

IDENTIFIKACE POTENCIÁLNÍCH BIOMARKERŮ KARCINOMU PRSU METODOU SELDI-TOF MS

IDENTIFICATION OF POTENTIAL BIOMARKERS OF BREAST CANCER BY SELDI-TOF MS

Brožková K.¹, Knoflíčková D.¹, Hernychová L.⁵, Bouchal P.¹, Holčáková J.¹, Michalová E.¹, Vyzula R.², Žaloudík J.³, Valík D.⁴, Nenutil R.¹, Vojtěšek B.¹

¹MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE, BRNO

²MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE, BRNO

³MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ CHIRURGICKÉ ONKOLOGIE, BRNO

⁴MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, BRNO

⁵UNIVERZITA OBRANY, FAKULTA VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ, ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE, HRADEC KRÁLOVÉ

Souhrn

Východisko: Včasná diagnóza a rychlé nasazení cílené terapie jsou klíčovými faktory úspěšnosti léčby nádorových onemocnění. Snaha o nalezení nových biomarkerů pro včasnější diagnostiku, bližší určení subtypu nádoru, výběr optimálního léčebného protokolu a stanovení prognózy odpovídavosti na léčbu stále zůstává jedním z hlavních cílů výzkumu v této oblasti. V naší studii jsme se zaměřili na diferenciální analýzu proteinových expresních profilů nádorové a normální tkáně 105 pacientek s diagnózou karcinomu prsu. **Metody a výsledky:** Lyzáty tkání byly analyzovány metodou SELDI-TOF MS s využitím čipů s povrchem chelatuujícím měďnaté kationty (IMAC 30). Intenzity signálů odpovídající jednotlivým proteinům vzorku byly statisticky hodnoceny pomocí Wilcoxonova testu na hladině významnosti $p < 0,01$. Bylo nalezeno 28 signálů se signifikantně vyšší hodnotou intenzity v nádorové tkáni a 18 signálů o vyšší intenzitě v normální tkáni prsu. Metodou peptidového mapování (PMF) byl identifikován protein specifický pro normální tkáň s charakteristickým signálem o molekulové hmotnosti 15841 Da jako β -řetězec hemoglobinu. **Závěr:** Analýza metodou SELDI-TOF MS prokázala významné rozdíly v hmotnostních spektrech proteinů exprimovaných v nádorové a normální tkáni. Na základě získaných spekter bylo možno vytipovat charakteristické píky označující proteiny, jež lze považovat za potenciální biomarkery onemocnění a které by mohly v budoucnosti poskytnout přesnější pohled na klasifikaci nádorů a tím i na jejich diagnostiku a terapii.

Klíčová slova: SELDI-TOF-MS, biologický marker, karcinom prsu, beta-Globin

Summary

Backgrounds: Early diagnosis and immediate therapeutic interventions are crucial factors for successful cancer treatment. New biomarkers are needed for timely diagnosis, more precise histopathological classification or for prediction of treatment response. Our study was aimed at the differential analysis of protein expression profiles of cancer and non-cancer tissue from 105 patients with breast cancer. **Methods and Results:** Tissue lysates were analyzed by SELDI-TOF-MS on copper chelating chips IMAC 30. Peak intensities were statistically evaluated by Wilcoxon test with significance defined as $p < 0,01$. 28 peaks are overexpressed in tumour tissue and 18 peaks are overexpressed in normal tissue. Protein with molecular weight 15841 Da was identified as the β chain of haemoglobin by method of peptide mass fingerprint (PMF). **Conclusions:** Analysis of the protein expression profile by SELDI-TOF-MS is able to provide a new point of view on diagnostic and tumor classification. Further independent studies of new sets of samples are essential for verification of specificity and sensitivity of the presented potential biomarkers.

Key words: SELDI-TOF-MS, biological marker, breast cancer, beta-Globin

ÚVOD

Nádorové onemocnění prsu je každoročně diagnostikováno u milionů žen na celém světě a svým rozšířením se tak řadí k nejčastěji se vyskytujícím formám rakoviny u žen. Představuje také druhou nejčastější příčinu úmrtí žen na nádorové onemocnění. Jedno procento nádorů postihuje také muže. V současnosti je diagnostika karcinomu

prsu založena především na zobrazovacích technikách (mamografie, ultrazvuk), jejichž využití v preventivních programech výrazně zlepšilo zachyt časnějších stádií onemocnění. Ačkoli během několika posledních desetiletí došlo k výraznému zvýšení úspěšnosti léčby díky pokroku screeningových programů a adjuvantní terapie (hormonální terapie a chemoterapie), umírá stále mnoho pacientek na

následky metastatických komplikací. Značná heterogenita nádorů je jen částečně popsána běžně používanými klinickopatologickými parametry (věk, velikost nádoru, statut hormonálních receptorů, grade atd.), tato kritéria však neumožňují dokonale vybrat nejlepší léčebnou strategii pro jednotlivé konkrétní případy.

Znalost kompletní sekvence lidského genomu a rychlý rozvoj molekulárně-biologických metod rozšiřuje pole potenciálních biomarkerů onemocnění či jejich kombinací a tím umožňuje přesnější diagnostiku, predikci terapeutické odpovědi a rozvoj studia nových terapeutických cílů. Nesmírný pokrok genomické éry zejména díky čipovým technologiím umožňujícím analýzu expresních profilů buněk na úrovni RNA postupně odhaluje jednotlivé alterace mechanismu mamární onkogeneze a konkrétní geny účastníci se těchto procesů jako ERBB2, TP53, CCND1, BRCA1 a BRCA2. Proteomické metody mají naopak potenciál odhalit další podstatnou část informací spojenou s lokalizací vybraných proteinů v buňce, jejich vzájemnou interakcí, posttranslačními modifikacemi (fosforylace, acetylace, glykosylace aj.), jejich stabilitou a v neposlední řadě s výslednou funkcí proteinů. Nejběžnější a dříve hojně využívaná proteomická metoda, dvourozměrná gelová elektroforéza (2D-ELFO), je limitována zejména velikostí analyzovaných proteinů (vyhodnocení je možné u proteinů >7000 Da) a neumožňuje detekci proteinů s nízkou hladinou exprese [1]. Jako alternativa 2D-ELFO pro analýzu expresního profilu na úrovni proteinů u komplexních biologických vzorků (sérum, plazma, moč, lyzáty nádorových tkání atd.) byla poprvé v roce 1993 popsána metoda SELDI-TOF MS (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry) [2]. Při aplikaci SELDI-TOF MS jsou některé proteiny na základě svých fyzikálních či chemických vlastností zachyceny na chromatografickém povrchu čipu, nenavázané proteiny jsou naopak odmyty. Čipy s navázanými proteiny jsou následně analyzovány hmotnostní spektrometrií [3].

Pionýrskou prací v oblasti analýzy metodou SELDI-TOF MS byla detekce časného ovariálního karcinomu analýzou proteinového profilu séra [4], kdy na souboru 50 vzorků sér pacientek s ovariálním karcinomem a 66 vzorků sér od zdravých žen bylo dosaženo 100% sensitivity, 95% specificity a 94% pozitivní prediktivní hodnoty. Analýza proteinových profilů vedoucí k odhalení maligního onemocnění, popřípadě jeho odlišení od benigní choroby, již byla publikována např. pro detekci karcinomu prostaty [5], karcinomu ledvin [6] nebo adenokarcinomu slinivky [7]. Pro detekci karcinomu prsu bylo zveřejněno několik prací analyzujících rozdíly v proteinovém profilu séra zdravých a nemocných žen [8-11] a dále práce identifikující potenciální biomarkery předpovídající metastázy v axilárních mizních uzlinách z mikrodisekované tkáně [12]. Než však bude možné zavést tyto potenciální biomarkery do klinické praxe, bude nezbytné potvrdit jejich validitu a robustnost na nezávislých souborech vzorků [13]. Následná identifikace rozdílně exprimovaných proteinů a studium jejich funkce by mohlo přinést nové poznatky v oblasti karcinogeneze či

odhalit nové terapeutické cíle. Takovými příklady mohou být například ubikvitin a lehký řetězec ferritinu jako prognostické biomarkery karcinomu prsu bez zasažených mizních uzlin [14] či snížená hladina exprese skupiny kalgranulinů pozorovaná ve spinocelulárních karcinomech dutiny ústní a hrtanu. [15].

Ve většině doposud publikovaných studiích bylo využito séra jako výchozího materiálu pro analýzu proteinových expresních profilů pomocí SELDI-TOF MS. Jeho výhodou je snadná dostupnost s minimální zátěží pacienta a možná následná aplikace biomarkerů v klinických screeningových programech. Nevýhodou séra může být metodická heterogenita v preanalytické fázi [16]. Naproti tomu zpracování normální a nádorové tkáně je do určité míry omezeno horší dostupností a heterogenitou získaného vzorku, nicméně výhodou je možná detekce i velmi nízkce exprimovaných proteinů s následnou studií jejich funkce. V rámci naší studie jsme se zaměřili na zavedení a otestování standardního postupu zpracování vzorků tkáně pro jejich následnou analýzu metodou SELDI-TOF MS a provedli jsme komplexní proteomickou analýzu vzorků nádorové a odpovídající normální tkáně 105 pacientek s diagnózou karcinomu prsu. Cílem naší analýzy bylo nalezení specifických proteinů typicky exprimovaných v nádorové tkáni, z nichž by některé bylo možno následně sledovat i ve vzorcích séra.

MATERIÁL A METODY

Pacientky

S využitím SELDI-TOF MS jsme studovali nádorové a paralelní normální vzorky mléčné žlázy od 105 pacientek, vybrané z konsektivní řady operovaných karcinomů prsu v letech 2004-2005, klinického stadia I a II, bez neoadjuvantní léčby. Byly vybrány větší nádory umožňující archivaci většího počtu alikvotů nádorové tkáně, aby nebyl všechn materiál spotřebován pro danou studii. V sestavě proto převažovaly nádory pT2 – 57 (54 %) nad pT1 – 43 (40 %) relativně často s metastatickým postižením jedné a více uzlin (pozorováno u 65, tj. 63 %) pacientek. Rozložení grade bylo v souboru rovnoměrné s mírnou převahou středně a špatně diferencovaných nádorů (G1 26,6 %; G2 33,3 %; G3 37,1 %). Průměr i medián věku pacientek v analyzovaném souboru byl v době diagnózy shodný, a to 59 let. Sestava zahrnovala vzorky 72 duktálních blíže neurčených karcinomů a 22 lobulárních karcinomů, dále 2 metaplastické, 2 mucinózní, 2 papilární, 2 pleiomorfí lobulární a 3 smíšené duktální a lobulární karcinomy. Exprese estrogenních receptorů byla potvrzena u 86 (= 82 %) nádorů, progesteronový receptor byl detekován u 81 (78 %) vzorků. Overexprese Her-2 receptoru byla imunohistochemicky zjištěna a FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridisation) validována u 20 (= 19 %) vzorků.

Zpracování vzorků

Operační materiál byl bezprostředně po zákroku (do 10 minut) zpracován standardním způsobem, tj. byl pořízen makroskopický popis a excidovány vzorky pro histologické vyšetření. Současně byl proveden odběr nativní nádorové tkáně: vzorky velikosti cca 3×3×8 mm

byly prudce zamrazeny v tekutém dusíku a dlouhodobě skladovány při -80°C . Reprezentativnost odebrané tkáně (minimálně 50 % materiálu tvořeno nádorovými buňkami) byla ověřena histologickým vyšetřením bezprostředně sousedící tkáně (tzv. paralelní řezy).

Lýza tkáně byla provedena ve třech rozdílných pufrech: i) NET pufr (150 mM NaCl; 1% NP-40; 50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 50 mM NaF; 5 mM EDTA); ii) močovinný pufr (9 M urea; 2% CHAPS); iii) guanidinový pufr (100 mM fosfátový pufr, pH 6,6; 6 M guanidin-HCl; 1% Triton X-100) třepáním 1 hod při pokojové teplotě s následnou centrifugací 30 min při $14000 \times g$ (dle [15]). Celková koncentrace proteinů v lyzátu byla stanovena metodou dle Bradfordové (Bio-Rad Protein Assay, USA) a lyzáty byly skladovány v alikvotech při -80°C . Vzorky byly analyzovány s využitím čipů IMAC 30 (Ciphergen Biosystems, USA), pro analýzu byly zpracovány dle standardního návodu výrobce. Vzorek byl na terčík čipu nanášen v množství 20 μg celkového proteinu $16\times$ ředěného IMAC vazebným pufrem (100 mM fosfátový pufr pH 7,0; 750 mM NaCl; 0,05% Triton X-100). Čipy byly analyzovány na ProteinChip Readeru Model PBS II C (Ciphergen Biosystems, USA) v pozitivním lineárním módu. Každý vzorek byl nanesen a změřen ve dvou opakováních, přičemž jednotlivé vzorky byly na čipy rozmístěny náhodně.

Hodnocení naměřených spekter

Získaná spektra byla kalibrována dle externích hmotnostních standardů „all-in-one protein I molecular weight standards mix“ (Ciphergen Biosystems, USA) a intenzita normalizována dle celkového iontového proudu v rozmezí 2 až 100 kDa. Pomocí „Biomarker Wizard“ software verze 3.2.1 (Ciphergen Biosystems, USA) byly automaticky detekovány signály o poměru S/N (signál/šum) > 5 a vyskytující se alespoň u 12,5 % spekter. Celkově bylo detekováno 89 signálů reprezentujících proteiny s odlišnou molekulovou hmotností přítomné ve vzorku. Intenzity jednotlivých signálů byly statisticky hodnoceny pomocí Wilcoxonova testu a proteiny rozdílně exprimované se statistickou významností ($p < 0,01$) byly rovněž hodnoceny vizuálně.

Příprava vzorků pro identifikaci metodou PMF

Směsné vzorky s vysokým obsahem vybraného proteinu byly naředěny v poměru 1:1 $2\times$ koncentrovaným IMAC vazebným pufrem, naneseny na „IMAC HyperCel Spin Column“ (Ciphergen Biosystems, USA) a zpracovány dle návodu výrobce. Po selektivní vazbě a vymytí nenavázaných proteinů byla provedena eluce vazebným pufrem s imidazolovým gradientem. Získané frakce (F1: 30 mM imidazol, F2: 60 mM imidazol, F3: 90 mM imidazol, F4: 120 mM imidazol, F5: 150 mM imidazol a F6: 250 mM imidazol) byly analyzovány pomocí SELDI-TOF MS na čipech NP20 ProteinChip Array s hydrofilním povrchem (Ciphergen Biosystems, USA). Frakce s vysokým obsahem vybraného proteinu byly rozděleny jednorozměrnou gelovou elektroforézou (1D-ELFO) v 10-20% tricinovém gelu (Invitrogen Corporation, UK), proteiny obarveny Coomassie blue a oblasti s předpokládaným výskytem

proteinů o dané molekulové hmotnosti vyříznuty pro následnou MS analýzu. Kousky gelu byly nejprve odbarveny a promyty v promývacím pufru (100 mM Tris-Cl, pH 8,5 v 50% acetonitrilu (AcN)), pak ekvilibrovány v ekvilibračním a štěpícím pufru (50 mM NH_4HCO_3 , pH 7,8 v 5% AcN). Pufr byl odstraněn a kousky gelu byly vysušeny na Speed Vac SP110 (Savant, Minnesota), následovalo enzymatické štěpení, kdy ke každému vzorku bylo přidáno 2,5 μl roztoku složeného z 0,5 μl štěpícího enzymu (trypsin, 1 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ v rekonstitučním pufru-50 mM kyselina octová) a 2 μl ekvilibračního a štěpícího pufru. Kousky gelu byly následně převrstveny 20-30 μl štěpícího pufru a inkubovány přes noc v termomixéru (Eppendorf, Germany) při 37°C a rychlosti otáčení 1500 rpm. Štěpení bylo zastaveno přidáním 5 μl 0,5% trifluoroctové kyseliny (TFA) v 95% AcN. Na destičku s hydrofobní maskou (Applied Biosystems, USA) byly naneseny vždy po 1 μl vzorky obsahující směsi peptidů vzniklých štěpením proteinu/proteinů extrahovaných z gelu. Každý vzorek byl po usušení za laboratorní teploty převrstven 1 μl roztoku matrice 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB, koncentrace 10 mg/ml, rozpuštěna ve 20% AcN, vodě a 5% TFA). Po vykrystalizování vzorků s matricí byla destička vložena do MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) hmotnostního spektrometru (Voyager-DE STR, Applied Biosystems, USA). Po kalibraci přístroje byly vzorky měřeny v pozitivním refletronovém módu a získaná hmotnostní spektra byla hodnocena metodou PMF pomocí programu PROTEIN PROSPECTOR MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu>). Výsledkem identifikací jednotlivých vzorků byl seznam proteinů, jejichž teoretickému spektru s určitou pravděpodobností odpovídá naměřené spektrum. Každý nalezený protein byl charakterizován parametry: „mowse score“ (pravděpodobnost shody identifikovaného proteinu se známým proteinem), „masses matched“ (počet signálů spektra známého proteinu nalezených ve spektru identifikovaného proteinu), teoretická molekulová hmotnost a pI proteinu, název proteinu.

VÝSLEDKY

Při optimalizaci zpracování tří vzorků paralelně v různých lyzačních pufrech byl získaný počet signálů srovnatelný pro vzorky lyzované v močovinném a guanidinovém pufru (56 resp. 57 signálů o S/N > 5 v rozsahu 3 – 80 kDa), při použití NET pufru jsme získali výrazně nižší počet signálů (41 signálů). U vzorků lyzovaných pomocí guanidinového pufru bylo navíc dosaženo $4\times$ vyšší intenzity signálů naměřených spekter, a proto byl vybrán jako nejvhodnější a použit pro lýzu celého souboru vzorků.

Softwarem „Biomarker Wizard“ (Ciphergen Biosystems, USA) bylo ve 428 naměřených spektrech detekováno 89 klastrů (= signálů splňujících podmínku intenzity S/N > 5 a zároveň se vyskytující alespoň ve 12,5 % naměřených spekter) v rozsahu 2 – 100 kDa. U 46 z nich byl rozdíl intenzity (vzájemný poměr intenzit > 2) vyhodnocen jako statisticky významný na hladině pravděpodobnosti $p < 0,01$. 28 signálů (píků) s vyšší intenzitou bylo nalezeno ve vzorcích nádorové tkáně, v normální tkáni prsu pak 18 signálů (píků). K identifikaci konkrétních proteinů,

jež jednotlivé signály představují, byly vybrány signály s největším rozdílem intenzity v obou typech vzorků, a to signály s předpokládanou molekulovou hmotností proteinů 7920 Da a 15841 Da (Obr.1, 2) charakteristické pro normální tkáň a signály 5175 Da, 5195 Da (Obr. 3), 6263 Da, 8395 Da a 8541 Da typické pro nádorovou tkáň. U signálů charakteristických pro normální tkáň lze předpokládat, že mohou být odrazem stejného proteinu. Výsledky hmotnostní spektrometrie graficky znázorněné jako spektrum píků jsou vyneseny tzv. efektivní hmotnosti (poměr hmotnosti a náboje dané molekuly m/z) na ose x a relativní intenzity signálu na ose y. Pokud některé molekuly o hmotnosti 15841 Da nesou náboj 1+, poskytnou signál v oblasti 15841, pokud některé molekuly nesou náboj 2+, poskytnou signál v oblasti 7920. Tento předpoklad nelze s jistotou vyloučit ani potvrdit (ve vzorku se mohou nacházet proteiny s molekulovou hmotností 15841 Da i 7920 Da), proto jsme se pokusili identifikovat oba tyto signály nezávisle na sobě.

Při MALDI-TOF MS byla úspěšně získána spektra potenciálních proteinů o molekulové hmotnosti 5195 Da, 8541 Da a 15841 Da. Metodou peptidového mapování byl identifikován pouze protein o molekulové hmotnosti 15841 Da jako β -řetězec hemoglobinu dosahující „mowse score“ 1,76.10⁷, „masses matched“ 9 (ze 14 detekovaných) s 60% pokrytím aminokyselinové sekvence (experimentálně bylo nalezeno 9 peptidů, které představují 88 aminokyselin z celkového počtu 146). Nízká úspěšnost identifikace jednotlivých proteinů v naší i jiných studiích je dána návazností několika technik (afinitní chromatografie, 1D-ELFO, MALDI-TOF MS), které jsou limitovány kapacitou a sensitivitou (vazba proteinů o nízké koncentraci na chromatografický povrch kolony, detekce proteinů na gelu barvením apod.). V průběhu tohoto komplexního procesu může z výše uváděných důvodů docházet ke ztrátám identifikovaných proteinů.

DISKUZE

Nádory prsu jsou v celosvětovém měřítku jedním z nejčastějších onkologických onemocnění, navíc spojené s vysokou úmrtností. Přestože se doba přežívání pacientek za posledních deset let podstatně prodloužila díky prevenci a včasným screeningovým metodám a taktéž systematické adjuvantní terapii, zůstává úmrtnost stále vysoká zejména kvůli metastatickému relapsu onemocnění. Komplexní geneze karcinomů prsu a heterogenita maligních buněk vytváří molekulárně odlišné podskupiny nádorů s rozdílným fenotypem i klinickým průběhem onemocnění včetně různé dispozice k metastazování do kostí, parenchymatózních orgánů, mozku, kůže, mízních uzlin atd. Detekce, diagnostika a léčba těchto nádorů závisí na integrovaných přístupech zohledňujících klinickou historii, výsledky zobrazovacích metod, histopatologii a molekulárně biologické charakteristiky nádoru. Je tedy zřejmé, že detekce a validace nových biomarkerů nepochybně pomůže klinickým pracovníkům efektivněji využívat všech doposud dostupných možností. Proteomické přístupy využívané pro hledání nových biomarkerů kombinují postupy založené na separaci, detekci a identifikaci proteinů. Klasickým příkladem je kombinace

dvourozměrné elektroforézy [17, 18] a MALDI-TOF MS, která umožňuje jak separaci proteinů (na základě poměru hmotnosti a náboje), tak jejich detekci a identifikaci.

V naší studii jsme využili metodu SELDI-TOF MS, která spojuje separaci proteinů s jejich přímou analýzou hmotnostním spektrometrem [19]. Zaměřili jsme se na identifikaci rozdílů proteinových spekter lyzátů nádorové a normální tkáně pacientek s karcinomem prsu. Fakt, že ke statisticky významným změnám dochází u více než poloviny hodnocených klastřů, naznačuje, že analyzované vzorky normální a nádorové tkáně prsu jsou zásadně a systematicky rozdílné. Zdrojem těchto rozdílů bude zejména různé zastoupení jednotlivých tkání v obou typech vzorků (zejména tukové tkáně, vaziva a epitelu), případně heterogenita souboru nádorových vzorků způsobená zastoupením různých subtypů karcinomu prsu. Tyto rozdíly expresních profilů mohou být dále způsobeny zvýšenou expresí daného proteinu, abnormálním rozpadem, fragmentací či proteolytickým štěpením proteinů, modifikací proteinů nebo jejich zvýšenou degradací. Všechny dosud publikované práce s cílem nalézt diagnostické či prognostické markery vycházely výhradně z analýzy séra, plazmy, případně tekutiny aspirované z mlékovodu [20, 21], s výjimkou Ricolleau *et al.* [14], který použil jako výchozí materiál hluboce zmrazenou tkáň a Nakagawa *et al.* [12], který využil mikrodisekci ze zmrazených řezů. Sensitivita proteomických aplikací hmotnostní spektrometrie pro sérové analýzy není dostatečná pro detekci proteinů s nízkou hladinou exprese, které jsou uvolňovány do krevního oběhu relativně malým množstvím nádorových buněk nebo jejich mikroprostředím [22]. Lyzáty tkání se tedy zdají být vhodnějším výchozím materiálem pro vytipování proteinů spojených s nádorovými buňkami a pro jejich následné cílené vyhledání v sérech. Práce s lyzáty nádorových tkání má rovněž výhodu pilotní studie vzhledem k minimálnímu zředovacímu efektu. Koncept naší práce vychází ze skutečnosti, že karcinomy prsu mohou uvolňovat proteiny do krevního oběhu, kde je lze následně detekovat. Použitelnost nových potenciálních biomarkerů v diagnostice a prognostice onemocnění je však limitována nejen jejich sensitivitou a specificitou, ale také dostupností výchozího materiálu a komplexností jeho přípravy pro analýzu. Jelikož sérum v současnosti představuje nejběžnější a relativně snadno dostupný výchozí materiál pro laboratorní analýzy, bude cílem navazujících studií snaha o nalezení v tkáni detekovaných rozdílných signálů i ve vzorcích sér s využitím stejného metodického přístupu. Při daných studiích bude nutné brát zřetel i na skutečnost, že proteiny uvolňované do séra mohou být degradovány prostřednictvím proteolytických systémů. Naše studie jednoznačně potvrdila nutnost analýzy proteinových expresních profilů („fingerprint“) vzorků lyzátů nádorové tkáně a jejich srovnání s klinicko-patologickými charakteristikami použitého souboru nádorů prsu. Výsledky naší analýzy rovněž ukázaly, že píky 5175 Da a 5195 Da jsou pozitivně korelovány s amplifikací genu Her-2 a pík 8395 Da s výskytem estrogenních receptorů α a β . Identifikace těchto píků a jejich následná analýza v sérech pacientek prokážou jejich možné využití jako biomarkerů.

Identifikace β -řetězce hemoglobinu v souvislosti se změnami expresního profilu karcinomu prsu již byla publikována [23] v práci analyzující tekutinu aspirovanou z mlékovodu 18 žen

s invazivním karcinomem prsu stádia I či II a 4 zdravých dobrovolnic metodou ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) MS umožňující kvalitativní a kvantitativní komparativní analýzu párových vzorků proteinů [24]. Práce poukázala na rozdílnou expresi 39 proteinů, z nichž α 2HS-glykoprotein byl identifikován jako protein se sníženou hladinou exprese, lipophilin B, β -řetězec hemoglobinu, hemopexin a prekurzor proteinu vázajícího vitamín D naopak jako proteiny se zvýšenou hladinou exprese ve vzorcích nádorové tkáně. Další práce identifikující β -řetězec hemoglobinu jako potenciální biomarker byly publikovány ve vztahu ke karcinomu vaječníku. Kozak *et al.* [25] identifikovali β -řetězec hemoglobinu spolu s transthyretinem, apolipoproteinem A1 a transferrinem metodou SELDI-TOF MS v kombinaci s micro-LC-MS/MS jako potenciální biomarkery časného stádia karcinomu vaječníku. Zvýšená hladina β -řetězce hemoglobinu byla jako jediná zjištěna ve vzorcích séra pacientek s nádorovým onemocněním, hladiny ostatních proteinů byly naopak zvýšeny v kontrolních sérech. Pokud jsou tyto markery použity v kombinaci s jediným běžně užívaným markerem karcinomu vaječníku CA125, je dosaženo o 8 % vyšší sensitivity v porovnání se samotným CA125 pro všechny histologické podskupiny, pro mucinózní tumory je sensitivity zvýšena dokonce o 31 %. Také Woong-Shick *et al.* [26] popsali oba řetězce hemoglobinu (α a β) jako markery karcinomu vaječníku ve studii 35 sér pacientek v porovnání s 10 kontrolními séry. V kombinaci s CA125 dosáhli téměř 99% sensitivity při detekci progresu onemocnění.

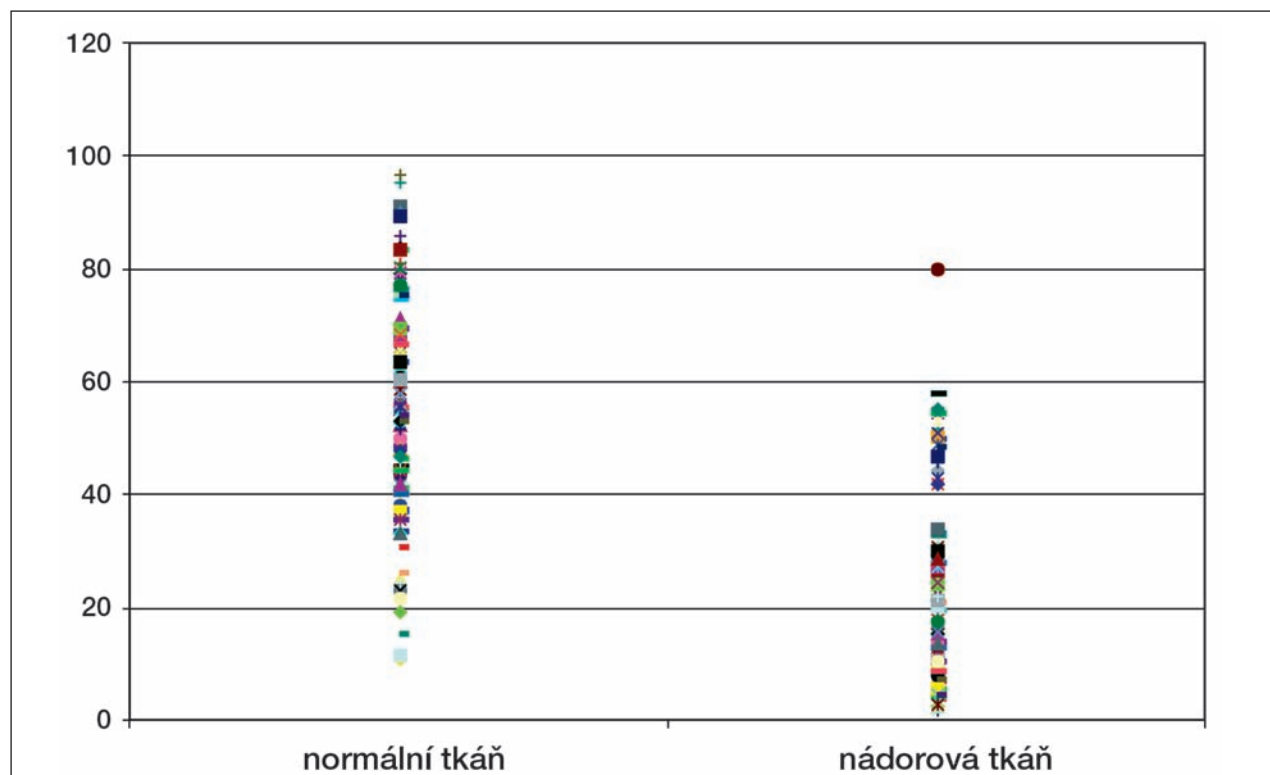
α a β řetězec hemoglobinu formují tetramer ($\alpha_2\beta_2$) primárně zodpovědný za transport kyslíku krví. Koncentraci hemoglobinu v séru již lze využít jako důležitý prediktivní faktor odpovědi na radioterapii či chemoterapii karcinomu prsu [27], dutiny ústní

a orofaryngu [28, 29]. Na druhou stranu hladina hemoglobinu v séru pacienta nesouvisí s anoxií nádoru [27].

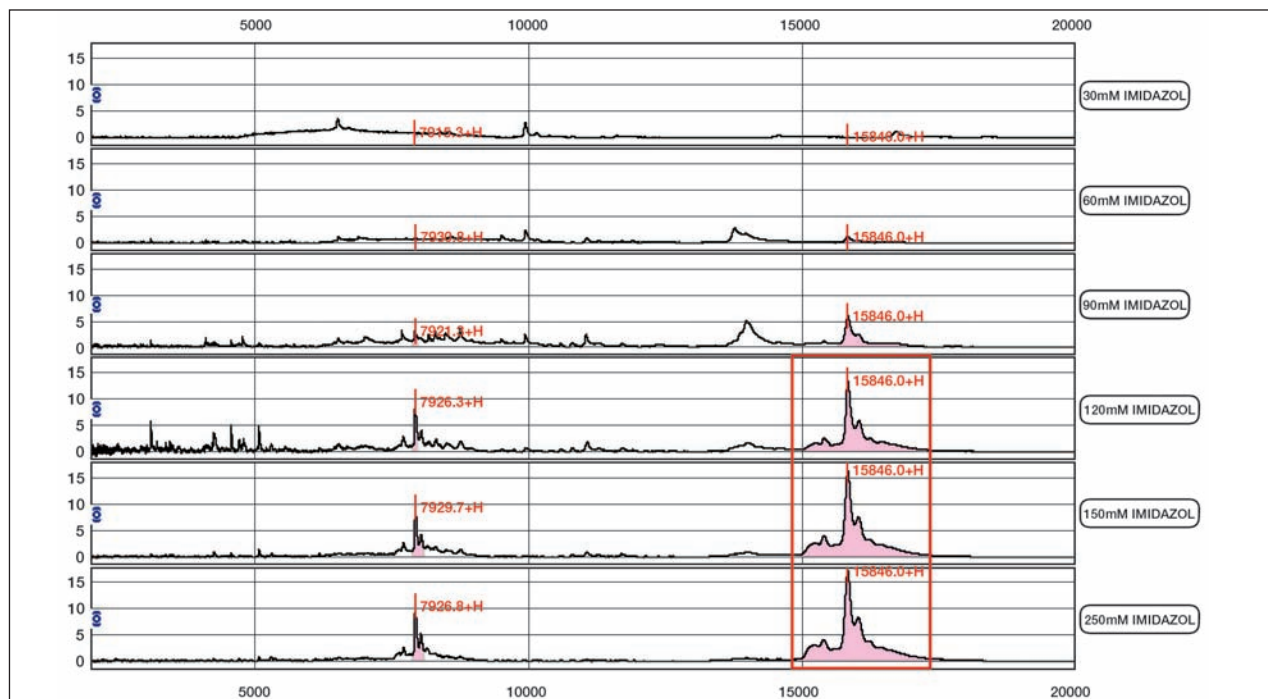
Naše výsledky ukazují na významné snížení hladiny β řetězce hemoglobinu v nádorové tkáni v porovnání s normální tkání, což je však zdánlivě v rozporu s analýzou vzorků tekutiny z mlékovodu. U pacientek s nádory vaječníku bylo pozorováno zvýšení sérové hladiny β řetězce hemoglobinu. Možným vysvětlením těchto rozporů je rozdílný podíl sérových složek na celkové extrahovatelné bílkovině v námi vyšetřených nádorových a normálních vzorcích. Stejný mechanismus (rozdílný podíl séra) se teoreticky mohl uplatnit i ve studii provedené na tekutině z mlékovodu, která byla získána po manuální masáži. Využití hemoglobinu jako prediktivního či prognostického markeru karcinomu prsu bude tedy nutné ověřit dalšími nezávislými studiemi. Vzhledem k poměrně nízké citlivosti metody SELDI-TOF MS se ukazuje jako nezbytné nalézt a využívat kombinace změn exprese několika proteinů u nádorových vzorků nebo sér pacientů s nádorovým onemocněním, charakterizující odlišné podskupiny onemocnění. Výsledky analýzy daného „fingerprintu“ u popisovaného souboru 105 karcinomů prsu jsou v současné době evaluovány na rozšířeném souboru karcinomů prsu ve vztahu ke klinicko-patologickým charakteristikám a k potenciálnímu využití jako biomarkerů nádorového onemocnění. Takto charakterizované proteinové expresní profily budou cenným doplňujícím zdrojem informací při histopatologické klasifikaci nádorů.

Poděkování

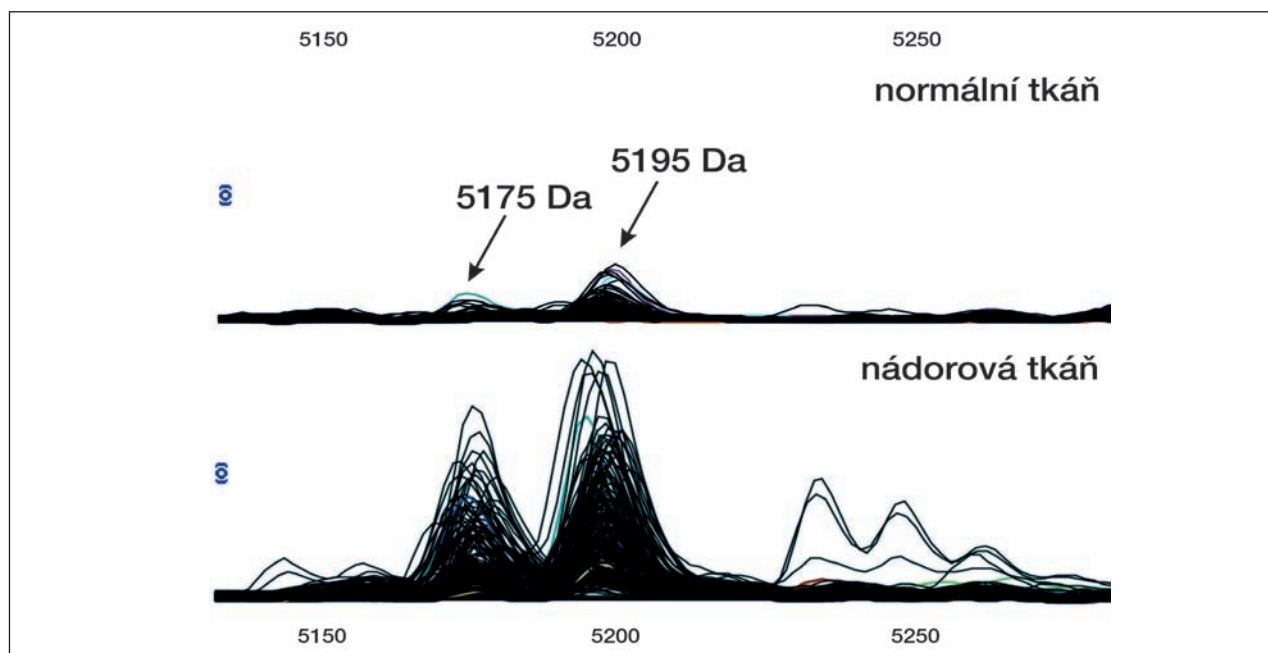
Tento projekt byl podporován z finančních zdrojů IGA MZ ČR NR 8338-3/2005.



Obr.1.: Intenzity signálu o m/z 15841 (vyjádřené jako plocha pod křivkou) pro normální a nádorovou tkáň



Obr.2.: Spektra jednotlivých frakcí v rozsahu 2 – 20 kDa po rozdělení směsného vzorku normální tkáně na IMAC koloně



Obr.3.: Překryv signálů vzorků normální a nádorové tkáně v oblasti 5175 a 5195 Da

Literatura

1. Tirumalai, R.S., et al., *Characterization of the low molecular weight human serum proteome*. Mol Cell Proteomics, 2003. 2(10): p. 1096-103.
2. T. William Hutchens, T.-T.Y., *New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1993. 7(7): p. 576-580.
3. Česková, P., et al., *Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a diagnostické proteomice: možnosti a limity*. Chemické listy, 2006. 100(11): p. 974-979.
4. Petricoin, E.F., et al., *Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer*. Lancet, 2002. 359(9306): p. 572-7.
5. Petricoin, E.F., 3rd, et al., *Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer*. J Natl Cancer Inst, 2002. 94(20): p. 1576-8.

6. Won, Y., et al., *Pattern analysis of serum proteome distinguishes renal cell carcinoma from other urologic diseases and healthy persons*. Proteomics, 2003. **3**(12): p. 2310-6.
7. Koopmann, J., et al., *Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(3): p. 860-8.
8. Vlahou, A., et al., *A novel approach toward development of a rapid blood test for breast cancer*. Clin Breast Cancer, 2003. **4**(3): p. 203-9.
9. Becker, S., et al., *Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) differentiation of serum protein profiles of BRCA-1 and sporadic breast cancer*. Ann Surg Oncol, 2004. **11**(10): p. 907-14.
10. Laronga, C., et al., *SELDI-TOF serum profiling for prognostic and diagnostic classification of breast cancers*. Dis Markers, 2003. **19**(4-5): p. 229-38.
11. Mathelin, C., et al., *Serum biomarkers for detection of breast cancers: A prospective study*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **96**(1): p. 83-90.
12. Nakagawa, T., et al., *Proteomic profiling of primary breast cancer predicts axillary lymph node metastasis*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11825-30.
13. Gast, M.C., et al., *SELDI-TOF MS serum protein profiles in breast cancer: Assessment of robustness and validity*. Cancer Biomark, 2006. **2**(6): p. 235-48.
14. Ricolleau, G., et al., *Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling identifies ubiquitin and ferritin light chain as prognostic biomarkers in node-negative breast cancer tumors*. Proteomics, 2006. **6**(6): p. 1963-75.
15. Roesch Ely, M., et al., *Transcript and proteome analysis reveals reduced expression of calgranulins in head and neck squamous cell carcinoma*. Eur J Cell Biol, 2005. **84**(2-3): p. 431-44.
16. Pilny, R., et al., *Surface-enhanced laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry reveals significant artifacts in serum obtained from clot activator-containing collection devices*. Clin Chem, 2006. **52**(11): p. 2115-6.
17. Stein, R.C. and M.J. Zvelebil, *The application of 2D gel-based proteomics methods to the study of breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002. **7**(4): p. 385-93.
18. Hathout, Y., et al., *Proteomic phenotyping: metastatic and invasive breast cancer*. Cancer Lett, 2004. **210**(2): p. 245-53.
19. Issaq, H.J., et al., *The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**(3): p. 587-92.
20. He, J., et al., *Detection of breast cancer biomarkers in nipple aspirate fluid by SELDI-TOF and their identification by combined liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Int J Oncol, 2007. **30**(1): p. 145-54.
21. Sauter, E.R., et al., *Proteomic analysis of nipple aspirate fluid using SELDI-TOF-MS*. Int J Cancer, 2005. **114**(5): p. 791-6.
22. Diamandis, E.P., *Analysis of serum proteomic patterns for early cancer diagnosis: drawing attention to potential problems*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(5): p. 353-6.
23. Pawlik, T.M., et al., *Proteomic analysis of nipple aspirate fluid from women with early-stage breast cancer using isotope-coded affinity tags and tandem mass spectrometry reveals differential expression of vitamin D binding protein*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 68.
24. Gygi, S.P., et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 994-9.
25. Kozak, K.R., et al., *Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer*. Proteomics, 2005. **5**(17): p. 4589-96.
26. Woong-Shick, A., et al., *Identification of hemoglobin-alpha and -beta subunits as potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of ovarian cancer*. Cancer Sci, 2005. **96**(3): p. 197-201.
27. Bottini, A., et al., *Pretreatment haemoglobin levels significantly predict the tumour response to primary chemotherapy in human breast cancer*. Br J Cancer, 2003. **89**(6): p. 977-82.
28. Glaser, C.M., et al., *Impact of hemoglobin level and use of recombinant erythropoietin on efficacy of preoperative chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **50**(3): p. 705-15.
29. Kovacs, R., R. Wilhelm, and D. Heinrichsohn, *Survival of exclusively irradiated patients with NSCC. Significance of pretherapeutic hemoglobin levels*. Strahlenther Onkol, 1998. **174**: p. 128-32.

AUTOR PRO KORESPONDENCI:

RNDr. Bořivoj Vojtěšek, DrSc.

Oddělení klinické a experimentální patologie,

Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, Brno, 656 53

vojtesek@mou.cz

Došlo / Submitted: 23. 4. 2007

Přijato / Accepted: 12. 9. 2007

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.