

Received: 2013.09.06
Accepted: 2014.06.23
Published: 2014.11.17

Zastosowanie hodowli komórkowych, płynów ustrojowych i tkanek w onkoproteomice*

The application of cell cultures, body fluids and tissues in oncoproteomics

Kamila Duś-Szachniewicz¹, Paweł Ostasiewicz¹, Marta Woźniak¹, Andrzej Gamian²

¹Katedra i Zakład Patomorfologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

²Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Streszczenie

Badania proteomiczne oparte na technologii spektrometrii masowej umożliwiają kompleksową analizę białek, badanie ich aktywności oraz wzajemnych oddziaływań. W ostatnich latach proteomika przestała funkcjonować jedynie jako narzędzie do identyfikacji białek i znalazła praktyczne zastosowanie w naukach biomedycznych.

Jeszcze do niedawna próby identyfikacji białkowych markerów chorób nowotworowych koncentrowały się na wyodrębnieniu pojedynczych białek o zmienionej ekspresji w stanie patologicznym. Biomarkery te były mało swoiste dla danego typu nowotworu i rzadko znajdowały zastosowanie w praktyce klinicznej. Narzędzia, którymi dysponuje obecnie proteomika pozwalają na całościową analizę profilu białkowego pacjenta na każdym etapie zaawansowania choroby nowotworowej. Charakterystyka porównawcza profili białkowych osób chorych i zdrowych przyczynia się do identyfikacji biomarkerów, które mogą znaleźć zastosowanie we wczesnej diagnostyce, monitorowaniu przebiegu choroby nowotworowej oraz ocenie skuteczności podjętego leczenia. Z rozwojem proteomiki związane są również nadzieje na opracowanie skutecznych terapii celowanych dostosowanych do indywidualnego pacjenta.

W pracy omówiono najnowsze osiągnięcia onkoproteomiki w identyfikacji biomarkerów wybranych nowotworów złośliwych człowieka z materiału klinicznego w postaci tkanek oraz płynów ustrojowych. Ponadto przedstawiono aktualne wyniki badań proteomicznych prowadzonych na liniach komórek nowotworowych.

Słowa kluczowe:

proteomika kliniczna • spektrometria masowa • markery nowotworowe • onkoproteomika • przygotowanie próbek

Summary

Mass spectrometry (MS)-based proteomics is a rapidly developing technology for the large scale analysis of proteins, their interactions and subcellular localization. In recent years proteomics has attracted much attention in medicine. Since a single biomarker might not have sufficient sensitivity and specificity in clinical practice, the identification of biomarker panels that comprise several proteins would improve the detection and clinical management of cancer

*Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie umowy numer (DEC-2011/01/N/NZ5/04253).

Praca współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

	patients. Additionally, the characteristics of protein profiles of most severe human malignancies certainly contribute to the understanding of the biology of cancer and fill the gap in our knowledge of carcinogenesis. This knowledge also is likely to result in the discovery of novel potential cancer markers and targets for molecular therapeutics. It is believed that the novel biomarkers will help in the development of personalized therapy tailored to the individual patient and will thereby reduce the mortality rate from cancer. In this review, the use of different types of human clinical samples (cell cultures, tissues and body fluids) in oncoproteomics is explained and the latest advances in mass spectrometry-based proteomics biomarker discovery are discussed.
Key words:	clinical proteomics • mass spectrometry • tumor biomarkers • oncoproteomics • sample preparation
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1129117
Word count:	5426
Tables:	1
Figures:	–
References:	103

Adres autorki: mgr Kamila Duś-Szachniewicz, Katedra Patomorfologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, 50-368 Wrocław, ul. Karola Marcinkowskiego 1, e-mail: kamila.dus@gmail.com.

Wykaz skrótów: **AFP** - alfa-fetoproteina (alpha-fetoprotein), **CEA** - antygen karcinoembrionalny (carcinoembryonic antygen), **CID** - dysocjacja wywołana kolizjami z cząstkami gazu obojętnego (collision induced disociation), **CSF** - płyn mózgowo-rdzeniowy (cerebrospinal fluid), **FASP** - przygotowanie próbek w oparciu o zastosowanie filtrów (filter aided sample preparation), **FFPE** - materiał utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie (formalin fixed paraffin embedded), **FT-IRC** - analizator cyklotronowego rezonansu jonów z fourierowską transformacją wyników (Fourier transform ion cyclotron resonance), **HDCAs** - inhibitory deacetylaz histonów (histone deacetylases inhibitors), **HPLC** - wysokosprawna chromatografia cieczowa (high performance liquid chromatography) **IMAC** - chromatografia powinowactwa do unieruchomionych jonów metali (immobilised metal affinity chromatography), **LC-MS/MS** - spektrometria mas sprzężona z chromatografią cieczową (liquid chromatography-mass spectrometry), **MS** - spektrometria masowa (mass spectrometry), **MS/MS** - tandemowa spektrometria masowa (tandem mass spectrometry), **MRM** - monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji (multiple reaction monitoring), **PSA** - swoisty antygen sterczowy (prostate-specific antigen), **PRIDE** - baza proteomicznej identyfikacji białek (PRoteomics Identifications Database), **Q** - analizator kwadrupolowy (quadrupole), **SILAC** - znakowanie stabilnym izotopem w hodowli komórkowej (stable isotope labeling by amino acids in cell culture), **TOF** - analizator czasu przelotu (time-of-flight), **UniProt** - katalog informacji nt. białek (Universal Protein resource), **2D-PAGE** - dwukierunkowa elektroforeza w żelu (two-dimensional gel electrophoresis).

WPROWADZENIE

W 2010 roku w Polsce zarejestrowano 140 564 zachorowania na nowotwory złośliwe. Według statystyk opublikowanych na stronie internetowej Krajowego Rejestru Nowotworów zachorowalność na nowotwory wzrasta systematycznie od 2003 roku o prawie 2500 nowych przypadków rocznie [41]. Współczesne strategie terapeutyczne obejmują leczenie chirurgiczne połączone najczęściej z radioterapią lub terapią cytostatykami. Metody te obciążone są efektami ubocznymi oraz obniżają w znacznym stopniu jakość życia pacjentów. Z tego względu przyszłością medycyny jest terapia celowana z wykorzystaniem leków działających wybiórczo na biał-

ka regulujące cykl komórkowy, białka indukujące apoptozę, czy receptory czynników wzrostu i różnicowania komórek.

Mimo że w badaniach nad procesami nowotworzenia uczestniczy wiele ośrodków naukowych na świecie i każdego dnia pojawiają się doniesienia dotyczące odkryć w zakresie identyfikacji potencjalnych biomarkerów nowotworowych lub nowych miejsc docelowych działania leków (tzw. punktów uchwytu leków), wciąż niewiele markerów znajduje zastosowanie kliniczne. Każdy biomarker, bądź panel biomarkerów, który może znaleźć zastosowanie kliniczne powinien być swoisty dla danego typu nowotworu. Ponadto musi być wykrywalny we wczesnych etapach

choroby nowotworowej lub w odpowiedzi na zastosowaną terapię za pomocą jak najmniej inwazyjnych technik. Określenie stężenia pojedynczych białek w surowicy krwi (np. antygenu karcinoembrionalnego (CEA), swoistego antygenu sterczowego (PSA), czy antygenów nowotworowych CA-125, CA19-9) stosowane jest od wielu lat w onkologii. Mimo to, większość znanych markerów wykazuje niewielką czułość i swoistość, co sprawia, że nie spełniają oczekiwanej roli w badaniach przesiewowych, diagnostyce oraz monitorowaniu przebiegu choroby nowotworowej. Przykładem takiego markera jest alfa-fetoproteina (AFP), oznaczana rutynowo w raku wątrobowokomórkowym. Jej przydatność kliniczna ogranicza się jedynie do wykrywania wczesnego stadium choroby, ponieważ około 1/3 pacjentów z zaawansowaną postacią nowotworu wykazuje prawidłowy poziom AFP w surowicy [74].

Duże nadzieje na rozwój nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych pokładane są w proteomice klinicznej, której zasadniczym celem, oprócz jednoczesnej identyfikacji i analizy wszystkich białek organizmu człowieka, jest poszukiwanie różnic w profilach białkowych osób zdrowych i chorych na każdym etapie przebiegu choroby [6]. Analizy proteomiczne pozwalają dodatkowo określić funkcję białek, ich aktywność oraz wzajemne oddziaływanie, a także umożliwiają badanie modyfikacji potranslacyjnych białek [7,86].

Poczyniony w ostatnich latach znaczący postęp w technologii proteomicznej umożliwia jednoczesną analizę ekspresji licznych białek w danym typie tkanki albo w płynach i wydzielinach ustrojowych. Proteomika kliniczna, mimo że jest stosunkowo młodą dyscypliną naukową, może pochwalić się pierwszymi sukcesami. W 2010 roku amerykańska FDA (Food and Drug Administration) zatwierdziła do powszechnego użycia test dostępny pod komercyjną nazwą OVA1, służący do ilościowego oznaczania panelu biomarkerów (CA125, transferryny, apolipoproteiny A, 1,2-makroglobuliny i transtyretyny) w surowicy krwi u kobiet ze stwierdzonymi w badaniu ultrasonograficznym zmianami w obrębie miednicy małej i pozwala zakwalifikować pacjentki do leczenia chirurgicznego [80,99].

W pracy omówiono najnowsze osiągnięcia onkoproteomiki w zakresie identyfikacji nowych biomarkerów z różnorodnego materiału klinicznego oraz śledzenia zmian wywołanych procesami patologicznymi na poziomie komórki, tkanki i narządu.

Spektrometria masowa w proteomice klinicznej

Termin proteom, wprowadzony do terminologii naukowej w latach 90 XX w., oznacza komplet białek kodowanych przez genom (protein complement of the genome). Nauka, która w sposób kompleksowy bada profile białkowe organizmów oraz zmiany w aktywności i ekspresji białek nazywana jest proteomiką [67]. Proteom jest układem dynamicznym w przeciwieństwie do genomu, który jest identyczny dla wszystkich komórek organizmu i niezmienny w czasie. Skład proteomu różni się między komórkami danego organizmu, ponadto zależy od etapu rozwoju,

oddziaływań z innymi komórkami oraz innych czynników zewnętrznych.

Potrzeba poznania pełnego wzoru białkowego danego organizmu wynika głównie z tego, iż badanie ekspresji mRNA nie dostarcza odpowiedzi na pytania dotyczące modyfikacji potranslacyjnych białek, ich umiejscowienia w komórce, oddziaływań między białkami, czy ich roli w poszczególnych szlakach metabolicznych [28]. Dodatkowo przyjmuje się, że liczba genów u człowieka wynosi około 20-25 tysięcy, podczas gdy liczba białek i peptydów szacowana jest na co najmniej kilkaset tysięcy. Kwasy nukleinowe są atrakcyjnymi markerami chorób nowotworowych ze względu na łatwość pozyskiwania próbek do badań, możliwość amplifikacji oraz analizy ilościowej pozyskanego materiału. Jednak w komórkach nowotworowych, zróżnicowana ekspresja mRNA z poziomem odpowiadającego mu białka skorelowane są jedynie w niewielkim stopniu [76].

W ostatniej dekadzie proteomika cieszy się coraz większym zainteresowaniem, ponieważ pozwala śledzić *in situ* zmiany w składzie białkowym narządu czy tkanki powstające na skutek procesów patologicznych. Analiza różnic w profilach białkowych osób chorych i zdrowych umożliwia poznanie biologicznych podstaw mechanizmów prowadzących do powstania i progresji choroby oraz prowadzi do identyfikacji punktów uchwytu dla nowych leków [73,82]. Niezaprzeczalnym atutem proteomiki jest również możliwość identyfikacji modyfikacji potranslacyjnych, takich jak fosforylacja, glikozylacja, acetylacja czy ubikwitynacja wpływających na aktywność białek i mających bezpośredni wpływ na transformację nowotworową komórek [44,50,95].

Spektrometria masowa (MS) jest najbardziej wszechstronnym i uniwersalnym narzędziem wykorzystywanym w analizie składu białkowego próbek klinicznych [51]. Technika ta umożliwia rozdział jonów ze względu na wartość stosunku względnej masy jonu (m) do jego stopnia naładowania (z) [1]. Na podstawie wartości m/z fragmentów białka określa się jego częściową sekwencję, co umożliwia wiarygodną identyfikację danego białka. Wspomniana strategia należy do szeroko stosowanego podejścia proteomicznego określanego bottom-up [71]. Alternatywna metodologia top-down, polega na wprowadzeniu do spektrometru niestrawionych proteolitycznie peptydów i białek, nieprzekraczających jednak 50 kDa. Ograniczenie dotyczące masy molekularnej analizowanych molekuł sprawia, że technika ta jest rozpoznawana w laboratoriach proteomicznych w analizie histonów, białek i peptydów sekrecyjnych oraz małych białek i peptydów regulatorowych [37]. Strategia bottom-up jest obecnie częściej stosowana w analizie materiału klinicznego od podejścia top-down, jednakże wciąż niewielka liczba zidentyfikowanych za pośrednictwem spektrometrii masowej biomarkerów nie pozwala jednoznacznie potwierdzić przewagi którejkolwiek z metod.

Ze względu na złożoność proteomu nie istnieje jeden standardowy sposób przygotowania próbki do analizy białek metodą spektrometrii masowej. Protokoły wykorzystywane w proteomice klinicznej różnią się w zależności od rodzaju

próbki, zastosowanej metody pomiaru czy też celów doświadczenia. Analiza porównawcza materiału pochodzącego od osób chorych i zdrowych może nieść istotne informacje kliniczne jedynie pod warunkiem opracowania i wdrożenia ujednoliconych schematów przygotowania próbek, które będą dostosowane do właściwości fizykochemicznych badanego materiału. Analiza proteomiczna materiału klinicznego to złożony proces obejmujący etapy przygotowania próbki, jonizacji, pomiarów spektrometrycznych oraz informatycznego opracowania danych.

Trawienie białek

Możliwość identyfikacji białek na podstawie pomiaru masy całych cząsteczek jest ograniczona, dlatego proteomika oparta na spektrometrii masowej zajmuje się analizą peptydów. Etap właściwej analizy materiału klinicznego w spektrometrze masowym poprzedzony jest reakcją trawienia enzymatycznego białek i peptydów znajdujących się w próbce przez enzymy proteolityczne. Enzymy te specyficznie dzielą białka w ściśle określonych miejscach, dlatego możliwa jest identyfikacja danego białka na podstawie znajomości peptydów proteolitycznych pokrywających jego sekwencję nawet w niewielkim stopniu. Najczęściej wykorzystywane enzymy to trypsyna i LysC [5].

Opublikowane niedawno wyniki eksperymentu przeprowadzonego przez Lowenthala i wsp. jednoznacznie wykazują, że liczba zidentyfikowanych białek metodą LC-MS/MS zależy od protokołu trawienia wykorzystanego do przygotowania próbek [47]. Autorzy podkreślają konieczność dopasowania techniki przygotowania próbek do specyfiki analizowanego materiału, a także zalecają przeprowadzanie niezależnych kontroli procesu trawienia w każdym badaniu proteomicznym.

Frakcjonowanie próbek

Próbki kliniczne poddawane analizom proteomicznym to mieszaniny licznych białek, dlatego przed wprowadzeniem do spektrometru masowego niezbędny jest ich wstępny rozdział. Jedną z metod frakcjonowania białek jest dwukierunkowa elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (2D-PAGE), umożliwiająca rozdział białek ze względu na ich masę cząsteczkową i wartość punktu izoelektrycznego. Rozdzielone i wybarwione plamy (tzw. spots) wycinane są z żelu, wyizolowane z nich białka są poddawane trawieniu enzymem proteolitycznym, a następnie analizowane pojedynczo w spektrometrze masowym. Elektroforeza dwukierunkowa umożliwia jednoczesne rozdzielanie nawet kilku tysięcy białek, mimo to duża czasochłonność i niewystarczająca powtarzalność tej metody spowodowały, że obecnie szeroko stosowana jest alternatywna strategia nazywana proteomiką typu „shotgun”. Polega na wprowadzeniu do spektrometru mieszaniny peptydów pochodzących z równoległego trawienia wszystkich białek znajdujących się w danej próbce [85]. Analiza złożonych mieszanin stała się możliwa dzięki połączeniu ze spektrometrem masowym wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [5,98]. Wstępny rozdział białek i peptydów w wyniku chromatografii, a następnie

właściwa analiza spektrometryczna to obecnie najczęściej wybierana metoda proteomicznej identyfikacji biomarkerów [21].

Analiza próbek klinicznych obejmuje również identyfikację białek mających określone modyfikacje potranslacyjne. Wówczas konieczne jest zastosowanie dodatkowych technik wzbogacania peptydów (peptide enrichment), takich jak immunoprecypitacja, chromatografia powinowactwa do unieruchomionych jonów metali (IMAC) bądź też metod z wykorzystaniem izotopów [55,79].

Jonizacja i właściwa analiza spektrometryczna

Spektroskopy masowe wyposażone są w następujące elementy:

- źródło jonów, w którym cząstki obojętne elektrycznie zamieniane są na jony,
- analizator rozdzielający jony pod względem wartości stosunku masy do ładunku,
- detektor, w którym zliczane są jony danego rodzaju [84].

Opracowanie nowych rozwiązań konstrukcyjnych zarówno do wytwarzania, rozdzielania i detekcji jonów, jak i zbierania i analizowania danych wpływają na uzyskiwanie coraz lepszych wyników oznaczeń przeprowadzanych na próbkach klinicznych.

Pomiar masy w spektrometrze masowym jest możliwy po uprzednim zjonizowaniu cząstek i przeprowadzeniu ich do fazy gazowej. W badaniach biomolekuł największe znaczenie mają wprowadzone w latach 90 ub.w. łagodne techniki jonizacji przez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI) oraz przez desorpcję laserową w matrycy (MALDI), w których rozpad badanych cząstek nie występuje wcale lub zachodzi w ograniczonym zakresie [23,35]. Obie techniki mogą być z powodzeniem wykorzystywane do analizy próbek klinicznych, przy czym zaletą pierwszej z nich jest duża wydajność i niewielki stopień fragmentacji badanych molekuł. Jonizacja przez desorpcję laserową w matrycy gwarantuje natomiast większą przepustowość i wydajność pomiaru, dodatkowo dopuszczalne jest większe zanieczyszczenie próbki niż w przypadku ESI [76].

Elementem spektrometru masowego umożliwiającym rozdział jonów na podstawie ich stosunku m/z jest analizator mas. Ze względu na zastosowane rozwiązania konstrukcyjne wyróżnia się analizatory kwadрупolowe (Q), analizatory czasu przelotu (TOF), pułapki jonowe, sektory magnetyczne oraz analizatory cyklotronowego rezonansu jonów z fourierską transformacją wyników (FT-IRC). Wiarygodna analiza próbek klinicznych, na które składają się liczne białka różniące się w niewielkim stopniu wartością masy molekularnej stała się możliwa dzięki skonstruowaniu spektrometrów mas zaopatrzonych w więcej niż jeden analizator mas [12]. Spektrometry takie umożliwiają przeprowadzenie dwuetapowej analizy tandemowej. W pierwszym cyklu odseparowane zostają jony o określonym stosunku masy do ładunku, następnie dochodzi do ich rozpadu na fragmenty najczęściej w wyniku dysocjacji wywołanej kolizjami

z cząstkami gazu obojętnego (CID). W drugim etapie analizy odbywa się analiza jonów powstałych w wyniku fragmentacji. Tandemowa spektrometria mas znalazła szerokie zastosowanie w proteomice klinicznej, ponieważ umożliwia ustalenie sekwencji aminokwasowej peptydów.

W identyfikacji biomarkerów chorób nowotworowych najpopularniejsze są spektrometry typu potrójny kwadrupol, podwójny analizator czasu przelotu (TOF/TOF) oraz spektrometry hybrydowe zaopatrzone w dwa odmienne typy analizatorów [66].

Analiza bioinformatyczna

Zaawansowane techniki bioinformatyczne pozwalają analizować jednocześnie setki tysięcy danych generowanych przez spektrometr masowy [86]. Wynikiem pomiaru spektrometrycznego jest widmo mas prezentowane graficznie w postaci wykresu liczby zanotowanych jonów o danych wartościach m/z [71]. Współczesne spektrometry masowe zintegrowane są z programami komputerowymi umożliwiającymi dopasowanie odpowiednich widm masowych do znanych sekwencji białek, które są ogólnie dostępne w międzynarodowych bazach danych, takich jak PRIDE czy UniProt. Bazy danych są na bieżąco aktualizowane i można w nich znaleźć informacje dotyczące aktywności białek, ich struktury przestrzennej, funkcji czy aktywności enzymatycznej. Nowoczesne oprogramowania proteomiczne (np. MASCOT, SEQUEST, X!Tandem) umożliwiają wiarygodną oraz kompleksową identyfikację jakościową i ilościową białek w materiale klinicznym [51].

ANALIZA PŁYNÓW USTROJOWYCH I WYDZIELIN

Proteomika kliniczna dysponuje narzędziami umożliwiającymi identyfikację biomarkerów białkowych z materiału klinicznego w postaci płynów ustrojowych i innych wydzielin, a także fragmentów tkanek uzyskanych w wyniku resekcji lub biopsji guza. Płyny ustrojowe znajdujące się w otoczeniu tkanek czy narządów zawierają białka sekrecyjne charakterystyczne dla danego typu tkanki, dlatego uważa się, że ich profil białkowy może odzwierciedlać stan fizjologiczny organizmu [19,30]. Niewątpliwie łatwy do uzyskania materiał kliniczny w postaci surowicy, osocza, moczu czy śliny, jest cennym źródłem metabolitów, białek oraz genetycznych biomarkerów chorób nowotworowych [18].

Surowica i osocze

Krew jest cennym źródłem informacji na temat zmian w poziomie ekspresji białek, które zachodzą pod wpływem procesów patologicznych [65]. Surowica i osocze to najlepsze do identyfikacji biomarkerów płyny ustrojowe ze względu na dostępność, łatwość w pozyskiwaniu i przechowywaniu próbek [6,75].

Krew jest szczególnie pożądanym materiałem badawczym z punktu widzenia onkoproteomiki. Na podstawie analizy porównawczej profili białkowych krwi uzyskanej od osób chorych i zdrowych możliwe będzie opracowanie paneli

biomarkerów, pozwalających określić rodzaj i stopień zaawansowania nowotworu. Markery białkowe będą miały także zastosowanie w badaniach przesiewowych populacji. Wyszczególnione wyżej założenia stały się podstawą ogólnowiatowego projektu „Plasma proteome project” realizowanego przez naukowców zrzeszonych w organizacji HUPO (Human Proteome Organization).

Jednak kompleksowe badanie składu białkowego osocza jest jeszcze dużym wyzwaniem dla proteomiki. Stężenie zaledwie 22 białek, to aż 99% masy całego proteomu, ponadto zakres stężeń białek osocza zawiera się w granicach od pg/mL w przypadku cytokin, aż do mg/ml dla albuminy i immunoglobulin (podczas gdy przeciętny zakres detekcji (dynamic range of detection) dla LC/MS wynosi 4-5 rzędów wielkości) [4,5]. Poszukiwanie markerów nowotworowych w osoczu koncentruje się głównie na białkach występujących w stężeniach rzędu ng i pg, dlatego zanim możliwa stanie się identyfikacja pojedynczych biomarkerów z materiału klinicznego za pomocą spektrometrii masowej, konieczny jest rozwój technik, które pozwolą na oczyszczenie próbki z wysoce i średnio reprezentowanych białek oraz umożliwią jej wydajne wstępne frakcjonowanie [22,76].

Mimo przytoczonych wyżej ograniczeń podejmowane są próby analizy profili białkowych krwi pacjentów z rozpoznaną chorobą nowotworową. Zhang i Chen poszukując markerów charakterystycznych dla poszczególnych podtypów raka gruczołu piersiowego, przeprowadzili analizy proteomiczne osocza 80 pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu piersiowego [98].

Rak gruczołu piersiowego występuje w pięciu molekularnych podtypach (luminalny A, luminalny B, HER2, bazaloidalny oraz podtyp z ekspresją genów typowych dla komórek prawidłowego gruczołu piersiowego) wykazujących różnice w klinicznym przebiegu choroby [20]. Dotychczas nie było możliwości określenia podtypu raka gruczołu piersiowego na podstawie różnic w profilach białkowych krwi pacjentek. Wyniki uzyskane przez Zhanga i Chena wskazują, że każdy z analizowanych podtypów raka różni się profilem białkowym surowicy znacznie bardziej niż to wynika z analizy molekularnej. Badanie skupień (cluster analysis) wykazało duże podobieństwo proteomiczne między podtypem luminalnym A i luminalnym B oraz podtypami HER2 i bazaloidalnym. Jednocześnie zauważono, że piąty podtyp z ekspresją genów typowych dla komórek prawidłowego gruczołu piersiowego najslabiej koreluje z pozostałymi podtypami raka. Autorzy podkreślają, że ocena poziomu ekspresji w surowicy, nie tyle pojedynczych białek, co całych szlaków sygnałowych oraz analiza interakcji między określonymi szlakami, pozwoli na nieinwazyjne różnicowanie podtypów raka piersi.

Zastosowania spektrometrii masowej w badaniach nad rakiem skupiają się zazwyczaj na identyfikacji nowych biomarkerów umożliwiających wczesną diagnostykę, czy różnicowanie nowotworów pod względem inwazyjności i stopnia zaawansowania [24]. Li i wsp. analizując profil białkowy kostniakomięsaków (osteosarcoma), poszukiwali

przyczyny występowania zjawiska oporności tego nowotworu na chemioterapię [45]. Celem badań było również wyselekcjonowanie pacjentów obarczonych wysokim ryzykiem wystąpienia przerzutów. Próba identyfikacji białek związanych z chemioopornością, czyli potencjalnych markerów prognostycznych, jak i nowych punktów uchwytu leków została przeprowadzona w grupie 27 pacjentów ze zdiagnozowanym kostniakomięsakiem. Na podstawie analizy próbek osocza uzyskanych przed i po chemioterapii, zidentyfikowano dwa białka: transtyretynę i surowiczą albuminę A, których zmienne stężenie może być podstawą do opracowania prostego testu laboratoryjnego określającego przewidywaną odpowiedź na terapię. Ponieważ oba zidentyfikowane białka są zaangażowane w proces wrodzonej oporności, autorzy rozważają opracowanie nowej strategii leczenia kostniakomięsaka opartej na chemioterapii zintegrowanej ze stymulacją układu immunologicznego pacjenta [45].

Płyn mózgowo-rdzeniowy

Płyn mózgowo-rdzeniowy (CSF) jest ważnym źródłem biomarkerów, ponieważ stwarza szansę oceny stanu zdrowia pacjenta bez konieczności wykonania trepanacji czaszki. Skład białkowy CSF cechuje o wiele niższa niż we krwi zawartość białek, dlatego można łatwiej badać zmiany w ekspresji potencjalnych markerów, wywołane procesami patologicznymi. Analiza składu białkowego płynu mózgowo-rdzeniowego z wykorzystaniem spektroskopii masowej znajduje zastosowanie w badaniach nad etiopatogenezą chorób neurodegeneracyjnych [83], stwardnienia rozsianego [61], autyzmu [2] i innych schorzeń ośrodkowego układu nerwowego. Jednak nadal niewiele wiadomo na temat zmian w profilu białkowym CSF, które są wynikiem występowania rozrostu nowotworowego w obrębie mózgu.

Wynikiem prac prowadzonych przez Rajagopala i wsp. była identyfikacja syntazy prostaglandyny D2 jako obiecującego biomarkera rdzeniaka zarodkowego (medulloblastoma), będącego najczęstszym nowotworem złośliwym ośrodkowego układu nerwowego u dzieci [64]. Próbkę płynu mózgowo-rdzeniowego (od 33 pacjentów z rozpoznaną chorobą nowotworową oraz 25 próbek kontrolnych) poddano analizie proteomicznej opartej na elektroforezie dwukierunkowej i tandemowej spektrometrii masowej. Wykazano sześciokrotnie obniżony poziom ekspresji syntazy prostaglandyny D2 we wszystkich próbkach pochodzących od dzieci z rdzeniakiem zarodkowym w porównaniu z próbkami uzyskanymi od dzieci zdrowych. Autorzy zalecają monitorowanie stężenia syntazy prostaglandyny D2 u pacjentów z rdzeniakiem zarodkowym do oceny skuteczności zastosowanej terapii [64].

W innym badaniu Desiderio i wsp. przeprowadzili analizę składu białkowego płynu mózgowo-rdzeniowego u 14 dzieci ze zdiagnozowanym nowotworem umiejscowionym w tylnej jamie czaszki [17]. Próbkę do badań pobierano dzień przed i 6 dni po zabiegu resekcji guza. Wykazano duże różnice w składzie białkowym płynu mózgowo-rdzeniowego otrzymanego przed i po operacji. Autorzy

zasugerowali, że obecność guza prawdopodobnie hamowała ekspresję licznych białek, co znalazło potwierdzenie w składzie proteomu płynu mózgowo-rdzeniowego. Zauważono również, że obecność guza hamuje ekspresję peptydów LVV- i VV-hemorfiny 7. W płynie mózgowo-rdzeniowym pobranym przed zabiegiem chirurgicznym od 12 pacjentów nie wykryto wymienionych peptydów, były one natomiast obecne w próbkach pooperacyjnych i kontrolnych. Określenie stężenia LVV- i VV-hemorfiny 7 w płynie mózgowo-rdzeniowym u dzieci po przebytej resekcji guza tylnej jamy czaszki może znaleźć zastosowanie kliniczne jako wyznacznik całkowitego usunięcia guza. Monitorowanie obecności LVV- i VV-hemorfiny 7 u pacjentów stwarza dodatkowo możliwość szybkiego wykrycia wznowy choroby bądź przerzutów, co przekłada się na podwyższenie efektywności terapii systemowej [17].

Ślina

Z próbek śliny w łatwy sposób można wyizolować białka, mRNA czy DNA, dlatego ślina jest jedną z najczęściej badanych wydzielin w celu poszukiwania nowych biomarkerów chorób nowotworowych [96,103]. Szczególnymi zaletami wykorzystania tego materiału z punktu widzenia proteomiki klinicznej jest zdecydowanie mniejsza złożoność składu białkowego śliny w porównaniu z krwią, co eliminuje konieczność stosowania czasochłonnych metod wstępnego frakcjonowania próbek. Do ewentualnego zastosowania w diagnostyce ważna jest możliwość pobierania dużej ilości materiału do analiz nieinwazyjnymi technikami oraz możliwość długoterminowego przechowywania próbek [69,92,97]. Uważa się, że ślina jest źródłem potencjalnych biomarkerów patologii jamy ustnej i gardła.

Rak jamy ustnej jest jednym z rzadziej występujących nowotworów u człowieka. Mimo znacznego postępu w chirurgii, radio- i chemioterapii, przeżywalność pięcioletnia u pacjentów kształtuje się na poziomie 50%. Szacuje się, że wczesne wykrycie zmian nowotworowych poparte odpowiednim leczeniem może spowodować wzrost przeżywalności wśród chorych do 80-90% [33]. Współczesna diagnostyka nie dysponuje jednak skuteczną metodą przesiewową umożliwiającą wczesne wykrycie raka jamy ustnej.

W 2008 r. Hu i wsp. scharakteryzowali zmiany występujące w proteomie śliny u szesnastu pacjentów z rozpoznaniem rakiem płaskonabłonkowym, u których nie wdrożono wcześniej leczenia systemowego [31]. Badacze zidentyfikowali 461 białek w ślinie osób chorych i 438 w ślinie zdrowych ochotników. Większość białek (409) znalazło się w obu typach próbek, wykazano jednak znaczące różnice w poziomie ich ekspresji. W próbkach pacjentów obecne były białka, takie jak antygen 2 raka płaskonabłonkowego, kalcyklina, HSP-70, aneksyna I, katepsyna G, peroksyredoksyna II czy tioredoksyna oraz wiele niezidentyfikowanych wcześniej potencjalnych biomarkerów raka płaskonabłonkowego. Badanie to wskazuje, że charakterystyka proteomu śliny może wpłynąć w przyszłości na rozwój narzędzi diagnostycznych przydatnych we wczesnym wykrywaniu raka jamy ustnej.

Analiza składu białkowego śliny przeprowadzona przez Jou i wsp. u 41 pacjentów z rozpoznany rakiem płaskonabłonkowym i próbek uzyskanych od zdrowych ochotników wykazała wzmożoną ekspresję transferyny w próbkach nowotworowych [33]. Wyniki zostały jednocześnie potwierdzone niezależnymi technikami ELISA i Western blot. Autorzy podkreślają ponadto silną korelację między wzrostem stężenia ślinowej transferyny, a rozmiarem i stopniem zaawansowania nowotworu, sugerując przydatność tego markera w ocenie stopnia progresji choroby.

Ślina może znaleźć zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu raka płuc i żołądka [11,97]. Analiza proteomu próbek śliny pochodzących od 72 pacjentów z rakiem płuc dowiodła, że skład białkowy śliny zmienia się pod wpływem transformacji nowotworowej zachodzącej w płucach [93]. Zidentyfikowano liczne białka wykazujące nadekspresję, z których haptoglobina hp2, aneksyna A1 i α -2 glikoproteina cynkowa zostały wytypowane jako potencjalne biomarkery raka płuc. Badacze zaprojektowali test diagnostyczny opierający się na ocenie stężenia wymienionych wyżej białek w ślinie, który pozwala odróżnić próbki śliny pacjentów z rakiem płuc od śliny osób zdrowych z dużą czułością i swoistością (odpowiednio 88,5 i 92,3%). Wspomniany test jest obecnie w fazie testów klinicznych i może znaleźć komercyjnie zastosowanie w diagnostyce nowotworów jamy ustnej.

Wydzielina stercza

Badania przesiewowe w kierunku raka gruczołu sterczowego są oparte na ocenie poziomu swoistego antygenu sterczowego (PSA) w osoczu krwi. Duże stężenie tego markera u pacjenta oraz badania obrazowe nie umożliwiają różnicowania łagodnej postaci nowotworu od agresywnej. Dopiero badanie histopatologiczne tkanek uzyskanych w wyniku biopsji bądź prostatektomii umożliwia postawienie właściwej diagnozy i podjęcie odpowiedniego leczenia [8]. Najnowsze doniesienia literaturowe wskazują, że wydzielina stercza jest cennym źródłem biomarkerów raka stercza [63,101]. W proteomicznych badaniach nad rakiem gruczołu sterczowego zaleca się wykorzystywanie jego wydzieliny zamiast próbek moczu czy nasienia, ponieważ występują w niej znacznie wyższe stężenie białek charakterystycznych dla gruczołu sterczowego [18].

Przeprowadzone w 2010 r. pilotażowe badania proteomu wydzieliny ze stercza z zastosowaniem spektrometrii masowej pozwoliły zidentyfikować 916 białek w dziewięciu próbkach pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem [18]. Wykazano, że 25% wszystkich białek proteomu to białka występujące w dużych stężeniach (high abundance protein), takie jak laktoferyna, PSA, aminopeptydaza N, poza tym w wydzielinie obecne były także liczne białka błonowe. Ten sam zespół naukowców zidentyfikował następnie 133 białka o zmienionej ekspresji w raku stercza z rozpoznany zewnątrztrętorkowym wzrostem guza w stosunku do raka ograniczonego do samego gruczołu [40]. Spośród tych białek wytypowano panel 14 potencjalnych biomarkerów o znacząco podwyższonej ekspresji w zaawansowanej posta-

ci raka (m.in. PSA, Psap, PARK7, transglutaminaza gruczołu oraz inhibitory metaloproteinaz, których rola w progresji raka tego gruczołu nie została do tej pory udokumentowana). Przyjmuje się, że zidentyfikowane białka umożliwią ocenę ryzyka progresji choroby oraz pomogą w doborze właściwego leczenia.

W najnowszych doniesieniach postuluje się, że źródłem nowych biomarkerów przydatnych klinicznie we wczesnej diagnostyce nabłonkowych nowotworów jajnika może być również płyn pobrany z torbieli jajnika [42]. Pomiary spektrometryczne przeprowadzone w grupie 192 kobiet ze zdiagnozowanymi łagodnymi (129 pacjentek) i złośliwymi (63 pacjentki) zmianami nowotworowymi jajnika pozwoliły zidentyfikować apoliproteinę C-III. Marker ten wykazywał znacząco wyższą ekspresję u pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem złośliwym [42]. Wyniki przedstawionych badań dowodzą jednoznacznie, że techniki proteomiczne mają szansę zmienić diagnostykę onkologiczną, umożliwiając jednocześnie wykrycie choroby w początkowym stadium rozwoju.

ANALIZA TKANEK

Poszukiwanie biomarkerów charakterystycznych dla konkretnego typu nowotworu wymaga kompleksowej analizy jak największej liczby próbek. Materiał tkankowy, oprócz płynów ustrojowych i komórek, stanowi nieocenione źródło informacji na temat proteomu osób zdrowych i chorych. Niewątpliwą zaletą wykorzystania materiału tkankowego w badaniach proteomicznych jest możliwość śledzenia zmian *in situ* - analiza patologicznie zmienionych tkanek i ich bezpośredniego otoczenia najlepiej obrazuje wiele zmian na poziomie białek jakie zachodzą podczas procesu nowotworzenia, progresji nowotworu i przerzutowania [62].

Do analizy profilu białkowego za pomocą spektrometrii masowej wykorzystane mogą być tkanki świeże, mrożone lub utrwalone.

Proces utrwalania tkanek w formalinie i zatapiania w parafinie jest rutynową procedurą przygotowania materiału klinicznego do badania histopatologicznego. W każdym zakładzie patomorfologii znajdują się więc tysiące utrwalonych preparatów, które mogą zostać wykorzystane do analiz proteomicznych, co jednocześnie eliminuje problem ograniczonej dostępności świeżego materiału do badań. Archiwalne tkanki i informacje kliniczne o pacjentach, od których zostały pobrane, pozwalają obserwować zmiany w proteomie tkanki na każdym etapie zaawansowania choroby, a także umożliwiają ocenę zmian będących następstwem podjętego leczenia.

W ciągu ostatnich lat wielokrotnie sugerowano, że utrwalone tkanki archiwalne mogą znaleźć zastosowanie w proteomice klinicznej, mimo nieodwracalnych zmian w ich strukturze powstałych na skutek reakcji krzyżowych zachodzących między białkami pod wpływem formaliny [26,77]. Obecnie wiadomo, że liczba zidentyfikowanych białek za pomocą spektroskopii masowej w materiale świeżym, mro-

żonym i utrwalonym jest identyczna, pod warunkiem, że próbki do analiz proteomicznych zostaną przygotowane zgodnie z protokołem uwzględniającym specyfikę danej tkanki [57,88,89]. Metodą pozwalającą na wykorzystanie archiwalnych tkanek w spektrometrii masowej jest technika FFPE-FASP oparta na zastosowaniu mikrofiltrów [89,90]. Po całkowitym usunięciu z tkanki parafiny i ponownym jej nawodnieniu, materiał zostaje poddany lizie w temperaturze 100 °C. Następnie lizat zostaje skutecznie oczyszczony dzięki zastosowaniu filtrów z mikroporami, a białka są poddawane procesowi trawienia enzymatycznego. Otrzymany roztwór peptydów jest wolny od detergentów, zanieczyszczeń i innych czynników uniemożliwiających przeprowadzenie analizy spektrometrycznej [49,91]. Zaletą omawianej techniki z punktu widzenia rutynowej diagnostyki jest możliwość wykorzystania niewielkiej ilości materiału biopsyjnego. Informację na temat składu białkowego badanej próbki można uzyskać już ze 100 nL wyjściowego lizatu tkankowego [87].

Istotnym aspektem analizy proteomu tkanek, który może znacznie zaburzać wyniki badań jest duża heterogenność guzów. Oprócz komórek nowotworowych, utkanie guza zawiera liczne subpopulacje komórek, m.in. komórki nabłonkowe, fibroblasty, limfocyty, czy komórki śródbłonna. Wykorzystywana w badaniu tkanek technika mikrodysekcji laserowej gwarantuje otrzymanie jednorodnych próbek zawierających ściśle określoną ilość materiału do analiz.

Wiśniewski i wsp. bazując na archiwalnym materiale tkankowym, analizowali zmiany w składzie proteomu cew gruczołowych gruczolakoraka jelita grubego oraz jego przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych w porównaniu z prawidłowym nabłonkiem jelita grubego [88]. Technika tandemowej spektrometrii masowej umożliwiła identyfikację ponad 8000 białek w próbkach pochodzących od 8 pacjentów. Analiza porównawcza proteomu tkanek nowotworowych i niezmiennego patologicznie nabłonka jelita grubego wykazała istotne statystycznie różnice w ekspresji 1808 białek. Zaobserwowano znacząco obniżony poziom ekspresji białek sekrecyjnych i błonowych w próbkach nowotworowych w porównaniu z prawidłowym nabłonkiem jelita grubego. W tym samym czasie liczne białka jądrowe, takie jak czynniki transkrypcyjne, histony czy białka regulatorowe były istotnie nadekspresjonowane w próbkach nowotworowych. Ponadto wykazano, że profile białkowe raka i jego przerzutu do węzłów chłonnych są w 99% zgodne. Pozwala to wnioskować, że proces rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych do węzłów chłonnych, wbrew dotychczasowym poglądom, nie wymaga radykalnych zmian w składzie białkowym komórki. Przytoczony przykład wskazuje olbrzymi potencjał proteomiki do jednoczesnego określania poziomu ekspresji wielu tysięcy białek [88].

BADANIE PROTEOMU LINII KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Badania prowadzone na liniach nowotworowych w warunkach laboratoryjnych, nie odzwierciedlają stanu *in vivo*, mimo to są cennym źródłem informacji na temat mechanizmów patologicznych zachodzących w komórkach na poziomie molekularnym.

Doświadczenia z wykorzystaniem linii komórkowych mają powszechnie znane ograniczenia. Zmienność warunków hodowli, na którą wpływ mogą mieć liczne czynniki zewnętrzne powoduje niestabilność komórek i w konsekwencji krótki czas przeżywania. W przypadku wykorzystania w badaniach hodowli linii ciągłych, problemem jest zaburzenie procesów sygnalizacji czy różnicowania komórek. Jednak współczesna onkoproteomika czerpie istotne informacje z badań na komórkach umożliwiając zrozumienie patogenyzy procesów nowotworowych [76]. Zalety wykorzystywania linii komórkowych w badaniach nad biologią nowotworów to przede wszystkim sposobność nieograniczonego eksperymentalnego manipulowania komórkami i szybkiej oceny wpływu danych czynników fizycznych i chemicznych na ich profil białkowy. Dodatkowym atutem jest możliwość analizowania kaskad sygnałowych indukujących zmiany w komórce prowadzące do jej różnicowania, podziału czy programowanej śmierci [25].

Współczesne metody chemioterapeutyczne są oparte na wiedzy dotyczącej przekazywania sygnałów w komórkach, dlatego zadaniem onkoproteomiki jest śledzenie zmian w profilu białkowym linii nowotworowych w odpowiedzi na zastosowaną terapię. Jednymi z cytostatyków nowej generacji, działającymi selektywnie na wybrane typy nowotworów, są inhibitory deacetylaz histonów (HDCA inhibitors), które zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* hamują proliferację i wzrost komórek nowotworowych oraz indukują apoptozę [72,100]. Liczne inhibitory deacetylaz histonów są obecnie testowane w badaniach klinicznych, a białka regulowane przez nie są potencjalnym celem terapeutycznym. Zho i wsp. analizowali zmiany w proteomie linii komórkowej raka piersi MDA-MB-231 indukowane związkiem o nazwie Vorinostat (SAHA) [102]. W badaniach zastosowali metodę SILAC, polegającą na zastąpieniu w próbce badanej wybranych aminokwasów w medium hodowlanym aminokwasami wyznakowanymi stabilnymi izotopami, które zostają następnie wbudowane w białka komórek [56]. Wyniki doświadczenia wykazały, że Vorinostat indukuje acetylację reszt lizyny w 61 białkach linii MDA-MB-231. Acetylacja, jako jedna z modyfikacji posttranslacyjnych białek, ma wpływ na ich stabilność, aktywność transkrypcyjną oraz docelową lokalizację w komórce [43]. Liczne białka modyfikowane w procesie acetylacji to produkty onkogenów lub genów supresorowych zaangażowane bezpośrednio w procesy onkogenezy, progresji nowotworowej i przerzutowania [70]. Wśród zidentyfikowanych białek wyróżnić można nie tylko białka zaangażowane w utrzymanie prawidłowej struktury chromatyny, ale też czynniki transkrypcyjne, chaperony, białka regulatorowe i strukturalne oraz enzymy glikolityczne, które dotychczas nie były klasyfikowane jako białka podlegające acetylacji [56]. Jednoczesna analiza wszystkich modyfikowanych posttranslacyjnie białek w wybranych liniach komórkowych, możliwa dzięki zastosowaniu metod proteomicznych, stwarza szansę na pogłębienie wiedzy na temat molekularnych podstaw procesu onkogenezy.

Białka sekrecyjne, takie jak czynniki wzrostu, czynniki ruchliwości komórek (cell motility factors) czy białka ma-

cierzy zewnątrzkomórkowej, odgrywają istotną rolę m.in. w regulacji sygnalizacji komórkowej oraz w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej. W przypadku komórek nowotworowych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej mogą być wydzielane również niektóre białka błonowe i wewnątrzkomórkowe, wpływając jednocześnie na różnicowanie komórek, przerzutowanie, angiogenezę oraz interakcje typu komórka-komórka czy komórka-środowisko zewnętrzne [34].

Rozwój metod proteomicznych opartych na spektrometrii masowej jaki się dokonał w ostatnich latach, wpłynął w znacznym stopniu na postęp w badaniu sekretomów (sekretom to zestaw białek sekrecyjnych wybranych linii komórkowych) [59]. Aby zgłębić mechanizmy procesów patologicznych, poddaje się kompleksowej analizie proteomicznej wszystkie białka uwolnione do pożywki przez komórki danej linii nowotworowej w ściśle kontrolowanych warunkach hodowlanych.

Białka sekrecyjne są szczególnie przydatne w diagnostyce, ponieważ mogą przenikać do krwi obwodowej i być wykrywane chociażby za pomocą tradycyjnych metod z wykorzystaniem swoistych przeciwciał. Badania sekretomów pozwalają ominąć istotny problem dużej złożoności próbki, występujący w badaniach płynów fizjologicznych [34].

Eksperymenty na komórkach, ze względu na dużą dostępność materiału, umożliwiają badanie na szeroką skalę białek zmodyfikowanych potranslacyjnie. Nieprawidłowości w procesach fosforylacji, glikozylacji czy acetylacji pełnią niewątpliwie istotną rolę w patogenezie chorób nowotworowych. Boersema i wsp. scharakteryzowali znaczące zmiany w ekspresji N-glikozylowanych białek sekretomu i białek błonowych w 11 liniach komórkowych wyizolowanych z guzów złośliwych piersi. Linie komórkowe dobrano do doświadczenia tak, aby oddawały różne stadia zaawansowania nowotworu [9]. Następnie za pomocą techniki super-SILAC mix scharakteryzowano profil białkowy osocza dwóch pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu piersiowego. Obecność licznych białek N-glikozylowanych, wykrytych w badaniach sekretomów linii komórkowych raka piersi, potwierdzono także w próbkach krwi pacjentek (np. tetraspanina 30, CD44, semaforina 4, pleksyny B1, B2 i D1, neuropilina). Świadczy to o tym, że białka sekrecyjne, potencjalnie istotne klinicznie, są obecne we krwi na poziomie wykrywalnym czułymi metodami z wykorzystaniem przeciwciał. Autorzy sugerują jakoby połączenie techniki ilościowego oznaczania sekretomu linii komórek nowotworowych z charakterystyką białek osocza chorego było efektywnym sposobem poszukiwania przydatnych klinicznie markerów nowotworowych.

WALIDACJA

Spektrometryczna analiza porównawcza materiału klinicznego uzyskanego od osób chorych i zdrowych wskazuje na zróżnicowaną ekspresję wielu białek. Mimo to jedynie nieliczne markery mogą przejść pozytywnie czasochłonny

i bardzo kosztowny etap walidacji klinicznej [16]. Proces walidacji biomarkerów wymaga przede wszystkim restrykcyjnej selekcji odpowiednio dużej liczby próbek wraz z informacjami klinicznymi pacjentów. Często brakuje historii przebiegu choroby w sytuacji, kiedy pacjent diagnozowany jest w jednym ośrodku, a leczenie odbywa się w innym. W przypadku badań walidacyjnych z wykorzystaniem krwi pochodzącej z banku krwi nie ma stuprocentowej pewności, że krew uznawana za kontrolną pochodzi od osoby zdrowej.

Niemniej jednak konieczne jest potwierdzenie danych wygenerowanych przez spektrometr masowy za pomocą niezależnych technik, takich jak immunohistochemia, ELISA, ilościowy Western blot czy cytometria przepływowa [76]. Metody, w których wykorzystuje się przeciwciała mają ograniczenia. Jednym z nich jest mała swoistość niektórych dostępnych na rynku przeciwciał. Inne przeciwciała nie są dostępne komercyjnie, wówczas konieczne jest przeprowadzenie długotrwałego procesu immunizacji, którego wyniki są często niezadowalające. Bazując na przeciwciałach często niemożliwe jest różnicowanie izoform białek homologicznych.

Stosowane powszechnie metody walidacyjne są czasochłonne i bardzo kosztowne, a wyniki w znacznym stopniu uzależnione są od doświadczenia wykonującego oznaczenia. Szansą na zrewolucjonizowanie procesu walidacyjnego jest opracowanie jednego zautomatyzowanego systemu walidacyjnego o dużej przepustowości, który będzie obowiązywał we wszystkich ośrodkach naukowych. Do realizacji tej idei zmierza projekt Human Protein Atlas, w ramach którego za pomocą różnych technik jest badana ekspresja tysięcy białek w zdrowych i patologicznie zmienionych tkankach oraz liniach komórkowych [78].

Alternatywą dla metod walidacyjnych opartych na przeciwciałach jest spektrometryczna technika monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (MRM), pozwalająca precyzyjnie potwierdzić obecność danego białka czy peptydu w próbce [60]. MRM umożliwia także wiarygodne oznaczanie izoform wybranych białek. Metoda ta była już z sukcesem stosowana do weryfikacji obecności wybranych antygenów w surowicy [46], dlatego przyjmuje się, że może znaleźć zastosowanie w pierwszym etapie walidacji klinicznej biomarkerów nowotworowych [16].

PODSUMOWANIE

Jeszcze do niedawna próby identyfikacji białkowych markerów chorób nowotworowych koncentrowały się na wyodrębnieniu pojedynczych białek o zmienionej ekspresji w stanie patologicznym. Biomarkery te były mało swoiste dla danego typu nowotworu i rzadko znajdowały zastosowanie w praktyce klinicznej [10]. Onkoproteomika oparta na spektrometrii masowej jest dyscypliną naukową pozwalającą na całościową analizę profilu białkowego pacjenta na każdym etapie zaawansowania choroby nowotworowej [16]. Zakłada się, iż rozwój onkoproteomiki umożliwi szybką i skuteczną diagnostykę oraz dobór spersonalizowanych

Tabela 1. Wykaz potencjalnych biomarkerów białkowych w wybranych typach nowotworów złośliwych

Typ nowotworu [rak]	Białko	Zmiany w ekspresji	Materiał badawczy	Źródło
Płuc	ANXA1	nadekspresja	ślina	[93]
Jajnika	ApoC-III	nadekspresja	płyn z cyst jajnika	[43]
Płuc	AZGP1	nadekspresja	ślina	[93]
Jelita grubego	CacyBP	nadekspresja	linia komórkowa	[27]
Gruzołu krokowego	COMP	nadekspresja	tkanka mrożona	[14]
Gruzołu krokowego	CTSK	obniżona ekspresja	tkanka mrożona	[14]
Wątrobowokomórkowy	Cytb5A	obniżona ekspresja	tkanka świeża	[38]
Jelita grubego	DPEP1	nadekspresja	tkanka utrwalona	[87]
Jelita grubego	GDF15	nadekspresja	surowica	[94]
Jelita grubego	GPCR5A	nadekspresja	tkanka utrwalona	[87]
Płuc	HP	nadekspresja	ślina	[93]
Gruzołu krokowego	OSF2	nadekspresja	tkanka mrożona	[14]
Gruzołu krokowego	PARK7	nadekspresja	wydzielina stercza	[40]
Pęcherza moczowego	ProEGF	obniżona ekspresja	mocz	[14]
Jelita grubego	RAI3	nadekspresja	tkanka utrwalona	[87]
Pęcherza moczowego	SAA4	nadekspresja	mocz	[13]
Jelita grubego	STOML2	nadekspresja	tkanka mrożona	[29]
Jelita grubego	TGM2	nadekspresja	surowica	[94]

metod terapeutycznych, a przez to wpłynie na obniżenie śmiertelności w wyniku choroby nowotworowej.

Jak każda nowa metoda, z którą wiąże się nadzieje na zrewolucjonizowanie współczesnej medycyny, również i onkoproteomika ma swoje ograniczenia.

Biorąc pod uwagę różnorodność materiału znajdującego zastosowanie w badaniach proteomicznych (płyny i wydzieliny ustrojowe, tkanki mrożone i utrwalone, linie komórkowe), konieczne jest opracowanie technik, które umożliwią bardziej efektywny rozdział białek oraz wiarygodną analizę ilościową próbek klinicznych.

Duża zmienność otrzymywanych wyników między ośrodkami badawczymi, stwarza konieczność opracowania standaryzowanych protokołów. Procedury te powinny obowiązywać na każdym etapie analizy proteomicznej (od pobrania materiału klinicznego do badań, przez przechowywanie i przygotowanie próbek, pomiary, opracowanie algorytmów niezbędnych do analizy danych aż po wiarygodną walidację zidentyfikowanych białek).

Słabym punktem badań onkoproteomicznych jest pomijanie różnic w profilach białkowych próbek pochodzących od różnych pacjentów. Różnice te są najczęściej skutkiem zmienności osobniczej, występującej niezależnie od stanu zdrowia pacjenta. Zmienność taką należy uwzględnić

w obliczeniach przez określenie stosunku ilości badanego białka między próbkami należącymi do tej samej grupy [64]. Należy podkreślić konieczność zachowania surowych kryteriów selekcji potencjalnych biomarkerów spośród setek tysięcy danych generowanych w wyniku opracowań bioinformatycznych [68]. Innym wyzwaniem dla proteomiki klinicznej jest badanie białek podlegających modyfikacjom potranslacyjnym, białek hydrofobowych oraz białek, które występują w komórce w stężeniu rzędu pikogramów. Potrzebny jest dalszy rozwój narzędzi analitycznych i metodologii przygotowania próbek, by w przyszłości możliwa była ich coraz dokładniejsza charakterystyka ilościowa i jakościowa. Rozwiązanie wymienionych problemów ugruntuje znaczenie onkoproteomiki jako mało inwazyjnej, szybkiej i wiarygodnej metody diagnostycznej.

Pozostaje do odpowiedzi pytanie, czy onkoproteomika sprostą oczekiwaniom niektórych entuzjastów badań nad białkami i umożliwi poznanie biologii nowotworów. Nie należy ulegać złudnemu wrażeniu, że sama informacja na temat składu białkowego guza pozwoli scharakteryzować wszystkie procesy leżące u podłoża transformacji nowotworowej. Jedynie translacja najnowszych osiągnięć z dziedziny proteomiki, genetyki i metabolomiki stwarza szansę na dogłębne poznanie mechanizmów nowotworzenia, a co za tym idzie, oczekiwany przełom w medycynie i farmacji.

PÍSMIENICTWO

- [1] Aebersold R., Mann M.: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003; 422: 198-207
- [2] Al-Ayadhi L., Halepoto D.M.: Role of proteomics in the discovery of autism biomarkers. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.*, 2013; 23: 137-143
- [3] Altelaar A.F., Munoz J., Heck A.J.: Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat. Rev. Genet.*, 2013; 14: 35-48
- [4] Anderson N.L., Anderson N.G.: The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics*, 2002; 1: 845-867
- [5] Angel T.E., Aryal U.K., Hengel S.M., Baker E.S., Kelly R.T., Robinson E.W., Smith R.D.: Mass spectrometry based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chem. Soc. Rev.*, 2012; 41: 3912-3928
- [6] Apweiler R., Aslanidis C., Deufel T., Gerstner A., Hansen J., Hochstrasser D., Kellner R., Kubicek M., Lottspeich F., Maser E., Mewes H.W., Meyer H.E., Müllner S., Mutter W., Neumaier M.: i wsp.: Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in fluid proteomics. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2009; 47: 724-744
- [7] Bark S.J., Hook V.: The future of proteomic analysis in biological systems and molecular medicine. *Mol. Biosyst.*, 2007; 3: 14-17
- [8] Barry M.J.: Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2001; 344: 1373-1377
- [9] Boersema P.J., Geiger T., Wiśniewski J.R., Mann M.: Quantification of the N-glycosylated secretome by super-SILAC during breast cancer progression and in human blood samples. *Mol. Cell. Proteomics*, 2013; 12: 158-171
- [10] Byrum S.D., Washam C.L., Montgomery C.O., Tackett A.J., Suva L.J.: Proteomic technologies for the study of osteosarcoma. *Sarcoma*, 2012; 2012: 169416
- [11] Castagnola M., Cabras T., Vitali A., Sanna M.T., Messana I.: Biotechnological implications of the salivary proteome. *Trends Biotechnol.*, 2011; 29: 409-418
- [12] Chalmers M.J., Gaskell S.J.: Advances in mass spectrometry for proteome analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000; 11: 384-90
- [13] Chen C.L., Lin T.S., Tsai C.H., Wu C.C., Chung T., Chien K.Y., Wu M., Chang Y.S., Yu J.S., Chen Y.T.: Identification of potential bladder cancer markers in urine by abundant-protein depletion coupled with quantitative proteomics. *J. Proteomics*, 2013; 85: 28-43
- [14] Chen J., Xi J., Tian Y., Bova G.S., Zhang H.: Identification, prioritization, and evaluation of glycoproteins for aggressive prostate cancer using quantitative glycoproteomics and antibody-based assays on tissue specimens. *Proteomics*, 2013; 13: 2268-2277
- [15] Craven R.A., Cairns D.A., Zougman A., Harnden P., Selby P.J., Banks R.E.: Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded renal tissue samples by label-free MS: assessment of overall technical variability and the impact of block age. *Proteomics Clin. Appl.*, 2013; 7: 273-282
- [16] de Wit M., Fijneman R.J., Verheul H.M., Meijer G.A., Jimenez C.R.: Proteomics in colorectal cancer translational research: biomarker discovery for clinical applications. *Clin. Biochem.*, 2013; 46: 466-479
- [17] Desiderio C., D'Angelo L., Rossetti D.V., Iavarone F., Giardina B., Castagnola M., Massimi L., Tamburrini G., Di Rocco C.: Cerebrospinal fluid top-down proteomics evidenced the potential biomarker role of LVV- and VV-hemorphin-7 in posterior cranial fossa pediatric brain tumors. *Proteomics*, 2012; 12: 2158-2166
- [18] Drake R.R., Elschenbroich S., Lopez-Perez O., Kim Y., Ignatchenko V., Ignatchenko A., Nyalwidhe J.O., Basu G., Wilkins C.E., Gjurich B., Lance R.S., Semmes O.J., Medin J.A., Kislinger T.: In-depth proteomic analyses of direct expressed prostatic secretions. *J. Proteome Res.*, 2010; 9: 2109-2116
- [19] Drake R.R., White K.Y., Fuller T.W., Igwe E., Clements M.A., Nyalwidhe J.O., Given R.W., Lance R.S., Semmes O.J.: Clinical collection and protein properties of expressed prostatic secretions as a source for biomarkers of prostatic disease. *J. Proteomics*, 2009; 72: 907-917
- [20] Duda-Szymańska J., Sporny S.: Praktyczna wartość molekularnej klasyfikacji raków sutka. *Pol. Merkur. Lekarski*, 2011; 31: 5-8
- [21] Farrah T., Deutsch E.W., Hoopmann M.R., Hallows J.L., Sun Z., Huang C.Y., Moritz R.L.: The state of the human proteome in 2012 as viewed through PeptideAtlas. *J. Proteome Res.*, 2013; 12: 162-171
- [22] Farrah T., Deutsch E.W., Omenn G.S., Campbell D.S., Sun Z., Bletz J.A., Mallick P., Katz J.E., Malmström J., Ossola R., Watts J.D., Lin B., Zhang H., Moritz R.L., Aebersold R.: A high-confidence human plasma proteome reference set with estimated concentrations in PeptideAtlas. *Mol. Cell. Proteomics*, 2011; 10: M110.006353.
- [23] Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M.: Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989; 246: 64-71
- [24] Fletcher C.D., Unni K.K., Mertens F.: World health organization classification of tumours, pathology and genetics, tumours of soft tissue and bone, IARC Press, Lyon, 2002 259-285
- [25] Fung K.Y., Brierley G.V., Henderson S., Hoffmann P., McColl S.R., Lockett T., Head R., Cosgrove L.: Butyrate-induced apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells includes induction of a cell stress response. *J. Proteome Res.*, 2011; 10: 1860-1869
- [26] Gámez-Pozo A., Sánchez-Navarro I., Calvo E., Diaz E., Miguel-Martin M., López R., Agulló T., Camafeita E., Espinosa E., López J.A., Nistal M., Vara J.Á.: Protein phosphorylation analysis in archival clinical cancer samples by shotgun and targeted proteomics approaches. *Mol. Biosyst.*, 2011; 7: 2368-2374
- [27] Ghosh D., Yu H., Tan X.F., Lim T.K., Zubaidah R.M., Tan H.T., Chung M.C., Lin Q.: Identification of key players for colorectal cancer metastasis by iTRAQ quantitative proteomics profiling of isogenic SW480 and SW620 cell lines. *J. Proteome Res.*, 2011; 10: 4373-4387
- [28] Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R.: Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell Biol.*, 1999; 19: 1720-1730
- [29] Han C.L., Chen J.S., Chan E.C., Wu C.P., Yu K.H., Chen K.T., Tsou C.C., Tsai C.F., Chien C.W., Kuo Y.B., Lin P.Y., Yu J.S., Hsueh C., Chen M.C., Chan C.C., Chang Y.S., Chen Y.J.: An informatics-assisted label-free approach for personalized tissue membrane proteomics: case study on colorectal cancer. *Mol. Cell. Proteomics*, 2011; 10: M110.003087
- [30] Hanash S.M., Pitteri S.J., Faca V.M.: Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature*, 2008; 452: 571-579
- [31] Hu S., Arellano M., Boontheung P., Wang J., Zhou H., Jiang J., Elashoff D., Wei R., Loo J.A., Wong D.T.: Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 6246-6252
- [32] Hu Y., Malone J.P., Fagan A.M., Townsend R.R., Holtzman D.M.: Comparative proteomic analysis of intra- and interindividual variation in human cerebrospinal fluid. *Mol. Cell. Proteomics*, 2005; 4: 2000-2009
- [33] Jou Y.J., Lin C.D., Lai C.H., Chen C.H., Kao J.Y., Chen S.Y., Tsai M.H., Huang S.H., Lin C.W.: Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer. *Anal. Chim. Acta*, 2010; 681: 41-48
- [34] Karagiannis G.S., Pavlou M.P., Diamandis E.P.: Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Mol. Oncol.*, 2010; 4: 496-510
- [35] Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F.: Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, 1987; 78: 53-68

- [36] Kawai A., Kondo T., Suehara Y., Kikuta K., Hirohashi S.: Global protein-expression analysis of bone and soft tissue sarcomas. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2008; 466: 2099-2106
- [37] Kellie J.F., Tran J.C., Lee J.E., Ahlf D.R., Thomas H.M., Ntai I., Catherman A.D., Durbin K.R., Zamdborg L., Vellaichamy A., Thomas P.M., Kelleher N.L.: The emerging process of Top Down mass spectrometry for protein analysis: biomarkers, protein-therapeutics, and achieving high throughput. *Mol. Biosyst.*, 2010; 6: 1532-1539
- [38] Khan R., Zahid S., Wan Y.J., Forster J., Karim A.B., Nawabi A.M., Azhar A., Rahman M.A., Ahmed N.: Protein expression profiling of nuclear membrane protein reveals potential biomarker of human hepatocellular carcinoma. *Clin. Proteomics*, 2013; 10: 6
- [39] Kikuta K., Tochigi N., Saito S., Shimoda T., Morioka H., Toyama Y., Hosono A., Suehara Y., Beppu Y., Kawai A., Hirohashi S., Kondo T.: Peroxiredoxin 2 as a chemotherapy responsiveness biomarker candidate in osteosarcoma revealed by proteomics. *Proteomics Clin. Appl.*, 2010; 4: 560-567
- [40] Kim Y., Ignatchenko V., Yao C.Q., Kalatskaya I., Nyalwidhe J.O., Lance R.S., Gramolini A.O., Troyer D.A., Stein L.D., Boutros P.C., Medin J.A., Semmes O.J., Drake R.R., Kislinger T.: Identification of differentially expressed proteins in direct expressed prostatic secretions of men with organ-confined versus extracapsular prostate cancer. *Mol. Cell. Proteomics*, 2012; 11: 1870-1884
- [41] Krajowy rejestr nowotworów. <http://www.onkologia.org.pl/> (20.04.2013)
- [42] Kristjansdottir B., Partheen K., Fung E.T., Marcickiewicz J., Yip C., Brännström M., Sundfeldt K.: Ovarian cyst fluid is a rich proteome resource for detection of new tumor biomarkers. *Clin. Proteomics*, 2012; 9: 14
- [43] Kusio-Kobialka M., Wolanin K., Podrzywalow-Barznicka P., Sikora E., Skowronek K., McKenna S.L., Ghizzoni M., Dekker F.J., Piwocka K.: Increased acetylation of lysine 317/320 of p53 caused by BCR-ABL protects from cytoplasmic translocation of p53 and mitochondria-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Apoptosis*, 2012; 17: 950-963
- [44] Lemmon M.A., Schlessinger J.: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 2010; 141: 1117-1134
- [45] Li Y., Dang T.A., Shen J., Hicks J., Chintagumpala M., Lau C.C., Man T.K.: Plasma proteome predicts chemotherapy response in osteosarcoma patients. *Oncol. Rep.*, 2011; 25: 303-314
- [46] Liebler D.C., Zimmerman L.J.: Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry. *Biochemistry*, 2013; 52: 3797-3806
- [47] Lowenthal M.S., Liang Y., Phinney K.W., Stein S.E.: Quantitative bottom-up proteomics depends on digestion conditions. *Anal. Chem.*, 2014; 86: 551-558
- [48] Maes E., Broeckx V., Mertens I., Sagaert X., Prenen H., Landuyt B., Schoofs L.: Analysis of the formalin-fixed paraffin-embedded tissue proteome: pitfalls, challenges, and future perspectives. *Amino Acids*, 2013; 45: 205-218
- [49] Manza L.L., Stamer S.L., Ham A.J., Codreanu S.G., Liebler D.C.: Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. *Proteomics*, 2005; 5: 1742-1745
- [50] Martin C., Zhang Y.: The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005; 6: 838-849
- [51] Metzger J., Lippa P.B., Good D.M., Mischak H.: Adapting mass spectrometry-based platforms for clinical proteomics applications: The capillary electrophoresis coupled mass spectrometry paradigm. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2009; 46: 129-152
- [52] Mischak H., Delles C., Klein J., Schanstra J.P.: Urinary proteomics based on capillary electrophoresis-coupled mass spectrometry in kidney disease: discovery and validation of biomarkers, and clinical application. *Adv. Chronic Kidney Dis.*, 2010; 17: 493-506
- [53] Mischak H., Massy Z.A., Jankowski J.: Proteomics in uremia and renal disease. *Semin. Dial.*, 2009; 22: 409-416
- [54] M'Koma A.E., Blum D.L., Norris J.L., Koyama T., Billheimer D., Motley S., Ghiassi M., Ferdowsi N., Bhowmick I., Chang S.S., Fowke J.H., Caprioli R.M., Bhowmick N.A.: Detection of pre-neoplastic and neoplastic prostate disease by MALDI profiling of urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 353: 829-834
- [55] Narimatsu H., Sawaki H., Kuno A., Kaji H., Ito H., Ikehara Y.: A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics. *FEBS J.*, 2010; 277: 95-105
- [56] Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A., Mann M.: Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, 2002; 1: 376-386
- [57] Ostasiewicz P., Zielinska D.F., Mann M., Wiśniewski J.R.: Proteome, phosphoproteome, and N-glycoproteome are quantitatively preserved in formalin-fixed paraffin-embedded tissue and analyzable by high-resolution mass spectrometry. *J. Proteome Res.*, 2010; 9: 3688-3700
- [58] Palmblad M., Tiss A., Cramer R.: Mass spectrometry in clinical proteomics – from the present to the future. *Proteomics Clin. Appl.*, 2009; 3: 6-17
- [59] Pavlou M.P., Diamandis E.P.: The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers? *J. Proteomics*, 2010; 73: 1896-1906
- [60] Picotti P., Aebersold R.: Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat. Methods*, 2012; 9: 555-566
- [61] Pieragostino D., Del Boccio P., Di Ioia M., Pieroni L., Greco V., De Luca G., D'Aguanno S., Rossi C., Franciotta D., Centonze D., Sacchetta P., Di Ilio C., Lugaesi A., Urbani A.: Oxidative modifications of cerebral transthyretin are associated with multiple sclerosis. *Proteomics*, 2013; 13: 1002-1009
- [62] Pin E., Fredolini C., Petricoin E.F.^{3rd}: The role of proteomics in prostate cancer research: biomarker discovery and validation. *Clin. Biochem.*, 2013; 46: 524-538
- [63] Principe S., Kim Y., Fontana S., Ignatchenko V., Nyalwidhe J.O., Lance R.S., Troyer D.A., Alessandro R., Semmes O.J., Kislinger T., Drake R.R., Medin J.A.: Identification of prostate-enriched proteins by in-depth proteomic analyses of expressed prostatic secretions in urine. *J. Proteome Res.*, 2012; 11: 2386-2396
- [64] Rajagopal M.U., Hathout Y., MacDonald T.J., Kieran M.W., Gurusangan S., Blaney S.M., Phillips P., Packer R., Gordish-Dressman H., Rood B.R.: Proteomic profiling of cerebrospinal fluid identifies prostaglandin D2 synthase as a putative biomarker for pediatric medulloblastoma: A pediatric brain tumor consortium study. *Proteomics*, 2011; 11: 935-943
- [65] Sanchez-Carbayo M.: Antibody array-based technologies for cancer protein profiling and functional proteomic analyses using serum and tissue specimens. *Tumour Biol.*, 2010; 31: 103-112
- [66] Savino R., Paduano S., Preianò M., Terracciano R.: The proteomics big challenge for biomarkers and new drug-targets discovery. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012; 13: 13926-13948
- [67] Scott D., Aebersold R.H.: Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics*, 2003; 33 (Suppl. 3): 311-323
- [68] Silberring J., Ciborowski P.: Biomarker discovery and clinical proteomics. *Trends Analyt. Chem.*, 2010; 29: 128
- [69] Shah F.D., Begum R., Vajaria B.N., Patel K.R., Patel J.B., Shukla S.N., Patel P.S.: A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. *Indian J. Clin. Biochem.*, 2011; 26: 326-334
- [70] Singh B.N., Zhang G., Hwa Y.L., Li J., Dowdy S.C., Jiang S.W.: Non-histone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2010; 10: 935-954
- [71] Steen H., Mann M.: The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004; 5: 699-711

- [72] Stepulak A., Stryjecka-Zimmer M., Kupisz K., Polberg K.: Inhibitory deacetylaz histonów jako potencjalne cytostatyki nowej generacji. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 68-74
- [73] Suehara Y., Kubota D., Kikuta K., Kaneko K., Kawai A., Kondo T.: Discovery of biomarkers for osteosarcoma by proteomics approaches. *Sarcoma*, 2012; 2012: 425636
- [74] Sun H., Chua M.S., Yang D., Tsalenko A., Peter B.J., So S.: Antibody arrays identify potential diagnostic markers of hepatocellular carcinoma. *Biomark. Insights*, 2008; 3: 1-18
- [75] Suzuki M., Tarin D.: Gene expression profiling of human lymph node metastases and matched primary breast carcinomas: clinical implications. *Mol. Oncol.*, 2007; 1: 172-180
- [76] Tan H.T., Lee Y.H., Chung M.C.: Cancer proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* 2012; 31: 583-605
- [77] Tanca A., Addis M.F., Pagnozzi D., Cossu-Rocca P., Tonelli R., Falchi G., Eccher A., Roggio T., Fanciulli G., Uzzau S.: Proteomic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded lung neuroendocrine tumor samples from hospital archives. *J. Proteomics*, 2011; 74: 359-370
- [78] The Human Protein Atlas. <http://www.proteinatlas.org/> (20.04.2013)
- [79] Thingholm T.E., Jensen O.N.: Enrichment and characterization of phosphopeptides by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.*, 2009; 527: 47-56
- [80] U.S. Food and Drug Administration. FDA clears a test for ovarian cancer. September 11, 2009. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2009/ucm182057.htm>. (02.03.2013)
- [81] van Swelm R.P., Laarakkers C.M., van der Kuur E.C., Morava-Kozicz E., Wevers R.A., Augustijn K.D., Touw D.J., Sandel M.H., Masereeuw R., Russel F.G.: Identification of novel translational urinary biomarkers for acetaminophen-induced acute liver injury using proteomic profiling in mice. *PLoS One*, 2012; 7: e49524
- [82] Végvári A., Kondo T., Marshall J.G.: Clinical proteomics. *Int. J. Proteomics*, 2012; 2012: 641491
- [83] Wang E.S., Yao H.B., Chen Y.H., Wang G., Gao W.W., Sun Y.R., Guo J.G., Hu J.W., Jiang C.C., Hu J.: Proteomic analysis of the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients pre- and post-deep brain stimulation. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2013; 31: 625-637
- [84] Wang P., Whiteaker J.R., Paulovich A.G.: The evolving role of mass spectrometry in cancer biomarker discovery. *Cancer Biol. Ther.*, 2009; 8: 1083-1094
- [85] Washburn M.P., Wolters D., Yates J.R.^{3rd}: Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.*, 2001; 19: 242-247
- [86] Wasinger V.C., Corthals G.L.: Proteomic tools for biomedicine. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2002; 771: 33-48
- [87] Wiśniewski J.R., Duś K., Mann M.: Proteomic workflow for analysis of archival formalin-fixed and paraffin-embedded clinical samples to a depth of 10 000 proteins. *Proteomics Clin. Appl.*, 2013; 7: 225-233
- [88] Wiśniewski J.R., Ostasiewicz P., Duś K., Zielińska D.F., Gnadt F., Mann M.: Extensive quantitative remodeling of the proteome between normal colon tissue and adenocarcinoma. *Mol. Syst. Biol.*, 2012; 8: 611
- [89] Wiśniewski J.R., Ostasiewicz P., Mann M.: High recovery FASP applied to the proteomic analysis of microdissected formalin fixed paraffin embedded cancer tissues retrieves known colon cancer markers. *J. Proteome Res.*, 2011; 10: 3040-3049
- [90] Wiśniewski J.R., Zougman A., Mann M.: Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. *J. Proteome Res.*, 2009; 8: 5674-5678
- [91] Wiśniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M.: Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods*, 2009; 6: 359-362
- [92] Wong D.T.: Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J. Am. Dent. Assoc.*, 2006; 137: 313-321
- [93] Xiao H., Zhang L., Zhou H., Lee J.M., Garon E.B., Wong D.T.: Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*, 2012; 11: M111.012112
- [94] Xue H., Lü B., Zhang J., Wu M., Huang Q., Wu Q., Sheng H., Wu D., Hu J., Lai M.: Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach. *J. Proteome Res.*, 2010; 9: 545-555
- [95] Yang X.J., Seto E.: Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol. Cell*, 2008; 31: 449-461
- [96] Zhang A., Sun H., Wang P., Han Y., Wang X.: Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J. Proteomics*, 2012; 75: 1079-1088
- [97] Zhang A., Sun H., Wang P., Wang X.: Salivary proteomics in biomedical research. *Clin. Chim. Acta*, 2013; 415: 261-265
- [98] Zhang F., Chen J.Y.: Breast cancer subtyping from plasma proteins. *BMC Med. Genomics*, 2013; 6 (Suppl. 1): S6
- [99] 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: 2995-2999
- [100] Zhang Z., Yamashita H., Toyama T., Sugiura H., Ando Y., Mita K., Hamaguchi M., Hara Y., Kobayashi S., Iwase H.: Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2005; 94: 11-16
- [101] Zhao T., Zeng X., Bateman N.W., Sun M., Teng P.N., Bigbee W.L., Dhir R., Nelson J.B., Conrads T.P., Hood B.L.: Relative quantitation of proteins in expressed prostatic secretion with a stable isotope labeled secretome standard. *J. Proteome Res.*, 2012; 11: 1089-1099
- [102] Zhou Q., Chaerkady R., Shaw P.G., Kensler T.W., Pandey A., Davidson N.E.: Screening for therapeutic targets of vorinostat by SILAC-based proteomic analysis in human breast cancer cells. *Proteomics*, 2010; 10: 1029-1039
- [103] Zimmermann B.G., Park N.J., Wong D.T.: Genomic targets in saliva. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2007; 1098: 184-191

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.