

PROTEOMICKÁ ANALÝZA A JEJÍ VYUŽITÍ VE VÝZKUMU MNOHOČETNÉHO MYELOMU

PROTEOMICS AND ITS APPLICATION IN MULTIPLE MYELOMA RESEARCH

POTÁČOVÁ A.¹, ČUMOVÁ J.^{1,2}, HÁJEK R.^{1,2,3}

¹UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM-ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

²LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

³INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

Souhrn

Základní metodou pro studium exprese proteinů je kombinace dvourozměrné elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Pro analýzu proteomu u pacientů s mnohočetným myelomem je možno využít plazmatické buňky či plazmu pacientů před léčbou, po léčbě a v průběhu onemocnění, což umožní monitorování léčebných odpovědí a možnost objevení nových biomarkerů zodpovědných za rezistenci či senzitivitu k podávanému léčivu.

Klíčová slova: proteomika, identifikace proteinů, dvourozměrná elektroforéza, mnohočetný myelom, plazma.

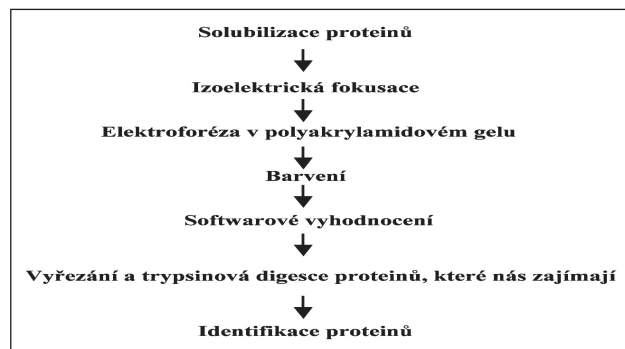
Summary

Two-dimensional gel electrophoresis combined with mass spectrometry has become a fundamental technique for the study of protein expression. Proteomic analysis of plasma cells or plasmatic proteins can be done before and after treatment. Proteomics offers the possibility of identification of disease-associated protein markers for prognostic evaluation and for the selection of targets for specific drug therapy.

Keywords: proteomics, two-dimensional gel electrophoresis, protein identification, multiple myeloma, plasma.

Úvod

Proteomika je vědní odvětví, pomocí něhož je možné analýzou všech proteinů přítomných v plazmě či buňkách charakterizovat strukturu a funkce celého proteomu za definovaných podmínek v daném okamžiku. Jejím cílem je separovat, identifikovat a charakterizovat proteiny a určit jejich vzájemné interakce. Proteomická analýza může být využita pro různé druhy vzorků jako jsou sérum a plazma, sliny, exudáty, buňky a jiné. Základní metodou pro studium exprese proteinů je kombinace dvourozměrné elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE) s hmotnostní spektrometrií (MS), pomocí níž je možné identifikovat separované proteiny (Obrázek č. 1).



Obrázek č. 1: Schéma návaznosti jednotlivých kroků proteomické analýzy (2D-PAGE/MS)

Metoda 2D-PAGE byla poprvé popsána v roce 1975 O'Farrellem (10). Další vývoj vedl ke kombinaci elektroforetických technik s chromatografií či hmotnostní spektrometrií, čímž bylo umožněno separovat a identifikovat proteiny i ze složitých komplexních vzorků, jako je například lidská plazma.

Vstupní materiál, požadavek na kvantitu, kvalitu a čistotu

Aby byla proteomická analýza využitelná v klinické praxi, je nutno vyšetřit co největší soubor pacientů, což umožní monitorování léčebných odpovědí a možnost objevení nových biomarkerů zodpovědných za rezistenci či senzitivitu k podávanému léčivu. Pro analýzu proteinového profilu u pacientů s mnohočetným myelomem je možno využít plazmatické buňky vyseparované z kostní dřeně, plazmu, popřípadě sérum.

Platná norma pro zpracování vzorku pro proteomickou analýzu neexistuje. Obecné doporučení pro 2D-PAGE je provést separaci vzorků ihned, to však z hlediska sběru biologického materiálu a technické náročnosti není možné, a proto se doporučuje veškerý materiál okamžitě po odběru zamrazit ve vzduchotěsných kryotubech a uchovávat v tekutém dusíku nebo v hlubokomrazicích boxech s konstantní teplotou minimálně -80°C. Tyto vzorky zpracovat ihned po rozmražení a opakovaně nezamrazovat (13, 12, 9).

Před separací pomocí 2D-PAGE musí být proteiny ve

vzorku solubilizovány, denaturovány, redukovány a alkylovány, aby byly narušeny veškeré mezimolekulové interakce, a aby každý výsledný proteinový spot reprezentoval jen jeden samostatný polypeptid. K solubilizaci vzorku se používají pufrý obsahující chaotropní látky (urea, thiourea), detergenty (dodecylsírán sodný, Triton X-100, CHAPS) a redukční činidla (dithiothreitol). Směs urea/thiourea je nezbytná pro účinné rozrušení vodíkových můstků a hydrofobních interakcí (3, 4). Detergenty se používají preventivně, aby bránily interakcím mezi hydrofobními doménami proteinů a redukční činidla proti zpětné oxidaci disulfidických vazeb. Pomocí těchto pufrů lze dosáhnout kompletního rozvolnění proteinů ve směsi.

Princip metody

2D-elektroforéza

2D-PAGE je založena na rozdělení proteinové směsi podle izoelektrických bodů a molekulových hmotností jednotlivých proteinů. Vzorek je nejprve separován v tenkém proužku akrylamidového gelu s imobilizovaným gradientem pH (IPG strip). V tomto kroku se bílkoviny rozdělí podle jejich okamžitého náboje, ten je nulový v oblasti pH odpovídající izoelektrickému bodu. Bílkoviny v izoelektrickém bodě tak ztrácejí mobilitu a nemohou již z tohoto místa migrovat dále. Poté je proužek gelu s rozdělenými bílkovinami převeden na horní okraj polyakrylamidového gelu. V elektrickém poli, kolmém na původní směr dělení, migrují proteiny k anodě v prostředí SDS a separují se podle svých molekulových hmotností. Výsledkem je dvourozměrná mapa, v níž každý protein zaujímá charakteristickou pozici. V závislosti na zvoleném pH gradientu stripu pro izoelektrickou fokusaci a na použité velikosti gelu je tato technika schopna rozdělit velká množství proteinů s molekulovou hmotností 6-300 kDa. Pomocí vysokokapacitních elektroforetických aparatur probíhá proteomická analýza u 12 vzorků současně, čímž se zvyšuje reprodukovatelnost vytvořených proteinových map. Nevýhodou této techniky je vysoká náročnost na kvalitu a kvantitu vstupního materiálu, nemožnost úplného kvantitativního vyhodnocení v celém rozsahu koncentrací, jelikož se hladiny proteinů pohybují v širokém dynamickém rozmezí až 10 řádů. Další limitací je stále velice obtížná analýza hydrofobních proteinů, velmi malých a extrémně velkých proteinů (5, 11, 14, 7).

Vizualizace proteinů

Po 2D-elektroforéze je třeba separované proteiny na gelu zafixovat a poté vizualizovat. Fixace probíhá několik hodin v roztoku ethanolu/kyseliny octové a vody a poté je možno barvit proteiny vybranou technikou. Jednotlivé typy značení proteinů mají své přednosti, ale i své nevýhody. Nejběžněji používanými jsou barvení Coomassie brilliant blue a stříbrem. Barvení Coomassie blue je jednoduché, je však limitováno detekčním limitem (0,2 µg proteinu na spot), a umožní tak detekovat pouze majoritní složky proteinové směsi (3). Naproti tomu stříbření je mnohem vhodnější nástroj pro detekci proteinů s nízkými koncentracemi ve vzorku, neboť je až 100 krát senzitivnější než Coomassie blue. Obě tyto techniky však vykazují poměrně malé dynamické rozmezí, tendenci k negativnímu barvení jistých

proteinů a malou reprodukovatelnost, která je u barvení Coomassie o něco vyšší, jelikož se jedná se o end-point techniku barvení, zatímco stříbření je založeno na subjektivním vyhodnocení intenzity barvení, což snižuje využitelnost pro další kvantitativní vyhodnocování. Zavedením fluorescenčních barvicích technik se na trhu objevila alternativa k stříbření. Barvení proteinů pomocí Sypro Orange, Sypro Red a Cy2, 3 a 5 má srovnatelnou senzitivitu se stříbřením, což umožňuje detekovat i nízkoabundantní proteiny ve směsi a navíc disponují tyto techniky širokým dynamickým rozmezím, a tudíž jsou mnohem efektivnější (5). Pro kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení proteomických map nabízí několik firem hardwarové vybavení (scannery, fluorescenční scannery) a softwarové vybavení, například Bio-Rad (PDQuest), Amersham Biosciences (ImageMaster).

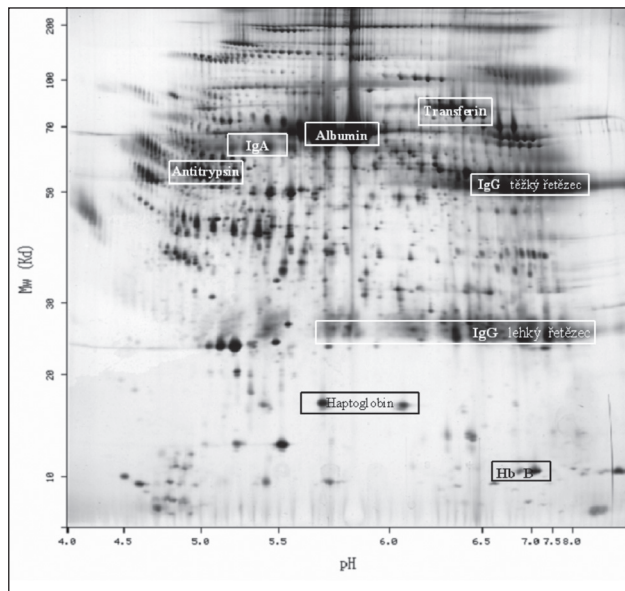
Hmotnostní spektrometrie

Před vlastní analýzou na hmotnostním spektrometru je nutné vybrané spoty z gelu vyřezat, převést do roztoku a bílkoviny enzymaticky naštěpit na směs menších peptidů. Nejčastěji je používán trypsin, který až na výjimky štěpí za argininem a lyzinem, a generuje tak peptidy o délce cca 10-30 aminokyselin (11).

Pro identifikaci proteinů (z jednotlivých spotů, vyřezaných z gelu) se využívá hmotnostní spektrometrie, která na základě analýzy naštěpených peptidů poskytuje vedle vlastní identifikace i informaci o aminokyselinové sekvenci proteinu či o druhu a lokalizaci modifikací. MS je založena na rozdělení iontů analyzovaných látek podle jejich poměru hmotností a náboje (m/z) v elektrickém/magnetickém poli. K analýze proteinů se například používá ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s analyzátozem doby letu (TOF, time-of-flight). Po ionizaci jsou látky urychleny silným elektrickým polem (25–30 kV) a vstupují do trubice analyzátoru doby letu, kde jsou separovány, následně dopadají do detektoru. Z doby průletu je pak zjištěn jejich m/z , resp. molekulová hmotnost. Jako komplementární ionizační technika k MALDI pro analýzu peptidů a proteinů se používá elektrosprej, schopný produkovat vícenásobně nabitě ionty, které jsou pak analyzovány hmotnostními analyzátoři různého typu (např. iontová past). V proteomické analýze se obvykle používá ve spojení on-line s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Tato kombinace umožňuje snadnější analýzu směsí, příp. odlišení analytu od kontaminujících složek. Vyšší specifitu a podrobnější informace je možné získat pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS^n). Vybraný iont je fragmentován (např. za přítomnosti helia, methanu) a poskytuje MS/MS spektrum. Současné spektrometry automaticky produkují MS/MS spektra na základě různě nastavených parametrů, např. intenzity přítomných iontů, přítomnosti vybraného iontu, jednoho ze seznamu vyprodukovaných iontů apod. Další možné modifikace MS technik jsou podrobněji popsány v článkách Zelená (14), Petrák (11).

Získaná MS , resp. MS/MS data jsou pak použita k vyhledávání a identifikaci proteinu pomocí databázového prohledávání. Na internetu je dostupných několik data-

bázi zaměřených na identifikaci proteinů, např. NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. K dispozici jsou i vzorové 2D-proteinové mapy pro jednotlivé typy vzorků (Obrázek č. 2), viz ExPASy Molecular Biology Server <http://www.expasy.ch/> (7).



Obrázek č. 2: Ukázka 2D mapy proteinového profilu lidské plazmy. Převzato a doplněno z <http://www.expasy.ch>

Specifická nastavení a problémy u MM

Proteomická analýza výše zmíněných biologických materiálů však naráží na určité limity. Klíčovou podmínkou pro vytvoření proteinového profilu myelomových buněk pomocí 2D-PAGE je jejich dostatečné množství a vysoká čistota. Proto je nutno před vlastní analýzou získat například imunomagnetickou separací (MACS) alespoň jeden milion plazmatických buněk s čistotou vyšší než 90%. Základním problémem při proteomické analýze plazmy či séra je detekovat minoritní proteiny s malou molekulovou hmotností v přítomnosti vysokoabundantních proteinů (5), kterých je v plazmě 85-90% z celkového množství proteinů. U těchto vzorků se doporučuje selektivně odstranit tyto majoritní proteiny a provádět 2D separaci pouze z minoritně zastoupených proteinů (viz níže).

2-DE analýza lidské plazmy

Plazma, základní a nej dostupnější klinický vzorek, obsahuje značné množství (60-80 mg/ml) a široké spektrum proteinů. Mnohých z nich je již po dlouhá léta využíváno jako ukazatelů fyziologických funkcí a biomarkerů patofyziologických procesů. Studium proteomu plazmy slibuje pokrok v oblasti biologického a klinického výzkumu mnoha onemocnění, což se sebou přináší naději na objevení nových biomarkerů použitelných pro diagnostiku onemocnění, předpověď odezvy na terapii a monitorování progresu onemocnění (1, 6, 8).

Pro proteomickou analýzu se obecně doporučuje plazma sbíraná do EDTA nebo citrátu zpracovaná co nejrychleji od odběru. Lidská plazma obsahuje kolem 10 000 různých proteinů a disponuje velice širokým kvalitativním i kvant-

titativním dynamickým rozmezím, přičemž rozdíly mezi hladinami majoritních a minoritních proteinů se pohybují v rozmezí 10 řádů (1). Většina z nich jsou proteiny s velmi nízkým zastoupením. Nejpoměrněji zastoupenými proteiny v plazmě jsou albumin (50 – 70%) a imunoglobulin G (8 – 26%). Během separace na gelu vysoké koncentrace těchto proteinů maskují přítomnost proteinů, které mají stejný izoelektrický bod či podobnou molekulovou hmotnost. Aby bylo možno detekovat minoritní proteiny, je třeba nejdříve odstranit většinově zastoupené proteiny. Toho je možno docílit pomocí afinitní kolony či za použití specifických protilátek. K tomuto účelu je na trhu dostupných několik analytických metod využívajících různých deplečních principů (2).

Na našem pracovišti jsou využívány dvě metody:

- 1) ProteoPrep Blue Albumin and IgG Depletion Kit od Sigma-Aldrich, pomocí něhož lze ze séra či plazmy odstranit albumin a IgG
- 2) High Capacity Multiple Affinity Removal System od Agilent Technologies (MARS). Jedná se o separaci pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie za použití speciální afinitní kolony pro vysoce specifickou imunoseparaci šesti v plazmě majoritně zastoupených proteinů: albuminu, IgG, IgA, haptoglobinu, antitrypsinu a transferrinu.

Stávající význam a očekávaný přínos 2D-PAGE u MM

Uplatnění proteomiky v problematice MM je doposud minimální. Proteomika by měla navázat tam, kde již genomický přístup nestačí. O rozvoji a dynamice onemocnění rozhodují kromě vlastností myelomových plazmatických buněk i jejich vzájemné interakce s prostředím kostní dřeviny (6). Cytokinové interakce mezi plazmatickými buňkami a buňkami kostní dřeviny umožňují růst, přežívání a migrace myelomových buněk a předpokládá se, že částečně odpovídají za přechod monoklonální gamapatie do MM. Analýzou proteomu můžeme získat hlubší a komplexnější vysvětlení příčin progresu monoklonální gamapatie nejasného významu do MM, příčin rezistence a senzitivity pacientů s MM na léčbu. Pomocí proteomické analýzy by mohl být nalezen nový panel biologických markerů zodpovědných za rezistenci či citlivost na danou léčbu, či na testované nové látky, což by umožnilo v klinické praxi předem specifikovat optimální léčebnou strategii pro konkrétního pacienta, a tak léčit MM maximálně efektivně.

	Výhody 👍	Nevýhody 👎
1) ProteoPrep Blue Albumin and IgG Depletion Kit	rychlá, instrumentálně nenáročná, přijatelná cena, možnost depletovat až 25 vzorků paralelně, kompatibilní s 2D-PAGE a hmotnostní spektrometrií	depletuje pouze albumin (95%) a IgG (80%), má nižší účinnost
2) High Capacity Multiple Affinity Removal System	depletuje 6 vysokoabundantních proteinů, což znamená až 85-90% celkových proteinů plazmy	časově náročná, drahá, není možné separovat vzorky paralelně, vzorky je nutno zkoncentrovat a odsolit

Tabulka č. 1: Porovnání ProteoPrep Blue Albumin and IgG Depletion Kit s MARS kapalinovou chromatografií

Závěr

Ač se jedná o časově a instrumentálně velice náročnou metodiku, která má stále mnoho omezení převážně v oblasti reprodukovatelného kvantitativního vyhodnocení, představuje rozvoj proteomiky novou a vzrušující cestu k bližšímu poznání patologických procesů na molekulární úrovni. Informuje nás o expresi specifických proteinových profilů a o jejich změnách významných pro různé patologické stavy. Předpokládá se, že dalším rozvojem proteo-

mických metod a v kombinaci s výsledky z gemonických analýz budeme moci složit úplný a vyčerpávající obraz většiny patologických stavů a najít nové biomarkery, které by sloužily pro diagnostiku onemocnění, předpověď odezvy na terapii a monitorování progresu onemocnění.

Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

Literatura

1. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002 Nov;1(11):845-67. Review. Erratum in: *Mol Cell Proteomics*. 2003 Jan;2(1):50.
2. Björnell K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics*. 2005 Jan;5(1):307-17.
3. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004 Dec;4(12):3665-85. Review. Erratum in: *Proteomics*. 2005 Feb;5(3):826-7.
4. Herbert B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 1999 Apr-May;20(4-5):660-3.
5. Herosimczyk A, Dejeans N, Sayd T, et al. Plasma proteome analysis: 2D gels and chips. *J Physiol Pharmacol*. 2006 Nov;57 Suppl 7:81-93.
6. Hideshima T, Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Cytokines and signal transduction. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(4):509-24.
7. Chambers G, Lawrie L, Cash P, Murray GI. Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol*. 2000 Nov;192(3):280-8.
8. Kim MR, Kim CW. Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 Apr 15;849(1-2):203-10.
9. Lundblad RL. Considerations for the Use of Blood Plasma and Serum for Proteomic Analysis. *The Internet Journal of Gastroenterology* 2005; 1(2).
10. O'Farrell H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem*. 1975; 250: 4007-4021.
11. Petrák J. Proteomics and its role in medicine *Cas Lek Cesk*. 2005;144(6):365-70.
12. Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, et al. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics*. 2005 Aug;5(13):3262-77.
13. Tworoger SS, Hankinson SE. Collection, processing, and storage of biological samples in epidemiologic studies: sex hormones, carotenoids, inflammatory markers, and proteomics as examples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Sep;15(9):1578-81.
14. Zelená J, Hájek R. Proteomics techniques and their application in haemato-oncologic malignancies. *Cas Lek Cesk*. 2007;146(7):586-92.