

Tvorba hmotnostne spektrometrických spektrálnych knižníc nádorových bunčných línií

Building Mass Spectrometry Spectral Libraries of Human Cancer Cell Lines

Faktor J., Bouchal P.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Súhrn

Východiská: Kvantifikácia proteínov v modelových nádorových bunčných líniách a v nádorových tkanivách je často predmetom onkologického výskumu. Metóda SWATH (sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion spectra), novinka v kvantitatívnej onkoproteomike, získava čoraz väčšiu popularitu, pretože umožňuje kvantifikáciu všetkých proteínov zaznamenaných v spektrálnej knižnici. Spektrálna knižnica obsahuje fragmentačné informácie o každom detekovateľnom proteíne vo vzorke. Dôkladná príprava spektrálnej knižnice výrazne vylepší kvantifikáciu obzvlášť nízkoabundantných proteínov, ktoré často zohrávajú výnámnu úlohu v nádorových ochoreniach. **Ciel:** V tomto článku sa venujeme optimalizácii prípravy spektrálnej knižnice s cieľom maximalizovať počet kvantifikovateľných proteínov v modelovej bunčnej línii MCF-7 odvodenej od karcinómu prsníka. Experiment je zameraný na optimalizáciu postupu prípravy vzorky pred vstupom do hmotnostného spektrometru, kde bol skúmaný vplyv zloženia lyzačného pufru, vplyv postupu rozpúšťania peptidov a vplyv materiálu mikroskúmaviiek na počet proteínov v spektrálnej knižnici. V neposlednom rade boli optimalizované aj parametre merania na hmotnostnom spektrometri pre získavanie dát do spektrálnej knižnice. **Záver:** Dôslednou optimalizáciou postupu sa podarilo pripraviť spektrálnu knižnicu obsahujúcu fragmentačné informácie o 1 653 proteínoch (FDR < 1%) z 1 µg lyzátu MCF-7. Hlavným prínosom optimalizácie postupu prípravy spektrálnej knižnice je rozšírenie pokrytia proteómu vo SWATH digitálnych biobankách umožňujúcich kvantifikáciu ľubovoľného proteínu vo fyzicky už nedostupných vzorkách. Kvalitné spektrálne knižnice by mohli v budúcnosti zohrávať kľúčovú úlohu pri tvorbe digitálnych fingerprintov proteómu pacientov.

Kľúčové slová

nádorové biomarkery – hmotnostná spektrometria – proteomika – digitálna biobanka – SWATH – kvantifikácia proteínov

Summary

Background: Cancer research often focuses on protein quantification in model cancer cell lines and cancer tissues. SWATH (sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion spectra), the state of the art method, enables the quantification of all proteins included in spectral library. Spectral library contains fragmentation patterns of each detectable protein in a sample. Thorough spectral library preparation will improve quantitation of low abundant proteins which usually play an important role in cancer. **Aim:** Our research is focused on the optimization of spectral library preparation aimed at maximizing the number of identified proteins in MCF-7 breast cancer cell line. First, we optimized the sample preparation prior entering the mass spectrometer. We examined the effects of lysis buffer composition, peptide dissolution protocol and the material of sample vial on the number of proteins identified in spectral library. Next, we optimized mass spectrometry (MS) method for spectral library data acquisition. **Conclusion:** Our thorough optimized protocol for spectral library building enabled the identification of 1,653 proteins (FDR < 1%) in 1 µg of MCF-7 lysate. This work contributed to the enhancement of protein coverage in SWATH digital biobanks which enable quantification of arbitrary protein from physically unavailable samples. In future, high quality spectral libraries could play a key role in preparing of patient proteome digital fingerprints.

Key words

biomarker – mass spectrometry – proteomics – digital biobanking – SWATH – protein quantification

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Jakub Faktor
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: jakub.faktor@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 7. 5. 2016

Přijato/Accepted: 9. 6. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164554>

Úvod

Rakovina patrí v dnešnej dobe k veľmi častým ochoreniam a v roku 2012 bola celosvetovo príčinou 8,2 milióna úmrtí [1]. Rakovinové ochorenia sú spôsobované genómovými zmenami a aj zmenami v biochemických dráhach, ktoré vedú k nekontrolovanému deleniu buniek a v pokročilejších štádiách onemocnenia k metastázovaniu. Včasná diagnostika a cieleňá liečba zameraná na charakteristické proteíny môže znížiť úmrtnosť spôsobenú dôsledkom rakovinových ochorení [2]. Preto sa onkologický výskum zameriava na hľadanie nových rakovinových biomarkerov a terapeutických cieľov a onkoproteomika, zaoberajúca sa výskumom proteínov zmenených v súvislosti s rakovinovými ochoreniami, sa stala jeho nezastupiteľným odvetvím [3]. Pre onkoproteomiku sú kľúčové metódy využívajúce techniky hmotnostnej spektrometrie (mass spectrometry – MS), ktoré popisujú zmeny v koncentračnom zastúpení proteínov v závislosti na vonkajších alebo vnútorných podnetoch. Novinkou v oblasti cieleňej onkoproteomiky je metóda SWATH (sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion spectra), ktorá bola vyvinutá za účelom spoľahlivej kvantifikácie všetkých detekovateľných proteínov v jednej analýze [4]. Výhodou pre onkologický výskum je možnosť tvorby digitálnych spektrálnych biobáň biologického materiálu, ktoré môžu obsahovať súbory tkanív, ale aj bunečných línií. Digitálny spektrálny biobanking v princípe umožňuje kvantifikáciu vybraného proteínu aj niekoľko rokov po zmeraní dát a výmenu dát medzi laboratóriami, čo významne urýchľuje výskum [5]. Pre extrakciu SWATH kvantitatívnych dát je nevyhnutné použiť spektrálnu knižnicu obsahujúcu informácie o proteínoch/peptidoch zastúpených vo vzorke. Podmienkou je, aby v spektrálnej knižnici mal každý proteín reprezentujúci peptid priradený retenčný čas a fragmentačné spektrum produktových iónov s ich intenzitami [6]. Kvantifikácia proteínov, ktoré nie sú v spektrálnej knižnici, je nemožná napriek tomu, že ich spektrá môžu byť prítomné v SWATH dátach. Dôkladná optimalizácia prípravy spektrálnej knižnice

má teda zásadný význam pre množstvo kvantifikovateľných proteínov vo SWATH biobanke. Cieľom nášho výskumu bolo nájsť vhodné podmienky pre prípravu spektrálnej knižnice modelovej bunečnej línie MCF-7 odvodenej od karcinómu prsníka. Prvotnou úlohou bolo nájsť vhodné podmienky bunečnej lýzy, kde sa prihliadalo na kompatibilitu lyzačného pufru s MS. V ďalšom kroku boli optimalizované podmienky na rozpúšťanie peptidov pred MS analýzou a bola porovnaná adsorpcia peptidov na rôzne povrchy stien mikroskúmaviek. Najväčší vplyv na počet proteínov obsiahnutých v spektrálnej knižnici má správne nastavenie parametrov MS metódy. Preto sme sa zamerali na optimalizáciu minimálnej intenzity prekursorového peptidu vybraného na fragmentáciu a doby vylúčenia prekursorového peptidu. Ukázalo sa, že dôkladnou optimalizáciou postupu prípravy vzorky a MS metódy na hmotnostnom spektrometri TripleTOF 5600+ sa dá podstatne zvýšiť počet proteínov obsiahnutých v spektrálnej knižnici, čo nám rozširuje možnosti kvantifikácie proteínov zastúpených v nízkych koncentráciách. Tieto proteíny sú obzvlášť zaujímavé pre onkologický výskum.

Materiál a metódy

Príprava lyzátu bunečnej línie MCF-7 a proteolytické štiepenie proteínov

Bunky získané z MCF-7 bunečnej línie boli 30 min lyzované v lyzačnom puFRE zloženom z 8 M močoviny, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 a v puFRE zloženom z 0,05% dodecylsulfátu sodného (SDS) a 0,5 M trietylammónium bikarbonátu. Po skončení lýzy bol lyzáť centrifugovaný 30 min/14 000 g/5 °C. Metódou RC-DC (Bio-Rad, USA) bola zmeraná koncentrácia proteínu v supernatante a 100 µg proteínového lyzátu bolo odobraných na proteolytické štiepenie. Proteolytické štiepenie a purifikácia peptidov z MCF-7 boli prevedené podľa Pernikářová et al [7].

„Acetonitrilová extrakcia“ peptidov pred separáciou pomocou kvapalinovej chromatografie (LC) spojenej s MS detekciou (LC-MS)

K 15 µg peptidovej vzorky z MCF-7 lyzátu bolo pridaných 15 µl puFRE zloženého z 51% acetonitrilu (AcN), 0,05%

trifluoroctovej kyseliny (TFA) v H₂O. Vzorka bola dôkladne premiešaná tak, aby sa rozpustili všetky peptidy na stenách skúmavky. Následne bola vzorka sonikovaná počas 5 min a opäť dôkladne premiešaná. Vzorka bola centrifugovaná 10 min/10 000 g/25 °C. Po prepipetovaní do novej skúmavky bol odparený acetonitril v Speed-Vacu tak, aby sme získali zmes peptidov v nanášacom puFRE zloženom z 2% AcN, a 0,05% TFA v H₂O.

Štandardné rozpúšťanie peptidovej vzorky pred LC-MS analýzou

K 15 µg peptidovej vzorky z MCF-7 lyzátu bolo pridaných 15 µl puFRE zloženého z 2% AcN, 0,05% TFA v H₂O. Vzorka bola dôkladne premiešaná tak, aby sa rozpustili všetky peptidy na stenách skúmavky. Následne bola vzorka sonikovaná počas 5 min a opäť dôkladne premiešaná. Vzorka bola centrifugovaná 10 min/10 000 g/25 °C.

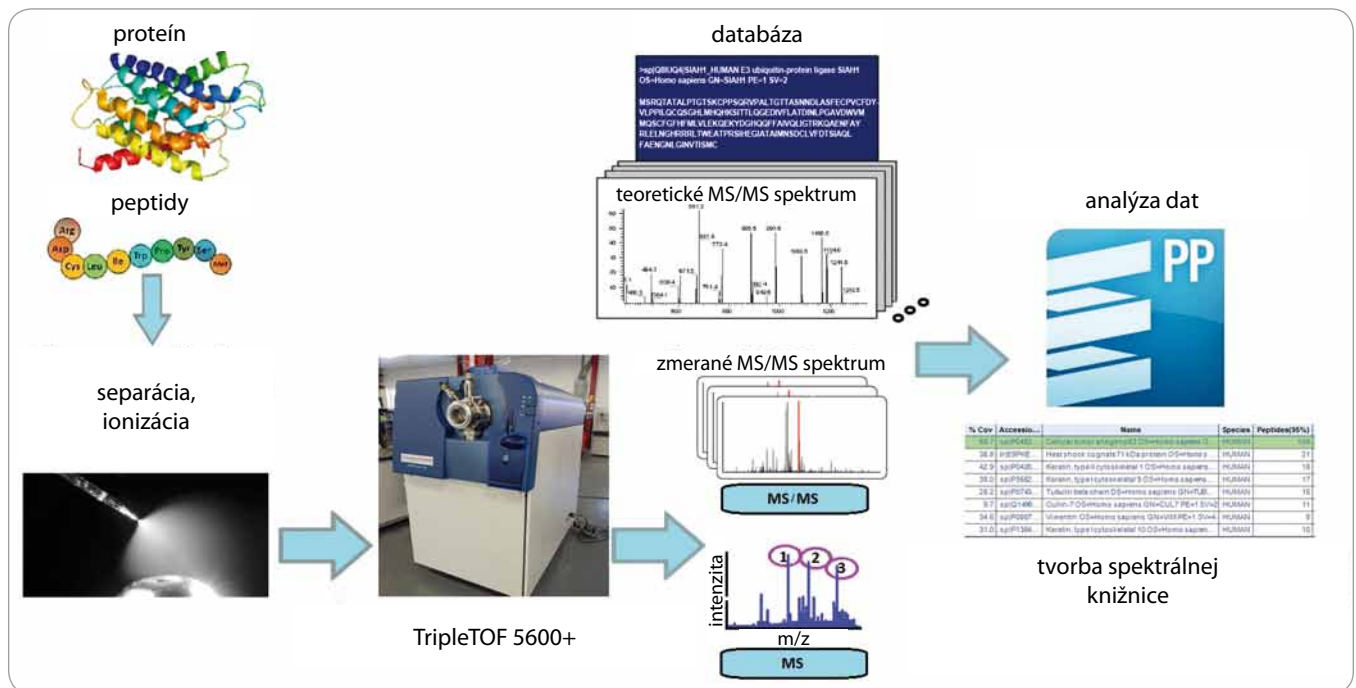
Mikroskúmavky použité na porovnanie adsorpcie peptidov na povrch

Zriedený roztok peptidovej vzorky MCF-7 bol napipetovaný do štyroch mikroskúmaviek s rôznym povrchom tak, aby bolo možné nastrieknuť 0,05 µg peptidov na kolonu. Použité boli polypropylénové mikroskúmavky so silanizovaným povrchom kat. č. 910-00096 (Eksigent, USA), dve mikroskúmavky s polypropylénovým povrchom „Red“ kat. č. 548-3120 (WVR, USA), „Orange“ kat. č. 548-0120 (WVR, USA) a mikroskúmavka so skleneným inzertom kat. č. 02-FIRVG (Thermo, USA). Mikroskúmavky so vzorkou boli umiestnené v autosampleri temperovanom na teplotu 8 °C.

Parametre LC-MS analýzy pre tvorbu spektrálnej knižnice

Vzorky boli separované na chromatografe Eksigent Ekspert nanoLC 400 system (SCIEX, USA), ktorý bol priamo spojený s hmotnostným spektrometrom TripleTOF 5600+ (SCIEX, Kanada).

Peptidy boli zachytené a odsolené na trap kolone µ-precolumn, 30 µm i.d., 5 mm dĺžka, C18 PepMap 100, 5 µm veľkosť častíc, 100 Å veľkosť pórov (Thermo Scientific, USA). Následne boli peptidy eluované na analytickú kolonu s náplňou 3C18-CL-120, 75 µm i.d., 150 mm



Obr. 1. Princíp tvorby spektrálnej knižnice.

V prvom kroku extrahujeme proteíny z biologického materiálu pomocou lyzačného pufru. Proteínový lyzát je proteolyticky štiepený na peptidy proteázou. Po odsolení sú peptidy rozpustené v nanášacom pufru a premiestnené do mikroskúmavky. Po separácii na LC systéme sa peptidy ionizujú a vstupujú do hmotnostného spektrometra, kde sú zmerané ich MS a MS/MS spektrá. Analýza dát a tvorba spektrálnej knižnice prebieha v programe ProteinPilot, kde sú porovnávané teoretické MS/MS spektrá peptidov s nameranými MS/MS spektrami. Peptid/proteín je zaradený do spektrálnej knižnice pokiaľ je nájdený prekryv medzi teoretickým a nameraným MS/MS spektrom.

MS – hmotnostná spektrometrie, LC – kvapalinová chromatografie

dĺžka, 5 µm veľkosť častíc, 120 Å veľkosť pórov (Eksigent, USA). Mobilná fáza A bola zložená z 0,1% (v/v) kyseliny mravčej (FA) v H₂O a mobilná fáza B z 0,1% (v/v) FA v AcN.

Nastavenie nano-kvapalinového chromatografu pre separáciu peptidov spektrálnej knižnice

Elúcia z analytickej kolony začínala na 2 % mobilnej fázy B počas 1 min. Percentuálny podiel mobilnej fázy lineárne stúpal na 12 % B počas 5 min, ďalších 114 min podiel B lineárne vzrástol na 35 % a v nasledujúcich 2 min vzrástol až na 80 % B, na hodnote 80 % B zostal počas 18 min a potom podiel mobilnej fázy B lineárne klesal na 2 % počas 2 min. Podiel mobilnej fázy B zostal na hodnote 2 % počas ďalších 38 min. Prietok mobilnej fázy bol 300 nl/min.

Nastavenie MS metódy pre identifikáciu proteínov (MS/MS) v spektrálnej knižnici

Hmotnostný spektrometer TripleTOF 5600+ pracoval v dáta dependentnom

móde. V ionizačnom zdroji (nano-elektrospreji) bol dusík použitý ako zmlžovací plyn a teplota aj tok sušiacého plynu boli nastavené na hodnoty 150 °C a 12 °C. Ionizačné napätie bolo nastavené na hodnotu 2700 V. MS spektrum z analyzátoru doby prietoku (TOF-MS) bolo zmerané v každom cykle nasledované fragmentáciou 20 najintenzívnejších prekursorových iónov a zmeraním spektier ich produktových iónov. Minimálna intenzita prekursorového iónu bola optimalizovaná. Pri tejto optimalizácii boli použité hodnoty 50 impulzov za sekundu (cps), 100 cps a 250 cps. Predmetom optimalizácie bola aj hodnota času vylúčenia zmeraných prekursorových iónov, použité boli hodnoty 8 s, 12 s, 20 s, 30 s a 40 s. Akumulačný čas prekursorového iónu bol 100 ms.

Analýza dát – tvorba spektrálnej knižnice

Dáta získané MS/MS metódou boli prehľadané pomocou programu ProteinPilot 4.5 (SCIEX, Kanada) proti ľud-

skej referenčnej databáze (Uniprot 2013_09) [8]. Parametre prehľadávania boli nastavené nasledovne – tryp-sín (proteolytický enzým), karbamidometyl (fixná modifikácia), FDR analýza bola prevedená proti obrátenej databáze (Uniprot 2013_09) [8].

Výsledky a diskusia

Optimalizáciu podmienok prípravy spektrálnej knižnice bunečnej línie MCF-7 (obr. 1) môžeme významne zlepšiť pokrytie kvantifikovaného proteómu a zvýšiť tak kvalitu spektrálnej knižnice (tab. 1–3) a aj kvantitatívnych dát extrahovaných zo SWATH datasetov. Prvým krokom pri príprave spektrálnej knižnice je extrakcia proteínov z bunečnej línie pomocou lyzačného pufru. Pri extrakcii proteínov je nutné použiť lyzačné pufrы kompatibilné s MS, prípadne pred MS analýzou odstrániť interferujúce látky použité pri lýze [9]. Metóda štiepenia proteínov na filtri (filter aided sample preparation – FASP) [10] umožňuje použitie detergentu SDS, prí-

Tab. 1. Počet identifikovaných proteínov v spektrálnej knižnici v závislosti na postupe rozpúšťania.

Pred MS analýzou bol rozpustený 1 µg peptidovej vzorky z bunečnej línie MCF-7 v nanášacom pufré (2% AcN, 98% H₂O, 0,05% TFA). Peptidové vzorky boli každým postupom rozpustené v duplikáte a meranie bolo zopakované 3-krát. Pre každý postup bola určená smerodajná odchýlka a priemerný počet identifikovaných proteínov. Výsledky dokazujú, že medzi porovnávanými postupmi nie je podstatný rozdiel v počte identifikovaných proteínov, počet identifikácií sa mierne zvyšuje pri použití acetonitrilovej extrakcie peptidov.

Počet proteínov v spektrálnej knižnici v závislosti na postupe rozpúšťania 1 µg peptidovej vzorky MCF-7

Replikát	Počet identifikovaných proteínov (FDR < 1%)	
	acetonitrilová extrakcia peptidov	štandardný postup rozpúšťania peptidov
1	681	686
	705	672
	724	700
2	722	712
	693	713
	723	695
priemer	708	696
smerodajná odchýlka	18,1	15,7

MS – hmotnostná spektrometrie

Tab. 2. Počet identifikovaných proteínov v spektrálnej knižnici v závislosti na povrchu mikroskúmvavky v autosampleri.

Napipetovaných bolo 0,05 µg peptidovej vzorky z MCF-7 do mikroskúmvaviek v duplikáte a meranie bolo zopakované 2-krát. Pre každý typ mikroskúmvavky bola určená smerodajná odchýlka a priemerný počet identifikovaných proteínov. Výsledky dokazujú, že počet identifikácií medzi porovnávanými mikroskúmvavkami nie je podstatný. Mikroskúmvavka so skleneným inzertom má vyššiu smerodajnú odchýlku a počet identifikovaných proteínov je nižší v porovnaní s ostatnými mikroskúmvavkami.

Typ mikroskúmvavky	Počet identifikovaných proteínov (FDR < 1%)			
	replikát 1	replikát 2	priemer	smerodajná odchýlka
thermo (sklenený inzert)	117	181	128	42,2
	79	133		
eksigent (silanizovaný povrch)	200	108	153	41,1
	173	132		
VWR „orange“ (polypropylén)	172	155	154	23,6
	120	168		
VWR „red“ (polypropylén)	105	155	144	27,3
	148	168		

padne močoviny v lyzačnom pufré. Po pridaní lyzátu filter zabezpečí výmenu do MS kompatibilného pufru. Ukázalo

sa, že lyzát pripravený v lyzačnom pufré zloženom z 8 M močoviny 0,5 M Tris/HCl, pH 8,5 poskytuje vyšší signál celkového

iónového prúdu a aj viac identifikovaných proteínov v porovnaní s lyzátom pripraveným v 0,05% SDS. Vyšší počet identifikácií a celkový MS signál z lyzátu pripraveného v močovinovom lyzačnom pufré môže byť výsledkom vyššej lyzačnej a solubilizačnej efektivity. Nižší signál u MCF-7 v SDS lyzačnom pufré zrejme spôsobuje SDS zachytené na stenách filtra, ktoré po vymytí do vzorky môže negatívne interferovať počas LC-MS analýzy [11]. Po lýze, FASP proteolytickom štiepení, odsolení a zakoncentrovaní biologickej vzorky sa získava koncentrát obsahujúci zmes peptidov, ktorý sa pred analýzou rozpúšťa v nanášacom pufré (2% AcN + 0,05% TFA v H₂O). Nanášací pufer musí rozpúšťať celé spektrum peptidov, efektívita závisí od postupu rozpúšťania peptidov a od zloženia nanášacieho pufru [12]. Porovnaný bol klasický postup rozpúšťania peptidovej vzorky z MCF-7, kde sa k lyzátu pridáva nanášací pufer s následným miešaním a postup acetonitrilovej extrakcie peptidov. Acetonitrilová extrakcia peptidov mierne zvýšila počet identifikácií v spektrálnej knižnici na 716 (FDR < 1%) oproti klasickému postupu (tab. 1). Postup acetonitrilovej extrakcie peptidov umožňuje efektívnejšie uvoľnenie hydrofóbných peptidov zo stien skúmvavky dôsledkom použitia vyššieho podielu organickej fázy (50% AcN) v porovnaní s klasickou metódou rozpúšťania v 2% AcN. Roztok peptidov v nanášacom pufré je následne premiestnený do LC-MS systému v mikroskúmvavkách. Nežiaducim efektom je adsorbcia peptidov na steny mikroskúmvavky, kde sa na nepolárne plastické povrchy počas státia v autosampleri adsorbujú najmä hydrofóbné peptidy [13]. Na trhu sú k dispozícii mikroskúmvavky vyrobené z rôznych materiálov, ktoré by mali minimalizovať adsorbciu peptidov. V súčasnosti sa často používajú sklenené mikroskúmvavky, mikroskúmvavky so silanizovaným povrchom, prípadne s povrchom potiahnutým polypropylénom alebo polyetylénom [14]. Porovnaním mikroskúmvaviek sme dospeli k záveru, že použitý materiál nemá zásadný vplyv na signál a počet identifikovaných proteínov v spektrálnej knižnici (tab. 2). Ukázalo sa, že optimalizácia parametrov metódy na ovládanie LC-MS prístroja má

naopak podstatný vplyv na rozsah a kvalitu spektrálnej knižnice. V rámci optimalizácie MS/MS metódy sme hľadali najlepšie nastavenie minimálnej intenzity peptidového (prekurzorového) iónu použitého na fragmentáciu a dobu jeho vylúčenia (tab. 3). Optimalizáciou minimálnej intenzity prekurzorového píku sme zamedzili fragmentáciu prekurzorov na úrovni šumu a zároveň sme zamedzili vylúčenie prekurzorov pochádzajúcich z proteínov zastúpených v nízkych koncentráciách, ktoré sú často predmetom onkologického výskumu. Optimálna doba vylúčenia prekurzorového iónu ďalej rozšírila počet identifikovaných proteínov. Vylúčenie fragmentovaných prekurzorových iónov zabraňuje opakovanej fragmentácii prekurzorového iónu s rovnakým m/z, a umožňuje tak fragmentáciu menej zastúpených prekurzorov. Po optimalizácii prípravy peptidovej vzorky z bunečnej línie MCF-7 a parametrov MS metódy bola vytvorená spektrálna knižnica obsahujúca 1 653 (FDR < 1%) proteínov z 1 µg lyzátu MCF-7 bunečnej línie, čo predstavuje 8,1 % zo všetkých 20 197 recenzovaných proteínov obsiahnutých v ľudskej databáze proteínov Swiss-Prot [15].

Záver

S využitím rôznych lyzačných podmienok, výberom vhodných mikroskúmaiev ako aj optimalizáciou MS metódy sme dosiahli vyšší počet identifikovaných proteínov a vytvorili sme kompletnejšiu spektrálnu knižnicu pre nádorovú bunečnú líniu MCF-7. Nový postup tvorby spektrálnej knižnice bude ďalej aplikovaný pri SWATH kvantifikácii proteínov v biologických vzorkách, kde významne ovplyvní kvalitu vyextrahovaných kvantitatívnych dát a pokrytie celkového proteómu. Rozšírenie spektrálnej knižnice umožní kompletnejší náhľad na reguláciu proteínov zastúpených v nízkych koncentráciách, ktoré sú obvyčajne najzaujímavejšie pre onkologický výskum, a tým zjednoduší hľadanie nových biomarkerov a terapeutických cieľov. Kompletnejšie spektrálne knižnice prispievajú k rozšíreniu a prehĺbeniu poznatkov v onkologickom výskume.

Tab. 3. Počet identifikovaných proteínov v závislosti na parametroch MS/MS metódy pre tvorbu spektrálnej knižnice.

V tabuľke sú zhrnuté výsledky z optimalizácie času vylúčenia prekurzorového peptidu a optimalizácie minimálnej prekurzorovej intenzity. Najvyšší počet identifikácií získame nastavením 12 s doby vylúčenia zmeraných prekurzorových peptidov, nastavením minimálnej intenzity prekurzorového peptidu na hodnotu 50 impulzov za sekundu (cps) a využitím 120 min nelineárneho LC gradientu.

čas (s)	počet identifikovaných proteínov (FDR < 1%)	Minimálna intenzita prekurzorového peptidu	
		intenzita (CPS)	počet identifikovaných proteínov (FDR < 1%)
8	1 653	50	1 302
12	1 684	100	1 197
20	1 642	250	932
30	1 528		
40	1 399		

MS – hmotnostná spektrometrie, LC – kvapalinová chromatografie

Literatúra

- Torre LA, Bray F, Siegel RL et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87–108. doi: 10.3322/caac.21262.
- Weigelt B, Peterse JL, van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(8): 591–602.
- Cho WC, Cheng CH. Oncoproteomics: current trends and future perspectives. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4(3): 401–410.
- Gillet LC, Navarro P, Tate S et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11(6): O111.016717. doi: 10.1074/mcp.O111.016717.
- Faktor J, Michalova E, Bouchal P. pSRM, SWATH and HRM – targeted proteomics approaches on TripleTOF 5600+ mass spectrometer and their applications in oncology research. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): S110–S115. doi: 10.14735/amko201415110.
- Schubert OT, Gillet LC, Collins BC et al. Building high-quality assay libraries for targeted analysis of SWATH MS data. *Nat Protoc* 2015; 10(3): 426–441. doi: 10.1038/nprot.2015.015.
- Pernikářová V, Sedláček V, Potěšil D et al. Proteomic responses to a methyl viologen-induced oxidative stress in the wild type and FerB mutant strains of *Paracoccus denitrificans*. *J Proteomics* 2015; 125: 68–75. doi: 10.1016/j.jprot.2015.05.002.
- ftp.uniprot.org [homepage on the Internet]. European Bioinformatics Institute (EBI), United Kingdom, c2002–2015 [updated 2015 March 14; cited June 9]. Available from: ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/previous_releases/release-2013_09/.
- Gundry RL, White MY, Murray CI et al. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Curr Protoc Mol Biol* 2009; Chapter 10: Unit 10.25. doi: 10.1002/0471142727.mb1025s88.
- Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 2009; 6(5): 359–362. doi: 10.1038/nmeth.1322.
- Pellerin D, Gagnon H, Dubé J et al. Amicon-adapted enhanced FASP: an in-solution digestion-based alternative sample preparation method to FASP. *F1000Research* 2015; 4: 140. doi: 10.12688/f1000research.6529.1.
- Peterson A, Hohmann L, Huang L et al. Analysis of RP-HPLC loading conditions for maximizing peptide identifications in shotgun proteomics. *J Proteome Res* 2009; 8(8): 4161–4168. doi: 10.1021/pr9001417.
- Duncan MR, Lee JM, Warchol MP. Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and polypropylene. *Int J Pharm* 1995; 120(2): 179–188.
- Stejskal K, Potěšil D, Zdráhal Z. Suppression of peptide sample losses in autosampler vials. *J Proteome Res* 2013; 12(6): 3057–3062. doi: 10.1021/pr400183v.
- UniProt.org [homepage on the Internet]. European Bioinformatics Institute (EBI), United Kingdom, c2002–2015 [updated 2015 March 14; cited 2016 Aug 2]. Available from: http://www.uniprot.org/uniprot/?query=*%&fil=reviewed%3Ayes+AND+organism%3A-%22Homo+sapiens+%28Human%29+%5B9606%5D%22.