

## Протеомика в открытии маркеров рака предстательной железы

В.Е. Шевченко<sup>1</sup>, А.В. Оленич<sup>2</sup>, Н.Е. Арноцкая<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ канцерогенеза ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>Медицинский научный центр «МедБиоСпектр»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, стр. 8

**Контакты:** Валерий Евгеньевич Шевченко vshev@nm.ru

Рак предстательной железы (РПЖ) занимает 2-е место в мире по распространенности среди злокачественных опухолей у мужчин. Протеомика представляет перспективный подход для открытия новых маркеров, которые могут улучшить эффективность лечения больных РПЖ. Для диагностики, прогноза и оценки эффективности терапии заболевания необходимы более специфичные и чувствительные маркеры, чем специфический антиген предстательной железы. Кроме того, протеомика может идентифицировать новые важные молекулярные мишени для терапии РПЖ. В настоящее время изучаются несколько возможных источников биомаркеров РПЖ, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки, включая ткань, мочу, сыворотку и плазму крови, секрет предстательной железы. Инновационные высокотехнологичные протеомные платформы сейчас идентифицируют и количественно определяют новые специфичные и чувствительные биомаркеры для обнаружения, стратификации и лечения РПЖ. Однако многие из них все еще далеки от использования в клинической практике.

В этом обзоре обсуждаются последние достижения в протеомных исследованиях РПЖ, уделяется особое внимание открытию биомаркеров и их применению в клинической практике для диагностики, прогноза течения заболевания и стратификации больных.

**Ключевые слова:** рак предстательной железы, протеомика, биомаркеры, масс-спектрометрия, опухолевая ткань, жидкости организма

DOI: 10.17 650/2313-805X. 2015.2.2.17–28

### The proteomics in prostate cancer biomarker discovery

V.E. Shevchenko<sup>1</sup>, A.V. Olenich<sup>2</sup>, N.E. Arnotskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow, 115478, Russia;

<sup>2</sup>Medical Scientific Center "MedBioSpectr"; 24 bldg 8 Kashirskoye Shosse, Moscow, 115478, Russia

Prostate cancer (PC) represents the second most frequent type of tumor in men worldwide. Proteomics represents a promising approach for the discovery of new biomarkers able to improve the management of PC patients. Markers more specific and sensitive than prostate-specific antigen are needed for PC diagnosis, prognosis and response to treatment. Moreover, proteomics could represent an important tool to identify new molecular targets for PC tailored therapy. Now several possible PC biomarkers sources, each with advantages and limitations, are under investigation, including tissues, urine, serum, plasma and prostatic fluids. Innovative high-throughput proteomic platforms are now identifying and quantifying new specific and sensitive biomarkers for PC detection, stratification and treatment. Nevertheless, many putative biomarkers are still far from being applied in clinical practice.

This review aims to discuss the recent advances in PC proteomics, emphasizing biomarker discovery and their application to clinical utility for diagnosis and patient stratification.

**Key words:** prostate cancer, proteomics, biomarkers, mass spectrometry, tumor tissues, body fluids

#### Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) — 2-е наиболее распространенное онкологическое заболевание и 6-е по смертельным исходам у мужчин в мире [1, 2]. Только у 8 % больных РПЖ становится клинически выраженным, а большинство живут с локализованной формой болезни с 5-летним сроком выживаемости [3]. Напротив, в случае агрессивного течения болезни с появлением отдаленных метастазов в печень, легкое, мозг и особенно кости выживаемость уменьшается до 30 % [1].

В настоящее время для диагностики РПЖ у мужчин старше 50 лет рекомендовано определение простатического специфического антигена (ПСА) в крови

вместе с пальцевым ректальным обследованием (ПРО). Эта скрининговая методика помогает обнаруживать РПЖ у больных без любых явных симптомов и приводит к снижению летальности от РПЖ и увеличению выживаемости. К сожалению, высокие уровни ПСА (> 4 нг/мл) в крови не обязательно указывают на наличие РПЖ [4], а могут обнаруживаться также при воспалении (простатит) или доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ). Основная проблема при ПСА-тестировании — число ложноотрицательных результатов, возникающих из-за используемой в настоящее время скрининговой методологии: у 15 % больных при уровне ПСА < 4 нг/мл и отрицательных результатах ПРО все же

обнаруживается РПЖ с суммой баллов по шкале Глисона (индекс Глисона)  $> 7$  [4]. По этим причинам ПСА предлагают рассматривать скорее как маркер объема предстательной железы, а не как маркер наличия злокачественной опухоли. Несмотря на то что определение ПСА уменьшило показатель смертности от РПЖ на 20 %, тем не менее в большинстве случаев наблюдается вялотекущая форма РПЖ.

Помимо ранней диагностики РПЖ, различия в показателях заболеваемости и смертности на первый план выдвигают дифференциальную диагностику агрессивного и вялотекущего рака в целях адекватного лечения пациентов с агрессивной формой болезни. В настоящее время лечение РПЖ во многом зависит от стадии болезни, вида рака и возраста больного. Стадия РПЖ оценивается по классической системе TNM, обеспечивающей важную информацию о локализации болезни, в то время как вид РПЖ определяется морфологическим анализом, определяющим уровень дифференцировки ткани. Низкий индекс Глисона указывает на дифференцированный рак, который с меньшей вероятностью может метастазировать. Несмотря на существование специфических методов лечения для каждой стадии РПЖ, до сих пор нет никаких маркеров, отличающих агрессивную болезнь от вялотекущей формы, независимо от индекса Глисона. К сожалению, даже если гистологический анализ и индекс Глисона достаточно эффективно предсказывают исход лечения для большинства больных РПЖ с показателями  $< 6$  и  $> 7$ , гистология не дает клинически полезную информацию для больных РПЖ с индексом Глисона 6 и 7, для которых эффект терапии все еще остается непредсказуемым. Кроме того, этот вид скрининга не является на 100 % специфичным и чувствительным для идентификации агрессивной болезни при значениях  $< 6$  и вялотекущей болезни при показателе  $> 7$ .

Андрогеннезависимый РПЖ может возникнуть при клональном отборе из гипермутированных клеток на фоне аблационной терапии, который определяет развитие опухоли и фатальный результат. Избежать развития андрогеннезависимого РПЖ — другая проблема при лечении РПЖ, и с этой целью важно установить, когда опухоль станет гормонорефрактерной, и разработать новую специфическую терапию. Новые биомаркеры РПЖ должны ответить на несколько важных клинических вопросов. Имеет ли пациент рак или доброкачественную опухоль? Требуется ли биопсия? Рак вялотекущий или агрессивный? Какой вид лечения наиболее адекватен?

Белковые маркеры рака — протеины, присутствующие в жидкостях организма или в тканях, которые могут отражать наличие злокачественной опухоли и указывать на ее агрессивность, стадию процесса и реакцию на терапию. Биомаркеры можно разделить на несколько категорий [5]:

- диагностические скрининговые биомаркеры — белки, которые используются для обнаружения рака

у человека. Они должны иметь высокую чувствительность и специфичность;

- прогностические биомаркеры, которые используются для предсказания течения заболевания, включая рецидив и агрессивность. Они полезны, когда статус болезни установлен и необходимо провести более адекватное лечение;

- биомаркеры стратификации — белки, которые предсказывают реакцию на определенную терапию, позволяя разделять пациентов на отвечающих и не отвечающих на терапию. Они могут быть идентифицированы при анализе молекулярного профиля тканей и могут представлять собой панели определенных белков, коррелирующие с реакцией на терапию. Биомаркеры стратификации не обязательно должны быть опухолеспецифическими [5].

Открытие новых белковых маркеров в крови, моче или ткани может помочь при разработке более чувствительных и специфичных диагностических и прогностических тестов РПЖ, позволяет раньше обнаружить и начать лечение пациентов с агрессивной болезнью и одновременно исключать передозировки для случаев с низким риском. Протеомика вместе с инновационными высокопроизводительными технологиями может быть перспективным подходом при идентификации новых биомаркеров для обнаружения рака и проведения терапии. Недавние достижения в протеомике создают мощные платформы, которые в состоянии не только обнаружить белки, но также определить их количество в ткани и во многих жидкостях организма (моча, кровь, семенная жидкость).

В обзоре обсуждаются новые достижения протеомики в области РПЖ, особое внимание уделяется открытию и идентификации биомаркеров и их возможному будущему клиническому применению в диагностике и стратификации пациентов.

### Биомаркеры ткани

Ключ к более эффективному диагнозу, прогнозу и предсказанию эффекта терапии РПЖ находится в анализе самой опухолевой ткани. При анализе протеома ткани можно приоткрыть механизмы, лежащие в основе трансформации нормальных клеток предстательной железы в опухолевые клетки, которые впоследствии приобретают способность к метастазированию. Фактически эти процессы регулируются сложными белковыми сетями, передающими биологические сигналы, и протеомной архитектурой через посттрансляционные эпигенетические модификации, например фосфорилирование. Статус фосфорилирование/активация непосредственно не коррелирует с уровнем транскрипции. По этим причинам, а также потому, что белки — функциональные единицы этих сигнальных путей, протеомные технологии стали мощным инструментом при открытии новых мишеней для лекарственных средств и маркеров для ранней диагностики или кандидатных вакцин.

Важный фактор, который должен учитываться при протеомном анализе, заключается в том, что опухолевая ткань обычно не образуется группой гомогенных клеток. Напротив, она состоит из множества различных клеточных субпопуляций (фибробласты, нервные клетки, эндотелиальные клетки, опухолеинфильтрирующие лимфоциты, эпителиальные клетки и т. д.), которые имеют перекрестные связи друг с другом и взаимодействуют, поддерживая рост опухоли. Для изучения сигнальных путей, ответственных за начало и прогрессию РПЖ, важно демонтировать эту сложную экосистему ткани. Изоляция чистых субпопуляций клеток из гетерогенной ткани являлась проблемой при разработке протеомного анализа, которую преодолели введением таких методов, как сортер клеток и лазерная микродиссекция (ЛМД) [6]. Белки, экстрагированные из отобранных клеток, могут быть проанализированы с помощью прямо-/обратно-фазовых микрочипов или масс-спектрометрии (MS). Наиболее широко используемые MS-платформы включают двумерный электрофорез с последующим MS-анализом (2DE-MS), MS с ассоциированной с матрицей лазерной десорбцией/ионизацией (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI-MS), MS с усиленной поверхностью лазерной десорбцией/ионизацией (surface-enhanced laser desorption/ionization, SELDI-MS), а также высокоэффективную хроматографию – тандемную MS (LC-MS/MS), позволяющие проводить качественный анализ протеома [7]. Только совсем недавно был введен метод изобарных мишеней для относительного и абсолютного количественного анализа (isobaric tag for relative and absolute quantitation, iTRAQ), который дает возможность количественно проанализировать изменения протеома [8].

Один из наиболее успешно используемых тканевых белковых маркеров для прогноза и предсказания РПЖ – без сомнения, рецептор андрогенов (РА). РА – ключевые регуляторы роста РПЖ, стимулирующие пролиферацию и торможение апоптоза опухолевых клеток. Однако один только РА-сигнальный путь недостаточен для поддержания роста опухоли и ее прогрессии, особенно в период поздних стадий РПЖ. В действительности прогрессирование РПЖ также поддерживается секреторными стромальными паракринными медиаторами, такими как IGF, FGF и EGF [9]. Перекрестная связь между опухолевым эпителием и его микроокружением активирует ряд тирозинкиназных рецепторов (например, IGFR, FGFR и EGFR), которые вместе с РА-сигналингом стимулируют выживание клеток РПЖ и их пролиферацию [10]. Понимание молекулярных механизмов, стимулирующих возникновение опухоли и ее прогрессию, приведет к идентификации более специфичных и потенциальных РПЖ-диагностических и прогностических биомаркеров, а также терапевтических мишеней.

Недавно проведенные протеомные исследования для оптимизации постановки диагноза и прогноза

РПЖ не основаны на определении уровней РА. Главная цель этих усилий – найти специфичные биомаркеры, способные отличать РПЖ от ДГПЖ, идентифицировать агрессивный рак и оптимизировать его лечение, а также предотвратить передозировку препаратами пациентов из группы с низким риском прогрессии. Важная начальная задача протеомного исследования – охарактеризовать молекулярные изменения в пределах онкогенеза РПЖ, используя взятую у тщательно отобранных пациентов нормальную ткань, неопластический эпителий, эпителий, изолированный из инвазивного фронта, и эндотелиальные клетки. Это исследование показало, что анализ SELDI-MS совместно с ЛМД может быть полезным инструментом для идентификации новых диагностических биомаркеров [6]. В дальнейшем другое подобное исследование продемонстрировало, что экспрессия 24 протеинов была специфичной для РПЖ и обнаружена в 16 (94 %) из 17 образцов РПЖ, но не в отобранных нормальных клетках и ни в одном из 12 образцов ДГПЖ [11]. Кроме того, авторы идентифицировали протеин с  $m/z$  24782 Да, присутствие которого коррелировало с наличием РПЖ. 2D-DIGE с протеомным MS-анализом образцов ткани РПЖ в сравнении с нормальной тканью тех же самых пациентов показал, что дифференциально экспрессируемые белки (ДЭБ) в этих 2 группах тканей вовлечены в развитие опухолевого процесса и принадлежат, по данным Gene Ontology, группам семейства HSP, сигнальных трансдукторов, метаблических ферментов, опухолеассоциированных протеинов и протеинов, контролирующих цитоскелетную перестройку и окислительный стресс. Системный подход к биологическим процессам доказал также, что все эти белки связаны в сети с центральными движущими элементами – с-MYC, p53, РА и ПСА, которые, как известно, являются ключевыми регуляторами при возникновении и прогрессии РПЖ и потенциальными мишенями для терапии [12].

Согласно опубликованным данным, высококодифференцированная простатическая интраэпителиальная неоплазия (ВДПИН) – наиболее вероятный предшественник аденокарциномы предстательной железы. Клеточная морфология ВДПИН подобна аденокарциноме, хотя в отличие от рака она сохраняет клетки базального слоя [13]. Проводился протеомный анализ ЛМД обогащенных клеток из нормальной ткани, ВДПИН и РПЖ (индекс Глисона 3), полученных из 22 образцов после радикальной простатэктомии. При анализе идентифицирован белок GDF15, который был экспрессирован в 19 из 27 случаев РПЖ, 3 из 8 случаев ВДПИН и ни в одном из образцов нормальной ткани. Основываясь на этих данных, авторы предположили, что GDF15 мог быть маркером раннего онкогенеза предстательной железы [14].

В других исследованиях предпринята попытка обнаружить группы маркеров для РПЖ и ДГПЖ. В каче-

стве примера можно привести исследование A.A. Alaiya et al., которые охарактеризовали экспрессию набора протеинов свежей ткани, взятой от 8 пациентов с РПЖ и 16 – с ДГПЖ. Протеомный анализ был выполнен с использованием анализов 2D-GE и MALDI-MS. Авторы нашли панель из 22 гипотетических биомаркеров, которые были дифференциально экспрессированы между ДГПЖ и РПЖ, и 15 из них, как уже сообщалось ранее, выявлены и в других лабораториях. Обнаруженные уровни disulfide-isomerase, 14-3-3-protein, enoyl CoA-hydrase, prohibitin и B-tubulin  $\beta$ -2 были выше в образцах РПЖ, в то время как уровни Keratin-II, desmin, HSP71, ATP-synthase- $\beta$ -chain и creatine kinase- $\beta$ -chain – в образцах ДГПЖ. Авторы пришли к заключению, что эта панель может успешно разделить образцы ДГПЖ и РПЖ, а также РПЖ начальной стадии и высококодифференцированный РПЖ [15].

Базальные клетки играют важную, но еще до конца не ясную роль в запуске дифференцировки и росте нормального секреторного эпителия предстательной железы. Хорошо известно, что инвазия РПЖ сопровождается разрушением слоя базальных клеток и инфильтрацией стромы раковыми клетками [16]. Некоторые исследователи предполагают, что потеря функции базальных клеток может иметь важное значение при трансформации интраэпителиальной неоплазии предстательной железы в инвазивный рак. J.I. Diaz et al. идентифицировали с помощью ЛМД и SELDI-MS специфический протеомный профиль для базальных клеток [17]. Другое недавно проведенное исследование, используя MS, продемонстрировало, что CRABP2 (cellular retinoic acid-binding protein 2) имеет пониженную экспрессию в базальных клетках доброкачественной опухоли предстательной железы в сравнении с РПЖ и простатитом. Аналогичное исследование проводилось для идентификации ДЭБ между эпителиальным и стромальным компонентами при РПЖ, простатите и в нормальной предстательной железе после изоляции различных клеточных субпопуляций. Caspase-1 и interleukin-18 receptor 1 были высокоэкспрессированы в лейкоцитах РПЖ, Wnt-3 имел пониженную экспрессию в эндотелиальных клетках ткани при простатите, tyrosine phosphatase non-receptor type 1 обнаружен только в нормальных и доброкачественных эндотелиальных клетках, poly ADP-ribose polymerase 14 имела пониженную экспрессию в миофибробластах ткани предстательной железы при простатите и, что интересно, integrin $\alpha$ -6 оказался высокоэкспрессирован в эпителии РПЖ, но абсолютно отсутствовал в миофибробластах РПЖ [18].

Некоторые исследователи сообщили об обнаружении потенциальных биомаркеров метастазирования в лимфатические узлы (lymph nodes metastasis, LNM) при РПЖ (LNM). X. Gao et al. показали, что CRPM4 (collapsing response mediator protein-4) является супрессором метастазирования, так как его экспрессия приводит к обратно пропорциональной кор-

реляции с LNM у исследованных пациентов [19]. J. Pang et al. идентифицировали 58 белков, которые были ДЭБ между группой LNM и группой больных РПЖ без регионарных метастазов. Среди этих белков 6 имели отношение к метастазированию (e-FABP5, MCCC2, PPA2, Ezrin, SLP2 и SM2) и, видимо, представляют собой новые гипотетические маркеры LNM при РПЖ [20].

Кроме необходимости отличать агрессивный рак от локализованной болезни, другая цель при исследовании РПЖ состоит в том, чтобы различать опухоли с низкими и высокими индексами Глисона. В недавнем исследовании с использованием 2D-DIGE в комбинации с ЛМД и MALDI-MS проанализированы образцы ткани после радикальной простатэктомии доброкачественной и злокачественной опухоли, полученные от 23 больных РПЖ с индексом Глисона 6 и 23 больных с индексом Глисона  $\geq 8$ . В результате идентифицированы 19 ДЭБ, половина из которых была связана с гликолизом и имела повышенную экспрессию в опухолевой ткани. Среди них lamin A с высокой статистической достоверностью различал образцы с низкими и высокими индексами Глисона, и поэтому данный белок может представлять собой новый биомаркер дифференцировки опухоли и прогноза заболевания [21].

В процессе трансформации и прогрессии РПЖ возникает много изменений в структуре белков и путей активации, частично из-за накопления мутаций генов. К настоящему времени зарегистрировано  $\geq 600$  мутаций для одного только гена *AR* [22], и многие из них оказывали влияние на образование RA-протеинового комплекса и сигнальную трансдукцию. M. Paliouras et al. недавно представили результаты протеомного профилирования 3 RA-генетических вариантов. Применяв методы системной биологии, исследователи смогли построить профиль сети белкового взаимодействия для каждого RA-варианта, показывающий, что различные изоформы дифференцированно активизируют нисходящие сигнальные пути, влияющие на исход болезни [23].

Вышеупомянутые исследования применяли количественный или качественный методы, однако введение iTRAQ-технологии помогает количественно анализировать протеом, идентифицируя новые потенциальные диагностические и прогностические тканевые маркеры, с использованием методов стабильных изотопов, которые дают возможность непосредственно сравнить результаты протеомного анализа между любыми 2 образцами. В последние несколько лет опубликованы результаты исследований, в которых с помощью этой технологии выполнялся количественный протеомный анализ РПЖ. C. Sun et al. проанализировали биоптаты предстательной железы, используя iTRAQ, и установили, что periostin значительно выше экспрессирован при РПЖ по сравнению с ДГПЖ, что дает возможность рассматривать его как многообещающий прогностический биомаркер и терапев-

тическую мишень [24, 25]. Другое исследование, проведенное на экспериментальной модели РПЖ методом количественной протеомики, продемонстрировало, что снижение экспрессии EPLIN (epithelial protein lost in neoplasm) — важное событие для активации эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Особенно EPLIN влияет на процессы образования межклеточных контактов, действуя как отрицательный регулятор ЭМП [26].

Используя метод MALDI-MS в сочетании с микроэкстракцией, J. Quanico et al. обнаружили увеличение экспрессии growth differentiation factor 15, hypoxia upregulated protein 1, periostin и poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) в биоптатах опухолевой ткани больных РПЖ по сравнению с нормальной тканью [27].

В другом исследовании идентифицировали и валидировали новые потенциальные биомаркеры РПЖ для диагностики пациентов с биохимическим рецидивом и без него. Авторы анализировали образцы ткани предстательной железы с помощью двумерного дифференциального гель-электрофореза и LC-MS/MS и обнаружили снижение экспрессии *secernin-1* и значительное увеличение *vinculin* в опухолевой ткани [28]. Полученные данные подтверждены вестерн-блоттингом и иммуногистохимическими (ИГХ) методами. Результаты исследования указывают на то, что *secernin-1* и *vinculin* относятся к новым тканевым биомаркерам для диагностики и прогноза РПЖ. Для валидации измеряли уровни этих белков в моче вестерн-блоттингом. Уровни *vinculin* у больных РПЖ были значительно выше, чем у пациентов без рака. MS-анализ с мониторингом множественных реакций (MRM-MS) показал значительно более высокие концентрации *prostatic acid phosphatase* в моче у больных РПЖ по сравнению с контролем, в то время как уровни *galectin-3* значительно снижены в моче у больных с биохимическим рецидивом по сравнению с таковыми без рецидива. По мнению авторов, техника MRM-MS имеет большие перспективы для проведения неинвазивной клинической диагностики РПЖ.

Протеомика также используется в фундаментальных исследованиях по поиску новых взаимодействий между белками, которые могли бы помочь при идентификации новых прогностических биомаркеров. В частности, это относится к *SOX4*, транскрипционному фактору, который требуется для дифференцировки и пролиферации во многих тканях в процессе развития организма. Анализ протеомов множества клеточных линий РПЖ обнаружил взаимодействие между *SOX4* и *plakoglobin*, раскрывающее новую роль *SOX4* в прогрессии РПЖ [29]. Другое исследование показало, что экспрессия белков *TRK-fused gene* (TFG) и РПЖ-специфического *Pin1 binding proteins* (PINBPs) избирательно повышена в клетках линий РПЖ и тканях, и поэтому эти белки могут быть потенциальными диагностическими и/или прогностиче-

скими биомаркерами и терапевтическими мишенями для РПЖ [30]. К сожалению, до настоящего времени эти данные все еще не валидированы на клинических образцах.

Многие авторы подтверждают результаты исследований, использующих ИГХ-методы, при анализе тканей животных и/или клинического материала. A. Glen et al. доказали высокую экспрессию *gp96* в образцах метастазов [31], а исследование S.D. Garbis et al. показало, что  $\alpha$ -methylacyl CaA racemase (AMACR) и prostate-specific membrane antigen (PSMA) являются маркерами для РПЖ [32]. Некоторые исследователи попытались объединить ряд биомаркеров, специфичных для различных стадий РПЖ, в мультиплексные наборы, которые могли бы различать вялотекущую и агрессивную формы рака. Так, A.K. Yocum et al. [33] использовали метод селективного мониторинга реакций в тандемной MS (SRM-MS/MS) и объединили его с введением меченных стабильными изотопами внутренних стандартов, чтобы обеспечить начальную валидацию открытым биомаркерам. Авторы выбрали 3 различных белка: AMACR — маркер для агрессивной локальной опухоли при переходе к метастатической болезни, EZH2 — биомаркер для агрессивной формы РПЖ и ПСА, протестированных в серии из хорошо изученных клеточных линий РПЖ, и впоследствии в гистологических препаратах. У этой группы белков, вероятно, есть хороший потенциал дифференцировать доброкачественную опухоль от локализованного РПЖ.

#### **Биомаркеры в биологических жидкостях**

Скрининг, основанный на тестировании биологических жидкостей, очень привлекателен из-за минимальной инвазивности, скорости и дешевизны процедуры сбора клинических образцов. Моча, секрет предстательной железы и семенная плазма в настоящее время широко изучаются вместе с сывороткой/плазмой для идентификации биомаркеров РПЖ [34–37]. Биологические жидкости не только удобны, но и фактически представляют собой важный источник маркеров опухолевого роста, так как трансформированные клетки могут продуцировать и высвобождать эти белки в циркуляцию. При РПЖ проксимальные жидкости, такие как секрет предстательной железы и семенная плазма, могли бы быть, вероятно, высокочувствительными и специфичными биомаркерами, так как содержат в высокой концентрации белки клеток предстательной железы [38].

Для открытия циркулирующих маркеров использовались 2 главных протеомных подхода:

- прямое исследование проксимальных или дистальных жидкостей организма, собранных от больных раком или здоровых контрольных групп [29, 39, 40];
- анализ клеточного супернатанта, который содержит секретлируемые белки. Эти белки реализуются

в микросреду, откуда могут достигнуть проксимальных жидкостей и кровяного русла [41–43].

Кондиционированные среды линий злокачественных клеток предстательной железы (LNCaP) и клеток ДППЖ (ВРН-1) анализировали двумерным электрофорезом с последующим анализом MALDI-MS. Авторы идентифицировали 11 ДЭБ, которые имели повышенное содержание в кондиционированной среде (LNCaP), включая creatine kinase, brain (CKB), isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+) (IDH2), aldo-keto reductase family 1 member A1 (AKR1A1), glyoxalase I (GLO I), triosephosphate isomerase 1 (TPI1) и cyclophilin [42]. Использование кондиционированной среды имеет некоторые преимущества, так как специфичные белки, связанные с опухолевыми клетками, идентифицируются быстро, и эта клеточная среда – очень простая матрица для анализа по сравнению с такой биологической жидкостью, как сыворотка. В то же время клеточная культура не может точно моделировать естественные условия микросреды ткани и особенно организма, и биомаркеры, идентифицированные *ex vivo*, могут быть не столь полезны в клинике. Тем не менее для идентификации потенциальных маркеров такой подход может быть весьма информативным.

Многие высокопроизводительные протеомные подходы, основанные на MS и белковых чипах, разработаны и применялись в преclinical исследованиях с главной целью одновременно анализировать множество образцов или множество протеинов [44–48]. Действительно, онкологические патологии могут быть хорошо поняты только при изучении множества факторов, которые вовлекаются в биологию опухоли. Следовательно, точный скрининговый тест должен анализировать набор биомаркеров, а затем необходимы технологии измерения для выполнения скрининга большого количества образцов в клинических условиях.

Капиллярный электрофорез, объединенный с MS (CE/MS), применялся для выполнения протеомного профилирования мочи. Мочу от 51 больного РПЖ и 35 индивидов с отрицательной биопсией анализировали для идентификации группы полипептидов, которые могут детектировать РПЖ. Авторы идентифицировали информативную группу полипептидов мочи, подтверждающую наличие секрета предстательной железы и являющуюся источником соответствующих биомаркеров предстательной железы. Белки, идентифицированные как кандидатные биомаркеры, включали collagen  $\alpha$ -1 (III), collagen  $\alpha$ -1 (I) и psoriasis susceptibility 1 candidate gene 2 protein [39–68]. Группа биомаркеров была валидирована в слепом тесте на панели из 213 образцов (118 РПЖ и 95 с отрицательной биопсией). РПЖ был обнаружен с чувствительностью 89 % и специфичностью 51 %. Учет возраста и процента свободного ПСА увеличил показатели чувствительности и специфичности протеомного набора (91 и 69 % соответственно) [49]. Эффективность анализа, основанного на CE/MS, оценивали при его использовании

в клинике. В группе из 184 пациентов удалось правильно диагностировать 42 из 45 больных раком и 79 из 124 пациентов без рака (чувствительность 86 % и специфичность 59 %). Кроме того, MS-платформа показала хорошую аналитическую точность, в то время как отношение стоимость/эффективность было уменьшено за счет сокращения числа требуемых биопсий и, таким образом, уменьшения риска возникновения РПЖ, связанного с ними [50]. Профилирование сыворотки выполняли, используя микрочипы с антителами, нанесенными в виде пятен на полиакриламидный гидрогель на стекле. При анализе около 180 различных белков идентифицировано 5 потенциальных биомаркеров (von willebrand factor, immunoglobulin M, alpha-1-antichymotrypsin, villin и immunoglobulin G) [51].

Биологические механизмы, поддерживающие развитие рака и его прогрессирование, очень сложные и определяются высокой гетерогенностью опухоли [52, 53]. Сейчас многие исследователи считают, что единичный биомаркер не может обеспечить необходимую чувствительность и специфичность для клинического скринингового теста из-за гетерогенности рака и необходимости отличать онкологическую патологию от значительно более распространенных воспалительных и доброкачественных болезней. Поэтому исследователи начали проверять эффективность тестов, основанных на панели из множества маркеров. Представлен интересный подход, использующий мультимолекулярные тесты или пробы различных жидкостей организма. Недавно прошел оценку мультимолекулярный тест для диагностики РПЖ. Анализ включал измерение уровней антител АМАСР и белка MMP-2 в крови больных РПЖ и одновременно анализ статуса гиперметилирования 2 генов *GSTP1/RASSF1A* [54]. В работе проанализировали образцы сыворотки и мочи от 113 мужчин. По данным ROC-кривой (receiver operating characteristic curve), чувствительность, специфичность, положительные и отрицательные прогнозирующие величины для мультимолекулярного анализа составили 57,1; 96,6; 88,9, и 82,4 % соответственно при AUC (area under ROC curve)  $0,788 \pm 0,07$ . Данные показали значительное усиление специфичности при диагностике РПЖ по сравнению с одним ПСА (в этом исследовании: специфичность 17,7 %, чувствительность 97,1 %, положительное прогнозирующее значение 33,7 % и отрицательное прогнозирующее значение 93,3 %).

За прошедшее время накоплена масса информации по новым кандидатным биомаркерам РПЖ в биологических жидкостях. Большинство экспериментальных исследований все еще должно валидироваться на больших клинических выборках. Поскольку эти маркеры идентифицированы различными методами и с учетом их роли в биологии РПЖ, есть большая уверенность в их полезности. Потенциальные маркеры включают,

например, beta 2 microglobulin [55–57], zinc alpha<sup>2</sup>-glycoprotein (ZAG) [58–60], transforming growth factor- $\beta$ 1 [61–63], interleukin 6 [64–66]. CD90 [67], engrailed-2 (EN2) [68], fibronectin 1 [57] и много других растворимых факторов и внутриклеточных белков, вовлеченных в структурные или метаболические функции клеток.

Engrailed-2 (EN2) – гомеодоменосодержащий транскрипционный фактор, экспрессирующийся в клеточных линиях и ткани РПЖ, но не в нормальной ткани предстательной железы. Он идентифицирован как кандидатный биомаркер мочи для PCaEN2 и детектирован вестерн-блоттингом у больных РПЖ, но не у индивидов с ВДПИН или ДГПЖ. EN2 измеряли методом ELISA в моче у больных РПЖ и в контрольных группах, зарегистрированных в 2 различных центрах. Уровни белка EN2 оказались в 10,4 раза выше у больных РПЖ по сравнению с контрольными группами. Даже при отсутствии заметной корреляции между экспрессией EN2 и комбинированным индексом Глисона наличие EN2 в моче позволяет отличить больных от индивидов контрольных групп с чувствительностью 66 % и специфичностью 88,2 % (AUC – 0,81) [68].

В свободном от клеток супернатанте, созданном после дайджеста в бессывороточной питательной среде коллагеназной ткани РПЖ и условно нормальной ткани, полученных при хирургической резекции предстательной железы, идентифицированы 3 различных CD90 (Thy-1) N-гликопептида от 2 различных N-гликосайтов [67]. Метод основан на предположении, что клетки остаются активными в питательной среде, продолжая реализовывать специфичные клеточные белки. CD90 показал приблизительно 5-кратное увеличение при раке против образцов неопухолевой ткани. ИГХ-анализ выявил сверхвысокую экспрессию CD90 в связанной с раком строме по сравнению с тканями нормальной стромы. Авторы решили протестировать мочу от больных раком на наличие фрагментов CD90, которые могли встречаться, если белок реализуется из опухолевых клеток. CD90-пептид идентифицировали в моче от больных РПЖ методом ICAT-MS/MS перед простатэктомией, но не после простатэктомии, подтверждая, что CD90 секретируется тканью РПЖ и может являться кандидатным биомаркером для неинвазивного теста [67]. Кроме того, используя анализ LC-SRM-MS, 7 MS/MS фрагментов определенного пептида к CD90, вариантный белок (инвентарный номер NCBI VAD92446) идентифицирован в дооперационных образцах. Эта разновидность, как оказалось, была специфичной для опухолеассоциированных стромальных клеток, что делает CD90 еще более ценным кандидатным биомаркером в ткани и в моче.

Для открытия биомаркеров РПЖ С. Li et al. исследовали образцы мочи после массажа предстательной железы от 28 больных РПЖ, 20 пациентов с ДГПЖ и 6 здоровых добровольцев, используя LC-MS/MS

[69]. Авторы обнаружили несколько пептидов, производных osteopontin (SPP1) и prothrombin (F2), уровни которых были снижены у больных РПЖ по сравнению с ДГПЖ. Диагностическая точность по данным AUC для SPP1- и F2-пептидов составила 0,65–0,77 и 0,68–0,72 соответственно. Кроме того, наблюдались существенные различия в уровнях pyridinoline (PYD) и deoxypyridinoline (DPD) у больных с РПЖ и ДГПЖ. Экскреция DPD и отношение уровней DPD/PYD изменялись в процессе развития РПЖ, увеличиваясь у больных с местно-распространенной опухолью.

#### **Маркеры биологических жидкостей для прогноза рака предстательной железы**

Beta-2-microglobulin ( $\beta$ 2M), beta-цепь главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I, определен как потенциальный маркер агрессивности РПЖ. В 2007 г. М. Gross et al. идентифицировали  $\beta$ 2M методом SELDI-TOF MS в питательных средах клеток LNCaP после андрогенной стимуляции [56]. Экспрессия  $\beta$ 2M модулирует андрогензависимую реакцию роста в клетках LNCaP [55]. Высокий уровень  $\beta$ 2M измеряли в сыворотке [54] и в секрете предстательной железы [37] больных с метастатическим РПЖ с учетом того, что  $\beta$ 2M-экспрессия коррелирует с агрессивными патологическими особенностями в образцах с первичным РПЖ [55]. Недавно продемонстрировано, что  $\beta$ 2M модулирует ЭМП, усиливая агрессивность рака и провоцируя образование метастазов *in vivo* [70].

Zinc alpha<sup>2</sup>-glycoprotein (ZAG) – секретируемый белок, ответственный за деградацию липидов в адипоцитах, присутствует во многих биологических жидкостях, таких как кровь, семенная плазма, моча и слюна. Высокие уровни ZAG были найдены в семенной плазме больных РПЖ в отличие от образцов здоровых доноров [71]. Недавно при исследовании методом 2D-DIGE образцов сыворотки крови пациентов с различными стадиями РПЖ нашли увеличение уровня ZAG в 1,3 раза в сыворотке больных РПЖ с индексом Глисона 7 по сравнению с пациентами с более ранними стадиями рака (индекс Глисона 5) [72]. Полученный результат валидирован методом иммуноферментного анализа (ELISA) на большем количестве образцов, но не был подтвержден ИНС-анализами, которые фактически демонстрировали обратно пропорциональную зависимость между экспрессией белка и стадией РПЖ. Авторы сообщили о существовании 2 различных форм ZAG в крови и семенной плазме. Первая изоформа, возможно, продуцируется гепатоцитами, в то время как вторая производится столбчатыми эпителиальными клетками предстательной железы, и это, вероятно, объясняет различия между их экспрессией в тканях и сыворотке.

Другие исследования идентифицировали новые прогностические факторы для оценки выживания неметастатического резистентного к кастрации РПЖ (mCRPC) [73]. В исследовании использован протеом-

ный скрининг N-связанных гликопротеидов, выполненный на мышинной модели с потерей PTEN, описанной ранее I. Cima [74]. Как отмечалось ранее, потеря PTEN связана с плохим прогнозом для mCRPC. Подход, введенный I. Cima в 2011 г., включает 2 шага:

1) протеомное профилирование сыворотки и ткани от мышей и идентификацию кандидатных биомаркеров;

2) измерение отобранных биомаркеров в человеческих образцах для проверки гипотезы, предложенной при первом шаге.

Для обнаружения новых прогностических факторов идентифицировали 79 белков в сыворотке 57 больных метастатическим раком, подвергнутых гормональной аблативной терапии. Белки отбирали по изменению их уровней после потери PTEN с использованием *in vivo* модели. Методом ELISA измеряли 13 белков, а методом SRM – остальные 66. Оптимальная панель из предсказательных маркеров состояла из 5 белков, включающих thrombospondin 1 (THBS1), CRP, PVRL1, MME и ephrin-A5 (EFNA5). Представленная панель давала AUC 0,955 (95 % доверительный интервал (ДИ) 0,909–0,992) и 0,943 (95 % ДИ 0,894–0,985) для прогнозирования опасности развития рака через 12 и 24 мес. Этот показатель уменьшает ошибку на 15 % по сравнению с прогностической моделью, предсказывающей выживаемость у мужчин с метастатическим РПЖ, предложенной S. Halabi в 2003 г. [57, 75].

Интересное всестороннее исследование для идентификации диагностических и прогностических биомаркеров, которые могли отличить агрессивный и вялотекущий РПЖ, выполнено I. Rehaman et al. [57]. Авторы собрали 4 пула сыворотки, которые включали больных с ДГПЖ, локализованным непрогрессирующим раком, локализованным прогрессирующим раком и метастатическим раком. Объединенные серологические образцы плазмы были обеднены в отношении 14 наиболее представленных протеинов сыворотки и проанализированы с использованием 4-плексного iTRAQ-подхода. Иерархический кластерный анализ данных показал высокое подобие между белковым профилем ДГПЖ и непрогрессирующим раком, в то время как метастатическая группа отличалась от всех других групп. Увеличение уровня eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (eEF1A1) наблюдалось при переходе от пациентов с ДГПЖ до больных прогрессирующим раком и поддерживалось у больных метастатическим раком. Afamin и fibronectin идентифицированы как потенциальные диагностические биомаркеры для рака начальной стадии. Действительно наблюдалось увеличение в 1,4 раза этих 2 белков при непрогрессирующем раке по сравнению с ДГПЖ. Много белков уже идентифицировано в качестве кандидатных биомаркеров РПЖ, включая CRP, alpha-2-macroglobulin, ceruloplasmin, zinc-alpha-2-glycoprotein, beta-2-microglobulin и fibronectin. В этом исследовании

[55] подтвердили ранее полученные данные о повышенной экспрессии beta-2-microglobulin при поздних стадиях метастатического РПЖ [55].

#### **Простасомы как источник биомаркеров рака предстательной железы**

Микровезикулы (MVB), продуцируемые опухолевыми клетками в биологические жидкости, представляют источник биомаркеров. MVB могут отслаиваться непосредственно от плазматической мембраны клеток (слущенные везикулы) или освобождаться из внутриклеточных мультивезикулярных телец, которые сливаются с плазматической мембраной. Многие физиологические функции связаны с MVB, представляющими собой транспортное средство коммуникации между соседними клетками, перенося молекулы, такие как белки mRNA и microRNA [76, 77]. Большое количество MVB в виде экзосом обнаружено в плазме больных раком по сравнению с контрольными группами при меланоме [78], раке ободочной и прямой кишки [79], РПЖ [78, 80] и других онкологических патологиях. Эти экзосомы, которые содержат белки, реализованные опухолью, и являются в некоторой степени клеточно-специфичными, важный новый материал для поиска новых биомаркеров [81].

MVB обнаружены во многих биологических жидкостях, таких как плазма, моча, семенная жидкость, слюна, грудное молоко и амниотическая жидкость. Однако жидкости организма содержат смесь MVB, происходящих из различных типов клеток, которые делают анализ и интерпретацию протеомных исследований достаточно трудными. Чтобы проанализировать белки, специфично принадлежащие опухолевым клеткам, протеом экзосом/микровезикул, продуцируемых метастатической линией клеток PC-3 в питательную среду, она была обработана SDS-PAGE и проанализирована нанокapиллярной жидкостной хроматографией – тандемной MS (nano LC-MS/MS) [82]. Эксперимент проводили 2 раза для оценки воспроизводимости метода. По 2 или более пептидам были идентифицированы 266 белков из 416. Идентифицированные белки включали integrins, heat shock proteins, белки, вовлеченные в транспорт везикул, клеточный сигналинг, и цитоскелетные белки. В качестве примера приводим 2 MVB-ассоциированных белка: CD63 и эндосомальный сортировочный комплекс (ESCRT), требуемый для транспорта Alix-белка (programmed cell death 6-interacting protein), – они обычно находятся в экзосомах и рассматриваются как экзосомальные маркеры. Интегрины, роль которых при раке активно изучается, как оказывается, вовлечены в закрепление экзосом к внеклеточному матриксу [82].

Белки, идентифицированные в простасомах, подтверждают гипотезу о том, что MVB, реализованные PC-3 клетками, являются экзосомами клеток предстательной железы. Сравнение содержания протеома, полученного из MVB клеток PC-3 с клетками рака

мочевого пузыря и рака толстой кишки, показало перекрывание для протеомов только на 35 %. Эти данные подтверждают то, что MVВ содержат белки, частично специфичные для клеток, в которых они определяются, и, таким образом, потенциально являются опухолеспецифичными. CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) и tetraspanin CD151 были далее исследованы с учетом их участия в онкогенезе [82]. CD151 связывается с интегринами и матричными металлопротеиназами, регулирующими миграцию клеток. CDCP1, уже ранее отмеченный как биомаркер рака, был описан как антиапоптотическая молекула, вовлеченная в выживание метастатических клеток. В этом исследовании оба белка были обогащены в MVВ из клеток PC-3 по сравнению с полученными из LNCaP-1 и клеточной линии нормальных эпителиальных клеток предстательной железы RWPE-1.

В другом исследовании авторы определили, что средние уровни содержания простасом в плазме 20 пациентов с РПЖ увеличены по сравнению с контрольной группой, включающей 20 индивидов такого же возраста, и эти данные подтверждены валидацией в слепом тесте [80]. Количество простасом в образцах оказалось значительно выше у больных с индексом Глисона 7–9 в сравнении с контрольными группами, в то время как у онкологических пациентов с индексом Глисона  $\leq 6$  количество простасом было таким же, как у контрольных индивидов. Тест, основанный на обнаружении количества переносимых кровью простасом, вероятно, был бы бесполезным при ранней диагностике РПЖ, но полезным при идентификации прогрессирующего рака, особенно когда текущий анализ ПСА не в состоянии отличить пациентов с индексом Глисона 7 от пациентов с индексом Глисона  $\leq 6$ . Авторы выдвинули гипотезу, что более низкая диффузионная способность простасом по сравнению с величиной ПСА может сделать простасомный тест более специфичным для рака, так как у них меньше возможности реализоваться во внутритканевое пространство (и затем в кровь) при доброкачественной болезни. Таким образом, исследование протеомов простасом и измерение их количества в биологических жидкостях, таких как моча, сыворотка, секрет предстательной железы и семенная жидкость, считается перспективным подходом для открытия новых диагностических и прогностических маркеров РПЖ. Существуют определенные трудности при стратификации экзосом, продуцируемых трансформированными и другими неопухолевыми клетками, что, безусловно, требует дальнейших исследований.

#### **Использование [-2]proPSA для диагностики и прогноза рака предстательной железы**

Специфичность ПСА составляет только 12,8 %, если использовать пограничное значение для нормы 4 нг/мл [83], что приводит к большому количеству ложноположительных диагнозов и провоцирует до 75 % ненужных биопсий предстательной железы

[84]. Повышенные уровни ПСА приводят к последующей передозировке препаратами при лечении вялотекущего РПЖ более чем в 50 % случаев [85]. Ряд производных ПСА, включая свободный ПСА (fPSA), процент отношения свободного к общему ПСА (%fPSA), плотность ПСА (PSAD) и скорость ПСА (PSAV), в основном улучшили отбор пациентов для назначения биопсии предстательной железы. Однако пока мы имеем ограниченные возможности для определения наличия или агрессивности РПЖ до биопсии предстательной железы [86, 87]. Прилагаются значительные усилия для исследования новых серологических маркеров, которые могли бы преодолеть ограничения ПСА-теста.

Предшественник ПСА (proPSA) — одна из идентифицированных форм fPSA, который рассматривается как перспективный кандидатный сывороточный маркер РПЖ [88, 89]. В сыворотке существуют 4 различных изоформы proPSA, известные как [-2]proPSA, [-4]proPSA, [-5]proPSA и [-7]proPSA, с пролидерным пептидом из 7, 5, 4 или 2 аминокислот [90, 91]. Как разновидность свободного ПСА, [-2]proPSA дифференцированно экспрессирован в периферической зоне предстательной железы и, как показано, увеличивается в сыворотке крови у больных РПЖ. Индекс здоровья предстательной железы (PHI), 2 производных от p2PSA и %p2PSA, которые рассчитываются как  $[(p2PSA/fPSA) \times \sqrt{tPSA}]$  и  $[(p2PSA/fPSA) \times 100]$  соответственно, увеличиваются при РПЖ и могут отличить РПЖ от доброкачественных опухолей предстательной железы лучше, чем tPSA или fPSA [92, 93]. При 90 % чувствительности, специфичность PHI и %p2PSA составила 31 и 33 % по сравнению с 10 и 11 % для tPSA и %fPSA соответственно [86].

#### **Заключение**

Цель открытия биомаркеров состоит в том, чтобы идентифицировать определенные маркерные молекулы, в том числе и белки, которые в состоянии улучшить раннюю диагностику, прогноз и направление развития болезни и предсказать терапевтические результаты, облегчающие развитие новых терапевтических подходов. Некоторые наиболее перспективные биомаркеры обнаружены с помощью протеомных подходов и интенсивно валидируются. Так как РПЖ — гетерогенное заболевание со сложным микроокружением/патологией опухоли и широким диапазоном исходов болезни, усилия по открытию и валидации биомаркеров РПЖ для реальной клинической практики особенно заманчивы. Однако морфологическая гетерогенность самих образцов, индивидуальные особенности, зависящие от конкретного пациента, слабая чувствительность аналитических технологий для открытия биомаркеров и для их валидации делают идентификацию клинически полезных биомаркеров очень трудной.

Использование и внедрение высокопроизводительных, чувствительных и надежных протеомных технологий для исследования биомаркеров тканей и биожидкостей облегчает поиск более персонализированного подхода к диагностике болезни и ее лечению. Протеомика будет необходима для продвижения от открытия биомаркера до надежной валидации и применения результатов исследования в клиниче-

ских испытаниях. После детектирования агрессивный РПЖ может обрабатываться специфическим набором препаратов для таргетной терапии, разработанным на основе знания молекулярно-генетических параметров для каждого больного. Кроме того, опыт, полученный при применении этих технологий к РПЖ, может впоследствии использоваться при разработке терапии для других солидных форм рака.

## ЛИТЕРАТУРА

- Jemal A., Siegel R., Xu J., Ward E. Cancer statistics 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60(5): 277–300.
- Ferlay J., Shin H.R., Bray F. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893–917.
- Stamey T.A., Freiha F.S., McNeal J.E. et al. Localized prostate cancer. Relationship of tumor volume to clinical significance for treatment of prostate cancer. *Cancer* 1993;71(3 Suppl):933–8.
- Thompson I.M., Pauler D.K., Goodman P.J. et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level b or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004;350:2239–46.
- Kulasingam V., Diamandis E.P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5(10): 588–99.
- Paweletz C.P., Liotta L.A., Petricoin E.F. New technologies for biomarker analysis of prostate cancer progression: laser capture microdissection and tissue proteomics. *Urology* 2001;57(4 Suppl 1):160–3.
- Aldred S., Grant M.M., Griffiths H.R. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. *Clin Biochem* 2004;37(11):943–52.
- Zieske L.R. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot* 2006;57(7):1501–8.
- Craft N., Shostak Y., Carey M., Sawyers C.L. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* 1999;5(3):280–5.
- Zhu M.L., Kyprianou N. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:841–9.
- Zheng Y., Xu Y., Ye B. et al. Prostate carcinoma tissue proteomics for biomarker discovery. *Cancer* 2003;98(12):2576–82.
- Ummanni R., Mundt F., Pospisil H. et al. Identification of clinically relevant protein targets in prostate cancer with 2D-DIGE coupled mass spectrometry and systems biology network platform. *PLoS One* 2011;6(2):16833.
- Montironi R., Mazzucchelli R., Lopez-Beltran A. et al. Mechanisms of disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate. *Nat Clin Pract Urol* 2007;4(6): 321–32.
- Cheung P.K., Woolcock B., Adomat H. et al. Protein profiling of microdissected prostate tissue links growth differentiation factor 15 to prostate carcinogenesis. *Cancer Res* 2004;64(17):5929–33.
- Alaiya A.A., Al-Mohanna M., Aslam M. et al. Proteomics-based signature for human benign prostate hyperplasia and prostate adenocarcinoma. *Int J Oncol* 2011;38(4):1047–57.
- Liu A., Wei L., Gardner W.A. et al. Correlated alterations in prostate basal cell layer and basement membrane. *Int J Biol Sci* 2009;5(3):276–85.
- Diaz J.I., Cazares L.H., Corica A., John Semmes O. Selective capture of prostatic basal cells and secretory epithelial cells for proteomic and genomic analysis. *Urol Oncol* 2004;22(4):329–36.
- Khamis Z.I., Iczkowski K.A., Sahab Z.J., Sang Q.X. Protein profiling of isolated leukocytes, myofibroblasts, epithelial, basal, and endothelial cells from normal, hyperplastic, cancerous, and inflammatory human prostate tissues. *J Cancer* 2010;1:70–9.
- Gao X., Pang J., Li L.Y. et al. Expression profiling identifies new function of collapsin response mediator protein 4 as a metastasis-suppressor in prostate cancer. *Oncogene* 2010;29(32):4555–66.
- Pang J., Liu W.P., Liu X.P. et al. Profiling protein markers associated with lymph node metastasis in prostate cancer by DIGE-based proteomics analysis. *J Proteome Res* 2010;9(1):216–26.
- Skvortsov S., Schäfer G., Stasyk T. et al. Proteomics profiling of microdissected low- and high-grade prostate tumors identifies Lamin A as a discriminatory biomarker. *J Proteome Res* 2011;10(1):259–68.
- Gottlieb B., Beitel L.K., Wu J.H., Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum Mutat* 2004;23(6):527–33.
- Paliouras M., Zaman N., Lumbroso R. et al. Dynamic rewiring of the androgen receptor protein interaction network correlates with prostate cancer clinical outcomes. *Integr Biol (Camb)* 2011;3(10):1020–32.
- Sun C., Song C., Ma Z. et al. Periostin identified as a potential biomarker of prostate cancer by iTRAQ-proteomics analysis of prostate biopsy. *Proteome Sci* 2011;9:22.
- Sun C., Zhao X., Xu K. et al. Periostin: a promising target of therapeutical intervention for prostate cancer. *J Transl Med* 2011;9:99.
- Zhang S., Wang X., Osunkoya A.O. et al. EPLIN downregulation promotes epithelial–mesenchymal transition in prostate cancer cells and correlates with clinical lymph node metastasis. *Oncogene* 2011;30(50):4941–52.
- Quanico J., Franck J., Daully C. et al. Development of liquid microjunction extraction strategy for improving protein identification from tissue sections. *J Proteomics*. 2013;79:200–18.
- Geisler C., Gaisa N.T., Pfister D. et al. Identification and validation of potential new biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis using 2D-DIGE and MS. *Biomed Res Int* 2015;2015:454256.
- Lai Y.H., Cheng J., Cheng D. et al. SOX4 interacts with plakoglobin in a Wnt3a-dependent manner in prostate cancer cells. *BMC Cell Biol* 2011;12:50.
- Endoh K., Nishi M., Ishiguro M. et al. Identification of phosphorylated proteins involved in the oncogenesis of prostate cancer via Pin1-proteomic analysis. *Prostate* 2012;72(6):626–37.
- Glen A., Gan C.S., Hamdy F.C. et al. iTRAQ-facilitated proteomic analysis of human prostate cancer cells identifies proteins associated with progression. *J Proteome Res* 2008;7(3): 897–907.
- Garbis S.D., Tyritzis S.I., Roumeliotis T. et al. Search for potential markers for prostate cancer diagnosis, prognosis and treatment in clinical tissue specimens using amine-specific isobaric tagging (iTRAQ) with two-dimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 2008;7(8):3146–58.

33. Yocum A.K., Khan A.P., Zhao R., Chinnaiyan A.M. Development of selected reaction monitoring-MS methodology to measure peptide biomarkers in prostate cancer. *Proteomics* 2010;10(19):3506–14.
34. Roobol M.J., Haese A., Bjartell A. Tumour markers in prostate cancer III: biomarkers in urine. *Acta Oncol* 2011;50(Suppl 1):85–9.
35. Shariat S.F., Semjonow A., Lilja H. et al. Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers. *Acta Oncol* 2011;50(Suppl 1): 61–75.
36. Principe S., Kim Y., Fontana S. et al. Identification of prostate-enriched proteins by in-depth proteomic analyses of expressed prostatic secretions in urine. *J Proteome Res* 2012;11(4):2386–96.
37. Drake R.R., Elschenbroich S., Lopez-Perez O. et al. In-depth proteomic analyses of direct expressed prostatic secretions. *J Proteome Res* 2010;9(5):2109–16.
38. Teng P.N., Bateman N.W., Hood B.L., Conrads T.P. Advances in proximal fluid proteomics for disease biomarker discovery. *J Proteome Res* 2010;9(12):6091–100.
39. Rehman I., Azzouzi A.R., Catto J.W. et al. Proteomic analysis of voided urine after prostatic massage from patients with prostate cancer: a pilot study. *Urology* 2004;64(6):1238–43.
40. M'Koma A.E., Blum A.E., Norris J.L. et al. Detection of pre-neoplastic and neoplastic prostate disease by MALDI profiling of urine. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353(3): 829–34.
41. Florentinus A.K., Bowden P., Sardana G. et al. Identification and quantification of peptides and proteins secreted from prostate epithelial cells by unbiased liquid chromatography tandem mass spectrometry using goodness of fit and analysis of variance. *J Proteomics* 2012;75(4):1303–17.
42. Chen W.Z., Pang B., Yang B. et al. Differential proteome analysis of conditioned medium of BPH-1 and LNCaP cells. *Chin Med J (Engl)* 2011;124(22):3806–9.
43. Sardana G., Jung K., Stephan C., Diamandis E.P. Proteomic analysis of conditioned media from the PC3, LNCaP, and 22Rv1 prostate cancer cell lines: discovery and validation of candidate prostate cancer biomarkers. *J Proteome Res* 2008;7(8): 3329–38.
44. Ji L., Jayachandran G., Roth J.A. High throughput profiling of serum phosphoproteins/peptides using the SELDI-TOF-MS platform. *Methods Mol Biol* 2012;818:199–216.
45. Schwenk J.M., Igel U., Neiman M. et al. Toward next generation plasma profiling via heat-induced epitope retrieval and array-based assays. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(11):2497–507.
46. Hawkrigde A.M., Muddiman D.C. Mass spectrometry-based biomarker discovery: toward a global proteome index of individuality. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 2009;2:265–77.
47. Schiess R., Wölscheid B., Aebersold R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Mol Oncol* 2009;3(1): 33–44.
48. Saraon P., Musrap N., Cretu D. et al. Proteomic profiling of androgen-independent prostate cancer cell lines reveals a role for protein S during the development of high grade and castration-resistant prostate cancer. *J Biol Chem* 2012;287(41):34019–31.
49. Theodorescu D., Schiffer E., Bauer H.W. et al. Discovery and validation of urinary biomarkers for prostate cancer. *Proteomics Clin Appl* 2008;2(4):556–70.
50. Schiffer E., Bick C., Grizelj B. et al. Urinary proteome analysis for prostate cancer diagnosis: cost-effective application in routine clinical practice in Germany. *Int J Urol* 2012;19(2):118–25.
51. Miller J.C., Zhou H., Kwekel J. et al. Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics* 2003;3(1):56–63.
52. Marusyk A., Almendro V., Polyak K. Intratumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 2012;12(5):323–34.
53. Mueller C., Liotta L.A., Espina V. Reverse phase protein microarrays advance to use in clinical trials. *Mol Oncol* 2010;4(6):461–81.
54. Prior C., Guillen-Grima F., Robles J.E. et al. Use of a combination of biomarkers in serum and urine to improve detection of prostate cancer. *World J Urol* 2010;28(6): 681–6.
55. Mink S.R., Hodge A., Agus D.B. et al. Beta-2-microglobulin expression correlates with high-grade prostate cancer and specific defects in androgen signaling. *Prostate* 2010;70(11):1201–10.
56. Gross M., Top I., Laux I. et al. Beta-2-microglobulin is an androgen-regulated secreted protein elevated in serum of patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(7):1979–86.
57. Rehman I., Evans C.A., Glen A. et al. iTRAQ identification of candidate serum biomarkers associated with metastatic progression of human prostate cancer. *PLoS One* 2012;7(2):e30885.
58. Katafigiotis S.I., Tyriztis., Stravodimos K.G., Alamanis C. et al. Zinc  $\alpha$ -2-glycoprotein as a potential novel urine biomarker for the early diagnosis of prostate cancer. *BJU Int* 2012;110(11 Pt B):E688–93.
59. Hassan M.I., Kumar V., Kashav T. et al. Proteomic approach for purification of seminal plasma proteins involved in tumor proliferation. *J Sep Sci* 2007;30(12):1979–88.
60. Henshall S.M., Horvath L.G., Quinn D.I. et al. Zinc-alpha2-glycoprotein expression as a predictor of metastatic prostate cancer following radical prostatectomy. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(19):1420–4.
61. Shariat S.F., Shalev M., Menesses-Diaz A. et al. Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) (TGF-beta(1)) strongly predict progression in patients undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2001;19(11):2856–64.
62. Ivanovic V., Melman A., Davis-Joseph B. et al. Elevated plasma levels of TGF-beta 1 in patients with invasive prostate cancer. *Nat Med* 1995;1(4):282–4.
63. Shariat S.F., Kattan M.W., Traxel E. et al. Association of pre- and postoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) and interleukin 6 and its soluble receptor with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 2004;10(6):1992–9.
64. Adler H.L., McCurdy M.A., Kattan M.W. et al. Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *J Urol* 1999;161(1):182–7.
65. Michalaki V., Syrigos K., Charles P., Waxman J. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 2004;90(12):2312–6.
66. Nakashima J., Tachibana M., Horiguchi Y. et al. Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6(7):2702–6.
67. True L.D., Zhang H., Ye M. et al. CD90/THY1 is overexpressed in prostate cancer-associated fibroblasts and could serve as a cancer biomarker. *Mod Pathol* 2010;23(10):1346–56.
68. Morgan R., Boxall A., Bhatt A., Bailey M. et al. Engrailed-2 (EN2): a tumor specific urinary biomarker for the early diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(5):1090–8.
69. Li C., Zang T., Wrobel K. et al. Quantitative urinary proteomics using stable isotope labelling by peptide dimethylation in patients with prostate cancer. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(12):3393–404.
70. Josson S., Nomura T., Lin J.T. et al.  $\beta$ -2-microglobulin induces epithelial to mesenchymal transition and confers cancer lethality and bone metastasis in human cancer cells. *Cancer Res* 2011;71(7):2600–10.
71. Hassan M.I., Kumar V., Kashav T. et al. Proteomic approach for purification of seminal plasma proteins involved in tumor proliferation. *J Sep Sci* 2007;30(12):1979–88.
72. Byrne J.C., Downes M.R., O'Donoghue N. et al. 2D-DIGE as a strategy to identify serum markers for the progression of prostate cancer. *J Proteome Res* 2009;8(2):942–57.
73. Kälin M., Cima I., Schiess R. et al. Novel prognostic markers in the serum of patients with castration-resistant prostate cancer derived from quantitative analysis of the pten conditional knockout mouse proteome. *Eur Urol* 2011;60(6):1235–43.
74. Cima I., Schiess R., Wild P. et al. Cancer genetics-guided discovery of serum biomarker signatures for diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(8):3342–7.
75. Halabi S., Small E.J., Kantoff P.W. et al. Prognostic model for predicting survival

- in men with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(7):1232–7.
76. Valadi H., Ekström K., Bossios A. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9(6):654–9.
77. Guescini M., Leo G., Genedani S. et al. Microvesicle and tunneling nanotube mediated intercellular transfer of g-protein coupled receptors in cell cultures. *Exp Cell Res* 2012;318(5):603–13.
78. Logozzi M., De Milito A., Lugini L. et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009;4(4):e5219.
79. Silva J., Garcia V., Rodriguez M. et al. Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51(4):409–18.
80. Tavoosidana G., Ronquist G., Darmanis S. et al. Multiple recognition assay reveals prostasomes as promising plasma biomarkers for prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(21):8809–14.
81. Duijvesz D., Luidert T., Bangma C.H., Jenster G. Exosomes as biomarker treasure chests for prostate cancer. *Eur Urol* 2011;59(5):823–31.
82. Sandvig K., Llorente A. Proteomic analysis of microvesicles released by the human prostate cancer cell line PC-3. *Mol Cell Proteomics* 2012;11(7):M111.012914.
83. Filella X., Foj L., Augé J.M. et al. Clinical utility of % p2PSA and prostate health index in the detection of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med* 2014;52(9):1347–55.
84. Postma R, Schröder FH. Screening for prostate cancer. *Eur J Cancer* 2005;41(6):825–33.
85. Draisma G., Etzioni R., Tsodikov A. et al. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(6):374–83.
86. Jansen F.H., van Schaik R.H., Kurstjens J. Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA in combination with total PSA and free PSA improves diagnostic accuracy in prostate cancer detection. *Eur Urol* 2010;57(6):921–7.
87. Guazzoni G., Nava L., Lazzeri M. et al. Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA significantly improves the prediction of prostate cancer at initial extended prostate biopsies in patients with total PSA between 2.0 and 10 ng/ml: results of a prospective study in a clinical setting. *Eur Urol* 2011;60(2):214–22.
88. Mikolajczyk S.D., Millar L.S., Wang T.J. et al. A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Cancer Res* 2000;60(3):756–9.
89. Catalona W.J., Bartsch G., Rittenhouse H.G. et al. Serum pro-prostate specific antigen preferentially detects aggressive prostate cancers in men with 2 to 4 ng/ml prostate specific antigen. *J Urol* 2004;171(6 Pt 1):2239–44.
90. Jansen F.H., Roobol M., Jenster G. et al. Screening for prostate cancer in 2008 II: the importance of molecular subforms of prostate-specific antigen and tissue kallikreins. *Eur Urol* 2009;55(3):563–74.
91. Mikolajczyk S.D., Rittenhouse H.G. Pro PSA: a more cancer specific form of prostate specific antigen for the early detection of prostate cancer. *Keio J Med* 2003;52(2):86–91.
92. Lazzeri M., Briganti A., Scattoni V. et al. Serum index test % [-2]proPSA and Prostate Health Index are more accurate than prostate specific antigen and % fPSA in predicting a positive repeat prostate biopsy. *J Urol* 2012;188(4):1137–43.
93. Scattoni V., Lazzeri M., Lughezzani G. et al. Head-to-head comparison of prostate health index and urinary PCA3 for predicting cancer at initial or repeat biopsy. *J Urol* 2013;190(2):496–501.