

Uloga proteomike u otkrivanju novih protutumorskih lijekova

The role of proteomics in the discovery of new anticancer drugs

Sandra Kraljević Pavelić^{1,2}, Nina Šaban^{1*}

SAŽETAK. S obzirom na to da je za potpuno razumijevanje bioloških sustava nužna i molekularna karakterizacija proteoma, proteomika je disciplina koja je nastala sa svrhom da komplementira istraživanje genoma. Iako je proteomika relativno nova biološka znanstvena disciplina, ona ima velik potencijal u farmaceutskoj industriji. Različite tehnike proteomike stoga se koriste u svrhu razjašnjavanja molekularnih mehanizama koji upravljaju staničnim procesima, za karakterizaciju složenih proteinskih mreža u stanici, za otkrivanje proteina biomarkera te, naposljetku, za identifikaciju novih meta za razvoj novih lijekova. Upravo u razvoju protutumorskih lijekova proteomika može omogućiti identifikaciju proteina uključenih u patogenezu raka, a rekonstrukcija signalnih putova može olakšati otkrivanje novih meta na koje bi novi lijek djelovao, te omogućiti uvid u mehanizme djelovanja tih lijekova, kao i njihovu toksičnost.

Ključne riječi: mete za lijekove, proteomika, protutumorski lijekovi

ABSTRACT. The field of proteomics has been thought as complementary to the genomic research since proteins are the executive molecules and players in biological systems. In particular, protein functionality is highly deregulated in cancer. Although proteomics is a relatively new research area it holds great potential in pharmaceutical industry due to its ability to quantitatively measure protein expression and identify proteins by mass spectrometry analyses as well as its ability to map the protein-protein interactions. As such, the proteomics technological platform has been widely applied to basic cancer research, cancer therapy and most importantly in the drug discovery process. Proteomics allows identification of proteins involved in cancer pathogenesis and deregulated signalling pathways that facilitates the discovery of new drug targets, or it might be used as well to precisely elucidate the drug mechanisms of action and toxicology.

Key words: anticancer drugs, cancer, proteomics

¹Institut "Ruđer Bošković",
Zavod za molekularnu medicinu,
Laboratorij za sistemsku biomedicinu,
Zagreb

²Odjel za biotehnologiju,
Sveučilište u Rijeci

Primljeno: 25. 10. 2008.

Prihvaćeno: 29. 1. 2009.

Adresa za dopisivanje:
*** Nina Šaban, dipl. ing.,**
Institut "Ruđer Bošković",
Zavod za molekularnu medicinu,
Laboratorij za sistemsku biomedicinu,
Bijenička cesta 54,
10 000 Zagreb
e-mail: nsaban@irb.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Unatoč velikom napretku tehnologije i novim spoznajama u području molekularne medicine, rak i dalje ostaje vodeći uzrok smrtnosti u razvijenim zemljama. Tzv. *-omics* metode, u koje ubrajamo genomiku i proteomiku, trebale bi ubrzati procese otkrivanja novih lijekova. Ovakvi pristupi u istraživanju bolesti zasnivaju se na sveukupnoj (globalnoj) analizi cijelog genoma (genomika) ili proteoma (proteomika) u svrhu razjašnjavanja biološke osnove bolesti, pa tako i raka. U posljednje se vrijeme, međutim, puno pažnje posvećuje i primjeni metoda proteomike u identifikaciji proteinskih meta (biljega), bilo kao važnih biljega za ranu, presimptomatsku dijagnostiku i prognozu raka, bilo kao biljega za terapijsku intervenciju. Uz to, proteomika ima velik potencijal u procesu otkrivanja i dizajniranja novih lijekova jer može identificirati regulatorne proteine ili potencijalne mete za djelovanje nekog lijeka. Otkrivanje novog i efikasnog lijeka, naime, dugotrajan je i zahtjevan proces koji uključuje identifikaciju mete, sintezu potencijalnih lijekova, kliničku selekciju lijekova kandidata, te potom predklinička i klinička ispitivanja¹. Najnoviji podaci govore kako cijena uvođenja novog lijeka na tržište iznosi oko 800 milijuna američkih dolara, a vremenski traje od 10 do 12 godina¹, stoga nije neobično što se javila potreba za novim znanstvenim pristupom uz pomoć kojeg bi se, u što je moguće kraćem vremenu i što učinkovitije, ubrzao proces otkrivanja novih lijekova. Naime, godišnje se u SAD-u odobri najviše 20 – 30 novih lijekova, a na sličnu situaciju naići ćemo i u Europi².

Usprkos vrijednim podacima koji su posljednjeg desetljeća dobiveni uz pomoć mikročip analiza, molekularni procesi u bolesnim tkivima ne mogu se objasniti samo uz pomoć razumijevanja gena i njihove ekspresije, već su ti procesi prije svega vezani za genske produkte – proteine. Osobito je stoga važan podatak o tome kako količina proteina ne mora nužno korelirati s količinom molekula mRNA. Nadalje, poznato je kako su upravo signalni putovi u kojima sudjeluju proteini poremećeni u stanicama raka, stoga je logičan zaključak kako se analizom proteina u takvim bolesnim stanicama mogu dobiti odgovori o patogenezi

raka te otkriti mete za dizajniranje novih lijekova. No, analiza sveukupnih proteina (proteoma) u stanici složen je proces upravo zbog činjenice da je funkcija proteina definirana nizom različitih faktora, kao što su to razina ekspresije, posttranslacijske modifikacije, interakcije s drugim proteinima ili DNA/RNA molekulama te mehanizmi aktivacije i represije². Nadalje, ekspresija proteina u biološkom sustavu mijenja se sa stadijem razvoja, djelovanjem čimbenika okoliša, progresijom bolesti, a sam broj proteina u proteomu izuzetno je velik. Smatra se kako u eukariotskoj stanici može istovremeno biti prisutno do 50.000 proteina³, a raspon njihove ekspresije (povećanje/smanjenje) iznosi sedam ili osam redova veličine⁴. Upravo takva složena priroda i varijabilnost statusa proteina nameće potrebu za osjetljivom i selektivnom tehnologijom koja će moći istovremeno analizirati tisuće nepoznatih proteina u istraživanom sustavu. Danas je u molekularnoj medicini dostupno nekoliko suvremenih proteomskih tehnika koje omogućuju istraživanje ekspresije proteina, analizu proteinskih modifikacija, analizu stanične lokalizacije i praćenje proteinskih interakcija⁵. Proteomske metode imaju i neke praktične nedostatke koji otežavaju njezino korištenje u rutinskoj kliničkoj i dijagnostičkoj praksi, ali jednako tako i u istraživačkim laboratorijima. Proteomika je, naime, izuzetno komplicirana i vremenski zahtjevana tehnologija koja ponekad, usprkos tome što se u analizi koriste baze podataka i kompleksni računalni programi, ne daje željeni odgovor, odnosno ne pronalazi poveznicu između gena, proteina i bolesnog stanja. Daljnja poboljšanja proteomskih metoda nužna su i u području detekcije i karakterizacije proteina, kako u području analize niskomolekularnih proteina i peptida (u području ispod 500 Da), tako i u području analize izuzetno velikih proteinskih struktura (u području iznad 120 kDa), te u unapređenju kvantifikacije. Vrlo je vjerojatno, međutim, kako će ubrzani tehnološki razvoj i automatizacija omogućiti implementaciju proteomike u istraživanje i razvoj novih lijekova⁶. Trenutno su metode proteomike izuzetno važne u istraživanjima molekularnih mehanizama koji uzrokuju rak te će samim time indirektno ubrzati i olakšati otkriće novih protutumorskih lijekova.

PRINCIPI I METODOLOGIJE PROTEOMIKE U ISTRAŽIVANJU RAKA

Glavni metodološki pristupi u proteomskom istraživanju su tzv. klasični pristup temeljen na analizi gelova, te tzv. "shotgun" pristup⁵. U klasičnom se pristupu koriste imobilizirani pH gradijenti u kojima se proteini razdvajaju na temelju njihovih različitih izoelektričnih točaka. Potom slijedi razdvajanje u drugoj dimenziji prema njihovoj molekularnoj masi uz pomoć 2-DE gel-elektroforeze (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Stotine točaka dobivenih na gelu predstavljaju različite proteine, različite izoforme istog proteina ili njegovu posttranslacijsku modifikaciju⁵. Nakon razdvajanja proteina na gelovima slijedi identifikacija razdvojenih i kvantificiranih proteina na masenom spektrometru. Ovakav je pristup izuzetno koristan za utvrđivanje ekspresije i vrste proteina u bolesnom u odnosu na zdravo tkivo. Analiza MALDI-TOF (engl. *matrix-assisted laser desorption ionization time of flight*) metoda je identifikacije proteina dobivenih iz gela koja se temelji na razgradnji svakog proteina uz pomoć tripsina te njihovoj ionizaciji, nakon čega se dobiveni spektri masa fragmenata uspoređuju sa spektrima pohranjenim u bazama podataka, te se na taj način ustanovljava o kojem je proteinu riječ⁵. Kod analize MALDI dobiveni se fragmenti razdvajaju na temelju omjera mase i naboja (engl. *mass-to-charge, m/z*). Za razliku od analize MALDI, kod analize ESI-MS/MS (engl. *electrospray ionization tandem mass spectrometry*) uzorak se ionizira u obliku finog spreja sitnih kapljica. Ulaskom u vakuum voda isparava, a molekule u otopini preuzimaju naboj. Za razliku od analize MALDI, molekularni ioni su kod analize ESI-MS/MS uglavnom višestruko nabijeni. Osim toga, budući da se analizom ESI-MS/MS mogu analizirati uzorci u tekućem stanju, ova se metoda često povezuje s tekućom kromatografijom (engl. *high performance liquid chromatography, HPLC*). Upravo je takav kombinirani pristup analize uz pomoć HPLC i ESI-MS/MS osnova tzv. "shotgun" pristupa koji uključuje izolaciju stotina proteina iz iznimno složenih smjesa, dobivenih proteolitičkom razgradnjom proteina (npr. u staničnim lizatima ili tjelesnim tekućinama), nakon čega slijedi sekvenciranje pomoću MS. Ovakva

metoda, zvana LC-MS/MS (engl. *liquid chromatography MS/MS*) bolja je od klasičnog proteomskog pristupa utoliko što omogućuje odvajanje i identifikaciju analita u niskom femtomolarnom opsegu, stoga je vrlo vjerojatno kako će velik dio istraživanja za otkrivanju biomarkera raka biti proveden na ovaj način⁵. Nadalje, MudPIT (engl. *multidimensional protein identification technology*), ICAT (engl. *isotope-coded affinity tags*) i ICPL (engl. *isotope-coded protein labels*) predstavljaju

Molekularni procesi koji se odvijaju u bolesnim tkivima ne mogu se objasniti samo uz pomoć razumijevanja statusa gena i statusa njihove ekspresije, nego su ti procesi prije svega vezani za genske produkte, proteine. Upravo se stoga analizom proteina u bolesnim stanicama mogu dobiti odgovori o procesima uključenim u patogenezu raka te eventualno otkriti mete za dizajniranje novih lijekova.

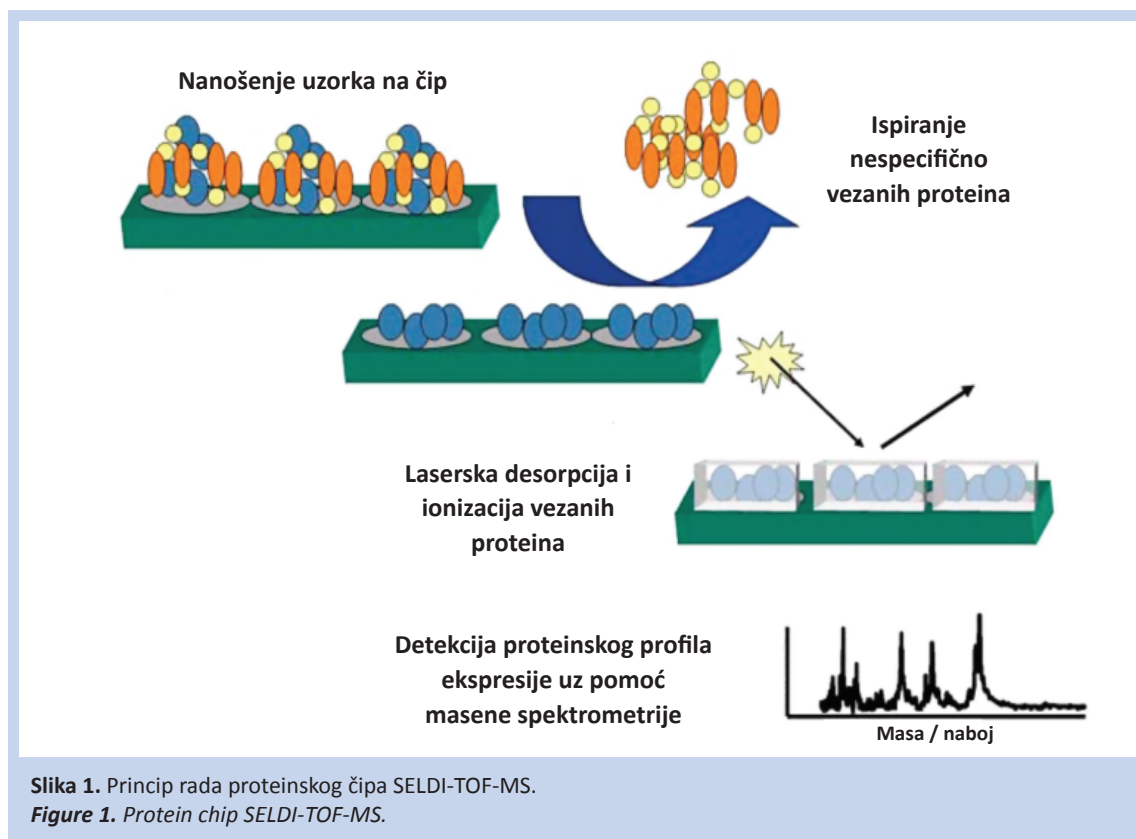
također važne "shotgun" tehnike. MudPIT je tehnika koja je tek nedavno zauzela važno mjesto u kliničkoj i dijagnostičkoj proteomici, a koristi se u svrhu identifikacije proteina iz složenih smjesa. Ova se metoda temelji na kromatografskom razdvajanju proteina u dvije dimenzije tako što se proteini najprije razdvoje na temelju naboja u koloni SCX (engl. *strong cation exchange column*), nakon čega slijedi reverzna kromatografija, a uz pomoć koje se peptidi razdvajaju na temelju njihove lipofilnosti. Prednost ove metode je u njejoj kompatibilnosti s ESI⁵. Metode ICAT i ICPL temelje se na obilježavanju proteina s lakim i teškim izotopima u dva uzorka koja želimo analizirati. Potom se uz pomoć masene spektrometrije određuje relativna količina obilježenih molekula, na temelju mase korištenih stabilnih izotopa, poput izotopa ugljika ¹³C i ¹²C. Na ovaj se način može odrediti kvantitativna promjena u proteinima stanice, odnosno tijela, inducirana određenom bolešću ili terapijom⁵.

U istraživanju raka, gdje su proteini glavni uzročnici bolesti, neprestano raste potreba istraživanja i posttranslacijskih modifikacija (npr. fosforilacija, glikolizacija i ubikvitinacija), jer upravo takve kemijske modifikacije proteina često određuju pro-

teinsku aktivnost i stabilnost. U patogenezi raka, primjerice, događa se fosforilacija aminokiseline tirozin u nekim regulatornim proteinima, što je posljedica mutacije ili pak prekomjerne ekspresije signalnih proteina⁷. Tradicionalni pristup istraživanja posttranslacijskih modifikacija uključivao je pročišćavanje takvog proteina, analizu peptida i identifikaciju fosforiliranih peptidnih regija metodom određivanja N-terminalne sekvence. Proteklih godina se, međutim, sve više u tu svrhu koristi masena spektrometrija kojom se peptidi koji sadrže fosfoprotein najprije izoliraju iz staničnih ekstrakata pomoću protutijela specifičnih za fosfotirozin, nakon čega slijedi identifikacija uz pomoć MS/MS⁸. Istraživanje takvih modifikacija u složenim proteinskim smjesama proteklih je godina usavršeno zahvaljujući metodi kromatografije s kationskim izmjenjivačima, uz pomoć koje se specifično veže fosfatna skupina fosforiliranih proteina. Tako izdvojeni proteini mogu se potom identificirati uz pomoć različitih tehnika MS⁹.

Posebno zanimljiva metoda u otkrivanju markera u različitim tumorima, koja će zasigurno pridonijeti otkriću novih protutumorskih lijekova, metoda je SELDI-TOF-MS (engl. *surface-enhanced laser*

desorption ionization – TOF-MS)¹⁰. Ovaj se pristup temelji na uporabi različitih vrsta proteinskih čipova, u ovisnosti o tome koju frakciju proteina želimo analizirati, stoga se najčešće koriste kemijski čipovi (anionske, kationske, hidrofobne, hidrofilne, metalni ioni) i biokemijski čipovi (imobilizirano protutijelo, receptor, DNA, enzim) na kojima se "hvataju", odnosno zadržavaju željeni proteini iz smjese. Nakon što se proteini iz smjese vežu na površinu čipa, na njih se usmjerava laser pri čemu se proteini ili proteinski fragmenti prenose u plinovitu fazu i analiziraju u cijevima masenog spektrometra TOF (slika 1). Ova metoda je pripomogla u otkrivanju brojnih dijagnostičkih markera za raka te karakterizaciji velikog broja fosforiliranih i glikoliziranih proteina i transkripcijskih faktora¹¹. Iako sve do sada nabrojene tehnike omogućavaju razdvajanje, identifikaciju i karakterizaciju proteina iz složenih bioloških smjesa, one nam ne mogu pružiti ključne informacije o biološkim funkcijama proteina i njihovim udjelima u promijenjenim signalnim putovima u zloćudnim tumorima. Za takvu analizu mogu se, međutim, koristiti proteinski čipovi koji omogućavaju simultanu analizu različitih signalnih proteina i njihovog aktivacij-



skog stanja¹². Korištenjem ovakvog pristupa mogu se dobiti informacije o vrsti proteina, ekspresiji, proteinskim interakcijama, vezivanju liganada na određene receptore i enzimskoj aktivnosti. Razlikujemo dvije vrste proteinskih čipova, analitičke i funkcionalne⁵. Analitički čip sadrži protutijela, antigene ili druge proteine uz pomoć kojih se određuje količina obilježenih proteina u uzorku. Funkcionalni čip pak sadrži veliki broj staničnih proteina ili proteina tkiva, te se na taj način ispituju različite biokemijske aktivnosti, primjerice interakcije protein – protein, protein – lipid, protein – nukleinska kiselina i interakcije enzim – supstrat. Ukoliko se na takve čipove nakon vezanja proteina iz smjese nanose i protutijela, vrlo je lako detektirati aktivirane proteine i utvrditi status aktivacije čitavih signalnih putova tako što se, primjerice, fosfospecifično protutijelo veže na fosforilirani protein koji je u interakciji s peptidom na čipu.

PROTEOMIKA U LIJEČENJU RAKA

Istraživanje razine aktivacije proteinskih sljedova pod utjecajem bolesnog stanja može rasvijetliti poremećaj u proteinskom slijedu koji je povezan s određenim bolesnim stanjem. Klinička proteomika stoga ima značaj u ranoj detekciji bolesti, u otkrivanju novih lijekova te skraćanju vremena razvoja lijeka, a utječe i na tijek kliničkih ispitivanja. Njezin cilj je uvođenje proteomskog oblikovanja u standardnu kliničku praksu, te upotreba proteomske tehnologije u kliničkoj dijagnostici. Proteomski profili mogu služiti kao dijagnostički biljezi, te mogu predviđati ishode tretmana kod mnogih bolesti, kao npr. nekih vrsta raka. Dosad je, međutim, opisan samo mali postotak proteina s važnom ulogom u staničnim procesima, čije promjene mogu dovesti do pojave malignih tumora¹³. Trenutno se proteomske tehnike u istraživanju bolesti raka sve više koriste za detekciju ranih stadija, otkrivanje novih meta i biomarkera te za prilagođavanje terapije pojedinom bolesniku i stanju njegovog organizma. Dok je postojeća terapija oboljelih od raka usmjerena na jednu molekularnu metu, u budućnosti možemo kao metu zamisliti čitav set proteina u signalnom putu¹⁴. Proteomika se, osim u istraživanju raka, danas koristi za razumijevanje niza bolesti kao što su astma¹⁵⁻¹⁷, Alzheimerova bo-

lest¹⁸, dermatološki poremećaji¹⁸, reumatoidni artritis¹⁹ i cistična fibroza²⁰.

Prema podjeli koju su predložili Blakstock i Weir²¹ farmaceutska proteomika obuhvaća područje istraživanja proteinskih interakcija (funkcionalna proteomika) i istraživanje ekspresije proteina (ekspresijska proteomika), pri čemu svaka ima zasebnu ulogu u sveukupnom procesu otkrivanja lijekova. Funkcionalna proteomika uključuje utvrđivanje funkcije i smještaja proteina unutar stanice te analizu interakcija između proteina i između proteina i

Uz pomoć proteomike moguće je razjasniti status signalnih putova uključenih u patogenezu raka i identificirati potencijalne mete za lijekove. Unatoč ovoj činjenici, još uvijek nije odobren niti jedan protutumorski lijek za kliničku uporabu koji bi bio otkriven uz pomoć metoda proteomike. Ipak, proteomske analize dovele su do identifikacije različitih biljega tumora, što je unaprijedilo dijagnostiku mnogih vrsta zloćudnih tumora.

molekula DNA i RNA²². Ovakav pristup omogućava sistematsku karakterizaciju proteina u smjesi kao i analizu staničnih putova i interakcija, koji mogu biti važni u nastanku raka ili su pak važni u mehanizmu djelovanja antitumorskog lijeka²³. Ovakve proteomske studije mogu ubrzati klinička istraživanja i povećati njihovu učinkovitost. Ekspresijska proteomika istražuje globalne promjene u profilu ekspresije proteina nastale kao odgovor na unutarnji ili vanjski podražaj (lijek, uvjeti okoliša). Usporedbom proteina različito eksprimiranih u uzorcima tkiva ili tjelesnih tekućina zdravih u odnosu na bolesne pojedince (serum, plazma, cerebrospinalna tekućina, amnionska tekućina itd.), moguće je otkriti stanične procese i biokemijske putove proteina koji su odgovorni ili pridonose razvoju bolesti. Upravo je ovo princip uz pomoć kojeg se mogu identificirati proteini koji bi služili kao biomarkeri bolesti i potencijalne mete za lijek²⁴. Tako su, primjerice, proteomske metode korištene za sistematsku analizu proteina u uzorcima urina bolesnika s karcinomom mjehura, što je rezultiralo identifikacijom proteina psorijacina kao ranog biljega te bolesti²⁵. Osim što se mogu koristiti u dijagnostičke svrhe, proteinski biljezi mogu biti korisni u razvoju individualizirane medicine. Nadalje, niz proteomskih istraživanja

tkiva različitih organa zahvaćenih tumorom (jetra, prostata, dojka, debelo crijevo, gušterača itd.) dovela su do otkrića proteina koji specifično sudjeluju u progresiji raka (primjerice enzima proteaza), koji predstavljaju potencijalne mete za djelovanje protutumorskih lijekova²⁵. Otkriće pametnih, protutumorskih lijekova trebalo bi biti olakšano proteomskim profiliranjem različitih vrsta tumorskih tkiva. Osim što biljezi povećavaju efikasnost i kvalitetu otkrivanja novih lijekova, oni su važni i u evaluaciji sigurnosti i efikasnosti novih lijekova.

Rezistencija na kemoterapiju predstavlja poseban problem u liječenju raka, a može biti stečena nakon tretmana lijekom ili možemo govoriti o prirodno rezistentnim stanicama koje neće reagirati na tretman lijekom²⁷. Proteomska analiza na lijek osjetljivih stanica u usporedbi s rezistentnim stanicama omogućuje identifikaciju specifične skupine biljega za rezistenciju¹. Na taj način proteomika može značajno pridonijeti razvoju novih modula liječenja i boljeg odgovora bolesnika na antitumorski lijek.

BUDUĆNOST PROTEOMSKOG PRISTUPA U LIJEČENJU RAKA

Iako proteomika ima velik potencijal u razjašnjavanju signalnih putova uključenih u patogenezu raka pa tako i u identifikaciji potencijalnih meta, još uvijek nije odobren niti jedan antitumorski lijek za kliničku uporabu koji bi bio otkriven uz pomoć proteomike. Ipak, proteomske analize su dovele do identifikacije različitih biljega tumora, što se koristi u dijagnostici mnogih vrsta zloćudnih tumora. S obzirom na to da samo ovakav globalan pristup može dati vrijedne informacije o statusu i aktivnosti proteina u bolesnim stanjima, farmaceutska industrija danas polaže velike nade u proteomska istraživanja. Metode kao što su masena spektrometrija, analiza proteinskih interakcija, kao i analiza ekspresije proteina, uvelike nam mogu pomoći u rasvjetljavanju mehanizama odgovornih za nastanak raka, rezistenciju na lijek ili pak razjasniti molekularne mehanizme uključene u odgovor tumorskih stanica na lijek. Zaključno, možemo ustvrditi kako proteomika ima važnu ulogu u razvoju lijekova, osobito stoga što se uz pomoć proteomike mogu identificirati nove potencijalne mete za djelovanje lijekova, rasvijetliti me-

hanizmi djelovanja postojećih i novih lijekova te utvrditi njihova toksičnost ili pojava rezistencije.

ZAHVALA

Ovaj rad nastao je uz financijsku potporu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa 098-0982464-2393 i projekta Fonda za zapošljavanje i razvoj RH 14V09809.

LITERATURA

1. Kraljević S, Sedić M, Scott M, Gehrig P, Schlapbach R, Pavelić K. Casting light on molecular events underlying anti-cancer drug treatment: What can be seen from the proteomic point of view? *Cancer Treat Rev* 2006;32:619-29.
2. Kraljević Pavelić S, Šaban N. Evolving '-omics' technologies in the drug development process. *Expert Opin Drug Disc* 2007;2:431-6.
3. Hanash SM. Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: current status. *Electrophoresis* 2000;21:1202-9.
4. Beranova-Giorgianni S. Proteome analysis by twodimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *Trends Analyt Chem* 2003;22: 273-81.
5. Fontana S, De Leo G, Sedić M, Kraljević Pavelić S, Alessandro R. Proteomics in antitumor research. *DDT: technologies* 2006;3:441-9.
6. Verrills NM. Clinical Proteomics: Present and Future Prospects. *Clin Biochem Rev* 2006;27:99-116.
7. Lim YP. Mining the tumor phosphoproteome for cancer markers. *Clin Cancer Res* 2005;11:3163-9.
8. Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, Spek EJ et al. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol* 2005;23:94-101.
9. Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villen J, Li J et al. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:12130-5.
10. Rubin RB, Merchant M. A rapid protein profiling system that speeds study of cancer and other diseases. *Am Clin Lab* 2000;19:28-9.
11. Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS Approach to Proteomics: Protein Profiling and Biomarker Identification. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:587-92.
12. Liotta LA, Espina V, Mehta AI, Calvert V, Rosenblatt K, Geho D et al. Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications. *Cancer Cell* 2003;3:317-25.
13. Pastwa E, Somiari SB, Czyz M, Somiari RI. Proteomics in human cancer research. *Proteomics Clin App* 2007; 1:4-17.
14. Petricoin EF, Zoon KC, Kohn EC, Barrett JC, Liotta LA. Clinical proteomics: Translating benchside promise into bedside reality. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:683-95
15. Chung YW, Oh HY, Kim JY, Kim JH, Kim IY. Allergen-induced proteolytic cleavage of annexin-1 and activation of cytosolic phospholipase A₂ in the lungs of a mouse model of asthma. *Proteomics* 2004;4:3328-34.

16. Yeo S, Roh GS, Kim DH, Lee JM, Seo SW, Cho JW et al. Quantitative profiling of plasma peptides in asthmatic mice using liquid chromatography and mass spectrometry. *Proteomics* 2004;4:3308-17.
17. Roh GS, Shin Y, Seo SW, Yoon BR, Yeo S, Park SJ et al. Proteome analysis of differential protein expression in allergen-induced asthmatic mice lung after dexamethasone treatment. *Proteomics* 2004;4:3318-27.
18. Shin SJ, Lee SE, Boo JH, Kim M, Yoon YD, Kim SI et al. Profiling proteins related to amyloid deposited brain of Tg2576 mice. *Proteomics* 2004;4:3359-68.
19. Ali M, Manolios N. Proteomics in rheumatology: a new direction for old diseases. *Semin. Arthritis Rheum* 2005;35:67-76.
20. Sloane AJ, Lindner RA, Prasad SS, Sebastian LT, Pedersen SK, Robinson M et al. Proteomic analysis of sputum from adults and children with cystic fibrosis and from control subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1416-26.
21. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999;17:121-7.
22. Wu W, Hu W, Kavanagh JJ. Proteomics in cancer research. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12:409-23.
23. Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W, Pappin DJ. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* 2006;356:1749-56.
24. He QY, Chiu JF. Proteomics in biomarker discovery and drug development. *J Cell Biochem* 2003;89:868-86.
25. Jain KK. Applications of proteomics in oncology. *Pharmacogenomics* 2000;1:385-93.
26. Gottesman MM. Mechanism of cancer drug resistance. *Ann Rev Med* 2002;53:615-27.
27. Kraljevic S, Pavelic K. Navigare necessere est – Improved navigation would help to solve two crucial problems in modern drug therapy: toxicity and precise delivery. *EMBO Rep* 2005;6:695-700.