

Proteomika i jej zastosowanie w wybranych jednostkach chorobowych

Proteomics and its application in selected diseases

Agata Płodzich

Pracownia Zapewnienia Jakości, Zakład Transfuzjologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

Streszczenie

Proteomika jest definiowana jako nauka zajmująca się proteomem, czyli komponentem białkowym, kodowanym przez genom. Termin „proteomika” został po raz pierwszy sformułowany i zastosowany przez Marca Wilkinsa w 1994 r. Głównym celem badań proteomicznych jest wyodrębnienie białek wytwarzanych przez komórki i narządy, zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych, badanie ich wzajemnych zależności oraz poznanie ich struktur trójwymiarowych. Badanie proteomiczne można podzielić na trzy główne etapy: 1) pozyskanie materiału i jego wstępna obróbka, 2) właściwa analiza profilu białek, 3) analiza otrzymanych danych. Na każdym z tych etapów wykorzystywane są coraz nowsze i coraz doskonalsze technologie, a zastosowanie metod proteomicznych w praktyce klinicznej daje realną szansę na identyfikację nowych biomarkerów i nowych celów terapeutycznych, które będzie można wykorzystać w diagnostyce i leczeniu chorób nowotworowych. Ponadto, możliwa stanie się wcześniejsza diagnoza choroby, przewidywanie jej postępu i reakcji pacjenta na leczenie. Podczas wykonywania eksperymentów proteomicznych badacze napotykają na wiele trudności metodologicznych, które niejednokrotnie uniemożliwiają interpretację wyników i wyciągnięcie wniosków. Zatem niezbędne okazuje się przyjęcie ogólnych norm pozwalających na porównanie wyników pochodzących z różnych laboratoriów, a także kryteriów jakościowych, które pozwoliłyby oceniać poszczególne etapy analizy. Badania nad biomarkerami różnych jednostek chorobowych pokazują, że jeżeli te warunki zostaną spełnione, to wyniki otrzymywane w eksperymentach proteomicznych mają dużą szansę na wykorzystanie w praktyce klinicznej. Celem niniejszej pracy było przedstawienie dotychczasowych osiągnięć w zakresie badań proteomicznych na przykładzie wybranych chorób nowotworowych i zespołu Downa.

Słowa kluczowe: proteomika, proteom, modyfikacje potranslacyjne, biomarkery, techniki proteomiczne, bioinformatyka, proteomika kliniczna, choroby nowotworowe, zespół Downa

J. Transf. Med. 2013; 6: 48–59

Summary

Proteomics is a branch of scientific research focused on the study of human proteome, i.e. a genome-encoded protein component. The term “proteome” was coined and first used by Marc R. Wilkins in 1994. The principal aim of proteomic research is selection of cellular and organ-produced proteins, in both physiological and pathological conditions and study of their three-dimension structures and complex interactions. There are three main phases to proteomic studies : 1) collection and preliminary testing of biological material, 2) protein profile analysis

Adres do korespondencji: mgr Agata Płodzich, IHiT, ul. Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 349 63 87, e-mail: a.plodzich@ihit.waw.pl

3) final data analysis. Each phase relies on increasingly novel and advanced technologies therefore application of proteomic techniques in clinical practice provides the opportunity of identifying new biomarkers and novel therapeutic targets for use in diagnostics and treatment of oncological diseases. Furthermore, proteomic technologies applied in clinical practice allow for earlier diagnosis of disease, prognosis for treatment and patient's response to treatment. Proteomic experiments involve several methodological challenges which may impede data interpretation and conclusions. A uniform set of standards seems therefore indispensable as it would allow the comparison of results from different laboratories whereas a uniform set of quality criteria would enable comparison of results obtained at each stage of analysis. Research on various biomarkers demonstrates that results of proteomic studies could then be successfully applied in clinical practice. The aim of this paper was to present the current achievements of proteomics on the examples of selected malignant tumors and the Down syndrome.

Key words: proteomics, proteome, posttranslational modifications, biomarkers, proteomic techniques, bioinformatics, clinical proteomics, oncological disorders, Down syndrome

J. Transf. Med. 2013; 6: 48–59

Wstęp

Rozwój nowoczesnych technik laboratoryjnych umożliwia nie tylko lepszą diagnostykę chorych, ale także prowadzenie badań profilaktycznych na znacznie szerszą skalę. Coraz większym zainteresowaniem, zarówno naukowców, jak i lekarzy, cieszą się badania, które pozwalają, poprzez jednoczesne oznaczanie wielu markerów chorobowych, monitorować funkcje wybranego narządu i całego organizmu ludzkiego.

Jedną z dziedzin, która umożliwia prowadzenia takich badań jest proteomika — nauka zajmująca się proteomem, czyli komponentem białkowym, kodowanym przez genom. Termin „proteom” został po raz pierwszy sformułowany i zastosowany w 1994 roku przez Marca R. Wilkinsa. Definicja proteomu mówi, że jest to zestaw wszystkich białek występujących w komórce, tkance czy organizmie, w określonym czasie [1]. Proteomika może być zatem definiowana jako nauka zajmująca się identyfikacją, opisywaniem oraz oznaczaniem ilościowym wszystkich białek uczestniczących w poszczególnych szlakach biochemicznych, znajdujących się w organellach, komórkach, tkankach i narządach. Eksperymenty przeprowadzane w ramach badań proteomicznych dostarczają bardzo dokładnych i kompleksowych informacji na temat funkcjonowania danego organizmu, jednak analiza proteomu jest o wiele bardziej skomplikowana niż analiza genomu. Różnica wynika przede wszystkim z faktu, że u wyższych organizmów eukariotycznych, genom pozostaje praktycznie niezmienny przez całe życie komórki i organizmu, natomiast proteom

podlega ciągłym zmianom. Dodatkowo, techniki wykorzystywane w badaniach proteomicznych są znacznie bardziej skomplikowane, niż stosowane w badaniach genomu, co powoduje, że nie są one tak wydajne [2].

Znaczenie modyfikacji potranslacyjnych białek proteomu

Życie komórki opiera się na wielu, powiązanych ze sobą dynamicznych procesach, które wpływają na jej wzrost, zdolność do rozmnażania i przeżycia. Ilość i jakość białek w komórce jest kontrolowana nie tylko poprzez szybkość ich biosyntezy i degradacji, ale także poprzez specyficzne procesy, jak na przykład modyfikacje potranslacyjne, które modulują molekularne interakcje, wpływają na stabilność białek oraz ich lokalizację w poszczególnych przedziałach międzykomórkowych. Modyfikacje potranslacyjne to chemiczne zmiany struktury białek, katalizowane przez specyficzne enzymy. Aktualnie znanych jest około 300 różnych modyfikacji potranslacyjnych, a nowe są sukcesywnie odkrywane.

Do najczęściej występujących modyfikacji zalicza się: sulfatację, fosforylację, hydroksylację, metylację, glikozylację i ubikwitinację [3]. Szczególnie interesujący, zwłaszcza z klinicznego punktu widzenia jest proces ubikwitinacji — zjawiska znakowania białek, polegającego na przyłączaniu specyficznych cząsteczek zwanych ubikwitiną. Ubikwityna (Ub) jest białkiem o masie 8,5 kDa, występującym w komórkach wszystkich organizmów eukariotycznych. Ubikwitinacji podlegają

zarówno białka uszkodzone czy nieprawidłowo funkcjonujące, jak i białka obce dla danej komórki, na przykład wirusowe. Wyróżnia się dwa rodzaje ubikwitynacji — monoubikwitynację, która polega na przyłączeniu monomerów ubikwityny do danego białka, co jest bardzo słabym sygnałem degradacji, oraz poliubikwitynację, polegającą na przyłączeniu polimerów (przynajmniej dimerów) ubikwityny. Powstałe w ten sposób łańcuchy poliubikwitynowe pełnią funkcję znacznika białek, który kieruje białko do proteasomu, gdzie następuje jego degradacja [4]. Proteasom jest dużym, wielkocząsteczkowym kompleksem enzymatycznym, utworzonym z białek, jego masa cząsteczkowa wynosi około 2 MDa. Jest to struktura charakterystyczna dla komórek eukariotycznych. W cytoplazmie oraz w jądrze komórkowym znajduje się około 30 tys. proteasomów, które odpowiadają za degradację ponad 80% białek oznaczonych ubikwityną. Główna funkcja proteasomu sprowadza się do rozpoznania i degradacji białka oznaczonego przez układ ubikwityny do zniszczenia. Proces właściwej degradacji białek wewnątrzkomórkowych ma ogromne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu żywego. Dowiedziono, że inhibicja szlaku proteasomów prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i apoptozy. Nieprawidłowe funkcjonowanie proteasomów może być przyczyną wielu chorób, w tym niektórych nowotworów złośliwych, a także chorób układu nerwowego, takich, jak choroba Alzheimera czy Parkinsona. Poza tym, zaburzenia regulacji szlaku ubikwityna–proteasom może prowadzić do powstania oporności na leki. Z tych powodów inhibicja proteasomów stała się nowym celem terapeutycznym [4–6].

Inhibicja proteasomu umożliwia hamowanie wielu szlaków patogennych prowadzących do powstania różnych nowotworów. Znanych jest wiele związków hamujących w sposób odwracalny lub nieodwracalny czynność proteasomu. Związki te można podzielić na naturalne, do których zalicza się między innymi: eponemycynę, dihydroepone-mycynę, epoxomycynę czy laktacysteinę, oraz na syntetyczne będące peptydami z aktywną grupą funkcyjną (aldehydową, winylosulfonową lub benzamidową) [6, 7]. Preparat o nazwie bortezomib (Velcade®; dawniej określany jako PS-341) został zaakceptowany jako lek i dopuszczony do użytku klinicznego [7].

W badaniach klinicznych II fazy, przeprowadzonych przez Jagannatha i wsp. stwierdzono istotną odpowiedź na leczenie u ponad 1/3 pacjentów z zaawansowanym szpiczakiem mnogim i na tej podstawie Amerykańska Agencji ds. Żywności

i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) zarejestrowała i wprowadziła bortezomib do leczenia klinicznego [8].

Bortezomib to zmodyfikowany kwas dipeptydyloborowy, który w sposób selektywny i odwracalny wiąże się z proteasomem 26S i hamuje jego działanie, co powoduje apoptozę komórek nowotworowych, a tym samym hamuje rozrost nowotworu. Preparat ten stosowany jest szeroko w leczeniu chorych na szpiczaka mnogiego, ponadto trwają zaawansowane badania nad jego zastosowaniem także w innych chorobach nowotworowych [5–7].

Ubikwitynacja oraz inne modyfikacje potranslacyjne są przyczyną tak ogromnej różnorodności, złożoności i heterogenności białek, a badania nad ich przebiegiem stanowią główne wyzwanie dla proteomiki [3].

Białka proteomu jako biomarkery

Biomarkery to cechy biologiczne o charakterze cząsteczkowym, które można wykorzystać jako wskaźniki procesów fizjologicznych lub chorobowych zachodzących w organizmie albo jako wskaźniki do oceny stopnia odpowiedzi organizmu na zastosowane leczenie farmakologiczne. Wykrycie biomarkerów zwiększa szansę wczesnego rozpoznania choroby, umożliwia rozpoczęcie indywidualnej terapii dostosowanej do konkretnego pacjenta oraz dostarcza informacji na temat wyników zastosowanego leczenia [2, 9].

Biomarkery są przede wszystkim wykorzystywane w prognozowaniu ryzyka wystąpienia choroby oraz w badaniach przesiewowych, diagnostyce i monitorowaniu przebiegu choroby. Ponadto można je wykorzystać do identyfikacji osób podatnych na poszczególne choroby. Opisanie biomarkerów charakterystycznych dla danej jednostki chorobowej pozwala podzielić populację na podstawie konkretnych genotypów choroby, a nie wyłącznie na wywiadzie rodzinnym. Możliwość określenia stopnia podatności na daną chorobę pozwala oszacować ryzyko jej wystąpienia w różnych populacjach [10].

Niezwykle cennym źródłem potencjalnych biomarkerów jest osocze, nie tylko jako podstawowy materiał kliniczny, ale także jako największy zbiór ludzkich białek. Oprócz białek fizjologicznych obecnych w osoczu, w stanach chorobowych znajdują się w nim także białka patologiczne. Co więcej, pobieranie osocza, jest zabiegiem mało inwazyjnym, niezbyt kosztownym, a pobrane próbki można łatwo przechowywać. Dzięki dotychczasowym

badaniom proteomicznym, opublikowano listę 289 białek osocza, ale postęp w zakresie wykorzystania technik wielowymiarowych daje realną szansę na podwojenie tej ilości w najbliższej przyszłości. Liczne dowody naukowe, pochodzące zarówno z badań proteomicznych, jak i z innych dziedzin sugerują, że wśród tych 289 białek, znajdują się takie, które mogą być biomarkerem znacznej liczby, jeśli nie większości chorób występujących u ludzi. Jednak obecnie, w rutynowej diagnostyce klinicznej, wykorzystuje się bardzo niewiele z tych białek, a w ciągu ostatnich dziesięciu lat liczba nowych białek akceptowanych przez FDA jako biomarkery zmniejszyła się do zaledwie jednego nowego białka diagnostycznego rocznie. Można tylko spekulować na temat przyczyn tak znacznej rozbieżności między oczekiwaniami rozbudzonymi przez osiągnięcia w dziedzinie proteomiki, a realiami diagnostyki klinicznej i sugerować rozwiązania, które w przyszłości umożliwią opracowanie skuteczniejszych narzędzi diagnostycznych [11].

Główne techniki wykorzystywane w proteomicie

Szybki postęp w obrębie spektrometrii masowej, zainicjowany przez rozwój łagodnych metod jonizacji, czyli desorpcji laserowej z udziałem matrycy (MALDI, *matrix-assisted laser desorption/ionization*) i elektrorozpylania (ESI, *electrospray ionization*), przyczynił się do udoskonalenia metod identyfikacji białek — zasadniczego etapu badań proteomicznych, a także do postępu w zakresie technik separacji białka oraz analizy uzyskanych wyników. Klasyczne podejście, polegające na izolacji pojedynczego białka oraz jego dalszej analizie, rozbudowano opisem potranslacyjnych modyfikacji białka i poszerzono o narzędzia umożliwiające ilościowe porównanie dwóch próbek lub większej ich ilości (proteomika ilościowa).

Bezpośrednie badanie proteomu pozwala na pełniejsze przedstawienie zmian zachodzących w organizmie. Jest jednak wiele przeszkód, które uniemożliwiają pełną analizę proteomiczną, a przede wszystkim złożoność i ogromna różnorodność proteomu. W organizmie ludzkim występuje co najmniej 250 różnych rodzajów komórek, a każda z nich zawiera od 2000 do 6000 głównych białek, przy czym modyfikacje potranslacyjne dodatkowo zwiększają tę liczbę. Szacuje się, że poszczególne rodzaje komórek człowieka mogą różnić się w zakresie około 400 specyficznych białek. Innym ważnym czynnikiem różnicującym jest dynamiczny zakres stężeń białka. W jednej komórce może znajdować

się od jednej do ponad 100 000 kopii cząsteczek białka. Wreszcie, proteom jest dynamiczny, podlega zmianom pod wpływem czasu i środowiska [12].

Etapy badania proteomicznego

Badanie proteomiczne można podzielić na trzy główne etapy: 1) izolacja i rozdział białek, 2) identyfikacja białek, 3) analiza sekwencji białka.

Izolacja i rozdział białek

Pierwszym etapem badania proteomicznego jest izolacja białek z komórek lub tkanek. Drugi etap obejmuje rozdział białek za pomocą takich metod jak na przykład elektroforeza dwuwymiarowa (2-DE) [13].

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

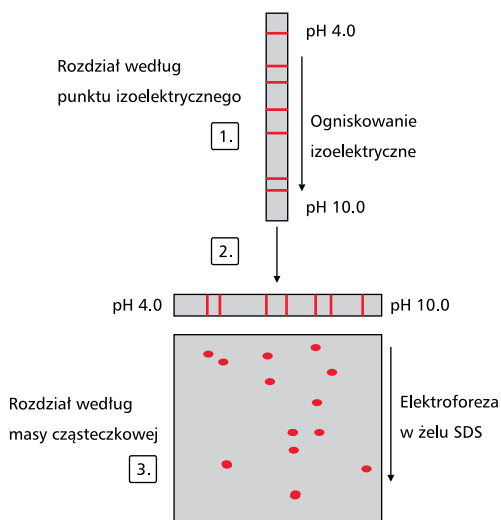
Technika, którą obecnie najczęściej stosuje się do separacji białek nosi nazwę elektroforezy dwuwymiarowej w żelu poliakrylamidowym (2D-PAGE) [14]. Metoda jest dwustopniowa. W pierwszym etapie białka są rozdzielane według ich punktu izoelektrycznego (pI). Punkt izoelektryczny dla większości białek mieści się w zakresie pH od 4 do 8. Przy wartości pH równej pI białko ulega wytrąceniu i jest widoczne w żelu po jego wybarwieniu [14, 15].

Drugi etap 2D-PAGE pozwala na rozdział białek według masy cząsteczkowej [15]. Rozdział odbywa się w żelu zawierającym siarczan dodecylu sodu (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) (ryc. 1).

Wyizolowane białka są następnie barwione przy użyciu błękitu kumasyny (CBB, *coomassie brilliant blue*) lub bardziej czułego azotanu srebra. Po barwieniu żele są skanowane i poddawane analizie za pomocą specjalnego programu komputerowego, który ułatwia dopasowanie ich wzorca i określenie liczby białek. Interesujące badane miejsca są następnie wycinane z żelu i poddawane trawieniu enzymatycznemu, zazwyczaj przy użyciu trypsyny. W konsekwencji otrzymuje się pojedyncze peptydy, które są następnie analizowane za pomocą spektrometrii mas (MS, *mass spectrometry*) [13].

Typowa elektroforeza 2D-PAGE umożliwia jednoczesne rozdzielenie kilku tysięcy białek. Otrzymane wzory rozdziału i intensywności „plamki” (*spots*) obrazują unikalny profil ekspresji białek wyizolowanych z danych tkanek [14].

Zaletą tej metody jest możliwość różnicowania licznych form tego samego białka powstałych wskutek modyfikacji potranslacyjnych. Przy użyciu elektroforezy nie można natomiast rozdzielić dużych białek (powyżej 150 kDa) i białek transbłonowych,



Rycina 1. Elektroforeza 2D. Proces rozdziału białek zachodzi dwustopniowo: w pierwszym etapie białka są rozdzielane według punktu izoelektrycznego (pI), natomiast w drugim etapie według masy cząsteczkowej

Figure 1. 2D electrophoresis. Protein separation process occurs in two stages: first step the proteins are separated according to the isoelectric point (pI); second step according to molecular weight

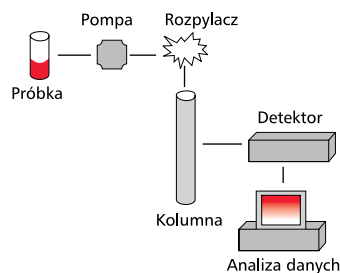
które wykazują silne właściwości hydrofobowe i nie przemieszczają się w żelu. Elektroforeza, jako metoda, nie odpowiada także najnowszym przepisom mówiącym o tym, że metoda powinna być zautomatyzowana i powinna umożliwiać jednoczesną analizę dużej liczby próbek. Dlatego stosowanie metody 2-DE w badaniach proteomicznych pozostaje ciągle przedmiotem dyskusji. Krytycy tej metody twierdzą, że jest ona niewygodna, czasochłonna i niezautomatyzowana, jej zwolennicy natomiast podkreślają, że pozostaje ona nadal skutecznym narzędziem oddzielenia złożonych mieszanin białek. Efektem toczących się dyskusji jest opracowanie alternatywnej, opartej na chromatografii, techniki rozdzielania białek złożonych lub mieszaniny peptydów [14, 15].

Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) jest powszechnie stosowaną metodą rozdzielania białek i peptydów [16].

Aparatura HPLC stosowana do badań proteomicznych nie różni się od aparatury konwencjonalnej; tak samo używa się systemu pomp, kolumn do separacji oraz detektora.

Najważniejszym elementem całego systemu jest kolumna — miejsce, w którym zachodzi se-



Rycina 2. Schemat HPLC. Wysokosprawna chromatografia cieczowa jest techniką stosowaną do oczyszczania, badania czystości oraz identyfikacji związków chemicznych. W typowym aparacie HPLC, analiza jednej próbki trwa od kilku do kilkudziesięciu minut, a próbka ma zazwyczaj objętość od 1 do 200 μ l

Figure 2. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) is a technique used for purification and identification of chemical compounds. A typical HPLC analysis of a single sample (volume 1–200 μ l) lasts several minutes

paracja. Kolumny stosowane w badaniach proteomicznych wypełnione są zazwyczaj tymi samymi fazami stałymi, co kolumny używane do tradycyjnych rozdzielów, a wszystkie typy stosowanych standardowo detektorów również są wykorzystywane w proteomice. Technika HPLC jest nieustannie doskonalona, na przykład dzięki stosowaniu nowych faz rozdzielania i nowego oprzyrządowania [16] (ryc. 2).

Identyfikacja białek

Do identyfikacji białek, obecnie, najczęściej stosuje się wysokoprzepustowe metody oparte na spektrometrii masowej w połączeniu z białkowymi bazami danych oraz programami do sekwencjonowania *de novo*.

Spektrometria mas

Spektrometria mas (MS, *mass spectrometry*) to nowoczesna technika analityczna umożliwiająca dokładny pomiar stosunku masy do ładunku elektrycznego danego jonu, badanie lub potwierdzenie struktury związków organicznych, jak również oznaczanie jakościowe oraz ilościowe związków występujących w mieszaninie.

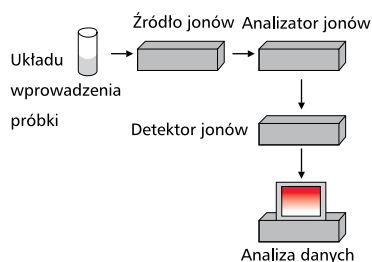
W naukach biologicznych spektrometria mas stworzyła nowe perspektywy i stała się wygodnym narzędziem pozwalającym uzyskać wiele istotnych informacji na temat badanych substancji. Jest uniwersalną techniką opartą na jonizacji cząsteczek lub atomów oraz na pomiarze stosunku masy cząsteczki do ładunku elektrycznego otrzymanych jonów. Wyniki pomiaru przedstawiane są w postaci widma masowego.

We wszystkich MS niezależnie od ich konstrukcji i przeznaczenia, występują elementy takie jak:

- źródło jonów, czyli urządzenie, w którym następuje jonizacja cząsteczek,
- analizator, w którym zjonizowane wcześniej cząsteczki ulegają rozdziałowi na podstawie stosunku ich masy cząsteczkowej do ładunku elektrycznego,
- detektor, czyli urządzenia zliczające liczbę jonów napływającą z analizatora [13].

Pierwszym krokiem jest zawsze jonizacja peptydów. Do głównych technik wykorzystywanych do jonizacji należy jonizacja przez desorpcję laserową w matrycy (MALDI, *matrix assisted laser desorption ionisation*), w której zastosowano wiązkę laserową o energii dobranej tak, aby nie doprowadzić do fragmentacji cząstek, a tylko do ich wybijania z matrycy oraz elektrorozpylenie (ESI, *electrospray*) oparte na rozpylaniu cieczy zawierającej badaną substancję w polu elektrycznym o wysokim napięciu [12, 14] (ryc. 3).

W badaniach proteomicznych, w których głównym zadaniem układu pomiarowego jest identyfikacja składu białkowego próbki, stosowane są systemy łączone, składające się ze spektrometru mas i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (LC-MS). W takim układzie wszystkie frakcje schodzące z kolumny chromatograficznej są poddawane jonizacji i wprowadzane do spektrometru. Ze względu na dużą złożoność analizowanych próbek, stosowane są także spektrometry tandemowe (MS/MS), wyposażone w dwa analizatory jonów. Spektrometry tandemowe są stosowane do określania sekwencji aminokwasowej peptydów, dlatego



Rycina 3. Schemat działania spektrometru mas. Każdy spektrometr mas składa się z pięciu podstawowych elementów: układu wprowadzenia próbki, źródła jonów, analizatora, detektora oraz rejestratora, który analizuje dane

Figure 3. Mass spectrometer structure. A mass spectrometer consists of five basic elements: sample input, source of ions, ion analyzer, ion detector and data recorder and analyzer

znalazły szerokie zastosowanie w badaniach proteomicznych [17].

W proteomicie MS pełni niezwykle ważną rolę, przede wszystkim dlatego, że umożliwia uzyskanie bardzo dokładnych wartości mas cząsteczkowych białek i peptydów. Ponadto znajduje szerokie zastosowanie w badaniach biomedycznych, gdzie ilości materiału są ograniczone. W hematologii, spektrometria mas może być wykorzystywana na bardzo szeroką skalę do badania białek i peptydów, sekwencjonowania DNA, analizy modyfikacji potranslacyjnych lub poszukiwania nowych białek [15].

Analiza sekwencji białka

Analiza sekwencji białka, czyli sposobu ułożenia aminokwasów w łańcuchu peptydowym białka, ściśle wiąże się z bioinformatyką i przeszukiwaniem baz danych w celu znalezienia konkretnego białka lub peptydu.

Bioinformatyka to nauka zajmująca się zastosowaniem technologii informatycznych do przechowywania, systematyzacji i kategoryzacji oraz analizy olbrzymiej ilości danych biologicznych. Stanowi ona integralną część badań proteomicznych. Analiza proteomiczna generuje ogromne ilości danych; podczas jednego eksperymentu dostarcza informacji o setkach, a nawet tysiącach białek. Dlatego analiza tych danych jest tak ważnym elementem badań proteomicznych. Bardzo często analiza bioinformatyczna zajmuje więcej czasu niż sam eksperyment i jest jego najdłuższym i najbardziej pracochłonnym etapem. Wymaga ponadto specjalnych narzędzi oraz umiejętności posługiwania się nimi, co nie zmienia faktu, że odgrywa kluczową rolę w całym eksperymencie [12, 18, 19].

Podczas badań proteomicznych niezbędnym narzędziem okazują się algorytmy, umożliwiające analizę danych z MS, w powiązaniu z informacjami uzyskanymi z bioinformatycznych baz danych. Są to zorganizowane, łatwo dostępne zbiory informacji podlegające stałej aktualizacji. Istnieje wiele baz danych, w których można znaleźć informacje istotne z punktu widzenia proteomiki: dane dotyczące trójwymiarowej struktury białek, ich szlaków metabolicznych czy aktywności enzymatycznej.

Do najpopularniejszych i najczęściej wykorzystywanych biologicznych baz danych należy UniProt (*Universal Protein Resource*), będąca kompleksowym i łatwo dostępnym narzędziem zawierającym informacje na temat sekwencji białek i ich funkcji, zgromadzonym na podstawie literatury naukowej, oraz NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), będąca zbiorem kilku różnych

baz danych. W skład NCBI wchodzi na przykład GenBank, czyli baza zawierająca zbiór genowych sekwencji nukleotydowych oraz SwissProt, na którą składa się znaczna liczba informacji dotyczących funkcji białek, ich struktury, modyfikacji potranslacyjnych, jak również wielu innych danych. W NCBI przechowywane są także informacje na temat artykułów biologicznych i medycznych (bazy PubMed i PubMed Central).

Zastosowanie proteomiki w wybranych jednostkach chorobowych — proteomika kliniczna

W wyniku postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach w dziedzinie technik proteomicznych, można bardzo szybko uzyskać ogromną liczbę danych o istotnym znaczeniu klinicznym. Do poznania złożonej roli białka w regulacji mechanizmów zdrowia i choroby niezbędne jest użycie wielu technik, w tym metody wysokoprzepustowej opartej na MS, które utorowały drogę do badań klinicznych również na poziomie systemowym. Dodatkowo, konieczna jest analiza interakcji pomiędzy białkami, oznaczanie ilościowe białek czy globalna analiza modyfikacji potranslacyjnych.

Zastosowanie technik proteomicznych w praktyce klinicznej może przynieść wymierne korzyści w postaci wczesnego rozpoznania choroby, przewidywania jej postępu i odpowiedzi pacjenta na leczenie czy wyznaczanie nowych celów interwencji terapeutycznej. Obecnie prowadzone są proteomiczne badania kliniczne, które skupiają się bardziej na analizie tkanek i płynów ustrojowych i, co za tym idzie, na analizie różnorodności i obfitości typów komórek, oznaczaniu ilościowym białek, dostępności próbek z możliwością ich długotrwałej obserwacji klinicznej, jak również na doborze optymalnej metody badań.

Te oraz inne problemy nieodłącznie związane z wykorzystywaniem próbek klinicznych powodują, że prowadząc kliniczne badania proteomiczne, trzeba opierać się na współpracy z przedstawicielami różnych dziedzin. Co więcej, przeniesienie podstawowych odkryć proteomicznych do praktyki klinicznej jest procesem długotrwałym i kosztownym, wymagającym szeroko zakrojonej współpracy między badaczami i przedstawicielami różnych dziedzin medycyny, w tym wsparcia aparaturowego i udziału przedstawicieli przemysłu [20].

Choroby nowotworowe — onkoproteomika

Terminem „nowotwór” określa się nieprawidłowy i niekontrolowany rozrost komórek w wyniku zakłócenia naturalnych mechanizmów regula-

cyjnych organizmu. Nowotwory stanowią grupę niezwykle różnorodnych chorób, które, pomimo postępów w zakresie diagnozowania i leczenia, nadal stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych, w tym w Polsce [21]. Każdego rok na całym świecie choroby nowotworowe są rozpoznawane u ponad 11 mln osób. Szacuje się, że do 2020 roku będzie przybywać 16 milionów nowych przypadków rocznie. Liczba zgonów na świecie z powodu chorób nowotworowych stale rośnie. Prognozy mówią, że w 2015 roku na raka umrze 9 milionów ludzi, a liczba ta w roku 2030 wzrośnie do 11,4 milionów [22].

Badania proteomiczne znajdują coraz szersze zastosowanie w diagnozowaniu chorób nowotworowych oraz w monitorowaniu postępu i przebiegu choroby. Onkoproteomika, jako gałąź proteomiki, zajmuje się badaniem białek oraz ich wzajemnych oddziaływań w komórkach nowotworowych i odgrywa coraz większą rolę w diagnostyce i leczeniu nowotworów, jak również w rozwoju terapii indywidualnych [22].

Wczesne rozpoznanie nowotworu jest trudne ze względu na często bezobjawowy lub skąpoobjawowy początek choroby. Wpływ na to może mieć również ograniczona wiedza w zakresie etiologii i onkogenezy. Jako istotny wskaźnik stanu biologicznego organizmu i progresji choroby nowotworowej biomarkery stanowią potężne narzędzie monitorowania przebiegu choroby oraz oceny zarówno skuteczności, jak i bezpieczeństwa nowych środków terapeutycznych [22].

Rak gruczołu krokowego

Swoisty antygen sterczowy (PSA, *prostate specific antigen*) jest jednym z najczęściej wykorzystywanych markerów nowotworowych stosowanym w diagnozowaniu raka gruczołu krokowego. Należy on do markerów nowotworowych dobrze poznanych, wykorzystywanych zarówno w diagnostyce, jak i w monitorowaniu leczenia [21, 23].

Swoisty antygen sterczowy występuje u wszystkich dorosłych mężczyzn, a jego stężenie może być podwyższone zarówno przy łagodnym przerostie gruczołu krokowego, jak i złośliwym raku prostaty. Podwyższone stężenie PSA wskazuje zatem tylko na konieczność przeprowadzenia dalszych badań, a nie odpowiada na pytanie o rodzaj i stan zaawansowania choroby prostaty.

Dowiedziano, że stany patologiczne w obrębie gruczołu krokowego mają swoje odzwierciedlenie w proteomicznym wzorze białek surowicy. Chcąc potwierdzić tę tezę, przeanalizowano za pomocą technik proteomicznych i porównano próbki su-

rowicy pacjentów z rozpoznaniem rakiem prostaty, u których stężenie PSA wynosiło ≥ 4 ng/ml, z próbkami surowicy pacjentów, u których nie rozpoznano raka prostaty (stężenie PSA w surowicy < 1 ng/ml). Wykorzystując techniki proteomiczne, poprawnie wskazano 95% pacjentów spośród 38 chorych ze stwierdzonym rakiem prostaty. Z kolei 177 (78%) z 228 badanych pacjentów prawidłowo zakwalifikowano jako chorych z łagodnym przerostem stercza, a w grupie 137 mężczyzn ze zwiększonym stężeniem PSA (4 – 10 ng/ml) wykazano swoistość tego testu na poziomie 71%. Jeżeli przedstawione wyniki uzyskają potwierdzenie w dalszych badaniach, diagnostyka wzoru białek surowicy metodami proteomiki może zyskać istotne znaczenie przy podejmowaniu decyzji dotyczących diagnozowania choroby i wyboru metod leczenia pacjentów z podwyższonym poziomem PSA [24].

Poznanie dynamiki zmian i ekspresji wielu różnych białek w procesie rozwoju raka prostaty oraz procesu angiogenezy stanowi pierwszy krok w opracowaniu nowych, unikalnych technik leczenia.

Rak wątroby

Rak wątrobowokomórkowy (HCC, *hepatocellular carcinoma*) jest piątym co do częstości występowania nowotworem złośliwym na świecie. Jako czynniki ryzyka wystąpienia choroby zidentyfikowano zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B lub C, oraz marskość wątroby [25, 26].

W skali światowej ponad 52% przypadków zachorowania na HCC wiąże się z zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV, *hepatitis B virus*) i 25% z zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV, *hepatitis C virus*). Rak wątrobowokomórkowy pozostaje nadal jednym z nowotworów o największej śmiertelności na świecie, mimo że czynniki ryzyka są dobrze znane. Dzieje się tak dlatego, że rozpoznanie choroby we wczesnym okresie jest trudne [27].

Rak wątrobowokomórkowy, piąty co do częstości występowania nowotwór na świecie, plasuje się na miejscu trzecim jako przyczyna zgonów na choroby nowotworowe. W skali światowej corocznie diagnozuje się około 626 tys. nowych przypadków HCC i odnotowuje 600 tys. zgonów z powodu tej choroby. Chociaż nadal nie udało się poznać wszystkich mechanizmów rozwoju HCC, zidentyfikowano jednak wiele czynników patologicznych, genetycznych i molekularnych leżących u podłoża tej choroby [28].

Osoby znajdujące się w grupie ryzyka, a więc cierpiące na marskość wątroby lub/i zakażone HBV

lub HCV poddaje się diagnostyce przesiewowej, w której ustalonym standardem jest oznaczanie biomarkera alfa-fetoproteiny (AFP, *alpha-fetoprotein*) oraz wykonywanie badania USG co 6–12 miesięcy. Jest to jednak standard postępowania daleki od doskonałości. Alfa-fetoproteina to glikoproteina wytwarzana w wątrobie, przewodzie pokarmowym i pęcherzyku żółciowym płodu, która jest wykorzystywana jako biomarker HCC, chociaż jej zwiększone stężenie obserwowane jest jedynie u 50–70% chorych. Należy podkreślić, że zwiększone stężenie AFP występuje także we wstępnej fazie zakażenia HBV, po czym obniża się lub nawet powraca do normy, zanim znowu wzrośnie w kolejnej fazie zaawansowania choroby [28, 29].

Za diagnostycznie istotne uznawane jest stężenie AFP ponad 400 ng/ml, ale tak wysokie wartości obserwuje się zaledwie u niewielkiego odsetka pacjentów chorych na HCC. Przy niższym stężeniu AFP wykonywanie badań monitorujących, w tym badania USG nawet co trzy miesiące, nie przyczynia się do poprawy wykrywalności HCC [28]. Stąd tak ogromne zainteresowanie oraz pośpiech w zakresie identyfikacji nowych biomarkerów HCC, które można byłoby zastosować do wczesnego wykrywania choroby i monitorowania skuteczności jej leczenia [29]. Z najnowszych badań wynika, że diagnozowanie nowotworu i wykrywanie niewielkich zmian świadczących o obecności HCC, można usprawnić, wykorzystując obok AFP również jej podfrakcje, czyli AFP-L3 oraz DCP [28] (des-gamma-karboksy-protrombina), które są nieprawidłową protrombiną, niezdolną do wiązania wapnia [29].

Pomiar DCP charakteryzuje się czułością porównywalną do oznaczania AFP lub niższą (50–70%), jest jednak bardziej swoisty (do 90%), dlatego w diagnostyce różnicowej HCC i zmian o charakterze nienowotworowym DCP okazał się bardziej przydatnym markerem niż AFP. Ponadto, stosując DCP, można skuteczniej wykrywać niewielkie zmiany chorobowe HCC: przy niewielkich ogniskach (o średnicy ok. 2 cm) wynik dodatni uzyskiwano u około 33% pacjentów [30, 31].

Identyfikacja nowej grupy cząsteczek zwanych mikro RNA (miRNA) jest bardzo obiecującym obszarem badań w zakresie diagnostyki HCC, mimo że badanie to wykracza poza obszar proteomiki. MikroRNA stanowią klasę krótkich, około 21–23-nukleotydowych, niekodujących cząsteczek RNA, które zidentyfikowano u organizmów jądrowych. Liczbę cząsteczek miRNA w genomie człowieka szacuje się na około 1000, z czego dotychczas zidentyfikowano około 500. Rola miRNA sprowadza

się do obniżania ekspresji genów poprzez hamowanie ich translacji. Częsteczki miRNA uczestniczą w wielu ważnych procesach biologicznych, a wyniki prowadzonych ostatnio badań wykazały wiele przykładów zaburzeń regulacji mikroRNA w chorobach nowotworowych. Dowiedziono, że mikroRNA nie tylko regulują ekspresję licznych onkogenów i genów supresorowych, ale same również mogą występować w roli onkogenów i supresorów [28].

MikroRNA regulują ekspresję genów poprzez wiązanie do specyficznych matrycowych RNA (mRNA), co w konsekwencji zapobiega ich translacji. Ponieważ każdy rodzaj miRNA może jednocześnie regulować ekspresję setek genów, cząsteczki te kontrolują całe podstawowe programy transkrypcyjne definiujące zasadnicze cechy komórek. W związku z powyższym, profilowanie miRNA stało się niezwykle cenną metodą fenotypowania i klasyfikowania nowotworów [28].

Dużo niezależnych grup badaczy przeprowadziło kompleksowe analizy miRNA związanych z HCC, co dostarczyło wielu cennych informacji na temat markerów miRNA. Ilość miRNA koreluje z najważniejszymi parametrami choroby, takimi jak: przerzuty, różnicowanie, zakażenie HBV lub HCV, wznowy nowotworu i czas przeżycia pacjenta. Niektóre miRNA zaangażowane są w kancerogenezę HCC poprzez promowanie komórek macierzystych raka i kontrolę proliferacji i apoptozy. Inne kontrolują migrację komórek i ich inwazję, przez co są związane z progresją HCC. MiRNA związane z HCC nie tylko dostarczają nowych informacji na temat molekularnych podstaw HCC ale również służą jako nowe narzędzia diagnostyczne i prognostyczne tej choroby. Obecnie jednak tylko kilka miRNA można wykorzystać w tym obiecującym obszarze, co jednak wymaga dalszego potwierdzenia w badaniach prospektywnych [28].

Rak jajnika

Rak jajnika stanowi przyczynę zgonu ponad 125 000 kobiet rocznie na całym świecie, czyli więcej niż wszystkie inne nowotwory ginekologiczne. Wczesne wykrycie nowotworu (I lub II okres zaawansowania) daje ponad 90% szans na przeżycie, ale tylko około 20% wszystkich przypadków zostaje wykryte we wczesnym okresie choroby. Większość przypadków raka jajnika ujawnia się w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego, co daje tylko 11% szans na przeżycie 5 lat. Objawy raka jajnika są zróżnicowane i często błędnie przypisywane innym chorobom. Dlatego z jego powodu umiera najwięcej kobiet, mimo że jest to nowotwór

występujący rzadziej niż inne złośliwe schorzenia kobiecych narządów rodnych [32].

Wczesne wykrycie choroby może przedłużyć lub uratować życie, obecnie jednak nie ma metod przesiewowych na tyle czułych, aby umożliwiły wykrycie raka jajnika w bardzo wczesnym okresie choroby, kiedy objawy nie są jeszcze wyraźnie widoczne. Dlatego konieczne staje się opracowanie skutecznych metod wczesnej diagnostyki tego schorzenia. Obecnie, najczęściej wykorzystywanym i najdokładniej przebadanym markerem jest CA-125 — glikoproteina błonowa występująca na powierzchni wielu rodzajów komórek nabłonkowych. Badanie krwi oceniające stężenie CA-125 i techniki obrazowania, takie jak tomografia komputerowa, przezpochwowe badanie ultrasonograficzne lub połączenie testu immunologicznego CA-125 z jedną z metod obrazowania pozwalają na monitorowanie pacjentów już zdiagnozowanych. Nie jest to jednak wystarczająco swoiste badanie diagnostyczne [33], gdyż podwyższone stężenie CA-125 obserwuje się również w wielu innych chorobach. Ponadto w badaniach immunohistochemicznych materiału pooperacyjnego wykazano, że tylko 20% raków jajnika produkuje CA-125. Co więcej, marker ten nie zawsze jest uwalniany do krwiobiegu we wczesnej fazie wzrostu nowotworu; podwyższone stężenie CA-125 obserwuje się u zaledwie 50–60% chorych w stopniu I zaawansowania choroby [34]. Chociaż oznaczanie stężenia CA-125 nie spełniło wszystkich oczekiwań ginekologów i onkologów, jest to nadal najbardziej powszechnie stosowana metoda w diagnostyce raka jajnika.

Innym, niezwykle obiecującym markerem diagnostycznym raka jajnika jest HE4 (*human epididymis protein 4*) — podfrakcja 4 ludzkiego białka z komórek nabłonkowych jądra [35], które jest białkiem o masie cząsteczkowej 11 kDa. Jego zwiększone stężenie obserwuje się w przypadku raka jajnika. W prawidłowej tkance jajnika ekspresja genu *WFDC2* kodującego HE4 i wytwarzanie tego białka obserwowane jest na minimalnym poziomie [36]. Oznaczanie białka HE4 może zoptymalizować wykrywanie raka jajnika w jego wczesnym okresie. Z badań wynika, że HE4 charakteryzuje się większą czułością i większą swoistością niż CA-125 (odpowiednio 96,9% v. 85,7% oraz 96,3% v. 79%) i wydaje się, że zastosowanie tego biomarkera w diagnozowaniu łagodnych nowotworów jajnika daje lepsze rezultaty niż zastosowanie CA-125 [35].

Analiza surowicy pacjentek z uwidocznioną w badaniu ultrasonograficznym patologiczną masą w obrębie przydatków wykazała, że HE4, jako test wykrywania raka jajnika, charakteryzuje się czułością

cią na poziomie 67% i swoistością 96%. Wykazano również, że połączenie dwóch markerów — CA125 i HE4 powoduje znaczny wzrost czułości i swoistości w porównaniu z zastosowaniem każdego z tych markerów pojedynczo [36].

Obecnie żaden ze znanych markerów nie jest na tyle czuły, aby po jego zastosowaniu można było ustalić precyzyjne i niebudzące wątpliwości rozpoznanie. Wysokie stężenie biomarkera wskazuje na znaczne zaawansowanie procesu nowotworowego, ale może też, pomimo obecności guza, utrzymywać się w granicach prawidłowych.

Priorytetem w badaniach nad markerami nowotworowymi powinno być zatem wykrywanie swoistych antygenów przypisanych do konkretnych nowotworów, jak również opracowanie testów diagnostycznych umożliwiających wykrywanie choroby w jej najwcześniejszym, bezobjawowym okresie.

Choroby nienowotworowe — zespół Downa w rozpoznawaniu prenatalnym

Zespół Downa (DS, *Down syndrome*) jest najbardziej rozpowszechnionym zaburzeniem genotypu ludzkiego, spowodowanym trisomią 21 chromosomu [37].

Początkowo, ryzyko wystąpienia DS było najczęściej szacowane na podstawie wyniku potrójnego testu przeprowadzanego w drugim trymestrze ciąży oraz na podstawie wieku matki. Test opierał się na pomiarze stężeń matczynych markerów surowiczych takich jak: AFP, podjednostka b ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (fbhCG, *human chorionic gonadotropin*), niezwiązany estriol (uE3, *unconjugated estriol*) i inhibina A [38].

Obecnie, badania przesiewowe w kierunku zespołu Downa polegają na obliczeniu ryzyka na podstawie pomiaru markerów biochemicznych w surowicy krwi matki, wykonywanych w pierwszym lub drugim trymestrze ciąży. Badania te są często uzupełniane badaniem USG przezierności karkowej płodu, co umożliwia zwiększenie ogólnego poziomu wykrywalności do 90–95% [37].

Pomimo intensywnych wysiłków zmierzających do poprawy jakości metod przesiewowych, najwyższy osiągalny stopień wykrywalności wynosi 95%, ale około 2,5–5% wyników okazuje się fałszywie dodatnich [37, 39]. Po przeprowadzeniu tych badań, kobiety z grupy wysokiego ryzyka mogą opowiedzieć się za badaniem inwazyjnym, takim jak amniopunkcja lub pobranie próbek kosmków kosmówki [38].

Badania przesiewowe odgrywają istotną rolę w diagnostyce prenatalnej i pozwalają ograniczyć

liczbę badań inwazyjnych, nie są jednak wolne od wad. Wymienione markery nie są swoiste dla DS; wykorzystuje się je również w diagnostyce zespołu Edwardsa (trisomia chromosomu 18) czy zespołu Patau (trisomia chromosomu 13) [37].

Postęp, jaki ostatnio dokonał się w zakresie metod proteomiki ilościowej, stwarza możliwość wykrywania nowych biomarkerów, które można będzie wykorzystać do monitorowania postępu choroby i do poznania mechanizmów cząsteczkowych leżących u podłoża DS [40].

Prowadzone przez Tsangaris i wsp. [41] badania proteomiczne płynu owodniowego pochodzącego od kobiet spodziewających się dziecka z DS oraz od kobiet z prawidłowo przebiegającą ciążą wykazały, że w przypadku zespołu Downa z trisomią 21 chromosomu występuje prawie czterokrotny wzrost stężenia PGBM — proteoglikanu zawierającego siarczan heparanu (*basement membrane — specific heparin sulfate proteoglycan core protein*). Ponadto u kobiet spodziewających się dziecka z DS stwierdzono dwukrotny wzrost stężenia alfa-1 mikroglobuliny (AMBP, *alfa microglobulin*) i zmniejszenie o 40% stężenia prekursora insulinopodobnego czynnika wzrostu wiążącego białko 1 (IBP-1, *insuline-like growth factor binding protein 1 precursor*). Wyniki przedstawionych badań wskazują jednoznacznie na konieczność prowadzenia dalszych analiz proteomicznych, które zapewne zrewolucjonizują diagnostykę jednostek chorobowych w bardzo wczesnym okresie ich rozwoju [41].

Wady i ograniczenia badań proteomicznych

Podczas wykonywania eksperymentów proteomicznych w warunkach laboratoryjnych badacze napotykają na wiele trudności metodologicznych. Jednym z pierwszych problemów stanowi sposób pobierania próbki [42]. Jest to niezwykle istotny etap we wszystkich badaniach proteomicznych, ponieważ na stężenie białek wpływa bardzo wiele czynników, w wyniku czego białka mogą ulegać agregacji, proteolizie lub utlenianiu. Jeżeli na sposób pobierania materiału nie zwraca się należytej uwagi, to zmiany zachodzące pod wpływem czynników zewnętrznych mogą zafałszować wyniki. Często analizie proteomicznej poddawane są komórki hodowane *in vitro*, co wynika z faktu, że w wielu przypadkach zmiany patologiczne, zachodzą tylko w niewielkim odsetku komórek danej tkanki. Jednak nie ma pewności, że zjawiska zachodzące w komórkach hodowanych *in vitro* będą także zachodziły w warunkach *in vivo*.

Proteomika ma tę zaletę, że podczas jednego doświadczenia uzyskuje się ogromną liczbę informacji. Może to jednak także stanowić wadę. Bardzo często, podstawowe oprogramowanie, które jest dostarczane z aparaturą pomiarową, nie jest w stanie przeanalizować tak dużej liczby danych. Stanowi to istotny problem, ponieważ może się okazać, że wyniki uzyskane na drodze prawidłowo przeprowadzonego doświadczenia są bezużyteczne [43].

Narzędzia bioinformatyczne stanowią niezbędny element każdego eksperymentu proteomicznego, który w powiązaniu z informacjami zawartymi w biologicznych bazach danych umożliwia analizę informacji ze spektrometru mas. Jednak, mimo niezaprzeczalnej roli, jaką odgrywa bioinformatyka w proteomice, może się okazać, że jest to jednocześnie najsłabsze ogniwo eksperymentu. Problem wynika najczęściej z tego, że badacze nie znają na odpowiednim poziomie narzędzi informatycznych, to znaczy na takim poziomie, który umożliwiłby im maksymalne wykorzystanie możliwości tych technik i narzędzi. Dotyczy to także bioinformatyków, którzy znają zagadnienia, techniki i narzędzia informatyczne, ale nie posiadają odpowiedniej wiedzy biologicznej, chemicznej czy biochemicznej i bardzo często nie są w stanie w prawidłowy sposób zinterpretować danych pochodzących z eksperymentu.

Kolejny problem, który może pojawić się w trakcie analizy danych, dotyczy biologicznych baz danych [43]. Obecnie białkowe bazy danych nie zawierają kompletnych informacji nie tylko o modyfikacjach potranslacyjnych, ale także dotyczących niektórych białek, co może skutkować niepełną interpretacją wyników badań. Dane te są sukcesywnie i regularnie uzupełniane, co w przyszłości wyeliminuje takie problemy.

Podsumowanie

Rozwój technik proteomicznych stwarza zupełnie nowe możliwości identyfikacji białek i wnosi znacznie pełniejszą informację niż analiza pojedynczych markerów białkowych. Techniki proteomiczne z pewnością okażą się przydatne do opracowywania skutecznych metod leczenia, jak również do wcześniejszego i bardziej precyzyjnego rozpoznawania chorób, jednak o dalszym rozwoju tych technik i o ich przydatności w laboratorium analitycznym zadecyduje rozwój metod analitycznych oraz postęp w dziedzinie informatyki. Równie istotne znaczenie ma opracowanie jednolitych procedur przygotowania i analizy materiału oraz walidacji otrzymanych wyników.

Piśmiennictwo:

1. Plebani M. Proteomics: The next revolution in laboratory medicine? *Clinica Chimica Acta* 2005; 357: 113–122
2. Wery J.P. Application of Proteomics Technologies to Biomarker Discovery and Development—Challenges and Solutions, *Current Separations*, 2007; 22 (1): 15–17.
3. Jensen O.N. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry, *Current Opinion in Chemical Biology* 2004; 8: 33–41.
4. Kazula A., Kazula E. Proteasomy a nowe kierunki terapii. *Farmacja Polska* 2009; 65 (7): 511–523
5. Jurczyszyn A., Skotnicki A. B. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in neoplastic diseases. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2006; 15 (2): 309–320.
6. Kostur A., Kulczyńska A., Kłoczko J. Proteasomy — nowy cel leczenia przeciwnowotworowego. *Acta Haematologica Polonica* 2010; 41 (2): 261–269.
7. Warzocha K., Kraj M., Pogłód R., Sokołowska U. Skuteczność i bezpieczeństwo bortezomibu (Velcade) w leczeniu nawrotowej i opornej postaci szpiczaka plazmocytozy. *Doniesienie wstępne.*, *Journal of Oncology* 2007; 57 (2): 160–169.
8. Jagannath S., Barlogie B., Berenson J.R., Siegel D.S. Updated survival analyses after prolonged follow-up of the phase 2, multicenter CREST study of bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2008; 143: 537–540.
9. Conrads T.P., Zhou M., Petricoin E.F. 3rd, Liotta L., Veenstra T.D. Cancer diagnosis using proteomic patterns. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2003; 3: 411–420.
10. Mayeux R. Biomarkers: Potential Uses and Limitations. *NeuroRx* 2004; 1: 182–188.
11. Anderson N.L., Anderson N.G. The human plasma proteome-history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell Proteomics* 2002; 1: 845–867.
12. Hirsch J., Hansen K.C., Burlingame A.L., Matthey M.A. Proteomics: current techniques and potential applications to lung disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004; 287: L1–L23.
13. Liunbruno G.M., Proteomics: applications in transfusion medicine *Blood Transfus.* 2008; 6: 70–85.
14. Petrák J. Proteomics and its role in Medicine. *Cas. Lek. Cesk.* 2005; 144: 365–370.
15. Cristea I.M., Gaskell S.J., Whetton A.D. Proteomic techniques and their application to hematology. *Blood* 2004; 103: 3624–3634.
16. Mitulovic G, Mechtler K. HPLC-techniques for proteomics analysis—a short overview of latest developments. *Brief Funct. Genomic Proteomic* 2006; 5: 249–260.
17. Han X., Aslanian A., Yates J. R. Mass Spectrometry for proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008;12: 483–490.
18. Srinivas P.R., Verma M., Zhao Y., Srivastava S. Proteomics for Cancer Biomarker Discovery. *Clin Chem.*, 2002; 48: 1160–1169.
19. Blueggel M., Chamrad D., Meyer H.E. Bioinformatics in proteomics. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2004; 5: 79–88.
20. deVera I.E., Katz J.E., Agus D.B. Clinical proteomics: the promises and challenges of mass spectrometry-based biomarker discovery. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2006; 4: 541–549.
21. Karley D., Gupta D., Tiwari A. Biomarker for cancer: a great promise for future, *World J. Oncol.* 2011; 2: 151–157.
22. Cho W.C. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol. Cancer* 2007; 6:25.

23. Bindukumar B., Schwartz S., Aalinkeel R., Mahajan S. i wsp. Proteomic profiling of the effect of prostate-specific antigen on prostate cancer cells. *Prostate* 2008; 68: 1531–1545.
24. Petricoin E.F. 3rd, Ornstein D.K., Pawletz C.P. i wsp. Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002; 94: 1576–1578.
25. Yokoo H., Kondo T., Fujii K. i wsp. Proteomic signature corresponding to alpha fetoprotein expression in liver cancer cells. *Hepatology* 2004; 40: 609–617.
26. Tangkijvanich P., Anukulkarnkusol N., Suwangool P. i wsp. Clinical Characteristics and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma: Analysis Based on Serum Alpha-fetoprotein Levels. *J. Clin. Gastroenterol.* 2000; 31: 302–308.
27. Steel L.F., Shumpert D., Trotter M. i wsp. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2003; 3: 601–609.
28. Behne T., Sitki Copur M. Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Hepatology* 2012; 1–7.
29. Feng J.T., Liu Y.K., Song H.Y., Dai Z. Heat-shock protein 27: A potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics* 2005; 5: 4581–4588.
30. Wang C.S., Lin C.L., Lee H.C. i wsp. Usefulness of serum des-gamma carboxy prothrombin in detection of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11: 6115–6119.
31. Donati M., Brancato G., Donati A. Clinical biomarkers in hepatocellular carcinoma (HCC). *Front Biosci (Schol Ed)* 2010; 2: 571–577.
32. Suh K.S., Park S.W., Castro A. i wsp. Ovarian cancer Biomarkery for molecular biosensors and translational medicine. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2010; 10: 1069–1083.
33. Tchagang A.B., Tewfik A.H., DeRycke M.S., Skubitz K.M., Skubitz A.P. Early detection of ovarian cancer using group biomarkers. *Mol. Cancer Ther.* 2008; 7: 27–37.
34. Bast R.C. Jr. Status of Tumor Markers in Ovarian Cancer Screening. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 200s–205s.
35. Chang X., Ye X., Dong L., Cheng H., i wsp. Human Epididymis Protein 4 (HE4) as a serum tumor biomarker in patients with ovarian carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2011; 21: 852–858.
36. Moore R.G., Brown A.K., Miller M.C. i wsp. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol. Oncol.* 2008; 108: 402–408.
37. Cho C.K., Diamandis E.P. Application of proteomics to prenatal screening and diagnosis for aneuploidies. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2011; 49: 33–41.
38. Pennings J.L., Koster M.P., Rodenburg W., Schielen P.C., de Vries A. Discovery of novel serum biomarkers for prenatal Down syndrome screening by integrative data mining PLoS. *One* 2009; 4: e8010.
39. Heywood W.E., Madgett T.E., Wang D. i wsp., 2D DIGE analysis of maternal plasma for potential biomarkers of Down Syndrome. *Proteome Sci.* 2011; 9: 56.
40. Chen C.P., Chen Y.H., Chern S.R., Chang S.J. i wsp. Placenta proteome analysis from Down syndrome pregnancies for biomarker discovery. *Mol Biosyst.*, 2012; 8: 2360–2372.
41. Tsangaris G.T., Karamessinis P., Kolialexi A. i wsp. Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Down syndrome. *Proteomics* 2006; 6: 4410–4419.
42. Tarkowski B., Girstun A. Zastosowanie spektrometrii mas w poszukiwaniach biomarkerów chorób nowotworowych. *Kosmos* 2005; 54 (4): 331–343.
43. Silberring J., Problemy proteomiki klinicznej — trendy, niebezpieczeństwa i problemy. *Postępy Biologii Komórki* 2009; 36 (25): 111–115.