

TECHNOLOGIE CIPHERGEN - NOVÁ PERSPEKTIVA V PROTEOMICE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

CIPHERGEN TECHNOLOGY - NEW PERSPECTIVE IN PROTEOMICS OF TUMOUR BIOLOGY

HELÁNOVÁ Š.¹, VYZULA R.², ŽALOUDEK J.^{1,2}, NENUTIL R.³, MÜLLER P.¹, ČESKOVÁ P.¹, VALÍK D.⁴, VOJTĚŠEK B.¹

¹ ZÁKLADNA EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE, ² KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE, ³ ODDĚLENÍ PATOLOGIE A ⁴ ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn: Proteomické přístupy sebou přinesly nové naděje na objevení biomarkerů použitelných pro diagnostiku onemocnění, předpovědi citlivosti na terapii a monitorování progresu. Velké úsilí bylo věnováno identifikaci tisíce proteinů v séru, plasmě, moči a tkáňových lysátech za využití hmotnostní spektrometrie. Diagnostika založená na využití metod hmotnostní spektrometrie má v molekulární medicíně velký potenciál. S využitím nejmodernějších technologií hmotnostní spektrometrie je možné vyvinout nové klinické testy, které budou praktické, robustní, přesné a především levné. Nejnovější přístup také nazývaný analýza proteomového profilu („proteomic pattern analysis“) lze považovat za potenciálně efektivní metodu včasné diagnostiky nemocí jako jsou nádory ovária, prsu, prostaty a jiných tkání. Tato metoda se opírá o charakteristický profil proteinů a nikoliv pouze o identifikaci individuálního biomarkeru. Získání charakteristického proteomového profilu s využitím „Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF MS)“ patří mezi nejnovější přístupy vedoucí k objevování těchto proteinových spekter schopných podílet se na odlišení chorobného stavu od zdravého stavu s vysokou senzitivitou a specificitou. Tyto nové přístupy spojují na jedné straně analýzu proteinů vázaných k pevné matici hmotnostní spektrometrií a na druhé straně bioinformatiku, což umožňuje detekci patologických stavů projevujících se změnou proteomu v séru, plasmě, moči a tkáňovém nebo buněčném lysátu. Výhodou těchto přístupů bude vývoj rapidních a ekonomicky výhodných testů s odpovídající klinickou senzitivitou a specificitou. Lze předpokládat, že tyto nové technologie přispějí k dramatickým změnám v detekci nemocí, jejich monitorování a jejich sledování.

Klíčová slova: nádor, biomarker, 2D ELFO, SELDI, Ciphergen

Summary: The proteomics approaches have brought new hope of discovering novel biomarkers that can be used to diagnose diseases, predict therapy response and monitor disease progression. Large effort was focused on the mass spectral identification of the thousands of proteins from serum, plasma, urine, and tissues. Mass spectrometry-based diagnostics have the potential to change molecular medicine. Using modern mass-spectrometer technologies, clinical tests can be developed in the near future that are practical, robust, accurate, and inexpensive. A new approach termed „proteomic pattern analysis“ is known as an effective method for the early diagnosis of diseases such as ovarian, breast, prostate cancer and others. This method relies on the pattern of proteins observed and does not rely solely on the identification of a traceable biomarker. Protein pattern profiling by surface-enhanced laser desorption/ionisation time of flight (SELDI-TOF) mass spectrometry is known as a novel approach to discover protein patterns capable of distinguishing disease and disease-free states with high sensitivity and specificity. These approaches couple affinity-based mass spectrometry with adaptive bioinformatics, which can now be employed to detect pathological states reflected in the serum, plasma, urine or cell lysate proteome. With this approach, rapid and cost-effective tests with exquisite clinical sensitivity and specificity are emerging. These new methodologies may dramatically change how disease is detected, monitored, and managed.

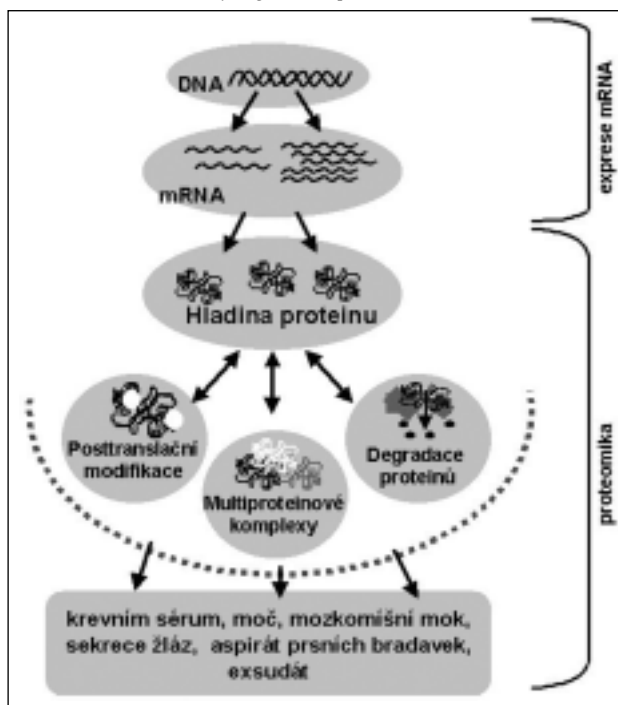
Key words: tumour, biomarker, 2-D ELFO, SELDI, Ciphergen

Jedním ze základních směrů biomedicínského výzkumu je hledání a stanovení biomarkerů, jejichž měření by vedlo k efektivnímu rozlišení definovaných fází různých typů onemocnění. Potřeba identifikovat biomarkery onemocnění je podporována nárůstem počtu přežívajících pacientů s onkologickým onemocněním, kteří díky biomarkerům byli diagnostikováni v počátečním stádiu vývoje primárního nádoru či recidivy. Doposud využívaný omezený počet nádorových markerů má značný význam pro detekci, diagnostiku a prognózu mnoha typů malignit navzdory skutečnosti, že jsou často prakticky využitelné pouze v určitých klinických situacích. Lze konstatovat, že stále chybí další skupiny biomarkerů, které by umožnily přesnější a včasnější diagnostiku daného onemocnění a sledování odpovědi pacienta na použitou terapii. Úspěch léčby nesporně závisí jak na přesné a včasné diagnóze a stanovení rozsahu onemocnění, tak také na dostupném a především spolehlivém a včasném odhalení klinické rekurence. Objevení, identifikace a validace proteinů (biomarkerů) doprovázejících určitou fázi onemocnění je velmi komplikovaný proces často vyžadující analýzu stovek, až tisíců vzorků.

Proteomika a nádorová onemocnění

Dostupnost sekvence lidského genomu otevřela cestu celé řadě nových možností v biomedicínském výzkumu a rozhodující výzvou je využití genetické informace pro lepší pochopení funkce a distribuce proteinů v normálních i biologicky patologických procesech. Úspěšné sekvenování lidského genomu odhalilo několik nových poznatků včetně skutečnosti, že lidský genom je tvořen pouze 30 000 - 40 000 geny, avšak je vysoce variabilní s přibližně 60 000 funkčními polymorfismy (1). S využitím nových vysoce výkonných genomických technologií pokračuje identifikace a analýza mutací a polymorfismů klíčových genů, čímž dochází k rozšiřování spektra vhodných genomických biomarkerů. Důležitým úkolem navazujícím na dokončenou analýzu genomu je identifikace nových proteinů a pochopení jejich struktury, funkce a vzájemných interakcí popřípadě interakcí s jinými molekulami, tedy informací, které z principu nemohou být získány na základě samotného genomického přístupu (Obr. 1). Funkčními produkty genetické informace v buňce jsou proteiny. Tyto proteiny - souborně označované termínem „proteom“

Obrázek 1: Souhrnná analýza genové exprese.



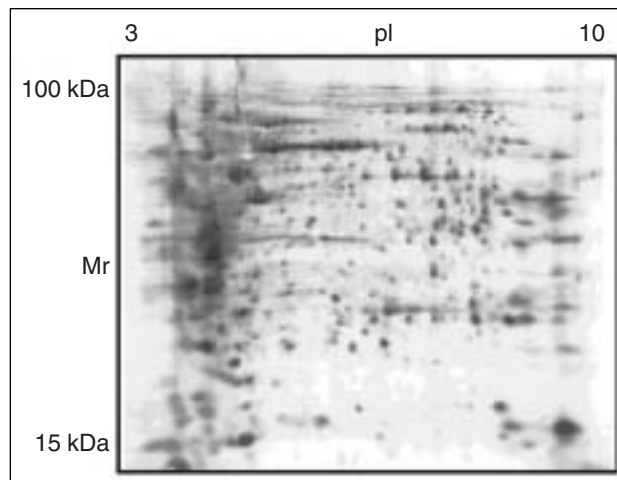
- jsou zodpovědné za (i) tvorbu strukturních komponentů v buňce (např. aktin, tubulin, dezmin a keratiny), (ii) mezibuněčnou komunikaci a signalizaci, (iii) metabolické procesy (enzymy a enzymové sítě) a (iv) regulaci klíčových biochemických drah ovlivňujících buněčné dělení, buněčnou diferenciaci a programovanou buněčnou smrt. Porušení normálních fyziologických funkcí buňky v důsledku procesů spojených s onemocněním vede ke změně proteinového spektra v čase. Takto vzniklé změny mohou, avšak nemusejí, vykazovat vzájemnou korelaci mezi hladinou genové exprese a hladinou syntetizovaného proteinu (2). Tato skutečnost je velmi důležitá především v oblasti onkologického výzkumu, kde aberantní exprese proteinů (způsobená mutacemi, polymorfismy popřípadě posttranslačními alteracemi atd.) může specificky přispívat k patogenezi daného onemocnění a zároveň nabízet nové cíle pro diagnostiku nebo potenciální terapii (2, 3). Nejen aberantní exprese proteinů, ale především vzájemné proteinové interakce hrají důležitou úlohu při regulaci biologických drah a jejich funkcí. Pro pochopení podstaty studovaného onemocnění je tedy rovněž nutná současná charakterizace proteinových hladin a sítě interakcí v buňce popřípadě v organismu (4). K analýze proteinových hladin a vzájemných interakcí proteinů jsou dostupné stále zlepšované „proteomické“ technologie. Tyto technologie jsou v mnoha případech komplementární, a tak bychom je mohli chápat jako různé metodické postupy vedoucí k objasnění různých funkcí proteomu (2D-ELFO, MALDI/SELDI-TOF, 2D-HPLC, ELISA, imunohistochemie).

Metodické přístupy využívané v proteomice

Doposud převládající efektivní proteomickou technologií v objevování nových biomarkerů rozdílných typů nemocí je dvourozměrná gelová elektroforéza (2D-ELFO) s následnou hmotnostní spektrometrií (5, 6). Metodou 2D-ELFO jsou komparativně analyzovány proteiny dvou rozdílných vzorků s následným srovnáním proteinových spekter (Obr. 2). Vybrané proteinové „spoty“ jsou vyříznuty z gelu, proteolyticky a chemicky štěpeny a výsledné peptidy jsou analyzovány hmotnostní spektrometrií (Mass Spectrometry - MS) s cílem identifikovat původní protein.

Metoda 2D-ELFO je založena na separaci proteinů podle jejich náboje (izoelektrického bodu) v prvním směru a podle

Obrázek 2: Typický 2-DE gel celobuněčného lyzátu myší buněčné linie A5. Proteiny byly separovány v imobilizovaném pH gradientu (pH 3-10) v prvním (horizontálním) směru a pomocí 12% SDS-PAGE v druhém (vertikálním) směru. Barveno stříbrem. (Mr – relativní molekulová hmotnost, pI – izoelektrický bod).

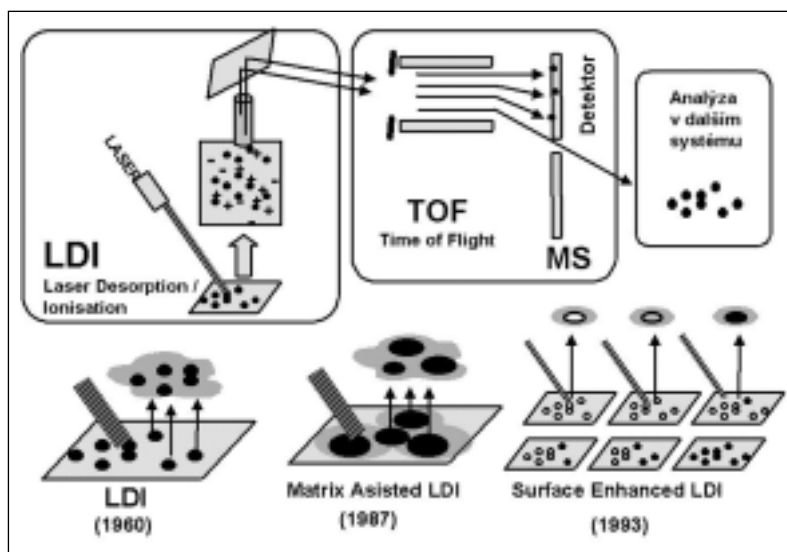


molekulové hmotnosti ve směru druhém. Jako separační metoda poskytuje excelentní rozlišení směsných proteinových komplexů. Tato metoda má však technické limity týkající se separačních a identifikačních procesů jako jsou: (i) velká pracnost, (ii) limitace množství nanášeného proteinu, (iii) nízká citlivost běžných barvicích technik a (iii) neschopnost rozlišovat proteiny s extrémně nízkými a vysokými molekulovými hmotnostmi. Díky těmto nedostatkům je složité provádět analýzy extrémně komplexních proteinových směsí stejně jako analýzy určité kategorie rozdílně exprimovaných proteinů (7). Původně byla tato metoda velmi málo reprodukovatelná především při analýze proteinových spekter a srovnání mezi dvěma gely a dvěma různými analytickými separacemi. Mnohaleté úsilí stovek laboratoří na celém světě vedlo nakonec ke zlepšení reprodukovatelnosti a širší aplikovatelnosti dané metody. Podařilo se vyvinout metody, které umožňovaly zlepšení analýzy vybraných skupin proteinů, byly vyvinuty nové imobilizované pH gradienty a jejich širší spektrum. Největším přínosem pro tuto metodologii byl vývoj sofistikovaného softwaru pro analýzu komplexních dat z 2D-ELFO. Přestože tato zlepšení vedla k vyšší citlivosti dané metody a k reprodukovatelnější analýze především velmi základních a kyselých proteinů (5-7), je nutno si uvědomit, že je to metoda těžkopádná a náročná na čas. V současné době se však 2D-ELFO stále využívá v oblasti hledání nových biomarkerů onemocnění.

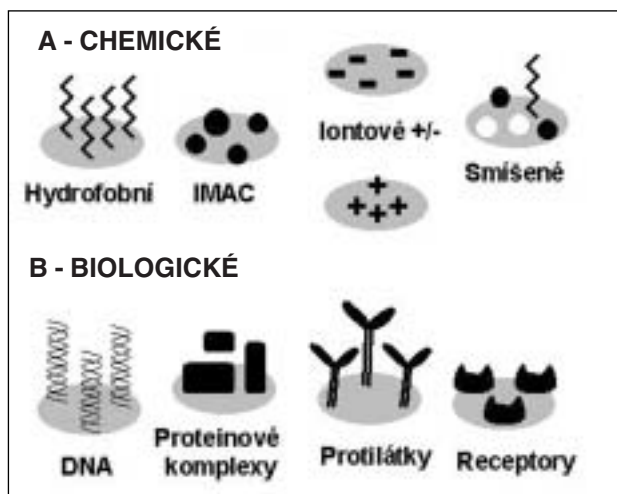
Vývoj další progresivní technologie 2D-HPLC (2D-High Pressure Liquid Chromatography - vysočinná kapalinová chromatografie) nepřinesl úspěch při hledání nových biomarkerů jednak z důvodu komplexity proteinových vzorků (sérum, plasy nebo tkáňových extraktů) a jednak důvodu problematického vymývání jednotlivých proteinů z kolony ve formě kompatibilní s hmotnostní spektrometrií (MS).

Následně zavedení nové výkonné a senzitivní metody MALDI-TOFMS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) otevřelo cestu k usnadnění charakterizace analyzovaných proteinů (8, 9). Aplikace MALDI-TOFMS pro rutinní diagnostiku je však velmi omezená, protože biologický materiál (sérum, plasma, celé buňky, buněčný lyzáty) obsahuje stovky klinicky a biologicky významných molekul, které musí být pro analýzu s využitím MALDI-TOFMS zdlouhavě připravovány a především purifikovány. K purifikaci a přípravě vzorků pak slouží výše uvedené metody 2D-ELFO, 2D-HPLC, molekulární síta a iontová chromatografie, tedy metody finančně i časově náročné a především vyžadující velký objem vstupních vzorků.

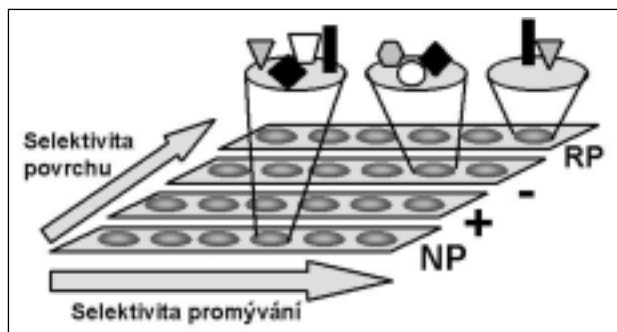
Obrázek 3: Schématické znázornění metody SELDI-TOF MS.



Obrázek 4: Struktura povrchů čipů používaných pro SELDI-TOF MS. (A) chemické povrchy. (B) biologické povrchy.



Obrázek 5: Schéma potenciální kombinace čipů. Současná analýza vzorků na čipech s různou matricí umožňuje zachycení všech přítomných proteinů ve vzorku.



Nejnovější metodický přístup zavedený v oblasti biomedicínského výzkumu zaměřeného na hledání biomarkerů je systém SELDI-TOF-MS (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), který kombinuje vazbu proteinů s hmotnostní spektrometrií. Teprve v této konfiguraci je hmotnostní spektrometrie vhodná pro detekci smě-

si proteinů v heterogenním a klinicky běžném vzorku. Tento systém současně řeší problémy spojené s přípravou vzorků pro MALDI-TOF-MS a byl poprvé představen v roce 1993 (10).

SELDI-TOF MS

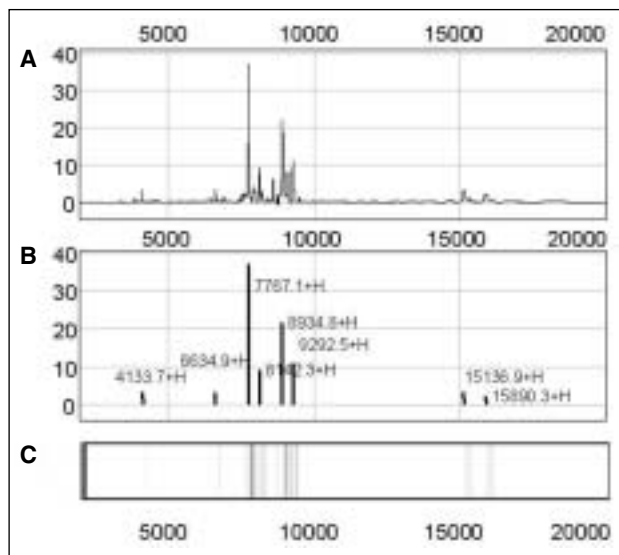
SELDI-TOF MS tvoří tři základní komponenty: (i) proteinové čipy, (ii) hmotnostní analyzátor a (iii) software pro analýzu získaných dat. Princip metody SELDI-TOFMS je jednoduchý a je založen na vazbě proteinů na předpřipravený povrch pevné fáze proteinového čipu (i) adsorpcí, (ii) elektrostatickou interakcí nebo (iii) afinitní chromatografií (Obr. 3). Univerzálnost této technologie spočívá v chemické (v podstatě „pseudochromatografické“) interakci povrchu čipu s analyzovaným materiálem (Ciphergen Biosystems ProteinChip, Fremont, CA). Tyto čipy mohou být vyrobeny dle požadavku zákazníka tak, aby byly schopny vázat specifickou skupinu proteinů z analyzovaného vzorku. Povrch čipů může být hydrofobní, hydrofilní, kation-

nický a anionický (chemické povrchy) nebo tvořený protilátkou, DNA, receptorem nebo ligandem (biologické povrchy) (Obr. 4 A, B). Následná analýza pak probíhá ve shodném principu s MALDI-TOF MS, kdy dochází k laserové desorpci a ionizaci vzorků, které jsou ko-krytalizovány s matricí na povrchu cílového čipu (11). Jednou z velkých výhod SELDI-TOF MS a rozdílných povrchů čipů je skutečnost, že daný vzorek komplexní směsi proteinů může být analyzován současně na několika různých sorbentech, aby byly navázány a analyzovány veškeré proteiny ve studovaném vzorku (Obr. 5). Proteiny navázané na matrici jsou s využitím relativně jednoduchého hmotnostního spektrometru ionizovány dusíkovým laserem, který poskytne dostatek desorpční energie na vytvoření plynných, ionizovaných molekul peptidů, jež jsou urychleny v elektrickém poli směrem k detektoru. Molekulové hmotnosti iontů jsou kalkulovány měřením doby jejich letu [„Time-Of-Flight“ (TOF)] k danému detektoru a vztaženy k poměru hmotnosti iontového analytu a jeho náboje (mass-to-charge ratio, m/z). Technologie SELDI-TOF MS umožňuje nejen využití čipů s chemickými povrchy, které slouží především ke hledání nových biomarkerů onemocnění, ale hlavně umožňuje přípravu čipů s biochemickým povrchem (tvořené protilátkami, DNA, enzymy, receptory, cytostatiky atd.), které umožňují studium biomolekulárních interakcí (interakce protein-protein, protilátka-antigen, enzym-substrát, protein-DNA, protein-cytostatikum, DNA-cytostatikum, receptor-ligand, atd.) (11).

Analýza proteomických dat

Rozvoj proteomických studií přináší naději na objevení nových biomarkerů použitelných pro diagnostiku onemocnění, předpověď odezvy na terapii a monitorování nádorové progresy. Využitím hmotnostní spektrometrie je možno identifikovat tisíce proteinů, které tvoří komplexní biosystémy jako jsou tkáň a tělní tekutiny. Za revoluční můžeme považovat především analýzu proteomového profilu jako potenciálně velmi efektivní metodu pro včasnou diagnostiku onemocnění, která se opírá o charakteristický profil proteinů a nikoliv jen o identifikaci stopového biomarkeru. Aby analýza proteomového profilu byla využitelná v klinické praxi jako nový vysoce citlivý diagnostický nástroj, je nutno provést analýzy stovek pacientů a rovněž analyzovat a interpretovat získaná data. Posun od analýzy jednoho markeru k analýze panelu markerů při diagnostice onemocnění a nutnost interpretace dat získaných proteomickými technologiemi vedla k rozvoji bioinformatiky, která umožňuje využívání proteinových databází a speciálního software. V uplynulých pěti letech byly vytvořeny

Obrázek 6: Hmotnostní spektrum SELDI analýzy séra pacienta. (A) spektrum vyjádřené formou piků, (B) vyjádřené jako čárové spektrum, (C) vyjádřené formou „gelového“ záznamu.



nové algoritmy pro obrazovou analýzu gelů připravených 2D-ELFO metodou, stejně jako nové algoritmy pro analýzu dat získaných hmotnostní spektrometrií [(„Peptide Mass Fingerprinting (PMF) a „Peptide Fragmentation Fingerprinting (PFF) - podrobnosti o metodách viz citace] (12). Výstupem TOF-MS analýzy je hmotnostní spektrogram zachycující relativní intenzitu v relaci k molekulové hmotnosti lomené nábojem detekovaných proteinů (m/z , viz výše) (Obr. 6A). Pro zjednodušení identifikace rozdílů v expresi proteinů dvou různých vzorků, umí používaný software prezentovat spektrometrický signál v podobě (i) vrcholů (Obr. 6 A), (ii) čárových spekter (Obr. 6 B) a (iii) 1D-ELFO struktury (Obr. 6 C). Software rovněž umožňuje srovnávací analýzu rozdílných vzorků s cílem nalezení unikátních rozdílů v expresi proteinů. Lze dále provádět shlukové analýzy (cluster analysis) s cílem identifikace signifikantních rozdílů v proteinových spektrech analyzovaných stovek a tisíců vzorků (13, 14).

SELDI, její limitace a využití v nádorové a obecné biologii

Mikročipová analýza pro detekci proteinů je příslibem pro biomedicínský výzkum a pro klinickou diagnostiku. Přes rozvoj těchto technologií v několika posledních letech je pro jejich reálné praktické využití v aplikované medicíně nutno překonat mnoho nedostatků. SELDI-TOF představuje nástroj, který je schopen komplexně studovat změny na úrovni proteinů ve tkáních, které mohou být asociovány s vývojem nádorů a progresí, ale není prozatím schopen poskytnout analýzy biomarkerů spojených s jednorázovými typy onemocnění. Přestože SELDI-TOF MS není ve většině případů schopna umožnit přímou identifikaci jednotlivých proteinů, které mohou být potenciálními biomarkery onemocnění, je schopna velmi rapidně generovat proteomové profily stovek vzorků. Sérum, moč nebo lýzát nádorové i normální tkáně vykazují velkou proteinovou variabilitu. Proteomická diagnostika může být tedy efektivní pouze tehdy, bude-li využívat metody, které dokáží najít a seskupit tyto rozdíly a srovnat je za účelem charakterizace určitého stavu nemoci. Například v sérech pacientek s ovariálním karcinomem a pacientek kontrolních nebyl nalezen jediný unikátní shodný proteinový profil, nicméně mnohočetné proteinové profily (multiple patterns) získané od pacientek s ovariálním karcinomem se ani v jednom případě neshodovaly s „multiple patterns“ získaných od kontrolních zdravých pacientek (15, 16). Tyto výsledky potvrzují, že analýza proteinových spekter (např. s využitím SELDI-TOF MS) může být realizovatelnější myš-

lenkou budoucí klinické diagnostiky než identifikace unikátních proteinů pro určitou nemoc.

Přestože SELDI-TOF MS byla již úspěšně použita i pro vytvoření proteomických profilů sérových vzorků získaných od pacientů s karcinomem prsu, ovária a prostaty (15, 17, 18), je tato technologie stále nepřipravena pro rutinní klinické diagnostické aplikace v laboratořích klinické biochemie. Důvodem je i to, že využití SELDI-TOF MS jako diagnostického instrumentu je ovlivněno také běžnými technickými problémy jako je dlouhodobá stabilita složitého zařízení při rutinním používání a především shodnost kvality chemického povrchu čipů mezi jednotlivými výrobními šaržemi. Při analýze a validaci komplexního klinického materiálu jako je sérum, plasma a moč je nutná stoprocentní shodnost chemického povrchu jednotlivých šarží vyráběných čipů, která je prozatím nedosažitelná. Problémem je biologická heterogenita u nemocných a kontrolních jedinců využívaných pro hledání nových biomarkerů studovaného onemocnění. Tato technologie nám tedy poskytuje směr hledání, identifikace a izolace specifických biomarkerů spojených s daným onemocněním, které v kombinaci mohou vést ke zlepšení detekce, diagnostiky a prognostiky např. nádorových onemocnění. Pro budoucí rutinní klinické využití SELDI-TOF MS jsou nutná technická zlepšení (např. stabilita laseru etc.) přípravy chemických povrchů čipů a především dopracování univerzálního software pro pokud možno „rutinní“ analýzu dat.

SELDI-TOF MS má rovněž celou řadu dalších možných biologických aplikací dle vytvořeného povrchu čipu. Na povrch čipu mohou být kovalentně navázány například protilátky, proteiny, enzymy, receptory, cytostatika a DNA, což umožňuje studium různých forem interakcí jako jsou (i) protilátka-antigen, (ii) protein-protein, (iii) protein-DNA, (iv) enzym-substrát, (v) receptor-ligand, (vi) cytostatikum-protein, (vii) cytostatikum-DNA, (viii) DNA-protein, atd. Jsou-li při přípravě čipů využity vazebné reagenty (capture reagents) s vysokou afinitou, jsou získané výsledky SELDI-TOF MS mnohonásobně specifičtější oproti klasickým „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA). Metoda SELDI-TOF MS je rovněž využitelná pro analýzu posttranslačních modifikací proteinů typu glykosylace a fosforylace (19, 20) a jako alternativní metoda „gel shift assay“, která odstraňuje používání radioaktivity v klasickém experimentálním uspořádání (21).

Závěry a potenciální směry využití SELDI-TOF v onkologické diagnostice

Příspěvek hmotnostní spektrometrie pro biologické vědy je již nyní enormní, o čemž svědčí udělení Nobelovy ceny v chemii v roce 2002. Současná a budoucí vývoj nových proteomických nástrojů bude mít velký aplikační význam pro (i) stratifikaci pacientů, (ii) sledování účinnosti terapie a pro (iii) stanovení rizika vzniku onemocnění, což v budoucnu budou moci využívat především onkologové. Přestože SELDI-TOF a s ní spojená proteomová technologie je stále v časném stádiu vývoje je zřejmé, že její nové modifikace jsou nutné pro plné klinické nasazení v medicíně. Jednou z nutností pro budoucí využití SELDI-TOF v onkologii je potvrzení její sensitivity a specificity pro prospektivní detekci různých stádií nádorových onemocnění. Bude nutné věnovat velké úsilí rovněž identifikaci nově objevených molekul, jejich koncentračním rozdílům a pochopení jejich patobiologických změn v séru, plasmě, moči nebo nádorové tkáni a především vztahu těchto změn k nádoru nebo k epigenetickým změnám způsobeným nádorovým procesem. Budoucí využívání SELDI-TOF MS v klinické praxi umožní včasnější detekci nádorových onemocnění s rozdělením pacientů dle potenciálního rizika a umožní charakterizaci každého pacienta s využitím proteinového profilu získaného z mikroskopického množství jeho tkáně a/nebo séra.

Rozšířené aplikace dané technologie ve výzkumu onkologických onemocnění povedou k identifikaci unikátních proteinů a proteinových profilů, které charakterizují nádorovou pro-

gresi od normálního stavu k více agresivním maligním stavům. Bude nutné přesněji provádět analýzu signálních drah, které jsou využívány jak nádorovými buňkami tak buňkami okolní normální tkáně a bude také třeba vytvořit mapy funkčních interakcí u jednotlivých pacientů, což umožní monitorování odpovědi na terapii jak nádorové populace buněk tak okolního buněčného prostředí. Nové identifikace a charakterizace proteinů, jejich interakcí a analýza funkčních drah by měly umožnit vývoj nových diagnostických a terapeutických přístupů pro onkologický výzkum a vývoj nových terapií. Podaří-li se vytvořit genomickou a proteomickou mapu kaž-

dého nádorového onemocnění popřípadě dalších nemocí, bude možné individualizovat selekci kombinované terapie, která zasáhne vybrané cílové proteinové dráhy. Tyto přístupy pak umožní klinikům monitorovat individuálně pacienty v průběhu celé terapie.

Poděkování

Práce byla podporována IGA MZ ČR NC7131-3 a NC7104-3 a VZMOÚ 00000209805. Poděkování patří především firmě AstraZeneca za příspěvek na zakoupení systému SELDI/TOF a Mgr. Pavlu Bouchalovi za podklady pro obrázek 2.

Literatura

- Christmann M., Tomicic M. T., Roos W. P. and Kaina B.: Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003; 193(1-2):3-34.
- Chambers G., Lawrie L., Cash P. and Murray G. I.: Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol* 2000; 192(3):280-8.
- Srinivas P. R., Srivastava S., Hanash S. and Wright G. L., Jr.: Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem* 2001; 47(10):1901-11.
- Gunn L. and Smith M. T.: Emerging biomarker technologies. *IARC Sci Publ* 2004; 157:437-50.
- Hanash S. M.: Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: current status. *Electrophoresis* 2000; 21(6):1202-9.
- Bergman A. C., Benjamin T., Alaiya A., Waltham M., Sakaguchi K., Franzen B., Linder S., Bergman T., Auer G., Appella E., Wirth P. J. and Jornvall H.: Identification of gel-separated tumor marker proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000; 21(3):679-86.
- Gorg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R. and Weiss W.: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000; 21(6):1037-53.
- Hillenkamp F., Karas M., Beavis R. C. and Chait B. T.: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 1991; 63(24):1193A-203A.
- Chaurand P., Stoeckli M. and Caprioli R. M.: Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry. *Anal Chem* 1999; 71(23):5263-70.
- Hutchens T. W. and Yip T.: New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1993; 7(546-80).
- Issaq H. J., Conrads T. P., Prieto D. A., Tirumalai R. and Veenstra T. D.: SELDI-TOF MS for diagnostic proteomics. *Anal Chem* 2003; 75(7):148A-55A.
- Blueggel M., Chamrad D. and Meyer H. E.: Bioinformatics in proteomics. *Curr Pharm Biotechnol* 2004; 5(1):79-88.
- Adam B. L., Qu Y., Davis J. W., Ward M. D., Clements M. A., Cazares L. H., Semmes O. J., Schellhammer P. F., Yasui Y., Feng Z. and Wright G. L., Jr.: Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002; 62(13):3609-14.
- Poon T. C., Yip T. T., Chan A. T., Yip C., Yip V., Mok T. S., Lee C. C., Leung T. W., Ho S. K. and Johnson P. J.: Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem* 2003; 49(5):752-60.
- 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. and Liotta L. A.: Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359(9306):572-7.
- Liotta L. A., Petricoin E. F., 3rd, Ardekani A. M., Hitt B. A., Levine P. J., Fusaro V. A., Steinberg S. M., Mills G. B., Simone C., Fishman D. A. and Kohn E. C.: General keynote: proteomic patterns in sera serve as biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003; 88(1 Pt 2):S25-8; discussion S37-42.
- Paweletz C. P., Liotta L. A. and Petricoin E. F., 3rd: New technologies for biomarker analysis of prostate cancer progression: Laser capture microdissection and tissue proteomics. *Urology* 2001; 57(4 Suppl 1):160-3.
- Paweletz C. P., Gillespie J. W. and Ornstein J. K.: Rapid protein display profiling of cancer progressions directly from human tissue using a protein biochip. *Drug Dev Res* 2000; 49(34-42).
- Cardone M. H., Roy N., Stennicke H. R., Salvesen G. S., Franke T. F., Stanbridge E., Frisch S. and Reed J. C.: Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282(5392):1318-21.
- Chernyak A., Karavanov A., Ogawa Y. and Kovac P.: Conjugating oligosaccharides to proteins by squaric acid diester chemistry: rapid monitoring of the progress of conjugation, and recovery of the unused ligand. *Carbohydr Res* 2001; 330(4):479-86.
- Forde C. E., Gonzales A. D., Smessaert J. M., Murphy G. A., Shields S. J., Fitch J. P. and McCutchen-Maloney S. L.: A rapid method to capture and screen for transcription factors by SELDI mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290(4):1328-35.