

Tömegspektrometria alkalmazása a fehérjék vizsgálatában

KIRÁLY MÁRTON¹, DALMADINÉ KISS BORBÁLA¹, DRAHOS LÁSZLÓ², VÉKEY KÁROLY³,
ANTAL ISTVÁN¹, LUDÁNYI KRISZTINA^{1*}

¹Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészeti Intézet, 1092 Budapest, Högyes Endre u. 7-9

²MTA Természettudományi Kutatóközpont, MS Proteomika Kutatócsoport, 1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2

³MTA Természettudományi Kutatóközpont, Műszercentrum, 1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2

*Levelezési cím: ludanyi.krisztina@pharma.semmelweis-univ.hu

Summary

KIRÁLY, M., DALMADI-KISS, B., DRAHOS, L., VÉKEY, K., ANTAL, I., LUDÁNYI, K.: *Application of Mass Spectrometry in Proteomics*

Mass spectrometry is a high sensitivity, highly selective, high throughput analytical technique. It is well suited to characterize polar, high mass molecules. It is one of the prime analytical techniques to study proteins, to determine their molecular mass, their amino acid sequence and their post-translational modifications. The objective of the present article is to introduce the most important mass spectrometry based methods relevant for protein analysis, like ionization techniques, mass analyzers and tandem mass spectrometry. We shall also introduce „top-down” and „bottom-up” protein sequencing and protein quantitation as well.

Keywords: protein, proteomics, mass spectrometry, „top-down”, „bottom-up”

Összefoglalás

A tömegspektrometria nagy érzékenyséű, szelektív „high throughput” analitikai technika, amely alkalmas nagy molekula-tömegű, poláros makromolekulák jellemzésére. A módszer a fehérje kutatások egyik legfontosabb analitikai módszere, segítségével a fehérje molekulatömege és elsődleges szerkezete is meghatározható, speciális tandem tömegspektrometriás technikákkal pedig lehetőség van a poszttranszlációs módosulások helyspecifikus analízisére, a molekulák heterogenitásának jellemzésére. Jelen összefoglaló célja, hogy bemutassa a fehérje analitikában használt legfontosabb tömegspektrometria alapú technikákat és készülékeket (ionforrások, speciális analizátorok és fragmentációs technikák, „hibrid” készülékek), valamint a szekvenencia meghatározás módszereit („top-down”, „bottom-up”, natív fehérje meghatározás). Külön fejezet foglalja össze a kvantitatív fehérje analízis lehetséges módszereit.

Kulcsszavak: fehérje, proteomika, tömegspektrometria, „top-down”, „bottom-up”

1. Bevezetés

A proteom az élő szervezetben előforduló teljes fehérjeállomány, a proteomika ennek szerkezeti és funkcionális vizsgálatával, megértésével foglalkozó tudományterület. Míg a genomika egy szervezet génkészletét vizsgálja, a proteomika az abból keletkező fehérjéket jellemzi [1, 2]. A proteomika célja a sejt folyamatok, szabályozó folyamatok megismerése, a gének és termékeik funkciójának megértése, fehérjék, biomarkerek meghatározása és biológiai gyógyszerek (biologikumok), bioszimiláris hatóanyagok kutatása, fejlesztése [3]. Fontos megemlíteni, hogy a genom egy adott szervezetben állandónak tekinthető, a proteom azonban a szervezet állapotától nagymértékben függ, így időben és térben is változó, más lehet az agyszövetben, egy adott sejtben, vagy akár egy sejt különböző részeiben, mint például a mitokondriumban vagy a sejt-magban.

Az emberi genom közel huszonötezer gént tartalmaz, a gének több mint százezer fehérjeszekven-

ciát kódolnak. A fehérjék intakt és módosult változatban, pl. foszforilálva vagy glikozilálva is előfordulnak. A fehérjék szerkezetének lehető legpontosabb meghatározására, működésük részletes megismerésére irányuló kutatás napjainkban az egyik legdinamikusabban fejlődő tudomány terület.

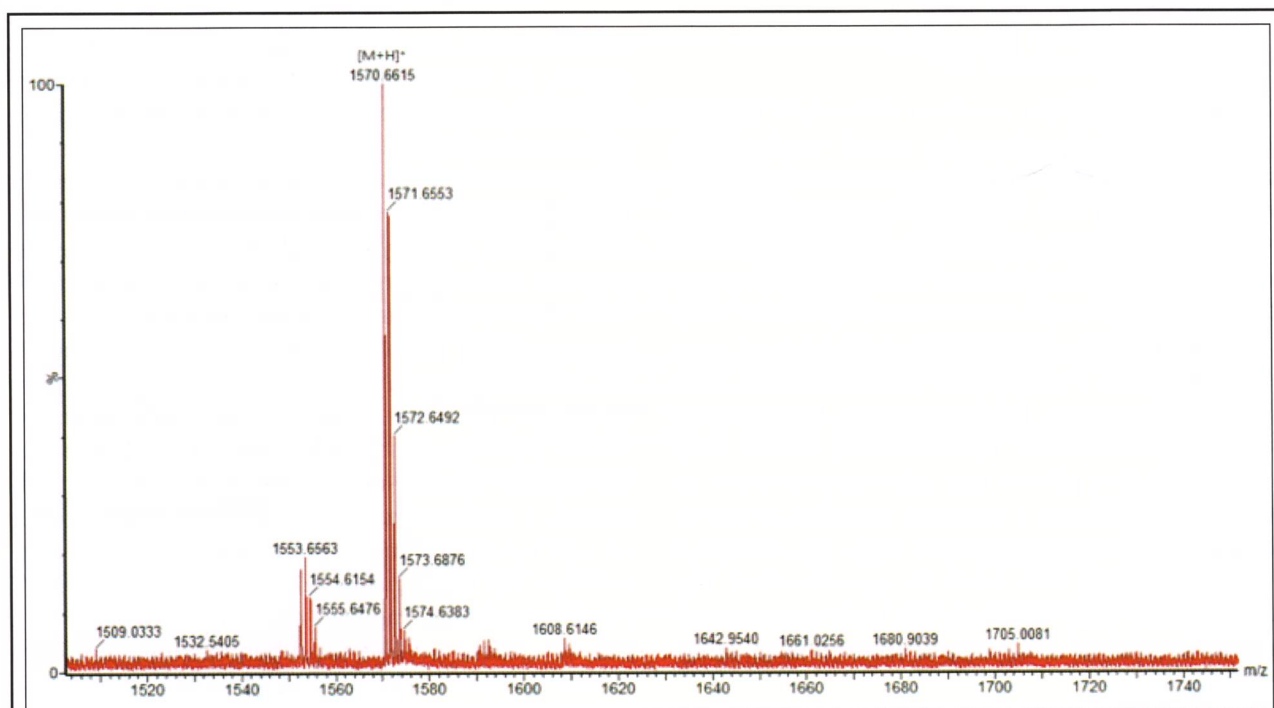
Az elmúlt néhány évtizedben a fehérjék szerkezetének felderítésére számos új analitikai módszer fejlesztettek, amelyek megjelenése előtt a fehérjeszerkezet pontos megismerése szinte lehetetlen feladatnak számított. Az első fehérje vizsgáló módszert 1975-ben J. Klose, P.H. O'Farrel és K. Scheele párhuzamosan fejlesztette ki [4-6]. A nagyfelbontású, fehérje-elválasztásra alkalmas módszerrel, a kétdimenziós gélelektroforézissel lehetővé vált a fehérjék molekulatömegének (MW) azonosítása ill. mennyiségi jellemzése (közelítő MW és félkvantitatív mennyiségi meghatározás) [7]. Ezt követően a 90-es években a tömegspektrometria területén bekövetkező készülék fejlesztések komoly áttörést jelentettek a fehérjék szekvenciájának és a poszttranszlációs módosulások (PTM)

meghatározásában. Az MS alapú proteomika elterjedéséhez nagymértékben hozzájárult a mátrixszal segített lézer deszorpciós technika (MALDI) és az elektroporlasztásos ionforrás (electrospray, ESI) kifejlesztése, valamint az ún. „hibrid” készülékek elterjedése. Fontos előre lépést jelentettek azok a módszerek is, amelyeket a kis mennyiségben rendelkezésre álló fehérjék proteolitikus hasítására fejlesztettek ki. Ma az irodalomban számos olyan módszer található, amelyekkel a szekvencia meghatározása mellett a PTM-ek (glikoziláció, diszulfid hidak stb.) is nagy pontossággal azonosíthatók. Az elmúlt években az adatbázisok segítségével történő fehérje azonosítás nagymértékben felgyorsította az értékelést, amely ma már manuálisan kivitelezhetetlen az óriási mennyiségű adathalmaz miatt [8]. Az ún. „high throughput screening-gel” és az MS-sel kapcsolt elválasztási módszerekkel lehetővé vált igen kis mennyiségű proteinek (femtomol) szerkezetének meghatározása is bonyolult biológiai mintákban. Ezek a fejlesztések nemcsak a biológia és az orvostudomány kérdéseinek megválaszolásához nyújtanak segítséget, hanem a gyógyszerkutatás területén is, főként a biológikumok kutatásában töltenek be alapvető szerepet. Az orvostudományban főként a patofiziológiai folyamatok feltérképezése, a betegségek molekuláris alapjainak megértése, ill. az orvosi diagnosztika területén van jelentősége a tömegspektrometriának.

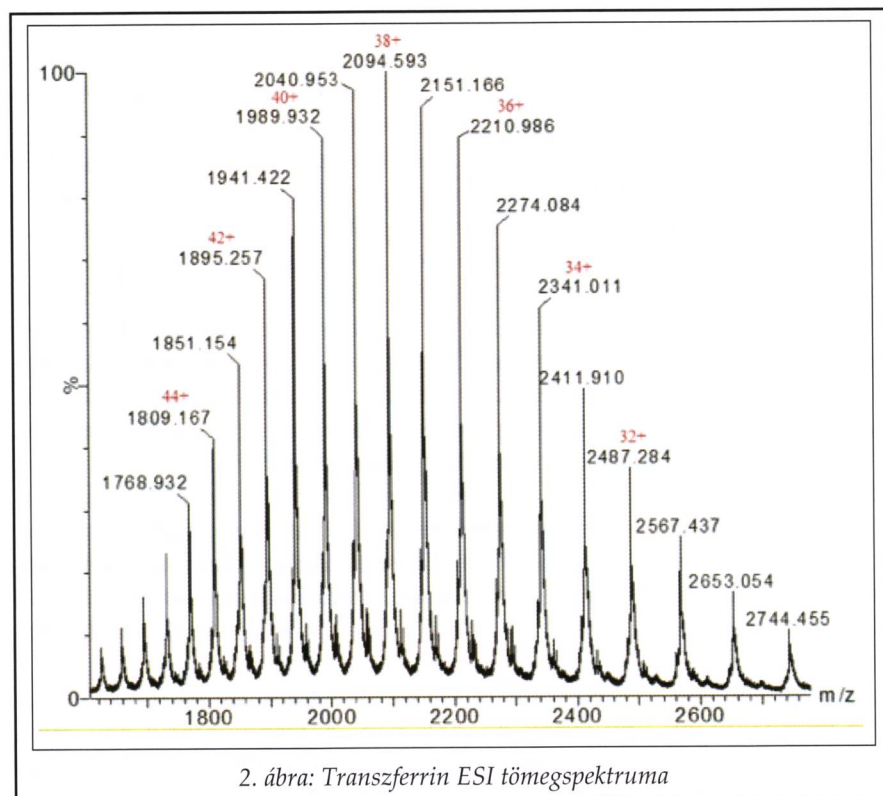
Napjainkban a gyógyszerkutatás egyik fő új irányvonala a fehérjealapú gyógyszerek kifejlesztése és alkalmazása. Ezek közül a legfontosabbak a monoklonális antitestek (mAb), amelyek primer szerkezetének meghatározása tömegspektrometriás módszerekkel történik: meghatározható a fehérje teljes szekvenciája, azonosíthatók a PTM-ek, vizsgálhatók a fehérje készítmények tisztasága és stabilitása [9]. Az originális fehérjekészítmények megjelenése mellett egyre nagyobb figyelem irányul azok „generikumaira”, az ún. bioszimiláris készítmények fejlesztésére is. A molekulák nagy mérete és élő szervezetekben történő előállítása miatt a hasonlóság igazolására speciális analitikai technikák szükségesek [10]. Erre az egyik leggyakrabban használt módszer a megfelelő enzimátikus hasítást követő nagyfelbontású tandem tömegspektrometria.

2. Speciális elvárások a tömegspektrometriás technikákkal szemben: ESI, MALDI, DESI, orbitrap, „hibrid” készülékek, CID, ECD, ETD

A fehérjék vizsgálatára alkalmas módszerekkel szemben számos olyan elvárást támasztanak, amelyek speciális készülékeket igényelnek. A lehető legpontosabb szekvencia meghatározáshoz, a PTM-ek azonosításához, a homológok, szennyezések jelenlétének igazolásához, ill. a mennyiségi jellemzéshez nagy felbontásra és nagy érzékeny-



1. ábra: Glu-fibrinopeptid MALDI tömegspektruma



2. ábra: Transzferrin ESI tömegspektruma

ségre van szükség. Ezekben a vizsgálatokban leggyakrabban két ionizációs technikát, a MALDI-t és az ESI-t használják, ill. olyan speciális analizátorokat, amelyek nagy felbontásuk miatt alkalmasak akár egy aminosav eltérés meghatározására is (ez esetenként a molekulatömegek néhány tizednyi vagy akár századnyi különbségét jelenti). Az ionforrások többszázezer Da molekulatömegű, főként poláros vegyületek ionizálására alkalmasak, az analizátorok pedig az intakt fehérjék molekulatömegének meghatározása mellett szerkezeti információt is adnak a molekuláról.

A MALDI esetében a spektrumban a molekulaion protonált vagy alkáli addukt formájában, esetleg kettős töltésű ionként detektálható, de esetenként dimerek, trimerek is megjelennek (1. ábra). Mivel a módszer ún. lágyionizációs technika, ritkán következik be fragmentáció az ionforrásban, alapvetően a molekulaion meghatározására alkalmas technika. A MALDI ionizáció általában repülési idő (TOF) analizátorhoz kapcsolt, mely igen széles (elvben végtelenül nagy) molekulatömeg tartományban működik. A felbontás növelésére az analizátort gyakran ún. reflektoron módban használják: az első analizátort követően az ionokat iontükrök segítségével egy második analizátorba fókuszálják, mely lehetővé teszi a molekulaionok nagy felbontással való meghatározását. Az utóbbi években a MALDI-TOF módszert képalkotási

(„imaging”) technikaként is használják, segítségével akár egy teljes szerv molekuláris összetétele „pásztázható” ill. tandem tömegspektrometriás módszerekkel a vegyületek szerkezete is meghatározható. Legnagyobb hátránya, hogy nem kapcsolható on-line elválasztási módszerekkel, kisebb kimutatási határral rendelkezik, ill. mennyiségi meghatározásra csak korlátozottan alkalmas [11].

Elektroporlasztásos ionizáció során szintén kíméletes körülmények között állítják elő az ionokat, az ionforrásban sokszorosan töltött ionok keletkeznek protonált molekulaion, alkáli, ill. a vivő eluens összetételétől függő adduktok (pl. ammónia addukt) formájában (2. ábra). Ebben az eset-

ben bármilyen analizátor használható, mert annak tömegtartománya nem befolyásolja a meghatározható ionok molekulatömegét. Az ESI egyik speciális változata a DESI (deszorpciós elektroporlasztásos ionizáció), ahol a töltött aeroszol cseppek a vizsgálandó felülettel ütköznek. A módszert, hasonlóan a MALDI „imaging”-hez, gyakran használják szövet metszetek „letapogató” vizsgálatára [11].

Az analizátorokkal szemben elvárás a nagy felbontás és a speciális tandem tömegspektrometriás mérési mód. Erre a célra leginkább a már említett TOF, valamint az orbitrap, Fourier transzformációs készülékek (FTMS), ill. a „hibrid” rendszerek alkalmasak. A „hibrid” készülékekben több különböző típusú analizátor található, Leggyakrabban a kvadрупól-repülési idő (QTOF), ill. a kvadрупól-ioncsapda (QTrap) rendszereket használják. A QTOF készülék – ionmobilitás cella közbeiktatásával – például különböző konformációs izomerek megkülönböztetésére is alkalmas, ezzel a technikával olyan IgG konformerek is elválaszthatók, amelyek csak diszulfidkötésekben különböznek egymástól [12].

Az orbitrap analizátor az egyik legújabb, nagy teljesítőképességű tömeg (m/z) analizátor. Elsősorban ioncsapda analizátorral kombinálva használják, nagy érzékenységű, rendkívül nagy felbontású és robusztus tandem tömegspektrometriás vizsgálatokhoz. Az orbitrap

segítségével lehetőség van például komplex mAb keverékek és kis tömegkülönbségű ionok elválasztására, valamint a különböző glikoformák szeparálásával a glikozilációs mintázat analízisére is [13].

Az aminosav szekvencia meghatározása ún. peptidtérképek segítségével történik a molekula enzimatis hasítását követően vagy az intakt fehérje tömegspektrométerben történő fragmentálásával, tandem tömegspektrometriás mérésekkel.

A peptidek fargmentációja a peptidkötések mentén következik be, ezeket a folyamatokat először K. Biemann írta le, azóta is az általa kidolgozott nomenklatúrát használják [14]. Az egyes peptidkötések hasadásakor peptidkötésenként hat jellemző fragmenstípus jöhet létre, melyeket a, b, c ill. x, y, z betűkkel jelölnek. Az a, b, c ionsorozat esetén a molekula hasadását követően a töltés az N-terminálison marad, míg az x, y, z sorozatok esetében a C-terminálison. A betűk után alsó indexben feltüntetett szám az adott fragmensben előforduló aminosavak számát adja meg (3. ábra) [15].

A szekvencia meghatározása tandem tömegspektrumok (MS/MS) alapján történik. A leggyakrabban használt ún. ütközés aktivált fragmentáció (CAD, CID) mellett speciális módszereket is kifejlesztettek, mint pl. az elektron befogásos disszociáció (ECD) és az elektron transzfer disszociáció (ETD). MALDI-TOF rendszerekben a tandem tömegspektrometriás vizsgálat forráson belüli bomlással (*in source decay*, ISD) ill. a forrás után, időkapuval kiválasztott molekulaion fragmentációval (*post source decay*, PSD) is történhet [16-18].

A legelterjedtebb fragmentációs módszer a CID, amellyel kis és nagy energiájú ütköztetést is meg lehet valósítani. A spektrumokban főként b és y fragmens sorozatok észlelhetők. A fragmentáció mértékét és az észlelt termék ionok szerkezetét elsősorban a CID ütközési energia szabja meg. Kis energiájú CID esetén egy-egy funkciós csoport lehasadása történik, míg nagy energiájú fragmentá-

ciónál a nagy gyorsító feszültség hatására az ionok jelentős kinetikus (ütközési) energiával rendelkeznek, így a primer fragmentáció mellett speciális fragmentációs folyamatok („*charge remote fragmentation*”) is lejátszódhatnak például TOF/TOF tandem rendszerekben. Az ütközési energia megfelelő megválasztásával lehetőség van speciális fragmens ionok „előállítására”, amelyek alapján bizonyos molekularészek azonosíthatók. Glikoproteinek esetében például a keletkező oligoszacharid egységek alapján kiválaszthatók a glikopeptid spektrumok (kromatográfiás csúcsok, LC-MS kapcsolás esetén), és így a glikopeptidek szekvenciája meghatározható [19].

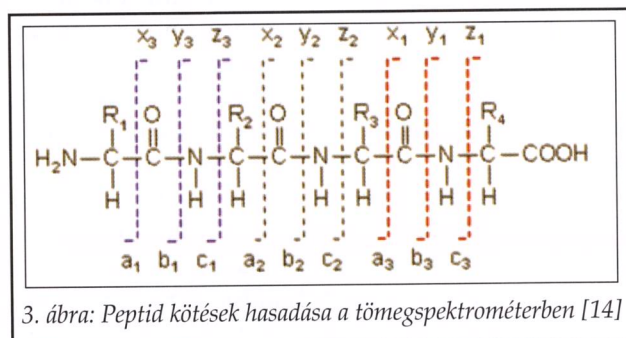
Az ECD módszert F.W. McLafferty és munkatársai fejlesztették ki az 1990-es évek végén. Lényege, hogy a többszörösen töltött biomolekulák alacsony energiájú elektronokat fognak be (<1eV) a tömegspektrométerben és gyök kationokká alakulnak, majd fragmentálódnak [15].

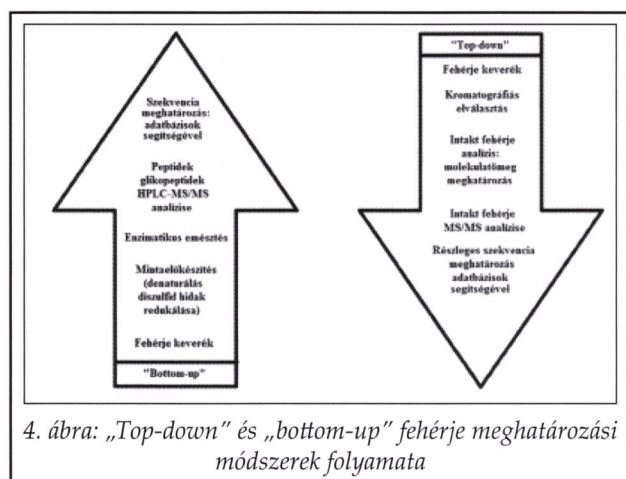
ETD technikát először D. Hunt és munkatársai mutatták be 2004-ben. A fragmentáció egy gyök anion elektronjának átadásával következik be, így lehetőség van a peptidek N-Cα kötésének hasadására. A módszerrel az N-terminális c-, és C-terminális z-típusú fragmensei határozhatók meg, amelyek komplementerei a CID fragmentációval keletkező b és y fragmenseknek. Ilyen módon a különböző fragmentációs technikák egymást kiegészítő információkat szolgáltatnak. Az ETD módszer alkalmas a PTM-ek helyének meghatározására is, mert – a CID-val ellentétben – az olyan instabil módosítások, mint például az oligoszacharid egységek, nem hasadnak le a peptid fragmensekről, de a diszulfid kötések felhasadnak, amely többlet információt szolgáltat a fehérje primer szerkezetéről [15].

A legrészletesebb szerkezeti információ a CID és az ECD ill. ETD technikákkal kapott eredmények kombinálásával nyerhető. Ilyen módon az intakt proteinek N- és C-terminális szekvenciái is vizsgálhatók [20].

3. Fehérjék szerkezet meghatározása

A proteomikai vizsgálatok során általában kis mennyiségű, biológiai mátrixban lévő fehérjekeverékekben kell meghatározni a fehérje szekvenciáját. A fehérje elsődleges szerkezetének meghatározásán kívül szükséges a PTM-ek ill. a homológ szerkezetek arányainak vizsgálata és a végső szerkezet kialakításában jelentős szerepet betöltő kötések (pl. diszulfid kötések) meghatározása is [21].





Egy fehérje szerkezetének jellemzésére négy módszert használnak: „bottom-up”, „middle-down”, „top-down” technikákat ill. a natív tömegspektrometriás módszert (4. ábra).

„Bottom-up” technika

A „bottom-up” technika a legszélesebb körben alkalmazott protein vizsgálati módszer. Az „alulról felfelé építkezés” során a fehérjéket emésztőenzimek segítségével peptidláncokra bontják, majd meghatározzák a peptidek molekulatömegét és szekvenciáját. Ezzel a módszerrel a fehérje primer szerkezete (aminosav sorrend) 100%-ban meghatározható, de lehetőség van a PTM-ek helyspecifikus azonosítására is. Leggyakrabban tripszines emésztést végeznek, amely a fehérjéket „optimális” méretűre bontja (kb. 5-20 aminosav, 400-2000 m/z tömegtartományban) [22]. A tripszin a bázikus aminosavak – specifikusan a lizin és arginin – C-terminálisánál lévő peptidkötéseket hasítja el, a kialakult szabad C-terminálisok nitrogént tartalmazó oldalláncai protonálódnak az ionforrásban. A fehérjék teljes primer szerkezetének meghatározásához gyakran szükséges egyéb enzimekkel, pl. kimotripsinnel, Lys C-vel, Glu C-vel végzett proteolitikus bontás is a teljes aminosav sorrend meghatározásához [18, 23].

Az emésztéssel nyert peptidek szekvenciájának pontos meghatározása HPLC-MS/MS technikával történik peptidtérképek segítségével: meghatározzák a fehérje fragmentumok (peptidek) pontos tömegét, megállapítják az ionok töltés számát, majd fragmentáltatják az egyszeres vagy többszörös töltésű molekuláionokat. A peptid szekvenciájának meghatározása a tandem tömegspektrumok alapján adatbázisok (pl. SwissProt, NCBI) segítségével történik. Az „in silico” tripszines hasításból szár-

mazó peptidek elméleti tandem tömegspektrumával való összehasonlítás után a számítógépes program statisztikai alapon választja ki a potenciális fehérjéket. A tandem tömegspektrometriás módszerrel az N- és C-terminálisokon történt változások és a különböző módosítások, mint pl. a glikoziláció, foszforiláció is vizsgálhatók. Az eljárást a szekvencia meghatározáson kívül például terápiás fehérjék különböző gyártási tételeinek ill. bioszimiláris és referencia termék összehasonlítására is alkalmazzák [24, 25].

„Top-down” technika

A „top-down” technika („felülről lefelé” történő meghatározás) az intakt fehérjék szekvenciáját előzetes emésztés nélkül vizsgálja. A fehérje tömegspektrométerben izolált, sokszorososan töltött molekuláionját kisebb egységekre hasítják és a kapott fragmentumok alapján azonosítják a peptideket, glikopeptideket. A mérésekhez nagyfelbontású analizátorok (TOF, FTMS, orbitrap) és speciális fragmentációs módszerek (ECD, ETD) szükségesek. A módszer előnye, hogy a kapott szerkezeti információ közvetlenül a kiválasztott molekulát jellemzi, az egész molekula (és nem csak egy része) vizsgálható, valamint a vizsgálathoz előzetes enzimes emésztés nem szükséges. Hátránya azonban, hogy a módszer érzékenysége más tömegspektrometriás technikákhoz képest kicsi, nagy méretű fehérjék esetén nem alkalmazható, az értékelés nehézkes és a megfelelő készülékek rendkívül drágák [18, 23].

„Middle-down” technika

A módszer („középről-lefelé” történő meghatározás) az előbbieken említett technikák „keveréke”, mert az intakt fehérjét csak részlegesen bontják emésztőenzimekkel a mérés előtt. Az eljárást általában akkor alkalmazzák, ha egy fehérjének csak egy bizonyos részletét vizsgálják [26].

Natív tömegspektrometriás módszer

Proteinek és protein-komplexek vizsgálatára alkalmas az ún. natív tömegspektrometriás módszer. A fehérjék előkészítése során olyan körülményeket alkalmaznak – például a biológiai közegnek megfelelő pH, denaturációt okozó szerves oldószerek mellőzése –, amely biztosítja, hogy a fehérje natív konformációja nem változik meg. Ilyen módon vizsgálható a minta szerkezeti heterogeni-

tása, ill. a fehérjék vagy fehérje komplexek hajtogatott konformációján túl ezek dinamikájáról és stabilitásáról is információ nyerhető.

4. Kvantitatív fehérje tömegspektrometria

A fehérjék szerkezetének meghatározása mellett szükséges azok kvantitatív jellemzése is. A fehérjék mennyiségi vizsgálatára ún. „label-free”, (azaz stabil izotópjelzést nem igénylő) vagy „labeled”, vagyis stabil izotópjelzést alkalmazó tömegspektrometriás módszereket használnak.

Izotópjelzés nélküli („label-free”) technika

A proteomikában leggyakrabban az izotóp jelzés nélküli módszereket használják, mert gyors, viszonylag egyszerű, olcsó, és a legtöbb esetben a kitűzött célhoz elegendő pontosságot biztosít. A módszer lényege, hogy a fehérje enzimatis hasítását követően a peptid keveréket kromatográfiásan szétválasztják, majd ionkromatogramok alapján meghatározzák a peptidok relatív mennyiségét. Számítógépes program segítségével állapítják meg az összehasonlítandó mintákban a vizsgált fehérjék relatív arányát. A fehérjék kvantitatív meghatározására számos algoritmus létezik, mint pl. az LFQ, TOP3 [3]. A módszerrel rendkívül összetett (akár több ezer fehérjét tartalmazó) minta is vizsgálható, például egy betegségben szenvedő csoport szérumban mintákban található fehérjék mennyisége is meghatározható. A tömegspektrum minőségét számos tényező befolyásolhatja, ezért az eljárásnak feltétele, hogy a befolyásoló tényezők azonos mértékben hassanak a vizsgált és a standard molekulára [11, 15, 26].

Izotópjelzéses („labeled”) technikák

A technika a stabil izotópos jelölésen alapul. Az izotópos jelölés általában kémiai úton történik. A módszer lényege, hogy az összehasonlítandó mintákat különböző izotópokat tartalmazó reagenssel kezelik, majd a mintákat összekeverik. A jelölést követően a további mintaelőkészítést a „kevert” mintával végzik. A tömegspektrometriás mérés során a különböző izotópokkal jelölt peptidok relatív arányából határozzák meg a kvantitatív adatokat. Az izotópjelzéses technikák általában pontosabb mennyiségi meghatározást tesznek lehetővé, mint az izotópjelzést nem tartalmazók, hátrányuk azonban, hogy idő-, munka- és

költségigényes módszerek, ill. összességében kevesebb fehérje határozható meg, mint a „label free” módszerrel [11, 15, 26].

5. Összefoglalás

A tömegspektrometria a fehérje analitika területén egyre szélesebb körben használt műszeres analitikai technika. Az orvostudományban és a biológiai kutatásokban történő alkalmazását a 20. század végén történt készülék és módszerfejlesztések tették lehetővé, amelyek segítségével a kis molekulák vizsgálata mellett a nagyobb molekula-tömegű biomolekulák, így peptidok, fehérjék, glikoproteinek, oligonukleotidok pontos molekulatömegének és elsődleges szerkezetének meghatározása is lehetővé vált. Az új típusú készülékek, speciális tandem tömegspektrometriás módszerek fejlődése jelentős tömegfelbontás és érzékenység javulást eredményezett, amely a poszttranszlációs módosulások, főként a glikoformok szerkezetének és helyének egyre pontosabb meghatározását is eredményezték. A készülék fejlesztésekkel, a makromolekulák mintaelőkészítésére kidolgozott módszerek optimalizálásával, ill. új módszerek kidolgozásával a biológiai rendszerek heterogenitása, az izoformák analízise is lehetővé vált.

IRODALOM

1. Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., Humphrey-Smith, I.: Electrophoresis 16, 1090-1094 (1995).
2. Wilkins, M.: Electrophoresis 7, 1077-1322 (1995).
3. Aebersold, R., Mann, M.: Nature 422, 198-207 (2003).
4. Scheele, G. A.: The Journal of Biological Chemistry 250, 5375-5385 (1975).
5. Klose, J.: Humangenetik 26, 231-243 (1975).
6. O'Farrell, P. H.: The Journal of Biological Chemistry 250, 4007-4021 (1975).
7. Bienvenut, W.V., Müller, M., Palagi, P.M., Gasteiger, E., Heller, M., Jung, E.: Proteomics and Mass Spectrometry: Some aspects and recent developments. In: Bienvenut, W.V. (ed): Acceleration and Improvement of Protein Identification by Mass Spectrometry. Springer, The Netherlands, 2005, pp. 225-281
8. Henzel, W.J., Stults, J.T., Watanabe, C.: Journal of American Society for Mass Spectrometry 14, 931-942 (2003).
9. Buzás, Zs.: Magyar orvos 1-2, 37-40 (2010).
10. Warren, J.B.: British Journal of Clinical Pharmacology 1, 7-14 (2013).
11. Trauger, S.A., Webb, W., Siuzdak, G.: Spectroscopy 16, 15-28 (2002).
12. Thompson, N.J., Rosati, S., Heck, A.J.R.: Methods 65, 11-17 (2014).
13. Hunt, D.F., Yates, J.R., Shabanowitz, J., Winston, S., Hauer, C.R.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83, 6233-6237 (1986).

14. Roepstorff, P., Fohlman, J.: *Biomed Mass Spectrom.* 11, 601 (1984).
15. Lin, D., Tabb, D.L., Yates, J.R.: *Biochimica et Biophysica Acta* 1646, 1-10 (2003).
16. Sandra, K., Vandenheede, I., Sandra, P.: *Journal of Chromatography A* 1335, 81-103 (2014).
17. Bogdanov, B., Smith, R.D.: *Mass Spectrometry Reviews* 24, 168-200 (2005).
18. Macht, M.: *Trends in Analytical Chemistry* 48, 62-71 (2013).
19. Mann, M., Hendrickson, R.C., Pandey, A.: *Annual Review of Biochemistry* 70, 437-473 (2001).
20. Han, X., Aslanian, A., Yates, J.R.: *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 483-490 (2008).
21. Hevér, H., Ludányi, K., Drahos, L., Vékey, K.: *Magyar Kémiai Folyóirat* 119, 46-52 (2013).
22. Somogyi, Á.: Mass spectrometry instrumentation and techniques. In: Vékey, K., Telekes, A., Vértes, Á. (ed): *Medical Applications of Mass Spectrometry*. Elsevier, The Netherlands, 2002, pp. 93-137.
23. Breuker, K., Jin, M., Han, X., Jiang, H., McLafferty, F.W.: *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19, 1045-1053 (2008).
24. Ph.Hg. VIII .- Ph.Eur.6.6-1. 2.2.55. Peptidterkép-vizsgálat 01/2010:20256
25. Beck, A., Diemer, H., Ayoub, D., Debaene, F., Wagner-Rousset, E., Carapito, C., Van Dorsselaer, A., Sanglier-Cianférani, S.: *Trends in Analytical Chemistry* 48, 81-95 (2013).
26. Chen, C.H.: *Analytica Chimica Acta* 624,16-36 (2008).

Érkezett: 2016. május 22.
