

Mass Spectrometry Analysis for Nitration of Proteins

Kwang Pyo Kim

Department of Molecular Biotechnology, Konkuk University, Seoul, Korea

Various proteomics and immunological methods including mass spectrometry combined with both liquid and 2-D PAGE, and immunodetection have been employed to identify and characterize nitrated proteins from pathological samples. Nitrosative modifications regulate cellular signal transduction and pathogenesis of inflammatory responses and neurodegenerative diseases. Nitric oxide generates reactive nitrosative species, such as peroxynitrite (ONOO⁻) that may be involved in a number of diseases. ONOO⁻ can mediate protein tyrosine nitration which causes structural changes of affected proteins and leads to their inactivation. Protein tyrosine nitration is a biomarker of oxidative stress and also influences protein structure and function. Recent advances in mass spectrometry have made it possible to identify modified proteins and specific modified amino acid residues. This review focuses on the significance of protein tyrosine nitration and the progress achieved in analytical methods. Although mass spectrometry of nitrated peptides has become a powerful tool for the analysis of nitrated peptides, the low stoichiometry of protein tyrosine nitration clearly demands the use of affinity chromatography to enrich modified proteins (or peptides).

Key Words: Proteomics; Mass Spectrometry; Nitric Oxide; Nitration; Chromatography, Affinity

Correspondence to: Kwang Pyo Kim
우143-701, 서울시 광진구 능동로 120,
건국대학교 생명환경과학대학 520호
520-ho, College of Life and Environmental
Sciences, Konkuk University, 120 Neung-
dong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 143-701,
Korea
Tel: +82-2-458-7682
Fax: +82-2-2049-6051
E-mail: kpkim@konkuk.ac.kr

Received 18 March 2013

Revised 20 April 2013

Accepted 24 April 2013

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

단백질의 질산화(protein tyrosine nitration)는 생체 내의 활성 질소에 의해 단백질에 일어나는 번역 후 수식(post-translational modification) 과정 중 하나로 단백질의 구조, 활성, 친수성, 단백질 간 결합력 등을 변화시키면서 단백질의 기능을 조절하는 중요한 역할을 한다[1,2]. 단백질의 질산화는 단백질의 타이로신 잔기에 선택적으로 수식되며, 산화적 스트레스와 염증 반응에 의해 생성되는 활성산소와 질산화 시약(peroxynitrite; tetranitromethane, TNM)에 의해 생성된 과산화아질산염에 의해서 발생한다고 알려져 있다.

이러한 단백질의 질산화와 관련하여서 사람에게서는 암, 치매,

파킨슨병을 비롯한 60개가 넘는 질병과 연관되어 있다는 것이 질산화 특이(NO₂-Tyr specific) 항체를 이용한 항체기반 분석법을 통하여 연구되어 밝혀졌다. 대부분 이러한 연구들은 용해된 단백질, 혈액 단백질로부터의 단백질의 질산화를 정량, 관찰을 통해 이루어졌지만, 단백질의 질산화가 특정 환경에 노출된 타이로신에서만 제한적으로 일어나는 번역 후 수식과정인지, 무작위로 발생하는 이벤트인지에 대한 연구는 이루어지지 못했다. 이것은 단백질의 번역 후 수식의 연구에서 항체를 이용한 방법이 항상 부딪히는 한계점이기 때문에 수식이 일어난 특정한 아미노산을 손쉽게 밝혀 낼 수 있는 새로운 분석 방법이 필요했다.

질량분석법(mass spectrometry, MS)은 단백질의 번역 후 수식

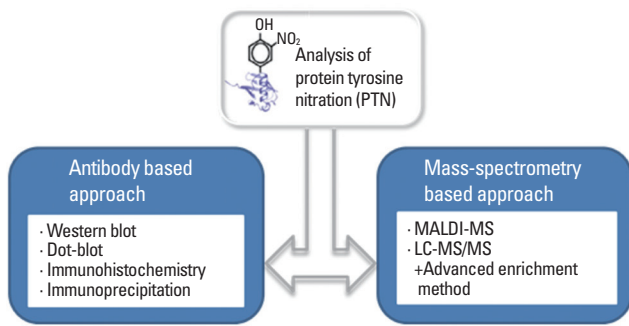


Fig. 1. This paper describes the analysis of PTN. Typical methods for the analysis are divided into antibody based approach and mass-spectrometry based approach. MALDI, Matrix-assisted laser desorption/ionization; LC-MS/MS, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

분석에서 전통적 방법이 가지는 한계점을 해결해 줄것이라 생각되는 중요한 기술이다. 크게 두 가지 1) matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), 2) electrospray ionization (ESI)의 이온화 방식을 가지며 MALDI는 주로 time-of-flight (TOF) 방식의 분석기와 ESI 방식은 다양한 종류의 분석기와 결합하여 사용된다. 특히 액체크로마토그래피법(LC)과 결합된 ESI-tandem MS (MS/MS) 방법은 단백질에서 얻어진 펩티드(peptide) 혼합물의 분리과 펩티드의 아미노산 서열결정에 최적화된 방법으로 단백질의 번역 후 수식 분석을 위해 널리 사용되고 있는 방법이다. 여기에서는 MS를 이용한 다양한 단백질의 질산화 분석방법들과 결과에 대하여 설명하고 최근의 연구동향에 대하여 기술하였다(Fig. 1).

본 론

1. 단백질의 질산화

단백질의 질산화는 생체 내에서의 활성 질소 종(reactive nitrogen species, RNS)과 활성 산소 종(reactive oxygen species, ROS)의 결합 반응에 의해 생긴다. RNS에는 일산화질소(nitrogen monoxide, NO), 이산화질소(nitrogen dioxide, NO₂), 과산화이질소(dinitrogen tetroxide, N₂O₄), 그리고 과산화아질산염(peroxynitrite, ONOO⁻) 등이 존재한다. 이 중에서 NO는 생체 내에서 심혈관계에서의 중요한 신호전달 분자이면서 동시에 세포자멸사(apoptosis), 면역 반응 등에 관여한다[3]. NO는 L-아르기닌(L-arginine)이 nitric oxide synthase (NOS) 효소에 의해 L-시트룰린(L-citrulline)으로 변환하는 과정 중에 형성되며, 이때 주위에 존재하는 산소와의 결합으로 NO₂, 과산화아질산염 등의 질소 화합물을 만들어 낸다. NO로부터 생성된 이차 질소화합물은 super oxide radical (O₂•⁻), 과산화수소(H₂O₂)에 의해 반응성이 높은 유리기 형태의 이산화질소(NO₂•)로 존재하게 되며 이것들이 단백질의 타이로신 잔기에 화학적으로 결합하여 단백질의 질산화를 촉진한다.

2 전통적 방법에서의 단백질의 질산화 연구

1) 면역탁본법(immunoblotting)

항체를 이용한 면역탁본법의 경우 높은 수준의 민감도를 가지는 방법으로 단백질의 질산화의 연구에 널리 사용된 방법으로 점 블롯(dot-blot), 웨스턴 블롯(western-blot) 등이 면역침전(immunoprecipitation, IP)과 함께 사용되어 왔다. 점 블롯을 사용하여 세포, 조직에서 생성된 전체 단백질의 질산화의 양을 비교할 수 있으며, 동일한 조건에서 동일한 양의 단백질을 멤브레인에 부착한 후 질산화 특이항체를 이용하여 밴드의 강도를 측정하여 비교한다. 그 이후 동일한 멤브레인에 대하여 강력한 환원제인 dithionite (DTT)를 처리한 후 다시 한 번 점 블롯을 하여 항체에 대한 샘플의 배경 신호를 통해 보정을 하는 방법이 주로 사용된다. 웨스턴 블롯 기법은 주로 면역침전과 같이 사용되며, 샘플에서 질산화 특이항체를 이용하여 면역침전을 수행한다. 또한 단백질의 질산화를 포함하는 단백질을 높은 수준으로 분리하여 SDS-PAGE 겔에 분리한 후 질산화 특이항체와 타겟 단백질 항체에 대하여 각각 웨스턴 블롯하며, 타겟 단백질 위치의 밴드 강도를 통하여 발현양을 확인한다[4]. 실험에 따라서 타겟 단백질에 대하여 먼저 면역침전을 수행하고 그 이후에 질산화 특이항체에 대하여 웨스턴 블롯을 수행하기도 한다.

2) 면역조직화학(immunohistochemistry)

질산화 단백질의 위치를 확인하기 위한 방법으로 사용되는 면역조직화학 방법은 항원-항체를 이용한 염색방법으로, 보고자 하는 신선한 조직을 분리한 후 포르말린(formalin) 등을 이용하여 고정시킨 후 파라핀에 고정된 조직시료 위에 질산화 특이항체를 직접 붙여 확인한다. 면역조직염색법에 의해 염색된 부분 역시 항체에 의한 배경 신호에 의한 간섭이 심하므로, 같은 조직에서의 다른 부위에서 DTT를 이용하여 NH₂-Tyr 형태로 바꾼 후 동일하게 질산화 특이항체로 배경신호를 확인하여야 한다.

3. 질량분석기를 이용한 단백질 질산화 연구

1) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS)

Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)은 ESI와 함께 단백질의 분석에 널리 사용되고 있는 이온화 방법의 하나이다[5]. 시료를 벤젠(benzene) 고리를 가진 매트릭스(matrix)와 일정 비율로 혼합한 뒤 레이저를 방출하면 매트릭스가 레이저의 광자를 흡수하는 안테나 역할을 하여 레이저를 맞은 부분의 온도가 급격히 상승해 이온화되며 탈착되어 이온이 분석관으로 진입하게 된다[6]. MALDI는 일반적으로 time-of-flight (TOF) 분석관과 함께 사용하게 되는데, 이는 분자의 크기(질량)에 따라 비행시간이 차이가 나는 점을 이용한 것이다.

MALDI-TOF 질량분석기를 이용한 단백질의 질산화 분석은

ESI 방법을 사용한 분석에 비해 그 횟수가 비교적 적은 편이다. 그 이유는 복잡한 시료로부터 단백질의 단백질의 번역 후 수식을 연구하는데 있어서 MALDI 이온화 방법이 비효율적인 것에 기인하는데, ESI 방법에 비해서 MS/MS를 통한 펩티드의 서열분석이 쉽지 않고, 다양한 중성소실신호(neutral loss peak)들이 생성되며, 매트릭스에 의한 편차가 생기는 등의 문제점이 발생하게 된다. 예를 들어, MALDI-TOF 질량분석기를 사용하여 단백질의 질산화를 분석하게 되면, nitrotyrosine ($M + H + NO_2$) 이외에도 nitrosotyrosine ($M + H + NO$), aminotyrosine ($M + H + NH_2$), nitrenetyrosine ($M + H + N$)과 같은 다양한 중성소실에 해당하는 신호들로 보이게 된다[7]. 위에서 언급한 것과 같은 중성소실신호들은 MALDI-TOF 질량분석기를 사용한 대부분의 연구들에서 찾아볼 수 있는데[8,9], Sarver는 액체크로마토그래피로 분리한 질산화된 bovine serum albumin (BSA)으로부터 단백질의 다양한 중성소실신호들을 MALDI-TOF 질량분석기를 사용하여 동정하였고, 이를 토대로 합성된 펩티드를 사용해 중성소실이 발생하는 전체적인 구조를 제시하였다. 특이한 점은 시료의 농도가 낮아짐에 따라 nitrotyrosine을 포함하는 신호의 상대적 크기는 감소하지만, aminotyrosine, nitrosotyrosine을 포함하는 신호들의 상대적 크기는 비교적 일정하게 유지되는 것을 보여주었다[10]. 또한 MALDI 이온화 방법에서는 반드시 매트릭스를 사용하게 되는데, 질산화된 단백질이 MALDI-TOF 질량분석기에서 광분해 될 때는 매트릭스들의 pKa 값에 의존하게 된다. 예를 들어, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)나 dihydroxybenzoic acid (DHB)와 같은 산성을 띠고 있는 매트릭스를 사용하게 매트릭스 분자들이 파편화되면서 매트릭스 분자들의 파편과 분자량 영역이 겹치는 nitrotyrosine ($M + H + NO_2$) 신호는 정확하게 볼 수 없게 되는 경우가 발생하게 된다[11]. 반면, 중성을 띠고 있는 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP)를 사용하게 되면 산성인 매트릭스를 사용했을 때 보다 더 적은 수의 파편화가 일어나게 된다[12]. MALDI-TOF 질량분석기를 사용해 단백질의 질산화를 분석하는 연구에서는 거의 모든 경우에 CHCA를 매트릭스로 사용하고 있다. 이 외에도 500 이하의 m/z 를 갖는 펩티드의 경우 매트릭스 신호와 겹치는 문제점이 발생하게 되는데, Salavej의 연구에서는 매트릭스 신호와 겹치는 부분들을 배제하고자 400 이상의 m/z 를 갖는 신호들만 분석에 포함하였다[13]. 이런 다양한 문제점들을 해결하기 위해 최근에는 IR-MALDI, UV-MALDI, PD-MALDI와 같은 다른 방법들을 사용하여 단백질의 질산화분석을 시도하고자 하는 연구도 진행되고 있다[14].

위에서 언급한 단점들에도 불구하고 MALDI-TOF 질량분석기를 사용한 단백질의 질산화 연구는 계속해서 증가하고 있는데, 이는 MALDI-TOF 질량분석기가 ESI 방식의 질량분석기에 비해서 시간과 비용적인 측면에서 큰 강점을 가지기 때문이다. MALDI-TOF 질량분석기는 단시간에 많은 질량분석 스펙트럼(MS spec-

trum)을 얻게 되고, 한번 준비된 시료는 반복해서 분석이 가능하기 때문에 시간을 절약할 수 있게 된다. 최근에도 많은 연구팀들이 앞서 언급했던 문제점들을 피하고 빠른 분석을 수행하기 위해서 다양한 연구들을 진행하고 있다. Butt는 MALDI-TOF를 사용한 단백질의 질산화 분석에서 주의해야 할 점들을 제시하였다. 먼저, MALDI-TOF 질량분석기의 분석 한계가 50 fmole 정도이기 때문에, 분리과정이 선행되어야 하며 케라틴(keratin)과 같은 단백질의 오염을 극도로 주의해야 하고, 이를 위해 시료는 물론이고 시약과 버퍼 등 실험에 사용하는 모든 것들의 순도를 최고 수준으로 유지해야 한다고 주장하였다. 또한, 단백질의 질산화 분석에 있어 MALDI-TOF를 사용할 때는 분자량의 범위가 1,000-3,000 (Da) 정도가 적당하다고 제시하였다[15]. 최근에는 MALDI-TOF 질량분석기를 사용한 단백질의 질산화 분석에 있어 거의 모든 연구에서 액체크로마토그래피, 혹은 면역침전과 같은 방법으로 분석하고자하는 시료의 분리가 선행되고 있다. 이는 다음 장에서 언급하게 될 단백질의 질산화 농축(enrichment) 방법 개발과도 같은 맥락에서 이해할 수 있는데, 단백질의 질산화는 생체 내에서 약 1/10,000-1/50,000 정도로 매우 적은 양으로 존재하기 때문에 이를 복잡한 시료 내에서 그대로 찾아내기란 쉬운 일이 아니다[16]. 따라서 많은 연구자들이 이를 극복할 수 있는 방법을 개발하거나 혹은 질량분석기를 사용한 분석에 들어가기에 앞서 다양한 방법들로 시료를 분리해 내어 분석하고 있다.

단백질의 질산화분석에서 MALDI-TOF 질량분석기는 주로 펩티드화 하지 않은 단백질의 동정 혹은 *in vitro* nitration과 같은 실험 결과의 확인에 중점적으로 이용되고 있다. 많은 연구에서 단백질을 펩티드화 하지 않고 동정하였는데, Yoon의 연구에서는 HT22 세포를 2D 전기영동 방법으로 분리한 뒤 MALDI-TOF 질량분석기로 단백질을 동정하였다[17]. 또한, Cappelletti의 연구에서는 PC12 세포를 사용해 MALDI-TOF 질량분석기로 단백질을 동정한 뒤에, 동정된 단백질을 이용하여 생물학적인 분석을 수행하였다[18]. 마찬가지로, Reed와 Castegna의 연구에서도 대뇌 피질 두정엽(inferior parietal lobule brain)을 사용하여 MALDI-TOF 질량분석기로 각각 8개, 6개의 단백질을 동정하여 생물학적인 분석에 사용하였다[19,20].

비록 그 횟수는 적지만, MALDI-TOF 질량분석기와 ESI 방식의 질량분석기를 모두 사용하여 단백질의 질산화를 분석한 연구들도 보고되고 있는데, Kanski의 연구에서는 마우스의 골격근(skeletal muscle)을 2D 전기영동 방법으로 분리한 뒤 MALDI-TOF 질량분석기로 단백질을 동정하였으며, 이후 단백질을 펩티드화하여 ESI 방식의 질량분석기로 펩티드를 분석하였다[21]. 이 외에도 Salzano는 BSA를 인공적으로 나이트레이션(*in vitro* nitration)시킨 뒤에 MALDI-TOF 질량분석기로 동정하고, ESI 방식의 질량분석기로 펩티드 지문 추적법(peptide finger printing)을 수행하였다[22].

위와 같이, MALDI-TOF 질량분석기를 사용한 분석들에 힘입어 최근에는 이들을 응용하여 복잡한 시료로부터 질산화된 단백질을 분석하는 연구들도 증가하고 있다. Fiore와 Sultana는 각각 신경교종(gliomas) 뇌와 해마로부터 질산화 단백질을 동정하였다[23, 24]. 또한, Zhan의 연구에서는 흡연자들의 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid)으로부터 질산화 단백질을 동정하였고, 이를 통하여 흡연과 연관된 염증폐질환(inflammatory pulmonary disease)의 생물학적인 경로를 예측하여 제시하였다[25].

이 외에도 질산화가 진행된 펩티드에 대한 삼중탠덤매스(MS/MS/MS) 실험[26], 질산화 그룹의 환원과 관련된 검증 실험[27], 미토콘드리아 단백질의 탈질산화 실험[28], 그리고 질산화 위치의 mapping 실험[29] 등 다양한 단백질의 질산화 연구에서 MALDI-TOF 질량분석기가 사용되고 있다.

2) 액체크로마토그래피-탠덤매스분석(LC-MS/MS)

질량분석기와 액체크로마토그래피를 결합하여 사용하는 액체크로마토그래피-탠덤매스분석은 단백체학(proteomics)과 대사체학(metabolomics) 등의 여러 연구분야에 널리 사용되는 방법이다. 액체크로마토그래피 분석법에서는 분석하는 물질의 크기(size exclusion), 극성(ion exchange), 소수성(reversed phase) 등의 성질로 분리가 가능한 컬럼(column)을 이용하여 분석물질을 순수하게 분리하며, 이것은 세포, 조직, 기관에서 유래한 단백질, 펩티드 분자들의 복잡성을 감소시킴으로써 더 많은 단백질, 펩티드의 동정을 가능하게 한다. LC를 결합한 MS의 경우 ESI 방식의 이온화 방식과도 쉽게 결합할 수 있다는 장점이 있는데, ESI는 단백질의 번역 후 수식의 분석에서 MALDI 방식에 비해 중성 소실이 더 적게 나타나며 탠덤매스분석(tandem mass, MS/MS)이 용이하다. 그렇기 때문에 액체크로마토그래피-탠덤매스분석을 이용한 단백질의 번역 후 수식 분석은 펩티드 단위에서의 단백질의 번역 후 수식 위치를 동정하는데 유리하며, MALDI에 비해 높은 재현성으로 다양한 정량 방법을 적용할 수 있어 인산화, 당쇄화 등의 분석에 적용되고 있다. 단백질의 질산화 분석에서의 경우 생체 내에서의 적은 양 때문에 질산화 시약의 처리 후 단백질의 질산화가 일어나는 아미노산 자리를 확인하는 경우가 많다. Ducrocq의 경우 액체크로마토그래피-탠덤매스분석을 이용하여 다양한 종류의 nitration agent (peroxinitrite, HNO₂)를 처리한 안지오텐신II (angiotensinII)의 질산화 자리를 분석, 안지오텐신II의 활성 변화와 질산화 사이의 관계를 설명하였다[30].

Retention time (RT)은 액체크로마토그래피의 분리 후 분자에 대한 스펙트럼 신호가 나타나는 시간을 의미하며, 각 펩티드 분자들의 성질에 따라 고유의 RT를 갖는다. 단백질의 번역 후 수식을 분석하는 단백질체학의 실험에서는 일반적으로 역상(reverse-phase) 크로마토그래피 방식의 C-18 column을 이용하여 펩티드 분석을

수행하며, 이때 질산화 단백질이 포함된 펩티드의 경우 일반적으로 나이트로 그룹(-NO₂ group)의 화학적 성질 때문에 친수성(hydrophilicity)이 감소하기 때문에 수식이 일어나지 않은 펩티드에 비해 0.5-2 min 정도 늦게 RT이 형성되는 특징을 보인다.

3) 탠덤매스분석(tandem mass spectrometry)

질량분석기를 이용한 단백질의 번역 후 수식 분석이 가장 강력한 분석 방법으로 떠오르는 이유 중 하나는 단백질에서 단백질의 번역 후 수식이 발생하는 아미노산을 특정(mapping)할 수 있다는 점이다. 질량분석기에서의 탠덤매스분석 방법은 펩티드 이온을 특정 기체 상태(gas-phase)에서 절편화하는 방식을 말하며, 여기에서 절편화되어 나오는 신호 피크 간의 질량차를 각 아미노산의 질량값과 또는 특정 아미노산에 대한 수식이 포함된 아미노산 질량값과 비교하여 이미 가지고 있는 단백질의 아미노산 서열 데이터베이스와 비교함으로써 펩티드의 아미노산 서열과 수식화된 위치를 알 수 있다. 여기에서 펩티드가 절편화되는 방식은 사용되는 방법에 따라 collision-induced dissociation (CID), electron-capture dissociation (ECD), electron-transfer dissociation (ETD) 등으로 구분이 될 수 있다. 일반적으로 사용되는 절편화 방식은 CID 방식으로 절편화하기 위한 펩티드 이온을 비 활성 기체(argon, helium, nitrogen gas)와 함께 가둔 후 강력한 에너지로 펩티드 이온을 들뜬 상태로 만들면 이온 간의 충돌로 절편화가 진행된다. 하지만 CID 방식의 절편화에서는 펩티드 골격보다는 수식화된 작용기를 더 잘 절편화시키는 경향을 보인다. 이러한 경향은 결국 펩티드의 아미노산 서열을 유추하는데 약점을 가지게 된다[31]. 1998년 McLafferty가 처음 소개한 ECD 방식의 절편화 방법은 FT-ICR-MS에서 펩티드 골격을 더 효율적으로 절편화시킨다는 것을 증명하였다[32]. ECD는 전자총(electron gun)으로부터 생성되는 전자 에너지를 통해 펩티드의 N-Cα 골격을 자르며 그 결과로 c-/z- type의 이온들을 형성한다. Hunt에 의해 소개된 ETD는 ECD와 마찬가지로 펩티드 골격을 자르는 경향을 보이지만 C-N 골격을 자르며 b-/y- type의 ions을 형성하는 절편화 방식이다. 그러나 단백질의 번역 후 수식분석에서 질산화 단백질의 경우 ECD를 통한 절편화 생성이 잘 안된다는 결과들이 있다[33,34].

4. 최근의 단백질의 질산화 연구 동향

1) 질산화된 펩티드 농축(enrichment) 방법을 사용한 단백질의 질산화 분석

앞서 언급한 바와 같이, 단백질의 질산화는 생체 내에서 매우 극소량으로 일어나기 때문에, 이를 분리 혹은 농축하지 않고는 질산화된 펩티드의 분석은 사실상 불가능하다. 그렇기 때문에 많은 연구진들이 질산화된 펩티드만을 선택적으로 획득할 수 있는 방법을 개발하고 있다. 질산화된 펩티드의 선택적인 획득에는 면역침전과

같이 항체를 사용하여 질산화된 펩티드만을 선택적으로 잡아내는 방법과 질산화된 펩티드에 친화표지를 부착한 뒤 친화표지가 부착된 시료만을 선택적으로 잡아내는 친화크로마토그래피(affinity chromatography) 방법이 일반적으로 사용되고 있다.

Murad는 당뇨 마우스 심장으로 부터 분리한 미토콘드리아에 과산화아질산염을 처리한 후 질산화 특이항체를 이용하여 면역침전을 수행하였다. 전체 단백체를 2DE gel을 통해 분리한 후 질산화 특이항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하여 질산화가 일어난 단백질을 검출한 후, 그 부분만을 잘라내서 in-gel digestion하여 펩티드화시켰다. MALDI-TOF를 이용하여 결국 10종의 활성질소 단백질을 동정하였다[35]. Desiderio의 실험에서는 사람의 뇌하수체 종양 조직(human pituitary adenoma tissue)에서의 단백질로부터 질산화 특이항체를 이용한 질산화타이로신 친화 컬럼(nitrotyrosine affinity column, NTAC)을 개발하여 생체 내의 질산화 단백질을 선택적으로 농축한 후, MALDI-LTQ를 이용하여 분석하여, 총 9개의 활성질소 단백질을 동정하였고, 탠덤매스분석을 통하여 NO₂ 잔기가 결합된 타이로신 자리를 확인하여 모두 단백질의 활성화 부위에 존재한다는 것을 확인하였다. 그리고 질산화가 일어난 것으로 밝혀진 3개의 단백질을 추가로 동정하였다[36].

질량분석기를 이용한 단백질의 번역 후 수식의 연구에는 다양한 농축방법들이 사용되는데, 아세틸화, 인산화 그리고 당화 등의 분석을 위해 다양한 농축방법이 개발되고, 실제 생체시료 내의 단백질의 번역 후 수식 연구에 유용하게 사용되고 있다. 하지만, 이에 비해서 단백질의 질산화에 대한 선택적인 농축방법은 많은 연구가 되고 있지만 실제로 생체시료에서 활용되고 있는 방법은 거의 없는 것이 현실이다. 이는 다른 단백질의 번역 후 수식들에 비해서 단백질의 질산화에 의한 변형이 특이적으로 더욱 극소량으로 존재하기 때문이기도 하지만, 일반적으로 사용되는 화학적 변형에 의한 농축방법을 적용하기에는 -NO₂ 잔기가 매우 좋지 못한 화학적 반응성을 갖기 때문이다. 따라서 단백질의 질산화를 분석하기 위한 농축방법에는 -NO₂ 잔기를 아민으로 환원시키는 과정이 대부분 포함되며 이는 시료의 손실을 증가시켜 분석을 어렵게 하는 요인의 하나로 작용하게 된다.

단백질에 친화적인 친화표지를 사용하는 선택적인 농축방법은 생체 내에서 소량으로 존재하는 단백질의 번역 후 수식들의 분석에 가장 일반적으로 사용되는 방법이다. 이 방법은 단백질의 질산화에 친화적인 친화표지를 붙여줌으로써 이후 질량분석기 등으로 분석할 때, 친화표지가 붙은 단백질만을 선택적으로 잡아내어 분석이 수월하게 해준다. 현재까지 개발된 방법은 모두 동일한 방법으로 접근하고 있으며, 다만 최종적으로 반응시키게 되는 친화표지만 서로 다른 종류를 사용하고 있다. 이 종류의 농축방법은 -NO₂ 잔기의 화학적 반응성이 낮기 때문에 -NO₂ 잔기를 아민으로 환원시켜주는 과정이 모두 포함되어 있으며, 이 과정에서는 sodium di-

thionite (Na₂S₂O₄)가 주로 사용된다. 또한, -NO₂ 잔기를 아민으로 환원시키기에 앞서 기존의 펩티드에 존재하고 있는 아민, 즉, lysine과 N-말단에 있는 아민을 아세틸화 혹은 메틸화 과정을 통하여 막아주게 된다. 이는 이후 반응시키는 친화표지들이 모두아민과 반응하기 때문에, 순수하게 단백질의 질산화로 부터의 변형으로 환원된 아민들에만 친화표지를 붙여주기 위해서 기존에 존재하는 아민들의 반응성을 모두 제거하는데 그 의미가 있다. 2003년 Nikov는 biotin-avidin 상호작용을 응용하여, sulfo-NHS-SS-biotin을 사용해 질산화가 일어난 단백질들을 특이적으로 잡아내는 농축방법을 개발하였다[37]. 이 방법은 pH 5 환경에서 정상적으로 반응할 수 있게 되며, biotin-avidin 상호작용을 통해 선택적으로 단백질을 추출한 이후에는 dithiothreitol (DTT)을 사용하여 이중 황결합(disulfide bond)을 끊어줌으로써 순수한 질산화 단백질을 얻을 수 있다. Nikov는 이 방법을 인간 혈청 알부민(human serum albumin, HSA)에 적용하였으며, 1개의 질산화 단백질을 동정하였다. 이와 동일한 방법으로 Abello는 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)과 안지오텐신II에서 질산화 단백질을 분석하였다[38]. 또한, Smith 연구팀에서는 N-succinimidyl S-acetylthioacetate (SATA)를 사용하여 질산화 단백질을 농축하는 방법을 개발하였는데, 아민으로 환원된 부분에 SATA 친화표지를 부착한 뒤, thiopropylsepharose 비드와 반응시켜 친화표지가 붙은 단백질만을 선택적으로 추출해 내었다. 이후 추출된 단백질들은 DTT를 사용하여 이중 황결합을 끊어줌으로써 비드와 분리되고, 알킬레이션(alkylation) 과정을 거쳐 최종적으로 추출되게 된다. 이 방법은 BSA에서 시험을 거친 뒤 히스톤과 마우스의 뇌에서 활용되었으며, 각각 3개와 102개의 질산화 단백질을 동정하였다[39]. Prokai-Tatrai는 solid-phase active ester reagent (SPAER)라고 명명한 질산화 단백질의 농축방법을 보고 하였는데, 이는 succinimidyl-4-formylbenzoate와 반응시킨 고체상태의 하이드라자이드비드를 환원된 아민에 붙이고, trifluoro acetic acid (TFA)와 같이 수소 이온을 발생시키는 시약을 통해 가수분해하여 비드를 떨어뜨려 질산화 단백질만을 선택적으로 추출해내는 방법이다[40]. Prokai-Tatrai는 이 방법을 혈장에 적용하였으며, 총 12개의 질산화 단백질을 동정해내었다. 이 외에도 Kim의 연구팀에서는 2009년과 2011년 2개의 농축방법을 각각 보고하였는데, 쉬프 베이스(schiff base)를 사용한 방법과[41] 불화탄소(fluorinated carbon) 친화표지를 사용한 방법이다[42]. 두 방법 모두 질산화 단백질로부터 환원된 아민에 친화표지를 붙이게 되는데, 쉬프 베이스 방법은 시료를 pyridine-2-carboxaldehyde와 반응시켜 bispyridinylated 형태로 만들어 준 뒤 Ni²⁺-NTA magnetic agarose bead를 사용하여 잡아내는 것이다. 반면, 불화탄소 친화표지를 사용한 방법은 시료를 N-succinimidyl 3-perfluorobutyl propionate와 반응시킨 뒤 불소화(fluorous)비드에 통과시켜 불소-불소(fluorine-fluorine) 상호작용을 통해 친화표지

가 붙은 단백질을 선택적으로 추출해 내는 방법이다. 두 방법은 각각 BSA와 hsp70 세포에 적용되어서 1개와 28개의 질산화 단백질을 동정하였다. 특이적으로, 슈프 베이스 방법만이 위에서 언급한 모든 방법들 중에 유일하게 MALDI-TOF 질량분석기로 분석되었는데, 슈프 베이스 형태의 친화표지가 ESI 방식의 질량분석기에서 이온화가 잘 되지 않는 문제로 인하여 MALDI-TOF 질량분석기를 사용하였다.

질산화가 일어난 단백질에 화학적 변형을 일으켜 이들을 추출하는 방법은 또한 정량분석에 장점을 가지고 있다. 현재까지의 질산화 정도에 대한 정량은 항체를 이용한 면역반응이 대부분을 차지하고 있다. 이들은 일반적으로 사용되는 정량방법이지만, 그 정확한 양을 알 수 없고 두 개의 정량성이 비슷한 경우 판별이 쉽지 않으며, 비 특이적인 단백질의 결합에 대해 배경 신호(background signal)가 발생할 수 있다는 단점이 있다. 반면에 화학적인 변형을 사용하여 질산화 단백질을 분석하게 되면, 이들 각각의 화학적인 성질에 따라서 선택적인 분석이 가능해지는 장점이 있다. 이 방법은 과거부터 종종 보고되어 왔는데, Crowley는 1998년 질산화 단백질의 -NO₂ 잔기를 *n*-propyl carboxylic acid ester와 heptafluorobutyric anhydride 용액에서 반응시켜 fluoroacylated 형태로 바꾸어 주고 이를 기체크로마토그래피-MS로 분석, 정량곡선을 작성하여 정량성이 나타남을 발표하였다[43]. Gevaert는 단백질에 변형이 일어나면 액체크로마토그래피에서 방출되는 시간에 차이가 생기는 점을 이용하여 combined fractional diagonal chromatography (CO-FRADIC)로 명명된 방법을 개발하였다[44]. 이 방법은 시료를 여러 개의 분획으로 나뉜 다음 특정한 화학적 변형을 일으켜 변형이 되지 않은 시료와 변형된 시료를 서로 다른 RT에 나누어 받음으로써 두 종류의 시료를 분리한 뒤에 분석하는 방법으로, 이후 Ghesquiere와 Larsen의 연구에서도 동일한 방법으로 응용되었다[44, 45]. 특히, Ghesquiere는 peroxydinitrite를 사용하여 강제로 질산화시킨 jurkat 세포에서 총 267개의 질산화 단백질을 동정함으로써 가장 많은 수의 단백질을 동정하였다.

위와 같이 최근까지도 다양한 질산화 단백질의 농축 기술은 개발되고 있지만 생체 내에서의 워낙 적은 양으로 인해 생체 시료에서는 적용하기가 어려워 아직도 많은 경우 질산화 시약을 처리하여 실험을 진행하거나 nitrotyrosine 모델 시스템을 만들어 확인을 하는 것이 대부분이다.

2) 질산화 단백질의 정량

잘 알려져 있는 인산화와 같은 단백질의 전사후 수식은 우리 생체 내에서 중요한 신호전달 물질로서 작용을 하며 인산화의 양에 따라 생체 내 단백질의 활성을 결정 짓는 중요한 요소이다. 그렇기 때문에 단백질의 번역 후 수식의 정량 또한 분석에서 매우 중요한 요소를 차지한다.

질산화 단백질의 정량법은 전통적 분석방법인 항체기반 분석법으로 질산화 특이항체를 이용하여 밴드의 세기를 측정하는 것에서부터 발전하였으며, 주로 NO₂에 특이적으로 결합할 수 있는 친화표지 등을 이용하여 정량을 하였다. Sharov는 4-aminomethylbenzene sulfonic acid (ABS)와 potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆)를 반복시켜 NO₂ 잔기에 반응시킴으로써 형광을 나타내는 친화표지를 붙여주고, 형광스펙트로스코피(fluorescent spectroscopy)를 사용하여 정량하는 실험을 발표하였다[46]. 이 방법은 복잡한 혼합물에서 적용되었고, 10 pmol까지의 정량한계를 결과로 보여주었다. 이와 비슷한 방법으로, Wisastra는 salicylaldehyde와 aluminum chloride를 시료에 함께 처리하여 NO₂ 잔기를 형광에 반응하는 물질로 변형시켜 준 뒤 359 nm와 475 nm의 형광에서 정량비교를 실험하였다[47]. 계속해서 언급되지만 질산화 단백질의 정량은 생체 내의 적은 양 때문에 직접적인 정량이 매우 힘들다. 이전의 많은 연구에서 질산화 단백질의 정량은 항체 기반 단백질 검출 방법(dot-blot, western blot, ELISA 등)을 이용하여 수행하였고, 민감도가 높은 항체 기반 실험방법의 특성상 전체 질산화 단백질의 양적 차이에 관한 충분한 정보는 제공할 수 있다. 그러나 단백질의 질산화에 의하여 발생하는 여러 신호전달, 반응 기전이 어떠한 단백질, 어느 위치에서 그리고 얼마만큼의 빈도로 일어나는가에 관한 상관관계는 확인을 할 수 없기 때문에 사실상 획득 가능한 정보가 극히 제한적이라 할 수 있다. 그에 반해 질량분석기를 이용한 분석의 경우 질산화가 일어난 정확한 아미노산에 대한 정량 비교가 가능하기 때문에 단순히 전체 질산화 단백질의 정량 차이만을 확인하는 것이 아니라 단백질의 기능과 질산화 단백질 정도와의 상관관계를 유추해 볼 수 있다.

질량분석기의 정량에서 MALDI는 장비의 특성상 시료에 따른 재현성이 확보되기 힘들기 때문에 주로 액체크로마토그래피를 이용한 정량을 수행한다. 이때 액체크로마토그래피상에서 펩티드의 광범위한 물리화학적 특성(크기, 전하, 소수성)에 따른 질량분석 반응의 차이 때문에, 대부분 펩티드 기반의 정량에서는 각 펩티드의 비교를 통해 정확성을 높인다.

질산화 단백질의 정량 분석은 주로 화학표지화(chemical labelling) 방법을 사용한다. 펩티드에 서로 다른 질량 값을 갖는 화학표지(iTRAQ, TMT)를 붙인 후 동량의 혼합 펩티드를 액체크로마토그래피-탠덤매스분석하여 서로 다른 질량 값을 갖는 화학표지 이온의 세기를 이용하여 상대적으로 정량을 하는 방법을 사용한다.

Evans의 실험에서는 iTRAQ, TMTM라는 화학표지를 이용한 정량 방법을 이전에 발표가 되었던 농축방법과 같이 활용하였다. BSA 단백질에 과산화아질산염을 처리한 NO₂-BSA에 앞의 농축방법에서 소개되었던 것처럼 반응성이 좋지 않은 NO₂잔기를 아민으로 치환을 하는 과정이 있으며, 그 전에 이미 있던 아민 잔기에 화학표지가 붙는 것을 막기 위해 lysine과 N-말단을 아세틸화를 수행하

였다. 그 이후 NO₂가 치환된 아민기에 TMT, iTRAQ 시약을 반응시킨 후 액체크로마토그래피-탠덤매스분석을 이용하여 분석하였고, 동일한 펩티드에서 유래된 탠덤매스분석스펙트럼에서 화학표지 이온에 해당하는 피크들의 세기를 비교함으로써 정량을 수행하였다[48].

Zhang 등의 연구에서의 경우는 화학표지를 사용하지 않는 방법을 이용하여 정량을 수행하였다. 이때의 전제는 서로 다른 분석에서의 재현성이 가장 중요하므로 microfluidic HPLC chip system와 Q-TOF 질량분석기를 사용하여 서로 다른 질산화시약과 환경에서 얻어진 BSA, OVA 시료를 분석하였다. 활성질소 단백질의 정량을 위해서 NO₂ 잔기를 포함한 펩티드(P_{nitrotyrosine})와 동일한 아미노산 서열을 가지지만 NO₂ 잔기가 없는 펩티드(P_{native})에 상응하는 스펙트럼의 피크의 면적값을 사용하여 아래와 같은 식에 대입하여 질산화 단백질의 정량을 수행한다.

$$\text{질산화 단백질 rate} = P_{\text{nitrotyrosine}} / (P_{\text{nitrotyrosine}} + P_{\text{native}}), *P = \text{Peptide}$$

그 결과 전체 질산화 단백질의 양이 단순히 질산화가 일어난 아미노산의 서열에 의한 질산화 단백질의 양을 의미하지는 않는다는 것을 실험적으로 밝혀 보았으며, 그것은 질산화단백질의 발생 기전이 독립적으로 존재 한다고 생각할 수 있다[49].

이 외에도 Tsumoto는 질산화 단백질에 중수소로 치환된 메탄과 치환되지 않은 메탄이 있는 두 종류의 아민에 반응하는 시약(amine-reactive reagent)을 사용하여 두 개의 서로 다른 시료에 각각을 처리해 차이가 나는 3 Da를 이용하여 두 시료를 정량비교하고자 하였다[50]. 이와 같이 화학적인 변형을 이용한 질산화 단백질의 정량 분석은 향후 질산화 단백질과 질병, 신호전달과의 상관관계를 규명하는데 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

결론

단백질의 질산화는 노화와 연관된다. 다양한 신경질환과 관련되어 있을 것이라고 생각되는 중요한 단백질의 번역 후 수식으로 최근에도 다양한 연구 결과들이 발표되고 있는 분야이다. 이 분야에서 질량분석기를 이용한 단백질의 질산화분석은 화학적친화표지를 이용한 농축방법이 발전하고있다. 하지만 이러한 농축방법이 아직까지는 실제 질병모델에서 단백질의 질산화기능을 밝힐 정도의 효율을 갖지는 못하는 현실이다. 이것은 생체 내에 단백질의 질산화가 워낙 소량으로 존재하기 때문인데, 앞으로의 연구에서는 실제 질병모델에서 적용가능한 농축방법이 개발될 것으로 기대되며, 그 이후에는 질병모델에서의 단백질 질산화자리(site)의 동정과 정량을 통해 질병과 단백질 질산화간의 상관관계가 밝혀질 것이라고 생각된다.

REFERENCES

1. Reynolds MR, Berry RW, Binder LI. Site-specific nitration and oxidative dityrosine bridging of the tau protein by peroxynitrite: implications for Alzheimer's disease. *Biochemistry* 2005;44:1690-700.
2. Yeo WS, Lee SJ, Lee JR, Kim KP. Nitrosative protein tyrosine modifications: biochemistry and functional significance. *BMB Rep* 2008;41:194-203.
3. Muntane J, la Mata MD. Nitric oxide and cancer. *World J Hepatol* 2010;2:337-44.
4. MacMillan-Crow LA, Cruthirds DL, Ahki KM, Sanders PW, Thompson JA. Mitochondrial tyrosine nitration precedes chronic allograft nephropathy. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1603-8.
5. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 2001;70:437-73.
6. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption/ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988;60:2299-301.
7. Abello N, Kerstjens HA, Postma DS, Bischoff R. Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *J Proteome Res* 2009;8:3222-38.
8. Turko IV, Murad F. Mapping sites of tyrosine nitration by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Methods Enzymol* 2005;396:266-75.
9. Tedeschi G, Cappelletti G, Negri A, Pagliato L, Maggioni MG, Maci R, et al. Characterization of nitroproteome in neuron-like PC12 cells differentiated with nerve growth factor: identification of two nitration sites in alpha-tubulin. *Proteomics* 2005;5:2422-32.
10. Sarver A, Scheffler NK, Shetlar MD, Gibson BW. Analysis of peptides and proteins containing nitrotyrosine by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2001;12:439-48.
11. Sheeley SA, Rubakhin SS, Sweedler JV. The detection of nitrated tyrosine in neuropeptides: a MALDI matrix-dependent response. *Anal Bioanal Chem* 2005;382:22-7.
12. Petersson AS, Steen H, Kalume DE, Caidahl K, Roepstorff P. Investigation of tyrosine nitration in proteins by mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2001;36:616-25.
13. Salavej P, Spalteholz H, Arnhold J. Modification of amino acid residues in human serum albumin by myeloperoxidase. *Free Radic Biol Med* 2006;40:516-25.
14. Shin YS, Moon JH, Kim MS. Selective screening of tyrosine-nitrated peptides in tryptic mixtures by in-source photodissociation at 355 nm in matrix-assisted laser desorption ionization. *Anal Chem* 2011;83:1704-8.
15. Butt YK, Lo SC. Detecting nitrated proteins by proteomic technologies. *Methods Enzymol* 2008;440:17-31.
16. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4003-8.
17. Yoon SW, Kang S, Ryu SE, Poo H. Identification of tyrosine-nitrated proteins in HT22 hippocampal cells during glutamate-induced oxidative stress. *Cell Prolif* 2010;43:584-93.
18. Cappelletti G, Maggioni MG, Tedeschi G, Maci R. Protein tyrosine nitration is triggered by nerve growth factor during neuronal differentiation of PC12 cells. *Exp Cell Res* 2003;288:9-20.
19. Reed TT, Pierce WM Jr, Turner DM, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of nitrated brain proteins in early Alzheimer's disease inferior parietal lobule. *J Cell Mol Med* 2009;13:2019-29.
20. Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR, But-

- terfield DA. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 2003;85:1394-401.
21. Kanski J, Alterman MA, Schoneich C. Proteomic identification of age-dependent protein nitration in rat skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 2003;35:1229-39.
 22. Salzano AM, D'Ambrosio C, Scaloni A. Mass spectrometric characterization of proteins modified by nitric oxide-derived species. *Methods Enzymol* 2008;440:3-15.
 23. Fiore G, Di Cristo C, Monti G, Amoresano A, Columbano L, Pucci P, et al. Tubulin nitration in human gliomas. *Neurosci Lett* 2006;394:57-62.
 24. Sultana R, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Merchant M, Klein JB, et al. Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiol Dis* 2006;22:76-87.
 25. Zhan X, Desiderio DM. Nitroproteins Identified in Human Ex-smoker Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Aging Dis* 2011;2:100-15.
 26. Zhan X, Desiderio DM. MALDI-induced Fragmentation of Leucine enkephalin, Nitro-Tyr Leucine Enkephalin, and d(5)-Phe-Nitro-Tyr Leucine Enkephalin. *Int J Mass Spectrom* 2009;287:77-86.
 27. Soderling AS, Hultman L, Delbro D, Hojrup P, Caidahl K. Reduction of the nitro group during sample preparation may cause underestimation of the nitration level in 3-nitrotyrosine immunoblotting. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;851:277-86.
 28. Koeck T, Fu X, Hazen SL, Crabb JW, Stuehr DJ, Aulak KS. Rapid and selective oxygen-regulated protein tyrosine denitration and nitration in mitochondria. *J Biol Chem* 2004;279:27257-62.
 29. Borges CR, Kuhn DM, Watson JT. Mass mapping sites of nitration in tyrosine hydroxylase: random vs selective nitration of three tyrosine residues. *Chem Res Toxicol* 2003;16:536-40.
 30. Ducrocq C, Dendane M, Laprevote O, Serani L, Das BC, Bouchemal-Chibani N, et al. Chemical modifications of the vasoconstrictor peptide angiotensin II by nitrogen oxides (NO, HNO₂, HOONO)--evaluation by mass spectrometry. *Eur J Biochem* 1998;253:146-53.
 31. Cook SL, Jackson GP. Characterization of tyrosine nitration and cysteine nitrosylation modifications by metastable atom-activation dissociation mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2011;22:221-32.
 32. Zubarev RA, Horn DM, Fridriksson EK, Kelleher NL, Kruger NA, Lewis MA, et al. Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations. *Anal Chem* 2000;72:563-73.
 33. Kelleher NL, Zubarev RA, Bush K, Furie B, Furie BC, McLafferty FW, et al. Localization of labile posttranslational modifications by electron capture dissociation: the case of gamma-carboxyglutamic acid. *Anal Chem* 1999;71:4250-3.
 34. Jones AW, Mikhailov VA, Iniesta J, Cooper HJ. Electron capture dissociation mass spectrometry of tyrosine nitrated peptides. *J Am Soc Mass Spectrom* 2010;21:268-77.
 35. Turko IV, Li L, Aulak KS, Stuehr DJ, Chang JY, Murad F. Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. *J Biol Chem* 2003;278:33972-7.
 36. Zhan X, Desiderio DM. Nitroproteins from a human pituitary adenoma tissue discovered with a nitrotyrosine affinity column and tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2006;354:279-89.
 37. Nikov G, Bhat V, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrated proteins by nitrotyrosine-specific affinity probes and mass spectrometry. *Anal Biochem* 2003;320:214-22.
 38. Abello N, Barroso B, Kerstjens HA, Postma DS, Bischoff R. Chemical labeling and enrichment of nitrotyrosine-containing peptides. *Talanta* 2010;80:1503-12.
 39. Zhang Q, Qian WJ, Knyushko TV, Clauss TR, Purvine SO, Moore RJ, et al. A method for selective enrichment and analysis of nitrotyrosine-containing peptides in complex proteome samples. *J Proteome Res* 2007;6:2257-68.
 40. Prokai-Tatrai K, Guo J, Prokai L. Selective chemoprecipitation and subsequent release of tagged species for the analysis of nitropeptides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2011;10:M110.002923.
 41. Lee JR, Lee SJ, Kim TW, Kim JK, Park HS, Kim DE, et al. Chemical approach for specific enrichment and mass analysis of nitrated peptides. *Anal Chem* 2009;81:6620-6.
 42. Kim JK, Lee JR, Kang JW, Lee SJ, Shin GC, Yeo WS, et al. Selective enrichment and mass spectrometric identification of nitrated peptides using fluorinated carbon tags. *Anal Chem* 2011;83:157-63.
 43. Crowley JR, Yarasheski K, Leeuwenburgh C, Turk J, Heinecke JW. Isotope dilution mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine in proteins and tissues is facilitated by reduction to 3-aminotyrosine. *Anal Biochem* 1998;259:127-35.
 44. Ghesquiere B, Colaert N, Helsens K, Dejager L, Vanhaute C, Verleysen K, et al. In vitro and in vivo protein-bound tyrosine nitration characterized by diagonal chromatography. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:2642-52.
 45. Larsen TR, Bache N, Gramsbergen JB, Roepstorff P. Identification of nitrotyrosine containing peptides using combined fractional diagonal chromatography (COFRADIC) and off-line nano-LC-MALDI. *J Am Soc Mass Spectrom* 2011;22:989-96.
 46. Sharov VS, Dremina ES, Galeva NA, Gerstenecker GS, Li X, Dobrowsky RT, et al. Fluorogenic Tagging of Peptide and Protein 3-Nitrotyrosine with 4-(Aminomethyl)-benzenesulfonic Acid for Quantitative Analysis of Protein Tyrosine Nitration. *Chromatographia* 2010;71:37-53.
 47. Wisastra R, Poelstra K, Bischoff R, Maarsingh H, Haisma HJ, Dekker FJ. Antibody-free detection of protein tyrosine nitration in tissue sections. *Chembiochem* 2011;12:2016-20.
 48. Robinson RA, Evans AR. Enhanced sample multiplexing for nitrotyrosine-modified proteins using combined precursor isotopic labeling and isobaric tagging. *Anal Chem* 2012;84:4677-86.
 49. Zhang Y, Yang H, Poschl U. Analysis of nitrated proteins and tryptic peptides by HPLC-chip-MS/MS: site-specific quantification, nitration degree, and reactivity of tyrosine residues. *Anal Bioanal Chem* 2011;399:459-71.
 50. Tsumoto H, Taguchi R, Kohda K. Efficient identification and quantification of peptides containing nitrotyrosine by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry after derivatization. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2010;58:488-94.