

Markery nowotworowe badane metodami proteomiki w osoczu i surowicy krwi

Monika Pietrowska

Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, oddział w Gliwicach, Gliwice

Tumor markers studied with proteomic methods in blood and serum plasma

Summary

Proteins are major components that directly determine phenotypes of cells and organisms, in either normal or pathological conditions. Because of numerous post-translational events that modify structure and function of proteins, the knowledge of genomes is only at the beginning of understanding of the full complexity of biological systems. "Proteomics" is the study of proteomes, which addresses proteins' 3D structure, function, and their inter- and intracellular communication. Among primary goals of proteomics, there is discovery of biomarker for various human disease conditions. Plasma and serum are considered to be the source of choice in molecular diagnostics. The development of cancer involves transformation and proliferation of altered cell types that produce unique proteins and enzymes, which can significantly modify the pattern of serum peptides and proteins. The serum protein/peptide profiles that could be registered using different analytical methodologies appear to carry important information with direct clinical applicability. Importantly, such peptide profiles itself could become a new kind of potential tumor marker. These approaches are promising, but the results obtained are still preliminary. For example, detection of disease markers in the blood proteome could be hampered by its extremely low concentrations and the presence of a few abundant components (e.g., albumin and immunoglobulins), and thus development of more specific and sensitive analytical methods is still required. Nevertheless, identification of serum proteomic patterns or molecular signatures specific for different cancer types, stages and responses to therapy is possible at this moment. This article provides a comprehensive overview of current methodologies used for cancer biomarkers detection in blood proteome.

Adres do korespondencji

Monika Pietrowska,
Zakład Radiobiologii
Doświadczalnej
i Klinicznej,
Centrum Onkologii –
Instytut
im. Marii
Skłodowskiej-Curie,
oddział w Gliwicach,
ul. Wybrzeże Armii
Krajowej 15,
44-101 Gliwice.

biotechnologia

2 (85) 39–53 2009

Key words:

proteomics, human proteome, biomarkers, ELISA, mass spectrometry, MALDI-TOF, LC/ESI/MS/MS, molecular signature of cancer.

1. Wprowadzenie

Komórki organizmu człowieka, w zależności od ich typu, produkują od 30 000 do 120 000 rodzajów białek, obecnych w różnych ilościach, od kilku do wielu milionów kopii w pojedynczej komórce. Większość z nich to białka konstytutywne, występujące w ponad 10 000 kopii w różnych typach komórek, ale każda z nich zawiera też od kilkudziesięciu do kilkuset rodzajów białek swoistych dla danego rodzaju komórki lub tkanki. Proteomika jest dziedziną biologii zajmująca się analizą proteomu, czyli kompletnego zestawu białek występujących w danej komórce, tkance lub całym organizmie. Badania nad proteomem ukierunkowane są na jakościowy oraz ilościowy opis wszystkich białek występujących w analizowanych komórkach lub tkance. W przeciwieństwie do genomiki, w której zakres wchodzi badania relatywnie stabilnego genomu, analiza proteomu dotyczy układu dynamicznego, zmieniającego się w trakcie cyklu komórkowego oraz w wyniku oddziaływań z innymi komórkami bądź środowiskiem (1). Badania proteomiczne stwarzają możliwości poznania wszystkich białek znajdujących się w komórce, ich struktury, modyfikacji, funkcji oraz wzajemnych relacji między nimi. Powinno to umożliwić wyjaśnienie mechanizmów przebiegu szlaków przekazywania sygnałów, zrozumienie molekularnych przyczyn chorób oraz projektowanie nowych leków, a w efekcie planowanie terapii „spersonalizowanych”.

Czynniki biologiczne (na przykład białka), których stan (modyfikacje potranslacyjne) i/lub ilość odzwierciedla ryzyko, występowanie lub stopień zaawansowania choroby, oraz efekty terapii nazywamy znacznikami lub biomarkerami. W badaniach onkologicznych odpowiednio dobrane zestawy markerów mogą dostarczyć informacji o czynnikach kancerogennych, na które ekspozycja był dany organizm. Pozwalają też wykryć wczesne zmiany o charakterze przednowotworowym (hiperplazja, dysplazja) poprzedzające wystąpienie jawnej postaci raka, czy też umożliwiają monitorowanie przebiegu leczenia. Proteomika kliniczna jest działem proteomiki, którego przedmiotem jest analiza zmian proteomu w czasie rozwoju choroby, a także w trakcie postępów terapii. Jej głównym zadaniem jest identyfikacja i scharakteryzowanie biomarkerów białkowych użytecznych w molekularnej diagnostyce choroby. W onkologii głównym celem badań proteomicznych jest znalezienie biomarkerów, których pomiar pozwoli na wykrycie choroby nowotworowej we wczesnym stadium, a także zmian związanych z procesem leczenia oraz skutecznością zastosowanej terapii (czasem przeżycia, remisji). W proteomice klinicznej zakres zainteresowań obejmuje nie tylko białka wewnątrzkomórkowe, ale również białka lub ich fragmenty obecne w płynach ustrojowych takich jak mocz czy krew (2,3).

2. Tradycyjne nowotworowe markery białkowe

Białkowe markery nowotworowe są wykorzystywane m.in. w klasycznej patologii, w której techniki immunohistochemiczne są standardem pozwalającym na wy-

krycie i zdiagnozowanie nowotworu. Diagnostyczne biomarkery nowotworowe można podzielić na prognostyczne i predykcyjne (4). Markery prognostyczne pozwalają na określenie rokowania niezależnie od sposobu leczenia. Klasycznymi czynnikami prognostycznymi w przypadku wielu nowotworów są wielkość guza pierwotnego, typ histologiczny raka, stopień złośliwości oraz stan węzłów chłonnych określony w badaniu mikroskopowym (5). W wyniku rozwoju biologii molekularnej lista czynników prognostycznych uległa znacznemu rozszerzeniu i znalazły się na niej między innymi: receptory hormonów, markery angiogenezy czy proliferacji (6). Do tej grupy należy receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*). Zwiększoną ekspresję EGFR stwierdzono w komórkach różnych nowotworów, w tym w 50-80% niedrobnokomórkowych raków płuca. Przekazywanie sygnału komórkowego poprzez EGFR pobudza podziały komórek guza, hamuje apoptozę oraz nasila angiogenezę i zdolność do tworzenia przerzutów. Nadmierna ekspresja receptorowych kinaz tyrozynowych rodziny ErbB (*HER*) jest związana ze złą prognozą w przypadku wielu rodzajów nowotworów (6,7). Onkogen *c-erbB2* (*Her2/neu*) koduje transbłonową glikoproteinę p185 o funkcji receptora kinazy tyrozynowej. W literaturze wskazuje się, że podwyższona ekspresja onkogenu *c-erbB2* może być związana z występowaniem raka piersi. Czynniki prognostycznymi są także markery proliferacji. Do tej grupy zalicza się odsetek komórek w fazie S, oceniany na podstawie zawartości DNA w komórkach – aneuploidalne komórki guza wykazują większą oporność na leczenie. Czynnikiem prognostycznym jest również ekspresja genu TP53. Mutacje i nadmierna ekspresja tego genu związana jest z ryzykiem rozwoju na przykład raka płuca – w grupie chorych z dysplazją nabłonkową III stopnia i zwiększoną ekspresją tego genu ryzyko to wynosiło 91%. Obecność mutacji w genie TP53 związana jest m.in. z krótszym czasem przeżycia chorych na raka płuca. Wpływ na przebieg choroby nowotworowej mają również proteazy związane ze zdolnością do przerzutowania. W tej grupie znajdują się aktywator plazminogenu typu urokinazy (uPAI) oraz inhibitor tego aktywatora (7,8).

Natomiast czynniki, które określają prawdopodobieństwo uzyskania remisji w przypadku zastosowania określonej metody leczenia są czynnikami predykcyjnymi. Wiedza dotycząca czynników predykcyjnych jest uboższa. Obecnie poszukuje się biomarkerów, które umożliwiłyby określenie grup chorych mających możliwie największe szanse wyleczenia przy zastosowaniu określonego sposobu leczenia.

Białkowe markery nowotworowe można badać w płynach ustrojowych. Mogą być one produkowane przez komórki nowotworowe lub prawidłowe w odpowiedzi na pojawienie się zmian nowotworowych, czy też być produktem rozpadu tych komórek w trakcie zastosowanego leczenia. Cennym źródłem biomarkerów są płyny ustrojowe szczególnie w tzw. badaniach przesiewowych. Badania przesiewowe polegają na poszukiwaniu markerów choroby u osób, u których nie występują kliniczne objawy choroby. Markery wczesnego wykrywania to takie elementy (składowe) biologii nowotworu, które pozwalają zidentyfikować rozwój choroby nowotworowej, w chwili kiedy jest mniejsze ryzyko rozprzestrzenienia się choroby i może ona

dobrze odpowiadać na zastosowane leczenie. Najbardziej znanym markerem nowotworowym jest obecny we krwi swoisty dla prostaty antygen PSA (ang. *Prostate-Specific Antygen*), który jest używany (samodzielnie lub z badaniem doodbytniczym) w badaniach przesiewowych do wczesnego wykrywania raka prostaty. Niestety wynik badania nie zawsze odzwierciedla zmiany chorobowe, w związku z tym nie u wszystkich mężczyzn to badanie przynosi oczekiwane rezultaty (9). Podobnie jak PSA, wiele wykorzystywanych markerów nowotworowych może występować także w prawidłowych komórkach, a w trakcie rozwoju choroby nowotworowej zmienia ulega ich poziom. Zdarza się też, że inne niż nowotworowe zmiany chorobowe (stany zapalne, przerosty tkanki) mogą podnosić poziom markera nowotworowego powyżej normy. Dlatego też czasem informacja o poziomie markera nie jest wystarczająca do postawienia diagnozy czy wprowadzenia zmian w schemacie leczenia, ale powinna być traktowana jako uzupełnienie badań klinicznych i obrazowych.

Pomimo zastrzeżeń, markery mogą być przydatne w monitorowaniu przebiegu leczenia lub w diagnozowaniu nowotworów w stadium rozsiewu oraz gdy źródło jego powstania jest nieznane. Przykładem markera znajdującego zastosowanie w monitorowaniu leczenia jest antygen karcynoembrionalny – CEA. Jest to glikoproteina związana z powierzchnią błon komórek embrionalnych oraz nowotworowych poprzez glikofosfatydyloinozyl, i w związku z tym łatwo uwalniana do krwiobiegu (10). CEA ulega ekspresji we wszystkich gruczolakorakach i jest znajdowany zarówno wewnątrz- jak i pozakomórkowo (10,11). Na podstawie dotychczasowych badań wykazano, że wysoki poziom CEA w surowicy krwi oceniany przedoperacyjnie jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym u chorych na raka okrężnicy (12). Wzrost poziomu CEA po resekcji nowotworu jest często obserwowany w przypadku wystąpienia przerzutów, zwłaszcza w wątrobie (11). Podwyższone stężenie tego markera w III stopniu zaawansowania klinicznego wykrywane po operacji wiąże się z wyższym ryzykiem wznowy i przerzutów, a także znacząco statystycznie niższym przeżyciem 5-letnim (12,13). W tabeli przedstawiono białkowe markery oznaczane w surowicy krwi obwodowej i stosowane w ocenie skuteczności leczenia różnych typów nowotworów.

Tabela

Markery nowotworowe stosowane obecnie w praktyce lekarskiej

Marker nowotworowy	Typ nowotworu	Obecne zastosowanie w praktyce lekarskiej	Literatura
1	2	3	4
AFP (<i>alpha-feto protein</i>)	wątroba, komórki macierzyste nowotworu jajnika oraz jąder	ocena stadium zaawansowania choroby, monitorowanie przebiegu leczenia oraz nawrotu choroby	(15,16)
B2M (<i>beta-2 microglobulin</i>)	szpiczak mnogi oraz chłoniaki	prognozowanie przebiegu leczenia, obecny w przypadku innych chorób (choroba Crohna, zapalenie wątroby)	(17-19)

1	2	3	4
CA 15-3 (<i>cancer antigen 15-3</i>)	rak piersi, płuc oraz jajnika	ocena stadium zaawansowania choroby, monitorowanie przebiegu leczenia oraz nawrotu choroby	(20,21)
CA 19-9 (<i>cancer antigen 19-9</i>)	rak trzustki, rak jelita grubego	ocena stopnia zaawansowania, monitorowanie przebiegu leczenia oraz nawrotu choroby, podwyższony poziom obserwuje się też w przypadku zapalenia trzustki oraz stanu zapalnego jelit	(22-24)
CA 72-4 (<i>cancer antigen 72-4</i>)	rak jajnika, rak jelita grubego	używany w kombinacji z CA-125 nie ma przesłanek co do samodzielnego zastosowania; w raku jelita grubego w kombinacji z CEA	(25,26)
CA-125 (<i>cancer antigen 125</i>)	rak jajnika	ocena stadium zaawansowania choroby, monitorowanie przebiegu leczenia oraz nawrotu choroby, podwyższony poziom obserwuje się w przypadku gruczolistości śródmacicznej (endometriozy)	(27-29)
Calcitonin	rak rdzeniasty tarczycy	ocena stadium zaawansowania choroby, monitorowanie przebiegu leczenia oraz nawrotu choroby, podwyższony poziom obserwuje się w przypadku anemii złośliwej oraz zapalenia tarczycy	(30,31)
CEA (<i>carcino-embryonic antigen</i>)	rak jelita, płuc, piersi, tarczycy, trzustki, wątroby, szyjki macicy oraz pęcherza moczowego	monitorowanie leczenia oraz nawrotu choroby, podniesiony poziom obserwuje się w przypadku zapalenia wątroby, okrężnicy lub trzustki oraz u osób palących	(11-14, 20-22)
hCG (<i>human chorionic gonadotropin</i>)	rak jąder	pomocny w diagnozowaniu, monitorowaniu leczenia oraz nawrotu choroby, poziom podniesiony w przypadku ciąży oraz niewydolności jąder	(32,33)
immunoglobuliny monoklonalne (<i>monoclonal immunoglobulins</i>)	szpiczak mnogi oraz Makroglobulinemia Waldenstroma	ocena stadium zaawansowania choroby, monitorowanie przebiegu leczenia oraz nawrotu choroby, nadprodukcja immunoglobulin czy przeciwciał oceniana elektroforetycznie	(34)
NSE (<i>neuron-specific enolase</i>)	neuroblastoma, drobnokomórkowy rak płuc	monitorowanie leczenia, w przypadku tego typu raka płuc ocena tego markera daje lepszy efekt niż ocena CEA	(35)
PSA (<i>prostate specific antigen</i>) całkowity oraz niezwiązany	rak prostaty	w badaniach przesiewowych oraz diagnozowaniu raka prostaty, monitorowaniu leczenia oraz nawrotu choroby, podniesiony poziom tego markera obserwuje się w początkowych stadiach przerostu prostaty (hipertrofia) zapaleniu prostaty, może też być związany z wiekiem	(9,39)
<i>Prostate-specific membrane antigen</i> (PSMA)	rak prostaty	pomoc w diagnozowaniu, nie jest używany rutynowo ze względu na wzrost jego poziomu z wiekiem	(36)

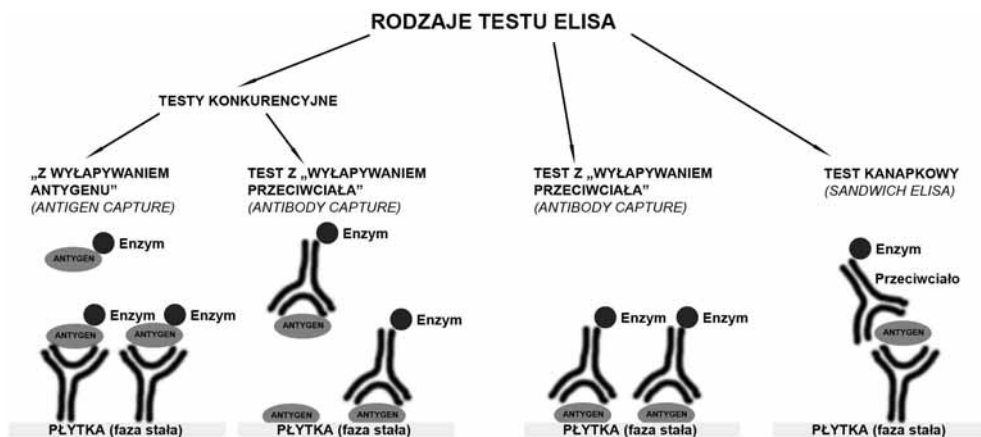
1	2	3	4
Prostatic acid phosphatase (PAP)	przerzutujący rak prostaty, szpiczak, rak płuc	pomoc w diagnozowaniu, nie jest używany rutynowo ponieważ podwyższony poziom markera obserwuje się w przypadku stanu zapalnego prostaty	(37-39)
S-100	przerzutujący czerniak	pomoc w diagnozowaniu	(40-42)
TA-90	przerzutujący czerniak	pomoc w diagnozowaniu	(41)
Thyroglobulin	rak tarczycy	monitorowanie nawrotu choroby, używany po usunięciu tarczycy do oceny postępów leczenia	(43,44)

3. Wykorzystanie metod proteomiki w poszukiwaniu markerów nowotworowych

Każdego roku dzięki rozwojowi metod badawczych odkrywa się wiele nowych potencjalnych markerów nowotworowych. Trudno jednak na podstawie obecności lub pomiaru poziomu jednego czynnika otrzymać użyteczną klinicznie informację. Dlatego też obecnie, wykorzystując nowoczesne techniki biologii molekularnej, próbuje się ustalić wzór (profil) genów lub białek swoistych dla choroby nowotworowej. Uważa się, że dopiero zestaw genów, transkryptów czy białek mógłby być wiarygodnym markerem nowotworowym. W poszukiwaniu markera „idealnego” bierze się pod uwagę jego czułość, swoistość, koszty oznaczania, powtarzalność wyników i możliwość zastosowania u pacjentów na różnym stadium rozwoju choroby, np. przy guzach o różnym stopniu zaawansowania. W badaniach wykorzystuje się bardzo różnorodny materiał: tkanki, osocze, surowicę, mocz czy płyn mózgowo-rdzeniowy. W badaniach proteomów badacze dysponują szeregiem nieustannie unowocześnianych technik, których użycie umożliwi poszukiwanie markerów nowotworowych. W artykule tym zostaną omówione najważniejsze z tych technik, które potencjalnie będzie można wykorzystać w diagnostyce.

4. Test ELISA

Metody analizy markerów, aby mogły być stosowane w praktyce klinicznej, powinny charakteryzować się wysoką czułością, swoistością i powtarzalnością, krótkim czasem wykonywania oraz możliwością przeprowadzania przynajmniej półilościowego pomiaru. Testem stosowanym rutynowo do ilościowych oznaczeń białkowych markerów procesów nowotworowych są testy immunoenzymatyczne. Ich zaletą jest prostota i niska cena. Płytkowy test immunoenzymatyczny fazy stałej – ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) został wprowadzony do praktyki laboratoryjnej w roku 1966 (45), i jest obecnie stosowany do: 1) wykrywania i oznaczeń ilościowych przeciwciał i antygenów, 2) charakterystyki strukturalnej antyge-



Rys. 1. Schemat ilustrujący rodzaje testu ELISA. Przedstawiamy schematycznie reakcje enzymatyczne zachodzące w poszczególnych odmianach tego testu – podział wynika z rodzaju reagenta umieszczonego na fazie stałej.

nów, oraz 3) określania swoistości przeciwciał. Jest to najpowszechniej stosowany test w badaniach biomedycznych (naukowych oraz diagnostycznych). Służy on do wykrycia określonych białek w badanym materiale z użyciem przeciwciał poliklonalnych lub monoclonalnych połączonych z odpowiednim enzymem. Zasada działania testu polega na tym, że przeciwciało związane z określonym enzymem może specyficznie rozpoznawać dane białko (antygen zawarty w materiale biologicznym), które wcześniej zostało unieruchomione na podłożu. Po dodaniu przeciwciał następuje utworzenie kompleksu z antygenem, zatem przeciwciało także zostaje unieruchomione. Po wypłukaniu nie związanego przeciwciała i dodaniu substratu dla enzymu związanego z przeciwciałem zachodzi reakcja enzymatyczna. Obecność produktu reakcji enzymatycznej (może to być np. produkt barwny powstający z bezbarwnego substratu) świadczy o obecności danego białka w badanym materiale, a pomiar ma charakter ilościowy. Metodą ELISA, podobnie jak innymi metodami immunologicznymi, można badać zidentyfikowane białka o znanej strukturze, dla których dostępne są wysoce swoiste przeciwciała. W zależności od komponentów reakcji enzymatycznej umieszczonych na płytce (fazie stałej) wyróżnia się kilka odmian tego testu (rys. 1).

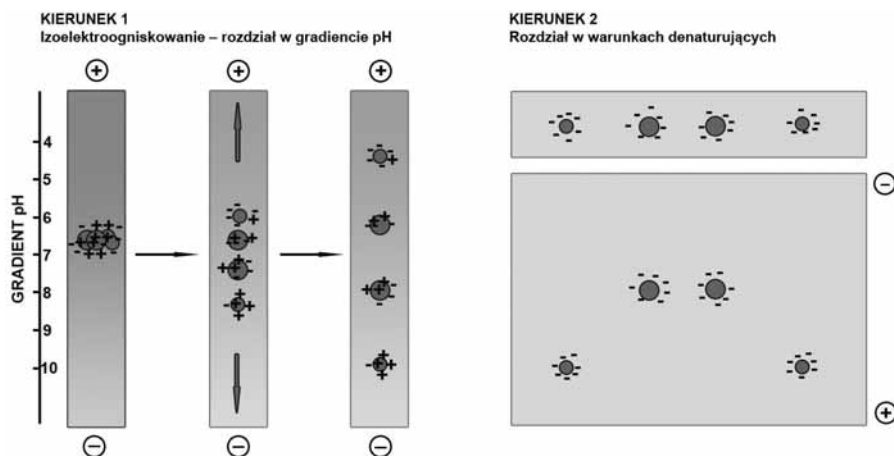
Niezależnie od rodzaju przeprowadzanego badania, każdy test immunoenzymatyczny wymaga wykorzystania fazy stałej opłaszczonej przeciwciałem lub antygenem. Jako fazy stałej używa się zwykle płytek polistyrenowych lub pleksiglasowych ze studzienkami (dołkami), do których można dodawać niewielkie ilości roztworów. Każdy dołek pełni funkcję mikroprobówki, przy czym w testach ELISA używa się zwykle płytek 96-dołkowych. Opłaszczanie z reguły przeprowadza się przez dodanie do studzienki roztworu przeciwciała lub antygeny, i inkubację przez określony czas w odpowiedniej temperaturze. Po przeprowadzeniu opłaszczenia należy jesz-

cze zablokować miejsca niezajęte przez przeciwciało lub antygen. Dokonuje się tego za pomocą czynników blokujących, np. roztworu owoalbuminy lub odtłuszczonego mleka, co zapobiega niespecyficznemu przyłączaniu się białek do fazy stałej podczas następujących etapów testu.

Technikami ELISA rutynowo oznacza się we krwi tradycyjne markery nowotworowe. Dzięki komercyjnie dostępnym zestawom można oznaczyć, np. białko HER-2 (c-erbB-2), będące markerem związanym m.in. z odpowiedzią na zastosowane leczenie (chemioterapia u pacjentek z rakiem piersi). W strukturze białka HER-2 wyróżnia się trzy domeny, a komercyjne zestawy do jego wykrywania zawierają przeciwciała swoiste dla domeny pozakomórkowej, co umożliwia jego oznaczenie w surowicy krwi. W dotychczas przeprowadzonych badaniach wykazano występowanie zwiększonej ekspresji genu kodującego białko HER-2 lub występowanie zmutowanej formy tego białka u osób z rakiem piersi i płuc. Innym powszechnie badanym prognostycznym markerem nowotworowym jest białko p53. Okres połowicznego rozpadu prawidłowego białka p53 wynosi 6-20 minut, co powoduje, że białko to nie jest wykrywane w surowicy krwi. Natomiast forma zmutowana białka p53 (o okresie połowicznego rozpadu 6-12 godzin), może być wykrywana w płynach pozakomórkowych, w tym również w surowicy krwi. Testem ELISA można oznaczać także poziom przeciwciał anty-p53. Poziom przeciwciał anty-p53 badany był we krwi pacjentek z rakiem piersi leczonych dwoma różnymi schematami chemioterapii. Na podstawie analizy wykazano obniżony poziom przeciwciał anty-p53 u pacjentek leczonych taksanami. Negatywny status przeciwciała anty-p53 może prognozować dobrą odpowiedź również na leczenie oparte na antracyklinach (20,46). Test ELISA, jako metoda mająca ugruntowaną pozycję w diagnostyce klinicznej, wykorzystywany jest często do weryfikacji wyników innych badań oraz jako nieinwazyjna metoda diagnozowania pacjentów z rozpoznaniem nowotworowym. U pacjentek z rakiem piersi zwerifikowano w ten sposób przydatność analizy nektyny-4 jako markera histologicznego oraz serologicznego (47).

5. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym

Płyny ustrojowe zawierają wiele białek tworzących kompleksy i wymagających rozdzielania przed ich dalszą analizą. Rozdział elektroforetyczny białek jest najstarszą i najczęściej wykorzystywaną techniką proteomiczną. W badaniach wykorzystuje się zazwyczaj dwukierunkową elektroforezę w żelu poliakrylamidowym. Analiza ta jest dwuetapowa (rys. 2). W pierwszym etapie białka są rozdzielane w żelu w zależności od punktu izoelektrycznego (pI), czyli wartości pH przy której wypadkowy ładunek elektryczny białka jest równy zero. W drugim etapie białka o podobnym punkcie izoelektrycznym są rozdzielane w zależności od ich wielkości w żelu zawierającym czynnik denaturujący oraz nadający rozdzielanym białkom ładunek ujemny – dodecylosiarczan sodu (SDS). Po zakończeniu elektroforezy białka w żelu



Rys. 2. Schemat przedstawiający etapy dwukierunkowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. W kierunku pierwszym białka rozdzielane są pod względem wartości pI (punktu izoelektrycznego), natomiast w drugim w zależności od wielkości białka.

są wizualizowane poprzez barwienie solami srebra, barwnikiem Coomassie Blue R-250 lub barwnikami fluorescencyjnymi. Widoczne na żelu plamki są wycinane, a następnie identyfikowane metodami spektrometrii mas. Technika ta jest wykorzystywana na przykład do badań różnic w proteomach osób zdrowych oraz chorych. Specjalne programy służą do identyfikacji plamek różnicujących rozdzielą elektroforetyczne. W połączeniu z identyfikacją białek metodami spektrometrii mas elektroforeza dwukierunkowa została z sukcesem wykorzystana do identyfikacji wielu nowych markerów nowotworowych. W wyniku takiej analizy preparatów surowicy krwi stwierdzono, że kwaśna alfa-1-glikoproteina i klusteryna ulega niższej ekspresji w przypadku raka piersi, natomiast poziom transtyreiny specyficznie się obniża w przypadku raka jajnika. Poziom innego białka surowicy – haptoglobiny jest wyższy w przypadku kilku innych nowotworów (48).

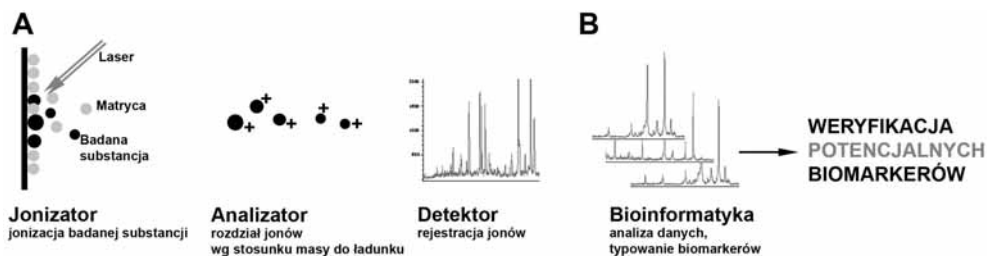
W związku z faktem, że w surowicy dużą część stanowią znane białka takie jak: albumina, immunoglobuliny, transferyna, haptoglobina oraz antytyrypsyna często stosuje się kombinację odmiany dwukierunkowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym DIGE (ang. *Differential In-Gel Electrophoresis*). Warunkiem koniecznym przed wykonaniem elektroforezy metodą DIGE jest wcześniejsze usunięcie białek za pomocą wymienionych technik wysokosprawnej chromatografii ciekowej lub/oraz immunopowinowactwa. Po oddzieleniu głównych białek surowicy u chorych z rakiem trzustki stwierdzono, że poziom apolipoproteiny E, alfa-1-antychymotrypsyny oraz inhibitora inter-alfa-trypsyny jest wyższy niż u osób zdrowych (49). Podobną techniką (elektroforeza 2-D-DIGE) usuwając z próbek surowicy przed analizą albuminę oraz immunoglobuliny ustalono, że białkami (potencjalnymi markerami) różnicującymi preparaty pacjentek z rakiem piersi od osób zdrowych są: proapolipoproteina A-I,

transferyna, i hemoglobina (wyższy poziom białka w przypadku surowicy osób chorych) oraz apolipoproteina A-I, apolipoproteina C-III i alfa-2-haptoglobina (wyższy poziom białka w surowicy osób zdrowych). Potencjalne biomarkery raka piersi były oceniane również standardowymi technikami immunologicznymi (*Western blot*, ELISA). Poziom transferyny korelował z wynikami elektroforezy, ale haptoglobiny i apolipoproteiny A-I nie wykryto rutynowym testem diagnostycznym, co sugeruje wyższą czułość zastosowanej metody (50).

Podsumowując, analiza surowicy lub osocza techniką elektroforezy dwukierunkowej w połączeniu z identyfikacją białek technikami spektrometrii mas jest, jak się wydaje, doskonałym narzędziem w ustalaniu różnic pomiędzy stanem prawidłowym a zmianami patologicznymi – nie tylko w przypadku chorób nowotworowych.

6. Spektrometria mas

Uniwersalną metodą badania białek jest spektrometria mas, stosuje się wiele różnorodnych metod wzbudzenia analitu oraz analizy powstających jonów. Podstawą tej techniki jest pomiar stosunku masy (m) do ładunku elektrycznego (z) jonów powstających w wyniku jonizacji cząsteczek analizowanych związków chemicznych (białek) wzbudzanych przy wykorzystaniu odpowiednich źródeł. Typowy spektrometr mas składa się z komory jonizacyjnej, analizatora i detektora, sprzężonych z komputerowym systemem kontroli oraz rejestracji i analizy danych (rys. 3). W badaniach proteomów najczęściej wykorzystywaną konfiguracją jest połączenie źródła jonów wykorzystujących do jonizacji cząsteczek analitu wykrystalizowane w odpowiedniej matrycy laser (MALDI, ang. *Matrix Assisted Laser Desorption*) z analizatorem czasu przelotu (ToF, ang. *Time of Flight*). Podstawową zaletą techniki MALDI-ToF jest możliwość bezpośredniej identyfikacji białek znajdujących się w mieszaninie. Ta metoda instrumentalna charakteryzuje się wysoką czułością, w sprzyjających warunkach możliwe jest wykrycie nawet attomolowych ilości białka. Technika ta stała się konkurencyjna w stosunku do innych metod powszechnie stosowanych w proteomice głównie ze względu na możliwość analizy białek obecnych w bardzo małych stężeniach, nawet w skomplikowanych mieszaninach takich jak płyny ustrojowe. Analizowaną substancję jonizuje się po jej zmieszaniu z roztworem matrycy. W tego typu spektrometrze (MALDI ToF) analizowana substancja ulega jonizacji poprzez przyłączenie pojedynczego protonu $[M+H]^+$, ze względu na niewielki nadmiar energii protonowane cząsteczki w bardzo niewielkim stopniu ulegają fragmentacji, ponadto powstawanie jonów wielokrotnie naładowanych $[M+nH]^{n+}$ zachodzi w niewielkim stopniu (51). Drugim powszechnie stosowanym podejściem analitycznym jest wykorzystanie sprzężenia chromatografu cieczowego ze spektrometrem mas ze źródłem jonizacji poprzez elektrorozpraszanie oraz analizator przystosowany do analizy widm powstających w wyniku kolizyjnie indukowanej jonizacji (LC/ESI/CID/MS/MS, ang. *Liquid Chromatography Electrospray Mass Spectrometry with*



Rys. 3. Schemat ilustrujący etapy procesu poszukiwania biomarkerów metodą analizy surowicy/osocza w spektrometrze ze źródłem jonów MALDI (A) oraz ich selekcji dzięki technikom obliczeniowym (B).

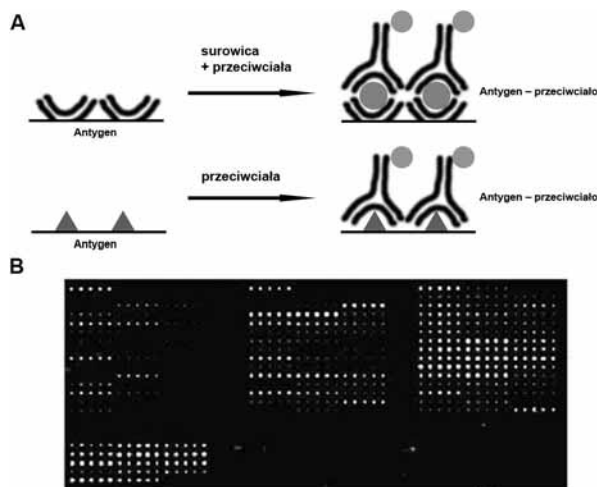
Collision Induced Dissociation). Ciągłe doskonalone metody spektrometrii mas znajdują bardzo szerokie zastosowanie w badaniach proteomicznych. Dzięki wykorzystaniu różnych technik spektrometrii mas możliwe jest odczytanie mas cząsteczkowych peptydów oraz białek o masie powyżej 500 kDa, w próbkach zawierających jedynie pikomolowe ilości analizowanych cząsteczek. Dokładność pomiaru mas cząsteczkowych na podstawie widm masowych często osiąga 0,01%, podczas gdy w przypadku technik elektroforetycznych wartość ta oscyluje pomiędzy 5 a 10%.

Różne odmiany techniki MALDI-ToF, lub zbliżonej do niej SELDI-ToF, (ang. *Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization*) są wykorzystywane do poszukiwania różnic pomiędzy proteomem osób zdrowych, a osób z rozpoznaniem choroby nowotworowej. Dotychczas dzięki technikom spektrometrii dokonano odkrycia kilku obiecujących markerów wczesnego wykrywania raka jajnika (52), prostaty (53) czy raka piersi (54). Poszukuje się tymi technikami również markerów skuteczności terapii przeciwnowotworowej – chemio- czy radioterapii (55). Analiza niskocząsteczkowych białek krwi związanych z albuminą surowicy została wykonana w przypadku krwi pacjentek z rakiem jajnika. Zidentyfikowano w ten sposób we frakcji surowicy swoiste fragmenty białek zaangażowanych w proces nowotworzenia, m.in. fragment białka BRCA2 (56). Obecnie rozwój technik spektrometrii mas umożliwia identyfikację białek różnicujących osoby zdrowe od osób z rozpoznaniem nowotworem (57-59). Dzięki zastosowaniu metod bioinformatyki, którymi analizować można duże ilości danych generowanych przez spektrometry mas oraz specjalnie opracowanych algorytmów klasyfikujących można w tej chwili identyfikować potencjalne znaczniki procesu nowotworowego (rys. 3B). Okazało się, że większość zidentyfikowanych w ten sposób markerów to białka (lub ich fragmenty) występujące fizjologiczne w surowicy w wysokich stężeniach, m.in. amyloid A, apolipoproteina A, fibrynogen i fibrynopeptydy, czy hemoglobiny (60). Na podstawie obserwacji, że wśród potencjalnych biomarkerów nowotworzenia znajdują się swoiste fragmenty „fizjologicznych” białek surowicy wskazano na konieczność systematycznego zbadania niskocząsteczkowej frakcji peptydów surowicy (poniżej 3000 Da), tak zwanego „peptydomu” lub „degradomu”. Dokonano analizy i identyfikacji 61 peptydów surowicy różnicujących chorych z trzema typami nowotworów (rak gruczołu krokowego, pęcherza i piersi)

i osoby zdrowe (61). Wśród różnicujących peptydów znalazły się m.in. swoiste fragmenty fibrynopeptydu A, fibryny, apolipoproteiny A-I, A-IV, E i J, białek C3 i C4a, bradykininy i transtyretyny. Klasyfikator składający się z 61 peptydów nie tylko odróżniał zdrowych od chorych, ale pozwalał zróżnicować chorych z różnymi typami nowotworów. Wskazywało to, że klasyfikator nie był znacznikiem nieswoistego procesu chorobowego (np. stanu zapalnego), ale był swoisty dla rodzaju nowotworu.

7. Macierze białkowe

Macierze białkowe służą do dokładnego określania typu i ilości białka w badanym płynie ustrojowym lub tkance. Na cienkich płytkach umieszcza się miliony kopii różnych przeciwciał, z których każde łączy się ze ściśle określonym fragmentem białka (rys. 4A) (62). Za pomocą specjalnych macierzy białkowych można określić, które z istniejących w komórkach białek ze sobą oddziałują. Ponadto można zbadać oddziaływania białek z fosfolipidami oraz substraty kinaz białkowych. Obecnie w badaniach proteomicznych wykorzystuje się trzy typy macierzy białkowych: funkcjonalne, analityczne oraz fazy odwróconej (62,63). Najczęściej używane macierze analityczne służą do profilowania mieszanin białkowych w celu określenia ich poziomu ekspresji, specyficzności oraz siły powinowactwa. Najpopularniejszymi macierzami analitycznymi są takie, w których na fazie stałej umieszczonych jest wiele kopii różnych przeciwciał (biblioteka przeciwciał), z których każde wiąże się z określonym fragmentem białka. Najczęściej wykorzystuje się tzw. metodę kanapkową (rys. 4A), polegającą na wykrywaniu białka przez dwa różne przeciwciała. Jedno



Rys. 4. Schemat przedstawiający dwie najbardziej typowe reakcje zachodzące na macierzy białkowej (A) oraz przykładowy odczyt/wynik takiej analizy (B).

wiąże się do cząsteczki białka, a drugie przyłącza do niej znacznik fluorescencyjny. Przykładowy wynik otrzymany z wykorzystaniem macierzy białkowej zaprezentowano na rysunku 4B. Ten typ macierzy może być używany do monitorowania różnic w profilach ekspresji białek w diagnostyce klinicznej (64). Techniki macierzy białkowych używane są w badaniach nowotworów jako uzupełnienie rutynowych testów diagnostycznych, takich jak ELISA. Z zastosowaniem tej techniki analizowano poziom 169 białek w surowicy pacjentek z rakiem jajnika oraz osób zdrowych w wyniku czego wyselekcjonowano cztery potencjalne markery: leptynę, prolaktynę, osteopontynę oraz insulinopodobny czynnik wzrostu II (65,66).

8. Podsumowanie

Markery nowotworowe są czynnikami (zazwyczaj białkami lub peptydami), które występują w płynach ustrojowych (mocz, krew) osób chorych lub w guzie. Różne markery mogą być związane z różnymi typami nowotworów. W zależności od swoistości i czułości mogą one być użyteczne w diagnozowaniu oraz przewidywaniu odpowiedzi nowotworu na zastosowaną terapię. Na obecnym etapie wiedzy o markerach i ich przydatności w leczeniu nowotworów nie mogą one być wykorzystywane samodzielnie do diagnozowania choroby. Są one jednak wartościowym uzupełnieniem wyników uzyskanych z innych rodzajów badań (histopatologia, badania obrazowe). Można jednak mieć nadzieję, że w przyszłości, dzięki rozwojowi nowych, bardziej precyzyjnych i czułych technik badawczych, możliwe stanie się wykorzystanie molekularnych markerów do kompletnego diagnozowania choroby oraz monitorowania terapii.

Praca zrealizowana w ramach projektów MNiSzW 2PO5E06730 oraz 2PO5B12630.

Literatura

1. Gygi S., Rochon Y., Franza B. R., Aebersold R., (1999), *Mol. Cell Biol.*, 19, 1720-1730.
2. Srinivas P. R., Verma M., Zhao Y., Srivastava S., (2002), *Clin. Chem.*, 48(8), 1160-1169.
3. Azad N. S., Rasool N., Annunziata C. M., Minasian L., Whiteley G., Kohn E. C., (2006), *Mol. Cell Proteomics*, 5(10), 1819-1829.
4. Henderson I. C., Patek A. J., (1988), *Breast Cancer Res. Treat.*, 52, 261-288.
5. Goldhirsh A., Wood W. C., Senn H. J., (1996), *Eur. J. Cancer*, 31A, 1754-1759.
6. Sassen A., Rochon J., Wild P., Hartmann A., Hofstaedter F., Schwarz S., Brockhoff G., (2008), *Breast Cancer Res.*, 10(1), R2.
7. Offersen B. V., Alsner J., Ege Olsen K., Riisbro R., Brünner N., Sørensen F. B., Sørensen B. S., Schlemmer B. O., Overgaard J., (2008), *Acta Oncol.*, 47(4), 618-632.
8. Haier J., Nicolson G. L., (2000), *Clin. Exp. Metastasis*, 18(8), 623-638.
9. Svetec D., Thompson I. M., (1998), *Ann. Oncol.*, 9(12), 1283-1288.
10. Maxwell P., (1999), *Br. J. Biomed. Sci.*, 56(3), 209-214.
11. Lucha P. A. Jr, Rosen L., Olenwine J. A., Reed J. F. 3rd, Riether R. D., Stasik J. J. Jr, Khubchandani I. T., (1997), *Dis. Colon. Rectum.*, 40(2), 145-149.

12. Goslin R., Steele G. Jr., Macintyre J., Mayer R., Sugarbaker P., Cleghorn K., Wilson R., Zamcheck N., (1980), *Ann. Surg.*, 192(6), 747-751.
13. Park Y. A., Lee K. Y., Kim N. K., Baik S. H., Sohn S. K., Cho C. W., (2006), *Ann. Surg. Oncol.*, 13(5), 645-650.
14. Park I. J., Kim H. C., Yu C. S., Yoo J. H., Kim J. C., (2005), *J. Korean Med. Sci.*, 20(4), 624-627.
15. Guzman G., Alagiozian-Angelova V., Layden-Almer J. E., Layden T. J., Testa G., Benedetti E., Kajdaczy-Balla A., Cotler S. J., (2005), *Mod. Pathol.*, 18(11), 1498-1503.
16. Ando S., Kimura H., Iwai N., Shima M., Ando M., Kuriyama T., (2001), *Anticancer Res.*, 21(4B), 3085-3092.
17. Stella-Holowiecka B., Czerw T., Holowiecka-Goral A., Giebel S., Wojnar J., Holowiecki J., (2007), *Transplant Proc.*, 39(9), 2893-2897.
18. Penz M. Z., Fiebigler W. C., Valencak J. B., Osterreicher C., Ba-Ssalamah A., Formanek M., Brodowicz T., Chott A., Raderer M., (2001), *Anticancer Res.*, 21(4B), 3049-3052.
19. Gross M., Top I., Laux I., Katz J., Curran J., Tindell C., Agus D., (2007), *Clin. Cancer Res.*, 13(7), 1979-1986.
20. Bao H., Yu D., Wang J., Qiu T., Yang J., Wang L., (2008), *Anticancer Drugs.*, 19(3), 317-323.
21. Park B. W., Oh J. W., Kim J. H., Park S. H., Kim K. S., Kim J. H., Lee K. S., (2008), *Ann. Oncol.*, 19(4), 675-681.
22. Reiter W., Stieber P., Reuter C., Nagel D., Lau-Werner U., Lamerz R., (2000), *Anticancer Res.*, 20(6D), 5195-5198.
23. Hess V., Glimelius B., Grawe P., Dietrich D., Bodoky G., Ruhstaller T., Bajetta E., Saletti P., Figier A., Scheithauer W., Herrmann R., (2008), *Lancet Oncol.*, 9(2), 132-138.
24. Halm U., Schumann T., Schiefke I., Witzigmann H., Mössner J., Keim V., (2000), *Br. J. Cancer*, 82(5), 1013-1016.
25. Carpelan-Holmström M., Louhimo J., Stenman U. H., Alfthan H., Järvinen H., Haglund C., (2004), *Tumour Biol.*, 25(5-6), 228-234.
26. Louhimo J., Carpelan-Holmström M., Alfthan H., Stenman U. H., Järvinen H. J., Haglund C., (2002), *Int. J. Cancer*, 101(6), 545-548.
27. Visintin I., Feng Z., Longton G., Ward D. C., Alvero A. B., Lai Y., Tenthorey J., Leiser A., Flores-Saaib R., Yu H., Azori M., Rutherford T., Schwartz P. E., Mor G., (2008), *Clin. Cancer Res.*, 14(4), 1065-1072.
28. Cooper B. C., Sood A. K., Davis C. S., Ritchie J. M., Sorosky J. I., Anderson B., Buller R. E., (2002), *Obstet. Gynecol.*, 100(1), 59-64.
29. Yurkovetsky Z. R., Linkov F. Y., Malehorn E. D., Lokshin A. E., (2006), *Future Oncol.*, 2(6), 733-741.
30. Laure Giraudet A., Al Ghulzan A., Aupérin A., Leboulleux S., Chehboun A., Troalen F., Dromain C., Lumbroso J., Baudin E., Schlumberger M., (2008), *Eur. J. Endocrinol.*, 158(2), 239-246.
31. Barbet J., Champion L., Kraeber-Bodéré F., Chatal J. F.; GTE Study Group. (2005), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90(11), 6077-6084.
32. Cole L. A., Sutton J. M., (2004), *J. Reprod. Med.*, 49(7), 545-553.
33. Hoshi S., Suzuki K., Ishidoya S., Ohyama C., Sato M., Namima T., Saito S., Orikasa S., (2000), *Int. J. Urol.*, 7(6), 218-223.
34. McMaster M. L., Csako G., (2008), *Int. J. Cancer*, 122(5), 1183-1188.
35. Riley R. D., Heney D., Jones D. R., Sutton A. J., Lambert P. C., Abrams K. R., Young B., Wailoo A. J., Burchill S. A., (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10(1 Pt 1), 4-12.
36. Olson W. C., Heston W. D., Rajasekaran A. K., (2007), *Clinical Trials of Cancer Therapies Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen Reviews on Recent Clinical Trials*, 2, 182-190.
37. Kishi Y., Kami M., Kusumi E., Mineyama T., Kato D., Hamaki T., Ueyama J., Miyakoshi S., Morinaga S., Muto Y., Taniguchi S., (2004), *Haematologica*, 89(5), ECR13.
38. Seki K., Miyakoshi S., Lee G. H., Matsushita H., Mutoh Y., Nakase K., Ida M., Taniguchi H., (2004), *Am. J. Surg. Pathol.*, 28(10), 1384-1388.
39. Dattoli M., Wallner K., True L., Cash J., Sorace R., (2003), *Cancer*, 97(4), 979-983.
40. Domingo-Domènech J., Castel T., Auge J. M., Garcia-Albeniz X. A., Conill C., Puig S., Vilella R., Matas J., Malvey J., Gascón P., Mellado B., Molina R., (2007), *Tumour Biol.*, 28(5), 264-272.

41. Faries M. B., Gupta R. K., Ye X., Lee C., Yee R., Leopoldo Z., Essner R., Foshag L. J., Elashoff D., Morton D. L., (2007), *Cancer Invest.*, 25(5), 285-293.
42. Djukanovic D., Hofmann U., Sucker A., Rittgen W., Schadendorf D., (2000), *Anticancer Res.*, 20(3B), 2203-2207.
43. Gupta M., Chia S. Y., (2007), *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, 14(5), 383-388.
44. Snozek C. L., Chambers E. P., Reading C. C., Sebo T. J., Sistrunk J. W., Singh R. J., Grebe S. K., (2007), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 92(11), 4278-4281.
45. Nakane P. K., Pierce G. B. Jr., (1966), *J. Histochem. Cytochem.*, 14(12), 929-931.
46. Mattioni M., Soddu S., Porrello A., D'Alessandro R., Spila A., Guadagni F., (2007), *Int. J. Biol. Markers*, 22(4), 302-306.
47. Fabre-Lafay S., Monville F., Garrido-Urbani S., Berruyer-Pouyet C., Ginestier C., Reymond N., Finetti P., Sauvan R., Adélaïde J., Geneix J., Lecocq E., Popovici C., Dubreuil P., Viens P., Gonçalves A., Charafe-Jauffret E., Jacquemier J., Birnbaum D., Lopez M., (2007), *BMC Cancer*, 2, 7, 73.
48. Goufman E. I., Moshkovskii S. A., Tikhonova O. V., Lokhov P. G., Zgoda V. G., Serebryakova M. V., Toropygin I. Y., Vlasova M. A., Safarova M. R., Makarov O. V., Archakov A. I., (2006), *Biochemistry (Mosc)*, 71(4), 354-360.
49. Yu K. H., Rustgi A. K., Blair I. A., (2005), *J. Proteome Res.*, 4(5), 1742-1751.
50. Huang H. L., Stasyk T., Morandell S., Dieplinger H., Falkensammer G., Griesmacher A., Mogg M., Schreiber M., Feuerstein I., Huck C. W., Stecher G., Bonn G. K., Huber L. A., (2006), *Electrophoresis*, 27(8), 1641-1650.
51. Aebersold R., Mann M., (2003), *Nature*, 422, 198-207.
52. Kozak K. R., Su F., Whitelegge J. P., Faull K., Reddy S., Farias-Eisner R., (2005), *Proteomics*, 5, 4589-4596.
53. Petricoin E. F., Ornstein D. K., Paweletz C. P., Ardekani A., Hackett P. S., Hitt B. A., Velasco A., Trucco C., Wiegand L., Wood K., Simone C. B., Levine P. J., Linehan W. M., Emmert-Buck M. R., Steinberg S. M., Kohn E. C., Liotta L. A., (2002), *J. Natl. Cancer Inst.*, 94, 1576-1578.
54. Li J., Zhang Z., Rosenzweig J., Wang Y. Y., Chan D. W., (2002), *Clin. Chem.*, 48, 1296-1304.
55. Goncalves A., Esterni B., Bertucci F., Sauvan R., Chabannon C., Cubizolles M., Bardou V. J., Houvenaegel G., Jacquemier J., Granjeaud S., Meng X. Y., Fung E. T., Birnbaum D., Maraninchi D., Viens P., Borg J. P., (2006), *Oncogene*, 25, 981-989.
56. Lowenthal M. S., Mehta A. I., Frogale K., Bandle R. W., Araujo R. P., Hood B. L., Veenstra T. D., Conrads T. P., Goldsmith P., Fishman D., Petricoin E. F., Liotta L. A., (2005), *Clin. Chem.*, 51, 1933-1945.
57. Ho D. W., Yang Z. F., Wong B. Y., Kwong D. L., Sham J. S., Wei W. I., Yuen A. P., (2006), *Cancer*, 107, 99-107.
58. Wadsworth J. T., Somers K. D., Cazares L. H., Malik G., Adam B. L., Stack B. C., Wright G. L., Semmes O. J., (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10, 1625-1632.
59. de Noo M. E., Deelder A., van der Werff M., Ozalp A., Mertens B., Tollenaar R., (2006), *Onkologie*, 29, 501-506.
60. Hortin G. L., (2006), *Clin. Chem.*, 52, 1223-1237.
61. Villanueva J., Shaffer D. R., Philip J., Chaparro C. A., Erdjument-Bromage H., Olshen A. B., Fleisher M., Lilja H., Brogi E., Boyd J., Sanchez-Carbayo M., Holland E. C., Cordon-Cardo C., Scher H. I., Tempst P., (2006), *J. Clin. Invest.*, 116, 271-284.
62. Griffiths J., (2007), *Analytical Chemistry*, 8833-8837.
63. Hall D. A., Ptacek J., Snyder M., (2007), *Mech Ageing Dev.*, 128(1), 161-167.
64. Zhu H., Snyder M., (2003), *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7(1), 55-63.
65. 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. Y., Berchuck A., van Haaften-Day C., Hacker N. F., de Bruijn H. W., van der Zee A. G., Jacobs I. J., Fung E. T., Chan D. W., (2004), *Cancer Res.*, 64, 5882-5890.
66. Mor G., Visintin I., Lai Y., Zhao H., Schwartz P., Rutherford T., Yue L., Bray-Ward P., Ward D. C., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(21), 7677-7682.