

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE



**Proteomika jako nástroj studia molekulárních mechanismů závažných
onemocnění**

**Proteomics as a tool for understanding molecular mechanisms
of human diseases**

Mgr. Jana Pospíšilová

Praha 2014

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie

Předseda

oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící

pracoviště: Laboratoř klinické proteomiky a hmotnostní spektrometrie
Ústav patologické fyziologie, 1. lékařská fakulta UK v Praze
U Nemocnice 5, 128 53 Praha 2

Školitel: Doc. RNDr. Jiří Petrák, Ph.D.

Autor: Mgr. Jana Pospíšilová

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

SOUHRN	4
ABSTRACT.....	5
1 ÚVOD.....	6
1.1 Proteomické strategie	6
1.2 Hmotnostní spektrometrie	7
2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	9
2.1 Identifikace potenciálních molekulárních cílů pro selektivní likvidaci buněk lymfomů z plášťové zóny rezistentních na protinádorovou molekulu TRAIL.....	10
2.2 Popis molekulárních mechanismů srdečního selhání s využitím potkaního modelu objemového přetížení	13
2.3 Hledání diagnostických biomarkerů karcinomu ovaria	16
3 DISKUZE	19
4 ZÁVĚR	23
5 POUŽITÁ LITERATURA	24
6 SEZNAM PUBLIKACÍ.....	25

SOUHRN

Proteomika je soubor analytických metod umožňující kvalitativní a kvantitativní popis proteomu. Expresní proteomika kvantitativně porovnává proteomy buněk, tkání, tělních tekutin a dalších biologických materiálů za různých podmínek s cílem nalézt rozdíly v expresi proteinů a na základě těchto rozdílů popsat biologické procesy probíhající ve zkoumaných organizmech.

Výchozím materiálem expresních proteomických studií jsou složité směsi obsahující tisíce proteinů, které jsou analyzovány kombinací separačních (hlavně elektroforetických a chromatografických) metod a identifikovány, případně kvantifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Cílem této dizertační práce je demonstrovat využití nástrojů expresní proteomiky k řešení několika biomedicínských problémů. Různé proteomické přístupy a nástroje jsme využili ke studiu molekulárních mechanismů závažných onemocnění jak na biologických vzorcích pacientů, tak na modelovém organismu a buněčné kultuře. Konkrétně jsme řešili tři různé projekty, a to hledání potenciálních molekulárních cílů pro selektivní likvidaci buněk lymfomů z plášťové zóny rezistentních na protinádorovou molekulu TRAIL, studium molekulárních mechanismů srdečního selhání s využitím potkaního modelu objemového přetížení a hledání diagnosticky využitelných biomarkerů karcinomu ovaria. Výsledkem těchto projektů je nalezení molekulární „slabiny“ buněk rezistentních na protinádorovou terapii potenciálně využitelné k selektivní eliminaci rezistentních buněk, dále navržení dvou možných terapeutických zásahů v léčbě chronického srdečního selhání a identifikace potenciálního biomarkeru karcinomu ovarii.

Ukázali jsme, že při vhodném uspořádání experimentu a kritickém vyhodnocení získaných informací proteomika poskytuje velmi cenný vhled do fyziologických i patologických molekulárních procesů a má potenciál v oblasti základního i aplikovaného biomedicínského výzkumu.

klíčová slova: expresní proteomika, hmotnostní spektrometrie, dvourozměrná elektroforéza, lymfom buněk z plášťové zóny, TRAIL, rezistence, srdeční selhání, karcinom ovaria, biomarker

ABSTRACT

Proteomics is a set of analytical methods which enable qualitative and quantitative characterization of the proteome. Expression proteomics quantitatively compares proteomes of cells, tissues, body fluids or other biological materials to find differences in protein expression and, based on these differences, to describe the biological processes occurring in investigated organisms.

An initial material for expression proteomic studies are complex mixtures containing thousands of proteins, which are analyzed using separation (electrophoretic and chromatographic) methods, and identified, possibly quantified using mass spectrometry.

The aim of this Thesis is to demonstrate the application of the tools of expression proteomics in solving diverse challenges in biomedicine. We employed various proteomic approaches and tools for studying molecular mechanisms of human diseases using patient biological samples, or a model organism and a cell culture. We were conducting three different research projects, namely: A quest for potential molecular targets for selective elimination of TRAIL-resistant mantle cell lymphoma cells; Investigation of molecular mechanisms of heart failure using a rat model of the disease induced by volume overload; and Searching for diagnostically usable serum biomarkers of ovarian cancer. Results of our three projects are discovery of molecular „weakness“ of resistant cells which has a potential as a therapeutic target for the selective elimination of such cells, suggestion of two highly potential therapeutic targets for treatment of heart failure and identification of a new potential biomarker of ovarian cancer.

We demonstrated that with a suitable experimental design and pointed evaluation of gained results proteomics provides significant insight into the physiological and also pathological molecular processes and carries a huge potential in the fields of basic and applied biomedical research.

key words: expression proteomics, mass spectrometry, two-dimensional electrophoresis, mantle cell lymphoma, TRAIL, drug resistance, heart failure, ovarian cancer, biomarker

1 ÚVOD

Termín **proteom** vyjadřuje proteinový komplement genomu. Je to soubor všech proteinů přítomných v daném čase v tkáni nebo buňce. **Proteomika** je vědní obor, či spíše soubor analytických metod, umožňující kvalitativní a kvantitativní hodnocení proteomů, včetně studia struktury, funkce, lokalizace a interakce mezi proteiny. **Expresní proteomika** porovnává proteomy kvantitativně, studuje rozdíly v expresi či koncentraci proteinů tělních tekutin, tkání a buněčných linií s cílem charakterizovat molekulární mechanismy probíhající ve studovaném organismu. Výchozím materiálem expresních proteomických studií jsou složité směsi obsahující tisíce proteinů. Komplexnost proteinové směsi a dynamický rozsah koncentrací proteinů v biologických vzorcích jsou vysoké [1], proto je nutné tyto směsi podrobit frakcionaci pomocí vhodných separačních metod, hlavně elektroforetických a chromatografických. K identifikaci proteinů slouží v proteomice hmotnostní spektrometrie.

1.1 Proteomické strategie

Pro identifikaci a kvantifikaci proteinů v komplexních směsích využívá expresní proteomika dvě základní strategie, a to „klasickou“ a tzv. „shotgun“ strategii. „Klasická“ proteomická strategie je založená na separaci komplexních vzorků intaktních proteinů a její nejběžnější design představuje dvourozměrná elektroforéza (2-DE). Pomocí 2-DE jsou v prvním rozměru proteiny separovány podle pI izoelektrickou fokusací v imobilizovaném gradientu pH (IPG-IEF) [2] a v druhém rozměru podle Mr pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) [3]. Kvantitativní informace je pomocí 2-DE získána porovnáním optických denzit obarvených proteinových spotů na gelech a vybrané proteiny jsou identifikovány hmotnostní spektrometrií (MS). Proteomická strategie „shotgun“ (neboli brokovnice) je založena na jedno- nebo

vícerozměrné separaci peptidů, které vznikly štěpením analyzovaného proteinového vzorku specifickou endoproteázou před začátkem separace. Vzniklá směs peptidů je pak separována nejčastěji kombinací dvou kapalinových chromatografií, nebo IPG-IEF spojenou s kapalinovou chromatografií. Identifikace peptidů je provedena pomocí MS. Kvantitativní informaci je při použití „shotgun“ strategie možné získat (vnesením stabilních izotopů) rovněž pomocí MS.

1.2 Hmotnostní spektrometrie

MS je analytická metoda měřící přesnou (molekulovou) hmotnost chemických látek. V iontovém zdroji spektrometru dochází měkkou ionizační technikou k ionizaci peptidů. Ionty poté prolétají hmotnostním analyzátozem, kde jsou děleny podle hmotnosti a následně dopadají na detektor. Jednotlivé peptidy jsou definovány svou aminokyselinovou sekvencí, která zároveň určuje hmotnost peptidu. Na základě porovnání hmotnosti peptidu změřené hmotnostním spektrometrem s teoretickou hmotností peptidu vypočítanou z aminokyselinové sekvence lze peptid a protein, ze kterého peptid vznikl, identifikovat. Teoretické hmotnosti peptidů jsou odvozovány *in silico* z genových a proteinových databází. Porovnání a přiřazení odpovídající sekvence aminokyselin pomocí teoretické a naměřené hmotnosti peptidů je provedeno softwarem.

Existují dvě základní metody identifikace proteinu pomocí MS, peptidový fingerprinting (PMF) a sekvenování peptidů (MS/MS, tandemová MS). Metodou PMF je protein identifikován porovnáním změřených přesných hmotností peptidů vzniklých z proteinu po štěpení specifickou endoproteázou (typicky trypsinem) s teoretickými hodnotami v databázích. PMF se využívá v případě, kdy vzorek určený k identifikaci obsahuje peptidy pouze jednoho nebo několika proteinů. Proto se PMF používá hlavně v kombinaci s 2-DE. Při tandemové MS dochází k následné fragmentaci vybraných

peptidů, při které se peptidy rozpadají především v peptidické vazbě a vznikají tak různě velké fragmenty. Změřením přesných hmotností fragmentů je získána částečná nebo úplná aminokyselinová sekvence peptidů, ze které je následně odvozen původní protein. Tuto metodu je nutné použít při „shotgun“ přístupu, kdy peptidy vznikají štěpením velkého množství proteinů a do iontového zdroje spektrometru jsou přiváděny nezávisle na tom, z jakého proteinu vznikly.

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Tato dizertační práce si klade za cíl demonstrovat využití různých proteomických nástrojů a dvou základních proteomických strategií (2-DE a „shotgun“) k řešení různých biomedicínských problémů. Expresní proteomika zde byla využita ke studiu molekulárních mechanismů závažných onemocnění, a to jak na biologických vzorcích pacientů, tak na buněčných kulturách a modelovém organismu.

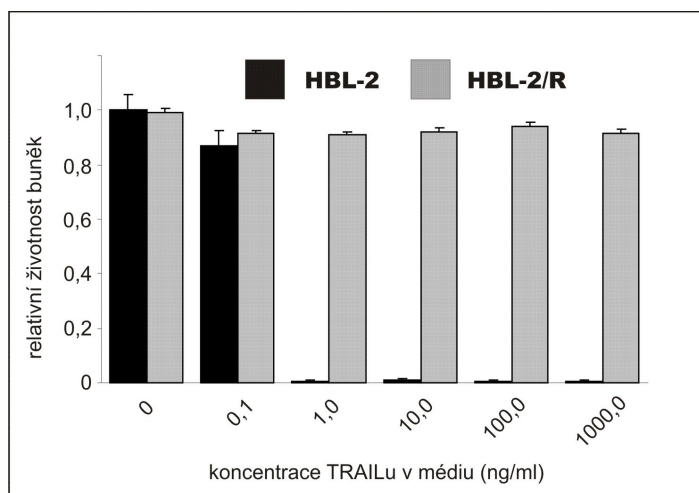
Dílčí cíle práce:

- 1. Identifikovat potenciální molekulární cíle pro selektivní likvidaci buněk lymfomů z plášťové zóny rezistentních na protinádorovou molekulu TRAIL**
- 2. Popsat molekulární mechanismy srdečního selhání s využitím potkaního modelu objemového přetížení**
- 3. Nalézt diagnosticky využitelné biomarkery karcinomu ovaria**

2.1 Identifikace potenciálních molekulárních cílů pro selektivní likvidaci buněk lymfomů z plášťové zóny rezistentních na protinádorovou molekulu TRAIL

Proapoptotická molekula TRAIL je atraktivním předmětem výzkumu jako potenciální terapeutická látka pro léčbu různých nádorových onemocnění včetně lymfomu buněk z plášťové zóny (MCL). MCL je velmi agresivní onemocnění se špatnou prognózou, pacienti umírají do 5-7 let od diagnózy [4]. TRAIL prokázal cytotoxický a cytostatický efekt na řadu leukemických i lymfomových buněk *in vitro* a rovněž *in vivo* na zvířecích modelech [5, 6], ale zároveň byl pozorován vývoj rezistence na TRAIL u řady buněčných linií [7]. Obecně lze říci, že vývoj rezistence při chemoterapii nádorových onemocnění průběh léčby velmi komplikuje. Rezistence je často zodpovědná za progresi a/nebo relaps nemoci. Rozhodli jsme se popsat změny v nádorových buňkách asociované s rezistencí na TRAIL. Provedli jsme porovnání proteomů buněk MCL senzitivních na TRAIL s buňkami rezistentními na TRAIL. Cílem této proteomické studie bylo identifikovat změny v expresi proteinů spojené s rezistencí lymfomových buněk na protinádorovou molekulu TRAIL a mezi identifikovanými proteiny vybrat takové molekuly, které by mohly tvořit „slabiny“ rezistentních buněk vhodné jako terapeutická zásahová místa. Dále bylo cílem, na základě těchto „slabin“, navrhnout vhodné způsoby selektivní eliminace rezistentních buněk.

Proteomickou studii jsme provedli na buněčné linii HBL-2, což je zavedený laboratorní model MCL. HBL-2 buňky jsou citlivé na TRAIlem indukovanou vnější dráhu aktivace apoptózy. TRAIL-rezistentní subklon HBL-2/R byl získán postupným zvyšováním koncentrace TRAILu v médiu (Obrázek 1).



Obrázek 1: Přežívání buněk HBL-2 a HBL-2/R po 78 hodinách v přítomnosti TRAILu. Subklon HBL-2/R rezistentní na TRAIL byl odvozen od buněk HBL-2 původně senzitivních na TRAIL. Absorbance HBL-2 buněk rostoucích v médiu bez TRAILu byla stanovena jako 1.

Proteomickou analýzu buněčné linie HBL-2 a HBL-2/R jsme provedli pomocí 2-DE. Směs proteinů z celobuněčného lyzátu byla separována v prvním rozměru pomocí IPG-IEF a poté pomocí SDS-PAGE. Kvantitativní informaci o relativním zastoupení proteinů v obou vzorcích jsme získali denzitometrickou analýzou proteinových spotů. Diferenciálně exprimované proteiny byly identifikovány pomocí MS. Identifikovali jsme 21 proteinů se změněnou expresí.

V TRAIL-rezistentních buňkách jsme odhalili sníženou expresi tří enzymů nukleotidového metabolismu, a to purinnukleosidfosforylázy (PNP, 1,6x snižená), adeninfosforibosyltransferázy (APRT, 2,2x snižená) a inozin-5'-monofosfát-dehydrogenázy 2 (IMPDH2, 1,6x snižená). Pro ověření výsledků z 2-DE byla provedena analýza metodou western blot pomocí specifických protilátek proti PNP a APRT v HBL-2 i HBL-2/R celobuněčných lyzátech. Snížení exprese těchto enzymů pravděpodobně ovlivňuje jak *de novo* syntézu, tak *salvage* dráhu purinů a narušuje tak zřejmě purinovou homeostázu v HBL-2/R buňkách. Lze předpokládat, že další narušení obou metabolických cest u HBL-2/R buněk (například inhibicí některých dalších zúčastněných enzymů) bude mít na tyto buňky fatální vliv a povede k jejich eliminaci.

Proteomickou analýzou buněk se nám podařilo odhalit metabolickou dráhu představující potenciální „slabinu“ TRAIL-rezistentních buněk. Navrhli jsme eliminaci

TRAIL-rezistentních MCL buněk specifickými inhibitory enzymů purinového metabolismu (např. methotrexátem, forodezinem, ribavirinem), které by měly být pro tyto buňky vysoce toxické ve srovnání s buňkami senzitivními na TRAIL, a měly by tedy být velmi efektivní při jejich selektivní likvidaci.

Demonstrovali jsme tak možnou budoucí úlohu expresní proteomiky v individualizaci protinádorové terapie.

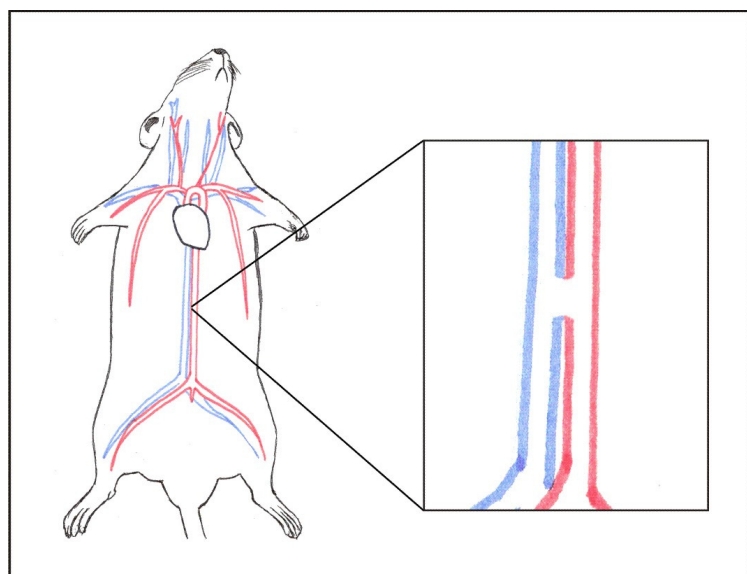
Výsledky této práce byly publikovány v článku:

Resistance to TRAIL in mantle cell lymphoma cells is associated with the decreased expression of purine metabolism enzymes. Pospisilova Jana, Vit Ondrej, Lorkova Lucie, Klanova Magdalena, Zivny Jan, Klener Pavel, Petrak Jiri. International Journal of Molecular Medicine 2013; 31(5):1273 (IF 1,96).

2.2 Popis molekulárních mechanismů srdečního selhání s využitím potkaního modelu objemového přetížení

Chronické srdeční selhání (CHSS) je závažné kardiovaskulární onemocnění, kterým v ČR ročně onemocní 40 000 osob hlavně důchodového věku. CHSS je stav, kdy srdce není schopné pokrýt metabolické potřeby tkání. Tento závažný klinický syndrom má velmi špatnou prognózu, do 4 let od diagnózy umírá polovina pacientů [8]. Pokroky v diagnóze a léčbě CHSS jsou omezené i proto, že molekulární mechanismy zodpovědné za vývoj a progresi CHSS nejsou zcela objasněné a jejich studium je ztíženo komplexností tohoto onemocnění.

Pro naši studii jsme použili dobře popsany a definovaný potkaní model CHSS vytvořený objemovým přetížením srdce v důsledku chirurgického propojení aorty s dolní dutou žílou (tzv. aorto-venózní píštěl, AVP, Obrázek 2) [9, 10].



Obrázek 2: Schéma operativního zákroku při tvorbě AVP. Píštěl byla provedena u desetidenních potkaních samců kmene Wistar.

Provedli jsme proteomickou analýzu porovnávající zdravou srdeční tkáň kontrolních potkanů se srdeční tkání potkanů AVP. Zvolili jsme strategii „shotgun“, tedy postup, při kterém je proteinový vzorek před vlastní proteomickou analýzou naštěpen specifickou endoproteázou na peptidy. Pro získání kvantitativní informace jsme peptidy značili izotopickými značkami metodou iTRAQ [11]. Separace značených peptidů byla provedena kombinací IPG-IEF a LC, identifikace

a kvantifikace pomocí MALDI-MS. Celkově bylo identifikováno a kvantifikováno 2 030 proteinů, z toho 66 proteinů bylo signifikantně diferenciatně exprimováno. Současne byla se vzorky srdečních tkání provedena analýza exprese mRNA na Illumina RatRef-12v1 čipech. Testováno bylo 16 206 transkriptů, z nichž diferenciatně exprimovaných bylo 851.

Tato studie je dosud nejrozsáhlejší semikvantitativní proteomickou a transkriptomickou analýzou změn souvisejících se srdečním selháním. Některé výsledky této analýzy potvrdily již dříve publikované změny typické pro srdeční selhání (např. změny exprese enzymů β -oxidace mastných kyselin a enzymů transportu vápenatých iontů). Zároveň byly identifikovány další, s CHSS dosud nespojované, proteiny a mechanismy, které s vývojem a progresí onemocnění souvisí a otevírají prostor pro další hypotézy a cílené experimenty směřující k detailnímu pochopení CHSS. Patří sem například identifikace změn v expresi annexinů A2 a A5, které jsme navrhli jako biomarkery srdečního selhání, a dále navržení dvou potenciálních terapeutických cílů pro léčbu srdečního selhání (monoaminoxidáza A a transglutamináza 2).

V navazující cílené studii zaměřené na příčiny arytmie při srdečním selhání jsme odhalili sníženou expresi connexinu 43 a P-connexinu 43 v srdeční tkáni AVP potkanů. Connexin 43 a jeho fosforylovaná forma (P-connexin 43) jsou hlavní proteiny tvořící těsné spojení membrán sousedících kardiomyocytů, které je velmi důležité pro správné šíření elektrického impulzu a pro synchronní kontrakce ve zdravém srdci. Snížená hladina exprese těchto dvou proteinů souvisí se zhoršenou kontraktilní schopností srdeční tkáně a zvyšuje tak riziko arytmie při srdečním selhání.

Výsledky naší práce jsme shrnuli ve dvou publikacích:

Proteomic and transcriptomic analysis of heart failure due to volume overload in a rat aorto-caval fistula model provides support for new potential therapeutic targets - monoamine oxidase A and transglutaminase 2. Petrak Jiri, Pospisilova Jana, Sedinova Miroslava, Jedelsky Petr, Lorkova Lucie, Vit Ondrej, Kolar Michal, Strnad Hynek, Benes Jan, Sedmera David, Cervenka Ludek, Melenovsky Vojtech. Proteome Science 2011; 11,9(1):69 (IF 2.42).

Myocardial morphological characteristics and proarrhythmic substrate in the rat model of heart failure due to chronic volume overload. Benes Jiri Jr, Melenovsky Vojtech, Skaroupkova Petra, Pospisilova Jana, Petrak Jiri, Cervenka Ludek, Sedmera David. Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology 2011; 294(1):102 (IF 1.34).

2.3 Hledání diagnostických biomarkerů karcinomu ovaria

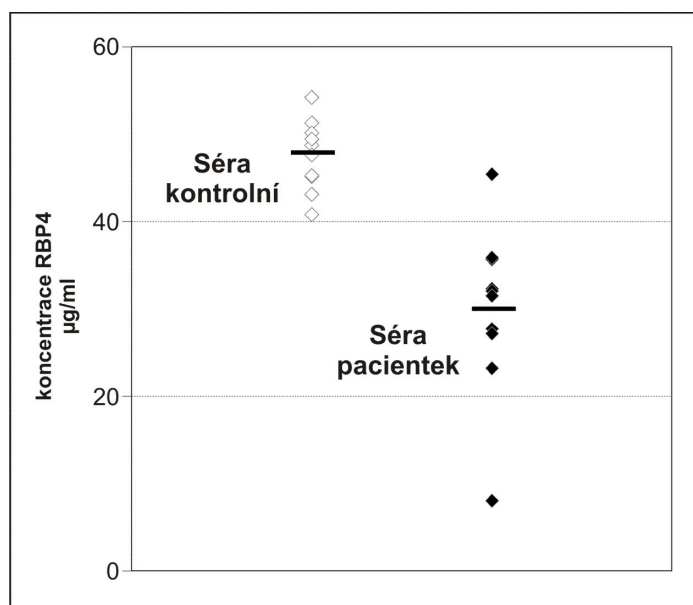
Karcinom vaječníků (karcinom ovaríí, KO) je závažné nádorové onemocnění postihující především ženy po menopauze. KO vykazuje mezi všemi gynekologickými nádorovými onemocněními nejhorší prognózu [12]. Mechanizmy vedoucí ke vzniku nádoru nejsou dosud jasně popsány a diagnostika i léčba tohoto onemocnění jsou velmi obtížné. U většiny pacientek s KO chybí specifické symptomy v počátcích onemocnění, a rovněž nejsou k dispozici senzitivní a specifické diagnostické biomarkery. Expresní proteomika porovnává proteomy a hledá diferenciálně exprimované proteiny mezi dvěma a více vzorky. Proto je ideálním nástrojem k nalezení biomarkerů, kdy můžeme pomocí expresní proteomiky porovnat patientské vzorky se vzorky kontrolními.

Výchozím biologickým materiálem pro hledání markerů KO bylo sérum pacientek odebrané před zahájením léčby. Séra pacientek byla porovnávána se séry kontrolních zdravých žen odpovídajících věkem pacientkám.

Krevní sérum je velmi složitá směs proteinů. Dvacet dva majoritních proteinů séra představuje více jak 99 % všech sérových bílkovin. Zbývající 1 % proteomu tak tvoří možný zdroj až tisíců proteinů – dosud bylo v séru spolehlivě identifikováno více jak 3 000 proteinů [1]. Proteomická analýza krevního séra je velmi obtížná, protože rozsah koncentrací jednotlivých proteinů je extrémní: od desítek mg/ml (albumin) až po pg/ml (interleukin 6), což odpovídá rozdílu řádově 10^{10} [1]. Žádná analytická metoda není schopná se s takovým rozsahem koncentrací ve vzorku vypořádat, proto je nutné před analýzou séra snížit dynamický rozsah koncentrací proteinů ve vzorku. My jsme zvolili dvě různé možnosti úpravy. V prvním případě jsme využili imunodepleci 14 nejhojnějších sérových proteinů v kombinaci s „shotgun“ strategií. Po úpravě jednotlivých vzorků sér imunodeplecí byl vytvořen směsný vzorek proteinů, které byly trypsinem štěpeny na peptidy a vzniklé peptidy byly značeny metodou iTRAQ. V druhém případě jsme ekvalizovali séra pomocí tzv. hexapeptidové knihovny a takto upravené vzorky analyzovali pomocí 2-DE.

Identifikovali jsme tři proteiny se změněnou koncentrací, a to α -1-antitrypsin (2x vyšší hladina v sérech pacientek s KO), apolipoprotein A4 (2,3x nižší koncentrace

v sérech pacientek s KO) a retinol binding protein 4 (RBP4, 2,2x nižší koncentrace). Změny v koncentraci proteinů byly ověřeny v individuálních neupravených sérech 10 pacientek s KO a 10 zdravých kontrol metodou western blot. Změny hladiny α -1-antitrypsinu a apolipoproteinu A4 byly v sérech pacientek s KO nalezeny a publikovány již dříve, proto jsme se zaměřili na protein RBP4, který byl v této souvislosti identifikován poprvé. Absolutní koncentrace proteinu RBP4 byly v jednotlivých neupravených vzorcích sér určeny metodou ELISA, koncentrace RBP4 38-40 μ g/ml odlišovala pacientky od zdravých kontrol (Obrázek 3).



Obrázek 3: Stanovení absolutní koncentrace RBP4 v původních neupravených vzorcích sér kontrolních žen a pacientek s KO metodou ELISA. Každý vzorek byl měřen v triplicátu.

Snížená hladina RBP4 v sérech pacientek s KO by mohla teoreticky souviset se sníženou hladinou retinolu v krvi. Proto jsme porovnali koncentraci retinolu v sérech pacientek a kontrol. Jeho hladina však byla v sérech obou skupin stejná.

Ověřovali jsme také (publikovanou) souvislost mezi sníženou hladinou RBP4 v krvi a inzulínovou rezistencí (diabetem 2. typu), poruchou glukózové tolerance

a syndromem polycystických ovaríí. Zpětně jsme ověřili anamnézu žen zahrnutých do experimentu. Ani pacientky s KO, ani kontrolní ženy těmito poruchami netrpěly. Proto předpokládáme, že nízká koncentrace RBP4 v sérech pacientek nesouvisí se změnami v hladinách retinolu a zmíněnými poruchami, ale s jinými změnami způsobenými přítomností nádoru. Dále jsme testovali možný vliv změn tělesné váhy pacientek na hladinu sérového RBP4. Souvislost mezi změnou hladiny RBP4 a obezitou byla publikována, ale výsledná korelace mezi RBP4 a BMI (body mass indexem) je diskutabilní. U skupiny pacientů s patologickou obezitou bylo po gastrické bandáži prokázáno snížení koncentrace sérového RBP4 [13], testovali jsme proto vztah mezi poklesem koncentrace RBP4 v séru pacientek a kachexií způsobenou nádorem. V našem případě nebyly rozdíly v BMI pacientek s KO a kontrolních žen statisticky významné.

Snížená koncentrace RBP4 v séru pacientek s KO by tak mohla být ukazatelem nutričních změn, ke kterým dochází v důsledku přítomnosti karcinomu, a to ještě před patrnou ztrátou hmotnosti pacientek. Po ověření této hypotézy na větší skupině žen s karcinomem ovaria a zdravých žen, která bude dobře stratifikovaná z hlediska stádia karcinomu, věku a celkového zdravotního stavu z důvodu možných souvisejících onemocnění, je potenciálně možné zařadit protein RBP4 do panelu diagnostických biomarkerů karcinomu ovaríí.

Výsledky tohoto projektu byly shrnuty v publikaci:

Decreased concentrations of retinol-binding protein 4 in sera of epithelial ovarian cancer patients: a potential biomarker identified by proteomics. Lorkova Lucie, Pospisilova Jana, Lacheta Jan, Leahomschi Sergiu, Zivny Jaroslav, Cibula David, Zivny Jan, Petrak Jiri. *Oncology Reports* 2012;27(2):318 (IF 2.30).

3 DISKUZE

Cílem této dizertační práce bylo demonstrovat využití proteomických přístupů a nástrojů k řešení různých biomedicínských problémů. Dvě základní proteomické strategie a kvantifikační metody spolu s hmotnostní spektrometrií jsme využili ke studiu molekulárních mechanismů závažných onemocnění, a to na vzorcích pacientů, na buněčných kulturách a jednom modelovém organismu. Tři popsané projekty poskytly řadu cenných dat, která byla publikována ve čtyřech impaktovaných časopisech. Ukázali jsme, že expresní proteomika je velmi vhodný nástroj k odhalování rozdílů v expresi proteinů ve složitých biologických vzorcích. Má tak velký potenciál zejména ve studiích bez počáteční hypotézy a umožňuje komplexní vhled do molekulárních procesů, fyziologických i patologických.

I přes dosažené úspěchy naší práce jsme si vědomi omezení, která souvisí s provedením experimentů a s technickými limity proteomických metod a hmotnostní spektrometrie.

Limity a omezení jednotlivých projektů

V prvním projektu (kapitola 2.1 Identifikace potenciálních molekulárních cílů pro selektivní likvidaci buněk lymfomů z pláštěvé zóny rezistentních na protinádorovou molekulu TRAIL) jsme odvozením rezistentního buněčného subklonu simulovali možnost vzniku rezistence nádorových buněk na TRAIL. Využili jsme k tomu buněčnou linii HBL-2 odvozenou z nádorových buněk pacienta trpícího lymfomem buněk z pláštěvé zóny. Experimenty s buněčnými kulturami jsou v základním a aplikovaném výzkumu často používané i přes řadu omezení, se kterými je nutné počítat. Kultivované buňky rostou za nefyziologických podmínek – pěstovány jsou v umělém kultivačním médiu a v atmosféře s mnohonásobně vyšším tlakem kyslíku, než odpovídá situaci ve tkáních. Kultivované buňky také postrádají obvyklý tkáňový kontext, tj. přítomnost jiných buněčných typů, s nimiž by *in vivo*

komunikovaly. V důsledku toho se fenotyp kultivovaných buněk často mění a jejich vlastnosti nemusí přesně odpovídat situaci v organismu. Proto je nutné počítat s omezenou možností aplikace získaných výsledků přímo na pacienta. Reálně může v těle pacienta v průběhu léčby TRAILem (či obecně jakoukoli protinádorovou terapií) vznikat řada buněčných klonů s odlišným fenotypem. Tento projekt si však kladl za cíl na *in vitro* modelu 1) demonstrovat potenciál proteomické analýzy k odhalení molekulárních změn asociovaných s vývojem rezistence nádorových buněk a 2) dokumentovat využití odhalených změn k navržení způsobu eliminace rezistentních buněk. V budoucnosti bychom rádi analogickou proteomickou analýzu provedli přímo na patientských vzorcích a demonstrovali tak její skutečný potenciál pro translační výzkum.

Cílem našeho druhého projektu (kapitola 2.2 Popis molekulárních mechanismů srdečního selhání s využitím potkaního modelu objemového přetížení) bylo identifikovat změny v expresi proteinů a mRNA v průběhu srdečního selhání na potkaním modelu chronického srdečního selhání (CHSS). Motivem této expresní proteomické a transkriptomické analýzy byla nutnost hlubšího pochopení onemocnění nezbytná ke zlepšení terapie CHSS. Identifikované změny přispěly k dalšímu popisu CHSS na molekulární úrovni a odhalené změny v expresi dvou enzymů MAO-A a TGM2 nás vedly k navržení dvou různých potenciálních terapeutických zásahů.

Patologické procesy spojené s vývojem a progresí CHSS dosud nebyly detailně popsány. Souvisí to nejen s komplexností tohoto klinického syndromu, ale také s tím, že studium tohoto závažného onemocnění na vzorcích myokardu pacientů není možné, protože by se neobešlo bez zbytečné zátěže pacientů a zdravých kontrol. Proto jsme se rozhodli provést proteomickou studii na dobře definovaném potkaním modelu, kde CHSS nastává v důsledku objemového přetížení srdce po operativním zákroku [9, 10]. Zvířecí modely různých lidských onemocnění jsou podobně jako experimenty s buněčnými kulturami pro základní biomedicínský výzkum velkým přínosem. Je však

nutné počítat s omezenou možností aplikace výsledků přímo na pacienta z důvodů mezidruhových rozdílů.

Možná omezení vyplývající z využití potkaního modelu však nejsou jediná, která je na tomto místě nutné diskutovat. Proteomickou a transkriptomickou analýzu jsme neprováděli na izolovaných kardiomyocytech, ale na části srdeční tkáně, myokardu. Taková tkáň neobsahuje pouze kardiomyocyty a nalezené expresní změny nemusí odrážet úroveň exprese v kardiomyocytech, ale mohou být odrazem změněné exprese v jiných typech buněk, například v endotelu nebo makrofázích infiltrujících myokard vlivem odpovědi organismu na zánětlivé procesy probíhající v poškozeném srdci. Další omezení našeho experimentu spočívá v tom, že jsme porovnávali kontrolní (zdravé) potkany se zvířaty se srdečním selháním (AVP) v jediném časovém intervalu, cca 22 týdnů po vytvoření píštěle. Rozsáhlejší analýza zahrnující více časových bodů by nám pravděpodobně umožnila rozlišit, zda získané výsledky odráží metabolické a strukturní změny způsobené srdečním selháním, nebo jestli tyto změny souvisí pouze s hypertrofií srdce, která srdečnímu selhání předchází. Takovou analýzu plánujeme provést v brzké budoucnosti.

Cílem třetího projektu (kapitola 2.3 Hledání diagnostických biomarkerů karcinomu ovaria) bylo identifikovat proteiny v sérech pacientek s karcinomem ovaria (KO), které by mohly sloužit jako biomarkery tohoto onemocnění. KO je nádorové onemocnění s velmi špatnou prognózou, u kterého je léčba komplikována především pozdní diagnózou. Pacientky většinou netrpí specifickými příznaky, které by odhalily karcinom v rané fázi. Proto je nutné pátrat po jiných diagnostických možnostech, mezi které patří právě senzitivní a specifické markery.

Sérum teoreticky obsahuje stopy všech probíhajících fyziologických i patologických dějů v podobě metabolitů, proteinů a peptidů uvolněných tkáněmi, a proto je vhodným zdrojem pro hledání biomarkerů. Biomarkerem karcinomu ovaria může být molekula pocházející přímo z nádorové buňky, nebo z okolních tkání reagujících na přítomnost nádoru, anebo to může být molekula související s imunitní

odpovědí organismu. Stejně tak to může být molekula související s jakoukoli jinou odpovědí organismu na změny probíhající v nádorové či okolní tkáni. Dá se předpokládat, že potenciální biomarker bude v séru přítomný ve velmi nízké koncentraci v porovnání s dalšími jeho složkami. Dnešní analytické metody nejsou schopné bez předchozí úpravy minoritní neznámou složku séra odhalit, protože jejich dynamický rozsah je řádově $10^4 - 10^5$ [14, 15]. Proto je nutné dynamický rozsah koncentrací jednotlivých proteinů séra snížit. V našem projektu jsem k tomu použili dva odlišné přístupy, a to imunoafinitní depleci nejhojnějších proteinů a ekvalizaci koncentrací proteinů pomocí hexapeptidové knihovny. Komplikací takové úpravy je skutečnost, že odstraněním abundantních proteinů ze séra dochází také ke ztrátám dalších proteinů a peptidů. Už odstranění albuminu ze séra může znamenat ztráty proteinů, které s albuminem interagují. Mezi takovými proteiny může teoreticky být i potenciální biomarker.

Porovnáním vzorků sér pacientek a kontrol se nám podařilo odhalit změny v koncentraci proteinu RBP4. Koncentrace RBP4 byla významně nižší v sérech pacientek s KO a při ověření metodou ELISA odlišovala pacientky od kontrol hranice 38-40 $\mu\text{g/ml}$. Vztah RBP4 ke KO je však zcela nejasný. Vyloučili jsme vliv několika možných faktorů, o kterých je známo, že mohou hladinu RBP4 ovlivňovat, a tím je koncentrace vitamínu A v krvi, diabetes 2. typu (inzulinová rezistence), polycystický syndrom ovaríí a obezita.

Snížená hladina RBP4 v séru pacientek s KO je pravděpodobně spojena buď se změnami v metabolismu retinoidů u pacientek, sníženou produkcí RBP4 v epitelu ovaríí, nebo odráží obecnější procesy související s energetickým metabolismem a dalšími systémovými změnami v organismu. V každém případě je nezbytné, aby tyto hypotézy byly v budoucnosti testovány na větší skupině pacientek a zdravých žen, která bude dobře stratifikovaná z hlediska stádia onemocnění, věku a celkového zdravotního stavu

4 ZÁVĚR

Potenciál expresní proteomiky v oblasti biomedicíny jsme demonstrovali využitím proteomických nástrojů na třech různých projektech, které se lišily jak koncepcí, tak kombinací separačních a kvantifikačních metod. Podařilo se nám odhalit některé změny související s rezistencí lymfomové buněčné linie na protinádorovou molekulu TRAIL a navrhnout možné terapeutické cíle pro selektivní likvidaci těchto rezistentních buněk. Dále jsme přispěli k popisu dosud nejasných mechanismů patologických změn v selhávajícím myokardu studiem potkaního modelu chronického srdečního selhání a navrhli dva možné terapeutické zásahy vhodné k léčbě tohoto onemocnění. V neposlední řadě jsme porovnáním sér pacientek s karcinomem ovaria se séry kontrolními identifikovali potenciální diagnostický biomarker karcinomu.

Proteomika je dynamický metodický a koncepční přístup ke studiu organismů, který se stal součástí základního i aplikovaného výzkumu, protože při vhodném uspořádání experimentu a kritickém vyhodnocení získaných informací poskytuje cenný vhled do fyziologických i patologických molekulárních procesů.

5 POUŽITÁ LITERATURA

1. Anderson, N.L., *The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects*. Molecular & Cellular Proteomics, 2002. **1**(11): p. 845-867.
2. Bjellqvist, B., K. Ek, P.G. Righetti, et al., *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications*. J Biochem Biophys Methods, 1982. **6**(4): p. 317-39.
3. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
4. Perez-Galan, P., M. Dreyling, and A. Wiestner, *Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era*. Blood, 2011. **117**(1): p. 26-38.
5. Wiley, S.R., K. Schooley, P.J. Smolak, et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
6. Pitti, R.M., S.A. Marsters, S. Ruppert, et al., *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12687-90.
7. Petrak, J., O. Toman, T. Simonova, et al., *Identification of molecular targets for selective elimination of TRAIL-resistant leukemia cells. From spots to in vitro assays using TOP15 charts*. Proteomics, 2009. **9**(22): p. 5006-15.
8. Sears, S.F., L. Woodrow, K. Cutitta, et al., *A patient's guide to living confidently with chronic heart failure*. Circulation, 2013. **127**(13): p. e525-8.
9. Flaim, S.F., W.J. Minteer, S.H. Nellis, et al., *Chronic arteriovenous shunt: evaluation of a model for heart failure in rat*. Am J Physiol, 1979. **236**(5): p. H698-704.
10. Garcia, R. and S. Diebold, *Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat*. Cardiovasc Res, 1990. **24**(5): p. 430-2.
11. Ross, P.L., Y.N. Huang, J.N. Marchese, et al., *Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(12): p. 1154-69.
12. Cho, K.R. and M. Shih Ie, *Ovarian cancer*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 287-313.
13. Haider, D.G., K. Schindler, G. Prager, et al., *Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 1168-71.
14. Rabilloud, T., *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains*. Proteomics, 2002. **2**(1): p. 3-10.
15. Marshall, A.G., C.L. Hendrickson, and G.S. Jackson, *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer*. Mass Spectrom Rev, 1998. **17**(1): p. 1-35.

6. SEZNAM PUBLIKACÍ

Výsledky komentovaných projektů byly shrnuty ve čtyřech publikacích:

Resistance to TRAIL in mantle cell lymphoma cells is associated with the decreased expression of purine metabolism enzymes. **Pospíšilová Jana**, Vít Ondřej, Lorková Lucie, Klánová Magdalena, Živný Jan, Klener Pavel, Petrák Jiří. International Journal of Molecular Medicine 2013; 31(5):1273 (IF 1,96).

Proteomic and transcriptomic analysis of heart failure due to volume overload in a rat aorto-caval fistula model provides support for new potential therapeutic targets - monoamine oxidase A and transglutaminase 2. Petrák Jiří, **Pospíšilová Jana**, Šedinová Miroslava, Jedelský Petr, Lorková Lucie, Vít Ondřej, Kolář Michal, Strnad Hynek, Beneš Jan, Sedmera David, Červenka Luděk, Melenovský Vojtěch. Proteome Science 2011; 11,9(1):69 (IF 2.42).

Myocardial morphological characteristics and proarrhythmic substrate in the rat model of heart failure due to chronic volume overload. Beneš Jiří Jr, Melenovský Vojtěch, Škaroupková Petra, **Pospíšilová Jana**, Petrák Jiří, Červenka Luděk, Sedmera David. Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology 2011; 294(1):102 (IF 1.34).

Decreased concentrations of retinol-binding protein 4 in sera of epithelial ovarian cancer patients: a potential biomarker identified by proteomics. Lorková Lucie, **Pospíšilová Jana**, Lacheta Jan, Leahomschi Sergiu, Živný Jaroslav, Cibula David, Živný Jan, Petrák Jiří. Oncology Reports 2012; 27(2):318 (IF 2.30).