

BARTOSZ TARKOWSKI, AGNIESZKA GIRSTUN

*Instytut Biochemii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
e-mail: bartosztarkowski@future-net.pl
agirstun@biol.uw.edu.pl*

ZASTOSOWANIE SPEKTROMETRII MAS W POSZUKIWANIACH BIOMARKERÓW CHORÓB NOWOTWOROWYCH

WSTĘP

Proteomika zajmuje się globalną analizą składu białkowego komórki, tkanki lub organizmu. Jej wyzwaniem jest badanie proteomu – struktury wysoce dynamicznej, której charakter, choć determinowany w dużej mierze przez statyczny genom, zmienia się w czasie w zależności od warunków środowiska. Potrzeba bezpośredniej analizy proteomu wynika przede wszystkim z tego, że wiele jego istotnych parametrów nie może zostać ustalonych z poziomu genomu lub transkryptomu komórki ze względu na istnienie procesów takich jak zróżnicowana szybkość syntezy i degradacji mRNA, splicing, zróżnicowana szybkość syntezy i degradacji białek, ich modyfikacje posttranslacyjne oraz kompartmentyzacja (PHYZICKI i współaut. 2003).

Białka są głównym nośnikiem aktywności biologicznej, toteż ustalenie jakim ulegają one zmianom pod wpływem określonych bodźców, może dać nam wiele istotnych informacji o molekularnych mechanizmach różnorodnych wewnątrzkomórkowych procesów, w tym również procesów patogenezy. Ponieważ choroby człowieka są często wynikiem bardzo złożonych zależności obejmujących zmianę funkcjonowania licznych białek, badania tych makrocząsteczek z pomocą metod proteomicznych mogą pomóc w znalezieniu skutecznych sposobów terapii i diagnozy. Proteomika znalazła tu zastosowanie przede wszystkim w poszukiwaniu nowych biomarkerów, ale również w poznawaniu mechanizmów chorobotwórczych, opracowy-

waniu leków i szczepionek oraz w badaniu patogenów (HANASH 2003).

Na przestrzeni ostatnich lat zostało wynalezionych wiele technik umożliwiających globalną analizę proteomu. W poszukiwaniach biomarkerów stosowane są metody umożliwiające porównywanie złożonych mieszanin białkowych oraz identyfikację i ocenę ilościową ich poszczególnych składników. Wykorzystywane są tu głównie: elektroforeza dwukierunkowa (ang. 2-dimensional electrophoresis, 2-DE) oraz spektrometria mas (ang. mass spectrometry, MS). Ta ostatnia okazała się być niezastąpionym narzędziem wykorzystywanym w biologii molekularnej głównie dzięki temu, że jest to metoda wysoce czuła, zdolna do analizowania próbek o wysokiej złożoności. Pierwotnie sama MS była wykorzystywana tylko do identyfikacji białek, ale ostatnio, dzięki rozwojowi wielu technik wykorzystujących stabilne izotopy, możliwe jest wykorzystanie jej także w ocenie ilościowej. Jej gwałtowny rozwój był możliwy przede wszystkim dzięki opracowaniu baz sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych, jak również dzięki wynalezieniu nowych technologii, szczególnie w sferze jonizacji peptydów (TYERS i MANN 2003). W proteomice MS stosowana jest w wykrywaniu interakcji białkowych, modyfikacji posttranslacyjnych białek, mapowaniu poszczególnych kompartmentów komórkowych czy też ilościowej analizie ekspresji genów w różnych stanach fizjologicz-

nych (YATES 1998, AEBERSOLD i MANN 2003, STEEN i MANN 2004).

Analizę proteomiczną można zasadniczo podzielić na: pobranie próbki, jej wstępne

frakcjonowanie, właściwą analizę składu oraz przetwarzanie uzyskanych danych.

IZOLACJA MATERIAŁU I WSTĘPNE FRAKJONOWANIE PRÓBK

Sposób pobierania próbki jest bardzo istotny we wszelkich badaniach mających na celu charakterystykę proteomu, ponieważ na stężenie białek wpływać może bardzo wiele czynników. Dużą rolę odgrywa tutaj zarówno zmienność osobnicza, jak i warunki izolacji materiału, podczas której białka mogą ulegać przemianom, takim jak proteoliza, agregacja czy też utlenianie. Czynniki, które powinny być brane pod uwagę, to np. czas i warunki przetrzymywania badanego materiału. W przypadku pośmiertnego pobrania tkanek należy również uwzględnić czas między zgonem a ich izolacją. Jeżeli materiał jest pozyskiwany z żywego organizmu, wpływ na skład białkowy próbki ma nawet pora dnia, w której dokonano jej pobrania. Jeśli do jakości próbki nie przykładamy należytej wagi, zmiany wynikające z czynników zewnętrznych mogą zostać zinterpretowane jako wynik istotnych procesów biologicznych.

Pewnym problemem podczas izolowania materiału do badań jest znaczna heterogenność tkanek. Oznacza to, że nieraz komórki, w których zachodzą interesujące (np. chorobotwórcze) procesy, stanowią niewielki procent wszystkich komórek danej tkanki. Z tego powodu ewentualne zmiany mogą być maskowane, jeżeli badaniom nie zostaną poddane jedynie ściśle określone populacje komórek. Dlatego często analizie proteomicznej poddawane są komórki hodowane *in vitro*, co jednak nie gwarantuje, że zaobserwowane zjawiska będą zachodziły także *in vivo*. Do izolowania z tkanek określonych typów komórek mogą posłużyć przeciwciała, lecz wykorzystanie tego typu technik również nie daje pewności, że w próbce znajdują się komórki reprezentatywne dla badanej populacji. Alternatywne metody izolacji ściśle określonych fragmentów tkanek opierają się na preparowaniu ich pod mikroskopem przy

wykorzystaniu lasera. Najczęściej wspomina w literaturze tego typu technika zwana w skrócie LCM (ang. laser capture microdissection) znalazła już wiele zastosowań jako metoda pobierania próbki do analizy (CRIVEN i BANKS 2001).

Komórka może zawierać ponad 100000 różnych białek, a różnice w ich ilości mogą wahać się w zakresie nawet 10 rzędów wielkości (STASYK i HUBER 2004). Oferowane przez proteomikę narzędzia, mimo imponujących możliwości, nie pozwalają z zadowalającą specyficznością i czułością charakteryzować tak złożone mieszaniny. Dlatego, w niemalże każdej globalnej analizie białek badacze skupiają się jedynie na określonej frakcji proteomu, co na ogół czyni ich zadanie o wiele łatwiejszym i pozwala wysnuć więcej rzetelnych wniosków. Tego typu podejście umożliwia przede wszystkim identyfikację białek o niewielkiej liczbie kopii, pełniących nieraz istotne funkcje regulacyjne, których obecność jest normalnie maskowana przez białka występujące obficie. Poza tym, sam charakter przeprowadzanych badań wymaga niejednokrotnie analizy jedynie określonej frakcji białek (np. białek określonego kompartmentu komórki lub niosących daną modyfikację), co automatycznie zezwala na pominięcie znacznej części proteomu na samym początku eksperymentu.

W celu zmniejszenia złożoności badanej próbki stosuje się zatem wyodrębnianie określonych przedziałów komórkowych lub poszczególnych organelli, izolowanie wybranych kompleksów białkowych, jak również izolację białek niosących określone modyfikacje lub posiadających szczególne właściwości fizykochemiczne (masa cząsteczkowa, punkt izoelektryczny, hydrofobowość itp.) (STASYK i HUBER 2004).

SPEKTROMETRIA MAS W PROTEOMICE

Analiza proteomu przy zastosowaniu MS jest przeprowadzana głównie z pomocą dwóch podejść. Pierwsze opiera się na

wykorzystaniu 2-DE jako metody rozdzielania białek i ich analizy ilościowej, po której przeprowadzana jest ich ekstrakcja z żelu

z jednoczesnym trawieniem specyficzną proteazą i identyfikacją za pośrednictwem MS. Wykorzystanie spektrometrii mas umożliwia tu identyfikację <1ng materiału pochodzącego z jednej plamy widocznej na żelu. W drugim podejściu, zwanym czasami proteomiką typu „shotgun”, próbka zostaje poddana trawieniu jeszcze przed właściwym rozdzieleniem, przeprowadzanym za pomocą wielostopniowej chromatografii cieczowej. Rozdzieleniu ulegają tu same peptydy, a dzięki sprzężeniu kolumn chromatograficznych bezpośrednio ze źródłem jonów spektrometru masowego, możliwa jest automatyzacja procesu i osiągnięcie wysokiej przepustowości. Podejście to, zwane technologią wielowymiarowej identyfikacji białek (ang. multidimensional protein identification technology, MudPIT) (WOLTERS i współaut. 2001), ma jednak również wady, polegające na tym, że pewne istotne informacje o danym białku są niemożliwe do ustalenia. Wynika to z tego, że nie wszystkie peptydy danego białka są wykrywane przez spektrometr masowy, przez co np. modyfikacje posttranslacyjne obecne na tych peptydach nie mogą zostać określone.

Oba wyżej wymienione podejścia należą do tzw. typu „bottom-up”, gdzie poznając stosunek masy do ładunku (m/z) fragmentów danego białka jesteśmy w stanie określić jego częściową sekwencję i tożsamość. Ostatnio coraz częściej stosowana jest analiza typu „top-down”, gdzie początkowo wyznaczany jest m/z całego białka, a następnie jego fragmentów. Analiza m/z fragmentów białka zezwala na ustalenie części jego sekwencji i identyfikację. Porównanie danych eksperymentalnych o masie molekularnej białka (i wywodzących się z niego peptydów) z danymi teoretycznymi pokazuje gdzie występują ewentualne różnice masy i pozwala na determinację miejsc modyfikacji posttranslacyjnych. W podejściu typu „top-down” dużą rolę odgrywają spektrometry FTICR (ang. Fourier transform ion cyclotron resonance – zob. dalej) ze względu na wysoką rozdzielczość, oraz nowe sposoby fragmentacji jonów, jak ECD (ang. electron capture dissociation), pozwalająca na efektywniejszą fragmentację jonów bez utraty modyfikacji posttranslacyjnych (KELLEHER 2004).

Analiza białek przy użyciu spektrometru masowego dzieli się zasadniczo na następujące etapy: przygotowanie próbki, trawienie próbki, jonizacja peptydów, analiza masy oraz analiza danych. Trawienie białek jest wymagane z kilku powodów. Po pierwsze,

czułość spektrometru masowego dla białek jest znacznie mniejsza niż dla peptydów. Po drugie, masy całych białek nie podają tak dokładnej informacji o ich tożsamości, jak masy wywodzących się z nich peptydów. Po trzecie, wiele białek jest nierozpuszczalnych w formie natywnej. Dzięki proteolizie przeprowadzana jest również ekstrakcja peptydów z żeli poliakryloamidowych w celu identyfikacji zawartych w nich białek.

Analizę spektrometryczną peptydów można podzielić na trzy etapy: jonizację, analizę masy, detekcję. Określenie wartości m/z , przy odpowiednio wysokiej rozdzielczości analizatora masy umożliwiające ustalenie ładunku cząsteczek, pozwala na wyznaczenie ich masy.

TECHNIKI JONIZACJI

Obecnie najczęściej wykorzystywane techniki jonizacji próbki to „wspomagana przez matrycę laserowa desorpcja/ionizacja” (ang. matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI) oraz jonizacja przez elektro-rozpylanie (ang. electrospray ionization, ESI). W MALDI materiał umieszczony na chemicznie obojętnym podłożu poddaje się krystalizacji wraz ze związkiem absorbującym UV, który, po naświetleniu laserem o odpowiedniej długości fali, pomaga przeprowadzić peptydy do fazy gazowej i zjonizować (STEEN i MANN 2004). Swego rodzaju modyfikacją tej techniki jest „powierzchniowo wzmocniona laserowa desorpcja/ionizacja” (ang. surface enhanced laser desorption/ionization, SELDI), w której badana próbka jest wstępnie frakcjonowana na specjalnie ku temu przygotowanych podłożach, na zasadzie chromatografii hydrofobowej, jonowymiennej, powinowactwa itp. Oczyszczona frakcja jest następnie na tym samym podłożu traktowana, podobnie jak w MALDI, odpowiednim związkiem stanowiącym matrycę i naświetlana laserem w celu jonizacji peptydów. Technika ta znalazła już wiele zastosowań w proteomice, również w poszukiwaniu biomarkerów, ponieważ umożliwia znaczne usprawnienie analizy porównawczej wielu próbek (ISSAQ i współaut. 2002). W przypadku ESI badana próbka ulega rozpyleniu przy ujściu kolumny chromatograficznej (STEEN i MANN 2004). Dzięki istnieniu wysokiego potencjału elektrycznego między końcem kapilary a wejściem do spektrometru masowego wytwarzane są wysoko naładowane kropelki. Z pomocą gazu lub ciepła rozpuszczalnik zostaje odparowany i w rezultacie do spektrometru

trafiają same zjonizowane peptydy. Główną zaletą ESI jest analiza peptydów wprost z roztworu oraz brak interferencji od matrycy (co stanowi problem w przypadku wykorzystania techniki MALDI). Źródło jonów typu ESI może również zostać bezpośrednio sprzężone z wcześniejszymi etapami frakcjonowania peptydów przy użyciu kolumn chromatograficznych.

ANALIZA MAS

Analizator masy jest centralnym elementem technologii, a jego kluczowymi parametrami przy zastosowaniach w proteomice są czułość, rozdzielczość, precyzja pomiaru oraz ewentualna możliwość tworzenia tandemowego widma mas, o czym dokładniej będzie mowa później. Głównymi stosowanymi dzisiaj analizatorami są: analizator kwadrupolowy, analizator czasu przelotu (ang. time-of-flight, TOF), pułapki jonowe (ang. ion trap, IT) oraz cyklotronowy rezonans jonowy z transformacją Fouriera (YATES 1998, AEBERSOLD i MANN 2003). Poszczególne źródła jonów oraz analizatory mas mogą być łączone w różnorodnych konfiguracjach, w celu wykorzystania zalet każdego z urządzeń.

Tandemowa spektrometria mas (MS/MS) (STEEN i MANN 2004) przeprowadzana jest przy użyciu spektrometrów masowych umożliwiających poddanie określonego jonu fragmentacji. Najczęściej używaną techniką fragmentacji jest dysocjacja indukowana zderzeniami (ang. collision-induced dissociation, CID) (YATES 1998, STEEN i MANN 2004), która polega na zrywaniu wiązań peptydowych pod wpływem zderzeń zjonizowanego peptydu z gazem obojętnym, takim jak argon lub hel. Na typowy eksperyment MS/MS składają się trzy etapy: selekcja określonych peptydów powstałych po trawieniu proteolitycznym białka, fragmentacja wyselekcjonowanych peptydów oraz analiza mas powstałych fragmentów. W dużym uproszczeniu, uzyskany w ten sposób zestaw fragmentów stanowi populację peptydów o kolejnych masach, które różnią się między sobą o masę odpowiedniego aminokwasu obecnego w sekwencji peptydu rodzicielskiego. Pozwala to na utworzenie tandemowego widma mas, w którym zawarta jest informacja na temat sekwencji analizowanych peptydów.

IDENTYFIKACJA BIAŁEK

Sposoby identyfikacji białek można podzielić na: wykorzystujące białkowe lub nukleotydowe bazy danych oraz metody se-

kwencjonowania *de novo*. W przypadku metod wspomaganych bazami danych możliwe jest wykorzystanie tzw. „masowego odcisku palca” białka (ang. peptide-mass fingerprint) lub danych uzyskanych w wyniku przeprowadzenia eksperymentu tandemowej spektrometrii mas (STEEN i MANN 2004). Sekwencjonowanie *de novo* wymaga zastosowania MS/MS, ponieważ eksperyment tego rodzaju dostarcza informacji o sekwencji analizowanych peptydów, w odróżnieniu od masowego odcisku palca, który nie niesie tego typu informacji.

Identyfikacja białek przy użyciu „masowego odcisku palca” opiera się na uzyskaniu widma mas peptydów powstałych po strawieniu analizowanej mieszaniny specyficzną proteazą (JENSEN i współaut. 1997). Te dane porównuje się z teoretycznymi widmami mas, które powstałyby po strawieniu tą samą proteazą każdego białka, którego sekwencja jest obecna w przeszukiwanej bazie danych. W tym celu wykorzystuje się programy takie jak ProFound, Mascot czy MS-Fit. Metoda ta znalazła zastosowanie przy ustalaniu białkowego składu plam w żelach po elektroforezie dwukierunkowej. Jej główną wadą jest to, że nadaje się jedynie do analizowania próbek o niskiej złożoności. Poza tym, zbyt mała liczba wykrytych peptydów lub zmiany ich mas wynikające z modyfikacji postranslacyjnych mogą uniemożliwić ustalenie tożsamości danego białka.

Dane uzyskane podczas eksperymentu MS/MS również mogą być wykorzystane do przeszukiwania baz danych z pomocą jednego z dostępnych algorytmów, takich jak Mascot, SEQUEST, czy PeptideSearch. Identyfikacja białka przy ich użyciu opiera się bądź na próbie interpretacji przynajmniej części widma MS/MS, w celu uzyskania częściowej sekwencji i wykorzystania jej do poszukiwań odpowiadającej jej sekwencji w bazie danych (PeptideSearch), bądź też na porównywaniu widm eksperymentalnych z widmami przewidzianymi dla poszczególnych sekwencji z bazy (Mascot, SEQUEST).

Wiele informacji i porównań dostępnych programów służących do identyfikacji białek za pośrednictwem ich masowego odcisku palca lub tandemowej spektrometrii mas można znaleźć w następujących pracach przeglądowych (CHAMRAD i współaut. 2004, SADYGOV i współaut. 2004).

Mimo wielkiej użyteczności baz danych przy identyfikowaniu białek metodami spektrometrii mas, niekompletność lub brak se-

kwencji genomowych wielu organizmów niejednokrotnie zmusza badaczy do sięgnięcia po metody sekwencjonowania *de novo* (STANDIG 2003). Tutaj sekwencję peptydu próbuje się ustalić jedynie na podstawie tandemowego widma mas. Jak już wcześniej wspomniano, różnice mas między kolejnymi fragmentami peptydu odpowiadają masom kolejnych aminokwasów w jego sekwencji. W ten sposób ustalane są sekwencje peptydów wywodzących się z trawienia białek specyficznymi proteazami. W interpretacji uzyskanych danych pomaga jeden z opracowanych do tego celu komputerowych algorytmów. Ponieważ celne zinterpretowanie tandemowego widma mas jest niejednokrotnie trudne ze względu na powstawanie w procesach jonizacji i fragmentacji różnych populacji jonów, stosowane są metody chemicznej modyfikacji oraz znakowania izotopami (REINDERS i współaut. 2004). Umożliwiają one wzbogacenie lub zubożenie widma w jony określonej populacji lub ich łatwe rozróżnienie. Utrudnieniem w sekwencjonowaniu *de novo* są również aminokwasy o podobnych lub wręcz takich samych masach, jak to jest w przypadku izoleucyny i leucyny. Podobnie, pewne kombinacje aminokwasów mogą stanowić problem przy interpretowaniu tandemowego widma mas.

ANALIZA ILOŚCIOWA BIAŁEK

Często, oprócz samej obecności danego białka, obiektem zainteresowań jest również jego ilość. Niestety, intensywność sygnału pochodzącego od danego jonu nie koresponduje bezpośrednio z ilością odpowiadającego mu peptydu w próbce, ze względu na takie zjawiska jak zróżnicowana rozpuszczalność i efektywność jonizacji różnych peptydów. Parametry te są jednak powtarzalne, więc wysokości szczytów na widmie masowym dla tych samych peptydów mogą być dobrym wskaźnikiem względnej ilości danego białka w poszczególnych eksperymentach.

Metody ustalania bezwzględnej ilości białek opierają się przede wszystkim na ocenie ich ilości względem dodawanych w znanym stężeniu wewnętrznych standardów wyznaczonych stabilnymi izotopami (BRÖNSTRUP 2004). Znaczna część eksperymentów proteomicznych polega jednak na porównywaniu dwóch lub większej liczby próbek (np. proteomu komórek w stanie chorobowym i w normalnym stanie fizjologicznym). Jest to tzw. proteomika różnicowa, która skupia się na ocenie względnej ilości i jakości białek.

Jak dotąd tego rodzaju eksperymenty opierały się na porównywaniu próbek z pomocą metod żelowych (SDS-PAGE i 2D-PAGE) i następującej identyfikacji za pośrednictwem MS białek o różnym poziomie ekspresji (GÖRG i współaut. 2004). Stopniowo wprowadzane są metody niewymagające porównywania ilości białek w żelu, wykorzystujące stabilne izotopy. Opierają się one na założeniu, że peptydy wywodzące się z różnych prób, wyznakowane różnymi izotopami, będą zachowywały się podczas eksperymentu identycznie. Dzięki niewielkiej różnicy mas, możliwa będzie za to ocena różnicy w ich ilości na podstawie uzyskanego widma.

Obecnie rozwijanych jest kilka technik wykorzystujących stabilne izotopy w proteomice różnicowej. W eksperymentach, gdzie materiał pobierany jest z hodowli komórkowych, można zastosować metodę zwaną znakowaniem stabilnym izotopem w hodowli komórkowej (ang. stable isotope labeling in cell culture, SILAC) (ONG i współaut. 2002). W jednej z prób określony aminokwas w pożywce zostaje zastąpiony analogiem wyznaczonym ^2H , ^{13}C lub ^{15}N i w trakcie hodowli wbudowany do białek. Następnie próba odniesienia i wyznakowana zostają ze sobą połączone, a ich proteomy wspólnie poddane analizie spektrometrycznej. Uzyskane spektrum mas umożliwia określenie ewentualnych różnic. Zaletą tej metody jest wysoki procent wyznakowania, przy odpowiednio długiej inkubacji materiału w medium ze zmodyfikowanym aminokwasem, jednak jej użycie jest oczywiście ograniczone do hodowli komórkowych. To ograniczenie nie występuje w przypadku metody wykorzystującej ICAT (ang. isotope-coded affinity tag) (GYGI i współaut. 1999), gdzie białka są znakowane dopiero po ich izolacji. Umożliwia to znacznik złożony z trzech modułów: (1) grupy biotynowej, pozwalającej na łatwą izolację wyznakowanych białek na kolumnach ze streptawidyną, (2) łącznika zawierającego określony izotop, który umożliwia relatywną ocenę ilości peptydu oraz (3) grupy umożliwiającej wiązanie znacznika do cystein. Proteomy wyizolowane z komórek w określonych stanach fizjologicznych są traktowane znacznikiem zawierającym określony izotop, łączone ze sobą i analizowane z pomocą spektrometrii mas. Wadą tej techniki jest to, że jedynie peptydy zawierające cysteiny podlegają kwantyfikacji. Problem ten nie istnieje w przypadku następnej metody. Peptydy mogą również zostać wyznakowane ^{18}O po-

chodzącym z wody zawierającej ten izotop tlenu, która jest środowiskiem reakcji proteolizy badanych białek. W wyniku reakcji enzymatycznej na każdym nowopowstającym C-końcu peptydu jeden lub dwa atomy tlenu grupy karboksylowej ulegają podstawieniu. Następnie próbki inkubowane z enzymem w obecności $H_2^{16}O$ i $H_2^{18}O$ zostają ze sobą połączone i poddane spektrometrii mas. Po-

nieważ każde strawione białko zostaje wyznaczone, nie dochodzi tu do zawężenia „obszaru poszukiwań”, jak w przypadku metod wykorzystujących ICAT. Poza tym, nie jest tu wymagane przeprowadzenie chromatografii powinowactwa, co pozwala uniknąć dodatkowych strat w analizowanej próbce (SAKAI współaut. 2005).

POSZUKIWANIE BIOMARKERÓW BIAŁKOWYCH

Biomarkery są wskaźnikami procesów biologicznych zachodzących w komórce lub całym organizmie. Mogą nimi być rozmaite cechy fenotypowe i genotypowe, jak np. określone allele genów, małe metabolity lub białka. Ich wykrywanie polega na analizie porównawczej materiału pobranego z komórek lub organizmów w różnych stanach fizjologicznych (np. komórki nowotworowe i komórki niestransformowane pochodzące z tego samego rodzaju tkanki).

Ponieważ dla danego stanu chorobowego powinien istnieć specyficzny zestaw biomarkerów, mogą one znaleźć zastosowanie w różnorodnych obszarach medycyny, w tym w badaniach przesiewowych, diagnozie, prognozowaniu postępu choroby, monitorowaniu odpowiedzi na terapię, czy też jako cele nowo opracowanych leków. Poza tym, mogą posłużyć jako obiekt dalszych badań naukowych mających na celu ustalenie molekularnych mechanizmów patogenezы konkretnych chorób.

Ponieważ w stanach patologicznych funkcjonalność białek jest często zaburzona, to właśnie w tej klasie związków upatruje się główne źródło nowych biomarkerów. Skupienie poszukiwań w tym właśnie obszarze ma jeszcze jedno uzasadnienie – większość stosowanych leków jest skierowana przeciwko białkom, a jednocześnie gama obecnie dostępnych celów jest zaskakująco wąska (REISS 2001). Dlatego wykrywanie biomarkerów białkowych powinno zaowocować wprowadzeniem na rynek wielu nowych medykamentów.

W poszukiwaniach biomarkerów białkowych szeroko wykorzystywane są metody rozdzielania oparte na chromatografii i elektroforezie w połączeniu z identyfikacją z pomocą MS. Takie podejście umożliwia wykrycie biomarkerów bez uprzedniego posiadania o nich jakichkolwiek informacji. Wykorzystanie metod proteomiki ma również tę zaletę,

że umożliwia jednocześnie wykrywanie wielu celów. Ma to istotne znaczenie, jeśli weźmiemy pod uwagę, iż możliwości określenia stanu fizjologicznego organizmu za pomocą zaledwie jednego biomarkera są znacznie ograniczone. Potrzebne jest więc przyporządkowanie całych paneli biomarkerów do określonych stanów patologicznych, by ich późniejsze zastosowanie było odpowiednio czułe i specyficzne (HALE i współaut. 2003, BISCHOFF i LUIDER 2004).

Warto zaznaczyć, że jednym z ciekawszych obszarów poszukiwań biomarkerów białkowych są płyny ustrojowe, takie jak osocze, mocz, czy płyn mózgowo-rdzeniowy. Jest to spowodowane tym, że płyny te mogą zostać pobrane od pacjentów za ich życia, podczas wszystkich stadiów choroby, a białka i peptydy obecne są w nich w formie rozpuszczonej. Ponadto tego typu biomarkery mają szansę zostać później bezpośrednio wykorzystane w diagnozowaniu określonych schorzeń.

W ogólnym zarysie, najczęściej stosowana w poszukiwaniu biomarkerów jest analiza porównawcza z wykorzystaniem 2-DE dwóch (lub więcej) wyizolowanych frakcji białek pochodzących z komórek lub organizmów w różnych stanach fizjologicznych. Białka o zróżnicowanej ekspresji są następnie identyfikowane na drodze ekstrakcji z żelu i przeprowadzanej po tym MS. Stopniowo wprowadzane są również metody niewymagające użycia żeli, oparte na wielowymiarowej chromatografii i MS (często w połączeniu ze znakowaniem jednej z prób stabilnymi izotopami). Prawie zawsze zróżnicowana ekspresja białek potwierdzana jest w osobnych eksperymentach przy wykorzystaniu metod immunologicznych, takich jak technika Western, testy ELISA, czy też immunocytochemia (gdą zróżnicowaniu ulega lokalizacja odpowiednich białek). Szeroko stosowana w poszukiwaniach biomarkerów raka jest ostatnio tak-

że metoda SELDI, z pomocą której próbuje się ustalić specyficzny wzór białek i peptydów (przede wszystkim w płynach ustrojowych) ludzi cierpiących na różnego typu nowotwory.

CHOROBY NOWOTWOROWE

Mimo intensywnych badań, choroby nowotworowe są nadal jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych. Proteomika ma szansę zrewolucjonizować podejście do tej grupy schorzeń, umożliwiając wcześniejsze wykrywanie raka, celniejsze diagnozowanie choroby, opracowanie nowych rodzajów terapii uwzględniających zapotrzebowania danego pacjenta oraz modulowanie leczenia w przypadku wystąpienia oporności na daną chemioterapię. Proteomika pozwoli również lepiej zrozumieć sekwencję zdarzeń zachodzących podczas nowotworzenia (SRINIVAS i współaut. 2002, MOCELLIN i współaut. 2004). Biomarkery białkowe znalazły już konkretne zastosowania w onkologii, np. antygen specyficzny dla prostaty (ang. prostate specific antigen, PSA) jest wykorzystywany w diagnozowaniu raka prostaty, -fetoproteina (AFP) w diagnozowaniu raka wątroby, a CD20 jest celem immunoterapii w przypadku chłoniaka nieziarniczego (SHAU i współaut. 2003). Ponieważ problem chorób nowotworowych jest nadal nierozwiązany, aktualnie przeprowadzanych jest wiele badań skupiających się na poszukiwaniu nowych biomarkerów najróżniejszych odmian raka (ALAIYA i współaut. 2003, WULFKUHL i współaut. 2003).

Zastosowania elektroforezy dwukierunkowej

Jak już wspomniano, przeważająca część eksperymentów mających na celu wyłonienie kandydatów na biomarkery danej choroby została przeprowadzona przy wykorzystaniu 2-DE. Ponieważ literatura w tym obszarze jest wyjątkowo bogata, ze względu na z góry ograniczoną długość tego artykułu oraz chęć przedstawienia alternatywnych metod poszukiwania markerów białkowych, autorzy ograniczyli się do przytoczenia poniżej zaledwie kilku prac z ostatnich lat.

Duża część badań nad rakiem z wykorzystaniem 2-DE skupia się na wyszukiwaniu różnic zachodzących w proteomie komórek pod wpływem transformacji nowotworowej. Ostatnio przeprowadzone zostały badania nad komórkami glejaka izolowanymi od pacjentów cierpiących na tego typu no-

wotwór mózgu (CHUMBALKAR i współaut. 2005). Wyłoniono w nich 72 białka o bardzo różnorodnych funkcjach, których poziom ekspresji, w zależności od stanu tkanki, ulegał zmianie. Warto przede wszystkim wspomnieć o obniżonej w przypadku komórek rakowych ekspresji proliny – supresora nowotworów, Rho-GDI – inhibitora dysocjacji Rho-GDP oraz białek szoku cieplnego, jak również o destabilizacji białka GFAP – głównego składnika filamentów glejowych. Podobne badania przeprowadzono dla raka trzustki pobierając materiał od 12 pacjentów, w którym wykryto zróżnicowany poziom ponad 100 białek (LU i współaut. 2004). Do wyróżnionych w eksperymencie należały, wiążące jony wapnia, białka z rodziny S100, małe białka wiążące GTP, białka cytoszkieletu (gelsolina, fascyna), czy też aneksyny. Badania przeprowadzone nad rakiem okrężnicy z wykorzystaniem agarozowej 2-DE wykazały obecność specyficznych dla komórek rakowych izoform określonych białek (TOMONAGA i współaut. 2004). Wykryte tutaj zmiany w jakości modyfikacji posttranslacyjnych miały charakter specyficznego wzoru cięcia proteolitycznego hydroksylazy proliny oraz jego braku w przypadku aneksyny A2. Stwierdzono również nadekspresję jednej z dwóch izoform eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 4H, pochodzącej z translacji dłuższego wariantu transkryptu genu.

Badania nad rakiem przełyku zostały przeprowadzone na materiale pobranym od pacjentów za pośrednictwem LCM, analizowanym następnie za pomocą różnicującej elektroforezy w żelu (ZHOU i współaut. 2002). Spośród ponad 1000 wykrytych białek, 58 okazało się być nadekspresjonowanych w komórkach rakowych, a 107 było w tych komórkach obecne w dużo niższym stężeniu. Identyfikacja zawartości części interesujących plam z żelu i eksperymenty przy wykorzystaniu techniki Western ostatecznie wskazały na białko gp96 występujące w stransformowanych komórkach w dużo większej ilości. Różnicującą elektroforezę w żelu zastosowano również w badaniach nad rakiem piersi, w których badano materiał pobrany od czterech pacjentek (SOMIARI i współaut. 2004). Zidentyfikowano białka z około 400 plamek w żelach świadczących o zróżnicowaniu ekspresji w tkankach objętych zmianami nowotworowymi. Wśród nich znalazły się, wskazywane przez inne badania nad rakiem, winkulina, gelsolina, -1-antytrypsyna, czy białka szoku cieplnego. Jednak wśród wszystkich

wyłonionych w eksperymencie potencjalnych biomarkerów, jedynie hsp70 (nadekspresja) oraz peroksyredoksyna (spadek ekspresji) konsekwentnie utrzymywały kierunek zmiany stężenia we wszystkich czterech próbach.

Biorąc pod uwagę, iż nowotworzenie jest procesem wieloetapowym, z punktu widzenia diagnozy i terapii kluczowym wydaje się ustalenie, w jaki sposób zmienia się ekspresja białek w czasie progresji nowotworu. Badania nad tym zagadnieniem zostały przeprowadzone na różnych liniach komórkowych wywodzących się z czerniaka w jego różnych stadiach rozwoju (BERNARD i współaut. 2003). W wyniku analizy porównawczej wyłoniono osiem potencjalnych biomarkerów. Wykorzystując technikę Western potwierdzono różnicowaną ekspresję czynnika wzrostu HDGF, nukleofosminy/B23 i katepsyny D, oraz zmiany w modyfikacjach posttranslacyjnych tych białek w zależności od linii komórkowej.

Jak już wcześniej zaznaczono, część poszukiwań biomarkerów raka skupia się na płynach ustrojowych człowieka, ponieważ mogą one stanowić dogodny materiał w późniejszej diagnostyce nowotworów. Pewną zależność stężenia określonych markerów we krwi od stadium zaawansowania choroby wykryto chociażby w przypadku raka wątroby (ang. hepatocellular carcinoma, HCC) (STEEL i współaut. 2003). HCC jest jedną z najgroźniejszych chorób nowotworowych, najczęściej wywołowaną przez zarażenie wirusem żółtaczkki typu B (ang. hepatitis B virus, HBV) lub C. Podczas eksperymentu wykorzystano próbki krwi pobrane od czterech grup pacjentów, klasyfikowanych względem występowania zakażenia HBV i zachorowania na HCC. Dowiedziano, że poziom polipeptydu będącego fragmentem białka C3 oraz izoformy apolipoproteiny A1 spadają wraz z kolejnymi stadiami prowadzącymi do rozwoju HCC. Ostatnio przeprowadzona została interesująca próba identyfikacji biomarkerów (również HCC) wśród glikoprotein osocza (BLOCK i współaut. 2005). W badaniach tych wykorzystano świszczę (*Marmota monax*) jako organizm modelowy. Po ustaleniu, że w przypadku zwierząt chorych białka glikozylowane zawierają większą ilość reszt fukozy, z obu grup zwierząt (chorych i zdrowych) wyizolowano interesujące frakcje glikoprotein. Po porównaniu obu frakcji z pomocą 2-DE okazało się, że jednym z nadekspresjowanych w przypadkach HCC białek było homologiem ludzkiego białka aparatu Golgiego 73 (ang. Golgi protein 73, GP73). Po przepro-

wadzeniu analizy osocza pacjentów chorych na HCC okazało się, że białko to jest u nich hiperfukozylowane i również występuje na podwyższonym poziomie. Ponadto, wstępne badania kliniczne wykazały, że podwyższony poziom GP73 może być tak samo, lub nawet bardziej skorelowany z występowaniem HCC, niż dotychczasowo wykorzystywany marker raka wątroby – AFP.

Jak widać, 2-DE okazała się być przydatnym narzędziem w poszukiwaniu biomarkerów chorób nowotworowych. Po dziś dzień jest ona główną metodą wykorzystywaną w globalnym porównywaniu ekspresji genów na poziomie białek, głównie dzięki wysokiej zdolności rozdzielczej, możliwości określenia punktu izoelektrycznego i masy molekularnej białka, jego obecnych izoform oraz modyfikacji posttranslacyjnych (GÖRG i współaut. 2004). Jednak metoda ta ma wiele ograniczeń: jest trudna do zautomatyzowania, białka o ekstremalnym punkcie izoelektrycznym lub wysoce hydrofobowe są często pomijane w analizie, a powtarzalność rozdzielców pozostawia wiele do życzenia. Z tych powodów wiele wysiłku wkłada się w opracowanie metod, które mogłyby zastąpić 2-DE w proteomice różnicowej.

Zastosowania stabilnych izotopów

W ostatnich latach opracowano metody bazujące na wykorzystaniu stabilnych izotopów, które umożliwiają ocenę ilościową białek z ominięciem rozdzielców elektroforetycznych i porównywania obrazów uzyskiwanych żeli. Ostatnio ukazało się kilka prac ukazujących zastosowanie tych metod w poszukiwaniach biomarkerów raka.

Metoda SILAC została zastosowana w dwóch eksperymentach, których celem było porównanie proteomów odpowiednich linii komórkowych. W pierwszym z nich porównano linie komórkowe wywodzące się z raka prostaty: PC3M i PC3M-LN4, różniące się zdolnością do tworzenia przerzutów (EVERLEY i współaut. 2005). Wyniki ukazują olbrzymi potencjał tej metody: zidentyfikowano ponad 1000 białek, z czego pod względem ilościowym porównano ponad 400, a wśród 83 zaobserwowano znaczne (przynajmniej trójkrotne) różnice w stężeniu pomiędzy badanymi liniami komórkowymi. Warto też zauważyć, że część białek, których ekspresja różniła się pomiędzy komórkami linii PC3M i PC3M-LN4, bierze udział w regulacji translacji. Związek zaburzeń tego procesu ze wzrostem inwazyjności komórek nowotwo-

rowych był wskazywany również przez inne grupy badawcze. Drugim przykładem zastosowania metody SILAC w badaniach nad chorobami nowotworowymi jest eksperyment, w którym porównywano białka sekrecyjne linii komórkowych HPDE i Panc1 (GRNBORG i współaut. 2005). Pierwsza z nich wywodzi się ze zdrowych komórek trzustki, a druga z komórek, które uległy transformacji nowotworowej. Ograniczenie się jedynie do białek wydzielanych na zewnątrz komórki miało tu istotny cel – zwiększenie prawdopodobieństwa wykrycia biomarkerów mających szansę zostać później zastosowane w diagnostyce opartej na badaniu płynów pobieranych od pacjentów. Zidentyfikowano 195 białek, z czego aż 145 określono jako ulegające sekrecji na zróżnicowanym poziomie, jednak należy nadmienić, że za znaczącą uznano tu już półtorakrotną różnicę. Eksperyment ten wyróżnił szereg białek o różnorodnych funkcjach, a wśród nich perlekan, antygen CD9, apolipoproteina E, integryny czy też cytokiny, których rola w rozwoju raka trzustki nie była do tej pory znana.

Technikę wykorzystującą ICAT zastosowano do porównania proteomów hepatocytów wyizolowanych za pomocą LCM z tkanki zdrowej i zmienionej nowotworowo (LI i współaut. 2004). Spośród ponad 600 zidentyfikowanych białek, oszacowano względne ilości 241, a dla 149 wykazano przynajmniej dwukrotną różnicę w poziomie ekspresji. Następnie wyróżnione białka częściowo przyporządkowano do jedenastu różnych grup, względem ich przewidywanej funkcji. Inna grupa porównała z pomocą ICAT leukocyty B wyizolowane od pacjentów chorych na białaczkę (BARNIDGE i współaut. 2005). Porównywano tu komórki mające zmutowany lub dziki allel genu zmiennego łańcucha ciężkiego immunoglobuliny, ponieważ mutacja w tym genie wiąże się z większym stopniem agresywności nowotworu. Osobno porównywano białka frakcji błonowej i cytozolowej doprowadzając do wyróżnienia 13 białek o przynajmniej trzykrotnej różnicy w poziomie ekspresji, z czego na szczególną uwagę zasługują oksydaza cytochromu c oraz jądrowa fosfoproteina pp32 (największe zróżnicowanie).

Technika LCM posłużyła do pobrania komórek pacjentek chorych na raka piersi w badaniach wykorzystujących znakowanie ^{18}O do porównania frakcji białkowej komórek nowotworowych i zdrowych (ZANG i współaut. 2004). Zidentyfikowano 76 bia-

łek, a ilościowo udało się porównać 12. Wśród nich wykryto zróżnicowany poziom dehydrogenazy izocytrynianowej, białka 14-3-3 /, aldolazy bisfosforanu fruktozy, czy też czynnika elongacji translacji 1-2, które już wcześniej wiązane były z rozwojem raka piersi. Znakowanie ^{18}O zastosowano również w badaniach nad opornością na chemioterapię (BROWN i FENSELAU 2004). W badaniach tych jako model posłużyły linie komórkowe MCF-7 (wrażliwa i oporna na doxorubicyn – lek działający na topoizomerazę II oraz wywołujący stres oksydacyjny w komórce) wywodzące się z nowotworu piersi. W komórkach będących opornymi na chemioterapię wykryto podwyższony poziom metalotioneiny i tioredoksyny (białka pełniące rolę antyoksydantów w komórce), co nie było zaskoczeniem, biorąc pod uwagę mechanizm działania doxorubicynu. Stwierdzono również podwyższony poziom inhibitorów apoptozy oraz ubikwityny i białka podobnego do ubikwityny – NEDD8. Ten ostatni fakt wydaje się szczególnie istotny, ponieważ nadmierna aktywność systemu proteolizy zależnego od ubikwityny została już wykazana w komórkach opornych na chemioterapię. Mechanizm tego zjawiska upatrywany jest w szybkiej degradacji białek uszkodzonych pod wpływem działania stresu oksydacyjnego wywołanego przez leki takie jak doxorubicyn.

Należy jeszcze zaznaczyć kilka interesujących faktów wspólnych dla większości wymienionych tu doświadczeń wykorzystujących stabilne izotopy. Po pierwsze, w wielu z tych eksperymentów zidentyfikowano białka o punkcie izoelektrycznym lub masie molekularnej wykluczających analizę takich białek z pomocą 2-DE. Po drugie, częstym było wykrywanie zróżnicowanej ekspresji dotychczas znanych biomarkerów raka, co może pośrednio świadczyć o przydatności tych metod w poszukiwaniu nowych biomarkerów. Po trzecie, metody te pozwalają na określenie względnego poziomu i identyfikację nawet kilkuset różnych białek w jednym eksperymencie, co przy wykorzystaniu elektroforezy dwukierunkowej jest wyjątkowo żmudnym procesem.

Zastosowania SELDI

Technologia SELDI posłużyła do opracowania paneli biomarkerów obecnych we krwi wielu rodzajów raka, m.in. raka jajników (PETRICOIN i współaut. 2002, KOZAK i współaut. 2003, VLAHOIU i współaut. 2003), piersi (LARONGA i współaut. 2003-2004), płuc

(XIAO i współprac. 2002-2003, YANG i współprac. 2005), prostaty (ADAM i współprac. 2002, QU i współprac. 2002), trzustki (KOOPMANN i współprac. 2004), nerki (WON i współprac. 2003), jak również nowotworów płaskokomórkowych głowy i szyi (SOLTYS i współprac. 2004). W badaniach tych porównywano profile peptydów i białek obecnych we krwi ludzi chorych i zdrowych (oraz ewentualnie w stadiach pośrednich, z rozwiniętymi nowotworami niezłośliwymi lub chorobami tych samych narządów o podłożu innym niż nowotworowe). Należy zaznaczyć, że skupiono się tu na ustaleniu, które ze szczytów na uzyskanych widmach są charakterystyczne dla ludzi chorych, a które dla ludzi zdrowych, nie identyfikując odpowiadających im peptydów i białek. Eksperymenty te opierały się na wykorzystaniu dużej ilości próbek krwi (często od kilkuset pacjentów). W pierwszym stadium, z pomocą odpowiednich algorytmów, ustalano, które szczyty na widmach mas najlepiej różnicują ludzi chorych od zdrowych. Następnie testowano opracowane panele biomarkerów na podobnej ilości próbek, co na ogół wykazywało ich wysoką czułość i specyficzność diagnozowania raka, często wyższą niż wykorzystywanych do tej pory metod diagnostycznych. Jednak w przypadku badań nad rakiem płaskokomórkowym głowy i szyi (SOLTYS i współprac. 2004) uzyskane panele biomarkerów charakteryzowały się umiarkowanymi wskaźnikami specyficzności i czułości, rzędu 60-80%. W tym przypadku zasugerowano, że frakcje surowicy krwi, w których znajdowały się najbardziej różnicujące cząsteczki, mogły zostać pominięta w analizie. Wynika to z charakteru metody SELDI – analizowana jest z jej pomocą jedynie określona frakcja próbki, zdolna do wiązania się do określonych podłoży na zasadzie chromatografii. Rozwiązaniem tego problemu mogłoby być zastosowanie wielu podłoży o różnych właściwościach chromatograficznych oraz późniejsze połączenie danych widmowych uzyskanych z każdego z tych podłoży. W podobny sposób wykorzystano technologię SELDI w poszukiwaniach biomarkerów raka piersi w płynie aspirowanym z brodawki sutkowej (PAWELETZ i współprac. 2001) oraz biomarkerów raka pęcherza moczowego obecnych w moczu (VLAHOU i współprac. 2001). Metoda SELDI została również zastosowana do zbadania lizatów komórek nabłonkowych prostaty wyizolowanych z pomocą techniki LCM (CAZARES i współprac. 2002). Porównywano tu populacje komórek

w różnym stadium zaawansowania raka tego narządu. Co istotne, jest to jedna z niewielu prac, w której pokuszono się o potwierdzenie zróżnicowania ekspresji jednego z wcześniej znanych markerów raka prostaty, aby uwiarygodnić SELDI jako metodę poszukiwania nowych biomarkerów.

SELDI wykorzystano również w badaniach, których wynikiem było ustalenie tożsamości określonych biomarkerów. W przypadku badań nad rakiem trzustki (ROSTY i współprac. 2002) porównywano widma mas białek soku trzustkowego ludzi chorych na raka tego narządu i cierpiących na schorzenia o innym podłożu. Następnie ustalono masę molekularną białka, od którego pochodziły dwa szczyty na uzyskanych widmach masowych, różnicujące pacjentów dotkniętych chorobą nowotworową od pozostałych. Dzięki przeszukaniu baz danych zidentyfikowano białko o odpowiedniej masie – HIP/PAP-1, które było dotąd wiązane z występowaniem chorób trzustki i wątroby. Podwyższony poziom tego białka w soku trzustkowym, jak i we krwi ludzi chorych na raka potwierdzono stosując metody immunologiczne. W podobny sposób przeprowadzono identyfikację biomarkerów we krwi dla raka jajników (ZHANG i współprac. 2004). Tu jednak najbardziej różnicujące szczyty na widmach masowych przyporządkowano odpowiednim białkom dzięki wielokrotnemu frakcjonowaniu próbek krwi względem właściwości biochemicznych białek. Każdą z tych frakcji sprawdzano z pomocą SELDI, czy zawiera białka odpowiedzialne za powstawanie różnicujących sygnałów. W końcu stosując metodę „masowego odcisku palca” ustalono tożsamość składników odpowiednich frakcji. W ten sposób zidentyfikowano apolipoproteinę A1, fragment transtyretyny (obecne w niższym stężeniu we krwi pacjentów) i fragment ciężkiego łańcucha H4 inhibitora inter-trypsyny (obecny w wyższym stężeniu we krwi pacjentów). Na podobnej zasadzie dowiedziono w ostatnim czasie, że peptydy HNP 1, 2 i 3 obecne we krwi, mogą znaleźć zastosowanie jako biomarkery raka okrężnicy (ALBRETHSEN i współprac. 2005).

Wyżej wymienione przykłady ukazują, że technologia SELDI może być z powodzeniem stosowana do wykrywania markerów raka, a może również jako narzędzie diagnostyki medycznej. Wiarygodność biomarkerów wykrywanych z pomocą SELDI jest jednak przez niektórych podważana. Wskazuje się na szereg jej właściwości, które dyskryminują aplikację

tej metody w tego typu badaniach. Po pierwsze, jest to metoda czuła przede wszystkim w stosunku do peptydów i białek o wysokim stężeniu. Tymczasem, najważniejszymi, z punktu widzenia wykrywania biomarkerów, są te cząsteczki, które obecne są we krwi w niskim stężeniu. Po drugie, widma mas generowane z pomocą SELDI nie dają informacji o ilości i tożsamości tych markerów, co uniemożliwia potwierdzenie zaobserwowanych zjawisk in-

nymi metodami (np. immunologicznymi). Po trzecie, wyniki uzyskiwane przez różne laboratoria dla tych samych chorób nie pokrywają się (różnicujące szczyty na widmach mas są inne), a ponadto od dawna stosowane klinicznie biomarkery raka sporadycznie wykrywane były podczas prac wykorzystujących tę technologię. Taki brak pozytywnej kontroli SELDI jeszcze bardziej podważa jej użyteczność (DIAMANDIS 2004).

PODSUMOWANIE

Zastosowanie metod proteomicznych, takich jak MS, budzi zainteresowanie nie tylko ze względu na możliwość ich wykorzystania w badaniach nad podstawowymi zjawiskami biologicznymi, ale przede wszystkim na rolę, jaką mogą spełnić w rozwoju medycyny. Jednym z zastosowań MS w tej sferze jest poszukiwanie biomarkerów, które mogą zostać w przyszłości wykorzystane zarówno

w diagnostyce chorób człowieka jak i przy opracowywaniu nowych terapii. Metody proteomiczne okazały się dotychczas pomocne w poszukiwaniu swoistych wskaźników wielu schorzeń. Przedstawione w niniejszej pracy przykłady badań nad biomarkerami chorób nowotworowych pokazują, że otrzymane wyniki mają dużą szansę na praktyczne wykorzystanie.

APPLICATION OF MASS SPECTROMETRY FOR DISCOVERY OF CANCER BIOMARKERS

Summary

Recently, mainly thanks to the creation of genomic sequences' databases of many organisms and invention of new technologies, rapid development of proteomics took place. Proteomics is the branch of modern molecular biology that deals with global analysis of proteins. A crucial part of this area of research is mass spectrometry, which allows sensitive, precise, fast and automated identification of single components of highly complex protein mixtures. Proteomic analysis is a multistage process that consists of sample collection and preparation, protein

separation, their quantification and identification, and analysis of the collected data. One of the aims of proteomics is to identify biomarkers – specific indicators of defined biological processes. The biomarkers are extremely important from the medical point of view, since they can be applied as diagnostic parameters, or serve as aims of novel therapies. As cancer is still an unsolved problem of healthcare, many experiments have been conducted aiming at identification of biomarkers of these incurable illnesses.

LITERATURA

- ADAM B., QU Y., DAVIS J. W., WARD M. D., CLEMENTS M. A., CAZARES L. A., SEMMES O. J., SCHELLHAMMER P. F., YASUI Y., FENG Z., WRIGHT G. L., 2002. *Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men*. Cancer Res. 62, 3609–3614.
- AEBERSOLD R., MANN M., 2003. *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature 422, 198–207.
- ALAIYA A. A., ROBLICK U. J., FRANZEN B., BRUCH H., AUER G., 2003. *Protein expression profiling in human lung, breast, bladder, renal, colorectal and ovarian cancers*. J. Chromatogr. B 787, 207–222.
- ALBRETHSEN J., BGEBO R., GAMMELTOFT S., OLSEN J., WINTHER B., RASKOV H., 2005. *Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study*. BMC Cancer 5, 8.
- BARNIDGE D. R., JELINEK D. F., MUDDIMAN D. C., KAY N. Y., 2005. *Quantitative protein expression analysis of cll b cells from mutated and unmutated igvh subgroups using acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagents*. J. Proteome Res. 4, 1310–1317.
- BERNARD K., LITMAN E., FITZPATRICK J. L., SHELLMAN Y. G., ARGAST G., POLVINEN K., EVERETT A. D., FUKASAWA K., NORRIS D. A., AHN N. G., RESING K. A., 2003. *Functional proteomic analysis of melanoma progression*. Cancer Res. 63, 6716–6725.
- BISCHOFF R., LUIDER T. M., 2004. *Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers*. J. Chromatogr. B 803, 27–40.
- BLOCK T. M., COMUNALE M. A., LOWMAN M., STEEL L. F., ROMANO P. R., FIMEL C., TENNANT B. C., LONDON W. T., EVANS A. A., BLUMBERG B. S., DWEEK R. A., MATTU T. S., MEHTA A. S., 2005. *Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks*

- and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 779–784.
- BROWN K. J., FENSELAU C., 2004. Investigation of doxorubicin resistance in mcf-7 breast cancer cells using shot-gun comparative proteomics with proteolytic ^{18}O labeling. *J. Proteome Res.* 3, 455–462.
- BRÖNSTRUP M., 2004. Absolute quantification strategies in proteomics based on mass spectrometry. *Expert Rev. Proteomics* 1, 503–512.
- CAZARES L. H., ADAM B., WARD M. D., NASIM S., SCHELLHAMMER P. F., SEMMES O. J., WRIGHT G. L., 2002. Normal, benign, preneoplastic, and malignant prostate cells have distinct protein expression profiles resolved by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin. Cancer Res.* 8, 2541–2552.
- CHAMRAD D. C., KÖRTING G., STÜHLER K., MEYER H. K., KLOSE J., BLÜGGEL M., 2004. Evaluation of algorithms for protein identification from sequence database using mass spectrometry data. *Proteomics* 4, 619–628.
- CHUMBALKAR V. C., SUBHASHINI C., DHOPLE V. M., SUNDARAM C. S., JAGANNADHAM M. V., KUMAR K. N., SRINIVAS P. N. B. S., MYTHILI R., RAO M. K., KULKARNI M. J., HEGDE S., HEGDE A. S., SAMUAL C., SANTOSH V., SINGH L., SIRDESHMUKH R., 2005. Differential protein expression in human gliomas and molecular insights. *Proteomics* 5, 1167–1177.
- CRAVEN R. A., BANKS R. E., 2001. Laser capture microdissection and proteomics: Possibilities and limitation. *Proteomics* 1, 1200–1204.
- DIAMANDIS E. P., 2004. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 367–378.
- EVERLEY P. A., KRIJGSVELD J., ZETTER B. R., GYGI S. P., 2005. Quantitative cancer proteomics: stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) as a tool for prostate cancer research. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 729–735.
- GÖRG A., WEISS W., DUNN M. J., 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665–3685. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 39–63.
- GRNBORG M., KRISTIANSEN T. Z., IWAHORI A., CHANG R., REDDY R., SATO N., MOLINA H., JENSEN O. N., HRUBAN R. H., GOGGINS M. G., MAITRA A., PANDEY A., 2005. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomics approach. *Mol. Cell. Proteomics*, Epub ahead of print.
- GYGI S. P., RIST B., GERBER S. A., TURECEK F., GELB M. H., AEBERSOLD R., 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 17, 994–999.
- HALE J. E., GELFANOVA V., LUDWIG J. R., KNIERMAN M. D., 2003. Application of proteomics for discovery of protein biomarkers. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 2, 185–192.
- HANASH S., 2003. Disease Proteomics. *Nature* 422, 226–232.
- ISSAQ H. J., VEENSTRA T. D., CONRADS T. P., FELSCHOW D., 2002. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: Protein profiling and biomarker identification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 587–592.
- JENSEN O. N., PODTELEJNIKOV A. V., MANN M., 1997. Identification of the components of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching. *Anal. Chem.* 69, 4741–4750.
- KELLEHER, 2004. Top-down proteomics. *Anal. Chem.* 76, 196A–203A.
- KOOPMANN J., ZHANG Z., WHITE N., ROSENZWEIG J., FEDARKO N., JAGANNATH S., CANTO M. I., YEO C. J., CHAN D. W., GOGGINS M., 2004. Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin. Cancer Res.* 10, 860–868.
- KOZAK K. R., AMNEUS M. W., PUSEY S. M., SU F., LUONG M. N., LUONG S. A., REDDY S. T., FARIAS-EISNER R., 2003. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: Potential use in diagnosis and prognosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 12343–12348.
- LARONGA C., BECKER S., WATSON P., GREGORY B., CAZARES L., LYNCH H., PERRY R. R., WRIGHT G. L., DRAKE R. R., SEMMES O. J., 2003–2004. SELDI-TOF mass profiling for prognostic and diagnostic classification of breast cancers. *Disease Markers* 19, 229–238.
- LI C., HONG Y., TAN Y., ZHOU H., AI J., LI S., ZHANG L., XIA Q., WU J., WANG H., ZENG R., 2004. Accurate qualitative and quantitative proteomic analysis of clinical hepatocellular carcinoma using laser capture microdissection coupled with isotope-coded affinity tag and two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 399–409.
- LU Z., HU L., EVERS S., CHEN J., SHEN Y., 2004. Differential expression profiling of human pancreatic adenocarcinoma and healthy pancreatic tissue. *Proteomics* 4, 3975–3988.
- MOCCELLIN S., ROSSI C. R., TRALDI P., NITTI D., LISE M., 2004. Molecular oncology in the post-genomic era: The challenge of proteomics. *Trends Mol. Med.* 10, 24–32.
- ONG S., BLAGOEV B., KRATCHMAROVA I., KRISTENSEN D. B., STEEN H., PANDEY A., MANN M., 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 376–386.
- PAWELETZ C. P., TROCK B., PENNANEN M., TSANGARIS T., MAGNANT C., LIOTTA L. A., PETRICOIN E. F., 2001. Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: Potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer. *Dis. Markers* 17, 301–307.
- PETRICOIN E. F., ARDEKANI A. M., HITT B. A., LEVINE P. J., FUSARO V. A., STEINBERG S. M., MILLS G. B., SIMONE C., FISHMAN D. A., KOHN E. C., LIOTTA L. A., 2002. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359, 572–577.
- PHIZICKY E., BASTIAENS P. I. H., ZHU H., SNYDER M., FIELDS S., 2003. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 422, 208–215.
- QU Y., ADAM B., YASUI Y., WARD M. D., CAZARES L. H., SCHELLHAMMER P. F., FENG Z., SEMMES O. J., WRIGHT G. L., 2002. Boosted decision tree analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectral serum profiles discriminates prostate cancer from noncancer patients. *Clin. Chem.* 48, 1835–1843.
- REINDERS J., LEWANDROWSKI U., MOEBIUS J., WAGNER Y., SICKMANN A., 2004. Challenges in mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics* 4, 3686–3703.
- REISS T., 2001. Drug discovery of the future: The implications of the human genome project. *Trends Biotechnol.* 19, 496–499.
- ROSTY C., CHRISTA L., KUZDZAL S., BALDWIN W. M., ZAHURAK M. L., CARNOT F., CHAN D. W., CANTO M., LILLEMÖE K. D., CAMERON J. L., YEO C. J., HRUBAN R. H., GOGGINS M., 2002. Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein 1 as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res.* 62, 1868–1875.

- SADYGOV R. G., COCIORVA D., YATES J. R., 2004. *Large-scale database searching using tandem mass spectra: Looking up the answer in the back of the book*. Nat. Methods 1, 195–202.
- SAKAI J., KOJIMA S., YANAGI K., KANAOKA M., 2005. *¹⁸O-labeling quantitative proteomics using an ion trap mass spectrometer*. Proteomics 5, 16–23.
- SHAU H., CHANDLER G. S., WHITELEGGE J. P., GORNBEIN J. A., FAULL K. F., CHANG H. R., 2003. *Proteomic profiling of cancer biomarkers*. Brief. Funct. Genomic. Proteomic. 2, 147–158.
- SOLTYS S. G., LE Q., SHI G., TIBSHIRANI R., GIACCIA A. J., KOONG A. C., 2004. *The use of plasma surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry proteomic patterns for detection of head and neck squamous cell cancers*. Clin. Cancer Res. 10, 4806–4812.
- SOMIARI R. I., SULLIVAN A., RUSSELL S., SOMIARI S., HU H., JORDAN R., GEORGE A., KATENHUSEN R., BUCHOWIECKA A., ARCIERO C., BRZESKI H., HOOKE J., SHRIVER C., 2004. *High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast*. Proteomics 3, 1863–1873.
- SRIVINIVAS P. R., VERMA M., ZHAO Y., SRIVASTAVA S., 2002. *Proteomics for cancer biomarker discovery*. Clin Chem, 48: 1160–1169.
- STANDING K. G., 2003. *Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry*. Curr. Opin. Struct. Biol. 13, 595–601.
- STASYK T., HUBER L. A., 2004. *Zooming in: Fractionation strategies in proteomics*. Proteomics 4, 3704–3716.
- STEEL L. F., SHUMPERT D., TROTTER M., SEEHOLZER S. H., EVANS A. A., LONDON W. T., DWEK R., BLOCK T. M., 2003. *A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma*. Proteomics 3, 601–609.
- STEEN H., MANN M., 2004. *The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing*. Nature Rev. Mol. Cell. Biol. 5, 699–711.
- TOMONAGA T., MATSUSHITA K., YAMAGUCHI S., OH-ISHI M., KODERA Y., MAEDA T., SHIMADA H., OCHIAI T., NOMURA F., 2004. *Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis*. Clin. Cancer Res. 10, 2007–2014.
- TYERS M., MANN M., 2003. *From genomics to proteomics*. Nature 422, 193–197.
- VLAHOU A., SCHELLHAMMER P. F., MENDRINOS S., PATEL K., KONDYLYS F. I., GONG L., NASIM S., WRIGHT G. L., 2001. *Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine*. Am. J. Pathol. 158, 1491–1502.
- VLAHOU A., SCHORGE J. O., GREGORY B. W., COLEMAN R. L., 2003. *Diagnosis of ovarian cancer using decision tree classification of mass spectral data*. J. Biomed. Biotechnol. 2003, 308–314.
- WOLTERS D. A., WASHBURN M. P., YATES J. R., 2001. *An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics*. Anal. Chem. 73, 5683–5690.
- WON Y., SONG H., KANG T. W., KIM J., HAN B., LEE S., 2003. *Pattern analysis of serum proteome distinguishes renal cell carcinoma from other urologic diseases and healthy persons*. Proteomics 3, 2310–2316.
- WULFKUHLE J. D., LIOTTA L. A., PETRICCOIN E. F., 2003. *Proteomic applications for the early detection of cancer*. Nat. Rev. Cancer 3, 267–275.
- XIAO X., LIU D., TANG Y., GUO F., XIA L., LIU J., HE D., 2002–2003. *Development of proteomic patterns for detecting lung cancer*. Dis. Markers 19, 33–39.
- YANG S., XIAO X., ZHANG W., ZHANG L., ZHANG W., ZHOU B., CHEN G., HE D., 2005. *Application of serum SELDI proteomic patterns in diagnosis of lung cancer*. BMC Cancer 5, 83.
- YATES J. R., 1998. *Mass spectrometry and the age of the proteome*. J. Mass Spectrom. 33, 1–19.
- ZANG L., TOYD P., HANCOCK W. S., SGROI D. C., KARGER B. L., 2004. *Proteomic analysis of ductal carcinoma of the breast using laser capture microdissection, LC-MS, and ¹⁶O/¹⁸O isotopic labeling*. J. Proteome Res. 3, 604–612.
- ZHANG Z., BAST R. C., YU Y., LI J., SOKOLL L. J., RAI A. J., ROSENZWEIG J. M., CAMERON B., WANG Y. Y., MENG X., BERCHUCK A., VAN HAAFTEN-DAY C., HACKER N. F., DE BRUIJN H. W. A., VAN DER ZEE A. G. J., JACOBS I. J., FUNG E. T., CHAN D. W., 2004. *Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer*. Cancer Res. 64, 5882–5890.
- ZHOU G., LI H., DECAMP D., CHEN S., SHU H., GONG Y., FLAIG M., GILLESPIE J. W., HU N., TAYLOR P. R., EMMERT-BUCK M. R., LIOTTA L. A., PETRICCOIN E. F., ZHAO Y., 2002. *2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers*. Mol. Cell. Proteomics 1, 117–123.