Proteomická analýza nádorových buněk

Proteomic Analysis of Cancer Cells

Tomancová A.[1], Šedo O.[2], Zdráhal Z.[2], Mayer J.[1], Pospíšilová Š.[1]

[1] Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematoonkologická klinika, Lékařská fakulta MU a FN Brno
[2] Oddělení funkční genomiky a proteomiky, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU Brno

Souhrn
Výrazný rozvoj analytické instrumentace a metodických přístupů během posledních dvou desetiletí významně rozšířil možnosti studia proteinů v živých systémech. Analýza tzv. proteomu poskytuje neustále se prohlubující náhled do biologických procesů na úrovni kvalitativních a kvantitativních změn proteinového složení v souvislosti s fyziologickými a patologickými stavy organizmu, čímž nabízí možnost jejich lepšího pochopení a stává se přínosem pro vývoj a validaci diagnostických a terapeutických přístupů. Proto se na studium lidského proteomu v současné době soustřeďuje i pozornost odborné veřejnosti v oblasti onkologie. V tomto článku jsou vysvětleny principy nejvyužívanějších proteomických metod (gelová elektroforéza, kapalinová chromatografie, hmotnostně spektrometrická analýza, čipové technologie) a uvedeny příklady jejich využití v oblasti onkologických, resp. hematoonkologických onemocnění.

Klíčová slova
proteomika – proteiny – onkologie – hematologie

Summary
The rapid development of analytical instrumentation and methodical approaches in the course of the last two decades has significantly extended the possibilities of studying proteins in living systems. Proteomic analysis provides ever deeper insights into the molecular nature of biological processes in terms of qualitative and quantitative changes in protein composition in connection with the physiological and pathological states of the organism. Thus, proteomic analysis contributes to a better understanding of these processes and becomes a tool for the development and validation of diagnostic and therapeutic approaches. Thanks to recent achievements, the attention of cancer specialists is more and more focused on human proteome research. In this brief review we explain the principles of widely used proteomic techniques (gel electrophoresis, liquid chromatography, mass spectrometry analysis, protein array technologies) and show examples of their application in oncology, namely hematooncological diseases.

Key words
proteomics – proteins – oncology – hematology

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NS9683-4/2008 a NS10439-3/2009 a výzkumnými záměry MSM00216 22415 a MSM0021622430.

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

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, pruducts, 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.

RNDr. Šárka Pospíšilová, PhD.
Centrum molekulární biologie
a genové terapie
Interní hematoonkologická klinika
FN Brno
Černopolní 9
625 00 Brno
e-mail: sarka.pospisilova@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 4. 9. 2009
Přijato/Accepted: 20. 9. 2009

Úvod

Základní role proteinů v živých organizmech byla prokázána už v začátcích biologického bádání. Termín „protein" poprvé použil Berzelius roku 1838, aby ilustroval význam těchto molekul. Název „protein" odvodil od řeckého slova „proteios" znamenající „první pozici" [1].

Po úspěšném rozluštění lidského genomu [2] následuje další etapa v poznání molekulární podstaty buněčných procesů, a to studium vlastních vykonavatelů většiny těchto procesů, tedy proteinů. Vědní disciplína zabývající se analýzou proteinů, resp. proteomu, se nazývá proteomika. Termín „proteom" vytvořený spojením slova protein a zažitého termínu „genom" poprvé použil v roce 1994 Marc Wilkins [3]. Proteom bývá definován jako kompletní sada bílkovin v buňce, tkáni nebo organizmu zahrnující veškeré jejich formy [4]. Vědní disciplína proteomika studuje z hlediska kvality i kvantity všechny proteinové formy, které jsou exprimovány organizmy v závislosti na jejich funkci, stáří a externích faktorech, jež příslušný organizmus ovlivňují [5]. Jinými slovy předmětem zájmu proteomiky je popis struktury a funkce všech funkčních produktů genové exprese, zahrnující identifikaci každého proteinu včetně jeho kvantifikace, lokalizace v buňce, určení protein-proteinových interakcí a charakterizace posttranslačních modifikací (např. fosforylace, acetylace, glykosylace, metylace aj.), které hrají důležitou roli v buněčných procesech [6–7]. Analýza proteomu poskytuje náhled do biologických procesů v závislosti na koncentraci proteinů v daném čase, čímž nabízí možnost lépe pochopit fyziologické a patologické stavy organizmu a stává se přínosem pro vývoj a validaci diagnostických a terapeutických přístupů. Např. v hematoonkologii se pomocí aplikace proteomických přístupů rozšiřují možnosti popisu vývoje hematopoetických buněk, leukemogeneze nebo funkční aktivity zralých buněk [8].

Analýza proteomu díky jeho komplexnosti (v případě člověka se jedná až o stovky tisíc proteinů či jejich forem) představuje podstatně složitější úkol, než jakým je analýza genomu. Vedle velkého počtu molekul je to také rozpětí koncentrací jednotlivých komponent (u krve je to až deset řádů), které velmi komplikuje analýzu minoritních složek, např. signální proteiny. Charakterizace posttranslačních modifikací, jež hrají významnou roli v mnoha buněčných procesech, klade ještě náročnější požadavky na přípravu vzorku i na instrumentaci.

V posledních 20 letech zaznamenaly proteomické metody i odpovídající instrumentace prudký rozvoj. Jedním z hlavních nástrojů proteomické analýzy se stala hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry – MS) ve spojení s vybranými separačními metodami. V následujícím textu je uveden stručný přehled separačních technik a nejběžnější MS instrumentace. Kompletní přehled MS instrumentace je uveden např. v práci B. Domona [9]. Pozornost je věnována také technikám využívajícím proteinové čipy.

Dvourozměrná gelová elektroforéza (2D-GE)

Dvourozměrná gelová elektroforéza byla poprvé popsána O'Farrelem v roce 1975 a stala se klíčovou metodou pro separaci komplexních směsí proteinů v biologických vzorcích. Metoda kombinuje dva separační kroky. V prvním rozměru jsou rozpuštěné a denaturované proteiny separovány v proužku polyakrylamidového gelu s imobilizovaným gradientem pH dle svých izoelektrických bodů (hodnota pH, při němž mají proteiny nulový náboj) metodou izoelektrické fokusace. V druhém rozměru je tento proužek gelu obsahující separované proteiny z předchozího kroku přiložen na separační gel. Proteiny jsou separovány technikou SDS-PAGE podle svých relativních molekulových hmotností (Mr) [10] (schéma. 1).

Tato metoda je schopna simultánně rozlišit více než 5 000 proteinů, po vizualizaci lze metodami hmotnostní spektrometrie detekovat méně než 1 ng proteinu ve spotu. Dokáže separovat také jednotlivé izoformy i posttranslačně modifikované proteiny. Velmi často se využívá pro hledání nových markerů na základě kvantitativních a kvalitativních rozdílů v proteinové expresi, které jsou stanoveny prostřednictvím softwarové analýzy obrazu [11].

Mezi nevýhody 2D-GE patří množství směsných spotů obsahujících různé proteiny se stejným pI a Mr, omezené možnosti detekce proteinů s nízkým, resp. vysokým pI, vysokou hydrofobicitou nebo příliš vysokou/nízkou Mr. Reprodukova-

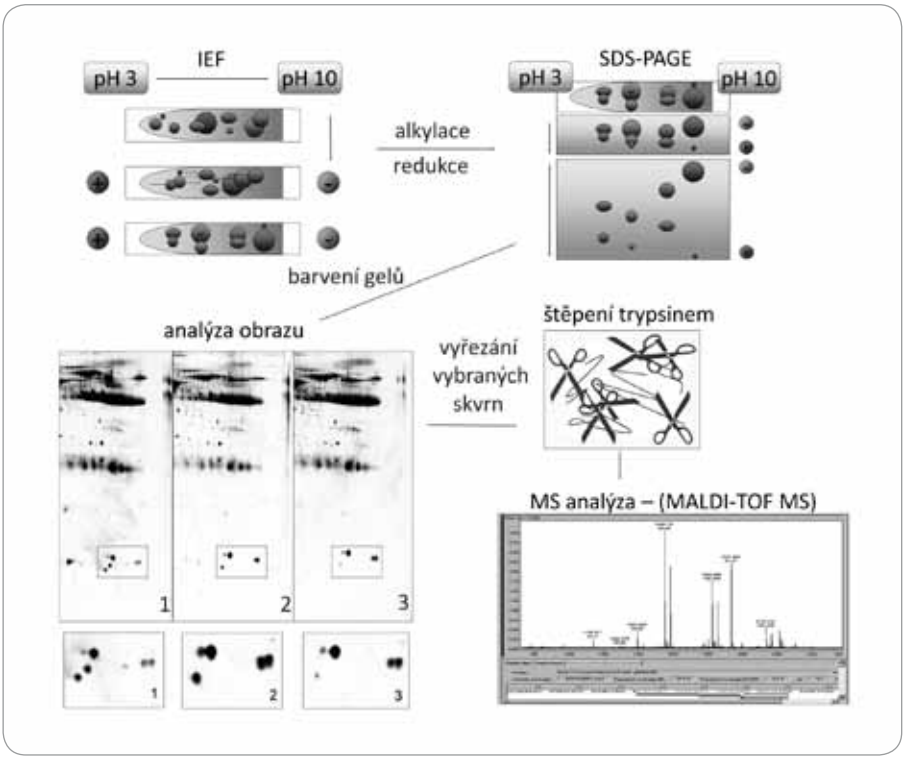


Schéma 1. Dvourozměrné gelové elektroforézy.

telnost metody spojená s 2D-GE je ovlivněna mnoha faktory, např. přípravou vzorků, původem činidel, použitou barvicí metodou, způsobem a kvalitou vyhodnocení gelů pomocí zvoleného programu pro analýzu obrazu. Výsledkem je celková variabilita metody pohybující se mezi 20 a 30 % [12].

Jedna z prvních studií využívající 2D gelovou elektroforézu k analýze hematologických vzorků byla publikována v roce 1988. Srovnávána byla exprese proteinů v různých typech krevních buněk (neutrofily, nefrakcionované lymfocyty periferní krve, T-lymfocyty, B-lymfocyty, T4 a T8 antigen pozitivní lymfocyty, buňky kostní dřeně aj.). Na jejím základě byl popsán protein p18 jako onkoprotein, jehož množství se mění v závislosti na jeho buněčném původu [13]. Na základě 2D-GE analýzy pozorovali v roce 2005 Cui JW a jeho skupina rozdílnou expresi proteinů mezi leukocyty pacientů s akutní leukemií a zdravými jedinci. Současně popsali i rozdíly v proteinové expresi mezi jednotlivými podtypy akutní myeloidní leukemie a akutní lymfoidní leukemie [14]. Ve stejném roce publikovali odlišné zastoupení proteinů mezi jednotlivými podtypy akutní myeloidní leukemie také Lopez-Pedrera et al. Identifikované proteiny patřily ke skupině metabolických enzymů, antioxidantů, strukturních proteinů a produktů supresorových genů. Sedm z identifikovaných proteinů vykazovalo také rozdílné zastoupení mezi blastocyty a normálními mononukleárními buňkami. Jednalo se o alfa-enolázu, RhoGDI2, annexin A10, katalázu, peroxiredoxin 2, tromomyosin 3 a lipocortin 1 (annexin 1). Tyto rozdílně exprimované proteiny mohou ovlivňovat významné metabolické dráhy buněk, např. glykolýzu, nádorovou supresi, apoptózu, angiogenezi a metastazování [15].

Diferenční gelová elektroforéza (2D-DIGE)

Z principu dvourozměrné gelové elektroforézy vychází další metoda, tzv. diferenční gelová elektroforéza (difference gel electrophoresis – 2D-DIGE). Poprvé byla popsána skupinou Jona Mindena [16]. Tato technika je založena na pre-elektroforetickém barvení vzorků fluorescenčními značkami (Cy2, Cy3 a Cy5), což umožňuje současnou separaci až tří proteinových vzorků na jednom gelu. Jednotlivé vzorky (např. zdravá vs nemocná tkáň, případně i referenční vzorek) jsou označeny značkami lišícími se vlnovou délkou emitovaného a excitovaného světla. Následně jsou všechny vzorky spojeny a jako jediný směsný vzorek podstupují klasickou 2D-GE. Protože jsou proteinové vzorky separovány na stejném gelu současně, proteiny společné smíchaným vzorkům migrují společně, díky tomu je zvýšena reprodukovatelnost metody. Tato metoda takto částečně odstranila některé z nevýhod klasické 2D-GE [17].

Na základě 2D-DIGE byly Wangem a jeho skupinou popsány kvantitativní rozdíly u 194 proteinů mezi směsí vzorků krevní plazmy pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně bez projevu reakce štěpu proti hostiteli a po projevu této reakce [18]. Skupina Y. J. Jianga pozorovala změny v proteinovém složení buněčných linií Burkittova lymfomu v závislosti na působení chemoterapie adriamycinu [19].

Desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice – hmotnostní spektrometrie (MALDI-MS)

Pro charakterizaci proteinů separovaných elektroforetickými metodami se velmi často využívá hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry – MS) s ionizací MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization – MALDI). Obecně, základním principem MS analýzy je přesné určení molekulové hmotnosti analyzovaných molekul, resp. jejich fragmentů. Proteiny jsou po gelové elektroforetické separaci vyříznuty z gelu a specificky naštěpeny proteázou, nejčastěji trypsinem, který štěpí proteiny v místě Lys a Arg. Takto vznikají peptidy o průměrné délce 10–30 aminokyselin, jejichž směs je pak podrobena MS analýze.

Prvním krokem hmotnostní analýzy je vždy ionizace. Při použití ionizace MALDI, která je jednou z nejčastěji používaných ionizačních technik pro MS analýzu biomolekul, je nejprve směs naštěpených peptidů smíchána s roztokem organické látky, obvykle derivátem aromatické karboxylové kyseliny (tzv. matrice), a nanesena na vzorkovací destičku. Po zaschnutí je vzorkovací destička vsunuta do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Vlastní ionizace je vyvolána krátkým pulzem laserového paprsku, jehož energii z velké části absorbuje matrice a šetrnou formou předá peptidům ve vzorku, aniž dojde k jejich nežádoucí fragmentaci. Peptidy během procesu MALDI přecházejí do plynné fáze převážně v podobě molekulových iontů. Dalším krokem je pak separace vzniklých iontů v hmotnostním analyzátoru. Nejčastěji používaným typem ve spojení s MALDI je průletový analyzátor (time-of-flight – TOF). Ionty jsou před vstupem do průletového analyzátoru urychleny v elektrickém poli tak, aby jim byla udělena stejná kinetická energie, a po průletu analyzátorem dopadají na detektor. Změřená doba letu iontů je závislá na jejich náboji a hmotnosti. Výsledkem analýzy je v tomto případě zjištění přesných molekulových hmotností jednotlivých peptidů (s přesností řádově v ppm). Naměřené molekulové hmotnosti naštěpených peptidů získaných z jednotlivých spotů na gelu jsou vstupními daty pro identifikaci proteinu pomocí databázového prohledávání, kdy jsou experimentální data srovnávána s daty vytvořenými *in silico* vyhledávacím programem z primárních sekvencí proteinů v dostupných proteinových databázích. Tento způsob identifikace proteinů se označuje jako peptidové mapování (peptide mass fingerprinting) [20].

Informace o primární sekvenci peptidů vedoucí k spolehlivější identifikaci proteinů na základě cíleně vytvořených fragmentů jednotlivých peptidů lze získat pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) [21].

Desorpce/ionizace laserem z upravených povrchů SELDI-TOF-MS

Na rozdíl od MALDI využívá technika SELDI (surface-enhanced laser desoption/ionization time-of-flight mass spectrometry) speciálních vzorkovacích destiček (tzv. čipů) s různými chromatografickými povrchy umožňujícími úpravu vzorků přímo na destičce [22]. Malé množství vzorku je naneseno na čip, který selektivně váže různé subtypy proteinů v surovém vzorku pomocí adsorpce, elektrostatických nebo afinitních interakcí. Po krátké inkubaci jsou vhod-

ným pufrem a vodou odmyty nenavázané proteiny a nespecificky vázané látky [23].

Technika SELDI je takřka výhradně spojena s průletovým analyzátorem a využívá se k měření profilů, tzn. zastoupení peptidů a proteinů s nízkou Mr ve vzorcích (nejčastěji do Mr 20 kDa). Dostupné přístroje tohoto typu neumožňují identifikaci jednotlivých složek vzorku. Výhodou SELDI-TOF-MS je jeho relativně vysoká tolerance vůči nečistotám ve vzorcích, nízké požadavky na množství vstupního materiálu a minimální požadavky na přípravu vzorků pro analýzu [24]. K nevýhodám řadíme nepřímou identifikaci proteinů a menší citlivost pro proteiny s vysokou relativní molekulovou hmotností (> 20kDa).

Tato technika se nejčastěji využívá pro hledání potenciálních biomarkerů, zejména v oblasti nádorových onemocnění [25–26], ale je možno ji uplatnit i u dalších chorob, např. pro akutní mozkové příhody [27], tromboembolii [28], remodelaci arteriálních stěn při hypertenzi [29] a další. Díky tomuto přístupu byly také popsány specifické změny v proteomu např. kmenových buněk po nízkých dávkách radioaktivity v rámci terapie [30] nebo změny proteinového složení u AML buněk s FLT3-IDT mutací [31].

MS identifikace proteinů s využitím vícerozměrné kapalinové chromatografie

Vedle dnes již klasické cesty identifikace proteinů pomocí elektroforetických separací a MALDI-MS popsané výše lze alternativně využít vícerozměrné separace peptidů pomocí kapalinové chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií a databázovým prohledáváním (multidimensional protein identification technology – MudPIT).

Technika MudPIT byla poprvé použita v Yatesově laboratoři [32]. Komplexní směs proteinů je štěpena v roztoku specifickou proteázou. Následně jsou naštěpené peptidy separovány dvou- či vícerozměrnou kapalinovou chromatografií [33]. Obvykle v prvním rozměru jsou peptidy separovány na základě náboje na katexové koloně a poté jsou peptidy dle hydrofobicity rozděleny na koloně s reverzní fází. Eluované peptidy jsou *on-line* identifikovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie využívající ionizaci elektrosprejem (electrospray ionization – ESI) [34]. Technikou ESI jsou peptidy ionizovány v kapalné fázi prostřednictvím spreje drobných kapiček, na který je vloženo napětí. V protiproudu sušícího plynu jsou pak odstraněny molekuly rozpouštědla a do analyzátoru hmotnostního spektrometru vstupují peptidy v podobě vícenásobně nabitých molekulových iontů. Tato ionizační metoda umožňuje přímé spojení MS se separací peptidů pomocí kapalinové chromatografie (liquid chromatography – LC). Schéma metody MudPIT je znázorněno na obr. 2. MudPIT umožňuje rychlou a simultánní separaci a identifikaci proteinů a peptidů v komplexní směsi [35]. Na druhou stranu MudPIT není vhodný pro sledování kvantitativních rozdílů expresí jednotlivých proteinů [36].

Koch et al popsali využití metody MudPIT k identifikaci nových proteinových interakcí onkogenu c-MYC, který kóduje transkripční faktor nezbytný pro indukci proliferace buněk, s cílem odhalit nové funkce a případně i dosud neznámé regulátory c-MYC. Identifikovali 221 proteinů spojených s c-MYC, z nichž jen u 17 bylo toto spojení známo. Mezi nově identifikovanými regulátory c-MYC patří např. DBC-1, FBX29, KU70, MCM7, Mi2-beta/CHD4, RNA Pol II, RFC2, RFC3, SV40 Large T Antigen, TCP1alpha, U5-116kD, ZNF281. Ektopicky exprimovaný FBX29 a E3 ubikvitinligáza snižují hladinu proteinu c-MYC a inhibují jeho transaktivaci, zatímco limitující množství FBX29 koncentraci c-MYC zvyšuje. Výsledky této skupiny naznačují, že c-MYC bez působení mitogenních transkripčních faktorů reguluje buněčnou proliferaci přímým spojením s proteinovými komplexy zahrnutými do různých syntetických procesů nutných pro dělení buňky. Komplexní popis sub-proteomu spojeného s c-MYC by mohl vysvětlit jeho regulaci [37].

Metoda MudPIT byla v oblasti hematologie využita také při charakterizaci proteinů krevních destiček v souvislosti s aterosklerotickým poškozením. Bylo určeno více než 300 proteinů krevních destiček zapojených do aktivace trombinu. Mezi nimi např. secretogranin III, cyclophilin A a calumenin, které byly identifikovány při aterosklerotických změnách cév, ale ve zdravých cévách nalezeny nebyly [38].

Kvantifikace pomocí hmotnostní spektrometrie

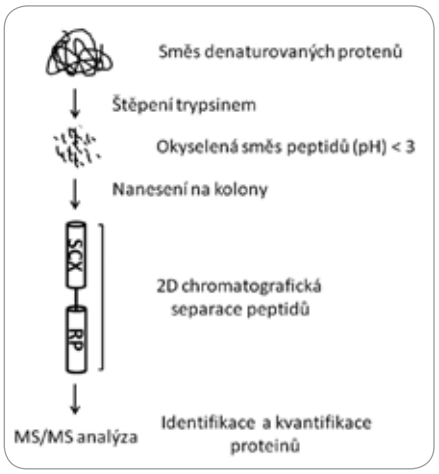
Výše zmíněné postupy poskytují jen nedostatečně přesné informace o kvantitě proteinů, např. kvůli relativně nízké reprodukovatelnosti (2D-GE). K překonání těchto nedostatků byly vyvinuty metody kvantifikace využívající hmotnostní spektrometrie, které současně umožňují i souběžnou identifikaci kvantifikovaných proteinů. Jsou to především metody založené na využití izotopicky rozdílných značek. Některé z nich jsou popsány níže.

ICAT

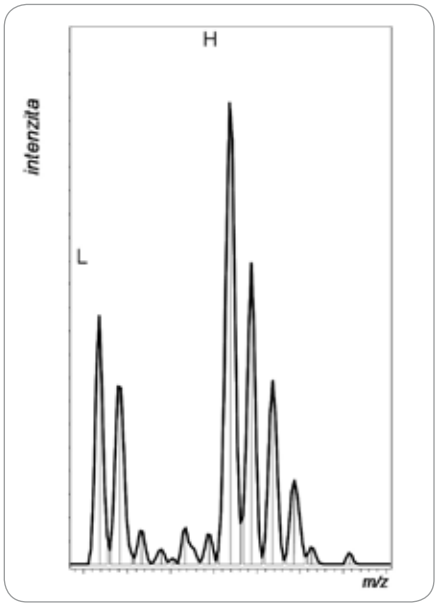
Historicky první metodou využívající izotopové značení byla metoda izotopově rozdílných afinitních značek (isotope coded affinity tags – ICAT) vyvinutá R. ebersoldem a jeho kolegy na univerzitě ve Washingtonu v roce 1999 [39]. Princip této metody spočívá v označení dvou vzorků (např. pro porovnání zdravé a nemocné tkáně) různě „těžkými" variantami značky vázajícími se na cystein („lehký" a „těžký" řetězec lišící se přítomností izotopu, např. ^{2}H). Proteinové vzorky označené těmito činidly jsou následně smíchány a enzymaticky naštěpeny. Před MS analýzou jsou afinitně odděleny peptidy se značkou od ostatních peptidů neoznačených. Na základě odlišné molekulové hmotnosti použitých variant značky jsou analyzované peptidy v hmotnostním spektru snadno odlišitelné a kvantifikovatelné na základě poměru intenzit signálu (obr. 3).

Metoda ICAT využívající kapalinově chromatografické separace může být na rozdíl od elektroforetických metod s úspěchem využita ke kvantifikaci proteinů s extrémními pI, málo abundantních proteinů [40] i membránově vázaných proteinů [41]. Mezi nevýhody této metody patří neschopnost ICAT činidla se vázat na proteiny neobsahující cystein, což na druhé straně významně snižuje komplexitu vzorků a výsledků jejich MS analýzy [42].

Publikovaných výsledků získaných metodou ICAT v hematologii nebo onkologii zatím není mnoho. V oblasti onkologie Pawlik TM et al popsali identifikaci



Obr. 2. Schéma metody multidimenzionální proteinové identifikace [66].
SCX – latexová kolona, RP – kolona s reverzní fází



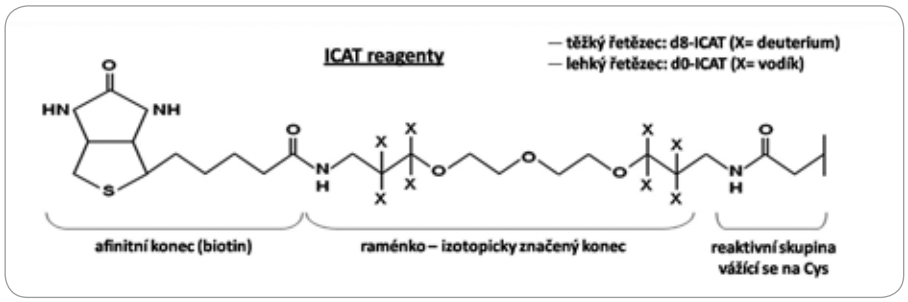
Obr. 3b. Detail MS spektra s peptidem označeným „lehkou" (L) a těžkou (H) variantou značky. Z poměru signálů lze určit změnu exprese odpovídajícího proteinu ve srovnávaných vzorcích.

a kvantifikaci tumor specifických proteinů z aspirátů prsních bradavek žen v časném stadiu rakoviny prsu v porovnání se zdravými kontrolami [43]. Shiio Y et al publikovali efekt proteinu – produktu leukemického onkogenu Myc na proliferaci a morfologii buněk [44].

SILAC

Jiný přístup zahrnující relativní kvantifikaci proteinů představuje značení proteinů pomocí izotopicky rozdílných aminokyselin během kultivace buněčných kultur (stable isotope labelling by amino acids in cell culture – SILAC). Bylo vyvinuto Matthiasem Mannem a jeho kolegy z univerzity v Jižním Dánsku v roce 2002 [45]. Do kultivačního média, které neobsahuje žádné aminokyseliny, jsou přidány esenciální izotopicky značené aminokyseliny (např. ^{13}C-arginin, ^{13}C-leucin), které jsou zabudovány do sekvence proteinů během jejich syntézy v průběhu kultivace. Opět se porovnávají buněčné vzorky v jednotlivých médiích obsahujících těžké nebo lehké formy aminokyselin. Z tohoto důvodu není nutné provádět značení proteinů chemicky nebo je přečišťovat afinitními metodami tak jako v případě ICAT. Tím je zajištěno, že porovnávané vzorky budou během celého experimentu vystaveny stejným podmínkám [46–47]. Porovnání obou metod je uvedeno na obr. 4.

Sun Y et al využili metodu SILAC k hledání rozdílů v proteinové expresi mezi zdravými a rakovinnými buňkami jater (buněčné linie HL-7702 vs HepG2 a SK-HEP-1). Identifikovali 116 potenciálních proteinových markerů, které jsou schopny odlišit rakovinné buňky jater od normálních [48]. Oveland et al, zabývající se stimulací receptoru tyrozinové kinázy FLT3 u buněk akutní myeloidní leukemie, využili metodu SILAC k identifikaci 375 proteinů, které snižují tvorbu receptoru FLT3 v AML buněčné linii THP-1. Dále popsali citlivost buněčných linií THP-1 s down-regulovaným FLT3 na idarubucin a vyslovili hypotézu, že indukovaný ligand modulující receptor může chemicky senzibilizovat některé podskupiny AML [49]. Liang X et al popsali díky této metodě kvantitativní změny spojené s fosforylací kinázy BCR-ABL a jejích substrátů v buňkách chronické myeloidní leukemie během odpovědi na léčbu. Demonstrovali až 90% redukci fosforylace BCR-ABL kinázy a regulaci fosforylace dalších proteinů spojených s hematoonkologickými chorobami (SHP-2, DOK2, SHC protein, protoonkogen B-lymfomů) v důsledku léčby imatinibem [50].

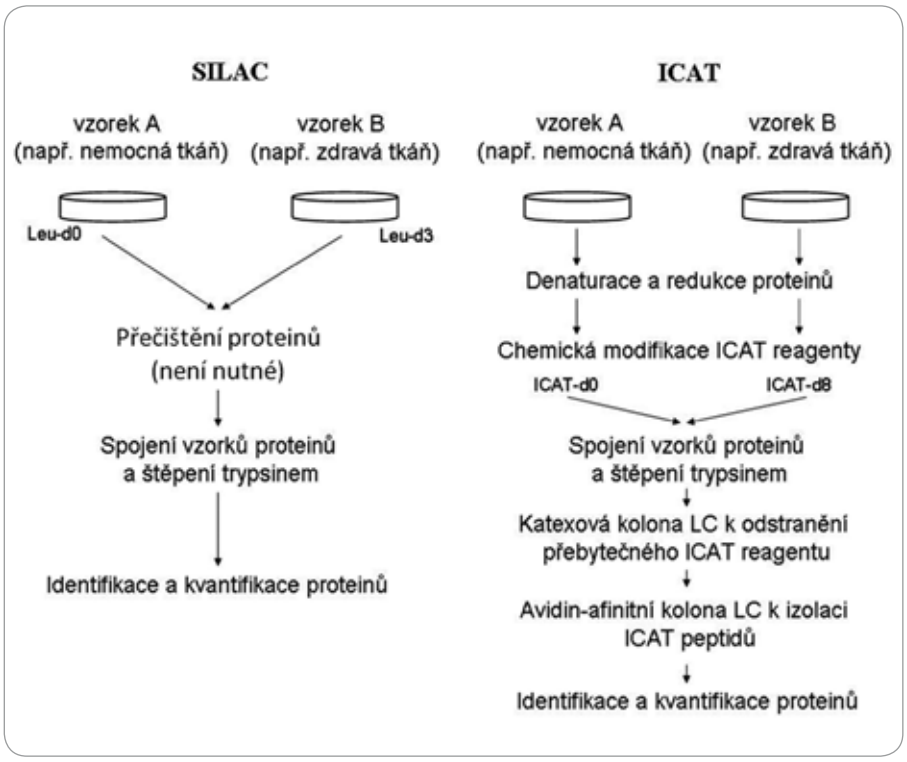


Obr. 3a. Schéma ICAT reagentu [39].

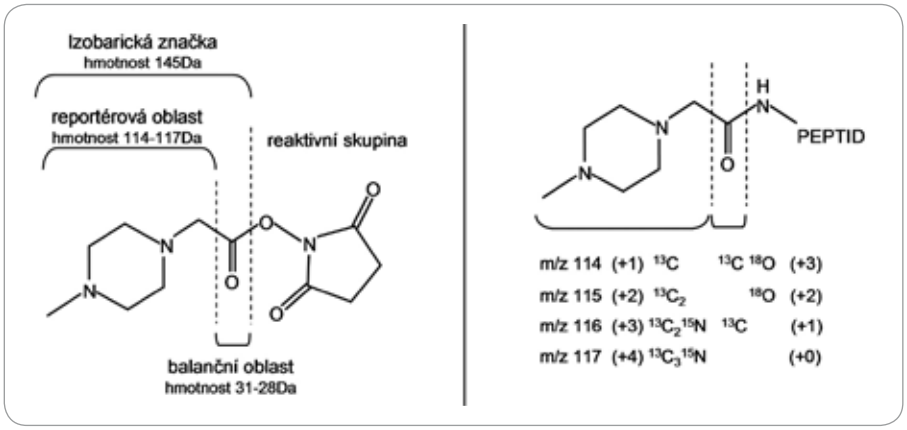
iTRAQ

Nová třída izobarických reagentů (isobaric tags for relative and absolute quantitation – iTRAQ) byla vyvinuta Darrylem Papinem a jeho kolegy ve firmě Applied Biosystems. iTRAQ reagenty využívají až osmi izobarických značek o stejné celkové molekulové hmotnosti, kterými se může označit až osm různých proteinových vzorků. Tyto izobarické značky obsahují tři základní oblasti – reaktivní, balanční a reportérovou (obr. 5) [51]. Vzorky jsou označeny před proteolytickým štěpením nebo po něm, smíchány dohromady a analyzovány pomocí LC-MS/MS. Zatímco celková hmotnost značek se neliší, hmotnost reportérových iontů, které se odštěpují při MS/MS z jednotlivých značek, je rozdílná. Takto poměry intenzit jednotlivých reportérových iontů odpovídají relativnímu množství proteinu ve srovnávaných vzorcích [52–53].

Ho et al použili metodu iTRAQ k popisu změn v proteinové expresi rakovinných buněk s cílem objasnit, jakým způsobem se zvyšuje jejich metastázový potenciál. Použili čtyři buněčné linie metastázového modelu rakoviny prsu a z více než 1 000 detekovaných proteinů pozorovali 197 proteinů, které vykázaly odlišnou expresi v buňkách s metastatickým potenciálem. Jednalo se především o kinázy, na které jsou cílena některá léčiva, fostafatázy, proteázy a transkripční faktory. Cel-



Obr. 4. Schematické znázornění a porovnání metod SILAC a ICAT [45].



Obr. 5. Příklad 4 iTRAQ značek [51].

kový počet expresních změn byl rozložen rovnoměrně mezi jemnou (cca 30 %), střední (cca 40 %) a agresivní (cca 30 %) formu metastazujících buněk. K ověření takto získaných výsledků a k dalšímu studiu tato skupina dále využila proteinové čipy [54].

Vysvětlení vzniku metastazujících buněk se snažila objasnit i skupina A. Glena, která metodu iTRAQ použila při sledování buněčných linií rakoviny prostaty. Jako modelový příklad vybrali špatně metastazující buněčnou linii LNCaP a její vysoce metastazující variantu LNCaP-LN3. Identifikovali 280 proteinů, mezi nimi např. kinázu CKBB (brain creatine kinase), rozpustnou formu katechol-O-metyltransferázy (catechol-o-methyl transferase – S-COMT), tumor rejekční antigen gp96 a glukózu regulující protein o velikosti 78kDa (grp78) [55].

Chen Y et al studovali proteomické a fosfoproteomické změny v modelu MC-F10AT, buněčné linie progredující rakoviny prsu, s cílem identifikovat nové substráty tyrozinových kináz. Detekovali 57 proteinů zahrnujících tyrozinkinázy, fosfatázy a další signální proteiny, které podstupují fosforylaci během progrese onemocnění. Sedm z těchto proteinů (SPAG9, TOLLIP, WBP2, NSFL1C, SLC4A7, CYFIP1 a RPS2) bylo následně potvrzeno jako nové substráty tyrozinkináz. SPAG9, TOLLIP, WBP2 a NSFL1C byly dále identifikovány jako spolehlivé cíle signálního epidermálního růstového faktoru a léčiva gefitinibu. SLC4A7 a TOLLIP byly prokázány jako nové tyrozinkinázové substráty, které vykazují spojitost s vývojem rakoviny [56].

Proteinové čipy

V současné době se pro studium proteinů vyvíjejí různé druhy technologií založené na čipové analýze. Proteinové čipy jako alternativa k běžným proteomickým přístupům se zdají být novou, nadějnou a vysoce kapacitní technikou pro studium proteomu [57]. Základy pro vývoj proteinových čipů položil Roger Ekins na konci 80. let [58]. Z hlediska použití lze proteinové čipy rozdělit na expresní (analytické) a funkční. Expresní čipy jsou používány pro stanovení přítomnosti a koncentrace proteinů v komplexních vzorcích a mají velký potenciál pro tzv. proteinové profilování, tj. monitorování proteinové exprese ve velkém měřítku („large-scale" přístup). Pomocí funkčních proteinových čipů detekujeme interakce proteinů s jinými proteiny, peptidy, nízkomolekulárními látkami, oligosacharidy nebo nukleovými kyselinami [59]. Z hlediska složení lze odlišit dva základní formáty proteinových čipů. Podle navázaných molekul na povrchu čipu se dělí na proteinové (na svém povrchu mají navázány definované malé proteiny – substráty nebo modifikovaný povrch substrátů pro definované proteiny) nebo protilátkové (na svém povrchu mají navázány protilátky pro vybrané proteiny). Proteinové čipy mohou využívat také různé druhy povrchů – sklněná destička, porézní akrylamidový gel, membrány, mikrovlákna, na nichž jsou jednotlivé molekuly navázány [60]. Protilátkové čipy jsou navrženy k detekci specifických komponent komplexních vzorků. V případě krevní plazmy se na protilátky navázané na povrchu čipu vážou krevní antigeny obsažené v plazmě. Existují dvě metody detekce proteinové ex-

Tab. 1. Porovnání metod založených na značení stabilními izotopy (upraveno dle [67]).

	ICAT	SILAC	iTRAQ
používané stabilní izotopy	H/D; $^{12}C/^{13}C$; $^{16}O/^{18}O$; $^{14}N/^{15}N$	$^{12}C/^{13}C$	osm izobarických reagentů
cílová aminokyselina	cystein	lysin, arginin	N-konce primárních aminokyselin
aplikovatelné vzorky	neživé vzorky	tkáňové n. buněčné kultury	neživé vzorky
klinické vzorky (krev)	ano	ne	ano

prese, které využívá čipová analýza. Fluorescenční nebo radioaktivní značení se v prvním případě používá pro navázané antigeny, v druhém případě pro sekundární protilátku. První protilátka se váže na protein navázaný na čipu a následně se druhá „značená" protilátka naváže na jinou oblast stejného proteinu [61–62].

Výhodou proteinových čipů je schopnost identifikovat jednotlivé izoformy proteinů, které mohou být kritické v patogenezi onemocnění, na druhou stranu největším problémem technologie proteinových čipů je zdroj použitelných molekul, zvláště u protilátkových čipů. Nejčastěji jsou využívány monoklonální protilátky, jejichž produkce je velmi drahá [63].

Analýzu proteinovými protilátkovými čipy využili Ghobrial a kolegové pro pochopení patogeneze lymfomu plášťových buněk (mantle cell lymfom – MCL) s výhledem na možné navržení nových terapií. Čipovou analýzou byla porovnávána proteinová exprese $CD19^+$ B lymfocytů izolovaných ze zdravé tonzily s B lymfocyty pocházejícími z histologicky potvrzeného MCL. Bylo identifikováno kolem 90 proteinů vykazujících zvýšenou expresi u nádorových buněk. Mezi nimi byly identifikovány regulátory buněčného cyklu (RCC1, MDM2), kinázy (CRIK), chaperony (Hsp90, Hsp10) a regulátory fosfatáz (AKAP149, PP5, inhibitor 2). Zvýšená exprese vybraných polypeptidů identifikovaných pomocí čipů byla potvrzena immunoblottingem nebo imunohistochemicky [64].

Aktuálně byla metoda čipové analýzy využita pro validaci proteinových markerů reakce štěpu proti hostiteli po transplantaci kostní dřeně v práci autorů S. Paczesny et al [65]. Vzorky 466 pacientů s různými hematologickými maligními diagnózami, kteří podstoupili transplantaci kostní dřeně, vyšetřovali na protilátkových proteinových čipech. Pozorovali expresní změny u 120 vybraných proteinů. Statistickými metodami určili panel čtyř proteinů – α-receptor interleukinu-2; receptor 1 tumor nekrotického faktoru, interleukin-8 a hepatocytární růstový faktor, který zřetelně oddělil skupiny pacientů postižené reakcí štěpu proti hostiteli a bez této komplikace [65].

Závěr

Proteomika je dynamický obor, který se v posledních letech dostává do popředí zájmu nejen molekulárních biologů a biochemiků, ale i lékařů. Díky proteomickým přístupům se prohloubily poznatky o významných metabolických nebo signálních procesech souvisejících s rozvojem onkologických nebo hematologických chorob a jejich komplikací.

Nové proteomické přístupy se pravděpodobně budou stále více uplatňovat v individuální péči o pacienta na několika úrovních: včasná detekce choroby, diagnóza s využitím proteinových markerů jako doplňku ke standardním vyšetřovacím metodám, individualizovaný výběr léčby jednotlivým pacientům, sledování účinnosti a toxicity léčby v čase a eventuální změny v léčbě na základě detekovaných změn v proteinovém profilu konkrétního pacienta. V blízké budoucnosti lze očekávat pokračování rychlého rozvoje proteomických technologií a nárůst počtu praktických výstupů pro klinické aplikace.

Literatura

1. Trifonov EN. Earliest pages of bioinformatics. Bioinformatics 2000; 16(1): 5–9. Review.
2. Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. The sequence of the human genome. Science 2001 16; 291(5507): 1304–51. Erratum in: Science 2001; 292(5523): 1838.
3. Wasinger VC, Cordwell SJ, Wilkins M et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. Electrophoresis 1995; 16(7): 1090–1094.
4. Matt P, Carrel T, White M et al. Proteomics in cardiovascular surgery. J Thorac Cardiovasc Surg 2007; 133(1): 210–214.
5. Wu W, Hu W a Kavanagh JJ. Proteomics in cancer research. Int J Gynecol Cancer 2002; 12: 409–423.
6. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ Jr. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. Angew Chem Int Ed Engl 2005; 44(45): 7342–7372.
7. Han KK, Martinage A. Post-translational chemical modification(s) of proteins. Int J Biochem 1992; 24(1): 19–28. Review.
8. Cristea IM, Gaskell SJ, Whetton AD. Proteomics techniques and their application to hematology. Blood 2004; 103(10): 3624–3634.
9. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. Science 2006; 312: 221–217.
10. Righetti PG. Bioanalysis: its past, present, and some future. Electrophoresis 2004; 25(14): 2111–2127.
11. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics 2004; 4(12): 3665–3685.
12. Tannu NS, Hemby SE. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. Nat Protoc 2006; 1(4): 1732–1742.
13. Hanash SM, Strahler JR, Kuick R. Identification of a polypeptide associated with the malignant phenotype in acute leukemia. J Biol Chem 1988; 263(26): 12813–12815.
14. Cui JW, Wang J, He K et al. Two-dimensional electrophoresis protein profiling as an analytical tool for human acute leukemia classification. Electrophoresis 2005; 26(1): 268–279.
15. López-Pedrera C, Villalba JM, Siendones E et al. Proteomic analysis of acute myeloid leukemia: Identification of potential early biomarkers and therapeutic targets. Proteomics 2006; 6(1): 293–299.
16. Unlü M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis 1997; 18(11): 2071–2077.
17. Lilley KS. 2D DIGE. Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics. Part 3. Proteomics 3.2. John Wiley & Sons 2005.
18. Wang H, Clouthier SG, Galchev V et al. Intact-protein-based high-resolution three-dimensional quantitative analysis system for proteome profiling of biological fluids. Mol Cell Proteomics 2005; 4(5): 618–625.
19. Jiang YJ, Sun Q, Fang XS et al. Comparative mitochondrial proteomic analysis of Rji cells exposed to adriamycin. Mol Med 2009; 15(5–6): 173–182.
20. Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT et al. Identifying proteins from 2-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90: 5011–5015.
21. Rajcevic U, Niclou SP, Jimenez CR Proteomics strategies for target identification and biomarker discovery in cancer. Front Biosci 2009; 14: 3292–3303.
22. Wu HM, Jin M, Marsh CB. Toward functional proteomics of alveolar macrophages. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005; 288(4): L585–L595.
23. Traum AZ, Schachter AD. Transplantation proteomics. Pediatr Transplant 2005; 9(6): 700–711.
24. Wiesner A. Detection of tumor markers with ProteinChip technology. Curr Pharm Biotechnol 2004; 5(1): 45–67.

25. Holcakova J, Hernychova L, Bouchal P et al. Identification of alphaB-crystallin, a biomarker of renal cell carcinoma by SELDI-TOF MS. Int J Biol Markers 2008; 23(1): 48–53.
26. Brozkova K, Budinska E, Bouchal P et al. Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight proteomic profiling of breast carcinomas identifies clinicopathologically relevant groups of patients similar to previously defined clusters from cDNA expression. Breast Cancer Res 2008; 10(3): R48.
27. Zhang X, Guo T, Wang H et al. Potential biomarkers of acute cerebral infarction detected by SELDI-TOF-MS. Am J Clin Pathol 2008; 130(2): 299–304.
28. Hong M, Zhang X, Hu Y et al. The potential biomarkers for thromboembolism detected by SELDI-TOF-MS. Thromb Res 2009; 123(3): 556–564.
29. Delbosc S, Haloui M, Louedec L et al. Proteomic analysis permits the identification of new biomarkers of arterial wall remodeling in hypertension. Mol Med 2008; 14(7–8): 383–394.
30. Zhang YQ, Li W, Wang GJ et al. Effect of low dose radiation on human bone marrow mesenchymal stem cells by using proteomic analysis. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2008; 16: 151–155.
31. Scholl S, Melle C, Bleul A et al. Specific pattern of protein expression in acute myeloid leukemia harboring FLT3-ITD mutations. Leuk Lymphoma 2007; 48(12): 2418–2423.
32. Liu H, Lin D, Yates JR 3rd. Multidimensional separations for protein/peptide analysis in the post-genomic era. Biotechniques 2002; 32(4): 898–902.
33. Sun S, Lee NP, Poon RT et al. Oncoproteomics of hepatocellular carcinoma: from cancer markers' discovery to functional pathways. Liver Int 2007; 27(8): 1021–1038.
34. Delahunty CM, Yates JR 3rd. MudPIT: multidimensional protein identification technology. Biotechniques 2007; 43(5): 563–569.
35. Maurya P, Meleady P, Dowling P et al. Proteomic approaches for serum biomarker discovery in cancer. Anticancer Res 2007; 27(3A): 1247–1255.
36. McDonald WH, Yates JR 3rd. Shotgun proteomics and biomarker discovery. Dis Markers 2002; 18(2): 99–105.
37. Koch HB, Zhang R, Verdoodt B et al. Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. Cell Cycle 2007; 6(2): 205–217.
38. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. Blood 2004; 103(6): 2096–2104.
39. Gygi SP, Rist B, Aebersold R et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. Nat Biotechnol 1999; 17(10): 994–999.
40. Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nat Biotechnol 2001; 19: 242–247.
41. Han DK, Eng J, Zhou H et al. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. Nat Biotechnol 2001; 19: 946–951.
42. Zieske LR. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. J Exp Bot 2006; 57(7): 1501–1508.
43. Pawlik TM, Hawke DH, Liu Y 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: 68.
44. Shiio Y, Donohoe S, Yi EC et al. Quantitative proteomic analysis of Myc oncoprotein function. EMBO J 2002; 21: 5088–5096.
45. Ong SE, Blagoev B, Mann M et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. Mol Cell Proteomics 2002; 1(5): 376–386.
46. Ong SE, Foster LJ, Mann M. Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. Methods 2003; 29(2): 124–130.
47. Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. Nat Rev Mol Cell Biol 2006; 7(12): 952–958.
48. Sun Y, Mi W, Cai Jet al. Quantitative proteomic signature of liver cancer cells: tissue transglutaminase 2 could be a novel protein candidate of human hepatocellular carcinoma. J Proteome Res 2008; 7(9): 3847–3859.
49. Oveland E, Gjertsen BT, Wergeland L et al. Ligand-induced Flt3-downregulation modulates cell death associated proteins and enhances chemosensitivity to idarubicin in THP-1 acute myeloid leukemia cells. Leukemia Research 2009, 33(2): 276–287.
50. Liang X, Hajivandi M, Veach D et al. Quantification of change in phosphorylation of BCR-ABL kinase and its substrates in response to Imatinib treatment in human chronic myelogenous leukemia cells. Proteomics 2006; 16(6): 4554–4564.
51. Ross PL, Huang YN, Marchese JN et al. Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents. Mol Cell Proteomics 2004; 3(12): 1154–1169.
52. Gafken PR, Lampe PD. Methodologies for characterizing phosphoproteins by mass spectrometry. Cell Commun Adhes 2006; 13(5–6): 249–262.
53. Aggarwal K, Choe LH, Lee KH. Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. Brief Funct Genomic Proteomic 2006; 5(2): 112–120.
54. Ho J, Kong JW, Choong LY et al. Novel Breast Cancer Metastasis-Associated Proteins. J Proteome Res 2009; 8(2): 583–594.
55. Glen A, Gan CS, Hamdy FC et al. iTRAQ-facilitated proteomic analysis of human prostate cancer cells identifies proteins associated with progression. J Proteome Res 2008; 7(3): 897–907.
56. Chen Y, Choong LY, Lin Q et al. Differential expression of novel tyrosine kinase substrates during breast cancer development. Mol Cell Proteomics 2007; 6(12): 2072–2087.
57. Collinsová M, Jiráček J. Current Development in Proteomics. Chem Listy 2004; 98: 1112–1118.
58. Ekins R, Chu F, Biggart E. Multispot, multianalyte, immunoassay. Ann Biol Clin (Paris) 1990; 48(9): 655–666.
59. Malčíková J, Tichý B, Kotašková J et al. Od genomu k proteinu – využití proteinových čipů v onkologii. Klin onkol 2006; 19 (Suppl): 346–350.
60. Hayduk EJ, Choe LH, Lee KH. Proteomic tools in discovery-driven science. Current Science 2002; 17 (83): 840–844.
61. Smith L, Lind MJ, Welham KJ et al. Cancer proteomics and its application to discovery of therapy response markers in human cancer. Cancer 2006; 107(2): 232–241.
62. Herosimczyk A, Dejeans N, Sayd T et al. Plasma proteome analysis: 2D gels and chips. J Physiol Pharmacol 2006; 57 (Suppl 7): 81–93.
63. Pierce JD, Fakhari M, Works KV et al. Understanding proteomics. Nurs Health Sci 2007; 9(1): 54–60.
64. Ghobrial IM, McCormick DJ, Kaufmann SH et al. Proteomic analysis of mantle-cell lymphoma by protein microarray. Blood 2005; 105(9): 3722–3730.
65. Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM et al. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. Blood 2009; 113(2): 273–278.
66. Whitelegge JP. Plant proteomics: BLASTing out of a MudPIT. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(18): 11564–11566.
67. Chen EI, Yates JR. Cancer Proteomics by Quantitative Shotgun Proteomics. Mol Oncol 2007; 1(2): 144–159.