

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V KVANTITATIVNÍ A DIAGNOSTICKÉ PROTEOMICE: MOŽNOSTI A LIMITACE

PAVLA ČEŠKOVÁ^a, KRISTÝNA BROŽKOVÁ^a,
LENKA HERNYCHOVÁ^b, JAROSLAV
ŠTĚRBA^{a,c}, DALIBOR VALÍK^d a BOŘIVOJ
VOJTĚŠEK^a

^a Oddělení molekulární a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno,

^b Ústav molekulární patologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, ^c Klinika dětské onkologie, Fakultní nemocnice Brno, Černopolní 9, 663 62 Brno, ^d Oddělení laboratorní medicíny, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno

ceskova@mou.cz, brozkova@mou.cz, vojtesek@mou.cz, hernychova@pmfhk.cz, jsterb@fnbrno.cz, valik@mou.cz

Došlo 25.10.05, přepracováno 24.11.05, přijato 4.12.05.

Obsah

1. Úvod a přehled metodik založených na hmotnostní spektrometrii umožňujících hledání interakčních partnerů a biomarkerů
 - 1.1. Kvalitativní proteomické přístupy
 - 1.2. Kvantitativní proteomické přístupy
2. ProteinChip® technologie, parametry a možnosti
 - 2.1. Analyzátor
 - 2.2. Povrchy
 - 2.3. Programové vybavení
3. Aplikace ProteinChip® technologie
 - 3.1. Čipy s aktivním biologickým povrchem
 - 3.2. Patologické biomarkery
4. Závěr

1. Úvod a přehled metodik založených na hmotnostní spektrometrii umožňujících hledání interakčních partnerů a biomarkerů

V posledních letech rychle se rozvíjející genomika a její přístupy podstatně změnily studium biologických systémů z molekulárního hlediska. Nové technologie v čele s technologií GeneChip® (známé také jako „DNA microarrays“) poskytly obrovské množství informací o expresi jednotlivých genů v buňkách a tkáních a vnesly do znalostí o těchto systémech nový rozměr. Poznatky o míře a změnách exprese jednotlivých genů nabídl alternativní systematizaci a klasifikaci různých organismů, stavů či onemocnění. Použití genomických přístupů je nicméně limitované, jelikož genomika není schopna poskytnout informace o vlastní aktivitě proteinů, jejich loka-

lizaci nebo interakčních partnerech a posttranslačních modifikacích. Další limitace genomických metod plyne ze skutečnosti, že vztah mezi hladinou mRNA („transkriptomem“), procesem translace („translatomem“), mírou exprese proteinu v buňce („proteomem“) a aktivním proteinem („funktomem“) není zcela jednoznačný^{1,2}. Vzhledem k těmto limitacím je ke genomovým funkčním studiím nutná identifikace vlastních kódovaných proteinů současně s informací o jejich expresi (funkční a diagnostická proteomika). Proteomické přístupy založené na rozvoji hmotnostní spektrometrie (MS) jsou v současné době schopny detegovat s poměrně velkou citlivostí přítomnost nízkých koncentrací proteinu v komplexních matricových biologických směsích.

1.1. Kvalitativní proteomické přístupy

Obecný přístup pro identifikaci nových proteinů je převážně založen na purifikaci proteinu a nebo jeho zakoncentrování a separaci v proteinové směsi pomocí chromatografických, elektroforetických nebo jiných technik (afinitní purifikace, ultracentrifugace, atd.), proteolytickém štěpení proteinu nebo proteinové směsi a následné analýze získané peptidové směsi hmotnostní spektrometrií. Nejčastější je použití kombinace kapalinové chromatografie (HPLC) a hmotnostní spektrometrie (LC-MS) nebo tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS). Tento přístup umožňuje efektivní získávání informací o interakčních partnerech sledovaných proteinů zejména při použití afinitních purifikačních technik jako je imunoprecipitace, nativní elektroforéza atd. Limitujícím krokem pak zůstává vlastní purifikace proteinových komplexů.

1.2. Kvantitativní proteomické přístupy a buněčné regulace

Z hlediska studia buněčných regulací a buněčné odpovědi na různé vnější i vnitřní podněty na proteinové úrovni je nezbytné disponovat způsoby, jak v komplexních proteinových směsích sledovat kvantitativní změny hladiny proteinů. Jedním z přístupů jsou metody využívající izotopového značení. Pro zainkorporování stabilního izotopu do proteinu jsou obvykle používány dva přístupy, metoda SILAC (Stable Isotopic Labeled Amino Acid – stabilními izotopy značené aminokyseliny, cit.³) a metoda ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag – izotopově značené afinitní raménko, cit.⁴). Metoda SILAC využívá *in vivo* zainkorporování izotopově značených aminokyselin do proteinů kultivací dvou srovnávaných buněčných kultur v médiu obsahujícím lehkou a těžkou izotopovou formu argininu. U metody ICAT se chemickou reakcí (vazba lehké a těžké formy ICAT na proteiny obsahující cystein přes skupinu -SH v redukovaném stavu) izotopově označí dvě proteinové

směsi připravené vhodnými separačními metodami z kultivovaných buněk nebo tkáňových lyzátů. Výsledné proteinové směsi jsou smíchány a podrobeny proteolýze. Peptidy jsou separovány metodou HPLC a charakterizovány hmotnostní spektrometrií. Z poměrů izotopově značených peptidů pak můžeme kvantifikovat rozdíly v expresi pro dané podmínky specifických proteinů.

Tyto přístupy jsou vhodné pro srovnání hladin proteinové exprese ve dvou buněčných kulturách vystavených různým podmínkám, ale pro srovnání více vzorků jsou nepoužitelné. Analýza širokého spektra vzorků je však nezbytná u všech klinických aplikací, kdy hledáme změny v expresi proteinů spojených se specifickými patologickými stavy a onemocněními. Těmto požadavkům vychází vstříc nová technologie ProteinChip® vyvinutá společností Ciphergen. Tato technologie založená na principu SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization – laserová desorpce/ionizace usnadněná povrchem) hmotnostní spektrometrie nabízí novou alternativu k 2D elektroforéze.

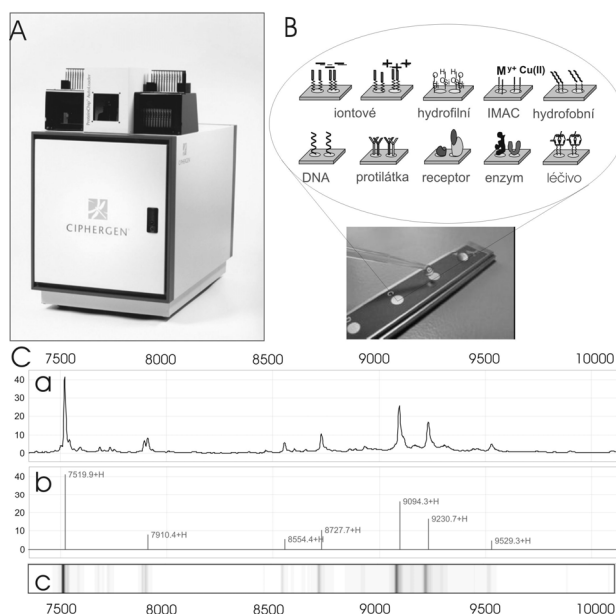
2. Protein Chip® technologie, parametry a možnosti

ProteinChip® technologie je založená na principu SELDI-TOF-MS. Metoda SELDI (cit.⁵) byla definována na počátku 90. let jako rozšíření metody MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry⁶ – laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice usnadňující desorpci spojená s průletovým hmotnostním analyzátozem, cit.⁶). Hlavním rozdílem a předností SELDI analýzy vůči MALDI je aktivní interakce proteinů s vlastním povrchem čipu. V obou případech jsou analyzované proteiny krystalizovány spolu se sloučeninou schopnou absorbovat energii z UV záření a poté převedeny do plynné fáze pulsním UV laserovým paprskem. Ionizované proteiny jsou urychleny elektrickým polem do hmotnostního analyzátoru TOF (Time of Flight – průletový hmotnostní analyzátor), kde jsou ionty rozděleny na základě jejich hmotnosti na náboje (m/z).

Součástí technologie je samotný čip s analytickými terčíky (aluminiová destička s osmi, resp. šestnácti terčíky s daným chromatografickým povrchem), vlastní hmotnostní spektrometr (TOF-MS) a programové vybavení umožňující ovládání přístroje a následné vyhodnocení a zpracování získaných dat.

2.1. Analyzátor

Hmotnostní spektrometr (obr. 1A) je navržen pro vysokou citlivost měření a dobrou reprodukovatelnost naměřených dat. Softwarová kontrola zajišťuje přesné místo zásahu laseru na terčíku v průběhu měření. Při opakovaném měření daného terčíku lze tak určovat místo ostřelování laserem, analýza proteinového spektra v různých místech terčíku pak zajišťuje homogenitu měřených dat.



Obr. 1. A. PBS II C – SELDI-TOF hmotnostní spektrometr s automatickým podavačem čipů. B. Možnosti dostupných chemických a biologicky aktivních povrchů v rámci ProteinChip® technologie. C. (a) Zobrazení hmotnostního spektra. (b) Čárové spektrum vybraných píků. (c) Denzitometrické vynešení hmotnostního spektra, tzv. „gel view“

2.2. Povrchy

Hlavní inovací SELDI v hmotnostně spektrometrických metodách je použití aktivních povrchů při adsorpci vzorku (obr. 1B). Na aluminiové destičce čipu jsou nabízeny terčíky s povrchy chemickými nebo biochemickými. Iontoměničové povrchy jsou připraveny na podkladu hydrogelu (komplexní syntéza přímo na jednotlivých terčích) nebo latexu (rychlá příprava ve velkém objemu; posléze nanášeeno na terčíky). Funkční skupinou slabého katektu je karboxylát, u silných aneů kvarterní amonná báze. Čipy s povrchem IMAC (Immobilized Metal Affinity Capture – povrch s vazbou přes zakotvený kov) nesou na svém povrchu imobilizovanou kyselinu nitrilotrioctovou (NTA) umožňující chelataci dvojmocných (Zn, Co, Ni, Cu, Ca, Mg) i trojmocných (Al, Fe, Ga) iontů kovů. Mezi chemickými povrchy jsou nabízeny i povrchy hydrofilní (oxid křemičitý) a dva druhy hydrofobních povrchů lišících se délkou alkylových řetězců s vlastnostmi odpovídajícími reverzní fázi C6 až C12 nebo C18.

Biochemické povrchy terčíků umožňují využití buď povrchu derivatizovaného epoxidem nebo karbonyldiimidazolem (CDI) pro kovalentní navázání molekuly. Na takto upravený terčík je možné imobilizovat enzymy, specifické receptory, léčiva nebo vhodně značené oligonukleotidy. Imobilizaci protilátek zjednodušuje komerčně dodávaný epoxidový povrch s navázaným G-proteinem.

K dispozici jsou také čipy se zlatými terčiky umožňující využití systému ProteinChip® pro standardní MALDI experiment.

2.3. Software

Softwarová výbava umožňuje jedinečnou identifikaci měřených čipů pomocí čárových kódů a podrobný popis vzorků nanášených na jednotlivých terčících (typ vzorku, způsob zpracování, podmínky vazby či promytí a přesná specifikace) a také vytvoření a aplikaci specifického protokolu pro každý jednotlivý terčik (rozeznání poměru hmotnost/náboj, intenzita laseru, počet měření v jedné pozici laseru, celkový počet měření na jednom terčiku aj.).

Získaná data lze zobrazit jako hmotnostní spektrum v podobě četnosti výskytu iontu s daným poměrem m/z v závislosti na m/z . Pro zpřehlednění spekter, zejména při práci s jejich větším množstvím, je možné vybrané píky spektra zobrazit ve formě čárového spektra, nebo celé spektrum denzitometricky převést do záznamu podobného gelové elektroforéze (obr. 1C).

Součástí softwaru jsou nástroje pro analýzu dat, jako je filtrace šumu, vyrovnání bazální linie, automatická detekce píků aj. Základní software pro manipulaci se získanými spektry je pak doplněn dalšími nástroji umožňujícími statistické zpracování.

3. Aplikace ProteinChip® technologie

ProteinChip® technologie umožňuje kvalitativní a do jisté míry i kvantitativní srovnání dvou proteinových profilů. Vyšší reprodukovatelnost získaných proteinových spekter spolu s relativně snadnější interpretací (digitalizací) hmotnostního spektra ve srovnání s výstupem 2D elektroforézy jako nejrozšířenější proteomické metody, zajišťuje této technologii široké možnosti uplatnění v mnoha různých oblastech.

Jedním z praktických využití této technologie např.

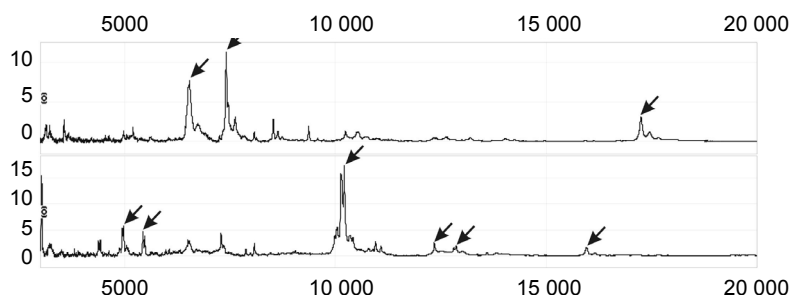
v oblasti mikrobiologie je vytvoření databáze proteinových profilů bakteriálních kmenů, která by sloužila k jejich identifikaci (obr. 2). Minimální množství vstupního materiálu je velkou výhodou v případě obtížné kultivace některých bakteriálních kmenů⁷. Ambiciózním projektem je pak vytvoření bakteriálního klasifikačního algoritmu s využitím umělé neuronové sítě⁸.

Z mikrobiologicko-klinických aplikací můžeme uvést průkaz infekce koronavirem (CoV), který je příčinou syndromu známého jako SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome – příznaky náhlého a těžkého dýchacího selhání)¹⁰, na úrovni tkáňových kultur pak průkaz infekce *Helicobacter pylori*¹¹ nebo *Bacillus anthracis*¹². Byla rovněž publikována práce, ve které byl pomocí této technologie identifikován faktor vyvolávající apoptotický zánik buněk centrálního nervového systému při infekci organismu *Trypanosoma brucei*¹³.

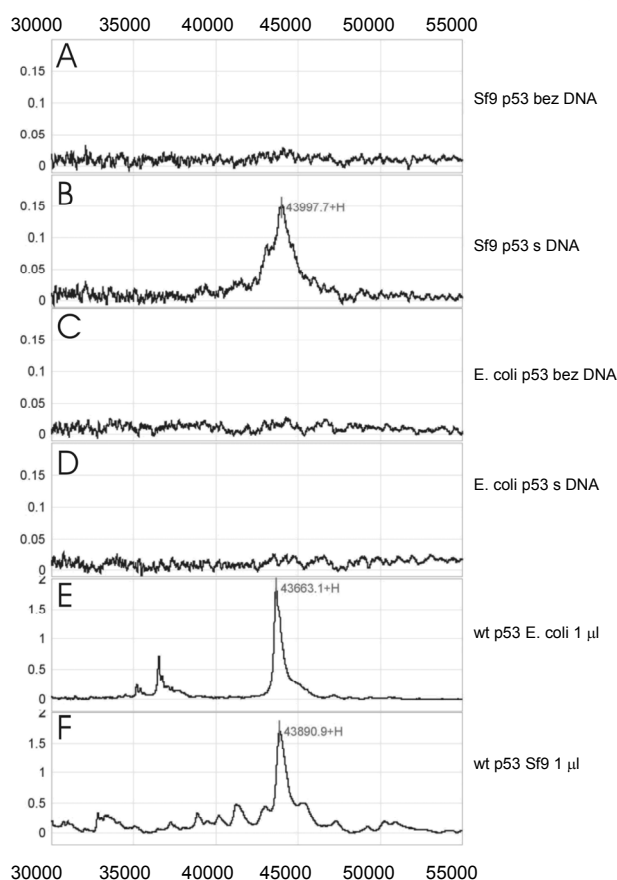
Povaha afinitní interakce čipu IMAC30, která umožňuje detegovat proteiny či peptidy schopné vázat kationt kovu, je zajímavá z hlediska vyvíjení postupů pro charakterizaci proteinové fosforylace¹⁴. Publikovaná byla aplikace daného čipu pro detekci kinasové aktivity^{15,16}.

3.1. Čipy s aktivním biologickým povrchem

Možnosti širokého uplatnění má použití biochemických čipů. Pomocí navázaného peptidu, proteinu, DNA, protilátky či molekuly léčiva můžeme na povrch čipu imobilizovat odpovídající reakční partnery a hmotnostní spektrometrií je přímo identifikovat. Velice efektivně tak můžeme získat informaci nejen o interakčním partnerovi, ale nastavením reakčních podmínek také o povaze interakce nebo kompetičních inhibitech. Přestože použití takto upravených aktivních povrchů není zatím v publikovaných pracích časté, můžeme uvést práci využívající kovalentního navázání monoklonální protilátky pro identifikaci nádorového markeru PSA (Prostate-Specific Antigen – krevní ukazatel nádoru předstojné žlázy)¹⁷. Navázané protilátky



Obr. 2. Hmotnostní spektra proteinového extraktu bakterie *Francisella tularensis*, subtyp *holactica* (A) a subtyp *tularensis* (B) s použitím hydrofobního selektivního povrchu (H50); bakterie byly kultivovány v tekutém Chamberlainově médiu, v pozdní logaritmické fázi jejich růstu byly centrifugací bakteriálních kultur získány pelety bakterií. Tyto pelety byly po promytí PBS resuspendovány v roztoku acetonitrilu (70 %), voda a trifluoroctová kyselina (0,5 %), vzorek byl 5 min třepán na vortexu a centrifugován. Pro další analýzu byl odebrán supernatant obsahující pouze proteiny extrahované z povrchu bakterií. Supernatant byl vakuově odpařen na speedvacu a resuspendován v 20% acetonitrilu s 0,5% TFA a dále zpracován podle standardního protokolu dodávaného výrobcem pro čipy H50. Ze spekter jsou zřejmé výrazné rozdíly v proteinovém profilu bakteriálních subtypů



Obr. 3. Sledování vazby DNA vazebného proteinu na oligonukleotid; na povrch čipu RS100 (karbodiimidazol) byl imobilizován avidin podle modifikovaného protokolu doporučeného výrobcem, po zablokování BSA (bovine serum albumin, hovězí sérový albumin) a promytí povrchu terčiku PBS (phosphate buffer saline, fosfátový pufr s NaCl) byl terčik inkubován s roztokem oligonukleotidu značeného biotinem (byl použit oligonukleotid kódující p53 vazebnou sekvenci) a znovu promyt PBS. Na připravený povrch terčiku byl nanášen roztok purifikovaného proteinu p53, reakce probíhala ve vlhké komůrce přes noc. Poté byl terčik promyt PBS a standardním postupem připraven k analýze. K reakci byl použit protein p53 exprimovaný v *E. coli*, který není schopen bez další aktivace vazby na DNA, a v eukaryotických hmyzích buňkách Sf9 exprimovaný protein p53, který je schopen vazby na DNA bez další aktivace v důsledku fosforylaci zprostředkovaných eukaryotním expresním systémem. Z výsledků je zřejmé, že nedochází k nespecifické vazbě proteinu p53 na avidinem modifikovaný povrch terčiku (A, C), bakteriálně exprimovaný protein p53 není schopen vazby na DNA (B) na rozdíl od p53 exprimovaného v Sf9 (D). Přítomnost proteinu p53 v reakci byla prokázána s použitím čipu NP20 (hydrofilní povrch oxidu křemičitého) (E, F)

byly také použity pro rozlišení molekulárních variant proteinu transthyretinu (TTR)¹⁸ nebo amyloid-beta fragmentů¹⁹. Zajímavou aplikací může být hledání transkripčních faktorů specifických pro danou DNA²⁰. V naší laboratoři se pokoušíme vyvinout metodu, která by umožnila v bi-

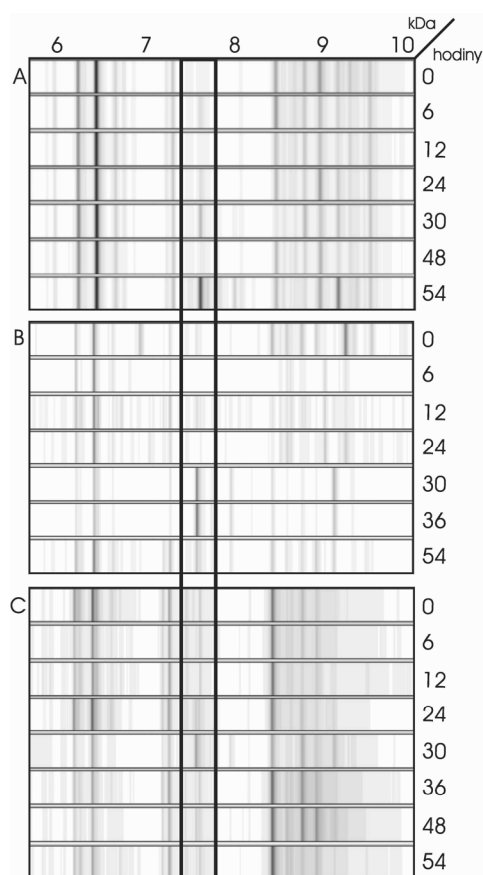
optických vzorcích nádorů pacientů rozlišit, zda nádorové buňky obsahují transkripčně aktivní protein p53 (schopný vazby na DNA) nebo inaktivní protein p53, který není schopen vazby na DNA, což je způsobeno expresí mutované formy proteinu p53 či jeho posttranslačními modifikacemi. Mutace genu p53 je přítomna ve více než 50 % lidských nádorů a jedním z terapeutických cílů je reaktivovat funkci vzniklých mutantních proteinů (obr. 3).

3.2. Patologické biomarkery

Asi nejdiskutovanější a nejčastější aplikací této technologie je už zmiňované využití SELDI/TOF k identifikaci nových patologických biomarkerů.

Hledání patologických biomarkerů je proces složitý už jen z podstaty definice biomarkeru. Biomarker musí být specifický pro daný patologický stav, měl by umožnit detegovat časné stadium patologických změn často ještě bez klinických příznaků a měl by být nezávislý na genetickém pozadí jedince. Způsob stanovení biomarkeru by pak měl patřit mezi robustní vyhledávací metody využívající relativně jednoduše získaného biologického materiálu, jako je krev, moč či mozkomíšni mok nebo biopsie. Úspěch v této oblasti vyžaduje kvalitní, k dané diagnóze relevantní klinické vzorky ve statisticky významném počtu, a metodiku umožňující účinně vytěžit informaci, kterou tyto komplexní proteinové směsi obsahují. Výsledky výzkumů posledních let naznačují, že většina onemocnění, zejména civilizačních, není způsobena poruchou v jednom genu, ale součtem působení většího množství rozdílných faktorů s různou vahou svého vlivu na výsledný stav organismu. V diagnostické proteomice je tedy nezbytné sledovat více parametrů a své uplatnění začínají nacházet tzv. fingerprintingové metody, kde specifický charakter genomového nebo proteinového „otisku“ odpovídá určitému stavu buňky nebo organismu. Velmi cennou vlastností této technologie je možnost zjednodušení komplexity výchozí proteinové směsi zavedením purifikačního kroku přímo na terčiku určenému k analýze hmotnostním spektrometrem. Nároky na výchozí množství vzorku jsou malé (jde o mikrolitry krevního séra), lze však pracovat i s reakčním objemem 250 mikrolitrů. Možnost kombinovat typ chromatografického povrchu a mobilních fází různých vlastností zajišťuje značnou variabilitu purifikačního kroku a umožňuje nalezení optimálních podmínek pro detekci požadovaného proteinu. Citlivost detekce proteinů lze zvýšit použitím dalšího purifikačního kroku, který předchází interakci vzorku s analytickým terčikem, což může vést ještě k výraznějšímu snížení komplexity směsi a dalšímu zakoncentrování proteinů. Standardizované postupy a vysoká reprodukovatelnost pak umožňuje získat kvalitní data pro statistické zpracování.

Jako inspirativní příklad uvádíme studii, v níž jsme sledovali u dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií léčených methotrexátem časové změny v proteinovém profilu krevní plazmy. Profily získané zpracováním směsné plazmy od čtyř pacientů jsme srovnávali s individuálními profily dalších tří pacientů a je zřejmé, že



Obr. 4. Studie časových změn v proteinovém profilu krevní plazmy u dětských leukemických pacientů léčených methotrexátem; byl použit čip CM10 (katex), fosfátový pufr pH6. Proteinový profil v závislosti na čase získaný zpracováním směsné plazmy od čtyř pacientů (A) jsme srovnávali s individuálními profily dalších dvou pacientů (B, C). Zvýrazněna je oblast, kde ve všech profilech je okolo 30. hodiny průběhu léčby metotrexátem detegovaná indukce nového píku

i přes individuální rozdíly dochází v charakterech proteinových profilů krevní plazmy ke shodným změnám, které lze přisoudit reakci na léčbu methotrexátem (obr. 4)

4. Závěr

První publikace týkající se SELDI/TOF byla zveřejněna v roce 1998 a od té doby množství jak metodických, tak aplikačních příspěvků exponenciálně stoupá. V roce 2004 už bylo těchto prací, vesměs aplikačních, publikováno 117 (Entrez PubMed).

Značná flexibilita systému při nalezení vhodných purifikačních podmínek je velkou výhodou při hledání biomarkerů, ale zároveň se negativně odráží v míře reprodukovatelnosti výsledků. Strategie výrobce v tomto směru vede k robotizaci a automatizaci celého procesu a to v rozsahu od přípravy vlastních analytických proteinových

čipů a používaných reagentů distribuovaných uživateli, až po vlastní zpracování vzorku a čipů, kde nabízí uživateli robotický systém (BioMek 2000). Společnost Ciphergen má velký zájem na validaci ProteinChip® technologie pro klinické účely a podílí se na organizaci a provádění mezilaboratorních projektů. Ukázkou může být studie hledající biomarkery časného stádia karcinomu ovária²¹, na které se s úspěchem podílelo 5 zdravotnických institucí. Velké validační studie také probíhají v rámci HUPO („Human Proteome Organisation“) a mezinárodního projektu „Plasma Proteome Project“, jehož výsledky začínají být publikovány^{22,23} vesměs s pozitivními závěry.

Zajímavé podněty k úvahám pak poskytují první prezentované výsledky aplikací ProteinChip® technologie v souvislosti s identifikací nových patologických biomarkerů. V podstatě všechny nalezené proteinové píky sledované pro studovaný patologický stav či onemocnění mají molekulovou hmotnost v rozmezí 2 až 15 kDa, většinou tedy jde o peptidy či proteinové štěpy nebo malé proteiny. Otázka specificity biomarkerů není zatím jasná: například apolipoprotein A-II byl identifikován jako biomarker „specifický“ pro onemocnění prostaty²⁴, ale také pro rakovinu prsu²⁵. Obecným problémem těchto studií je relevantní interpretace výsledků – většina studií končí s konstatováním, že u dané skupiny pacientů a odpovídajících kontrol byly nalezeny pro dané onemocnění specifické proteinové píky, které by mohly být využity pro diagnostické účely, a že ProteinChip® technologie je účinným a silným nástrojem pro jejich vyhledávání. S tímto konstatováním se lze ztotožnit do té míry, že jde o relativně novou metodu, která přes svoje limity a úskalí má potenciál poskytnout zásadně nové informace a je rozvojovou alternativou ke stávajícím proteomickým technikám. Podaří-li se identifikovat specifické proteinové komponenty, je možné proti nim vyvinout monoklonální protilátky, které lze pak využít při podrobnější charakterizaci proteinových markerů a při vývoji diagnostických kitů.

Ve spojení s prvky umělé inteligence, jako jsou inteligentní neuronové sítě, dále vzrůstá možnost využití ProteinChip® technologie ve funkční a diagnostické proteomice. Příkladem může být jedna z nejnovějších publikovaných prací, která využívá spojení ProteinChip® technologie a neuronové sítě k stanovení diagnózy hepatocelulárního karcinomu²⁶.

Práce byla podporována GA ČR číslo 301/04/P023, IGA MZ ČR NR8338-3/2005 a VZ MOU (NZO 00209 805). Poděkování patří především firmě AstraZeneca za příspěvek na zakoupení systému SELDI/TOF.

LITERATURA

- Greenbaum D., Luscombe N. M., Jansen R., Qian J., Gerstein M.: *Genome Res.* 11, 1463 (2001).
- Greenbaum D., Colangelo C., Williams K., Gerstein M.: *Genome Biol.* 4, 117 (2003).
- Ong S. E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D. B., Steen H., Pandey A., Mann M.: *Mol. Cell Pro-*

- teomics 1, 376 (2002).
4. Smolka M. B., Zhou H., Purkayastha S., Aebersold R.: *Anal. Biochem.* 297, 25 (2001).
 5. Hutchens T. W., Yip T. T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7, 576 (1993).
 6. Hillenkamp F., Karas M., Beavis R. C., Chait B. T.: *Anal. Chem.* 63, 1193A (1991).
 7. Lundquist M., Caspersen M. B., Wikstrom P., Forsman M.: *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 303 (2005).
 8. Lancashire L., Schmid O., Shah H., Ball G.: *Bioinformatics.* 21, 2191 (2005).
 9. Barzaghi D., Isbister J. D., Lauer K. P., Born T. L.: *Proteomics.* 4, 2624 (2004).
 10. Yip T. T., Chan J. W., Cho W. C., Yip T. T., Wang Z., Kwan T. L., Law S. C., Tsang D. N., Chan J. K., Lee K. C., Cheng W. W., Ma V. W., Yip C., Lim C. K., Ngan R. K., Au J. S., Chan A., Lim W. W.: *Clin. Chem.* 51, 47 (2005).
 11. Das S., Sierra J. C., Soman K. V., Suarez G., Mohammad A. A., Dang T. A., Luxon B. A., Reyes V. E.: *J. Proteome Res.* 4, 920 (2005).
 12. Seo G. M., Kim S. J., Chai Y. G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 1236 (2004).
 13. Stiles J. K., Whittaker J., Sarfo B. Y., Thompson W. E., Powell M. D., Bond V. C.: *Mol. Biochem. Parasitol.* 133, 229 (2004).
 14. Thomas R.: *Analysis of protein phosphorylation using IMAC30 ProteinChip Array.*, User meeting, Berlin 2005.
 15. Elased K. M., Cool D. R., Morris M.: *Hypertension* 46, 953 (2005).
 16. Thulasiraman V., Wang Z., Katrekar A., Lomas L., Yip T. T.: *Methods Mol. Biol.* 264, 205 (2004).
 17. Wang S., Diamond D. L., Hass G. M., Sokoloff R., Vessella R. L.: *Int. J. Cancer* 92, 871 (2001).
 18. Schweigert F. J., Wirth K., Raila J.: *Proteome Sci.* 2, 5 (2004).
 19. Bradbury L. E., LeBlanc J. F., McCarthy D. B.: *Methods Mol. Biol.* 264, 245 (2004).
 20. Forde C. E., Gonzales A. D., Smessaert J. M., Murphy G. A., Shields S. J., Fitch J. P., McCutchen-Maloney S. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 1328 (2002).
 21. Zhang Z., Bast R. C. Jr, Yu Y., Li J., Sokoll L. J., Rai A. J., Rosenzweig J. M., Cameron B., Wang Y. Y., Meng X. Y., Berchuck A., Van Haaften-Day C., Hacker N. F., de Bruijn H. W., van der Zee A. G., Jacobs I. J., Fung E. T., Chan D. W.: *Cancer Res.* 64, 5882 (2004).
 22. Omenn G. S., States D. J., Adamski M., Blackwell T. W., Menon R., Hermjakob H., Apweiler R., Haab B. B., Simpson R. J., Edes J. S., Kapp E. A., Moritz R. L., Chan D. W., Rai A. J., Admon A., Aebersold R., Eng J., Hancock W. S., Hefta S. A., Meyer H., Paik Y. K., Yoo J. S., Ping P., Pounds J., Adkins J., Qian X., Wang R., Wasinger V., Wu C. Y., Zhao X., Zeng R., Archakov A., Tsugita A., Beer I., Pandey A., Pisano M., Andrews P., Tammen H., Speicher D. W., Hanash S. M.: *Proteomics* 5, 3226 (2005).
 23. Rai A. J., Stemmer P. M., Zhang Z., Adam B. L., Morgan W. T., Caffrey R. E., Podust V. N., Patel M., Lim L. Y., Shipulina N. V., Chan D. W., Semmes O. J., Leung H. C.: *Proteomics* 5, 3467 (2005).
 24. Malik G., Ward M. D., Gupta S. K., Trosset M. W., Grizzle W. E., Adam B. L., Diaz J. I., Semmes O. J.: *Clin. Cancer Res.* 11, 1073 (2005).
 25. Heike Y., Hosokawa M., Osumi S., Fujii D., Aogi K., Takigawa N., Ida M., Tajiri H., Eguchi K., Shiwa M., Wakatabe R., Arikuni H., Takaue Y., Takashima S.: *Anticancer Res.* 25, 1197 (2005).
 26. Wang J. X., Zhang B., Yu J. K., Liu J., Yang M. Q., Zheng S.: *Med. J. (Engl.)* 118, 1278 (2005).
- P. Češková^a, K. Brožková^a, L. Hernychová^b, J. Štěrbá^{a,c}, D. Valík^d, and B. Vojtěšek^a** (^a*Department of Molecular and Experimental Pathology, Masaryk Oncological Institute, Brno*, ^b*Department of Molecular Pathology, Faculty of Military Health Service, University of Defence, Hradec Králové*, ^c*Clinic of Child Oncology, Faculty Hospital, Brno*, ^d*Department of Laboratory Medicine, Masaryk Oncological Institute, Brno*): **Mass Spectrometry in Quantitative and Diagnostic Proteomics: Potentials and Limitations**
- Development of new array-based technologies enabled complex analysis of genome, transcriptome and proteome in health and disease. Its results appear to induce dramatic changes in cancer research and show the advent of molecular medicine. Genomic studies are logically extended by including proteomic studies allowing early detection of pathological malignant processes in tissues and corresponding changes in serum protein spectrum. The ProteinChip® technology based on SELDI-TOF mass spectrometry is a new proteomic technology providing a quantitative proteomic approach in biomarker studies. Its principles, application potential and limitations in functional and diagnostic proteomics and molecular medicine are discussed.