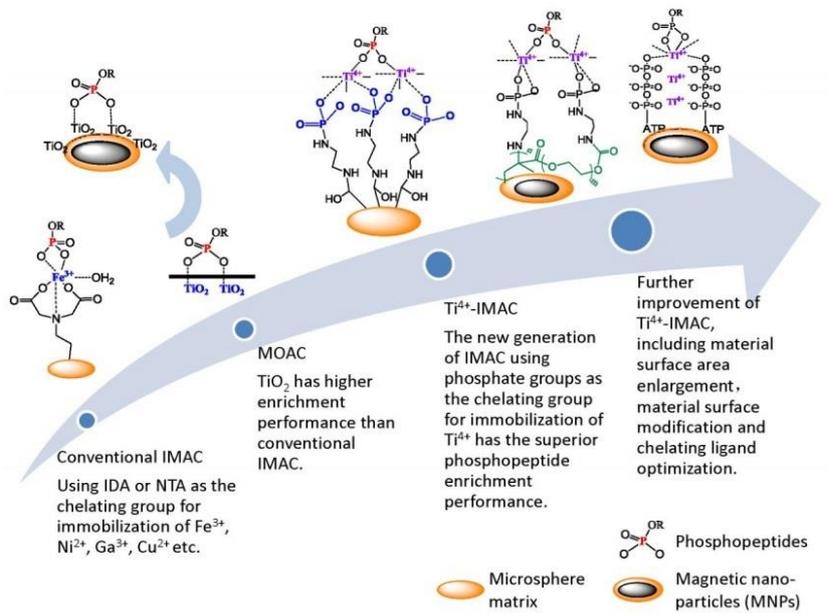


그림 4. Improvements of phosphorylation enrichment methods. [8]

Glycosylation enrichment 방법으로 현재 사용되는 방법은 LAC(Lectin affinity chromatography), HILIC(Hydrophilic Interaction Chromatography), Mixed-mode chromatography 등이 있다 [8]. 그중 최근에는 Mixed mode 방법의 크로마토그래피가 많이 사용되고 있는데, Mixed mode 란 용어의 의미처럼 2 가지 분리모드를 동시에 사용하는 크로마토그래피 분석법이다 [9]. Reverse phase 와 anion exchange 를 동시에 이용한다. Anion exchange 가 가능한 Waters 사의 AX C18 컬럼을 이용하면 효과적으로 N-glycosylation 을 캡처할 수 있다 [5, 9]. O-glycosylation 의 경우, 글리칸 구조와 글리코실화 부위의 이질성으로 인해 가장 복잡한 PTM 중 하나이며, 구조가 비교적 짧고 보존되는 아미노산 서열이 부족하여 분석법 규명에 어려움이 있다. 효소(galactosyl transferase)나 affinity 를 이용하는 방법이 있지만 아직은 분석에 한계점이 있다 [8].

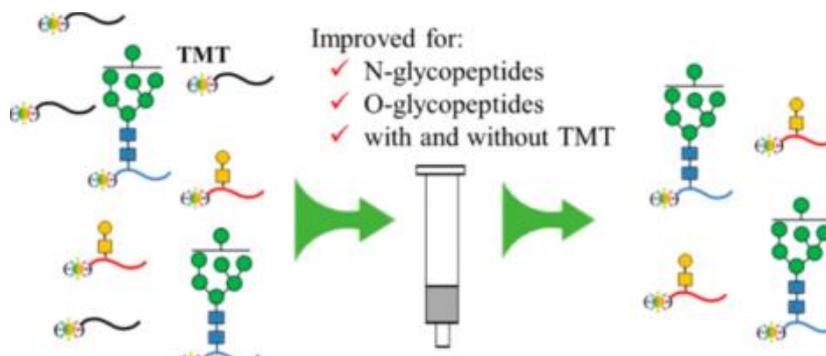


그림 5. Glycosylation enrichment methods using different columns (HILIC, MAX) [9]

Phosphorylation 과 glycosylation 에 대한 정보가 가장 많이 제공되어 있어 대표적으로 두 가지 PTM 에 대한 enrichment 방법을 소개하였는데, 이외에도 다양한 PTM 을 enrichment 할 수 있는 방법들이 있다. LC-MS 로 PTM 분석을 하였을 때의 가장 큰 장점은 데이터베이스(UniProt)를 사용하여 *in silico* 로 매칭하기 때문에 훨씬 더 유연하게 분석할 수 있다는 점이고, 다른 플랫폼보다 다양한 종에 대한 분석이 가능하다.

PTM-omics by Antibody Array

현재까지 많이 진행되는 Western blotting IHC, IP, ELISA 등의 실험으로도 PTM 을 확인할 수 있지만 한번에 많은 양의 PTM 을 확인하는 것은 어렵다. 세포 또는 조직 용해물 내에 존재하는 복잡한 PTM 단백질을 사전에 농축할 필요없이 수천개의 단백질을 한번에 스크리닝 하는 목적의 Multiplex ELISA 기반 실험이 Antibody array 실험이다 [19]. Antibody array 실험은 항원-항체 반응을 통해 단백질 발현을 스크리닝하는 면역 실험법이다 [20]. 변형되지 않은 일반 형태의 단백질뿐만 아니라 변형된 PTM 단백질을 특정적으로 인식하는 항체를 이용하면 PTM 단백질을 antibody array 로도 확인할 수 있다 [3]. 이미 여러 회사에서 PTM antibody array chip 을 제작, 공급하고 있으며, 이바이오젠에서는 Raybiotech 과 Fullmoon Biosystems 사의 PTM array chip 을 이용한 실험분석 서비스를 제공하고 있다. 특히 Fullmoon Biosystems 의 Phosphorylation array 를 이용하면 세포 신호 전달 경로를 매핑하는 특정 protein 의 unphospho form 과 phospho form 의 비율을 확인할 수 있다는 장점이 있다 [10]. Raybiotech 에서는 2024 년 기준, Phosphorylation 을 비롯한 Glycosylation, Oxidation, Acetylation, S-Nitrosylation S-Acylation, Glycan array 등 많은 PTM array chip 을 제공하고 있다.

Cutting edge protein technology and PTM-omics

과학의 기술이 발전되고 새로운 실험 방법은 계속 나오고 있다. Transcript 레벨에서는 최근에 GeoMx DSP 와 CosMx SMI 를 필두로 하는 Spatial Profiling 이 크게 주목받고 있다. Proteomics 분석도 과거의 실험보다 발전하고 있고 샘플당 단백질 Identification 숫자도 늘어가고 있다. 앞서 언급한 GeoMx DSP 에서는 약 570 개의 Protein level 을 측정할 수 있는 IPA Atlas 가 출시했다 [11, 12]. 2023 년에 Thermo Fisher 사에서 출시한 Orbitrap Astral MS 장비는 기존보다 4 배 빨라진 분석시간과 2 배 깊어진 coverage depth 를 가지고 있다 [13]. 그리고 2021 년에 Bruker 사에서 출시된 timsTOF SCP MS 는 Ion mobility 방법의 TOF 매스로 2 개의 TIMS 채널에서 collision 을 통한 세밀한 분석이 가능하며 250pg 수준의 cell 에서 분석이 가능하다 [14]. Astral 장비와 timsTOF 장비도 PTM 분석에 활용 가능한 잠재성이 있는 최신 장비들이지만 PTM 에서의 실제 적용은 아직 연구가 많이 필요할 것으로 보인다.



Orbitrap Astral



timsTOF SCP

그림 6. Latest instruments for LC-MS/MS proteomics analysis [13, 14]

Publications on PTM-omics

1. Raybiotech PTM antibody array publication

Antibody array 를 이용한 PTM 연구된 논문 하나를 소개하고자 한다. 최근 5 년간 전세계를 강타하였던 코로나 19 바이러스(SARS-CoV2, COVID-19)에 대한 PTM glycosylation 연구를 진행한 논문이다. COVID-19 바이러스에 있는 spike protein 에는 약 60 여개의 N-linked glycan 이 있다고 한다. 숙주세포에서 ACE2 와 결합하는 이 spike protein 의 glycosylation 은 면역 회피와 숙주세포 침입에 영향을 준다고 한다 [15].

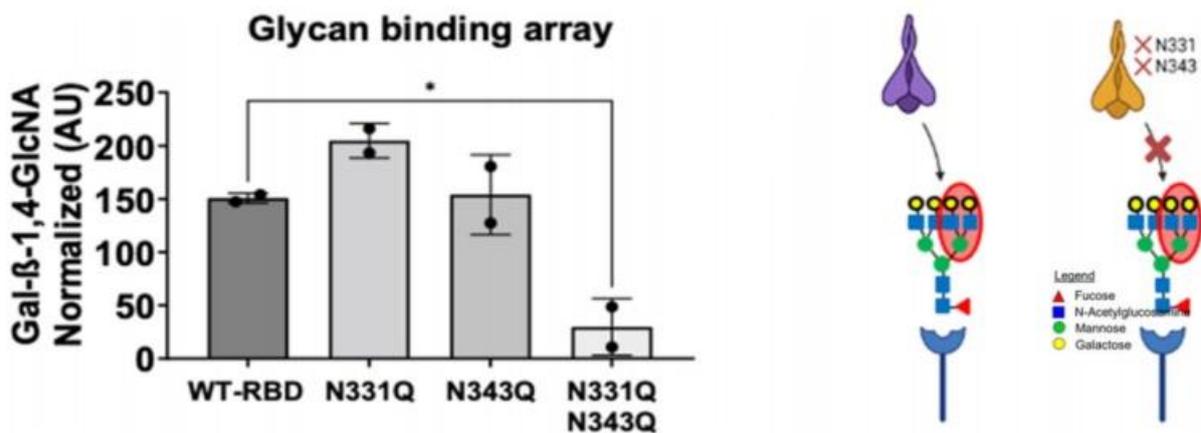


그림 7. Identification of glycan binding domain in RBD protein [15]

이 연구에서는 spike protein 의 Receptor binding domain(RBD)에서 Asn331 과 Asn343 에서 N-glycosylation 이 바이러스 침입과 IL-6 조절에 주요하다고 판단하여 실험을 진행하였고 해당사항은 Glycan array 300, Human L1000 array, Raybiotech IL-6 ELISA 키트를 이용해 진행되었다. 실제로 Asn331 과 Asn343 에 mutant 를 주었을 때 다른 glycosylation 패턴 및 IL-6 변화를 확인할 수 있었다 [15].

2. Fullmoon Biosystems Phosphorylation array publication

두번째로는 세포 노화 연구에서 Fullmoonbio PTM array 를 활용한 예시가 있어 소개하고자 한다. 2024 년에 발매된 최신 연구로 간세포암종에서 TRIM22 의 중요성을 소개하는 논문인데 여기에서 ubiquitination 과 phosphorylation 이 중요한 역할을 한다 [10]. Fullmoonbio 사의 Phospho explorer array (PEX100)가 해당 연구에서 사용되었다.

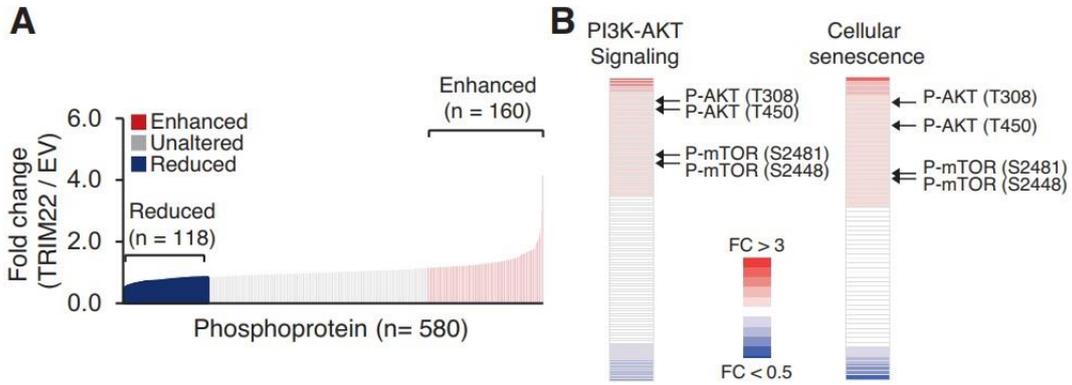


그림 8. Phosphoproteins changes in TRIM22 overexpressed cells by PEX100 profiling [10]

그림 8 의 그래프를 통해 TRIM22 가 overexpression 된 샘플에서 phosphoprotein 변화를 나타내었다. 총 580 개의 확인된 Phosphoprotein 를 분석하였고 이중 160 개는 enhanced fold change, reduced fold change 를 확인할 수 있었다. TRIM22 의 overexpression PI3K 및 AKT signaling 에 영향을 주는 protein 들의 phosphorylation 변화를 유도했다고 확인할 수 있었다 [10].

3. LC-MS/MS PTM analysis publication

마지막으로 소개할 논문은 LC-MS/MS 장비로 플랑크톤 종에서의 PTM 종류들을 자세히 규명한 연구결과이다. 해당 논문에서 사용한 LC 장비는 Thermo Dionex Ultimate 3000 HPLC 를 사용하고 tandem MS (MS/MS)는 Q-Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer 를 사용하였다. 분석한 종은 식물성 플랑크톤 중 *Emiliania huxleyi* 를 분석하였다. *E. huxleyi* 는 석회비늘편모류에 속한 종으로, 적도, 극지방, 영양분이 풍부한 지역과 빈영양 환경까지 거의 모든 지역에 존재하며 탄소 순환 및 황 순환에 중요한 역할을 하며 기후 변화에도 영향을 준다고 알려져 있다. 해당 종의 분석을 위해 global protein 의 분석은 앞서 선행되었고 해당 data set 을 이용하여 PTM 서치를 Comet 및 TPP (Trans-Proteomic Pipeline) 툴을 이용하여 분석하였다 [16].

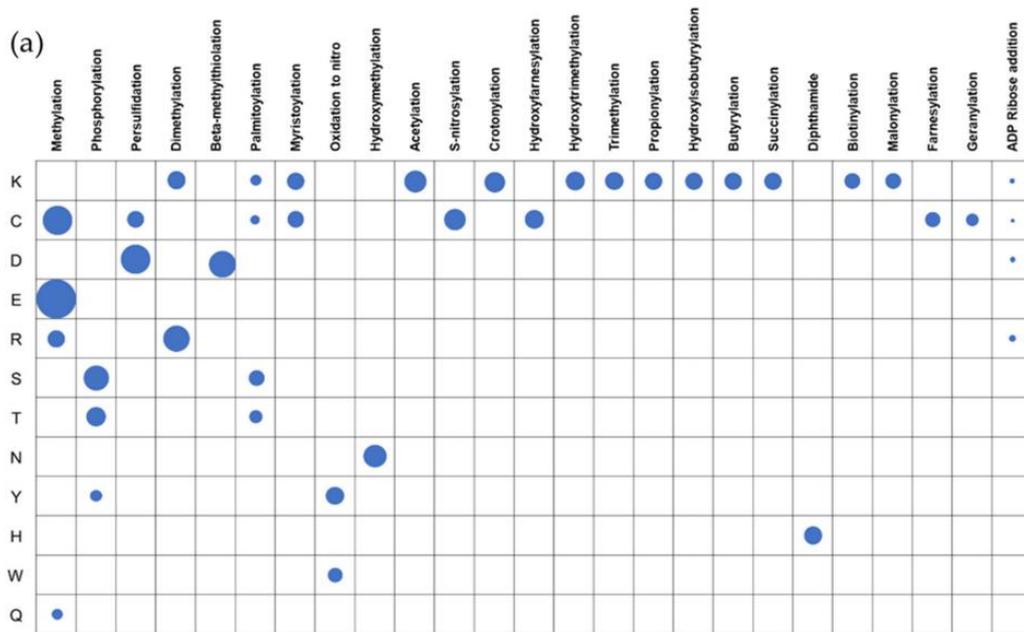


그림 9. Global discovery of post-translational modifications (PTMs) from tandem mass spectra [16]

70 개의 peptide fraction 으로 PTM 서치 분석을 진행하여 샘플 내의 PTM global discovery 를 확인할 수 있었고 그림 9 와 같이 PTM type 들과 어떤 아미노산 잔기에서 PTM 변형이 일어나는지 확인할 수 있었다. 가장 많은 것은 Methylation 변형이었고, 가장 많이 일어난 아미노산 site 는 Lysine(K)이었다 [16]. 모든 분석은 enrichment 없이 진행되었기 때문에 정확하다고 하기는 어렵지만 그래도 상대적으로 연구가 부족한 *E. huxleyi* 플랑크톤 내에서 global PTM 패턴을 파악할 수 있었다. 해당 방법으로 다른 종에서도 가능할지는 추가적인 연구가 필요하다.

Ebiogen's PTM-omics Service

이바이오젠의 PTM-omics 서비스는 LC-MS/MS Proteomics 및 Antibody array 서비스로 진행이 가능하다.

LC-MS/MS PTM proteomics 서비스의 경우, 현재 Phosphorylation 과 Glycosylation 의 enrichment method 만 진행 가능하다. 추후 가능한 PTM 을 추가할 예정이며 (Methylation, Ubiquitination 등등) enrichment 를 직접 진행하여 의뢰하는 경우 다른 PTM 서비스 의뢰도 가능하다. Total protein profiling 과 분석방법은 유사하며 분석에 앞서 PTM 전처리가 추가가 된다. 추가적으로는 Proteomics 는 아니지만 단일 단백질 분리 샘플에서 PTM site 분석이 가능하고 Phosphorylation, acetylation, methylation, ubiquitination, formylation 측정이 가능하다. (별도문의)

LC-MS/MS PTM Proteomics Service

Sample requirement	> 1000 ug protein (for PTM enrichment)
Sample Type	Cell pellet, Tissue, Extracted Protein
Analysis Instrument (HPLC & UPLC)	Thermo Dionex 3000 HPLC
Analysis Instrument (Mass Spectrometry)	Thermo Orbitrap Q-Exactive MS (High Resolution MS) Thermo Orbitrap Exploris 480 MS (High Resolution MS)
Turnaround time	~7 weeks after Protein QC

LC-MS/MS Global Proteomics Service

Sample requirement	> 150 ug protein (Label-free) > 200 ug protein (TMT Labeling)
Sample Type	Cell pellet, Tissue, Serum/Plasma, Gel piece (IP), Conditioned Media, Exosomes/EVs, Extracted Protein, etc.
Analysis Instrument (HPLC & UPLC)	Thermo Dionex 3000 HPLC Agilent 1290 HPLC
Analysis Instrument (Mass Spectrometry)	Thermo Orbitrap Q-Exactive MS (High Resolution MS) Thermo Orbitrap Exploris 480 MS (High Resolution MS) SCIEX TripleTOF 5600+ SWATH-MS (DIA)
Turnaround time	~6 weeks after Protein QC

Fullmoon Biosystems array 의 Phosphorylation profiling chip 은 site specific antibody 와 phospho-specific antibody 로 구성되어 있어서 효과적으로 phospholylation profiling 을 분석할 수 있다. 이바이오젠은 Fullmoon Biosystems 사의 국내 유일한 Certified Service Provider 로 실험 분석 서비스를 제공하고 있다. 각 칩의 자세한 정보는 제조사의 홈페이지를 통해 확인이 가능하다.

Fullmoon Biosystems Antibody Array Service

	Total Protein Profiling	Phosphorylation Profiling
Detection Methods	Fluorescent	Fluorescent
Solid Support	Glass Slide	Glass Slide
Design Principle	Direct Labeling (Biotin)	Direct Labeling (Biotin)
Data Type	Semi-quantitative	Semi-quantitative
# of Analytes	60 - 1358	40 - 1318
SPECIES	Human	H, M, R*

Raybiotech array 에서는 PTM (Phosphorylation, Glycosylation, Glycan, Oxidation, Acetylation, S-Nitrosylation S-Acylation)을 분석할 수 있는 다양한 Chip 이 구성되어 있다. 그 외에도 protein expression profiling 을 진행할 수 있는 다양한 시리즈(L-series, G-series)도 있으며 PTM array 들은 대부분 G 시리즈의 칩이다.

Raybiotech Antibody Array Service

	L-Series	G-Series
Detection Methods	Fluorescent	Fluorescent
Solid Support	Glass Slide	Glass Slide
Design Principle	Direct Labeling (Biotin)	Sandwich ELISA
Data Type	Semi-quantitative	Semi-quantitative
# of Analytes	50 - 8000	10 - 1200
SPECIES*	H, M, R, L	H, M, R, P, C, B, F, E, N, L, O, K, D

< 참고 문헌 >

1. Leutert, M., Entwisle, S. W., & Villén, J. (2021). Decoding post-translational modification crosstalk with proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 20.
2. Creative Proteomics, Overview of Post-translational Modification Analysis, <https://www.creative-proteomics.com/services/overview.htm>
3. Raybiotech Inc. (2023). Protein Post-Translational Modifications: Translating Diversity to Discovery (White Paper)
4. Khoury GA, Baliban RC, Floudas CA (September 2011). "Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database". *Scientific Reports*. 1 (90): 90.
5. Xiaoxiao Liu, Matthew A. Lauber (2020). Increased Resolving Power for Acidic Glycans with an MS-Compatible Anion Exchange Reversed Phase Separation, Waters Corporation Application Note
6. Johnson, H., & Eyers, C. E. (2010). Analysis of post-translational modifications by LC-MS/MS. *LC-MS/MS in proteomics: methods and applications*, 93-108.
7. Wang, Y., Zhang, J., Li, B., & He, Q. Y. (2019). Advances of proteomics in novel PTM discovery: applications in cancer therapy. *Small Methods*, 3(5), 1900041.
8. Huang, J., Wang, F., Ye, M., & Zou, H. (2014). Enrichment and separation techniques for large-scale proteomics analysis of the protein post-translational modifications. *Journal of Chromatography A*, 1372, 1-17.
9. Yang, W., Shah, P., Hu, Y., Toghi Eshghi, S., Sun, S., Liu, Y., & Zhang, H. (2017). Comparison of enrichment methods for intact N- and O-linked glycopeptides using strong anion exchange and hydrophilic interaction liquid chromatography. *Analytical chemistry*, 89(21), 11193-11197.
10. Kang, D., Hwang, H. J., Baek, Y., Sung, J. Y., Kim, K., Park, H. J., ... & Lee, J. S. (2024). TRIM22 induces cellular senescence by targeting PHLPP2 in hepatocellular carcinoma. *Cell Death & Disease*, 15(1), 26.
11. Scalise, C. B., Kincaid, K., Thigpen, H., Moore, J., Dover, B., Norian, L., ... & Arend, R. C. (2024). A spatial proteomic study of platinum refractory HGSOc implicates dual AKT and WNT activity linked to an immunosuppressive tumor microenvironment. *Gynecologic Oncology*, 185, 83-94.
12. Nanostring GeoMx IO Proteome Atlas. <https://nanostring.com/products/geomx-digital-spatial-profiler/geomx-protein-assays/io-proteome-atlas/>
13. Thermo Fisher Scientific Technical Note – Rethink what is possible Orbitrap Astral mass spectrometer (2023). www.thermofisher.com/OrbitrapAstral
14. Bruker Technical Note - timsTOF SCP Unbiased, quantitative true single cell proteomics (SCP) research (2021). <https://www.bruker.com/ko/products-and-solutions/mass-spectrometry/timstof.html>
15. Das, T., Luo, S., Tang, H., Fang, J., Mao, Y., Yen, H. H., ... & Huang, R. P. (2024). N-glycosylation of the SARS-CoV-2 spike protein at Asn331 and Asn343 is involved in spike-ACE2 binding, virus entry, and regulation of IL-6. *Microbiology and Immunology*.
16. Duong, V. A., Nam, O., Jin, E., Park, J. M., & Lee, H. (2021). Discovery of Post-Translational Modifications in *Emiliana huxleyi*. *Molecules*, 26(7), 2027.
17. Karve TM, Cheema AK. Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *J Amino Acids*. 2011; 2011:207691.
18. Suskiewicz, M. J. (2024). The logic of protein post-translational modifications (PTMs): Chemistry, mechanisms and evolution of protein regulation through covalent attachments. *BioEssays*, 2300178.
19. Dunphy K, Dowling P, Bazou D, O'Gorman P. Current Methods of Post-Translational Modification Analysis and Their Applications in Blood Cancers. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 16;13(8):1930.
20. Engholm-Keller, K., & Larsen, M. R. (2013). Technologies and challenges in large-scale phosphoproteomics. *Proteomics*, 13(6), 910-931.