

Proteomika w prognozowaniu wystąpienia raka jajnika: rzeczywistość i nadzieje

Proteomics in predicting the prevalence of ovarian carcinoma: reality and hopes

Bogdan Waksmański¹, Anita Olejek²

¹Klinika Perinatologii i Ginekologii, Śląska Akademia Medyczna w Zabrze; kierownik Kliniki: dr hab. med. Wojciech Kaźmierczak

²Katedra i Oddział Kliniczny Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej, Śląska Akademia Medyczna w Bytomiu;

kierownik Katedry: dr hab. med. Anita Olejek, prof. nadzw. ŚAM

Przeгляд Menopauzalny 2006; 6: 352–357

Streszczenie

Rak jajnika jest nadal główną przyczyną zgonów chorych na nowotwory narządu rodne. Powszechnie stosowane metody diagnostyczne są ograniczone w skuteczności i zwykle umożliwiają diagnozę, kiedy choroba jest już zaawansowana. To zmusza do szukania nowych, czulszych i swoistych metod wykrywania wczesnych stadiów raka jajnika. Profil drobnocząsteczkowych białek krwi odzwierciedla patologiczny stan narządu, a przez to umożliwia identyfikację raka w początkowym stadium jego rozwoju. Identyfikacja tych białek w surowicy krwi stanowi podstawę proteomiki.

W pracy przedstawiono współczesne poglądy dotyczące możliwości prognostycznych wystąpienia raka jajnika w oparciu o profil białek u pacjentek z rakiem jajnika w stadiach początkowych i zaawansowanych. Omówiono obecne badania dotyczące markerów białkowych polegające na porównaniu profili białkowych i wybraniu białek wskaźnikowych, następnie analizowanych metodami konwencjonalnymi oraz na badaniu zachowania się często występujących w ilościach śladowych konkretnych białek w różnych środowiskach i w rozmaitych typach raka jajnika.

Słowa kluczowe: proteomika kliniczna, rak jajnika, białka wskaźnikowe, ścieżki sygnałowe

Summary

Ovarian carcinoma remains a leading cause of deaths among carcinomas of the reproductive tract. Common diagnostic procedures are of limited efficacy, and they usually enable diagnosis when the disease is already advanced. This makes it necessary to search for more sensitive and more specific methods of detecting ovarian carcinoma at early stages. The profile of micro-molecular blood proteins reflects the pathological state of the organ, thus enabling to identify carcinoma at an early stage of its growth. Identification of such proteins in blood serum creates the basis for proteomics.

The paper deals with contemporary approaches to the predicting of ovarian carcinoma based on the profile of proteins in subjects with ovarian carcinoma at early and advanced stages. Recent research regarding protein markers is discussed, which involves the comparison of protein profiles and the selection of indicator proteins, and then conventional analysing and reviewing of the behaviour of specific proteins, which often occur in negligible amounts, in various environments and different types of ovarian carcinoma.

Key words: clinical proteomics, ovarian cancer, protein markers, signal path

Adres do korespondencji:

dr med. **Bogdan Waksmański**, Katedra i Oddział Kliniczny Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej, ul. Stefana Batorego 15, 41-902 Bytom, tel. +48 32 281 71 06, e-mail: waksman1@mp.pl

Wstęp

Rak jajnika jest nadal główną przyczyną zgonów chorych na nowotwory narządu płciowego w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej i Europy. Zarówno onkolodzy, jak i klinicyści przypisują ten fakt trudnościom w wykryciu raka jajnika we wczesnym stadium zaawansowania. Aktualnie powszechnie stosowane metody diagnostyczne są ograniczone w skuteczności i zwykle umożliwiają diagnozę, kiedy choroba jest już zaawansowana. To zmusza do szukania nowych, czulszych i swoistych metod wykrywania wczesnych stadiów raka jajnika [1].

Całkowita liczba białek w ludzkich komórkach jest szacowana na 250–500 tys., i tylko mały procent został zidentyfikowany oraz zsekwenconowany. Do tej pory nie został określony kompletny proteom dla jakiegokolwiek organizmu. Dla porównania, genom albo cały zestaw genów dla kilku organizmów został rozpoznany, włączając w to genom człowieka. Ludzki genom, jak się obecnie uważa, zawiera ok. 35 tys. genów kodujących setki tysięcy białek [2].

Profil drobnocząsteczkowych białek krwi odzwierciedla patologiczny stan narządu, a przez to może umożliwić identyfikację raka w początkowym stadium jego rozwoju. Identyfikacja tych białek w surowicy krwi stanowi podstawy proteomiki, z którą wiąże się duże nadzieje w ostatnich latach [3]. Proteomika razem z genomiką pozwala poznać kształt białka, jego funkcję i sposób ekspresji. Zastosowanie techniki *reverse-phase protein microarrays* pozwala na profilowanie ścieżek sygnałowych w raku jajnika, śledzenie ich zachowania się podczas postępowania terapeutycznego oraz selekcjonowanie białek o znaczeniu prognostycznym [4].

Analiza proteomu

Identyfikacja proteomu nie polega wyłącznie na wygenerowaniu listy białek znajdujących się w określonym narządzie czy tkance, ale przede wszystkim na poszukiwaniu różnic w profilach białkowych, którymi różnią się chorzy od zdrowych. Różnice w profilu proteomu mogą być zarówno przyczyną schorzeń, jak i konsekwencją choroby. Z drugiej strony należy pamiętać, że skład białkowy komórki zmienia się w czasie, a nawet w określonych obszarach przestrzeni wewnątrzkomórkowej [5].

W badaniach proteomowych najczęściej obecnie stosuje się techniki wykorzystujące metody chromatograficzne lub elektroforetyczne z metodami wizualizacji komputerowej [2].

Mieszaniny rozpuszczalnych białek są wstępnie rozdzielane metodą elektroforezy dwukierunkowej na podstawie różnicy w wartościach punktu izoelektrycznego i masy cząsteczkowej. W ostatnich latach obserwujemy znaczny rozwój badań łączących techniki elektroforezy dwuwymiarowej ze spektrometrią masową. Obecnie stosowane są 2 techniki pozwalające na definiowanie profili białek krwi wykorzystujące spektroskopię masową do segregowania białek [6]. Są to MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*), czyli jonizacja laserem wspomaganą matrycą z analizatorem przelotu, oraz SELDI-TOF (*Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization – Time of Flight*), tj. jonizacja laserem wspomaganą powierzchniowo z analizatorem czasu przelotu.

Z kolei tandemowa spektrometria masowa MS/MS (*Tandem Mass Spectrometry*) pozwala przede wszystkim

Tab. I. Kontrowersje dotyczące technologii MALDI-TOF w analizie profilu białek w chorobach nowotworowych (na podstawie Diamandis i wsp. [7])

1. Identyfikacja oraz dyskryminacyjne stężenie cząsteczek w surowicy krwi są nie do końca poznane. Spektrometria masowa jest w dużej mierze techniką jakościową. Związek między wzrostem piku a stężeniem cząsteczki nie jest linearny i może być bardzo złożony, co wymaga stosowania zaawansowanych technologii bioinformatycznych.	2. Dyskryminacyjny pik cząsteczki zidentyfikowany przez różnych badaczy dla tej samej choroby może być bardzo różny.
3. Dane uzyskane w różnych laboratoriach są mało porównywalne, dlatego tworzenie norm jest bardzo złożone.	4. Optymalne przygotowanie badanej próbki w różnych analizach jest bardzo zróżnicowane. Obróbka laboratoryjna oraz preparatyka są ciągle przedmiotem krytyki.
5. Udokumentowane wczesne markery raka jajnika (np. PSA, CA125 etc.), które mogłyby służyć jako pozytywne kontrole, nie są identyfikowane przez tę technologię.	6. Niespecyficzne macierze wskazują olbrzymią grupę białek/peptydów, z których znaczna część ma nieznaną przynależność. Niewyjaśnione znaczenie informacyjnych cząsteczek w ogromnej grupie uzyskanych wyników z jednej analizy utrudnia praktyczne zastosowanie tej metody. Brak analitycznej czułości wyników uzyskanych z spektrometrii masowej.
7. Technika spektroskopii masowej analizuje także peptydy lub inne cząsteczki, które są obecne w wysokich stężeniach (np. mg/l lub g/l). Takie cząsteczki na pewno nie są produktem tkanki nowotworowej.	8. Do tej pory nie jest znany związek między cząsteczkami dyskryminującymi a biologią raka.

na określanie struktury badanego związku na podstawie charakterystycznych i swoistych jonów fragmentacyjnych. Widma masowe fragmentacyjne mogą dostarczyć wielu informacji o budowie badanego związku, a także o sekwencji białka. Badania tą techniką dają całkowitą czułość 100%, a swoistość 95%. Swoistość wykazuje 10% pozytywną wartość predykcyjną w przypadku badań przesiewowych raka jajnika na poziomie 99,6% [7].

Ze względu na postępującą standaryzację procedur badawczych wyniki pochodzące z różnych ośrodków stają się coraz bardziej wysoce powtarzalne. Uzyskuje się w tych analizach 100% czułości oraz 100% swoistości badanego profilu białek pod względem ich różnicowania [8]. Z drugiej strony w niektórych publikacjach wskazuje się na pewne ograniczenia metody MALDI-TOF, co przedstawiono w tab. I [7, 9]. W znacznej części te ograniczenia są wynikiem uzyskania ogromnej liczby danych z jednej analizy i w efekcie trudnej jej interpretacji wymagającej użycia zaawansowanych technik statystycznych. Otrzymane tą drogą informacje trudno też jest bezpośrednio przenieść do codziennej praktyki klinicznej.

Podstawą analizy proteomowej w badanej próbce jest zróżnicowany wzór tworzony przez mały, kluczowy podzbiór białek albo peptydów ukrytych pośród całego repertuaru tysiąca białek reprezentowanych w widmie próbki. Wzór ten jest zdefiniowany przez wartości szczytów amplitud określonych na podstawie wartości masy do ładunku (m/z) zajmujących odpowiednią pozycję wzdłuż poziomej osi widma. Dla raka jajnika zwykle wykorzystuje się wzór, który jest tworzony przez kombinację widmowych amplitud o 5 ściśle określonych wartościach m/z [10]. Zastosowanie technik bioinformatycznych sztucznej inteligencji pozwala wyodrębnić następnie grupę białek związanych z określonym procesem biologicznym, np. z przemianą zmiany łagodnej w złośliwą [11].

Bioinformatyka

Obecnie analizy statystyczne koncentrują się na wybraniu białek wskaźnikowych wyodrębnionych na podstawie analizy zbioru zmiennych samouczących się [12]. W trakcie analizy białek otrzymujemy piki amplitudy, które wymagają klasteryzacji, po której uzyskujemy widmo każdego pacjenta, lub badania, które może być zapisane jako p wymiarowy wektor, którego elementami są wysokości wierzchołków o zadanych masach [13].

Dysponując już zbiorem obserwacji uczących korzysta się następnie z systemów klasyfikacyjnych opartych na analizie dyskryminacyjnej, najczęściej LDC (*linear discriminant analysis*) i QDA (*quadral discriminant analysis*) [14]. Zwykle na początku analizy wykorzystuje się niewielką próbę badaną obejmującą niewielu chorych i stosuje się sprzęgnięcie algorytmów klasyfikacyjnych, np. drzew decyzyjnych z metodami redukcji wymiaru danych. To zmniejszenie zmiennych można osiągnąć, ar-

bitralnie wykorzystując wybranie najlepszych zmiennych w rankingu zbudowanym na podstawie: testu T (porównując średnie wartości zmiennej u zdrowych i chorych), wzajemnej informacji ze zmienną decyzyjną, korelacji ze zmienną decyzyjną czy porównania odległości rozkładów prawdopodobieństwa dla danej zmiennej u zdrowych i chorych [14]. Przekładając powyższe rozważania na język proteomiki, Alexe i wsp. [15] zaproponowali wykorzystanie metod analizy logistycznej do wybrania z 15 154 białek surowicy 162 kobiet z rakiem jajnika 7–9 białek o znaczeniu prognostycznym. Okazało się, że zastosowanie wielokrotnej replikacji wyników analizy (*multiple cross-validation tests*) dawało prawie 100% czułość i specyficzność w omawianym badaniu i może być praktycznie wykorzystane w analizach statystycznych tego typu.

Rak jajnika a białka wskaźnikowe

Liczne grupy badaczy szukają białkowych wykładników raka jajnika [7]. Główne kierunki badań koncentrują się na porównaniu wzorów białek pacjentek zdrowych oraz z rakiem jajnika. Poszukuje się heurystycznego modelu opartego na profilu proteomowym dyskryminującego poprawnie wszystkie raki, także te bezobjawowe (tab. II). Wybrany profil białek surowicy krwi okazał się szczególnie dyskryminujący dla pacjentów w I stopniu zaawansowania klinicznego raka jajnika [8], co jednakże nie udało się udowodnić w bardziej zaawansowanych stopniach klinicznych choroby. Badanie wykazało w tym względzie czułość prawie 100%, z 95% specyficznością. Panel proteomowy obejmujący ok. 1000 peptydów i białek surowicy krwi zmieniał się selektywnie i specyficznie w stadium wczesnym i miarę zaawansowania raka jajnika, co także wykazano w tym badaniu [8].

Kozak i wsp. [16] na podstawie analizy danych uzyskanych z 14 mikromacierzy białkowych wybrali białka o najwyższej wartości piku m/z , tj. transtyretynę (TTR *transthyretin* 13,9 kDa, fragment TTR 12,9 kDa), beta-hemoglobinę (*Hb beta-hemoglobin* 15,9 kDa), apolipoproteinę AI (*apoAI apolipoprotein AI* 28kDa) i transferynę (TF *tranferrin* 79 kDa). Następnie metodami Western blott oraz ELISA potwierdzono ustaloną drogą analizy wieloczynnikowej znaczenie prognostyczne tych białek w rozpoznawaniu wczesnych postaci raka jajnika o granicznej złośliwości oraz złośliwych. Na podstawie analizy pola pod krzywą ROC (*receiver operating characteristic*) stwierdzono większą wartość prognostyczną dla TTR, HB i TF (0,993) niż antygenu CA125 (0,833). Zauważono także, że włączenie do analizy wieloczynnikowej antygenu CA 125 podnosi wartość ROC do 0,959. Jednakże w przypadkach wczesnych postaci raków śluzowych wspomniane markery białkowe nieznacznie poprawiają wykrywanie tej postaci nowotworu (ROC 0,959) w porównaniu z samym antygenem CA 125 (ROC 0,613) ani nie poprawiają wartości predykcyjnej, kiedy te białka analizowane są łącznie z CA 125 (ROC 0,995).

Tab. II. Porównanie czułości i specyficzności białek w badaniach poszukujących wskaźników wystąpienia raka jajnika [10, 20–22]

Badanie	m/z	Czułość i specyficzność
Petricoin i wsp. [10]	534, 989, 2.111, 2.251, 2.465	100%, 95%
Kozak i wsp. [23]	4.400, 15.900, 18.900, 23.000, 30.100	96%, 83 %
	3.100, 13.900, 21.00, 79.000, 106.700	82%, 95%
	5.100, 16.900, 28.000, 93.000	73%, 95%
Lin i wsp. [20]	6190,48, 5147,06, 11 522,6, 11 537,7	90%, 100%
Ye i wsp. [22]	17.400	72%, 93%

W badaniu Ahmeda i wsp. [17] metodami proteomowymi porównano 24 próbki surowicy krwi pacjentek z zaawansowanym rakiem jajnika z 11 pochodzącymi od kobiet zdrowych. Na podstawie analizy porównawczej proteomów 22 białka podczas rozdzielania w elektroforezie konsekwentnie podlegały ekspresji w próbkach pochodzących od chorych i zdrowych kobiet. Przy użyciu techniki tandemowej MS stwierdzono, iż u pacjentek z najbardziej zaawansowanym rakiem jajnika są to izoformy prekursora haptoglobiny oraz izoformy transferyny. Zwiększona ekspresja tych białek w surowicy krwi łączy się także z ich obecnością w płynie otrzewnowym u pacjentek w stopniu klinicznym II i III. W tym badaniu także zanotowano spadek stężenia haptoglobuliny w trakcie chemioterapii (6 cykli taksolem i karboplatyna), któremu towarzyszyło jednak zróżnicowane zachowanie się stężenia transferyny w surowicy krwi. Zaobserwowano także, że istnieje korelacja między stężeniem CA 125 a haptoglobuliną w surowicy krwi przed leczeniem i po jego zakończeniu. W aktualnie trwającym badaniu dotyczącym dyskryminującego profilu białkowego w wykryciu raka jajnika oraz oceny zastosowanej chemioterapii Zhang i wsp. [18] stwierdzili 90,8% specyficzność oraz 93,5% czułość wybranego przez siebie spektrum peptydowego. Cztery użyte w tym badaniu markery białkowe wykazują istotnie statystycznie wyższe wartości predykcyjne niż antygen CA 125 ($p < 0,05$). Stwierdzono również obecność białka o m/z równej 4475 u 75% kobiet po zakończeniu chemioterapii, co być może będzie pomocne w monitorowaniu terapii. Bast i wsp. [19] wskazują, że równoczesne wykorzystanie w celach prognostycznych CA 125 oraz markerów białkowych, takich jak HE4 (*Human Epididymis Protein 4*), mezoteliny, M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*), osteopontyny, kallikreiny oraz rozpuszczalnego receptora EGF (*epidermal growth factor*), może być przydatne w zaawansowanym raku jajnika. Lin i wsp. [20], badając 35 pacjentek z rakiem jajnika i porównując profile białkowe ze zdrowymi kobietami w tym samym wieku za pomocą techniki SELDI-MS oraz sieci neuronalnej zidentyfikowali białka o masach o 6190,48, 5147,06, 11 522,6, i 11 537,7 w grupie z nowotworem. Stwierdzono dwa piki odpowiadające m/z 5295,5 i 8780,48 występujące tylko w grupie kobiet zdrowych.

Proteomika w ścieżkach sygnałowych

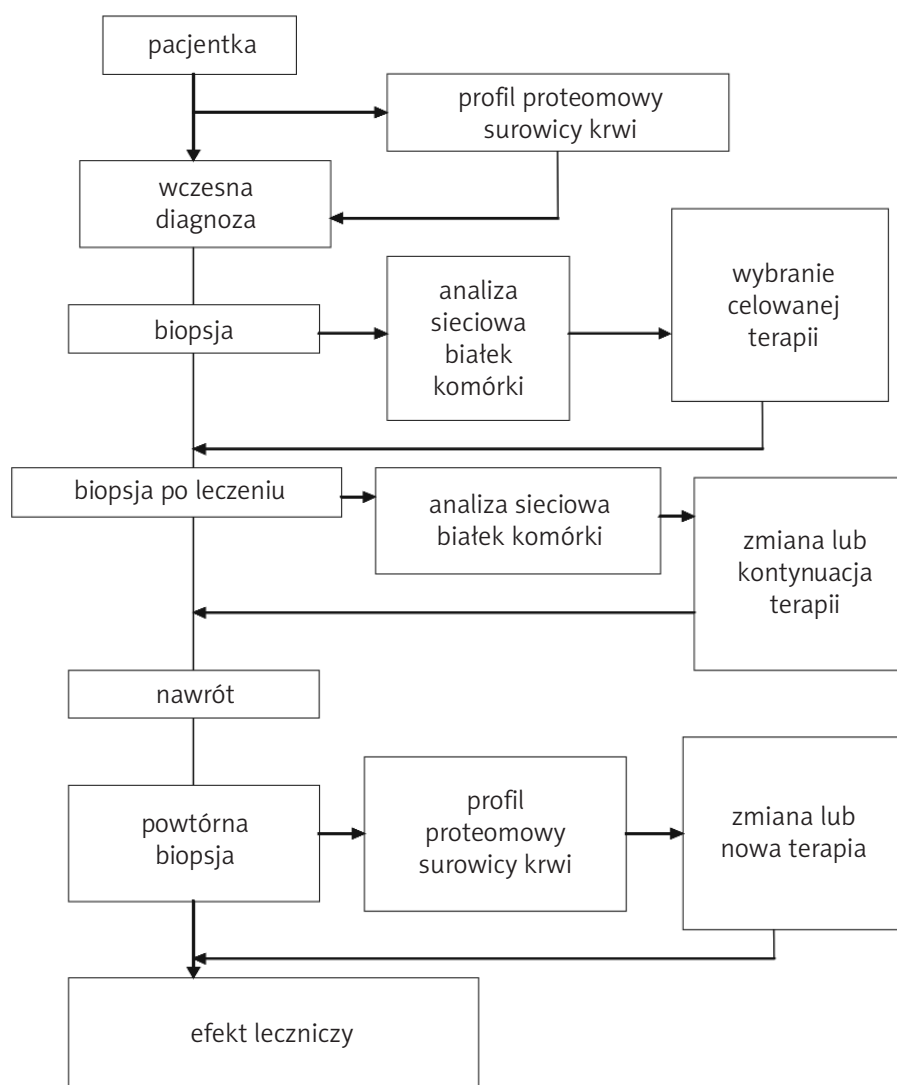
Podstawowym dogmatem transformacji genetycznej są najczęściej nabyte mutacje określonych grup genów. Aberracje chromosomowe występujące w raku jajnika są związane z kontrolą regulacji cyklu komórkowego, apoptozą, adhezją, angiogenezą, sygnalizacją przez błonową, naprawą DNA i stabilnością genową. Rozregulowanie mechanizmów proliferacji, przeżycia komórek i apoptozy obserwuje się szczególnie w rozsiałym zaawansowanym raku jajnika, na co zwraca uwagę w swej pracy Davidson i wsp. [5]. Biochemiczna prezentacja klinicznego rozsiewu komórek nowotworowych może stać się podstawą predykcyjnego i korelacyjnego postępowania, które może doprowadzić do poznania tego mechanizmu i zastosować w przyszłości odpowiednie celowane leczenie. Zaburzenia genetyczne charakterystyczne dla raka jajnika obejmują wzmocnienie lub nadmierną ekspresję rozmaitych białek, m.in. onkoprotein z rodziny receptorów erb-b i 3-kinazy fosfatidyloinozytolu (PI3K). Ta ostatnia ścieżka często jest aktywowana w procesie nowotworowym, mając istotny wpływ na przeżycie komórki. Analiza profilu białkowego tej ścieżki, jak podaje Moscova i wsp. [21] może być pomocna w wykryciu ukrytych białek zaangażowanych w ten szlak biochemiczny. Użyto w tym badaniu 5 linii komórek raka jajnika, w których aktywowano ścieżkę 3-kinazy fosfatidyloinozytolu za pomocą 50 ng/mL EGF w obecności lub przy braku jego inhibitora. Stwierdzono białka o wartościach m/z 8,385 i 8,922, odpowiadające interleukinie-8 i chemokininie. Stężenia tych białek zwiększają się u chorych z zaawansowanym rakiem jajnika w surowicy krwi, co potwierdzały wcześniejsze badania tej samej grupy badaczy [21].

Z kolei Ye i wsp. [22] analizowali zmiany potranslacyjne zachodzące w profilu białkowym białek uzyskanych z moczu kobiet zdrowych, ze zmianami łagodnymi w przydatkach oraz z rakiem jajnika. Celem tego badania było poszukiwanie białek markerowych obecnych w moczu kobiet. Stwierdzono szczyt amplitudy o wartości m/z 17,400 w grupie pacjentek z rakiem jajnika, który odpowiadał neurotoksynie eozynofilowej (*eosinophil-derived neurotoxin, EDN*). Jak wiadomo, wykazuje ona

aktywność RNA-zy i jest także potencjalnie neurotoksyczna, a jej forma glikozylowana była wybitnie podwyższona w grupie 128 kobiet z rakiem jajnika. Na podstawie analizy klasterowej oraz oceny chromatograficznej również w grupie pacjentek z rakiem jajnika stwierdzono zwiększoną ekspresję osteopontyny. Przeprowadzona analiza statystyczna dla kombinacji obu białek, tj. neurotoksyny eozynofilowej i osteopontyny, wykazała, że dają one 93% specyficzność i 72% czułość w wykryciu raka jajnika. Wspomniani autorzy wskazują, że mocz może być lepszym źródłem wskaźników raka jajnika, choćby ze względu na mniejszą liczbę tam występujących termolabilnych białek i peptydów niż w surowicy krwi.

Co dalej?

Bardzo obiecującą perspektywą zastosowania analizy białek organizmu jest proteomika kliniczna, uzupełniająca diagnostykę pacjenta i wspomagająca jego leczenie poprzez dobór najlepszych metod terapeutycznych (ryc. 1). Istnieją pewne szanse, że zastosowanie zintegrowanych mikrosystemów analitycznych pozwoli na szybką analizę profilu białkowego, uzupełnioną o równie łatwą identyfikację nieprawidłowości genetycznych [4]. Technologia proteomowa skupia wiedzę pochodzącą z analizy genomu oraz kliniki raka jajnika w celu poznania jego biologii. Ten unikalny proteomowy punkt widzenia na patogenezę nowotworu pozwoli



Ryc. 1. Współczesne miejsce analizy profilu białkowego w procesie diagnostyczno-terapeutycznym choroby nowotworowej (na podstawie Posadas i wsp. [8])

na stworzenie narzędzi, które pomogą klinicyście w podejmowaniu właściwych decyzji diagnostycznych i terapeutycznych u kobiet z rakiem jajnika w przyszłości.

Piśmiennictwo

1. Fields MM, Cheven E. Ovarian cancer screening: a look at the evidence. *Clin J Oncol Nurs* 2006; 10: 77-81.
2. Liotta LA, Espina V, Mehta AI, et al. Protein microarrays: Meeting analytical challenges for clinical applications. *Cancer Cell* 2003; 3: 317-25.
3. Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics Supplement* 2003; 33: 311-32.
4. Boyce EA, Kohn EC. Ovarian cancer in the proteomics era: diagnosis, prognosis, and therapeutic targets. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15 (Suppl. 3): 266-273.
5. Davidson B, Espina V, Steinberg SM, et al. Proteomic analysis of malignant ovarian cancer effusions as a tool for biologic and prognostic profiling. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 791-9.
6. Vorderwülbecke S, Cleverley S, Weinberger RS, et al. Protein quantification by the SELDI-TOF-MS² based ProteinChip[®] System. *Nature Methods* 2005; 2, 393-5.
7. Diamandis PE. Mass Spectrometry as a Diagnostic and a Cancer Biomarker Discovery Tool Opportunities and potential limitations. *Molecular & Cellular Proteomics* 2004; 3: 367-78.
8. Posadas EM, Simpkins F, Liotta LA, et al. Proteomic analysis for the early detection and rational treatment of cancer-realistic hope? *Ann Oncol* 2005; 16: 16-22.
9. Baggerly AK, Morris SJ, Edmonson RS, et al. Signal in noise: evaluating reported reproducibility of serum proteomic tests for ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 307-9.
10. Petricoin EF, Liotta LA. SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 24-30.
11. Ransohoff DF. Lessons from controversy: ovarian cancer screening and serum proteomics. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 315-9.
12. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-7.
13. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, et al. Sample classification from protein mass spectrometry, by "peak probability contrasts". *Bioinformatics* 2004; 20: 3034-44.
14. Wu B, Abbott T, Fishman D, et al. Comparison of statistical methods for classification of ovarian cancer using mass spectrometry data. *Bioinformatics* 2003; 19: 1636-43.
15. Alexe G, Alexe S, Liotta LA, et al. Ovarian cancer detection by logical analysis of proteomic data. *Proteomics* 2004; 4: 766-83.
16. Kozak KR, Su F, Whitelegge JP, et al. Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics* 2005; 5: 4589-96.
17. Ahmed N, Oliva KT, Barker G, et al. Proteomic tracking of serum protein isoforms as screening biomarkers of ovarian cancer. *Proteomics* 2005; 5: 4625-36.
18. Zhang H, Kong B, Qu X, et al. Biomarker discovery for ovarian cancer using SELDI-TOF-MS. *Gynecol Oncol.* 2006 [Epub ahead of print].
19. Bast RC Jr, Badgwell D, Lu Z, et al. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15 (Suppl 3):274-81.
20. Lin YW, Lin CY, Lai HC, et al. Plasma proteomic pattern as biomarkers for ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16 (Suppl 1): 139-46.
21. Moscova M, Marsh DJ, Baxter RC. Protein chip discovery of secreted proteins regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 2006; 66: 1376-83.
22. Ye B, Skates S, Mok SC, et al. Proteomic-based discovery and characterization of glycosylated eosinophil-derived neurotoxin and COOH-terminal osteopontin fragments for ovarian cancer in urine. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 432-41.
23. Kozak KR, Amneus MW, Pusey SM, et al. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange Proteinchips: Potential use in diagnosis and prognosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12343-8.