

Možnosti proteomických metod v klinické diagnostice

Vajrychová M.¹, Tambor V.², Lenčo J.¹

¹Ústav molekulární patologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové

²Centrum biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové

SOUHRN

Cíl: Poskytnout základní přehled proteomických přístupů a metod a zhodnotit potenciál jejich využití v klinické praxi.

Typ: Přehledová práce

V klinické praxi roste význam laboratorních vyšetření pro zjištění aktuálního stavu pacientů. Mezi významnou skupinu molekul patří bezesporu proteiny, jejichž stanovení nejen umožňuje, ale i usnadňuje, urychluje a zpřesňuje diagnostiku. Hledání nových proteinových molekul s diagnostickým potenciálem se proto stalo jedním z důležitých cílů proteomiky.

Proteomické přístupy zahrnující separaci a identifikaci molekul pomocí pokročilých analytických technologií a bioinformatiky jsou dnes využívány zejména při hledání nových potenciálních proteinových a peptidových markerů ve snadno dostupném klinickém materiálu. Některé proteomické metody začaly být využívány v posledních letech i pro následné ověřování diagnostického významu objevených markerů a v budoucnu mohou najít uplatnění i při rutinním laboratorním vyšetření. Cílem této práce je poskytnout základní přehled proteomických přístupů a metod a zhodnotit jejich význam pro klinickou praxi.

Klíčová slova: Proteomika, proteinové a peptidové markery, proteomické přístupy, hmotnostní spektrometrie

SUMMARY

Vajrychová M., Tambor V., Lenčo J.: The potential of proteomic methods in clinical diagnostics

Objective: The review provides basic overview of proteomic approaches and methods and evaluates their potential towards clinical practice.

Design: Review

The role of laboratory biomarker assessment in patient diagnosis determination has been increasing. Proteins unquestionably rank among very important molecules. Protein assessment of which not only enables, but can also accelerate and facilitate the diagnosis and make it more accurate. Hence, discovery of proteins with diagnostic potential has become one of the main goals of proteomics.

Currently, proteomic approaches involving separation and identification of molecules by means of advanced analytical technologies and bioinformatics are typically used for the discovery of protein and peptide biomarkers in well accessible clinical material. However, in recent years some of the methods have been employed also for subsequent verification of the diagnostic potential of newly discovered biomarkers and are believed to be used also for routine laboratory settings in the future. The aim of the work is to provide an overview of proteomic approaches and methods and evaluate their relevance for clinical practice.

Keywords: Proteomics, protein and peptide markers, proteomic approaches, mass spectrometry

Úvod

Díky dynamickému rozvoji proteomických technologií v posledních několika letech je dnes k dispozici široká paleta separačních a identifikačních metod, které umožňují provádět explorativní i cílené analýzy proteomu, případně některých jeho specifických aspektů jako jsou posttranslační modifikace proteinů nebo jejich interakce. Každá z dostupných metod má svá specifika, která předurčují jejich využití. Kombinace různých proteomických metod a technologií vymezuje řadu dobře definovaných proteomických přístupů. Společným jmenovatelem většiny moderních proteomických přístupů je využití hmotnostní spektrometrie (MS) jako klíčové metody pro identifikaci proteinů [1].

Hmotnostní spektrometry měří molekulové hmotnosti látek, přesněji řečeno poměr jejich molekulových hmotností k náboji (m/z). Pro proteomické aplikace se používají hmotnostní spektrometry vybavené měkkými ionizačními technikami ESI (Electrospray Ionization) a MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization).

Tyto přístroje zaznamenávají tři různé úrovně informace o proteinech (obr. 1). V první řadě se jedná o určení molekulové hmotnosti proteinů. Tento typ analýz se využívá především pro měření MS profilů. Na nižší úrovni lze dále měřit molekulové hmotnosti peptidů vzniklých štěpením celých proteinů sekvenčně specifickou proteázou. Artificiální štěpení proteinů je nezbytným krokem většiny proteomických analýz. Nejčastěji používanou specifickou proteázou v proteomice je trypsin, který štěpí protein od N-konce za argininem nebo lyzinem. Trypsin u většiny proteinů produkuje dostatečné množství peptidů, které jsou vhodné pro následné analýzy na hmotnostních spektrometrech. Na měření molekulových hmotností specifických peptidů je založena dnes již zřídka používaná metoda peptidového mapování (PMF - Peptide Mass Fingerprinting). Tato metoda se dříve hojně používala pro rychlou identifikaci proteinů především v rámci proteomického přístupu založeném na gelových metodách. Na nejnižší úrovni lze na tandemových hmotnostních spektrometrech (MS/MS) získat informaci o molekulové hmotnosti fragmentů peptidů.

Na tomto typu analýz je postaven „shotgun“ proteomický přístup, který je dnes ze všech přístupů využívajících hmotnostní spektrometrii vnímán jako nejperspektivnější.

v původním formátu představena již v roce 1975 [4]. Ačkoliv odlišné formy elektroforézy byly používány již dříve, až kombinace izoelektrické fokusace (IEF) a jednorozměrné SDS elektroforézy poskytla dostatečně

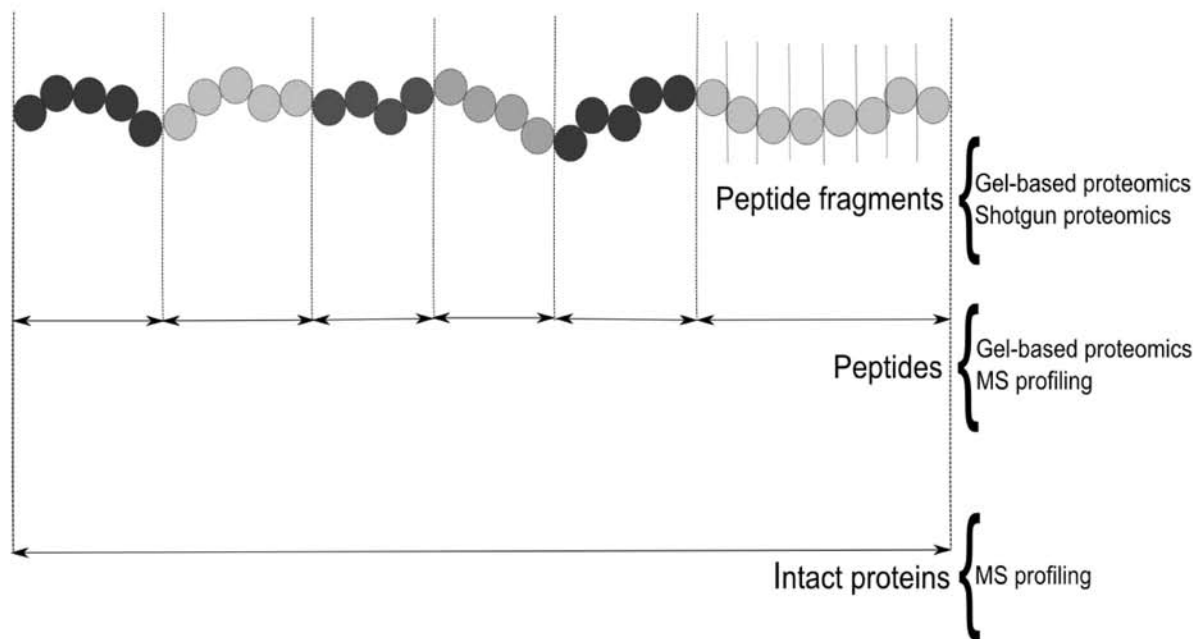


Fig. 1. Information about proteins can be obtained at three distinct levels by mass spectrometry. MS profiling provides information about molecular weight of intact proteins and native endogenous peptides. Proteins separated using gel electrophoresis can be identified by peptide mass fingerprinting (PMF), which is based on measuring molecular weight of artificially prepared peptides. Peptide fragmentation followed by MS/MS spectra acquisition and interpretation can be used for confirming PMF results, but more importantly is essential for shotgun proteomic applications.

Vznik a další rozvoj proteomiky by nebyl možný bez předchozích úspěšných projektů molekulární biologie a genomiky, které poskytly nezbytná sekvenční data. Zpracovávat, spravovat a zpřístupňovat tato data je úkolem bioinformatiky. Na základě znalosti sekvence genomu umožnily bioinformatické nástroje kromě jiného také identifikaci neznámých proteinů pomocí metod hmotnostní spektrometrie [2]. Bioinformatika proto představuje naprosto nepostradatelnou součást proteomiky a jejich vzájemný vztah bude stále těsnější.

V posledním desetiletí proteomika prokázala, že je schopna odpovědět na některé klíčové otázky v biologických a lékařských oborech. K velmi aktuálním patří aplikace proteomických metod do klinického prostředí, kde vedle studia molekulárních mechanismů nemocí a vyhledávání nových terapeutických cílů je zvláštní význam kladen na vyhledávání slibných diagnostických molekul. Ačkoliv těžiště proteomických aplikací stále leží především v oblasti výzkumu a vývoje, některé proteomické metody mají potenciál pro zavedení do laboratorní diagnostiky, jak ostatně dokládá úspěšné etablování měření MS profilů v klinických mikrobiologických laboratořích [3].

Proteomika založená na gelových metodách

Proteomika jako nový směr funkční genomiky by patrně nevznikla bez vývoje a rozšíření dvourozměrné polyakrylamidové elektroforézy (2D-PAGE), která byla

vysoké rozlišení pro globální analýzu proteomu. K základním proteomickým metodám dnes patří 2D-PAGE zdokonalená ukotvenými pH gradienty pro IEF [5]. Hlavní nedostatek metody, tj. reprodukovatelnost, se podařilo významně ošetřit zavedením diferenciatní gelové elektroforézy (DIGE). U DIGE jsou proteiny před analýzou kovalentně značeny fluorescenčními barvivy, která mají jiná excitační a emisní spektra, avšak díky podobné chemické struktuře neovlivňují výslednou pozici proteinu na 2D-PAGE gelu [6]. Ačkoliv klasický formát 2D-PAGE trpí omezeným pokrytím koncentračního rozmezí proteinů a obtížnou separací proteinů s krajními fyzikálně-chemickými vlastnostmi, metoda je stále využívána v oblasti klinické proteomiky [5,7]. Nezástupitelná je pak úloha 2D-PAGE pro globální analýzy proteinových izoform a některých posttranslačních modifikací [8].

Neznámé proteiny rozdělené na 2D-PAGE jsou identifikovány pomocí metod hmotnostní spektrometrie. Jelikož se jedná o analýzu peptidů vzniklých z elektroforeticky separovaného proteinu, postačuje k tomuto účelu hmotnostní spektrometr typu MALDI-TOF. Spolu s odpovídajícím softwarem dokáže tento jednoduchý přístroj provádět identifikace proteinů metodou peptidového mapování PMF [1].

Testy založené na různých typech elektroforetické separace proteinů se dnes v diagnostických laboratořích využívají rutinně. Širšímu využití 2D-PAGE v klinické praxi brání především manuální náročnost a obtížná automatizace této metody. Na druhou stranu 2D-PAGE

může být v diagnostice využita u velmi specifických onemocnění, například pro jednoznačnou identifikaci a charakterizaci abnormálních proteinů produkovaných u hemato-onkologických onemocnění [9,10].

Proteomika založená na protilátkách

Protilátky využívá naprostá většina rutinně používaných diagnostických souprav, především ELISA testů, které dnes představují zavedený standard pro kvantifikaci proteinů v klinické laboratorní praxi. Tyto diagnostické soupravy jsou převážně určeny pro stanovení pouze jednoho vybraného proteinu. Skutečný „high-throughput“ proteomický přístup využívající protilátky se tak rozvíjel až s dostupností multiplexových technologií, které umožňují analyzovat v jednom vzorku desítky až stovky různých proteinů [11].

Logickou námitkou proti tomuto přístupu může být nedostupnost kvalitních a ověřených protilátek proti některým proteinům. Na přípravě a důkladném ověření specifických protilátek je postaven projekt pro charakterizaci celého lidského proteomu známý jako Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org) [12]. V současné době je těmito protilátkami pokryto přes 12 200 lidských genů. Tento projekt, který výrazně zvyšuje dostupnost kvalitních protilátek, spolu s dalším vývojem multiplexových technologií v budoucnu povede k širší aplikaci protilátkového přístupu do klinické proteomiky. Lze rovněž očekávat, že díky dalšímu vývoji ve smyslu vyšší robustnosti začnou do rutinní klinické praxe promlouvat i protilátkové multiplexové metody [13,14].

Proteomika založená na měření MS profilů

Přímá analýza vzorku na jednoduchém hmotnostním spektrometru MALDI-TOF může velmi rychle poskytnout náhled na jeho složení. Technologie byla doplněna o možnosti frakcionace na různých chromatografických površích ukotvených přímo na terčik, na který se nanáší vzorek pro MS analýzu [15]. Dnes je tato technologie známá jako SELDI-TOF (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization) a je využívána především k vyhledávání nových diagnostických molekul v tělních tekutinách [7]. Vhodný typ frakcionace může ze vzorku odstranit některé nežádoucí komponenty a obohatit jej tak o zajímavé proteiny či peptidy. Analogicky lze toto měření provádět pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF, kdy frakcionace vzorku probíhá odděleně před jeho nanesením na terčik. Mezi přednosti měření MS profilů patří vysoká průchodnost vzorků, jejich snadná příprava bez nutnosti enzymatického štěpení, velmi malé množství vzorku potřebného k analýzám, snadná obsluha a relativní cenová dostupnost technologie. Po zveřejnění průkopnické práce Petricoina a kol. [16] byla tato technologie v proteomické komunitě přijata s nadšením. Zdálo se, že je konečně k dispozici nástroj, který by urychlil vyhledávání, ově-

řování a zavádění nových markerů přítomných v lehce dostupných tělních tekutinách do klinických laboratoří, a co víc, že v těchto laboratořích může být rutinně používán. Rozporuplné, obtížně reprodukovatelné výsledky a opakovaně nalézané vysoce zastoupené fragmenty sérových proteinů, které nesplňují kritéria kladená na specifické markery, však přinesly vystrážlivění a kritické zhodnocení tohoto přístupu [17].

Na druhou stranu měření MS profilů přineslo první hmatatelný důkaz, že proteomika může zlepšit klinickou diagnostiku. OVA1 test schválený FDA (Food and Drug Administration) vyhodnocuje u pacientek s nálezem na vaječniku hladiny CA 125 a dalších čtyř sérových proteinů (transthyretinu, apolipoproteinu A1, β -2 mikroglobulinu a transferinu). Tyto proteiny byly vybrány ze sedmi kandidátů objevených měřeními MS profilů séra [18,19]. OVA1 test rozděluje pacientky do skupin s rozdílnou pravděpodobností rakoviny vaječniku a má lepší citlivost než stanovení samotného CA 125. OVA1 test je však založen na protilátkách, z čehož lze usoudit, že měření MS profilů se pravděpodobně nestane rutinně používanou metodou v humánní klinické diagnostice [20].

Jednoduchý princip měření MS profilů se stal základem pro unikátní proteomickou metodu MALDI zobrazování (MALDI imaging). Hmotnostní spektrometr zde napodobuje funkci mikroskopu, kdy zaznamenává hmotnostní profily napříč řezem tkání. MALDI zobrazování umožňuje sledovat endogenní i exogenní molekuly s rozlišením několika desítek μ m a přináší zajímavé výsledky tam, kde je nutné znát přesnou lokalizaci molekul v tkáni [21]. MALDI zobrazování našlo uplatnění v oblasti výzkumu a vývoje, avšak do rutinní klinické praxe v blízkém časovém horizontu pravděpodobně nezasáhne. Největší překážkou v tuto chvíli představuje nedostupnost hmotnostních spektrometrů, které by byly schopné pokrýt ve velmi krátkém čase a s vysokým rozlišením celou plochu tkáňového řezu.

Zdálo by se, že měření MS profilů v tuto chvíli nemá klinické diagnostice co nabídnout a zůstane spojeno pouze s experimentálními laboratořemi. MS profilování se však v klinickém prostředí etablovalo jako první čistě proteomický přístup vůbec [3]. Měkká ionizační technika MALDI umožňuje získat profily proteinových komponent z celých buněk. Různé druhy a dokonce kmeny bakterií a hub produkují specifické MALDI MS profily a toho lze využít pro jejich rychlou a jednoznačnou identifikaci v klinických mikrobiologických laboratořích (obr. 2). Komerčně dodávané technologie pro identifikaci mikroorganismů zahrnují jednoduchý MALDI-TOF hmotnostní spektrometr a databázi standardních MS profilů mikroorganismů. V současné době je v České republice nainstalováno již několik těchto přístrojů.

„Shotgun“ proteomika

Název tohoto přístupu byl analogicky odvozen od „shotgun“ DNA sekvenování. Protože proteomické technologie využívající hmotnostní spektrometrii nejsou zatím schopné zvládnout „high-throughput“

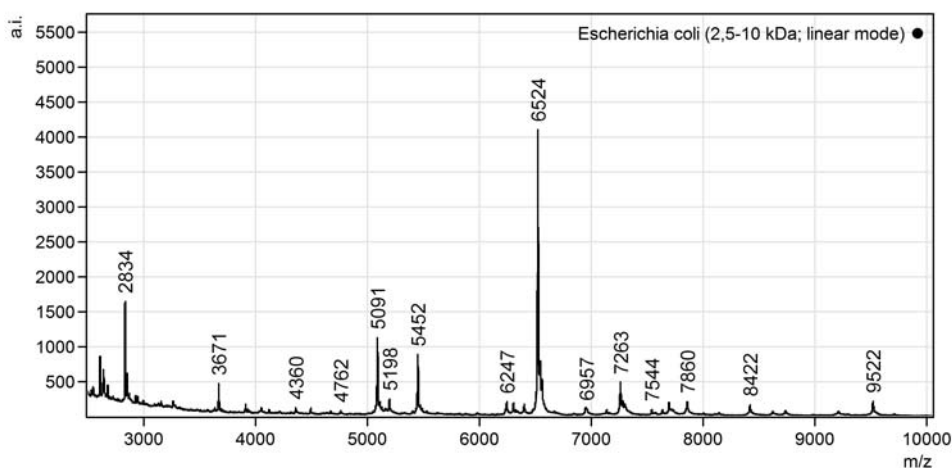


Fig. 2. MS profile obtained from *E. coli* (laboratory strain BL21). Spectrum was recorded with alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix on a 4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer (AB Sciex) operated in linear mode.

identifikaci proteinů v jejich parentním stavu, je u typického „shotgun“ experimentu směs proteinů nejprve štěpena sekvenčně specifickou proteázou na peptidy. Směs uměle připravených peptidů je následně analyzována na tandemových hmotnostních spektrometrech s předřazenou separací na kapalinovém chromatografu (LC-MS/MS). Z analýzy peptidů se pak skládá obraz původního složení směsi proteinů. „Shotgun“ proteomický přístup je pomocí nejnovější instrumentace schopen identifikovat přes 2 500 různých proteinů eukaryotních buněk během jedné LC-MS/MS analýzy, ve které chromatografická separace trvá 90 min [22].

Explorativní „shotgun“ proteomické analýzy

Cílem explorativních „shotgun“ analýz je popis co možná největšího počtu komponent ve vzorku. Tyto typy analýz se provádějí na tandemových hmotnostních spektrometrech, které dokáží přesně určit molekulovou hmotnost, resp. m/z , peptidového prekurzoru a z něj následně získat fragmentační spektrum. Při explorativních analýzách pracují tyto přístroje v tzv. módu závislém na informaci (Information-Dependent Analysis, IDA), při kterém jsou během měření z MS spekter vybírány vhodné prekurzory peptidů, které jsou následně fragmentovány a přístroj zaznamená MS/MS spektra. Tyto dva kroky se cyklicky opakují s cílem získat fragmentační informaci o co nejvyšším počtu prekurzorů, s čímž roste pravděpodobnost identifikace vysokého počtu proteinů. Nejnovější hmotnostní spektrometry dokáží fragmentovat více než 10 prekurzorů za sekundu. I tato rychlost je však nedostatečná pro pokrytí všech peptidů vzniklých po štěpení komplexního vzorku proteinů [23]. Pro co největší záchyt proteinů a detailní analýzu proteomu lze před analýzou na LC-MS/MS ještě předřadit jinou separační metodu, např. chromatografii na koloně se silným katexem, nebo frakcionaci prováděnou na základě jiných, např. chemických vlastností peptidů [24,25].

Na základě pravidel o fragmentaci peptidů jsou k získaným fragmentačním spektrům přiřazeny sekvence aminokyselin nejlépe odpovídající danému spektru. V dalším kroku jsou identifikované sekvence peptidů přiřazeny k odpovídajícím sekvencím proteinů. Pokud jsou úspěšně vysvětlena alespoň dvě fragmentační spektra pokrývající dva různé peptidy jednoho proteinu, je tento protein s velkou mírou jistoty identifikován. Identifikace proteinů v takovém měřítku, v jakém to umožňuje „shotgun“ proteomika, by však nebyla možná bez znalostí sekvence genomů a bioinformatických nástrojů [2].

Kromě identifikace je čím dál častěji cílem explorativních analýz získat také informace o kvantitativním zastoupení jednotlivých složek ve vzorku. Tato oblast „shotgun“ proteomiky prodělala v posledních letech dynamický vývoj. Dnes je dostupné široké spektrum metod, které umožňuje provádět jak relativní, tak absolutní kvantifikaci proteinů při explorativních analýzách. Jedna skupina těchto metod je založena na zavedení stabilních izotopů do proteinů nebo peptidů. Tato skupina metod je obecně známá jako izotopové ředění. Při analýzách klinických vzorků v úvahu přichází zavádění stabilních izotopů chemickou reakcí na úrovni proteinů, během enzymatického štěpení nebo chemickou reakcí na úrovni peptidů [26]. Kvantifikace vychází buď z MS nebo, v případě použití izobarického značení, z MS/MS spekter. Izobarické značení nezvyšuje komplexitu MS spekter, proto lze tímto způsobem kvantifikovat více různých vzorků v jedné analýze (obr. 3). Druhá skupina kvantitativních metod zahrnuje „label-free“ techniky, které nevyužívají stabilních izotopů a které jsou založeny na porovnávání naměřených intenzit peptidových prekurzorů mezi vzorky, anebo je kvantitativní informace odvozována z počtu identifikovaných peptidů daného proteinu [27].

Kvantitativní shotgun přístup zaujímá v proteomice vůdčí pozici, protože je schopen identifikovat velké množství proteinů a současně k nim přiřadit informaci o jejich zastoupení. Jednou z mnoha úspěšných „shotgun“ analýz provedených v poslední době je identifikace několika potenciálních kardiovaskulárních markerů

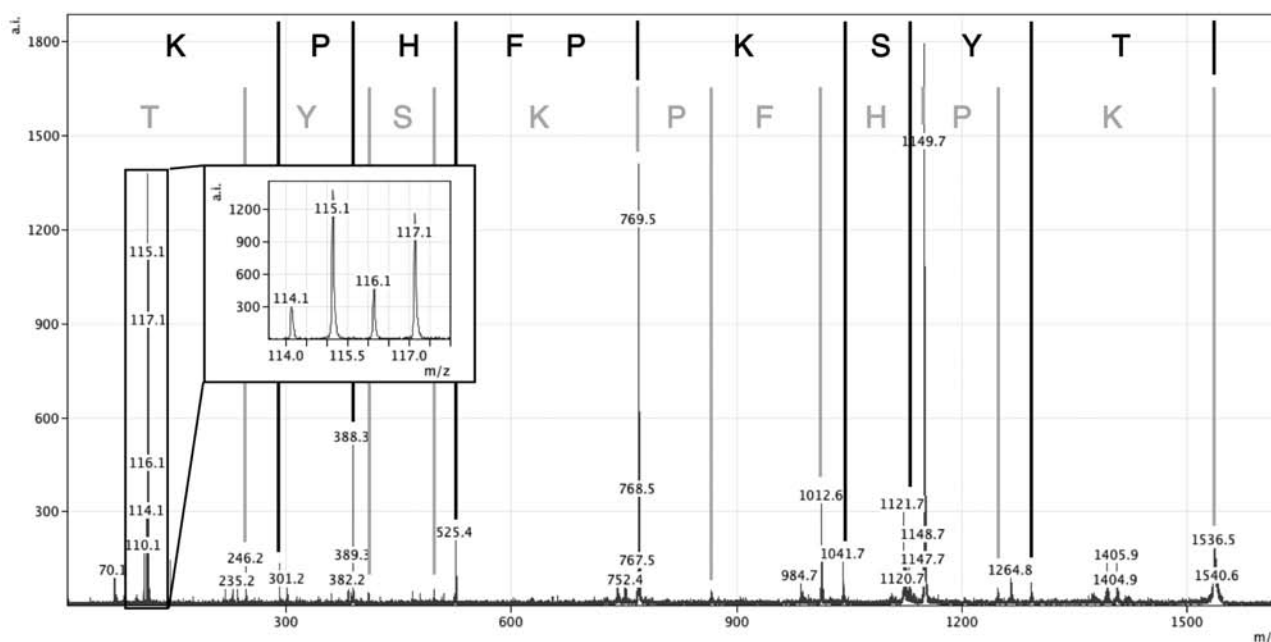


Fig. 3. MS/MS spectrum of iTRAQ labeled tryptic peptide TYSKPFHPK derived from IL-8 protein. Zoomed lower mass segment of the spectrum shows four iTRAQ reporter ions (114-117). The intensity of these ions corresponds to the quantity of the originating protein and may be thus used for relative quantitation and protein level comparison across four samples. Spectrum was obtained during exploratory analysis of amniotic fluid proteome changes associated with presence of infection and inflammation during spontaneous preterm labor.

v lidské plazmě [28]. Je zřejmé, že shotgun přístup je zatím používán výlučně na experimentálních pracovištích. Na posledním světovém kongresu Human Proteome Organisation v Ženevě v roce 2011 zazněl požadavek na vývoj proteomické technologie, která by umožnila do hloubky charakterizovat proteom nádorové tkáně. Tato informace by podle klinických pracovníků spolu se znalostí změn na úrovni DNA výrazně přispěla při rozhodování o léčebném postupu u jednotlivých pacientů. Je proto možné, že v budoucnu „shotgun“ technologie proniknou také do klinických laboratoří.

Cílené „shotgun“ proteomické analýzy

Kromě explorativního typu analýz lze „shotgun“ proteomiku využít také pro cílené sledování vybraných proteinů. K tomuto účelu se využívají hmotnostní spektrometry typu trojitého kvadrupólu (QqQ), které pracují v režimu monitorování vybraných reakcí (SRM - Selected Reaction Monitoring). SRM analýzy jsou v klinickém prostředí již zavedeny pro záchyt dědičných metabolických poruch nebo v oblasti toxikologie a monitorování terapeutických hladin léčiv [29, 30].

Pro proteomické aplikace přístroj v SRM módu propouští v prvním kvadrupólu pouze m/z vybraného peptidového prekurzoru, který je v kolizní cele fragmentován. Třetí kvadrupól pak propouští pouze specifickou m/z vybraného fragmentu. Kombinace filtrů Q1 a Q3, neboli přechod, je obvykle velmi specifický pro jednotlivé molekuly. Každý přechod je zaznamenáván pouze v rozmezí několika desítek milisekund, a proto lze v jedné metodě měřit až několik stovek přechodů specifických pro desítky peptidů. Je tedy zřejmé, že

SRM umožňuje provádět cílené multiplexové analýzy proteinů. Tryptické peptidy navíc produkují několik intenzivních fragmentů, proto lze pro zvýšení specificity měření v proteomice monitorovat více přechodů při stejném Q1 filtru. Z tohoto důvodu je možné se setkat s označením monitorování více reakcí (MRM - Multiple Reaction Monitoring) [31].

Oproti aplikacím využívaným v analýze malých molekul obnáší přesná absolutní kvantifikace proteinů pomocí SRM problémy spojené s efektivitou enzymatického štěpení. Proto se jako nejvhodnější standard pro taková měření jeví přímo proteiny s inkorporovanými těžkými izotopy, které se do vzorku přidávají ještě před enzymatickým štěpením. Příprava značených proteinových standardů však může být náročná, a proto se lze spíše setkat s použitím proteotypických syntetických peptidů s inkorporovanými těžkými izotopy [31].

Nezastupitelnou úlohu má SRM pro analýzu endogenně vzniklých nativních peptidů. V těchto případech je často nemožné připravit specifické monoklonální protilátky odlišující nativní peptidy, které představují překrývající úseky parentních proteinů. Jsou-li cílem SRM analýz nativní peptidy, problémy spojené se štěpením proteinů nejsou aktuální. V tomto případě se přesná absolutní kvantifikace provádí pomocí syntetických peptidů s inkorporovanými těžkými izotopy [32,33].

Velice slibnou aplikací SRM je analýza exprese mutovaných alel u nádorových onemocnění. Mutované proteiny jsou produkovány pouze nádorovými buňkami, a představují tak jedinečné diagnostické ukazatele. Velký význam má také získání informace o poměru produkce mutované a divoké formy proteinu v postižených buňkách [34].

SRM analýzy určené pro stanovování nativních peptidů v klinických vzorcích jsou schopné splnit požadavky kladené na metody používané v klinickém prostředí. Pokud se podaří vyřešit možnou variabilitu spojenou se štěpením proteinů, mohlo by SRM měření proniknout na pole klinické diagnostiky v oblasti rutinní kvantifikace proteinových markerů [35].

Závěr

Význam proteomiky ve vědě a výzkumu dokládají tisíce kvalitních publikací z různých biologických a lékařských oborů, přičemž v oblasti hledání nových klinicky důležitých molekul zaujímá proteomika jednu z předních pozic. Otázkou zůstává, zda proteomika nalezne širší uplatnění i při validaci nových diagnostických markerů a zda se jí podaří proniknout mezi rutinně používané metody humánní laboratorní medicíny.

O úspěšném etablování proteomiky do klinických pracovišť svědčí využití měření MS profilů na hmotnostních spektrometrech MALDI-TOF v klinické mikrobiologii. Další proteomickou metodou využívající hmotnostní spektrometrii, která by v blízké budoucnosti mohla laboratorní diagnostiku obohatit, je cílená analýza proteinů a peptidů pomocí SRM.

Literatura

1. **Han, X., Aslanian, A., Yates, J. R.** Mass spectrometry for proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008, 12 (5), p. 483–90.
2. **McHugh, L., Arthur, J. W.** Computational methods for protein identification from mass spectrometry data. *PLoS Comput. Biol.* 2008, 4 (2), e12.
3. **Bizzini, A., Greub, G.** Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010, 16 (11), p. 1614–9.
4. **O'Farrell, P. H.** High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* 1975, 250 (10), p. 4007–21.
5. **Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C.** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J. Proteomics.* 2010, 73 (11), p. 2064–77.
6. **Unlü, M., Morgan, M. E., Minden, J. S.** Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis.* 1997, 18 (11), p. 2071–7.
7. **Tambor, V., Fucíková, A., Lenco, J., et al.** Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician. *Physiol. Res.* 2010, 59 (4), p. 471–97.
8. **Casado-Vela, J., Cebrián, A., Gómez del Pulgar, M. T., et al.** Lights and shadows of proteomic technologies for the study of protein species including isoforms, splicing variants and protein post-translational modifications. *Proteomics.* 2011, 11 (4), p. 590–603.
9. **Maisnar, V., Tichy, M., Stulik, J., et al.** Capillary immunotyping electrophoresis and high resolution two-dimensional electrophoresis for the detection of mu-heavy chain disease. *Clin. Chim. Acta.* 2008, 389 (1-2), p. 171–3.
10. **Tissot, J. D., Tridon, A., Ruivard, M., et al.** Electrophoretic analyses in a case of monoclonal gamma chain disease. *Electrophoresis.* 1998, 19 (10), p. 1771–3.
11. **Schröder, C., Jacob, A., Tonack, S., et al.** Dual-color proteomic profiling of complex samples with a microarray of 810 cancer-related antibodies. *Mol. Cell Proteomics.* 2010, 9 (6), p. 1271–80.
12. **Berglund, L., Björling, E., Oksvold, P., et al.** A gene-centric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol. Cell Proteomics.* 2008, 7 (10), p. 2019–27.
13. **Yu, X., Schneiderhan-Marra, N., Joos T. O.** Protein microarrays for personalized medicine. *Clin. Chem.* 2010, 56 (3), p. 376–87.
14. **Pontén, F., Schwenk, J. M., Asplund, A., Edqvist, P-HD.** The Human Protein Atlas as a proteomic resource for biomarker discovery. *J. Intern. Med.* 2011, 270 (5), p. 428–46.
15. **Hutchens, T. W., Yip, T.** New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993, 7 (7), p. 576–80.
16. **Petricoin, E. F., Ardekani, A. M., Hitt, B. A., et al.** Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet.* 2002, 359 (9306), p. 572–7.
17. **Albrethsen, J.** The first decade of MALDI protein profiling: a lesson in translational biomarker research. *J. Proteomics.* 2011, 74 (6), p. 765–73.
18. **Rai, A. J., Zhang, Z., Rosenzweig, J., et al.** Proteomic approaches to tumor marker discovery. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2002, 126 (12), p. 1518–26.
19. **Zhang, Z., Bast, R. C. Jr, Yu, Y., et al.** Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2004, 64 (16), p. 5882–90.
20. **Zhang, Z., Chan, D. W.** The Road from Discovery to Clinical Diagnostics: Lessons Learned from the First FDA-Cleared In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assay of Proteomic Biomarkers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010, 19 (12), p. 2995–2999.
21. **Seeley, E. H., Caprioli, R. M.** MALDI imaging mass spectrometry of human tissue: method challenges and clinical perspectives. *Trends Biotechnol.* 2011, 29 (3), p. 136–43.
22. **Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J-P., et al.** Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol. Cell Proteomics.* 2011, 10 (9), M111.011015.
23. **Michalski, A., Cox, J., Mann, M.** More than 100,000 detectable peptide species elute in single shotgun proteomics runs but the majority is inaccessible to data-dependent LC-MS/MS. *J. Proteome Res.* 2011, 10 (4), p. 1785–93.
24. **Donato, P., Cacciola, F., Mondello, L., Dugo, P.** Comprehensive chromatographic separations in proteomics. *Journal of Chromatography A.* 2011, 1218 (49), p. 8777–90.
25. **Leitner, A., Lindner, W.** Chemistry meets proteomics: the use of chemical tagging reactions for MS-based proteomics. *Proteomics.* 2006, 6 (20), p. 5418–34.
26. **Iliuk, A., Galan, J., Tao, W. A.** Playing tag with quantitative proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 393 (2), p. 503–13.
27. **Neilson, K. A., Ali, N. A., Muralidharan, S., et al.** Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics.* 2011, 11 (4), p. 535–53.

28. **Addona, T. A., Shi, X., Keshishian, H., et al.** A pipeline that integrates the discovery and verification of plasma protein biomarkers reveals candidate markers for cardiovascular disease. *Nat. Biotechnol.* 2011, 29 (7), p. 635–43.
29. **Lehotay, D. C., Hall, P., Lepage, J., Eichhorst, J. C., Etter, M. L., Greenberg, C. R.** LC-MS/MS progress in newborn screening. *Clin. Biochem.* 2011, 44 (1), p. 21–31.
30. **Saint-Marcoux, F., Sauvage, F-L., Marquet, P.** Current role of LC-MS in therapeutic drug monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 388 (7), p. 1327–49.
31. **Gallien, S., Duriez, E., Domon, B.** Selected reaction monitoring applied to proteomics. *J. Mass Spectrom.* 2011, 46 (3), p. 298–312.
32. **Van den Broek, I., Sparidans, R. W., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H.** Quantitative assay for six potential breast cancer biomarker peptides in human serum by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2010, 878 (5-6), p. 590–602.
33. **Lenco, J., Lan, R., Edwards, N., Goldman, R.** MS/MS library facilitated MRM quantification of native peptides prepared by denaturing ultrafiltration. *Proteome Sci.* 2012, 10 (1), p. 7.
34. **Wang, Q., Chaerkady, R., Wu, J., et al.** Mutant proteins as cancer-specific biomarkers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011, 108 (6), p. 2444–9.
35. **Manfred, R.** LC-MS/MS for protein and peptide quantification in clinical chemistry. *Journal of Chromatography B.* 2012, 883-884, p. 59–67. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023211006209>

Práce byla podpořena projektem MŠMT ME10025.

Do redakce došlo 7. 3. 2012

Adresa pro korespondenci:
Mgr. Marie Vajrychová
Ústav molekulární patologie
Fakulta vojenského zdravotnictví, UO
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: vajrychova@pmfhk.cz