

Strona czasopisma: <http://analit.agh.edu.pl/>

# Identyfikacja epitopów glikanowych na powierzchni białek

## *Identification of glycanic epitopes on the surface of proteins*

Kinga Mudlaff<sup>[a]</sup>, Anna Drabik<sup>[a]</sup>

[a] AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Polska

**ABSTRAKT:** Najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet jest rak piersi, w przypadku którego etiologia w większości przypadków jest nieznaną. Celem pracy była identyfikacja epitopów glikanowych na powierzchni białek ognisk tumorowych. Do badań prowadzono hodowlę komórek linii MCF7. Po zakończeniu hodowli komórki inkubowano z biotynylowanymi aptamerami o stężeniu 25nM: A33, A26 oraz A33sc, stanowiącą próbę kontrolną. Następnie komórki traktowano nanocząsteczkami magnetycznymi opłaszczonymi białkiem streptawidyną SAV-MB. Stężenie protein oznaczono spektrofotometrycznie metodą Bradforda. Dalszy rozdział białek przeprowadzono w warunkach denaturujących SDS – PAGE na żelach wybarwianych techniką Pro-Q 488 Emerald Glycoprotein Gel. Peptydy i glikopeptydy zanalizowano przy użyciu systemu kapilarnej chromatografii cieczerwowej w układzie odwróconych faz RP oraz tandemowej spektrometrii mas - nanoLC-MS/MS. Zebrane widma poddano analizie przy użyciu oprogramowania Data Analysis w oparciu o bazy danych UniProt/Swiss-Prot oraz Panther. Zidentyfikowano łącznie 201 białek. Wyniki analiz MS/MS pozwoliły na wyróżnienie dwóch peptydów, które ze względu na pełnione funkcje oraz zachodzące interakcje wydają się być ciekawym i obiecującym obiektem badań w diagnostyce i terapii nowotworowej. Do oznaczonych związków należą: KIF 13B (Kinesin-like protein) i HS90 B (Heat Shock protein).

**ABSTRACT:** The most commonly occurring tumor in women is breast cancer, which etiology is in most cases unknown. The aim of this work was identification of glycanic epitopes on the surface of tumor centers. For the research purposes, the cell culture of MCF lines was carried out. After the culture the cells were incubated with biotinylated aptamers in concentrations of 25 nM: A33, A26 and A33sc, which was the control sample. Afterwards, the cells were treated with magnetic nanoparticles coated with the protein streptavidin SAV-MB. The protein concentration was indentified spectrophotometrically using the Bradford method. The further protein separation was carried out in SDS-PAGE denaturing conditions on gels stained with the Pro-Q 488 Emerald Glycoprotein Gel. Peptides and glycopeptides were analyzed with the use of capillary liquid chromatography system in reversed phase (RP) and nanoLC-MS/MS tandem mass spectrometry. The assembled spectra underwent an analysis in the Data Analysis software using the UniProt/Swiss-Prot and Panther data. The total of 201 proteins was indentified. The MS/MS analyses results allowed to distinguish two peptides, which – basing on their functions and occurring interactions – seem to be an interesting and promising research subject in cancer diagnostics and treatment. The indentified compounds include KIF 13B (Kinesin-like protein) and HS90 B (Heat Shock Protein).

**Słowa kluczowe:** rak piersi, aptamer, biomarkery

## 1. Wprowadzenie

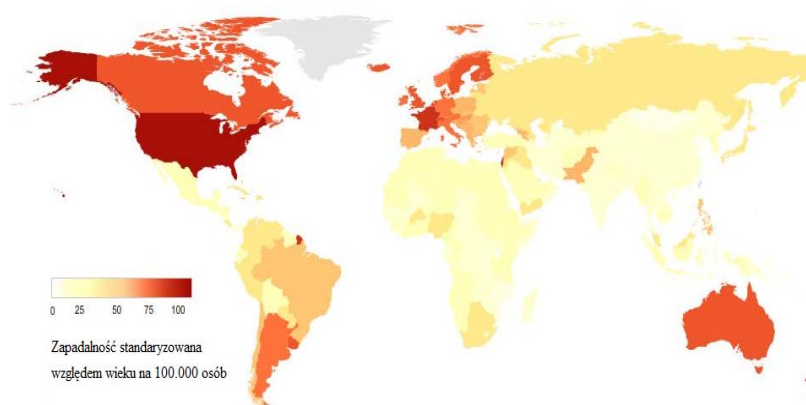
### 1.1 Problem diagnostyki nowotworowej

W Europie nowotwory złośliwe zajmują obecnie drugie miejsce, tuż za chorobami układu krążenia, pod względem częstości przyczyn zgonów. Istnieje wiele typów i podtypów nowotworów, które łącznie stanowią duży odsetek guzów złośliwych rozpoznawanych rokrocznie [1].

W Polsce na choroby nowotworowe zapada corocznie blisko 160 tysięcy osób, natomiast 92,5 tysiąca pacjentów umiera (dane prognozowane na rok 2014). W krajach rozwijających się statystyki przedstawiają się jeszcze bardziej dramatycznie, a dynamiczny wzrost liczby zachorowań ma związek

przede wszystkim z prowadzeniem niezdrowego stylu życia oraz występowaniem zakażeń wirusowo-bakteryjnych [2].

W Polsce najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet jest rak piersi. W większości przypadków etiologia jest nieznana. Najważniejszym czynnikiem ryzyka jest wiek, nosicielstwo zmutowanych genów – BRCA1, BRCA2, hormonalna terapia zastępcza (HTZ) oraz ekspozycja na działanie promieniowania jonizującego. Najlepszą metodą wczesnego wykrywania raka piersi u kobiet, które nie mają objawów są badania przesiewowe, polegające na badaniu mammograficznym kobiet [3]. Większość zgonów (ok. 90%) z powodu nowotworów złośliwych piersi występuje po 50 roku życia. Ryzyko zgonu z powodu raka piersi systematycznie wzrasta wraz z przechodzeniem do starszych grup wiekowych. W Polsce umieralność z powodu nowotworów piersi jest o 20% niższa niż przeciętnie w Europie [Krajowy Rejestr Nowotworów]. W diagnostyce raka piersi liczy się czas. Im wcześniej choroba zostanie rozpoznana, tym szybciej uda wdrożyć się odpowiednią terapię, a szanse pacjentki na pełne wyleczenie będą większe.



**Rys. 1** Zapadalność na choroby nowotworowe. Źródło: International Agency for Research on Cancer.

Szanse na pokonanie choroby w dużej mierze zależą od tego jak wcześnie zostanie wykryty nowotwór. W Polsce blisko 80% chorych zgłasza się do lekarza zbyt późno, podczas gdy zdecydowana większość nowotworów wykrytych w tzw. przedinwazyjnym (zerowym) stadium rozwoju jest najczęściej całkowicie wyleczalna. Celem diagnostyki onkologicznej jest odpowiedź na pytanie, czy pacjent cierpi na chorobę nowotworową, a jeśli tak, to jaki jest typ histologiczny guza i stopień zaawansowania. Rozpoznawanie chorób nowotworowych składa się z trzech etapów:

- 1) Badania podmiotowego, czyli wywiadu lekarskiego;
- 2) Badania przedmiotowego, które przeprowadza lekarz w celu wykrycia fizycznych oznak chorobowych;
- 3) Badań dodatkowych: laboratoryjne, obrazowe, histopatologiczne, które dają szczegółowe informacje o stopniu i rodzaju zaawansowania choroby.

Współczesna diagnostyka opiera się na coraz to dokładniejszych metodach analitycznych i zaawansowanej aparaturze. Pomimo ogromnego postępu podstawą rozpoznania nadal jest prawidłowa diagnoza specjalisty. Dobra znajomość objawów chorobowych pozwala zdiagnozować pacjenta w możliwie najkrótszym czasie. Nowotwory złośliwe mogą rozwijać się latami. Rozwój nowotworu w formie dostępnej do wykrycia może trwać nawet dziesięć lat. Na przykładzie raka żołądka wykazano, że proces ten może trwać 10, a nawet i 20 lat. Objawy kliniczne sugerujące obecność zmian pojawiają się późno, najczęściej gdy leczenie radykalne (chirurgiczne) nie jest już możliwe. Niezadowalające wyniki leczenia nowotworów w Polsce to z jednej strony niska świadomość onkologiczna społeczeństwa i późna wizyta u lekarza. Nie są to jednak jedyne powody, gdyż przypadki

wielomiesięcznej obserwacji chorych z „podejrzanymi” objawami bez wdrażania jakiegokolwiek diagnostyki także nie należą do rzadkości [3].

## 1.2 Biomarkery nowotworowe

Komórki ludzkie, w zależności od typu, produkują od 30 000 do 120 000 rodzajów białek w różnych ilościach – od kilku, do nawet wielu milionów kopii w jednej komórce. Znaczną część stanowią białka konstytutywne, występujące w ponad 10 000 kopii w różnych typach komórek. Każda komórka zawiera także od kilkudziesięciu do kilkuset rodzajów białek swoistych dla danego rodzaju tkanki [4].

Proteomika dostarcza informacji o białkach znajdujących się w komórce, ich strukturach i funkcjach oraz wzajemnych relacjach pomiędzy nimi. Wyjaśnia mechanizmy przebiegu szlaków przekazywania sygnałów, przyczynia się do zrozumienia molekularnych przyczyn chorób, a także służy do projektowania nowych leków [4].

Choroba jest procesem, który modyfikuje ekspresję określonych genów prowadzącym do zmian w produkowanych białkach [5,6]. Każda zmiana powoduje prawdopodobieństwo zaburzenia szlaków metabolicznych. Produkty białkowe zmienionych genów modyfikują mechanizmy podstawowych procesów zachodzących w komórkach takich jak różnicowanie, proliferacja, zmiana właściwości adhezyjnych czy śmierć komórek. Takie zmiany najczęściej mają charakter ilościowy, co oznacza, że aby odróżnić prawidłowy fenotyp od nowotworowego należy stosować normy. Dzieje się tak z tzw. markerami nowotworowymi [7].

Markery nowotworowe są to substancje o różnym pochodzeniu i strukturze biologicznej. W czasie kancerogenezy dochodzi do zmian funkcji oraz struktury genów. Wynikiem tego procesu jest wytwarzanie w komórkach nowotworowych pewnych substancji, które nie są produkowane w komórkach prawidłowych. Mowa wtedy o tzw. neoantygenach. Zainteresowanie wzbudzają, ze względu na możliwości wykorzystania klinicznego, antygeny towarzyszące nowotworom. Grupę tą stanowią substancje, których synteza zachodzi wyłącznie na określonych etapach onkogenezy i ustaje bądź zmniejsza się w komórkach dojrzałych [8]. Biomarkery są wykorzystywane w prognozowaniu ryzyka występowania chorób, w badaniach przesiewowych, diagnostyce oraz monitorowaniu przebiegu choroby. Mogą służyć do identyfikacji osób podatnych na konkretne choroby. Możliwość określenia prawdopodobieństwa zapadania na daną chorobę pozwala oszacować ryzyko jej wystąpienia w różnych populacjach [9]. Dzięki znajomości białek charakterystycznych dla komórek nowotworowych możliwe jest dopasowanie leku do unikalnego zestawu cech molekularnych i genetycznych guza [10].

Biomarkery nowotworowe można podzielić na prognostyczne i predykcyjne [4]. Czynniki prognostycznymi w przypadku wielu nowotworów są wielkość guza pierwotnego, typ histologiczny raka, oraz stan węzłów chłonnych określony w badaniu mikroskopowym [3]. W wyniku rozwoju biologii molekularnej, lista czynników prognostycznych uległa znacznemu rozszerzeniu i znalazły się na niej między innymi: poziom ekspresji receptorów hormonów, markery angiogenezy czy proliferacji [4]. Do tej grupy należy receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Czynniki prognostycznymi są także markery proliferacji. Do tej grupy zalicza się odsetek komórek w fazie S, oceniany na podstawie zawartości DNA w komórkach – aneuploidalne komórki guza wykazują większą oporność na leczenie. Na przebieg choroby nowotworowej wpływ mają także proteazy, odpowiadające za tworzenie przerzutów. Do tej grupy należą zarówno aktywator plazminogenu typu urokinazy (uPAI) oraz jego inhibitor [11,12]. Natomiast czynniki, które określają prawdopodobieństwo uzyskania remisji w przypadku zastosowania określonej metody leczenia są czynnikami predykcyjnymi [4].

Obecnie poszukuje się biomarkerów, które umożliwiłyby określenie grup chorych mających możliwie największe szanse wyleczenia przy zastosowaniu określonego sposobu leczenia. Białkowe biomarkery mogą być produkowane przez komórki nowotworowe lub prawidłowe w odpowiedzi na pojawienie się zmian nowotworowych. Cennym źródłem biomarkerów są płyny ustrojowe

szczególnie w tzw. badaniach przesiewowych [4,9]. Identyfikacja biomarkerów różnych chorób pozwala na opracowanie metod szybkiej diagnozy oraz pozwala na zrozumienie mechanizmów danej choroby [13].

### 1.3 Proces glikozylacji – rola w kancerogenezie

Jedną z największych grup związków organicznych, wchodzącą w skład komórek są cukry. Spełniają one istotną rolę w przebiegu procesów życiowych, głównie stanowiąc materiał energetyczny i budulcowy [14]. Oligosacharydy dołączane potranslacyjnie do białek i lipidów spełniają istotne funkcje, takie jak udział w prawidłowym fałdowaniu białek, oddziaływaniach międzykomórkowych, a także przekazywaniu sygnałów wewnątrz i zewnątrzkomórkowych [15]. Glikozylowane białka są wysoce skomplikowane w swojej strukturze poprzez ogromną różnorodność oligosacharydów dołączanych do łańcucha polipeptydowego, a także ze względu na wielowymiarową sieć zależności łączącą glikoproteiny [14].

Glikany są złożonymi biopolimerami, które tworzą rozgałęzione związki. Znajdują się na powierzchni wszystkich komórek i określane są mianem glikomu [16]. Kluczowe białka błonowe oraz wydzielnicze układu odpornościowego są glikozylowane. Ten mechanizm sprawia, że glikany obecne są prawie w każdym aspekcie nabytej i wrodzonej odporności immunologicznej [17]. Znaczna część białek wytwarzanych przez rybosomy w szorstkim retikulum endoplazmatycznym (RER) to glikoproteiny, zawierające krótkie łańcuchy cukrowców połączonych kowalencyjnie z białkiem podczas jego przechodzenia przez RER i aparat Golgiego [18]. W glikozylacji biorą udział enzymy takie jak glikozylotransferazy, katalizujące przenoszenie cukrów z donora do substratu i tworzące wiązania glikozydowe, a także glikozydazy – hydrolizujące wiązania glikozydowe w glikanach [19]. Wyodrębnia się N- i O- glikozylację. Elementem determinującym proces przyłączenia oligosacharydu do łańcucha polipeptydowego jest obecność miejsc N- i O- glikozylacji w jego sekwencji, a także obecność bądź brak w ER glikotransferaz i glikozydaz [17]. Synteza oligosacharydów przyłączanych wiązaniem O-glikozydowym przebiega poprzez dodawanie kolejnych jednostek monosacharydowych do powstającego białka, gdy przechodzi ono przez aparat Golgiego. W etapie pierwszym N – acetylogalaktozoamina (GaINAc) jest przyłączana do reszt Ser lub Thr białka poprzez transferazę GaINAc. W kolejnych etapach zostają dodane inne monosacharydy, z użyciem cukrów zaktywowanych przez nukleotydy. Liczba i typ dodanych monosacharydów ściśle zależą od białkowego substratu. Z kolei oligosacharydy przyłączane wiązaniem N – glikozydowym syntetyzowane są w postaci rozgałęzionych struktur prekursorowych, a te przekazywane są na akceptorową resztę Asn modyfikowanego białka. Oligosacharyd jest syntetyzowany na przenośniku lipidowym, jakim jest fosforan dolicholu [18].

Ludzki genom składa się z około 30 do 50 tysięcy genów kodujących białka, a liczba białek poznanych do tej pory to w przybliżeniu 500 tysięcy. Oznacza to, że na jeden gen przypada prawie 10 różnych wariantów białek [10]. Modyfikacje potranslacyjne tłumaczy się jako chemiczne zmiany w strukturach białek, które katalizowane są przez specyficzne enzymy. Obecnie poznanych jest około 300 modyfikacji potranslacyjnych, a sukcesywnie odkrywane są nowe [20]. Modyfikacje potranslacyjne w białkach powodują zmiany w oddziaływaniach z innymi białkami, fakt że kierowane są one do specyficznych miejsc w komórce, oraz mają wpływ na ich strukturę trzecio i czwartorzędową [23]. Najczęściej występującymi modyfikacjami są: sulfatacja, fosforylacja, hydroksylacja, metylacja ubikwitynacja, oraz glikozylacja [20].

Glikozylacja spełnia istotną rolę w mechanizmie wzajemnego rozpoznawania się komórek, np. w trakcie tworzenia przerzutów nowotworowych [14]. W ciągu 35 -letnich badań, stwierdzono, że nieprawidłowa glikozylacja występuje w niemal wszystkich typach nowotworów, a wiele epitopów glikanowych stanowi antygeny nowotworowe. Ostatnie badania wskazują, że nieprawidłowa glikozylacja jest rezultatem początkowych transformacji onkogennych, a także odgrywa kluczową rolę w indukcji inwazji i tworzenia przerzutów. Pojęcie promocji lub hamowania nowotworu

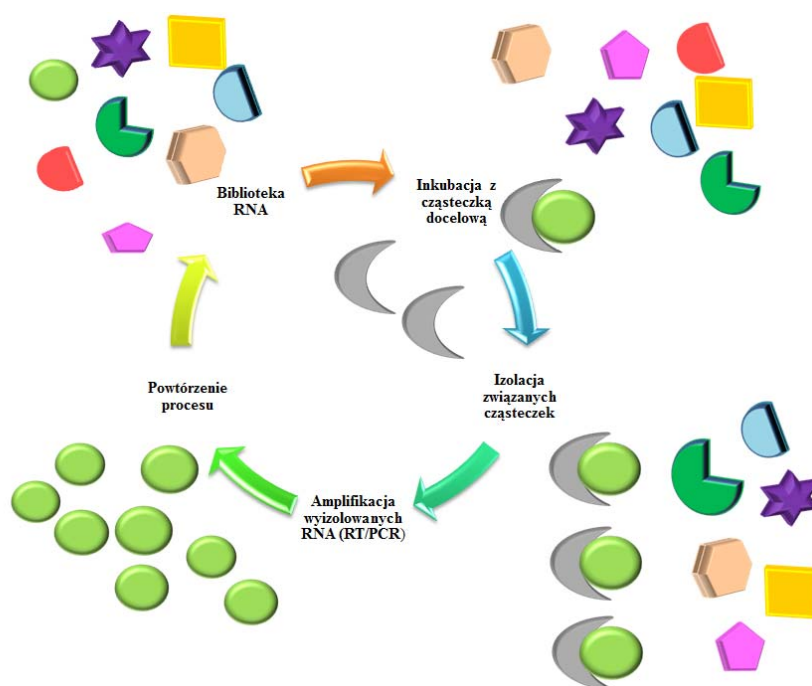
zależnego od glikozylacji jest opracowane w związku z badaniami klinicznym [21]. Wysoka ekspresja niektórych epitopów glikanowych sprzyja inwazji i tworzeniu przerzutów, prowadząc do zmniejszenia odsetku 5-10 letnich przeżyć chorych, podczas gdy ekspresja innych epitopów glikanowych hamuje progresję nowotworu, co prowadzi do wyższych wskaźników przeżycia pooperacyjnych [21].

#### 1.4 Aptamery

Aptamery (łac. aptus – przyczepiony, dopasowany; mer - cząsteczka) są jednoniciowymi oligonukleotydami kwasu rybonukleinowego (RNA) lub deoksyrybonukleinowego (DNA), które wykazują wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania do ściśle określonych biomolekuł lub cząsteczek. Małe cząsteczki takie jak barwniki organiczne, nukleotydy, aminokwasy, narkotyki, biopolimery, polisacharydy, peptydy i białka mogą być wiązane przez aptamery. Reakcje substratów z aptamerami występują w roztworze jak również na powierzchni ciał stałych (także powierzchni komórek).

W ostatnich latach wykorzystano nowo odkryte właściwości aptamerów, które umożliwiają ich zastosowanie do różnych celów biomedycznych, a także użycie ich jako środków farmaceutycznych [23]. Powstawanie kompleksów z aptamerami obejmuje różne typy interakcji (wiązania wodorowe, siły Van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne).

Aptamery wyodrębniło dzięki metodzie SELEX (ang. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) [22,24]. Technika SELEX opiera się na zidentyfikowaniu oraz wybiórczej amplifikacji oligonukleotydów, które charakteryzują się specyficznym i selektywnym powinowactwem do liganda, spośród licznej puli przypadkowych sekwencji, stanowiących bibliotekę oligonukleotydów. W metodzie tej wyróżnia się trzy główne etapy: utworzenie kombinatorycznej biblioteki DNA bądź RNA, selekcję oligonukleotydów oraz powielenie wyselekcjonowanych aptamerów.



Rys. 2 Schemat procesu SELEX.

Cykl powtarzany jest wielokrotnie, aż do uzyskania pojedynczej sekwencji oligonukleotydu. Pierwszym etapem jest utworzenie biblioteki kombinatorycznej RNA bądź DNA za pomocą syntezy chemicznej. Tworzą ją cząsteczki o różnych formach, kształtach, jednak o określonej długości. Drugim etapem jest selekcja oligonukleotydów, które za pomocą specyficznego oddziaływania związały się z docelową cząsteczką. Następnie pulę oligonukleotydów inkubuje się z docelową cząsteczką w ściśle określonych warunkach. Niezwiązane aptamery są usuwane poprzez przemywanie, natomiast cząsteczki, które wiążą się specyficznym są w dalszym etapie eluowane i powielane są dzięki reakcji PCR, bądź RT/PCR (PCR z odwrotną transkryptazą).

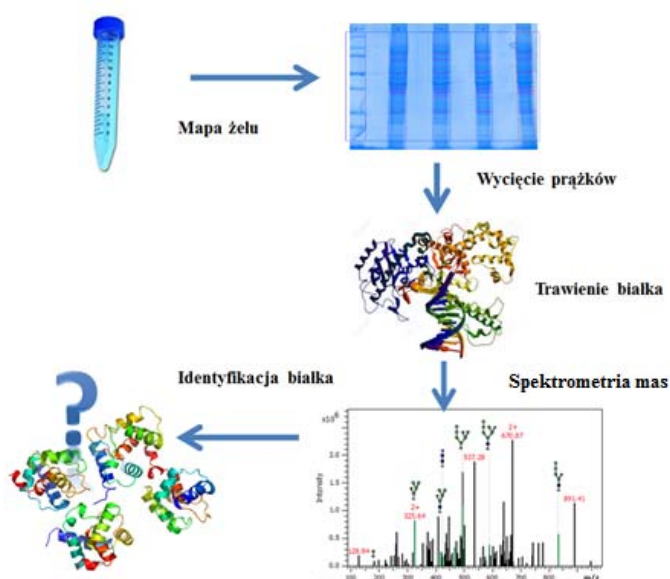
Aptamery mogą być stosowane do celów terapeutycznych, w taki sam sposób jak przeciwciała monoklonalne. Jednakże w przeciwieństwie do tradycyjnych sposobów wytwarzania przeciwciał monoklonalnych, mogą być syntetyzowane w „probówce” w nieograniczonych ilościach. Obecnie przeciwciała pozyskuje się ze zwierząt. Po osiągnięciu konkretnego miana przeciwciał od immunizowanych zwierząt (najczęściej są to myszy, kozy i króliki) pobierana jest krew, z której uzyskuje się surowicę z przeciwciałami. Z uwagi na cierpienie zwierząt oraz problem pojawiania się immunizacji w organizmie gospodarza, metoda ta powinna być stosowana wyłącznie w uzasadnionych przypadkach [25]. Warunki i cele terapii mogą być dobrane techniką *in vitro* w sposób, który mógłby być niemożliwy przy wykorzystywaniu żywych organizmów. Aptamery są obecnie poddawane ocenie klinicznej w przypadku chorób oczu, chorób hematologicznych i nowotworów [22]. Aptamery stanowią ciekawą grupę leków, charakteryzującą się porównywalnym powinowactwem i specyficznością jak przeciwciała terapeutyczne, jednocześnie pozwalając na uniknięcie problemów immunogenności leków białkowych i mogą być wytwarzane w bardziej wydajny sposób [22].

### 1.5 Identyfikacja glikozylacji – proteomika

Badanie proteomu różni się znacząco od tradycyjnych technik biochemicznych, które stosowane są w identyfikacji i badaniu funkcji białek. Proteomika umożliwia jednoczesną analizę tysięcy białek za pomocą połączenia wielu technik analitycznych [10]. Cel badań proteomicznych stanowi wyodrębnienie białek wytwarzanych przez komórki i narządy w stanach fizjologicznych i patologicznych, a także badanie wzajemnych zależności między nimi [10; 23]. Badanie proteomiczne można podzielić na trzy etapy:

- 1) pozyskanie i przygotowanie materiału do badań,
- 2) analiza profilu białek za pomocą technik spektrometrii mas,
- 3) bioinformatyczna analiza danych.

Wykorzystywane są coraz to nowocześniejsze technologie, a zastosowanie metod proteomicznych w praktyce klinicznej pozwala na identyfikację biomarkerów, które będzie można potencjalnie wykorzystać w diagnostyce i terapii chorób nowotworowych [9]. Pierwszy etap badania proteomicznego stanowi izolacja białek z komórek. Etap drugi polega na rozdzieleniu białek dzięki metodom takim jak elektroforeza żelowa [9] lub chromatografia cieczowa. Do analizy modyfikacji potranslacyjnych białek wykorzystuje się różne techniki spektrometrii mas w połączeniu z białkowymi bazami danych oraz programami do sekwencjonowania *de novo* [23, 9; 27]. Analiza ta ściśle wiąże się z bioinformatyką i przeszukiwaniem baz danych w celu znalezienia konkretnego białka bądź peptydu [23].



Rys. 3 Schemat przebiegu analizy proteomicznej.

Białka stanowią trudny obiekt badań ze względu na ich przestrzenną strukturę oraz występowanie w wielkocząsteczkowych kompleksach [16].

Zaburzenia w procesach regulujących modyfikacje białek są niebezpieczne dla organizmu, mogą powodować choroby, takie jak Alzheimer czy nowotwory [26]. Przykładem jest N-homocysteinyłacja (cząsteczki homocysteiny przyłączane są do reszty lizyny w białkach) wynikiem jest zmiana struktury trzeciorzędowej białka, której konsekwencją może być np. choroba układu krwionośnego [23]. Istotne znaczenie w identyfikacji procesów prowadzących do powstania stanów chorobowych ma analiza modyfikacji potranslacyjnych. Wiadomo, że fosforylacja bądź glikozylacja białek przyczynia się do powstawania wspomnianych powyżej chorób [23]. Zastosowanie techniki elektroforezy dwuwymiarowej lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas stwarza możliwość precyzyjnej analizy profili białkowych w różnych stanach patologicznych ludzkiego organizmu dostarczając potencjalnych biomarkerów wielu jednostek chorobowych [10].

Analizy proteomiczne są skomplikowane, ponadto zaplecze tych analiz ma ogromny wpływ na jakość uzyskiwanych wyników, a proces optymalizacji przygotowania próbek wymaga niezwyklej staranności na wszystkich etapach pracy [27].

## Literatura:

- [1] Gatta G., van der Zwan J.M., Casali Paolo G. 2011. Rare cancers are not so rare: The rare cancer burden in Europe. *Eur. J. Cancer*, 47 (17): 2493–2511
- [2] Chmielarczyk W., Galicka M., Kamińska G., Szymańska W., 2009. „Minimum Onkologiczne” dla lekarzy specjalizujących się w medycynie rodzinnej, skrypt. Warszawa SPEO Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie
- [3] Kordek R., Jassem J., Jeziorski A., Kornafel J., Krzakowski M., Powłoga J., 2013. *Onkologia, podręcznik dla studentów*, Via Medica, Gdańsk
- [4] Pietrowska M., 2009. Markery nowotworowe badane metodami proteomiki w osoczu i surowicy krwi. *Biotechnologia*, 2(85) 39-53
- [5] Krzywonos A., 2010. Rola badań proteomicznych w diagnostyce klinicznej. *Journal of Laboratory Diagnostic*, 46 (4) 411-414
- [6] Siedlecki J.A, Limon J: *Choroby nowotworowe*. [w:] Bala J (red.): *Biologia molekularna w medycynie*. PWN, Warszawa 2007; 336-397

- [7] Siedlecki J.A., 2011. Diagnostyka molekularna nowotworów. *Postępy Nauk Medycznych* 2 88-93
- [8] Soborczyk A., Deptała A., 2007. Markery nowotworowe w praktyce klinicznej. *Choroby Serca i Naczyń*, 4 (4) 184–189
- [9] Płodzich A., 2013. Proteomics and its application in selected diseases. *Journal of Transfusion Medicine* 6 (2) 48–59
- [10] Kossakowska B., Dudka I., Gancarz R., Antonowicz—Juchniewicz J. 2009. Analiza proteomiczna profili białkowych w niektórych stanach patologicznych ludzkiego organizmu. *Postępy Hig Med Dosw.* 63: 549-563
- [11] Haier J., Nicolson G. L., (2000), *Clin. Exp. Metastasis*, 18(8), 623-638
- [12] Offersen B. V., Alsner J., Ege Olsen K., Riisbro R., Brünnner N., Sorensen F. B., Sorensen B. S., Schlemmer B. O., Overgaard J., (2008), *Acta Oncol.*, 47(4), 618-632
- [13] Kraj A., Drabik A., Silberring J. 2010. Proteomika i metabolomika [w:] proteomika kliniczna Bodzoń-Kułąkowska A. 379-387
- [14] Surman M., Janik M. 2014. Regulacja procesu glikozylacji białek przez kaskadę cAMP. *Postępy Biochemii* 60 (3) 305-311
- [15] Kim PJ, Lee DY, Jeong H. 2009. Centralized modularity of N-linked glycosylation pathways in mammalian cells. *PLoS* (4): e7317
- [16] Śliwa-Dominiak J., Depuła W. 2014. Udział glikoprotein w odporności. *Post. Biol. Kom.* 37 (3) 571-583
- [17] Van Kooyk Y, Rabinovich GA. 2008. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 9(6):593-601
- [18] Hames D., Hooper N. 2012. *Biochemia*. PWN
- [19] Kłyszczko-Stefanowicz L. 2002. *Cytobiochemia*. PWN
- [20] Jensen O.N. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry, *Current Opinion in Chemical Biology* 2004; 8: 33–4
- [21] Hakomori S. 2002. Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *Commentary* 99 (16): 10231-10233
- [22] Nezlin R. 2014. Aptamers in immunological research. *Immunol Lett.* 162 (2 Pt B):252-5
- [23] Marczak Ł. 2009. Oznaczanie modyfikacji potranslacyjnych białek metodami spektrometrii mas. *Biotechnologia* 2 (85) 27–38
- [24] Ti-Hsuan Ku, Tiantian Zhang, Hua Luo, Tony M. Yen Ping-Wei, Chen Yuanyuan Han, Yu-Hwa Lo. 2015. Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing. *Sensors* 15(7), 16281-16313
- [25] Jakóbisiak M., *Przeciwciała monoklonalne*, Immunologia, red. Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W., wydaw. PWN, 2005, s. 45-53
- [26] Crane R, Gadea B, Littlepage L, Wu H, Ruderman JV. 2004. Aurora A, meiosis and mitosis. *Biol Cell.* 96(3):215-29
- [27] Łuczak M., Figlerowicz M., Wojtaszek P. 2009. Aspekty metodyczne analiz proteomicznych z wykorzystaniem metod elektroforezy dwukierunkowej i spektrometrii mas. *Biotechnologia.* 2 (85) 7–26 2009