

УДК 577.2.616-006;577.2.08

МЕТОДЫ ПОИСКА МАРКЕРОВ ДЛЯ СЫВОРОТОЧНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ

© 2013 г. Ю. А. Букурова*, Г. С. Краснов, И. Г. Никитина, В. Л. Карпов,
Н. А. Лисицын, С. Ф. Берестень

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 04.10.2011 г.

Принята к печати 11.11.2011 г.

В обзоре описаны наиболее часто используемые методы поиска маркеров для серологической диагностики опухолей в условиях клиники. Проведен сравнительный анализ эффективности этих методов.

Ключевые слова: протеомика, опухолевые маркеры, биоинформатика, микроРНК, некодирующие РНК.

SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF TUMORS: METHODS OF MARKER'S SEARCH, by Yu. A. Bukurova*, G. S. Krasnov, I. G. Nikitina, V. L. Karpov, N. A. Lisitsyn, S. F. Beresten (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russian Federation; *e-mail: bukurova@eimb.ru). This review describes the most popular methods of search for serological markers of tumors that are used in clinical setting, provided with comparison of their efficiency.

Keywords: proteomics, tumor markers, bioinformatics, microRNA, noncoding RNAs.

DOI: 10.7868/S0026898413010035

ВВЕДЕНИЕ

Как отмечается в докладе ООН, в статистике смертности развитых стран онкологические заболевания занимают первое место (затем следуют сахарный диабет, болезни сердца и легких). Общеизвестно, что ранняя диагностика онкологических заболеваний, в том числе сывороточная, во многом определяет успех лечения и позволяет существенно повысить выживаемость больных. Однако в клинической практике для диагностики опухолей до сих пор используется лишь несколько десятков маркеров, что, по-видимому, связано с недостаточной эффективностью существующих методов их поиска. Современные методы основаны на сравнительном анализе протеомов, транскриптомов или геномов нормальных и опухолевых тканей (группы методов перечислены согласно частоте их использования в клинической практике, табл. 1). В обзоре описаны основные методы поиска маркеров, используемых в диагностике опухолей, перечислены их достоинства, недостатки, проведена оценка их информативности.

МЕТОДЫ ПРОТЕОМИКИ

Методы протеомики позволяют анализировать изменения в содержании белков, их процессинге и посттрансляционных модификациях. Наиболее часто используются методы протеомики *in vitro*, основанные на фракционировании белков нормальных и опухолевых тканей с последующей масс-спектрометрической идентификацией белков, содержание которых наиболее заметно и часто изменяется в опухолях. Ко второй группе относятся методы идентификации белков, способных связываться с аутоиммунными антителами, присутствующими в сыворотке крови онкобольных, но не в крови здоровых доноров (обратная протеомика). Наконец, методы протеомики *in silico* направлены на выявление отклонений в содержании (или процессинге) мРНК опухолей по сравнению с нормальными тканями. Эти методы относятся к области протеомики, поскольку для сывороточной диагностики используются только кодируемые мРНК белки (сами мРНК быстро деградируют в крови и других биологических жидкостях).

Принятые сокращения: нкРНК – некодирующие РНК.

* Эл. почта: bukurova@eimb.ru

Таблица 1. Методы поиска опухолевых маркеров

Подход	Метод	Анализ белков или кДНК	Идентификация маркера	Ссылка
Протеомика <i>in vitro</i>	2DE, 2D DIGE SELDI	Двумерный гель-электрофорез	Масс-спектрометрия	[1]
		Адсорбция к поверхностям микрочипов	Масс-спектрометрия	[2]
Обратная протеомика	SEREX	Анализ двух копий экспрессионных кДНК-клонотек опухоли с использованием аутоиммунных антител онкобольшого	Секвенирование	[4]
	Proteomex	Иммуноблотинг 2DE-электрофореграмм нормальной и опухолевой тканей с использованием аутоиммунных антител	Масс-спектрометрия	[5]
	AMIDA	2DE иммунопреципитатов нормальных и опухолевых тканей, полученных с использованием аутоиммунных антител онкобольшого	Масс-спектрометрия	[6]
Протеомика <i>in silico</i>	Opcomine	Анализ баз данных гибридизации кДНК с зондами микрочипов	По зонду микрочипа	[7]
	EST	Анализ баз данных секвенирования фрагментов кДНК	По последовательности	[8]
	SAGE	Анализ баз данных экспрессии кДНК-ярлыков	По ярлыку	[8]
Транскриптомика	Анализ микроРНК WTSS	Анализ профилей экспрессии микроРНК опухолевых экзосом	По содержанию микроРНК	[9]
		Анализ баз данных высокопроизводительного секвенирования транскриптома	По содержанию нкРНК	[10]
Геномика	GM	Высокопроизводительное секвенирование экзосом нормальных и опухолевых тканей	ПЦР	[11]
	EGM	Высокопроизводительное секвенирование библиотек фрагментов ДНК нормальных и опухолевых тканей после обработки бисульфитом	ПЦР	[12]

Первый и третий подходы позволяют обнаружить опухолеспецифичные белки, проникающие в кровотоки (такие как, например, раковоэмбриональный антиген), или секреторные белки, содержание которых в крови резко возрастает при возникновении опухоли (такие, как антиген, специфичный для предстательной железы). Эти маркеры обычно выявляют с использованием высокоаффинных антител и иммунофлуоресцентного анализа в сэндвич-формате. Многообещающим подходом к сывороточной диагностике опухолей считается анализ экзосом (т.е. окруженных бислоем мембраной мини-клеток без ядра и митохондрий, размером около 100 нм), которые секретируются в кровотоки опухолевыми клетками. Использование антител к тканеспецифичным мембранным белкам опухолевых экзосом позволяет заметно повысить чувствительность теста в результате удаления экзосом, секретиромых клетками крови, и резко увеличить чувствительность теста в результате «амплификации» сигнала, обусловленной тем, что на поверхности экзосомы находятся тысячи молекул белкового маркера.

ПРОТЕОМИКА *in vitro*

Двумерный гель-электрофорез, 2DE

Метод двумерного гель-электрофореза (2DE, two-dimensional gel electrophoresis) включает две основные процедуры – разделение белков с использованием изоэлектрофокусировки в трубках в одном направлении (разделение по заряду); и электрофоретическое разделение содержимого трубки в денатурирующем полиакриламидном геле в перпендикулярном направлении (разделение по массе в диапазоне 10–200 кДа). Впервые эту технику описали в 1970 г. Кениг и соавт. [13], а затем О'Фаррелл [14] предложил использовать для изоэлектрофокусировки белков неравновесный градиент pH, который формируется при проведении электрофореза с помощью амфолинов (рис. 1, вверху). Последующая идентификация белковых пятен с различающейся интенсивностью на полученных парах 2DE-электрофореграмм нормальных и опухолевых тканей проводится с помощью масс-спектрометрии. Хотя 2DE достаточно трудоемок и имеет низкую чувствительность (детектируется лишь 1–3 тыс. наиболее высококопийных белков протеома), на протяже-

нии десятилетий он был наиболее высокоэффективным и часто используемым методом анализа протеомов.

Двумерный дифференциальный гель-электрофорез (2D DIGE)

Суть метода дифференциального гель-электрофореза (DIGE, differential gel electrophoresis) заключается в одновременном разделении белков здоровой и опухолевой тканей, а также внутреннего контроля (смесь здоровой и опухолевой ткани в определенном соотношении), с целью выявления белковых пятен, характерных только для опухолевой ткани. Для этого белки метят флуоресцентными цианиновыми красителями, имеющими различную длину волны испускаемого излучения (обычно норма – Cy3, опухоль – Cy5, контроль – Cy2) [15, 16]. Помеченные белки объединяют и разделяют методом 2DE. 2DE-анализ позволяет выявить опухолеспецифичные белки (рис. 1, внизу) и идентифицировать их в отобранных пятнах с помощью масс-спектрометрии. Метод также позволяет оценить количество белка в пятне по соотношению интенсивностей флуоресценции пятен в нормальной, опухолевой и контрольной ткани.

Усиленная поверхностью лазерная десорбция-ионизация (SELDI)

Метод усиленной поверхностью лазерной десорбции-ионизации (SELDI, surface-enhanced laser desorption/ionization), впервые описанный в 1993 г. [17], – это наиболее часто используемая модификация технологии MALDI [18]. SELDI объединяет разделение белков путем сорбции к различным образом обработанным пятнам на поверхности микрочипа с последующим удалением несвязавшихся белков и масс-спектрометрической идентификацией белков, связавшихся с одной из поверхностей микрочипа (рис. 2) [19]. Идентификация белков, связавшихся с поверхностями микрочипа, основана на определении масс и зарядов образовавшихся из них положительно заряженных пептидов, которые попадают на поверхность отрицательно заряженного детектора. Главное преимущество SELDI – возможность быстро анализировать протеомы биологических и клинических образцов [20], почти без предварительной подготовки [21]. Использование метода SELDI пока не привело к обнаружению информативных маркеров опухолей вследствие целого ряда нерешенных технических проблем [22].

МЕТОДЫ ОБРАТНОЙ ПРОТЕОМИКИ

Серологическая идентификация рекомбинантных экспрессируемых клонов (SEREX)

Метод SEREX (serological identification of antigen by recombinant cDNA expression cloning) основан на сравнении результатов иммунологического анализа двух идентичных копий бактериальной экспрессионной клонотек опухолевых кДНК с использованием сывороток крови онкобольных и здоровых доноров. Опухолеспецифичные клоны секвенируют с целью идентификации опухолевых антигенов (рис. 3) [4, 23, 24]. Метод позволяет выявлять подмножество антигенов опухоли, которые реагируют с антителами онкобольных, но не взаимодействуют с сыворотками здоровых доноров. Анализ структуры, профиля экспрессии и частоты серореактивности идентифицированных антигенов позволяет отобрать маркеры, наиболее перспективные для сывороточной диагностики опухолей, прогнозирования, послеоперационного мониторинга и создания противоопухолевых вакцин [6].

Метод Proteomex

Метод основан на 2DE-разделении белков нормальной и опухолевой тканей (на двух гелях). Белки переносят на мембраны и инкубируют с антисыворотками онкобольных, а затем с конъюгатами вторичных антител к иммуноглобулинам человека. Выявленные опухолеспецифичные антигены идентифицируют методами масс-спектрометрии (рис. 3) [5, 25–28]. Подобно другим методам протеомики *in vitro*, Proteomex позволяет выявлять опухолеспецифичные посттрансляционные модификации белков, играющие важную роль в развитии рака и аутоиммунных реакций (такие как гликозилирование, сумоилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п.). Однако для проведения такого анализа необходимы дополнительные технологии и усложненное программное обеспечение. Например, при анализе фосфорилирования требуется обогащать фосфорилированные белки методами катион-обменной хроматографии или проводить сравнительный анализ масс-спектров до и после отщепления или модификации фосфатных групп [29–32].

Идентификация антигенов с помощью аутоантител (AMIDA)

Технология AMIDA (autoantibody-mediated identification of antigens) основана на параллельной иммунопреципитации белков опухолевой ткани с использованием антител сыворотки крови здорового донора, и сыворотки онкобольного. Иммунопреципитаты разделяют с помощью 2DE,

электрофореграммы окрашивают солями серебра, а затем идентифицируют опухолеспецифичные белки масс-спектрометрическими методами (рис. 3) [33–38].

МЕТОДЫ ПРОТЕОМИКИ *in silico*

Биоинформатический поиск в базе данных Oncomine

База данных Oncomine содержит информацию о профилях экспрессии генов, полученных с помощью гибридизации суммарных мРНК нормальных и опухолевых тканей с зондами коммерчески распространяемых микрочипов. Каждый микрочип содержит короткие последовательности (зонды), комплементарные большинству мРНК человека [7, 39]. Используя соответствующий веб-сервис [8], можно оценить уровень экспрессии почти любого гена в сотнях тканей и быстро обнаружить гены, экспрессия которых статистически значимо различается в нормальных и опухолевых тканях определенного типа [40]. Аналогичная информация приведена в базе данных Human Proteome Atlas [41], содержащей результаты подробного иммуногистохимического анализа 60 пар образцов норма/опухоль.

При относительной дешевизне (300–1000 \$ за эксперимент) метод имеет ряд недостатков. Во-первых, в процессе анализа происходит перекрестная гибридизация гомологичных членов семейства родственных мРНК. Кроме того, сложность пробы (большая суммарная длина последовательностей транскрипта и значительные различия в концентрациях мРНК) часто приводит к отсутствию детектируемого сигнала от довольно большой части мРНК вследствие низкой концентрации таких мРНК в пробе. Анализ осложняется и значительными расхождениями результатов, получаемых при использовании как микрочипов различных компаний, так и различных методов статистической обработки результатов. И, наконец, метод не позволяет детектировать большинство структурных изменений в мРНК (мутации, продукты альтернативного сплайсинга и т.п.). В настоящее время при помощи микрочипов можно анализировать только мРНК и микроРНК, тогда как транскриптом человека, по-видимому, содержит десятки тысяч некодирующих РНК (нкРНК), а также большое число антисмысловых РНК. Таким образом, конструкцию микрочипов необходимо будет постоянно совершенствовать.

Биоинформатический поиск в базах данных EST

Суть метода EST (expressed sequence tags) заключается в секвенировании фрагментов длиной

200–800 п.н. кДНК биологического образца [42, 43] (рис. 4). Метод основан на предположении, согласно которому количество секвенированных EST-клонов отражает содержание каждой мРНК в образце. В 90-е годы прошлого века получен целый ряд клонотек EST нормальных и опухолевых тканей с представительностью более 100000 клонов, позволяющих определить уровень синтеза большинства высококопийных и среднекопийных мРНК. По результатам многолетних исследований построена база данных dbEST. Для проведения биоинформатического анализа этой базы предложен целый ряд подходов и программных средств. Однако после создания метода высокопроизводительного секвенирования транскриптома (см. ниже) эта база используется все реже.

Биоинформатический поиск в базах данных SAGE

Серийный анализ экспрессии генов (SAGE, serial analysis of gene expression) заключается в получении коротких (10 п.н.) фрагментов из каждой кДНК исследуемого образца (нуклеотидных меток-ярлыков, тэгов), лигировании ярлыков в одну конкатемерную последовательность, амплификации и секвенировании конкатемеров [44]. Для идентификации гена последовательность ярлыка сопоставляется с геномной нуклеотидной последовательностью (рис. 4). Чувствительность SAGE зависит от “глубины” секвенирования ярлыков и представительности клонотеки [45, 46], а оценка уровня экспрессии транскриптов основана на частоте встречаемости ярлыка. Метод обеспечивает адекватную оценку абсолютного содержания мРНК, позволяя прямо сравнивать количество различных мРНК в одном и том же образце или в различных образцах. Сравнение эффективности поиска онкомаркеров методами SAGE и 2DE показало, что метод серийного анализа генов экспрессии более чем втрое уступает 2DE по информативности [47]. Это связано с двумя проблемами: 1) присутствием ярлыков, для которых в геноме нет соответствующего участка (в этом случае происходят ошибки в секвенировании или амплификации); 2) существованием нескольких участков в геноме с последовательностями, идентичными ярлыку. Обе трудности устраняются при удлинении ярлыка, осуществленном в модификациях LongSage [48] и Tag-seq [49, 50]. В настоящее время производство и секвенирование Tag-seq-библиотек для образцов заказчика проводится на коммерческой основе (mRNA tag profiling service). Основное достоинство и, одновременно, недостаток такого подхода заключается в анализе лишь части транскриптома, как и при гибридизации на микрочипах. Это, с одной стороны, делает анализ более дешевым, а с другой, менее информативным.

МЕТОДЫ ТРАНСКРИПТОМИКИ

Первоначально методы анализа транскриптома были направлены на идентификацию мРНК, уровень синтеза которых резко изменяется в процессе канцерогенеза. Такой подход позволяет обнаружить прогностические мРНК-маркеры, используемые для ПЦР-анализа биопсийного материала, в котором мРНК достаточно стабильны. Однако использование мРНК-маркеров для диагностики невозможно, поскольку в сыворотке они быстро деградируют. Альтернативным и весьма перспективным транскриптомным подходом к поиску диагностических маркеров является анализ некодирующих РНК (нкРНК), которые делятся на две группы: короткие (длиной менее 200 н.) и длинные (более 200 н.). Количество коротких нкРНК, закодированных в геноме человека, достигает нескольких тысяч. Наиболее многочисленным семейством нкРНК является семейство микроРНК (в настоящее время идентифицировано более 800 их видов). Основная функция микроРНК состоит в регуляции экспрессии практически всех белоккодирующих генов человека. Регуляция осуществляется на посттранскрипционном уровне в результате специфической гибридизации микроРНК с ее мРНК-мишенями [51–53]. Недавно было показано, что микроРНК секретируются опухолями в кровотоке в составе экзосом, а после деградации экзосом накапливаются в крови в виде чрезвычайно стабильных комплексов с белками семейства Argonaut [54]. Профилирование содержания тканеспецифичных микроРНК в сыворотках крови позволяет точно установить локализацию опухолей (часто с определением ее подкласса) и прогнозировать дальнейшее ее развитие [55].

В отличие от генов, кодирующих короткие нкРНК, гены длинных нкРНК занимают большую часть генома, включая районы, которые ранее называли “мусорной ДНК”. Суммарная длина, а следовательно, и общее число таких генов во много раз превышает длину генов, кодирующих белки (более 90 и 2% генома соответственно) [56]. С учетом неопределенности положения 5'- и 3'-концов мРНК, их процессинга, альтернативного сплайсинга и редактирования, а также синтеза антисмысловых последовательностей, число индивидуальных РНК в транскриптоме человека может достигать миллиона и более. Большая их часть не содержит поли(А)-последовательностей и, по-видимому, транскрибируется с участием РНК-полимеразы III. Предварительные данные указывают на то, что дальнейший анализ этой *terra incognita* может привести к революционным изменениям в молекулярной биологии [57]. При этом некоторые длинные нкРНК достаточно стабильны в сыворотке крови и могут применяться в

сывороточной диагностике опухолей, поскольку секретируются в кровотоке в составе стабильных белковых комплексов [58]. Таким образом, число опухолевых маркеров, используемых в клинической практике, в будущем может многократно увеличиться.

Профилирование экспрессии микроРНК

Разработанный недавно метод профилирования экспрессии микроРНК наиболее перспективен по чувствительности и точности диагностики онкологических заболеваний, что объясняется тканевой специфичностью и массовой секрецией многих микроРНК опухолями в кровотоке в составе экзосом. В клинической практике метод пока не используется. Применение гибридизации на микрочипах для детекции маркера в этом случае не очень эффективно (длина микроРНК не превышает 23 н., а некоторые микроРНК различаются всего одним основанием), тогда как ОТ-ПЦР с удлинением амплифицируемого фрагмента в процессе реакции (метод *mirQ*) позволяет получить весьма воспроизводимые результаты [51].

Высокопроизводительное секвенирование нкРНК

Метод высокопроизводительного секвенирования транскриптома (WTSS, whole transcriptome shotgun sequencing) в принципе позволяет определить нуклеотидные последовательности всех мРНК и нкРНК в составе тканевого транскриптома с использованием коммерчески распространенных наборов для подготовки проб и поли(А)-нейтральной амплификации (рис. 4) [59–61]. Наиболее часто используемые для WTSS секвенаторы компании “Illumina” имеют производительность до 300 млрд.н. на запуск, длину “рида” (прочитываемого фрагмента) – 50–100 н., при стоимости секвенирования 1 \$ за 1 млн.н. (12000 \$ за запуск) [62]. Последующий компьютерный анализ дает возможность определить и соединить последовательности всех транскрибируемых экзонов, идентифицировать все изоформы РНК (т.е. выявить различия в положении 5'- и 3'-концов всех транскриптов данного гена), а также обнаружить ранее неидентифицированные РНК [55]. Со временем данный подход может привести к полной реконструкции всех тканевых и клеточных транскриптомов (при использовании микродиссекции), что потребует глубины секвенирования в несколько терабайт, чтобы обеспечить покрытие, достаточное для количественного анализа всех нкРНК.

ГЕНОМНЫЕ МЕТОДЫ

Выделяют две основные группы геномных опухолевых маркеров [63]:

1) генетические маркеры, т.е. фрагменты ДНК опухолевых клеток, в которых обнаруживаются точечные мутации, делеции, амплификации или транслокации, возникающие на разных стадиях канцерогенеза;

2) эпигенетические маркеры — участки промоторных областей, гиперметилирование которых в опухолевых клетках приводит к подавлению транскрипции гена (сайленсингу).

Еще один, довольно редко используемый эпигенетический подход, основан на анализе глобального гипометилирования ДНК опухолевых клеток.

Поиск генетических маркеров (GM)

Наибольшее число генетических маркеров было обнаружено в догеномную эпоху в результате анализа ретровирусов мышей, опытов по ко-трансфекции и позиционного клонирования. В настоящее время такие маркеры выявляют с использованием методов высокопроизводительного секвенирования экзона (кодирующей части генома или его частей) нормальных и опухолевых клеток онкобольного. Анализ генетических маркеров — основа для консультирования семей с наследственной предрасположенностью к возникновению рака (такие случаи составляют в среднем около 20–30% от общего числа заболевших) [11]. Наконец, генетические маркеры используются для прогноза, но не для серологической диагностики, поскольку для этого необходимо очистить циркулирующие в кровотоке опухолевые клетки, что возможно лишь на поздних стадиях заболевания или при послеоперационном мониторинге.

Поиск эпигенетических маркеров (EGM)

Гиперметилирование CpG-островков в промоторных областях генов в опухолевых клетках происходит гораздо чаще, чем мутации в ДНК. Библиотеки эпигенетических маркеров получают в результате обработки ДНК рестриктазой, введения адапторов на концы всех фрагментов, обработки ДНК бисульфитом (что позволяет расщепить большинство фрагментов островков с неметилированными остатками цитозина) и полногеномной амплификации фрагментов, оставшихся интактными. Библиотеки нормальных и опухолевых тканей, полученных от одного и того же онкобольного, подвергают высокопроизводительному секвенированию с последующей идентификацией опухолевых специфических эпигенетических маркеров с

помощью компьютерного анализа [12]. Высокая стабильность ДНК позволяет выявлять опухолевые специфические эпигенетические маркеры в биологических жидкостях и стуле с использованием ПЦР. Специфичность анализа заметно повышается при амплификации гиперметилированных фрагментов длиной более 200 п.н. поскольку это позволяет элиминировать ДНК нормальных клеток, попадающих в кровоток, в результате апоптоза [64]. Однако, несмотря на высокую специфичность и чувствительность анализа эпигенетических маркеров (особенно при использовании их панелей), в клинической диагностике опухолей они используются редко, вследствие выявления часто встречающихся, но неопасных пренеопластических тканей и аденом, а также возрастных изменений генома [65, 66].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ частоты использования описанных в обзоре методов идентификации опухолевых маркеров по базе данных PubMed показал, что наиболее популярны геномные методы, за которыми следуют анализ микроРНК и двумерный электрофорез белков (табл. 2). Быстро растет популярность и эффективность поиска транскриптомных маркеров опухолей методами высокопроизводительного секвенирования. Открывшаяся возможность полной реконструкции клеточных и тканевых транскриптомов может привести к идентификации ряда новых, пригодных для диагностики опухолей нкРНК, стабильных в сыворотке крови в составе белковых комплексов.

Важно отметить, что, несмотря на большую историю геномных методов поиска диагностических маркеров опухолей, их применение в клинической практике весьма ограничено. Так, обзор использующихся в настоящее время или проходящих клинические и доклинические испытания диагностических маркеров рака толстой кишки показывает, что большинство из них (70%) — белки, а 30% — фрагменты ДНК [67]. Это, по-видимому, связано с тем, что, несмотря на более низкую чувствительность иммунохимических методов анализа белковых маркеров по сравнению с амплификацией ДНК, результаты белковых тестов дают возможность однозначной постановки диагноза, тогда как анализ ДНК требует использования больших панелей маркеров и трудоемкого секвенирования ДНК-продуктов. В то же время, очевидна необходимость радикального повышения чувствительности современных методов детекции белков. Это откроет возможность анализа низкокопийных белков и преодоления громадного динамического диапазона их концентраций в процессе тестирования биологических образцов (до триллиона раз).

Таблица 2. Анализ методов поиска опухолевых маркеров по базе данных PubMed*

Метод	Первое упоминание, год	Число публикаций			Тренд***
		всего	в год	2010–2011**	
2DE	1972	1680	43	114	2.7
2D DIGE	2002	180	20	29	1.5
SELDI	2001	376	37	20	0.5
SEREX	1998	53	4	3	0.8
Proteomex	2003	4	0	0	0.0
AMIDA	2004	2	0	0	0.0
Oncomine	2007	16	4	4	1.0
EST	1996	38	2	1	0.5
SAGE	1998	134	10	4	0.4
микроРНК	2002	838	93	275	2.9
WTSS	2005	103	17	22	1.3
GM	1960	24097	473	1450	3.1
EGM	1978	1354	41	220	5.4

* Поиск осуществляли с использованием следующего алгоритма: (название метода) AND (cancer markers).

** Число публикаций в год за период 2010–2011 (текущая продуктивность).

*** Отношение текущей продуктивности к числу публикаций в год за время существования метода (тренд >1 – рост популярности, <1 – снижение популярности).

Настоящая работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 14.740.11.0757 и № 16.552.11.7034) и Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-01023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wong S.C., Chan C.M., Ma B.B., et al. 2009. Advanced proteomic technologies for cancer biomarker discovery. *Exp. Rev. Proteomics*. **6**, 123–134.
- Garrisi V.M., Abbate I., Quaranta M., et al. 2008. SELDI-TOF serum proteomics and breast cancer: which perspective? *Expert. Rev. Proteomics*. **5**, 779–785.
- Balestrieri M.L., Giovane A., Mancini F.P., et al. 2008. Proteomics and cardiovascular disease: an up-date. *Curr. Med. Chem.* **15**, 555–572.
- Song M.H., Ha J.C., Lee S.M., et al. 2011. Identification of BCP-20 (FBXO39) as a cancer/testis antigen from colon cancer patients by SEREX. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**, 195–201.
- Seliger B., Kellner R. 2002. Design of proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets. *Proteomics*. **2**, 1641–1651.
- Rauch J., Gires O. 2008. SEREX, Proteomex, AMIDA, and beyond: serological screening technologies for target identification. *Proteomics Clin. Appl.* **2**, 355–371.
- <https://www.oncomine.org/resource/login.html>
- <http://www.genecards.org/>
- <http://www.hptaa.org/miRNA/index.htm>
- <http://rna-seqblog.com/>
- Lichtenstein P., Holm N.V., Verkasalo P.K., et al. 2000. Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.* **343**, 78–85.
- Mill J., Petronis A. 2009. Profiling DNA methylation from small amounts of genomic DNA starting material: efficient sodium bisulfite conversion and subsequent whole-genome amplification. *Methods Mol. Biol.* **507**, 371–381.
- Koenig R., Stegemann H., Francksen H., et al. 1970. Protein subunits in the potato virus X group. Determination of the molecular weights by polyacrylamide electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta.* **207**, 184–189.
- O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021.
- Issaq H.J., Veenstra T.D. 2008. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *BioTechniques*. **44**, 697–700.
- Collet B., Guitton N., Saïkali S., et al. 2011. Differential analysis of glioblastoma multiforme proteome by a 2D-DIGE approach. *Proteome Sci.* **9**, 16.
- Hutchens T.W., Yip T. 1993. New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **7**, 576–580.
- Kussmann M., Roepstorff P. 2000. Sample preparation techniques for peptides and proteins analyzed by MALDI-MS. *Methods Mol. Biol.* **146**, 405–424.
- Caputo E., Moharram R., Martin B.M. 2003. Methods for on-chip protein analysis. *Anal. Biochem.* **321**, 116–124.
- Issaq H.J., Veenstra T.D., Conrads T.P., et al. 2002. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein pro-

- filing and biomarker identification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 587–592.
21. Bischoff R., Luider T.M. 2004. Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **803**, 27–40.
 22. Liu J.Y., Jin L., Zhao M.Y., et al. 2011. New serum biomarkers for detection of tuberculosis using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* **49**, 1727–1733.
 23. <http://www.licr.org/SEREX.html>
 24. Liggins A.P., Guinn B.A., Banham A.H. 2005. Identification of lymphoma-associated antigens using SEREX. *Methods Mol. Med.* **115**, 109–128.
 25. Klade C.S., Voss T., Krystek E., et al. 2001. Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics*. **1**, 890–898.
 26. Klade C.S. 2002. Proteomics approaches towards antigen discovery and vaccine development. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **4**, 216–223.
 27. Le Naour F., Hohenkirk L., Grolleau A., et al. 2001. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J. Biol. Chem.* **276**, 17920–17931.
 28. Lichtenfels R., Kellner R., Bukur J., et al. 2002. Heat shock protein expression and anti-heat shock protein reactivity in renal cell carcinoma. *Proteomics*. **2**, 561–570.
 29. Mann M., Jensen O.N. 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* **21**, 255–261.
 30. Gallego M., Virshup D.M. 2007. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 139–148.
 31. Kim K.I., Baek S.H. 2006. SUMOylation code in cancer development and metastasis. *Mol. Cells.* **22**, 247–253.
 32. Krueger K.E., Srivastava S. 2006. Posttranslational protein modifications: current implications for cancer detection, prevention, and therapeutics. *Mol. Cell. Proteomics*. **5**, 1799–1810.
 33. Gires O., Munz M., Schaffrik M., et al. 2004. Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1198–1207.
 34. Rauch J., Ahlemann M., Schaffrik M., et al. 2004. Allogenic antibody-mediated identification of head and neck cancer antigens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 156–162.
 35. Scanlan M.J., Gout I., Gordon C.M., et al. 2001. Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. *Cancer Immun.* **1**, 4.
 36. Scanlan M.J., Welt S., Gordon C.M., et al. 2002. Cancer-related serological recognition of human colon cancer: identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets. *Cancer Res.* **62**, 4041–4047.
 37. Scanlan M.J., Simpson A.J., Old L.J. 2004. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* **4**, 1.
 38. <http://www2.licr.org/CancerImmunimeDB>
 39. Rhodes D.R., Kalyana-Sundaram S., Mahavisno V., et al. 2007. OncoPrint 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia*. **9**, 166–180.
 40. Yang Y., Pospisil P., Iyer L.K., et al. 2008. Integrative genomic data mining for discovery of potential blood-borne biomarkers for early diagnosis of cancer. *PLoS One.* **3**, e3661.
 41. <http://www.proteinatlas.org/>
 42. Adams M.D., Kelley J.M., Gocayne J.D., et al. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science.* **252**, 1651–1656.
 43. Wilcox A.S., Khan A.S., Hopkins J.A., et al. 1991. Use of 3' untranslated sequences of human cDNAs for rapid chromosome assignment and conversion to STSs: implications for an expression map of the genome. *Nucl. Acids Res.* **19**, 1837–1843.
 44. Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B., et al. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science.* **270**, 484–487.
 45. Yamamoto M., Wakatsuki T., Hada A., et al. 2001. Use of serial analysis of gene expression (SAGE) technology. *J. Immunol. Methods.* **250**, 45–66.
 46. Ruijter J.M., Van Kampen A.H., Baas F. 2002. Statistical evaluation of SAGE libraries: consequences for experimental design. *Physiol. Genomics.* **11**, 37–44.
 47. Букурова Ю.А., Ханкин С.Л., Краснов Г.С. и др. 2010. Оценка эффективности идентификации белковых маркеров опухоли толстой кишки методами 2D-анализа и биоинформатического поиска. *Молекуляр. биология.* **44**, 375–381.
 48. Saha S., Sparks A.B., Rago C., et al. 2002. Using the transcriptome to annotate the genome. *Nat. Biotechnol.* **20**, 508–512.
 49. Morrissy A.S., Morin R.D., Delaney A., et al. 2009. Next-generation tag sequencing for cancer gene expression profiling. *Genome Res.* **19**, 1825–1835.
 50. Morrissy S., Zhao Y., Delaney A., et al. 2010. Digital gene expression by tag sequencing on the illumina genome analyzer. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **Chapter 11**: Unit 11.11.1–36.
 51. Lu J., Getz G., Miska E.A., et al. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* **435**, 834–838.
 52. Naqvi A.R., Islam M.N., Choudhury N.R., et al. 2009. The fascinating world of RNA interference. *Int. J. Biol. Sci.* **5**, 97–117.
 53. Lee S.K., Calin G.A. 2011. Non-coding RNAs and cancer: new paradigms in oncology. *Discov. Med.* **11**, 245–254.
 54. Patel D.J., Ma J.B., Yuan Y.R., et al. 2006. Structural biology of RNA silencing and its functional implications. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **71**, 81–93.
 55. Schetter A.J., Leung S.Y., Sohn J.J., et al. 2008. MicroRNA expression profiles associated with prognosis

- and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *J. Am. Med. Acc.* **299**, 425–436.
56. Gibb E.A., Brown C.J., Lam W.L. 2011. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol. Cancer.* **10**, 38.
57. Guttman M., Garber M., Levin J.Z., et al. 2010. Ab initio reconstruction of cell type-specific transcriptomes in mouse reveals the conserved multi-exonic structure of lincRNAs. *Nat. Biotechnol.* **28**, 503–510.
58. Panzitt K., Tschernatsch M.M., Guelly C., et al. 2007. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. *Gastroenterology.* **132**, 330–342.
59. Castle J.C., Armour C.D., Löwer M., et al. 2010. Digital genome-wide ncRNA expression, including SnoRNAs, across 11 human tissues using polyA-neutral amplification. *PLoS One.* **5**, e11779.
60. Tariq M.A., Kim H.J., Jejelowo O., et al. 2011. Whole-transcriptome RNaseq analysis from minute amount of total RNA. *Nucl. Acids Res.* **39**, e120.
61. <http://www.454.com/applications/transcriptome-sequencing.asp>
62. Wang Z., Gerstein M., Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 57–63.
63. Taby R., Issa J.P. 2010. Cancer epigenetics. *CA Cancer J. Clin.* **60**, 376–392.
64. Kalimutho M., Del Vecchio Blanco G., Cretella M., et al. 2011. A simplified, non-invasive fecal-based DNA integrity assay and iFOBT for colorectal cancer detection. *Int. J. Colorectal Dis.* **26**, 583–592.
65. Widschwendter A., Müller H.M., Fiegl H., et al. 2004. DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **10**, 565–571.
66. Wong T.S., Kwong D.L., Sham J.S., et al. 2004. Quantitative plasma hypermethylated DNA markers of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 2401–2406.
67. Tanaka T., Tanaka M., Tanaka T., et al. 2010. Biomarkers for colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 3209–3225.

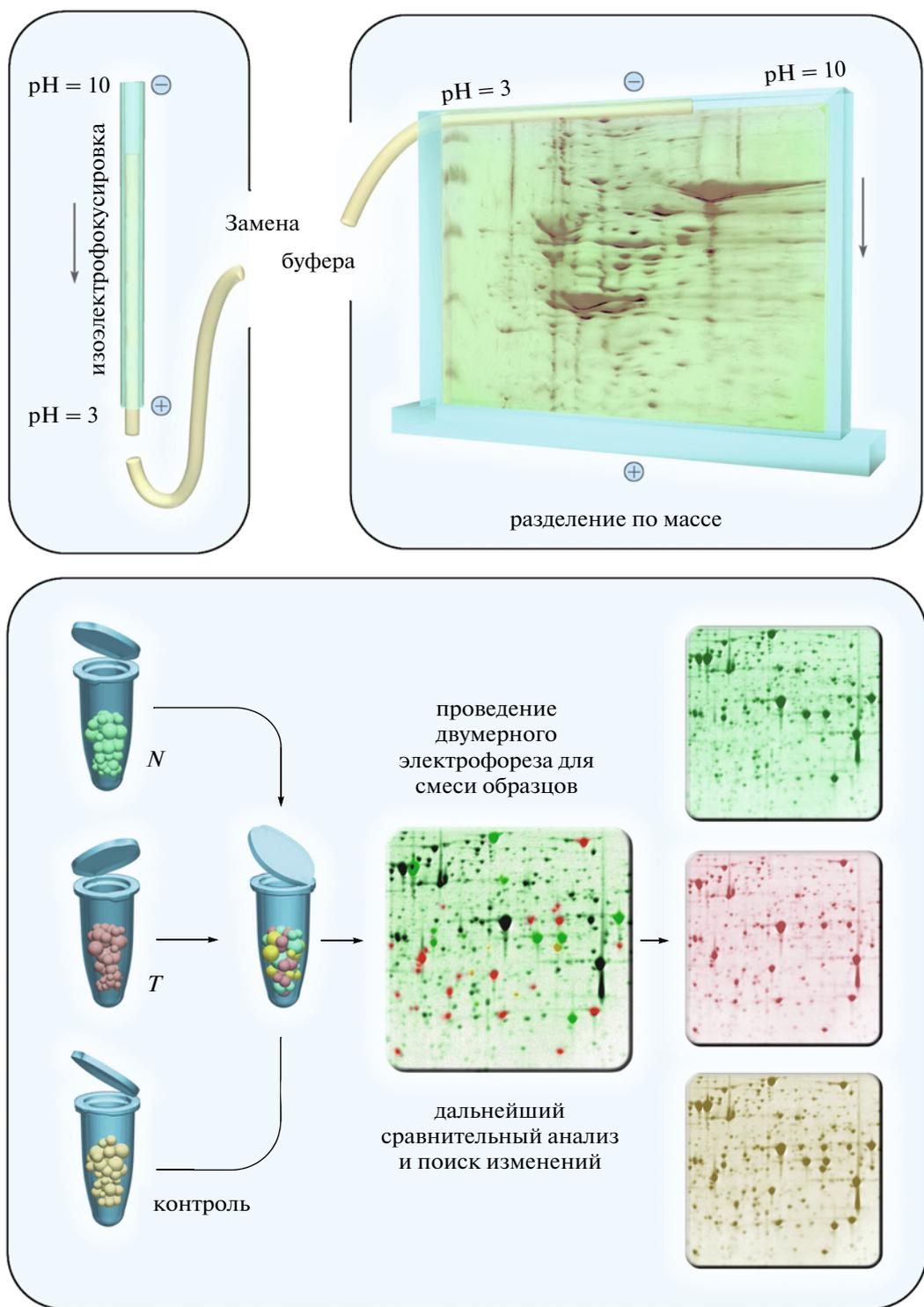


Рис. 1. Схемы методов протеомики *in vitro*. Вверху – 2DE; внизу – 2DE DIGE (цвет пятна не отражает длину волны испускаемого излучения и использован для демонстрации принципа).

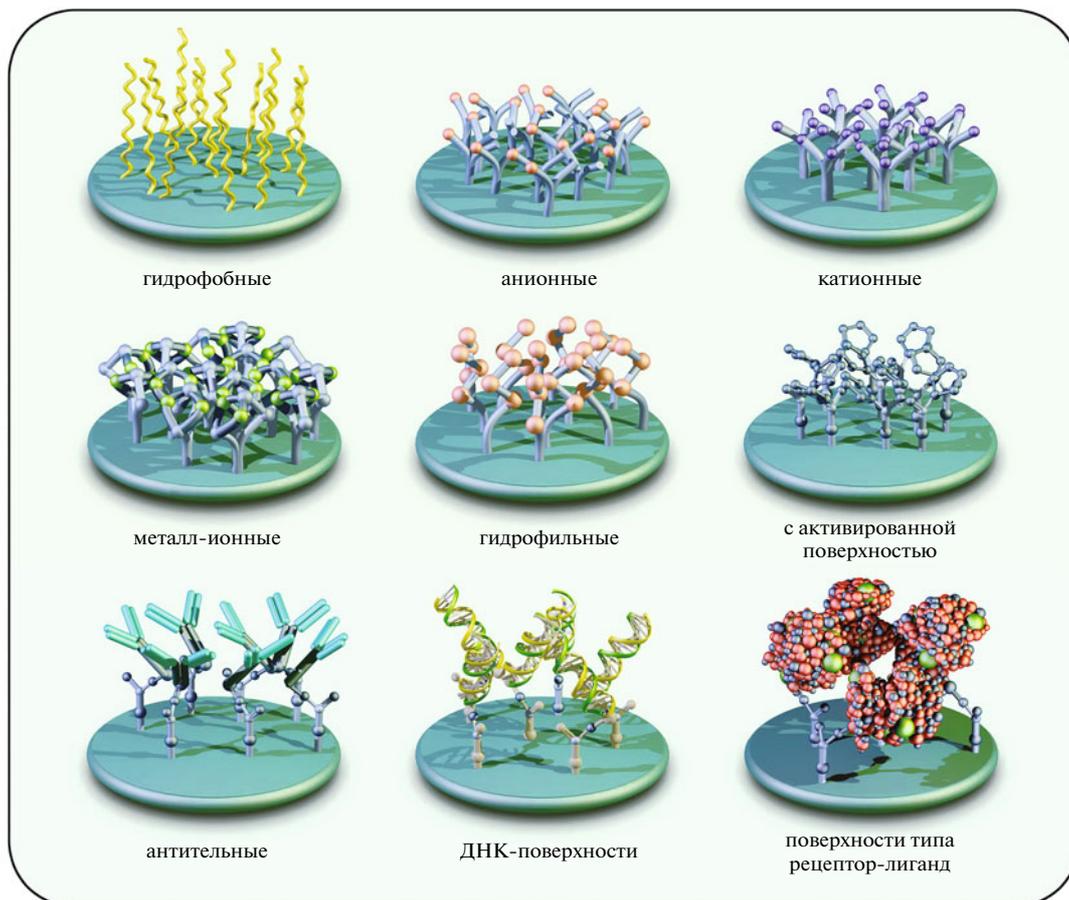
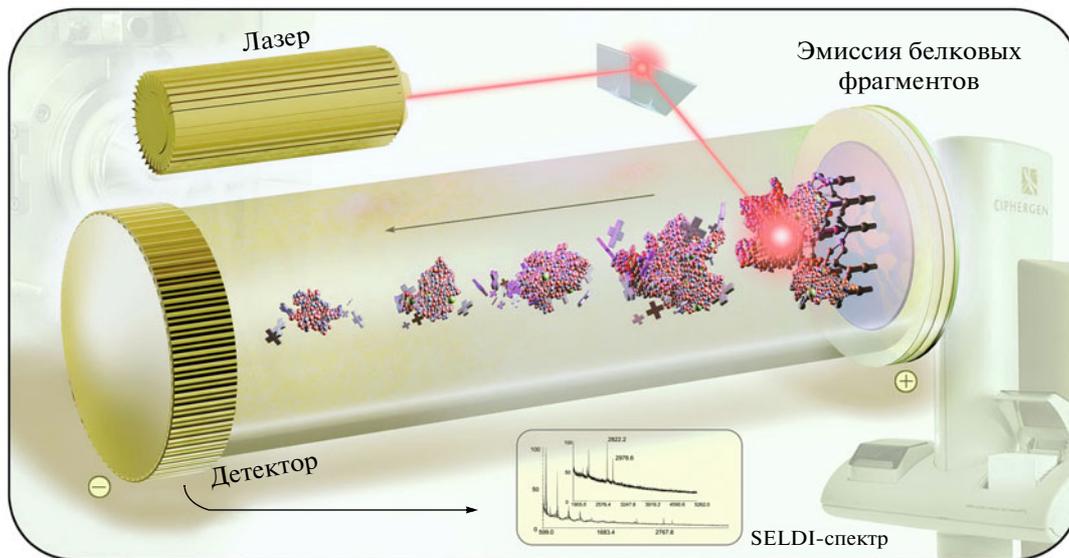


Рис. 2. Схемы метода SELDI. Вверху – устройство SELDI масс-спектрометра, где луч аргонового лазера преломляется линзой и поочередно направляется на связавшиеся с белками активированные поверхности, показанные внизу.

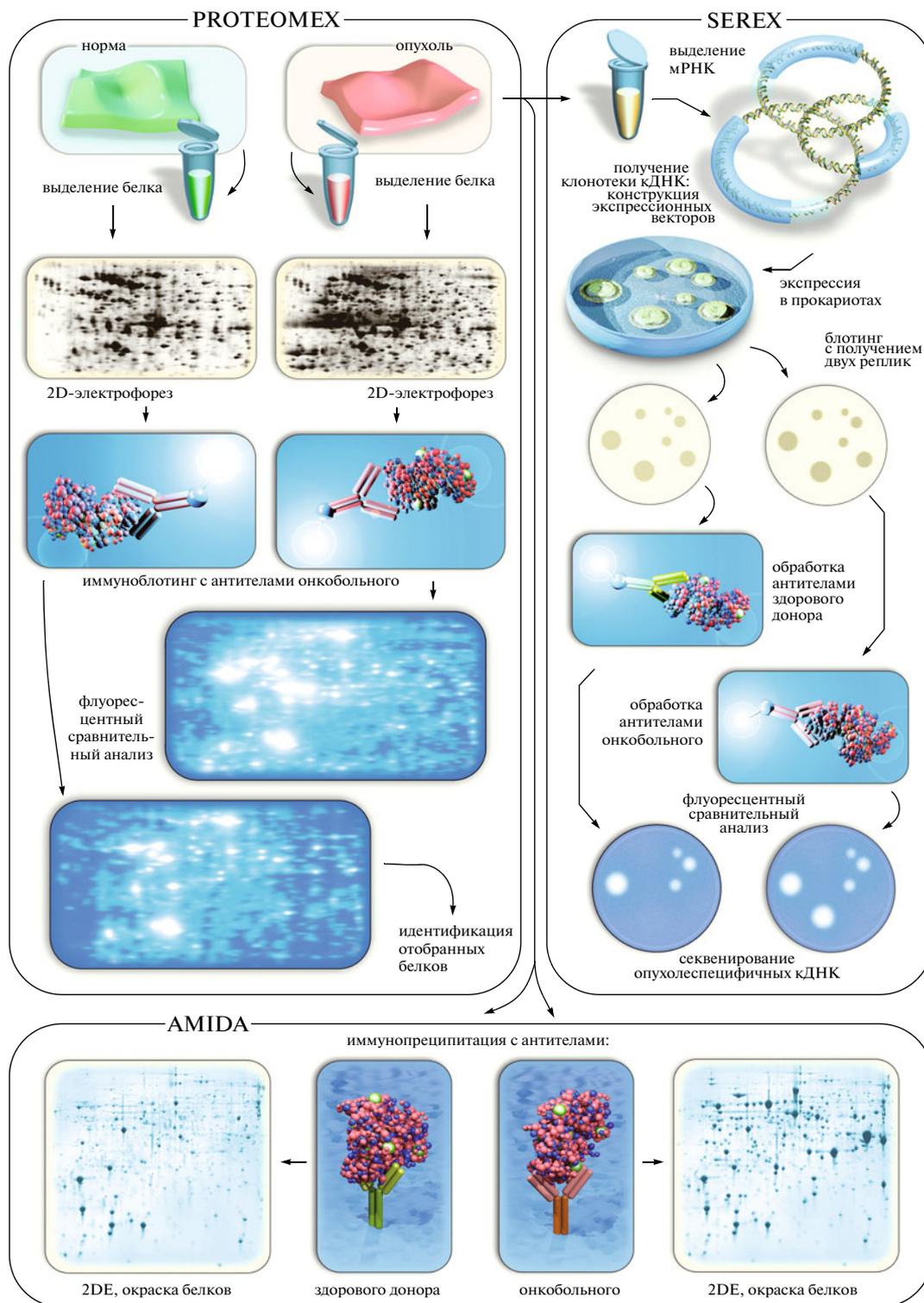


Рис. 3. Схемы методов обратной протеомики (SEREX, Proteomex и AMIDA).

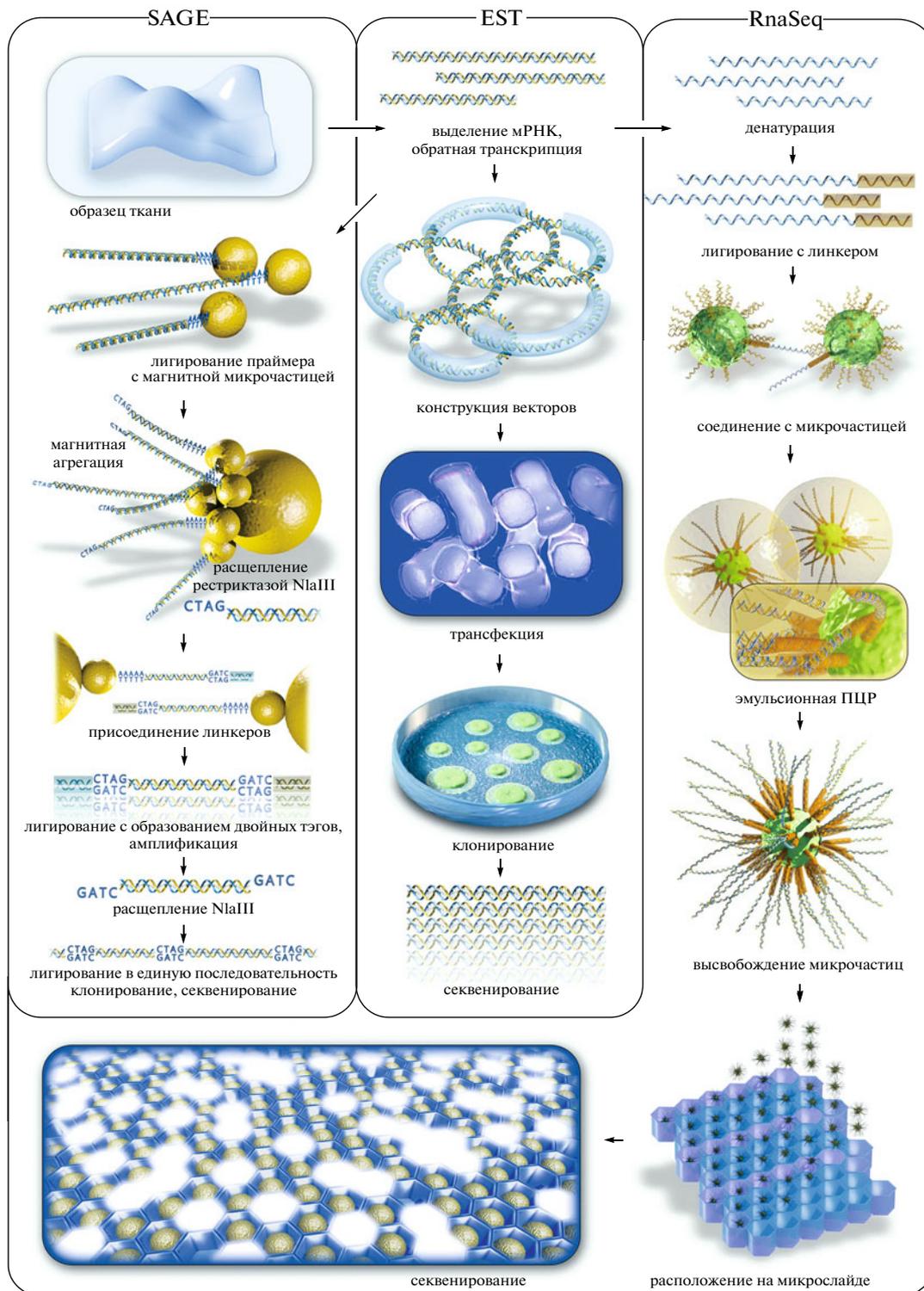


Рис. 4. Схемы методов протеомики *in silico*, основанных на сравнении транскриптомов нормальной и опухолевой ткани (SAGE, EST и RnaSeq).