zlom Sbornik XIII 17.10.2006 12:37 Stránka 123

Analýza proteomu se zaměřením na prognostické faktory karcinomu prsu

Vydra J., Aschermannová A., Šmakal M., Konopásek B., Petruželka L., Selicharová I., Jiráček J., Smutná K., Matoušková E, Brožová K., Veselý P.
Onkologická klinika 1. LF UK Praha, Ústav onkologie a pneumologie na Pleši
Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR Praha
Ústav molekulární genetiky České akademie věd

Každý rok je v České republice nově hlášeno téměř 6 tisíc pacientek s karcinomem prsu, z toho je jen 19 % pokročilých karcinomů prsu. Jen 8 % pacientek má prokazatelné vzdálené metastázy v době diagnosy (viz tabulka č. 1). Přesto každým rokem zemře na karcinom prsu více než 2 tisíce pacientek. I přes pokroky v léčebné strategii umírá každá druhá až třetí pacientka.

Optimalizace léčebné strategie je možná na základě molekulárně biologických vlastností nádoru. Dalším nezbytným krokem po přečtení lidského genetického kódu je analyzovat funkce sítě proteinů v buňce. Pokrok v proteinové analýze, především díky hmotnostní spektrometrii, umožňuje identifikaci jednotlivých proteinů. Proteom je proteinový obraz genomu a zobrazuje též funkční aktivitu jednotlivých buněčných mechanismů. Přesné stanovení prognosy je základním předpokladem ekonomicky únosné, ale přitom účinné léčby. Cílem našeho projektu je získání nových prognostických a prediktivních faktorů na základě proteomické analýzy.

Tab. 1 - Hlášená nová onemocnění karcinomem prsu podle klinického stadia onemocnění, Česká republika rok 2002 - Národní onkologický registr ČR

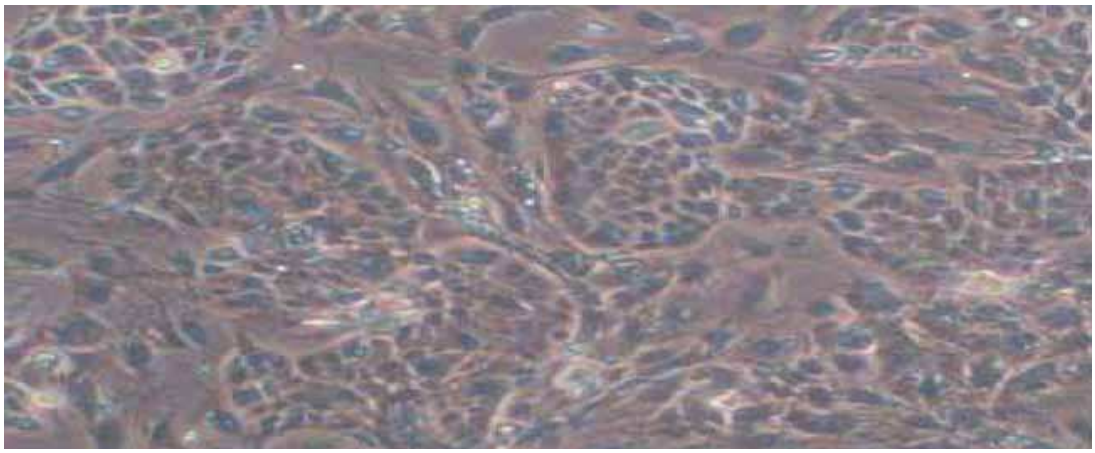
Klinické stadium	I	II	III	IV	Ostatní	celkem	Vzdálené metastázy
Nově hlášeno	1630	2067	572	443	666	5378	412
Výskyt %	30%	39%	11%	8%	12%	100%	8%

Materiál a metodika:

Klinická analýza - zahrnuje TNM klasifikaci, výskyt klinických událostí - progresi či recidivu. Histologie a histochemie - rutinní vyšetření histologický typ nádoru, grade, hladina hormonálních receptorů (ER, PR) HER2/neu.

Kultivace in vitro - odebraná nádorová tkáň je enzymaticky rozvolněna pomocí kolagenázy A. Získané buňky jsou kultivovány na feedru letálně ozářených myších buněk 3T3 (1). Kultura je zobrazena na obr. 1. Je velmi pravděpodobné, že v těchto kulturách rostou buňky blízké kmenovým buňkám nádoru (2).

Obr. 1 Tkáňová kultura karcinomu prsu L154



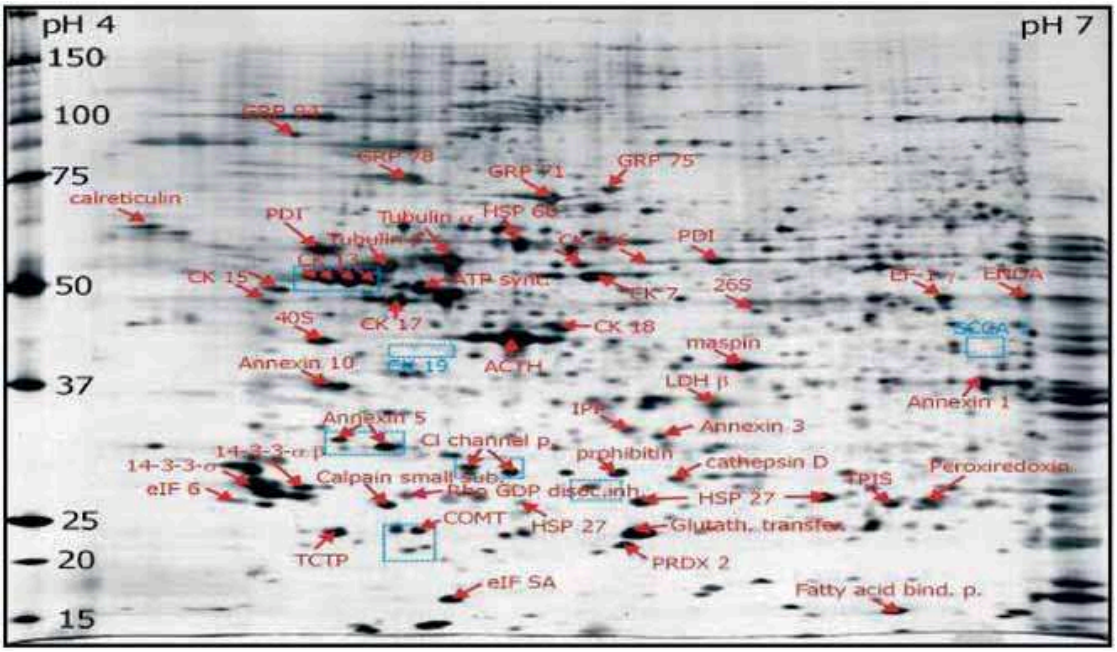
zlom Sbornik XIII 17.10.2006 12:37 Stránka 124

Proteomická analýza: kombinuje vysokoúčinnou dvoudimenzionální gelovou elektroforézu (2-DE), sloužící k separaci proteinů (3) a hmotovou spektrometrií, sloužící k identifikaci vybraných proteinových skvrn z gelů (obr 2). 2-DE gely byly připraveny z proteinového extraktu kultivovaných nádorových buněk. Pro identifikaci proteinů byla použita digesce trypsinem na peptidy, extrakce peptidů z gelu a MALDI - TOF spektrometrie s vyhledáním příslušného proteinu v databázi.

Obr. 2 Hmotnostní spektrometr

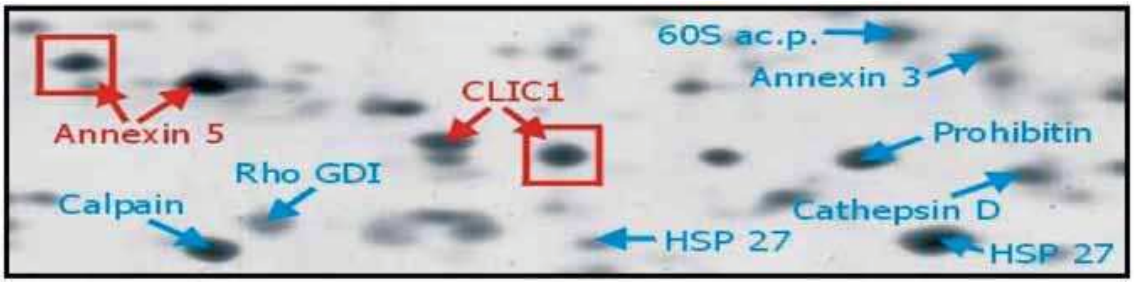
Výsledky:
Nejdříve jsme identifikovali proteiny z gelů linie karcinomu prsu EM- G3, abychom získali základní orientaci v proteinové mapě karcinomu prsu (4). Lokalizace identifikovaných proteinů je v souladu s dosud publikovanými 2DE mapami epitelií mléčné žlázy.

Obr. 3 Proteinová mapa linie EM-G3



Dále jsme analyzovali gely získané 2-DE elektroforezou nádorů 23 pacientek. Tyto gely jsme na základě exprese vybraných proteinů rozdělili do tří základních skupin:
Skupina A - charakterizovaná mj. vysokou expresí proteinu chloridového kanálku CLIC 1 o molekulové váze 26 kD a izoelektrickým bodem pI 5,35 (obr. 4, 5)
Skupina B - charakterizovaná mj. vysokou expresí proteinu o molekulové váze 26 kD a izoelektrickým bodem pI 5,35, nejspíše jde o isoformu prohibitinu (obr. 6)
Skupina C - ostatní vzorky (obr. 7)

Obr. 4 Exprese proteinu chloridového kanálku CLIC 1 - dvě isoformy



zlom Sbornik XIII 17.10.2006 12:37 Stránka 125

Obr. 5 Proteom „A“ nádorové buňky L154

Obr. 6 Proteom „A“ nádorových buněk L54

Obr. 7 Proteom „B“ nádorových buněk L128

Obr. 8 Proteom „C“ nádorových buněk 179