

# Πρωτεωμική και Γυναικολογικός Καρκίνος

Καλή Μαξέδου<sup>1</sup>, Νίκος Πράπας<sup>2</sup>, Ανάργυρος Κούρτης<sup>3</sup>, Γεώργιος Μαξέδος<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ιατρός Βιοπαθολόγος, Διδάκτορας Α.Π.Θ., <sup>2</sup>Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής - Γυναικολογίας Α.Π.Θ., <sup>3</sup>Επιμελητής Β' ΕΣΥ  
<sup>4</sup>Καθηγητής Μαιευτικής - Γυναικολογίας Α.Π.Θ., Δ' Μαιευτική - Γυναικολογική Κλινική Α.Π.Θ.

Αλληλογραφία: Δρ. Καλή Μαξέδου, Ιατρός Βιοπαθολόγος  
Αριστοτέλους 45, 55 236 Πανόραμα  
Τηλ./fax: 2310 346942  
E-mail: kali@med.auth.gr

## Περίληψη

Η πρωτεωμική ασχολείται με τη μελέτη του πρωτεώματος, του συνόλου των πρωτεϊνών ενός οργανισμού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται τεχνικές, παλαιότερες, αλλά και σύγχρονα επιτεύγματα της τεχνολογίας, όπως τα συστήματα φασματογράφου μάζας. Στην ογκολογία, η πρωτεωμική μπορεί να συμβάλει στην ανίχνευση ομάδας βιολογικών δεικτών για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου, την εφαρμογή κατάλληλης θεραπείας και την παρακολούθησή της, με μεγαλύτερη ευαισθησία από τις μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Η εφαρμογή της πρωτεωμικής στον καρκίνο των ωοθηκών, τον καρκίνο του μαστού αλλά και τον καρκίνο του ενδομητρίου φαίνεται ότι μπορεί να δώσει μια άλλη προοπτική στη διάγνωση και τη θεραπεία το καρκίνου.

Λέξεις κλειδιά: πρωτεωμική, καρκίνος, βιολογικοί δείκτες

## Εισαγωγή

Στις μέρες μας, μετά την ταυτοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, η Ιατρική Γενετική προχώρησε στην αναγνώριση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά. Η μελέτη όλων των πρωτεϊνών του οργανισμού, που καλούνται «πρωτέωμα», αναφέρεται ως «πρωτεωμική» (proteomics). Ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1994 από τους Mark Wilkins et al. και αποτελεί την επιστημονική εξέλιξη της «γενωμικής» (genomics) (Wilkins et al., 1996a; Wilkins et al., 1996b).

Για τις ανάγκες της πρωτεωμικής έχουν αναπτυχθεί τεχνολογικά επιτεύγματα, τα οποία επιτρέπουν με μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία την ανίχνευση πρωτεϊνών. Παλαιότερα, οι παραδοσιακές τεχνικές της πρωτεωμικής δεν ήταν τόσο ευαίσθητες ώστε να χρησιμοποιηθούν για προσδιορισμούς σε ανθρώπινα κλινικά δείγματα (Wu and Kavanagh, 2002). Σήμερα, όμως, η κλινική πρωτεωμική διαθέτει πολύ περισσότερα τεχνολογικά μέσα, με κυριότερη τη φασματομετρία μάζας (mass spectrometry). Στην ογκολογία, η πρωτεωμική μπορεί να συμβάλει στην ανίχνευση και ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνών,

οι οποίες εκφράζονται διαφορετικά στους υγιείς ιστούς, σε σχέση με τους νεοπλασματικούς. Οι τεχνικές της πρωτεωμικής μπορούν να συμβάλουν στην ανίχνευση καρκινικών δεικτών για τη διάγνωση, την παρακολούθηση της πορείας της νόσου και τη δημιουργία θεραπευτικών στόχων (Haoudi and Bensmail, 2003).

### Από τη Γενομική στην Πρωτεωμική

Ποια ήταν όμως η ανάγκη στροφής της έρευνας για τον καρκίνο από τη γενομική στην πρωτεωμική; Μετά την ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος οι ερευνητές βρέθηκαν σε αδιέξοδο δεδομένου ότι οι γενετικές πληροφορίες αναφορικά με τον καρκίνο δεν επέτρεπαν την ακριβή πρόβλεψη των διεργασιών σε κυτταρικό και πρωτεϊνικό επίπεδο.

Η έκφραση των γονιδίων ενός κυττάρου *in vivo* υπόκειται στην επίδραση παραγόντων του περιβάλλοντος, οι οποίοι επηρεάζουν το μικροπεριβάλλον των κυττάρων και προκαλούν την αλληλεπίδρασή τους μέσα στην πολυπλοκότητα των δομών των ιστών (Wu and Kavanagh, 2002). Κάθε επίδραση πάνω στα κύτταρα έχει ως άμεση συνέπεια μεγάλο αριθμό μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών, δηλαδή των προϊόντων των γονιδίων των κυττάρων. Δεδομένου ότι από ένα γονίδιο προκύπτουν περισσότερα του ενός RNA και ότι μια πρωτεΐνη μπορεί να υποστεί μεταγραφικές, μεταφραστικές και περισσότερες από 200 μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν τη δομή της, τη λειτουργία της, την αλληλεπίδρασή της με τις άλλες πρωτεΐνες και με τον πυρήνα, τη σταθερότητα και την ημιπερίοδο ζωής της, συμπεραίνουμε ότι από ένα γονίδιο μπορεί να προκύψει ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνικών προϊόντων. Συνεπώς, το πρωτέωμα αντανάκλα τόσο τη γενετική πληροφορία, όσο και τις περιβαλλοντικές επιδράσεις πάνω στα κύτταρα (Haoudi and Bensmail, 2003). Έτσι, στην περίπτωση του καρκίνου, η πρωτεωμική μπορεί να συμβάλει, για παράδειγμα, στην εντόπιση διαφορών ανάμεσα σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα σε έναν ιστό και να βοηθήσει, με τον τρόπο αυτό, στη χρήση των κατάλληλων χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων για την καλύτερη θεραπεία της δεδομένης κακοήθειας. Η πρωτεωμική μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση του ρόλου των γονιδίων κατά την καρκινογένεση απαντώντας σε θεμελιώδη ερωτήματα, όπως ποιες πρωτεΐνες υπάρχουν σε ποια κύτταρα, πώς συμμετέχουν οι πρωτεΐνες αυτές στη μεταγωγή σήματος και πώς

αλλάζει η έκφραση και η λειτουργία τους, με συνέπεια την παρακμή και το θάνατο ενός οργανισμού (Verma et al., 2001).

Η έννοια «πρωτεωμική» για τον καρκίνο συμπεριλαμβάνει δύο κατηγορίες: την «πρωτεωμική έκφρασης» (expression proteomics) και την «πρωτεωμική λειτουργίας» (functional proteomics). Στην πρωτεωμική έκφρασης, πεδίο έρευνας αποτελούν οι πρωτεΐνες οι οποίες ανιχνεύονται με διαφορετικό τρόπο σε ένα δεδομένο ιστό, βιολογικό υγρό ή ορό. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την ανίχνευση βιολογικών δεικτών (καρκινικών δεικτών), που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην έγκαιρη εντόπιση και διάγνωση της νόσου, στην παρακολούθηση της θεραπείας και στο σχεδιασμό νέων θεραπευτικών σχημάτων. Από την άλλη πλευρά, η «πρωτεωμική λειτουργίας» ασχολείται με την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή πρωτεΐνης-DNA/RNA και με τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αυτή η πρωτεωμική μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών μεταξύ τους, αλλά και της απάντησής τους στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση των βιολογικών διεργασιών των καρκινικών κυττάρων και στην αναγνώριση πρωτεϊνικών θεραπευτικών στόχων, για αποτελεσματικότερη στοχευμένη θεραπεία (Wu and Kavanagh, 2002).

Παράλληλα, η πρωτεωμική διαιρείται σε «ποσοτική πρωτεωμική» και «δομική πρωτεωμική». Η ποσοτική πρωτεωμική ασχολείται με τη διερεύνηση της διαφορετικής έκφρασης των πρωτεϊνών ανάμεσα σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς, ή σε διαφορετικά στάδια μιας νόσου. Από την άλλη πλευρά, η δομική πρωτεωμική προσπαθεί να αποκαλύψει τη δομή των πρωτεϊνών και να χαρτογραφήσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (Anderson et al., 2000).

Μέχρι σήμερα, η διερεύνηση των βιολογικών δεικτών περιοριζόταν στην ανίχνευση ενός δείκτη για μια δεδομένη νόσο. Το πλεονέκτημα της πρωτεωμικής στη διαγνωστική του καρκίνου είναι ότι επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση ομάδας ανεξάρτητων αλλά σχετιζόμενων με τη νόσο πρωτεϊνών, οι οποίες σαν σύνολο είναι λιγότερο ευάλωτες στις γενετικές και περιβαλλοντικές επιδράσεις σε σχέση με τον ένα δείκτη (Anderson, 2005). Για παράδειγμα, οι Rai et al. ανίχνευσαν τρεις πιθανούς βιολογικούς δείκτες, οι οποίοι εκφράζονταν διαφορετικά σε πάσχουσες από καρκίνο του μαστού σε σχέση με υγιή άτομα. Συγκρινόμενοι με το καρκινικό αντιγόνο 125 (CA125) οι δείκτες αυτοί, μεμονωμένα, δεν πλεονεκτούσαν έναντι αυτού. Αντίθετα,

ο συνδυασμός των νέων δεικτών ήταν καλύτερος για τη διάγνωση και θεραπεία σε σχέση με τη χρήση μόνο του CA125 (Rai et al., 2002).

### Τεχνικές Πρωτεωμικής

Διάφορες τεχνικές είναι σήμερα διαθέσιμες για την απομόνωση και την ταυτοποίηση του πρωτεώματος σύνθετων δειγμάτων. Η ηλεκτροφόρηση μιας και δύο διαστάσεων (2D-gel electrophoresis) και άλλες τεχνικές χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό και την απομόνωση των πρωτεϊνών, ενώ η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS) είναι σήμερα η κορωνίδα των μεθόδων ταυτοποίησής τους.

#### Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1975 (O'Farrell, 1975) και από τότε χρησιμοποιείται ευρέως στα διάφορα εργαστήρια αφού βελτιώθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε σε μια πρώτη διάσταση να κινητοποιούνται οι πρωτεΐνες, ανάλογα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο, σε βαθμίδωση του pH και σε μια δεύτερη διάσταση να διαχωρίζονται, ανάλογα με τη μοριακή τους μάζα (Bjellqvist et al., 1982). Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται γέλη πολυακρυλαμίδιου, ενώ με τη χρήση διαφορετικών χρωστικών, όπως χρώση αργύρου (Merril et al., 1979), Coomassie μπλε χρώση, φθορίζουσες χρωστικές (Patton, 2000), ή ραδιοσήμανσης μπορούν να απεικονιστούν χιλιάδες πρωτεΐνες πάνω σε μια και μόνο γέλη. Στη συνέχεια, η γέλη μπορεί να σαρωθεί με laser πυκνόμετρα, με ανιχνευτές φθορισμού ή άλλη συσκευή και τα δεδομένα μπορούν να αναλυθούν με κατάλληλα υπολογιστικά προγράμματα (Bergman et al., 2000; Chakravarti et al., 2002). Με τον τρόπο αυτό, η δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για την ποσοτική εκτίμηση των μεταβολών των πρωτεϊνών ανάμεσα σε δύο δείγματα. Σήμερα, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται και για την ανάλυση των πρωτεϊνών ενός σύνθετου δείγματος πριν την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με τη φασματομετρία μάζας (Haoudi and Bensmail, 2003). Παρόλο που η δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση είναι πολύ χρήσιμη τεχνική, παρουσίαζε κάποιους περιορισμούς, όπως ότι χρειαζόταν μεγάλη ποσότητα δείγματος (~50μg), ότι είχε χαμηλή ευαισθησία στην ανίχνευση πρωτεϊνών, όπως οι κυτταροκίνες, οι πολύ μικρού και πολύ μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνες, και ότι είχε χαμηλή επαναληψιμότητα. Οι περιορισμοί αυτοί έχουν ξεπεραστεί, αφού η τε-

χνική έχει υποστεί βελτιώσεις που την καθιστούν χρήσιμο εργαλείο σε μελέτες παθήσεων, όπως ο καρκίνος (Gharbi et al., 2002; Somiari et al., 2003; Seike et al., 2004).

#### Άλλες τεχνικές

Παρά το γεγονός ότι η δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την πρωτεωμική, πλήθος νέων μεθόδων έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση του πρωτεώματος (Haoudi and Bensmail, 2003). Νέες μέθοδοι, όπως εκείνες του ιοντισμού [electrospray ionization (ESI), matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) και surface-enhanced laser desorption-ionization (SELDI)], έχουν βοηθήσει την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας, χωρίς τα μειονεκτήματα της δυσδιάστατης ηλεκτροφόρησης. Σε ένα παράδειγμα της τεχνικής του ιοντισμού, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται αρχικά στην αέρια φάση και με τη βοήθεια πρωτεασών διασπώνται σε πεπτιδία τα οποία, αφού συνδεθούν με ειδική ουσία (matrix), ιονίζονται και επιταχύνονται σε ηλεκτρικό πεδίο. Η μάζα των πεπτιδίων υπολογίζεται στη συνέχεια με βάση την ταχύτητα της επιτάχυνσης μέσα στο φασματογράφο μάζας και το χρόνο «πτήσης» των ιόντων (time-of-flight, TOF), αφού αυτά εξαρτώνται από τη μάζα και το φορτίο των ιόντων (m/z). Στη συνέχεια, γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων με διεθνείς βάσεις δεδομένων για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών. Οι μέθοδοι αυτές παρέχουν τη δυνατότητα της ταυτοποίησης και αλληλούχισης πρωτεϊνών σε πραγματικό χρόνο (real-time) αλλά και τη μελέτη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων πρωτεϊνών, ιδιαίτερα με τη χρήση της τεχνολογίας του τετραπόλου. Για την προετοιμασία και το διαχωρισμό σύνθετων πρωτεϊνικών δειγμάτων, μια επίσης πολύ αξιόπιστη μέθοδος είναι η υγρή χρωματογραφία, η οποία σε συνδυασμό με το φασματογράφο μάζας παρέχει υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας ταυτοποίηση πρωτεϊνών.

Μια άλλη μέθοδος, οι πρωτεϊνικές μικροσυτοιχίες (protein microarrays) με τη χρήση διαφόρων αντιγονικών υποστρωμάτων, έχουν χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια για την παράλληλη ανίχνευση πολλών πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά και ιστούς και φαίνεται εξίσου ελπιδοφόρα για την παρακολούθηση μιας νόσου.

#### Εφαρμογές στο γυναικολογικό καρκίνο

Αναφορικά με τον καρκίνο, η πρωτεωμική μπορεί να συμβάλει στην αναγνώριση και ποσοτική ανάλυση

ση πρωτεϊνών που εκφράζονται στους υγιείς ιστούς και στα διάφορα στάδια της νόσου, από την προνεοπλασία στη νεοπλασία. Μπορεί να βοηθήσει στην ανίχνευση δεικτών για τη διάγνωση του καρκίνου, για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και την αναγνώριση θεραπευτικών στόχων. Η πρωτεωμική αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση βιολογικών δεικτών, αφού το πρωτέωμα αντανακλά τόσο τον γενετικό προγραμματισμό, όσο και τις περιβαλλοντικές επιδράσεις σε επίπεδο της μετάφρασης και μετα-μεταφραστικά. Κατά την καρκινογένεση, οι πρωτεΐνες υφίστανται αλλαγές κατά τη μετατροπή του υγιούς κυττάρου σε καρκινικό, με συνέπειες στη λειτουργία του κυττάρου. Έτσι, ο βασικός στόχος της πρωτεωμικής είναι η αναγνώριση και η κατανόηση των αλλαγών αυτών, προκειμένου να γίνει έγκαιρη διάγνωση και να προσδιοριστεί η θεραπεία που αρμόζει στη συγκεκριμένη πάθηση. Συγκεκριμένα, για τους γυναικολογικούς καρκίνους, η πρωτεωμική φαίνεται ότι μπορεί να είναι χρήσιμη μέθοδος δίνοντας άλλη διάσταση στη διαγνωστική και στη θεραπευτική.

### I. Καρκίνος ωοθηκών

Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί έναν πολύ επιθετικό καρκίνο και εκείνον με τη μεγαλύτερη θνητότητα στις γυναίκες (Parkin et al., 1992; Banks et al., 1997; Greenlee et al., 2001). Είναι δυσπρόσιτος στην κλινική εξέταση και οι γυναίκες φθάνουν συνήθως στο γυναικολόγο με προχωρημένης έκτασης νόσο. Το καρκινικό αντιγόνο 125 (CA125) αποτελεί τον πιο διαδεδομένο ορολογικό δείκτη για τον προχωρημένο επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών. Αναφορικά όμως με τη χρήση του στην έγκαιρη διάγνωση του ωοθηκικού καρκίνου σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες με τη μορφή του screening, υστερεί ως δείκτης εξαιτίας της χαμηλής ευαισθησίας και ειδικότητας (Jacobs and Bast, 1989; MacDonald and Jacobs, 1999). Επιπλέον, παρόλο που το πνευλικό και το κοιλιακό υπερηχογράφημα έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο γυναικών υψηλού κινδύνου, κανένα από τα δύο δεν έχει την απαραίτητη ευαισθησία και ειδικότητα για να εφαρμοστεί σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες (MacDonald and Jacobs, 1999). Έχουν, παράλληλα, γίνει προσπάθειες να χρησιμοποιηθεί ο CA125 σε συνδυασμό με άλλους δείκτες καρκίνου (Woolas et al., 1993; Woolas et al., 1995; Zhang et al., 1999; Zhang et al., 2001) και με το υπερηχογράφημα σε μια δεύτερη διαγνωστική γραμμή (Jacobs et al., 1993; Menon et al., 2000) αυξάνοντας, έτσι, την ειδικότητα στη διάγνωση, κάτι που είναι μεγάλης ση-

μασίας σε καρκίνους όπως των ωοθηκών, που δεν είναι τόσο συχνοί αλλά έχουν μεγάλη θνητότητα. Εντούτοις, είναι μεγάλη η ανάγκη για ανακάλυψη νέων ορολογικών βιολογικών δεικτών, οι οποίοι μόνοι τους ή σε συνδυασμό με άλλους δείκτες ή διαγνωστικές μεθόδους να παρέχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στην πρόωμη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών (Bast et al., 2002).

Τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών δείχνουν ότι η πρωτεωμική μπορεί να καλύψει αυτές τις ανάγκες στη διαγνωστική και τη θεραπεία του καρκίνου. Μελέτη του 2002 των Rai et al., στην οποία μελετήθηκε το πρωτέωμα 67 γυναικών (29 με καρκίνο ωοθηκών και 38 χωρίς καρκίνο) έδειξε ότι στις γυναίκες με καρκίνο εμφανίζονταν δύο πρωτεΐνες (60 και 79 kD), οι οποίες σε συνδυασμό με το CA125 αύξησαν την κλινική ευαισθησία (από 81.3 σε 93.8%). Επιπλέον, συγκρίνοντας την ευαισθησία κατά τη χρήση του συνδυασμού των δεικτών σε πρώιμο και προχωρημένο στάδιο της νόσου διαπιστώθηκε ότι ήταν πιο αυξημένη στις περιπτώσεις πρώιμου σταδίου της νόσου.

Ένα χρόνο αργότερα, το 2003, μελέτη των Ye et al. κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η α-υπομονάδα της απτοσφαιρίνης, η οποία παράγεται και από τα καρκινικά κύτταρα, εκτός από τα ηπατικά, είναι ένας πιθανός βιολογικός δείκτης, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά στον CA125. Πρόκειται για μελέτη που διενεργήθηκε σε ορό 175 γυναικών, με διάφορους τύπους καρκίνου των ωοθηκών, και 91 μαρτύρων, ο οποίος αναλύθηκε με τις μεθόδους SELDI-MS και LC-MS/MS. Στη μελέτη φάνηκε ότι παρόλο που η ανίχνευση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ως βιολογικός δείκτης καρκίνου έχει χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα σε σχέση με τον CA-125, η χρήση του συνδυασμού των δύο δεικτών μπορεί να αυξήσει την πρώτη από 64% σε 91% και τη δεύτερη από 90% σε 95%.

Άλλη μελέτη των Zhang et al. του 2004 (Zhang et al., 2004) ταυτοποίησε ομάδα τριών πρωτεϊνών, την απολιποπρωτεΐνη A1, την τρανσθυρετίνη και τμήμα της βαριάς αλύσου H4 του αναστολέα της α-θρυψίνης (ΙΤΙΗ4), οι οποίες παρουσίασαν σημαντική διαφορά στα επίπεδα σε γυναίκες με καρκίνο ωοθηκών σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Συγκεκριμένα, οι δύο πρώτες παρουσιάστηκαν ελαττωμένες και η τρίτη αυξημένη σε καρκινοπαθείς. Η μελέτη διενεργήθηκε σε 155 γυναίκες με επιθετικό επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών, 42 με άλλους καρκίνους ωοθηκών, 166 με καλοήθεις πνευλικές μάζες και 142 υγιείς γυναίκες. Κατά την εκτίμηση της ευαισθησίας της χρήσης της ομάδας των πρωτεϊνών για την πρόω-

μη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών, αυτή βρέθηκε αυξημένη σε σχέση με την ευαισθησία της χρήσης μόνο του CA125 (από 65% σε 74%). Τμήματα της πρωτεΐνης ΙΤΗ4 ανίχνευσαν και οι Song et al. δύο χρόνια αργότερα, το 2006, και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι σχετίζονται με διαφορετικές εκφάνσεις της νόσου και ότι πιθανόν αποτελεί καλό βιολογικό δείκτη για την πρόωμη διάγνωση, αλλά και τη σταδιοποίηση.

Τέλος, μέσα στο 2008 ανακοινώθηκαν τα αποτελέσματα της μελέτης των Gortzak-Uzan et al., οι οποίοι μελέτησαν το ασπιτικό υγρό 4 γυναικών με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών με μεθόδους πρωτεωμικής (LC-MS) και ανίχνευσαν 80 πρωτεΐνες στο ασπιτικό υγρό και των τεσσάρων γυναικών. Από τις πρωτεΐνες αυτές, και μετά από σύγκριση με τα αποτελέσματα άλλων μελετών με μικροσυστοιχίες, οι 18 θεωρήθηκαν πιθανοί βιολογικοί δείκτες, μεταξύ των οποίων ήταν η S100A11, η γλουταθειονή-S-τρανσφεράση P, η ApoE, η HSPE1, η μυελοϋπεροξειδάση, η λαμινίνη B1, κ.ά. Μετά από συστηματική ανάλυση οι πρωτεΐνες κατατάχθηκαν σε κατηγορίες, όπως πρωτεΐνες αύξησης, διαφοροποίησης και απόπτωσης, μεταγωγής σήματος, μεταφοράς, μεταβολικές, κ.ά., και παράλληλα διερευνήθηκαν οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.

## II. Καρκίνος μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες αυξημένης θνητότητας στο γυναικείο πληθυσμό των ανεπτυγμένων κρατών του πλανήτη. Ο κίνδυνος μια γυναίκα να αναπτύξει καρκίνο του μαστού είναι 12.6% (μια στις οκτώ γυναίκες) (Jemal et al., 2007). Μέχρι σήμερα, οι ορολογικοί δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον καρκίνο του μαστού είναι το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο και ο CA 15-3. Τα επίπεδά τους σχετίζονται με το μέγεθος του όγκου και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και διερευνούνται για την παρακολούθηση της θεραπείας προχωρημένου καρκίνου μαστού ή υποτροπών, αλλά δεν είναι κατάλληλοι για screening με σκοπό την πρόωμη διάγνωση της νόσου, λόγω χαμηλής ευαισθησίας και ειδικότητας (Diamandis et al., 2002; Lumachi et al., 2004; Khatcheressian et al., 2006). Έτσι, για screening μέχρι σήμερα χρησιμοποιείται η μαστογραφία, παρόλα τα μειονεκτήματά της, όπως αυξημένα ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα, και επικίνδυνη έκθεση της ασθενούς (Leitch, 1995; Esserman et al., 2002).

Οι Naour et al. 2001 μελετώντας ορό από 30 γυναί-

κες με νεοδιαγνωσθέντα καρκίνο του μαστού και 25 υγιείς διαπίστωσαν ότι 3 πρωτεΐνες - ισομορφές μιας πρωτεΐνης 25kDa, της RS/DJ-1, ανευρέθηκαν σε 4 από τις 30 καρκινοπαθείς, αλλά σε καμία υγιή γυναίκα. Κατέληξαν, με τη μελέτη αυτή στο συμπέρασμα ότι η ανίχνευση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης με τη χρήση της πρωτεωμικής μπορεί να βοηθήσει στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του μαστού. Το 2002, οι Li et al. με τη χρήση της τεχνολογίας SELDI ταυτοποίησαν τρεις πρωτεΐνες ως πιθανούς βιολογικούς δείκτες για τον καρκίνο του μαστού, τις οποίες ονόμασαν BC1, BC2 και BC3. Από αυτές η πρώτη παρουσίαζε ελαττωμένα επίπεδα στον ορό καρκινοπαθών, ενώ οι άλλες δύο αυξημένα επίπεδα σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Η ευαισθησία και η ειδικότητα στη διάκριση των καρκινοπαθών αρχικού σταδίου από τις υγιείς μάρτυρες ήταν 93% και 91%, αντίστοιχα. Ένα χρόνο αργότερα, το 2003, οι Tammen et al. ανίχνευσαν 2300 πεπτίδια σε κυτταρικές σειρές, πολλά από τα οποία ήταν θραύσματα των θυμοσινών και της καθεψίνης D. Το 2004, οι Fowler et al. χρησιμοποιώντας την SELDI-TOF τεχνική ανίχνευσαν υψηλότερα επίπεδα α-1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης σε υλικό από FNA, καρκινοπαθών γυναικών σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Το 2006, μελέτη των Pawlik et al. έδειξε, μετά από πρωτεωμική ανάλυση υγρού θηλής του μαστού (NAF) γυναικών με καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου, ότι ήταν ελαττωμένη η έκφραση της α-2-HS-γλυκοπρωτεΐνης και αυξημένη η έκφραση της λιποφυλλίνης B, της β-σφαιρίνης, της αιμοπηξίνης και της πρόδρομης πρωτεΐνης της συνδέουσας τη βιταμίνη D, σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Τα συμπεράσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι η χρήση τεχνικών της πρωτεωμικής για την εξέταση του NAF μπορεί να βοηθήσει στην εύρεση δεικτών για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού. Την ίδια χρονιά, οι Huang et al. με τη βοήθεια της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης μελέτησαν ορό από 39 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και 35 υγιείς μάρτυρες και διαπίστωσαν αυξημένη έκφραση της προ-απολιποπρωτεΐνης A-I και της τρανσφερρίνης και ελαττωμένη έκφραση των απολιποπρωτεϊνών AI και CIII και της α-2-απτοσφαιρίνης στις γυναίκες με καρκίνο.

Τέλος, το 2007 οι Sharon et al. μελετώντας κυτταρικές σειρές με τεχνικές πρωτεωμικής αναγνώρισαν την παρουσία της πρωτεΐνης S100A6 και της ουβικιτίνης στα καρκινικά κύτταρα που αποπίπτουν και θεωρούν ότι με άλλες μελέτες πρωτεωμικής πάνω σε κλινικά δείγματα μπορούν να εξαχθούν πολλά συμπεράσματα που θα οδηγήσουν σε

αποτελεσματικότερη αντικαρκινική θεραπεία μέσω προαγωγής της απόπτωσης.

### III. Καρκίνος ενδομητρίου

Πολύ λιγότερες μελέτες έχουν γίνει αναφορικά με τον καρκίνο του ενδομητρίου, ο οποίος πλήττει κυρίως εμμηνοπαυσιακές γυναίκες και αποτελεί τον πέμπτο σε συχνότητα καρκίνο των γυναικών, κυρίως στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη, ενώ παρουσιάζει αυξανόμενη συχνότητα στις Ασιατικές χώρες (Parazzini et al., 1991). Μέχρι σήμερα, οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για screening σε γυναίκες με παθολογική αιμορραγία είναι το κολπικό υπερηχογράφημα, το οποίο όμως παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία (90%) αλλά χαμηλή ειδικότητα (48%), και η δειγματοληψία από το ενδομήτριο. Είναι μέθοδοι με πολλά ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα, αλλά και ανεπιθύμητες ενέργειες για τη γυναίκα, όπως αιμορραγία, λοίμωξη ή και, σπάνια, διάτρηση της μήτρας (Robertson, 2003).

Οι μελέτες πάνω στη χρήση της πρωτεωμικής για την εύρεση βιολογικών δεικτών που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην πρόωπη διάγνωση είναι πολύ περιορισμένες σε αριθμό. Το 2005, οι Yoshizaki et al. ανίχνευσαν, με τη βοήθεια της τεχνικής SELDI-TOF-MS, τις πρωτεΐνες EC1 και EC2, στο ενδομήτριο 19 γυναικών με καρκίνο του ενδομητρίου. Οι πρωτεΐνες αυτές εμφάνιζαν αυξημένη και ελαττωμένη έκφραση, αντίστοιχα, σε σχέση με τον ενδομήτριο ιστό 20 υγιών μαρτύρων, ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα των πρωτεϊνών ανάμεσα στα διάφορα στάδια της νόσου. Την ίδια χρονιά, οι DeSouza et al. ανίχνευσαν με LC-MS και διαπίστωσαν υπερέκφραση πρωτεϊνών σε ενδομήτριο γυναικών με καρκίνο ενδομητρίου σε σχέση με υγιές ενδομήτριο, όπως η τσαπερονίνη 10, το M1 ή M2 ισοένζυμο της πυρουβικής κινάσης, η καλζιτσαρίνη, η ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη D0, ο ανασταλτικός παράγοντας της μετανάστευσης των μακροφάγων και το πρόδρομο πολυμερές του υποδοχέα ανοσοσφαιρινών. Ταυτόχρονα ανίχνευσαν πρωτεΐνες με ελαττωμένη έκφραση στο παθολογικό ενδομήτριο, όπως η πρόδρομος της α-1-αντιθρυψίνης, η κρεατινική κινάση B και η τρανσεγγεΐνη. Και οι εννιά πρωτεΐνες βρέθηκε ότι σχετίζονταν με διαφορετικές μορφές του καρκίνου. Η ανίχνευση αυτής της ομάδας των πρωτεϊνών με μεθόδους της πρωτεωμικής θεωρήθηκε μετά από αυτή τη μελέτη ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί, σε συνδυασμό και με άλλες πρωτεΐνες, στη διάγνωση και το screening του καρκίνου του ενδομητρίου.

### Προοπτικές

Η πρωτεωμική μπορεί να έχει πολλές εφαρμογές στην κλινική πράξη, αναφορικά τόσο με τη διάγνωση, όσο και με τη θεραπεία του γυναικολογικού καρκίνου. Μέχρι σήμερα, η ανίχνευση ενός μόνο βιολογικού δείκτη παρείχε τη δυνατότητα εκτίμησης του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου. Σήμερα με τη βοήθεια της πρωτεωμικής ανοίγονται καινούργιοι ορίζοντες στην κλινική διαγνωστική. Ερευνητές σε όλο τον κόσμο έχουν την πεποίθηση, μέσα από τα θεαματικά αποτελέσματα των μελετών τους, ότι μελλοντικά η ταυτοποίηση ομάδων βιολογικών δεικτών σε ένα και μόνο δείγμα, βιολογικό υγρό, ορό, ή ιστό, μπορεί με μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα να θέσει τη διάγνωση του καρκίνου πολύ πιο έγκαιρα, από ό,τι σήμερα, να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς της νόσου και να εφαρμόσουμε καλύτερη στοχευμένη θεραπεία (Hanash, 2003; Tyers and Mann, 2003).

Η έρευνα του καρκίνου, με τη βοήθεια της φασματομετρίας μάζας, των εξελιγμένων συστημάτων πρωτεωμικής και της βιοπληροφορικής, έχει ήδη αρχίσει να δίνει σημαντικές πληροφορίες στους κλινικούς ιατρούς και να καταδεικνύει την ανάγκη για περισσότερη έρευνα πάνω στον τομέα αυτό, προκειμένου να επικυρωθούν τα παρόντα αποτελέσματα. Με τον τρόπο αυτό η πρωτεωμική θα μπορέσει να συμβάλει: α) στην πρόωπη ανίχνευση της νόσου, με την ανίχνευση ομάδων πρωτεϊνών σε ορό, ιστούς και βιολογικά υγρά, β) στη διάγνωση τη βασισμένη σε πρωτεΐνες - «δακτυλικά αποτυπώματα», σε συνδυασμό και με την ανοσοϊστοχημεία, γ) στην εξατομικευμένη θεραπεία, με σχήματα που στοχεύουν με τον καλύτερο τρόπο το πρωτεϊνικό δίκτυο του δεδομένου ιστού, δ) στην real time εκτίμηση της αποτελεσματικότητας και της τοξικότητας του θεραπευτικού σχήματος που χρησιμοποιείται, ε) στην τροποποίηση της θεραπείας ανάλογα με τις παρατηρούμενες αλλαγές στο πρωτεϊνικό δίκτυο και στη μελέτη της ανθεκτικότητας σε φάρμακα (Jain, 2000; Liota et al., 2001; Herrmann et al., 2001; Wu et al., 2002).

Όλα αυτά καθιστούν τις μεθόδους της πρωτεωμικής ισχυρά διαγνωστικά εργαλεία στα χέρια των κλινικών ιατρών. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητη η χρήση εξοπλισμού τελευταίας τεχνολογίας, η ανάπτυξη τεχνικών σωστής επεξεργασίας των δειγμάτων, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία των μεθόδων και η ακρίβεια των αποτελεσμάτων, η σύσταση ομάδων με τη συνεργασία ερευνητών διαφόρων ειδικοτήτων (εξειδικευμένων στην MS, μαθηματικών, ειδικών της βιοπληροφορικής, βιολόγων

της μεταγενεωμικής γενιάς, κλινικών στατιστολόγων και επιδημιολόγων) και διεξαγωγή μελετών οι οποίες θα επικυρώσουν τα αποτελέσματα των πρώτων αυτών ερευνητικών προσπαθειών, ώστε να εξαχθούν αποτελέσματα ασφαλή που θα συμβάλουν στην ελάττωση της νοσηρότητας και της θνητότητας από τον γυναικολογικό καρκίνο.

## Proteomics and Gynecological Cancer

K. Makedou<sup>1</sup>, N. Prapas<sup>2</sup>, A. Kourtis<sup>3</sup>, G. Makedos<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Biopathologist,

<sup>2</sup>Assoc. Prof. Obstetrics & Gynecology of University Thessaloniki,

<sup>3</sup>Assistant B' ΕΣΥ

<sup>4</sup>Prof. Obstetrics & Gynecology of University Thessaloniki, Greece

Correspondence: K. Makedou, Biopathologist  
45 Aristotelous str. 55 236 Panorama, Greece  
Tel./fax: +30 2310 346942  
E-mail: kali@med.auth.gr

### Summary

Proteomics is the study of the complete protein complement of the human genome, the "proteome". Various technologies have been developed for the purposes of proteomics, such as mass spectrometry. In oncology, proteomics can provide the identification of a panel of proteins, which can be used as biomarkers for early cancer detection, for disease stage determination, for the application of the appropriate target therapy, and for better disease monitoring, and these can be achieved with a greater sensitivity than with technologies used in the past. Proteomics can have important applications in ovarian, breast and endometrial cancer, giving a new perspective in clinical practice.

*Key words:* proteomics, cancer, biomarkers, ovarian, breast

### Βιβλιογραφία

Anderson, L. (2005) Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J. Physiol.* 563, 23-60.  
Anderson, N.L., Matheson, A.D. and Steiner, S. (2000) Proteomics: applications in basic and applied biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 408-412.  
Banks, E., Beral, V. and Reeves, G.. (1997) The epidemiology of epithelial ovarian cancer: a review. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 7, 425-438.

Bast, R.C., Jr., Urban, N., Shrinidhar, V. et al. (2002) Early detection of ovarian cancer: promise and reality. *Cancer Treat. Res.* 107, 61-97.  
Bergman, A.C., Benjamin, T. and Alaiya, A. et al. (2000) Identification of gel-separated tumor marker proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis*, 21, 679-686.  
Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G. et al. (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 6, 317-339.  
Chakravarti, D.N., Chakravarti, B. and Moutsatsos, I. (2002) Informatic tools for proteome profiling. *Biotechniques*, 32(Suppl), 4-15.  
DeSouza L, Diehl, G., Rodrigues, M.J. et al. (2005) Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cICAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 4, 377-386.  
Diamandis, E. P., Fritsche, H. A., Lilja, H et al. (2002) Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications, AACC (American Association for Clinical Chemistry) Press, Washington, D. C.  
Esserman, L., Cowley, H., Eberle, C. et al. (2002) Improving the accuracy of mammography: volume and outcome relationships. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 369-375  
Fowler, L.J., Lovell, M.O. and Izbicka, E. (2004) Fine-needle aspiration in PreservCyt: A novel and reproducible method for possible ancillary proteomic pattern expression of breast neoplasms by SELDI-TOF. *Mod. Pathol.* 17, 1012-1020.  
Gharbi, S., Gaffney, P., Yang, A. et al. (2002) Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system. *Mol. Cell. Proteomics*, 1, 91-98.  
Gortzak-Uzan, L., Ignatchenko, A., Evangelou, A.I. et al. (2008) A Proteome Resource of Ovarian Cancer Ascites: Integrated Proteomic and Bioinformatic Analyses To Identify Putative Biomarker. *J. Prot. Res.* 7, 339-351.  
Greenlee, R.T., Hill-Harmon, M.B., Murray, T. and Thun, M. (2001) Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 51,15-37.  
Hanash, S. (2003) Disease proteomics. *Nature*, 422, 226-232.  
Haoudi, A. and Bensmail, H. (2003) Postgenomics: Proteomics and Bioinformatics in Cancer Research. *J. Biomed. Biotechnol.* 4, 217-230.  
Huang, H.L., Stasyk, T., Morandell, S. et al. (2006) Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis / MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays. *Electrophoresis*, 27, 1641-1650.  
Jacobs, I. and Bast, R.C. Jr. (1989) The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum. Reprod.* 4,1-12.  
Jacobs, I., Davies, A.P., Bridges, J., Stabile, I. et al. (1993) Prevalence screening for ovarian cancer in postmenopausal women by CA 125 measurement and ultrasonography. *B.M.J.* 306, 1030-1034.  
Jemal, A., Siegel, R., Ward, E. et al. (2007) Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 57, 43-66.  
Khatcheressian, J.L., Wolff, A.C., Smith, T.J. et al (2006) American society of clinical oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in

- the adjuvant setting. *J. Clin. Oncol.* 24, 5091-5097
- Le Naour, F., Misek, D.E., Krause, M.C. et al. (2001) Proteomics-based identification of RS / DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 3328-3335.
- Leitch, A. M. (1995) Controversies in breast cancer screening. *Cancer*, 76, 2064-2069.
- Li, J., Zhang, J., Rosenweig, J. et al. (2002) Proteomics and Bioinformatics Approaches for Identification of Serum Biomarkers to Detect Breast Cancer. *Clin. Chem.* 48, 1296-1304.
- Liota, L.A., Kohn, E.C. and Petricoin, E.F. (2001) Clinical proteomics: personalized molecular medicine. *JAMA*, 286, 2211-2214.
- Lumachi, F. and Basso, S.M. (2004) Serum tumor markers in patients with breast cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 4, 921-931.
- MacDonald, N.D. and Jacobs, I.J. (1999) Is there a place for screening in ovarian cancer? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 82,155-157.
- Menon, U., Talaat, A., Rosenthal, A.N. et al. (2000) Performance of ultrasound as a second line test to serum CA125 in ovarian cancer screening. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 107, 165-169.
- Merril, C.R., Switzer, R.C. and Van Keuren, M.L. (1979) Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4335-4339.
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250,4007-4021.
- Parazzini, F., La Vecchia, C., Bocciolone, L. and Franceschi S. (1991) The epidemiology of endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 41, 1-16.
- Parkin, D.M., Muir, C.S. and Whelan, S.F. (1992) *Cancer Incidence in Five Continents*. Lyon, France: IARC Scientific.
- Patton, W.F. (2000) Making blind robots see: the synergy between fluorescent dyes and imaging devices in automated proteomics. *Biotechniques*, 28, 944-957.
- Pawlik, T.M., Hawke, D.H., Liu, Y. et al. (2006) Proteomic analysis of nipple aspirate fluid from women with early-stage breast cancer using isotope-coded affinity tags and tandem mass spectrometry reveals differential expression of vitamin D binding protein. *B.M.C. Cancer*, 6, 68-78.
- Rai, A.J., Zhang, Z., Rosenweig, J. et al. (2002) Proteomic Approaches to Tumor Marker Discovery Identification of Biomarkers for Ovarian Cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 126,1518-1526.
- Robertson, G. (2003) Screening for endometrial cancer. *M.J.A.* 178, 657-659.
- Seike, M., Kondo, T., Fujii, K. et al. (2004) Proteomic signature of human cancer cells. *Proteomics*, 4, 2776-2788.
- Sharon, L., Christopherson, R.I. and Baxter, R.C. (2007) Profiling of Apoptotic Changes in Human Breast Cancer Cells Using SELDI-TOF Mass Spectrometry. *Cell. Physiol. Biochem.* 20, 579-590.
- Somiari, R.I., Sullivan, A., Russell, S. et al. (2003) High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics*, 3, 1863-1873.
- Song, J., Patel, M., Rosenweig, C.N. et al. (2006) Quantification of fragments of human serum inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 by a surface enhanced laser desorption/ionization-based immunoassay. *Clin. Chem.* 52, 1045-1053.
- Tammen, H., Kreipe, H., Hess, R. et al. (2003) Expression profiling of breast cancer cells by differential peptide display. *Breast. Cancer Res. Treat.* 79, 83-93.
- Tyers, M. and Mann, M. (2003) From genomics to proteomics. *Nature*, 422, 193-197.
- Verma, M., Wright, G.L. Jr., Hanash, S.M. et al. (2001) Proteomic approaches within the NCI early detection research network for the discovery and identification of cancer biomarkers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 945,103-115.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A. et al. (1996a) Progress with proteome projects. Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13, 19-50.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Williams, K.L. and Hochstrasser, D.F. (1996b) Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis*, 17, 830-838.
- Woolas, R.P. X.F., Jacobs, I.J., Yu, Y.H. et al. (1993) Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancer. *J. Natl. Cancer, Inst.* 85, 1748-1751.
- Woolas, R.P., Conaway, M.R., Xu, F. et al. (1995) Combinations of multiple serum markers are superior to individual assays for discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecol. Oncol.* 59, 111-116.
- Wu, W. and Kavanagh, J.J. (2002) Proteomics in cancer research. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 12, 409-423.
- Ye, B., Cramer, D.W., Skates, S.J. et al. (2003) Haptoglobin-Subunit As Potential Serum Biomarker in Ovarian Cancer: Identification and Characterization Using Proteomic Profiling and Mass Spectrometry. *Clin. Canc. Res.* 9, 2904-2911.
- Yoshizaki, T., Enamoto, T., Nakashima, R. et al. (2005) Altered protein expression in endometrial carcinogenesis *Cancer Letters*, 226, 101-106.
- Zhang, Z., Barnhill, S.D., Zhang, H. et al. (1999) Combination of multiple serum markers using an artificial neural network to improve specificity in discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecol. Oncol.* 73, 56-61.
- Zhang, Z., Bast, R.C. Jr., Yu, Y. et al. (2004) Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 64, 5882-5890.
- Zhang, Z., Xu, F., Yu, Y. et al. (2001) Use of multiple markers to detect stage I epithelial ovarian cancers: neural network analysis improves performance. Presented at: Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; May 12-15; San Francisco, Calif. Abstract 873.