

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Vývojová biologie

PROTEOMOVÁ ANALÝZA
BUNĚČNÉ PROLIFERACE A DIFERENCIACE
NA MODELECH NERVOVÝCH KMENOVÝCH BUNĚK
A NÁDOROVÝCH BUNĚK

Dizertační práce

2007

Mgr. Helena Skalníková

školitel: RNDr. Hana Kovářová, CSc.

Dizertační práci jsem vypracovala na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i., v Liběchově.

Prohlašuji, že dizertační práce ani její žádná část nebyla předložena ke získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Na tomto místě bych chtěla v první řadě poděkovat své školitelce RNDr. Haně Kovářové, CSc. za velmi motivující vedení a podporu během celého doktorského studia. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Petrovi Haladovi, PhD za identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií. V neposlední řadě děkuji svým kolegům z Laboratoře biochemie a molekulární biologie zárodečných buněk a Laboratoře buněčné regenerace a plasticity Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., za vytvoření příjemného pracovního prostředí a také svým přátelům za podporu během studia.

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru AV0Z50450515, Centra buněčné terapie a tkáňových náhrad 1M0538, grantu GAČR 301/05/0418 a interních grantů UZFG/05/09 a UZFG/06/17.

OBSAH

1	ÚVOD	1
1.1	Diferenciace nervových kmenových buněk	2
1.1.1	Nervové kmenové buňky	2
1.1.2	Diferenciace nervových kmenových buněk	2
1.1.3	Miniaturní prase jako model v biomedicíně	3
1.2	Inhibice proliferace nádorových buněk	3
1.2.1	Regulace buněčného cyklu	3
1.2.2	Syntetické inhibitory cyklin-dependentních kináz	4
1.3	Proteomika a její metody	4
1.3.1	Proteomika	4
1.3.2	Metody analýzy proteomu	5
1.3.3	Analýza posttranslačních modifikací proteinů	6
2	CÍLE PRÁCE	7
3	METODY	8
3.1	Izolace a kultivace buněk	8
3.2	Analýza proteinů pomocí 2D elektroforézy a 2D kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie	8
3.3	Verifikace kvantitativních změn proteinů získaných z proteomových analýz	9
3.4	iTRAQ kvantifikace peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie	9
3.5	Proteinové mikročipy	9
4	PŘEHLED PUBLIKACÍ	10
4.1	Publikace související s tématem dizertační práce	10
4.1.1	Diferenciace nervových kmenových buněk	10
4.1.2	Inhibice proliferace nádorových buněk	10
4.2	Publikace nesouvisející s tématem dizertační práce, publikované během doktorského studia	10
5	KOMENTÁŘ K PUBLIKACÍM SOUVISEJÍCÍM S TÉMATEM DIZERTAČNÍ PRÁCE:	11
5.1	Charakterizace proteomu kmenových buněk	11
5.2	Studium diferenciace nervových kmenových buněk pomocí proteomických metod	13
5.3	Změny v buněčných signalizacích doprovázející diferenciaci nervových kmenových buněk	16
5.4	Proteinové změny doprovázející protinádorový účinek inhibitoru cyklin-dependentních kináz: Identifikace kandidátních biomarkerů pomocí 2-D kapalinové separace a následné hmotnostní spektrometrie	21
5.5	Systém založený na dvojrozměrné kapalinové chromatografii proteinů jako alternativa k dvojrozměrné gelové elektroforéze	23
5.6	Inhibitory cyklin-dependentních kináz a rakovina: využití proteomových studií k určení molekulárních mechanismů a účinnosti nových léčiv	23
5.7	Frakcionace a relativní kvantifikace proteinů pomocí systému ProteomeLab™ PF 2D a aminoreaktivního izobarického značení iTRAQ následovaného tandemovou hmotnostní spektrometrií	25
6	ZÁVĚR	27
7	CITOVANÁ LITERATURA	28

1 ÚVOD

Množení jednobuněčných organismů je limitováno pouze přítomností živin v prostředí. Naproti tomu dělení buněk mnohobuněčného organismu musí být přísně regulováno, aby bylo zajištěno vytváření a uchování struktury a funkce organismu. Na tvorbě a obnově tkání se podílejí kmenové buňky, které jsou definovány jako buňky schopné dlouhodobě obnovovat samy sebe a zároveň vytvářet diferencované buňky se specializovanými funkcemi. Podle vývojového stadia organismu, ze kterého jsou kmenové buňky izolovány, rozeznáváme embryonální nebo tkáňové kmenové buňky. Embryonální kmenové buňky lze izolovat z vnitřní buněčné masy preimplantační blastocysty a jsou schopné se podílet na tvorbě většiny tkání daného organismu. Díky této vlastnosti jsou označovány jako pluripotentní buňky. Tkáňové kmenové buňky pocházejí z tkání plodu nebo dospělého organismu a jejich přítomnost byla prokázána např. v kostní dřeni, kůži, epitelu trávicí soustavy, játrech, slinivce břišní, ledvinách, svalech a mozku. Na rozdíl od embryonálních kmenových buněk jsou tkáňové kmenové buňky označovány jako multi- nebo unipotentní [1].

Kmenové buňky jsou schopné dlouhodobě přežít a proliferovat a tím mají více možností akumulovat četné mutace, které mohou vést ke zvýšené proliferaci a tvorbě nádorů. Koncept nádorových kmenových buněk byl vytvořen při *in vitro* studiu myších myelomových buněk [2]. U hematopoetických malignit, ale i u solidních nádorů prsu nebo mozkových nádorů bylo pozorováno, že jen malá část nádorových buněk je schopná proliferace a tvorby nádoru po transplantaci do imunodeficitní myši. Tyto buňky jsou považovány za nádorové kmenové buňky. Nádory můžeme tedy považovat za onemocnění související s kmenovými buňkami (shrnutí v [3] a [4]).

Tato dizertační práce je zaměřena na analýzu proteomu a jeho změn ve dvou významných vývojových procesech:

- i) v průběhu diferenciaci nervových kmenových buněk do tří hlavních typů nervových buněk (neuronů, astrocytů a oligodendrocytů)
- ii) při inhibici proliferace nádorových buněk s využitím nové generace protinádorových přípravků na bázi inhibitorů cyklin-dependentních kináz.

1.1 Diferenciace nervových kmenových buněk

1.1.1 Nervové kmenové buňky

V centrálním nervovém systému byla přítomnost kmenových buněk (NSCs) zjištěna teprve na počátku 90. let minulého století [5; 6]. Nervové kmenové buňky jsou definovány jako multipotentní progenitory, které obnovují samy sebe a dávají vznik různým typům neuronů a glií, které jsou přítomné v nervovém systému [7]. Poprvé byly nervové prekuzory izolovány ze subventrikulární zóny předního mozku, později i z hippocampu, mozkové kůry, striata, optického nervu a míchy. Tyto buňky mohou být množeny v tkáňové kultuře jako volně plovoucí shluky buněk (neurosféry) nebo jako přisedlá jednovrstevná kultura. Ke stimulaci růstu se nejčastěji používá epidermální růstový faktor a bazický fibroblastový růstový faktor [8].

Díky možnosti izolovat, množit a opětovně implantovat nervové kmenové buňky do centrálního nervového systému jsou NSCs vhodným kandidátem pro léčbu metabolických a degenerativních nervových chorob nebo i jiných mozkových a míšních lézí. V současnosti se testuje použití kmenových buněk pro léčbu mozkové ischemie/hypoxie, poranění míchy a neurodegenerativních onemocnění, včetně Parkinsonovy nebo Alzheimerovy nemoci.

1.1.2 Diferenciace nervových kmenových buněk

Mechanismy, které řídí sebeobnovu a diferenciaci kmenových buněk nejsou dosud zcela známé. Nervové buňky diferencují *in vivo* v mikroprostředí, tzv. niche, tvořeném mezibuněčnými interakcemi a difúzibilními signálními molekulami, ale také interakcemi kmenových buněk s endoteliálními buňkami, extracelulární matrix a bazální laminou, které udávají orientaci buněčného dělení. Během nitroděložního vývoje jsou primárním prekuzorem neuronů a glií radiální glie. Postnatálně se radiální glie mění na astrocyty, z nichž část si uchovává vlastnosti kmenových buněk [9]. U dospělých jedinců probíhá tvorba nových neuronů zejména v subventrikulární zóně mozku.

In vitro lze nervovou diferenciaci buněk navodit odstraněním růstových faktorů nebo diferenciálními faktory jako jsou retinová kyselina, inzulínový růstový faktor nebo „brain-derived neurotrophic factor“. Diferencované nervové buňky je možné detekovat barvením buněk na typické znaky (tzv. markery) neuronů, astrocytů a oligodendrocytů. Přítomnost specifických proteinů a jejich funkce do značné míry určuje morfologii a funkci diferencovaných buněk.

Změny doprovázející přechod z proliferující kmenové buňky do diferencované buňky lze sledovat na úrovni regulace nukleových kyselin metodami transkriptomiky, jako jsou cDNA mikročipy, transgeneze nebo RNA interference [10]. Změna fenotypu buňky je ale konečným odrazem změn na úrovni proteinů, a to kvalitativních nebo kvantitativních změn celkových hladin proteinů a jejich posttranslačních modifikací, změnou buněčných lokalizací či interakcí proteinů s jinými molekulami. Proto nástroje proteomiky, tj. poměrně nové vědní oblasti, která studuje biologické procesy na úrovni proteinů, poskytují cenné údaje pro podrobnou charakterizaci mechanismů, které řídí buněčnou proliferaci a diferenciaci. Nespornou výhodou proteomových studií je globální přístup, oproti studiu jednotlivých proteinů.

1.1.3 Miniaturní prase jako model v biomedicíně

Ve srovnání s hlodavci nabízí prase jako zvířecí model mnohé přednosti, zejména díky svému anatomickému uspořádání i fyziologickým a imunologickým funkcím blízkým člověku. Relativně snadná je příprava transgenních prasat a jejich využití k modelování lidských chorob. Dlouhá délka života prasete umožňuje dlouhodobé sledování účinků experimentu a přispívá k zavedení bezpečných protokolů pro použití v lidské medicíně. Pro snadnější chov bylo vyšlechtěno několik kmenů miniaturních prasat. V současné době je prase používáno například k získání štěpů pro xenotransplantace, pro studium reprodukce a k experimentálním léčebným zákrokům včetně aplikace kmenových buněk [11]. Také v této práci jsem využila model prasečích nervových kmenových buněk.

1.2 Inhibice proliferace nádorových buněk

1.2.1 Regulace buněčného cyklu

Proliferace buněk je nutná pro růst a vývoj organismu a pro obnovu tkání. Proliferující buňka prochází buněčným cyklem, na jehož konci vznikají dvě dceřinné buňky. Průchod buněčným cyklem je řízen postupnou aktivací serin/threoninových kináz zvaných cyklin-dependentní kinázy (CDKs). Aktivita kinázy a její substrátová specifita je řízená nekovalentní vazbou regulační podjednotky, cyklinu, na kinázu. Dosud bylo popsáno 11 členů rodiny CDK kináz, které tvoří komplexy s cykliny A, B, C, D (D1, D2, D3) a E [12].

Kromě vazby cyklinu je aktivita CDKs regulována dalšími mechanismy jako fosforylacemi a defosforylacemi specifických míst kinázy, regulovaným sestavováním komplexu cyklin-CDK, ubikvitinem zprostředkovanou degradací cyklinů a pomocí

přirozených inhibitorů CDKs [13]. Specifické proteinové inhibitory cyklin-dependentních kináz inhibují buď pouze členy CDK4/CDK6 rodiny kináz (inhibitory INK4 rodiny: p16, p15, p18 a p19) nebo i další CDKs (inhibitory Cip/Kip rodiny: p21, p27 and p57) [12]. Poruchy regulace buněčného cyklu a časté mutace v molekulách přirozených inhibitorů CDKs byly zaznamenány u většiny nádorových buněk.

1.2.2 Syntetické inhibitory cyklin-dependentních kináz

Synteticky připravené inhibitory CDKs jsou jedním z perspektivních prostředků protinádorové léčby. Syntetické inhibitory ze skupiny trisubstituovaných purinů byly objeveny v roce 1994 při sledování inhibičního vlivu rostlinných hormonů cytokininů na průchod buněčným cyklem. Jeden z derivátů cytokininů nazvaný olomoucín vykazoval inhibiční aktivitu komplexu CDK1/cyklin B již při mikromolárních koncentracích [14]. Od té doby bylo syntetizováno několik derivátů odvozených od olomoucínu (viz příloha str. P50, obr. 1). Tyto syntetické inhibitory CDKs kompetitivně inhibují vazbu ATP na CDKs, zastavují buněčný cyklus na přechodech G1/S a G2/M, jsou velmi cytotoxické pro nádorové buňky v *in vitro* testech a jeden z derivátů, roscovitin, je nyní testován v klinických studiích [15].

Pro porozumění mechanismu působení daného preparátu je nutné sledovat vliv inhibitoru cyklin-dependentních kináz na nádorové buňky na molekulární úrovni.

1.3 Proteomika a její metody

1.3.1 Proteomika

Proteomika je vědní disciplína, která využívá celkový pohled na proteiny přítomné v buňkách, tělesných tekutinách nebo tkáních s cílem pochopit buněčné procesy na úrovni proteinů a objevit a identifikovat bioznaky těchto procesů. Pojem „proteom“ jako proteinový komplement genomu poprvé použil v roce 1994 australský postgraduální student Mark Wilkins na konferenci v italské Sieně. Proteomika doplňuje genomové a transkriptomové studie o úroveň proteinů. Právě proteiny určují výsledný fenotyp buňky, její tvar, funkce a chování. Navíc proteiny podléhají mnoha posttranslačním modifikacím, které určují jejich aktivitu, lokalizaci a interakce s jinými molekulami a které nelze odhalit studiem na úrovni DNA nebo mRNA.

Proteomové studie jsou zaměřeny na charakterizaci proteinů přítomných ve studovaném objektu (tzv. „protein profiling“) nebo na sledování změn v hladinách, modifikacích či interakcích proteinů během experimentálního zásahu (tzv. „functional or

differential proteomics“). Cílem proteomiky je nalézt typické znaky těchto procesů. Velké úsilí je věnováno nalezení diagnostických a prediktivních znaků různých onemocnění v krevní plazmě či jiných tělních tekutinách. V naší studii jsme se zaměřili mimo jiné na nalezení znaků odpovídavosti/rezistence nádorových buněk na protinádorovou léčbu.

Na rozdíl od metod transkriptomiky je studium na úrovni proteinů vzhledem k jejich obrovské rozmanitosti mnohem komplikovanější a vyžaduje náročné metodické zázemí.

1.3.2 Metody analýzy proteomu

K velkému rozvoji metod proteomiky došlo zejména díky vývoji technik jako jsou dvojrozměrná gelová elektroforéza, kapalinová chromatografie (LC), jemné ionizační techniky, např. ESI (ionizace elektrosprejem, [16]) a MALDI („matrix assisted laser desorption ionisation“, [17]) pro hmotnostní spektrometrii, tandemové hmotnostní spektrometrie a bioinformatiky. Techniky pro separaci a identifikaci proteinů mají různé limitace související s velkým rozsahem koncentrací proteinů např. v séru, ale i fyzikálně-chemickými vlastnostmi proteinů jako jsou extrémní molekulové hmotnosti, omezená rozpustnost/hydrofobicita nebo příliš vysoké či nízké izoelektrické body. Díky novým technologiím se daří tyto problémy stále více minimalizovat.

Klasická proteomika používá k separaci proteinů dvojrozměrnou gelovou elektroforézu (2-DE) [18]. V prvním směru jsou pomocí izoelektrické fokusace v gelu s imobilizovaným gradientem pH [19] proteiny soustředěny v místě svého izoelektrického bodu. Poté se proteiny rozdělí klasickou SDS elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Po vizualizaci proteinů barvením získáme dvojrozměrnou proteinovou mapu, kde jednotlivé skvrny představují proteiny. Pomocí speciálních počítačových programů je možné porovnat několik proteinových map a nalézt skvrny, jejichž hladina byla ovlivněna během experimentálnímu zásahu. Proteinovou skvrnu lze z gelu vyříznout, štěpit proteázou na menší peptidy a poté určit jejich molekulovou hmotnost pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Sekvenci peptidu je možné stanovit pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Hmotnosti peptidů jsou charakteristické pro daný protein („peptide mass fingerprinting“, PMF) a porovnáním naměřených hmotností s teoretickými hodnotami v databázích lze protein identifikovat.

Vícerozměrná LC je často užívaná k separacím proteinů nebo peptidů. Jedním z instrumentů nedávno vyvinutým pro dvojrozměrnou LC proteinů je ProteomeLabTM PF 2D (Beckman Coulter), který používá kombinaci chromatofokusace a chromatografie s reverzní fází (RP). Kombinace těchto chromatografií pro analýzu proteinů byla poprvé

popsána v roce 2001 [20]. V poslední době se stále více uplatňují chromatografické separace peptidů, které jsou připravovány štěpením proteinů specifickou proteázou. Štěpení na peptidy však mnohonásobně zvyšuje složitost vzorku a vyžaduje použití vysoce účinných separačních metod. Většinou se používá vícerozměrná chromatografie, kdy v prvním směru se nejčastěji používá iontoměničová LC následovaná RP chromatografií. Výhodou je možnost přímého napojení RP chromatografických kolon na jehlu elektrosprejového ionizátoru, kde se peptidy ionizují a mohou být přímo detekovány a sekvenovány v tandemovém hmotnostním spektrometru. Protože se v tomto uspořádání získá obrovské množství dat, jsou k interpretaci hmotnostních spekter potřeba výkonné počítačové programy, aby se zabránilo falešně pozitivním identifikacím proteinů.

1.3.3 Analýza posttranslačních modifikací proteinů

Posttranslační modifikace a zejména fosforylace hrají klíčovou roli v přenosu signálů, regulaci genové exprese a metabolismu buněk. Základní buněčné procesy jako je proliferace a diferenciací jsou řízeny reverzibilními fosforylacemi na určitých serinových, threoninových a tyrozinových zbytcích. Přenos fosfátové skupiny na protein je zprostředkován proteinovými kinázami, naopak defosforylace je katalyzována fosfatázami. Proteinové kinázy a fosfatázy jsou jedním z hlavních cílů léčby u různých onemocnění [21].

Fosforylace proteinů lze detekovat pomocí specifických protilátek, které rozeznávají určité fosforylované aminokyselinové zbytky jednotlivých proteinů [22]. Protilátka lze použít např. při imunoblotu, imunocytochemickém barvení nebo jako imobilizované na proteinových mikročipech.

Pomocí hmotnostní spektrometrie lze detekovat změnu molekulové hmotnosti posttranslačně modifikovaného peptidu a také určit polohu modifikace. Afinity obohacení modifikovaných peptidů zvyšuje relativní množství peptidu ve vzorku a usnadňuje jeho analýzu. K obohacení fosforylovaných peptidů lze použít afinitní chromatografii s imobilizovanými ionty Fe^{3+} nebo Ga^{3+} („immobilised metal affinity chromatography“, IMAC) nebo kolony plněné oxidem titaničitým [23]. Toto obohacení je nezbytné vzhledem k tomu, že nefosforylované peptidy významně potlačují ionizaci modifikovaných molekul při hmotnostní spektrometrii.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem dizertační práce byla proteomová analýza diferenciacce nervových kmenových buněk a inhibice proliferace nádorových buněk.

Specifické cíle dizertační práce jsou:

- identifikace a klasifikace proteinů přítomných v prasečích nervových kmenových buňkách („protein profiling“) pomocí dvojrozměrné gelové elektroforézy
- analýza kvalitativních a kvantitativních změn v hladinách proteinů v průběhu *in vitro* diferenciacce prasečích nervových kmenových buněk
- detekce změn v hladinách signálních proteinů a jejich fosforylací v průběhu diferenciacce nervových kmenových buněk pomocí protilátkových mikročipů
- sledování účinku inhibitoru cyklin dependentních kináz na nádorové buňky na modelu hematologické malignity s využitím dvojrozměrné kapalinové chromatografie k separaci proteinů
- relativní kvantifikace proteinových změn s využitím izobarického značení peptidů iTRAQ a následné tandemové hmotnostní spektrometrie.

3 METODY

3.1 Izolace a kultivace buněk

Nervové kmenové buňky jsem izolovala z mozkových hemisfér 40-denních plodů miniaturních prasat. Zkoušela jsem i izolaci z 28 a 80 denních plodů, ale izolace ze 40-denních plodů poskytovala nejvyšší množství buněk. Ze směsi mozkových buněk jsem nervové kmenové buňky získala pomocí kultivace v médiu neobsahujícím sérum, ale pouze EGF, bFGF a suplementy N-2 a B-27. Toto médium neumožňuje růst jiných buněk, než NSCs. Diferenciaci buněk jsem navozovala retinovou kyselinou. Přítomnost diferencovaných nervových buněk jsem ověřovala imunocytochemickým barvením buněk na markery neuronů (β -III tubulin), astrocytů („glial fibrillary acidic protein“, GFAP) a oligodendrocytů („2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase“, CNPáza).

Nádorové buňky linie CEM (buňky lidské T-lymfoblastoidní leukemie) byly kultivovány v RPMI-1640 médiu s 10% fetálního hovězího séra. Po 12 hodinách od pasážování byl k buňkám přidán inhibitor cyklin-dependentních kináz, bohemin, do výsledné koncentrace v médiu 60 μ M.

3.2 Analýza proteinů pomocí 2D elektroforézy a 2D kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Extrakty proteinů jsem separovala pomocí dvojrozměrné gelové elektroforézy nebo pomocí dvojrozměrné kapalinové chromatografie.

Pro analýzu NSCs jsem použila dvojrozměrnou gelovou elektroforézu. Nervové kmenové buňky lze z primárních kultur získat pouze v omezeném množství, a proto jsem k separaci zvolila právě 2-DE, která umožňuje analyzovat menší nanášky proteinů (řádově μ g).

Proteiny nádorových buněk CEM buněčné linie jsem separovala pomocí 2-D HPLC, systémem ProteomeLabTM PF 2D. Dvojrozměrná gelová elektroforéza již byla pro analýzu této buněčné linie použita v předchozí studii [24].

Vybrané proteiny byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem AV ČR, Oddělením biochemie a molekulární biologie University of Southern Denmark, Odense, Dánsko a Ústavem analytické chemie AV ČR v Brně.

3.3 Verifikace kvantitativních změn proteinů získaných z proteomových analýz

Změny v hladinách proteinů jsem ověřovala po přenosu proteinů na PVDF membránu (imunoblot) s detekcí proteinů pomocí specifických protilátek po jednorozměrné a dvojrozměrné elektroforetické separaci proteinů.

Buněčná lokalizace α -B crystallinu, hnRNP A1 a hnRNP A2/B1 byla u NSCs dále studována pomocí imunocytochemického fluorescenčního barvení spolu s barvením na typické znaky jednotlivých diferencovaných nervových buněk.

Pokles hladiny Crk-like proteinu po působení inhibitoru CDKs byl potvrzen v *in vivo* studii na imunodeficitních myších, kterým byly přeneseny nádorové buňky linie K562, ve spolupráci s Laboratoří experimentální medicíny Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

3.4 iTRAQ kvantifikace peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie

I přes vysokou rozlišovací schopnost dvojrozměrných separačních metod proteinů mohou některé frakce obsahovat více než jeden protein. Problém kvantifikace jednotlivých proteinů lze překlenout použitím další metody pro kvantifikaci a identifikaci peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie. Jako možnou metodu pro značení frakcí z ProteomeLabTM PF 2D systému jsem zvolila izobarické značení iTRAQ („isobaric tags for relative and absolute quantitation“) Tento způsob značí peptidy na aminokyselinovém konci a na aminoskupině lyzinu. Pro relativní kvantifikaci se následně používá tandemová MS.

3.5 Proteinové mikročipy

Přenos signálu v buňce je zajištěn zejména fosforylacemi proteinů. Ke studiu změn fosforylací určitých proteinů během diferenciaci nervových kmenových buněk byly ve spolupráci s firmou Kinexus Bioinformatics Corporation, Vancouver, Kanada, použity protilátkové mikročipy, na kterých je imobilizováno přes 600 protilátek. Po interakci mikročipu s buněčným lyzátem bylo vyhodnocením vybráno 32 proteinů, jejichž hladina/fosforylace se signifikantně lišila u diferencovaných buněk oproti NSCs. Tyto změny byly dále ověřeny imunoblotem s detekcí specifickou protilátkou po separaci proteinů SDS elektroforézou a přenosu na membránu.

4 PŘEHLED PUBLIKACÍ

4.1 Publikace související s tématem dizertační práce

4.1.1 Diferenciace nervových kmenových buněk

- 1) Vodička P., Skalníková H., Kovářová H. *The Characterization of Stem Cell Proteomes. Current Opinion in Molecular Therapeutics* 2006, 8:232-239. **IF 2,70.**
- 2) Skalníková H., Halada P., Vodička P., Motlík J., Řehulka P., Hørning O., Chmelík J., Jensen O.N., Kovářová H. *A proteomic approach to studying the differentiation of neural stem cells. Proteomics* 2007, 14 stran, v tisku. **IF 6,088.**
- 3) **připravovaná publikace** Skalníková H., Pelech S., Kovářová H. *Changes in cellular signalling involved in neural stem cells differentiation.* (bude podáno do Cloning and Stem cells, IF 3,026).

4.1.2 Inhibice proliferace nádorových buněk

- 4) Skalníková H., Halada P., Džubák P., Hajdúch M., Kovářová H. *Protein Fingerprints of Anti-cancer Effects of Cyclin-dependent Kinase Inhibition: Identification of Candidate Biomarkers Using 2-D Liquid Phase Separation Coupled to Mass Spectrometry. Technology in Cancer Research and Treatment* 2005, 4:447-454. **IF 1,68.**
- 5) Skalníková H., Kovářová H., Moos J., Filová V., Halada P. *The System Based on Principle of Two-Dimensional Liquid Chromatography of Proteins as an Alternative to Two-Dimensional Electrophoresis. Chemické listy* 2005, 99:952-956. **IF 0,45.**
- 6) Hajdúch M., Skalníková H., Halada P., Vydra D., Džubák P., Dziechciarková M., Strnad M., Radioch D., Kovářová H. *Cyclin-dependent kinase inhibitors and cancer: usefulness of proteomic approaches in assessment of the molecular mechanisms and efficacy of novel therapeutics. Kapitola v knize Clinical Proteomics* (editoři M. Dunn and J. Van Eyk), VCH a Wiley Company, Německo, v tisku.
- 7) Skalníková H., Řehulka P., Chmelík J., Suresh G., Kovářová H. *Fractionation and relative quantitation of proteins using ProteomeLabTM PF 2D system and amine-reactive isobaric tagging iTRAQ coupled to tandem mass spectrometry.* Podáno do Proteomics IF 6,088.

4.2 Publikace nesouvisející s tématem dizertační práce, publikované během doktorského studia

- Skalníková H., Freiberger T., Chumchalová J., Grombířiková H., Šedivá A. *Cost-effective genotyping of human MBL2 gene mutations using multiplex PCR. Journal of Immunological Methods* 2004, 295:139–147. **IF 2,57.**

5 KOMENTÁŘ K PUBLIKACÍM SOUVISEJÍCÍM S TÉMATEM DIZERTAČNÍ PRÁCE:

5.1 Charakterizace proteomu kmenových buněk

The Characterization of Stem Cell Proteomes.

Vodička P., Skalníková H., Kovářová H.

Current Opinion in Molecular Therapeutics 2006, 8:232-239.

V tomto review jsou shrnuty výsledky proteomových studií, které byly dosud provedeny u kmenových buněk, spolu s přehledem použitých metodik. První proteomové studie kmenových buněk byly publikovány až po roce 2000, tj. až po ustálení prvních protokolů pro získání a kultivaci kmenových buněk v množství dostatečném pro analýzu proteinů. Zároveň vývoj nových separačních a detekčních metod a citlivějších hmotnostních spektrometrů umožnil rozvoj této vědní oblasti.

Základním nástrojem pro separaci proteinů kmenových buněk dosud zůstává dvojrozměrná gelová elektroforéza s vizualizací proteinů zejména barvením dusičnanem stříbrným nebo fluorescenčním barvením. Stále častěji se též využívají chromatografické separace proteinů nebo peptidů. Pro analýzu kmenových buněk byly použity i metody pro relativní kvantifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie, a to metabolické značení SILAC („stable isotope labeling by amino acid in cell culture“,) [25] a iTRAQ [26]. Pro snížení složitosti vzorku byly použity frakcionace buněk na jadernou a cytoplazmatickou složku [27]. První studie proteomu kmenových buněk byly popisného charakteru, zaměřené na celkové mapování proteinů, které jsou detekovatelné v různých typech buněk.

Jedním z nejlépe zmapovaných proteomů je proteom myších embryonálních kmenových buněk, které je možné dlouhodobě kultivovat v nediferencovaném stavu za přítomnosti leukemického inhibičního faktoru (LIF). Rozsáhlá studie linie R1 pomocí 2D elektroforézy s izoelektrickou fokusací při pH gradientech 3-10, 4-7 a 6-11 byla provedena Elliotem a kolegy [28]. Ze 700 proteinových skvrn vybraných pro MS analýzu se podařilo 241 identifikovat a tyto odpovídaly 218 unikátním (=neopakujícím se v různých proteinových databázích) proteinům.

Pro srovnání při použití 2D chromatografie a qTOF hmotnostní spektrometrie se u myších embryonálních kmenových buněk linie E14-1 podařilo identifikovat 1790 proteinů. Nejčastěji byly zastoupeny proteiny účastníci se syntézy a degradace proteinů, dále

metabolismu a tvorby energie, syntézy DNA a RNA. Více než třetina identifikovaných proteinů byly proteiny s jadernou lokalizací, mezi nimiž bylo nalezeno 39 transkripčních faktorů včetně faktorů typických pro kmenové buňky (Oct-3/4, Sox-2, UTF-1). Navíc byly u 84 proteinů detekovány posttranslační modifikace [29].

Kromě myších embryonálních kmenových buněk byl mapován proteom lidských kmenových buněk, a to fetálních nervových kmenových buněk linie ReNcell VM [30], hematopoetických buněk pupečnickové krve [31], a mezenchymových kmenových buněk z pupečnickové krve [32].

Ve snaze zmapovat faktory nutné k růstu lidských embryonálních kmenových buněk bylo analyzováno médium kondiciované kulturou lidských novorozeneckých fibroblastů linie HNF02, která se používá jako podpůrná vrstva při kultivaci lidských embryonálních kmenových buněk. Bylo identifikováno 102 proteinů, většinou proteinů extracelulární matrix, ale i dva růstové faktory gremlin a Dickkopf homolog 3 [33].

V další etapě se různí autoři zaměřili na sledování změn v hladinách proteinů během diferenciaci kmenových buněk do specializovaných buněčných typů. Spontánní diferenciaci myších embryonálních kmenových buněk po odstranění LIF z kultivačního média byla studována Kurisakim a kol. [27] pomocí 2-DE s fluorescenčně barvenými vzorky separovanými v jednom gelu („difference in gel electrophoresis“, DIGE).

Další pokročilá metodika SELDI-TOF MS („surface-enhanced laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry“), využívající vazbu proteinů na chemicky definované povrchy a přímé stanovení jejich molekulové hmotnosti pomocí hmotnostní spektrometrie, byla použita k porovnání obsahu proteinů v proliferačních a diferencovaných lidských buňkách embryonálního karcinomu. Byl nalezen peptid o Mr 7207.5 daltonů, který byl typický pro nediferencované buňky. Hladina tohoto peptidu byla porovnána u 8 linií s různým stupněm diferenciaci [34].

Diferenciaci nervových kmenových buněk byla dosud studována dvěma kolektivy. V prvním případě šlo o diferenciaci nervových kmenových buněk krysího hippokampu do astrocytů a neuronů navozenou přidáním 2% fetálního hovězího séra a odstraněním EGF a FGF. Mezi 128 identifikovanými proteinovými skvrnami převládaly proteiny účastníci se metabolismu, udržující správnou konformaci („folding“) proteinů, zahrnuté v transkripci, cytoskeletu, ale i signalizaci, detoxikaci a diferenciaci [35]. V následující studii byla odstraněním růstových faktorů z kultivačního média navozena diferenciaci imortalizovaných lidských buněk fetálního středního mozku a bylo identifikováno 45 proteinů, jejichž hladina

se měnila v průběhu diferenciaci [30]. Další dvě proteomové studie se zabývaly diferenciací embryonálních kmenových buněk do nervových buněk [36; 37].

Dále byla provedena proteomová analýza diferenciaci mezenchymových buněk [25; 38], hematopoetických buněk [26; 39], myoblastů [40] a adipocytů [41].

Z přehledu je patrné, že proteomika kmenových buněk je nový a dynamicky se rozvíjející obor. K analýzám proteomů kmenových buněk byly použity pokročilé proteomické metody. Mezi identifikovanými proteiny se podařilo zachytit i proteiny signálních drah a transkripční faktory, které se v buňkách nacházejí jen ve velmi málo kopiích.

5.2 Studium diferenciaci nervových kmenových buněk pomocí proteomických metod

A proteomic approach to studying the differentiation of neural stem cells.

Skalníková H., Halada P., Vodička P., Motlík J., Řehulka P., Hørning O., Chmelík J., Jensen O.N., Kovářová H.

Proteomics, v tisku

Tato publikace prezentuje výsledky proteomové analýzy diferenciaci nervových kmenových buněk na prasečím modelu. V první části jsou charakterizovány proteiny konstitutivně přítomné v nervových kmenových buňkách i diferencovaných nervových buňkách, druhá část je věnována změnám v hladinách proteinů navozených retinovou kyselinou.

Nervové kmenové buňky byly izolovány z hemisfér prasečích plodů a kultivovány *in vitro*. Buňky byly izolovány z plodů celkem tří březích samic a pro získání materiálu pro proteomovou studii bylo použito 16 kultivací. Po 10 dnech kultivace byly buňky přesazeny na misky potažené složkami extracelulární matrix (fibronectin a laminin) a po dobu 5 dnů byly stimulovány k diferenciaci 1 μ M kyselinou retinovou. Přítomnost diferencovaných buněk byla v každé kultuře ověřena imunocytochemickým barvením na markery neuronů (β III tubulin nebo „microtubule associated protein“, MAP), astrocytů („glial fibrillary acidic protein“, GFAP) a oligodendrocytů („2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase“, CNPáza) (viz příloha str. P11, obr. 1).

Pomocí dvojrozměrné gelové elektroforézy byly mapovány proteiny přítomné v nervových kmenových buňkách a také sledovány změny v proteinovém složení během diferenciaci do nervových buněk. Pro zajištění vysoké reprodukovatelnosti výsledků bylo pro nervové kmenové buňky i pro diferencované buňky vytvořeno a porovnáno vždy 5 proteinových map.

Při profilování proteinů přítomných v nervových buňkách bylo na všech proteinových mapách shodně detekováno 125 proteinových skvrn, z nichž 66 bylo identifikováno pomocí hmotnostní spektrometrie. Podle databází Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) a UniProt (<http://www.expasy.uniprot.org/>) byly proteiny zařazeny do funkčních skupin. Nejčastěji zastoupenými proteiny byly strukturální protein vimentin (detekován v 10 proteinových skvrnách), cytoskeletární protein beta-aktin a proteiny obrany proti stresu – heat shock protein 60 a heat shock cognate 71 kDa protein. Z funkčních skupin byly nejvíce zastoupeny proteiny účastníci se metabolismu a úprav RNA a proteinů (40% identifikovaných proteinů) následované cytoskeletárními proteiny a anexiny (21%), metabolickými proteiny a enzymy (17%), proteiny účastníci se tvorby energie (10%), obrany buňky (7%) a buněčných signalizací (5%) (viz příloha str. P14, obr. 2B).

V druhé části studie byly sledovány proteiny s rozdílnou hladinou mezi proliferujícími nervovými kmenovými buňkami a nervovými buňkami diferencovanými kyselinou retinovou a s využitím softwaru PDQuest (Bio-Rad) bylo nalezeno 29 proteinů se signifikantními změnami. Hladiny většiny diferenčních proteinů vzrůstaly během diferenciaci, nebyl nalezen žádný protein přítomný pouze v kmenových buňkách, ale bylo detekováno 6 proteinových skvrn typických pouze pro diferencované buňky. Celkem 16 z 29 regulovaných proteinů se podařilo identifikovat. Jednalo se o proteiny účastníci se vazby na DNA a RNA a podílející se na regulaci transkripce a translace, úprav a transportu mRNA (hnRNP H, hnRNP A1, hnRNP A2/B1, paraspeckle protein 1 alpha isoform, and far upstream element-binding protein 1), odpovědi na stres (heat-shock protein beta-1, alpha-B crystallin, protein DJ-1), skladování železa a regulace redox potenciálu (ferritin subunit L, glutathione S-transferase P, protein disulfide-isomerase A6), tvorby energie (triosephosphate isomerase 1, acyl CoA-dehydrogenase) a cytoskeletu (alpha-centractin) (viz příloha str. P15, tab. 1).

Zvyšování hladiny v souvislosti s diferenciací buněk bylo u tří proteinů hnRNP A1, hnRNP A2/B1 a α -B crystallinu potvrzeno i imunoblotem po jednorozměrné i

dvojrozměrné gelové separaci proteinů (viz příloha str. P17, obr. 5). Po 2D imunoblotu bylo u všech tří verifikovaných proteinů detekováno několik izoform proteinu a zároveň vyšší intenzita signálu u diferencovaných buněk. Navíc byla ověřena hladina markerů diferencovaných neuronů (MAP2), astrocytů (GFAP) a oligodendrocytů (CNPáza) u vzorků kmenových buněk, diferencovaných nervových buněk, lyzátu proteinů z mozku dospělého prasete. Jako negativní kontrola neexprimující markery nervových buněk byla použita linie prasečích endoteliálních buněk.

Pro zjištění, ve kterém typu diferencovaných nervových buněk se zvyšuje hladina hnRNP A1, hnRNP A2/B1 a α -B crystallinu, byly neurosféry i buňky diferencované na krycích sklíčcích podrobeny imunocytochemickému barvení na výše uvedené proteiny spolu s barvením na markery diferencovaných buněk. V případě hnRNP A1 byl detekován silný jaderný signál u diferencovaných buněk (viz příloha str. P18, obr. 6A), ale téměř nebyl pozorován signál u neurosfér, i když obsahovaly několik spontánně diferencovaných buněk (viz příloha str. P18, obr. 6B). Naopak u hnRNP A2 byl detekován jak jaderný, tak cytoplazmatický signál s tečkovaným vzorem u diferencovaných buněk (viz příloha str. P18, obr. 6C). V neurosférách byl slabší signál hnRNP A2/B1 zaznamenán v jádrech buněk na povrchu sféry (viz příloha str. P18, obr. 6D). Při dvojitým barvení buněk protilátkou proti α -B crystallinu nebyl tento protein detekován v proliferujících buňkách pozitivních na jaderný marker Ki-67 (viz příloha str. P19, obr. 7A) ani v diferencovaných neuronech pozitivních na β III-tubulin (viz příloha str. P19, obr. 7B), což ukazuje, že α -B crystallin je přítomen v neproliferujících buňkách gliové linie. Cytoplazmatický signál α -B crystallinu byl pozorován u některých buněk pozitivních na GFAP (astrocyty) a vimentin (ve zvýšené hladině exprimován v radiálních gliích). Jaderný signál α -B crystallinu byl detekován u některých astrocytů pozitivních na GFAP, oligodendrocytů pozitivních na CNPáza a u buněk exprimujících vimentin (viz příloha str. P19, obr. 7C-E).

V diskuzi jsou posouzeny funkční aspekty identifikovaných proteinů ve vztahu k buněčné diferenciaci a se zaměřením na funkce proteinů v nervovém systému.

5.3 Změny v buněčných signalizacích doprovázející diferenciaci nervových kmenových buněk

Changes in cellular signalling involved in neural stem cells differentiation

Skalníková H., Pelech S., Kovářová H.

připravovaná publikace, bude podáno do Cloning and Stem cells, IF 3,026

úvod

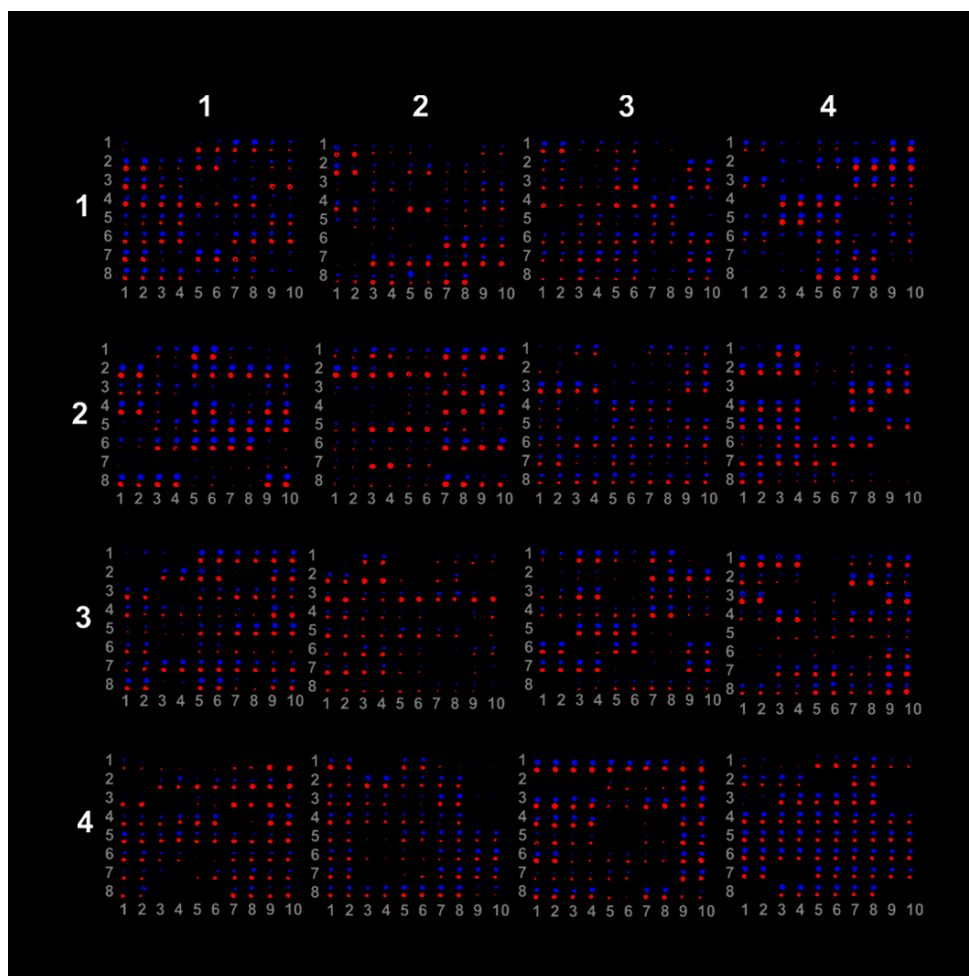
Technologie protilátkových mikročipů byla použita pro sledování signálních proteinů, které obvykle nejsou detekovatelné pomocí dvojrozměrné gelové elektroforézy. Mikročipová technologie KINEXTM firmy Kinexus Bioinformatics Corporation, Vancouver, Kanada, používá destičky, na kterých je oboustranně imobilizováno přes 600 protilátek rozeznávajících více než 250 fosforylačních míst, 240 proteinových kináz a 110 dalších signálních proteinů, které regulují buněčnou proliferaci, stres a apoptózu. Každá protilátka je přítomná ve dvou replikách.

Pomocí mikročipů byly porovnány hladiny proteinů a jejich fosforylací u nervových kmenových buněk izolovaných z mozků 40-denních prasečích plodů a kultivovaných po dobu 10 dní za přítomnosti EGF a bFGF a u stejných buněk stimulovaných po dalších 5 dní k diferenciaci pomocí 1 μ M kyseliny retinové.

metody

Buňky byly izolovány a kultivovány jak bylo popsáno v předchozí komentované publikaci „*A proteomic approach to studying the differentiation of neural stem cells*” (viz příloha str. P10, odstavec 2.1). Buňky byly lyzovány v lyzačním pufru obsahujícím 20 mM MOPS (pH 7,0), 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 0,5% Triton X-100 a inhibitory proteáz a fosfatáz. Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí BCA kitu (Pierce) a vzorek byl naředěn lyzačním pufrům na koncentraci 2 mg/ml. Poté byl do vzorku přidán dithiothreitol do konečné koncentrace 1 mM. Vzorky byly dále zpracovány firmou Kinexus Bioinformatics Corporation, kde byly extrakty buněčných proteinů označeny fluorescenční barvičkou a každý vzorek byl inkubován na jedné straně mikročipu. Po vychytání značených proteinů protilátkami imobilizovanými na čipu byl čip promyt a oskenován. Pro lepší přehlednost byly jednotlivým vzorkům přiřazeny náhradní barvy, proteiny kmenových buněk jsou znázorněny modře a proteiny diferencovaných buněk červeně (viz obr. 1 a 2). Hladiny vybraných proteinů a jejich fosforylací v nervových kmenových

buňkách a diferencovaných buňkách byly následně ověřeny imunoblotem v laboratořích firmy Kinexus.



Obr. 1

Protilátkový mikročip s 639 imobilizovanými protilátkami. Signál protilátek rozeznávajících proteiny kmenových buněk je znázorněn modrou barvou, signál proteinů diferencovaných buněk červeně.

výsledky

Po vyhodnocení intenzit signálu obou replik protilátky mezi dvěma analyzovanými vzorky byly vybrány proteiny, jejichž hladina (hladina fosforylované formy v případě fosfo-specifické protilátky) se po experimentálním zásahu mění. Z celkem 639 signálních molekul kvantifikovaných pomocí mikročipu bylo vybráno 32, u nichž se intenzita signálu proteinu mezi kmenovými a diferencovanými buňkami lišila o více než 30%, variabilita mezi oběma replikami protilátky byla nižší než 15% intenzity signálu a poměr signálu k šumu pozadí byl minimálně 2. Z těchto 32 signálních molekul se v 16 případech jednalo o změny v celkových hladinách proteinů a v 16 případech šlo o změny ve fosforylacích proteinů.

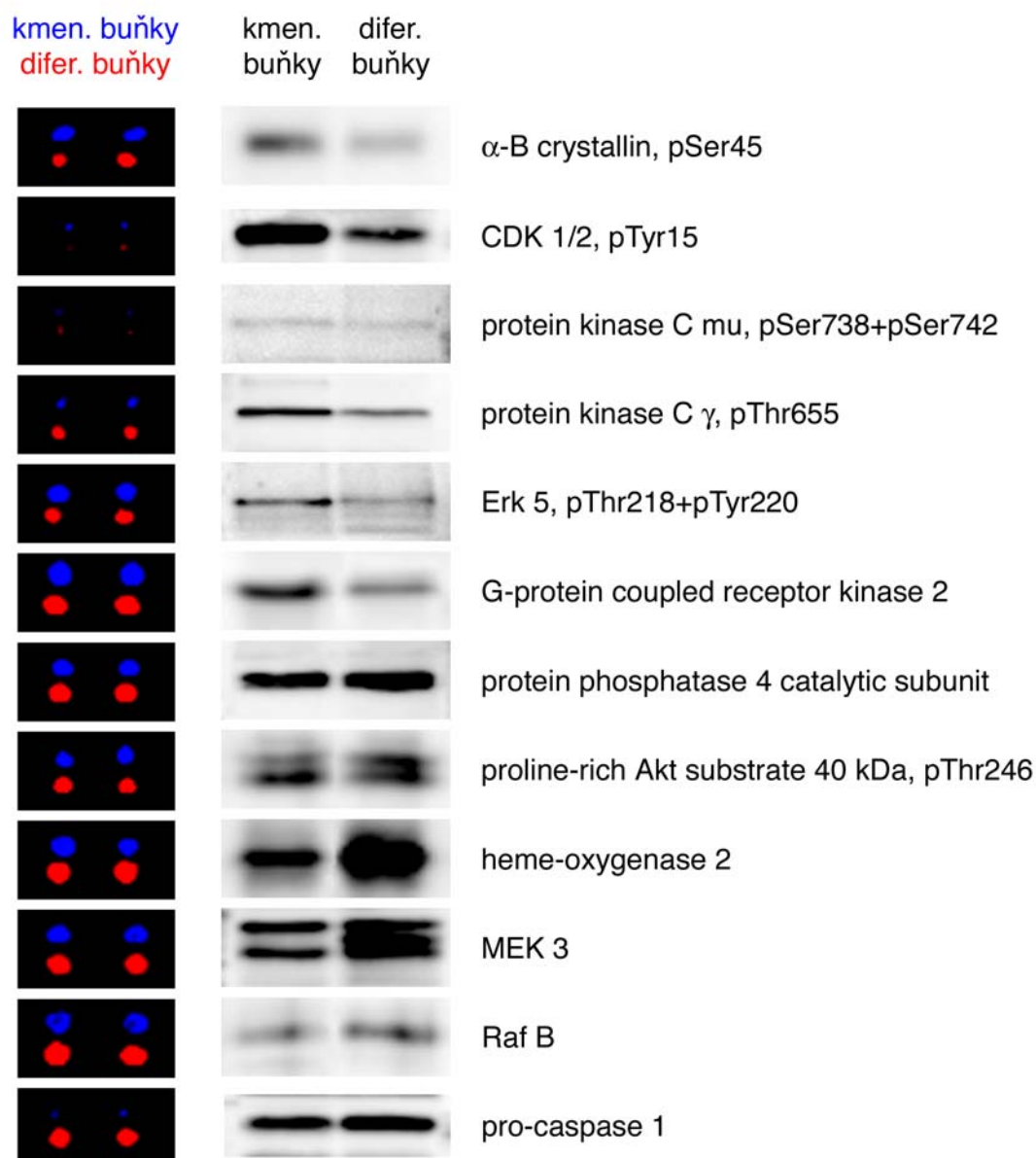
Změna hladiny vybraných proteinů a změna intenzity fosforylace cílových míst v průběhu diferenciaci nervových kmenových buněk byla ověřena imunoblotem po SDS elektroforéze proteinů. Celkem byla změna hladiny potvrzena u 12 signálních molekul (tabulka 1 a obrázek 2). U 8 molekul nebyla při imunoblotu pozorována změna hladiny mezi kmenovými a diferencovanými buňkami a u dalších 2 molekul byl výsledek imunoblotu v rozporu s výsledky mikročipů. U zbývajících 10 molekul nebyl při imunoblotu detekovatelný signál protilátky.

U nervových kmenových buněk v porovnání s diferencovanými buňkami byla prokázána zvýšená fosforylace na specifických fosforylačních místech molekul CDK1/2, protein kinázy C (PKC) μ a PKC γ , kinázy Erk5 a α -B crystallinu a zvýšená hladina proteinu GRK2. Naopak u diferencovaných nervových buněk byly nalezeny zvýšené hladiny katalytické podjednotky protein fosfatázy 4, hem-oxygenázy 2, MEK3 kinázy, RafB kinázy a pro-kaspázy 1 a zvýšená fosforylace 40 kDa substrátu Akt kinázy bohatého na prolin.

Tabulka I.

Přehled proteinů regulovaných během diferenciaci nervových kmenových buněk detekovaných pomocí mikročipu a imunoblotu. Název proteinu a databázové číslo udávají registraci proteinu v proteinové databázi Swiss-Prot. Poměr NSC/Dif. udává poměr intenzity signálu protilátky u nervových kmenových buněk a signálu u diferencovaných buněk detekovaného pomocí mikročipu a imunoblotu.

název proteinu	databázové číslo	rozeznávané místo	NSC/Dif. mikročip	NSC/Dif blot
α -B crystallin	P02511	pSer45	2,30	2,07
CDK1/2	P06493	pTyr15	2,24	1,92
Protein kinase C μ	Q15139	pSer738+pSer742	1,78	1,53
PKC γ	Q02156	pThr655	1,57	1,68
Erk5	P53788	pThr218, pTyr220	1,49	1,58
G-protein coupled receptor kinase 2	P25098	pan-specific	1,36	1,49
Protein phosphatase 4 - catalytic subunit	P60510	pan-specific	0,74	0,68
proline-rich Akt substrate 40 kDa	Q96B36	pThr246	0,67	0,90
heme oxygenase 2	P30519	pan-specific	0,64	0,46
MEK3	P46734	pan-specific	0,63	0,45
RafB	P15056	pan-specific	0,62	0,79
pro-caspase 1	P29466	pan-specific	0,59	0,74



Obr. 2

Přehled proteinů, jejichž hladina (jejich fosforylace) se měnila během diferenciaci nervových kmenových buněk. Vlevo je detail mikročipu znázorňující 2 repliky téže protilátky a signál u nervových kmenových buněk (modře) a u diferencovaných buněk (červeně). Vpravo je hladina proteinů detekovaná pomocí imunoblotu.

diskuse

Pro sledování změn na úrovni signálních proteinů regulujících buněčný cyklus, diferenciaci a apoptózu u kmenových nervových buněk a diferencovaných nervových buněk byly použity protilátkové mikročipy. Protilátky imobilizované na čipu byly vybrány z více než 2800 testovaných protilátek tak, aby byla zajištěna vysoká specifita a vysoká

reaktivita s antigenem. Firmou Kinexus byla testována reaktivita protilátek s lidskými, myšími a krysími antigeny, ale vysoká reaktivita a specifita byla pozorována i u jiných druhů. Nespornou výhodou mikročipové technologie je poměrně rychlá kvantifikace více než 600 proteinů a jejich fosforylací při velmi malé spotřebě vzorku (100 µg proteinů). Nevýhodou čipu je, že pro vazbu na čip jsou používány nedenaturované proteiny, a proto může technologie mikročipů poskytovat falešně pozitivní a negativní výsledky – protilátka může zkříženě reagovat s dalšími proteiny, které mají podobné epitopy nebo naopak u nativních proteinů nemusí být daný epitop přístupný nebo může být překryt jinými proteiny, se kterými je protein v komplexu. Proto je nutné získaná data ověřit pomocí imunoblotu po SDS elektroforéze denaturovaných proteinů. Imunoblot navíc ověřil i specifitu protilátky a molekulovou hmotnost proteinu v lyzátech buněk miniaturního prasete.

U nervových kmenových buněk byly pozorovány aktivace protein kináz CDK1 a 2, PKC γ , PKC μ a Erk5, které souvisejí s buněčnou proliferací.

Pro dělicí se buňky je typická aktivační fosforylace cyklin-dependentní kinázy 1 (CDK1) na tyrozinu 15. Aktivace CDK1 a její asociace s cyklinem B spouští vstup buněk do mitózy [12]. Intenzita fosforylace Tyr15 CDK1 byla u proliferujících nervových kmenových buněk přibližně 2krát vyšší než u neproliferujících diferencovaných nervových buněk.

Protein kináza C představuje rodinu serin/threoninových kináz silně exprimovaných v mozkové tkáni, které slouží k přenosu mnohostranných signálů zahrnutých v krátkodobých (tok iontů, uvolňování neurotransmiterů), střednědobých (modulace receptorů) a dlouhodobých procesech (buněčná proliferace, přestavba synapsí, genová exprese). V mozku je PKC aktivovaná mitogenními stimuly [42].

Kináza Erk5 (extracellular signal-regulated protein kinase 5) je zástupcem rodiny mitogeny aktivovaných protein-kináz a její aktivace je zajištěna specifickou fosforylací pomocí kinázy MEK5. Kináza Erk5 byla detekována v mnoha tkáních a nejvyšší hladiny byly pozorovány v mozku [43]. Při studiu embryonálního vývoje krysy bylo pozorováno, že k syntéze Erk5 dochází od embryonálního stádia E11 a ve stádiu E13, kdy začíná tvorba buněk mozkové kůry, vrcholí fosforylace Erk5. Erk5 je přítomná v proliferujících progenitorových buňkách mozkové kůry, ze kterých vznikají neurony a glie a aktivní Erk5 zvyšuje podíl neuronů mezi diferencovanými nervovými buňkami [44].

U diferencovaných nervových buněk byla detekována zvýšená hladina hem-oxygenázy 2. Obecnou funkcí hem-oxygenáz je degradace hemu na oxid uhelnatý, železo a

biliverdin, který je okamžitě redukován na bilirubin. Hem-oxygenáza 2 (HO-2) je konstitutivně přítomná zejména v mozkové tkáni. Oxid uhelnatý syntetizovaný v nervovém systému pomocí HO-2 působí pravděpodobně jako plynň neurotransmitter, podobně jako oxid dusnatý [45]. HO-2 působí také neuroprotektivně, což bylo potvrzeno studií na HO2^{-/-} myši, u které docházelo ke zvýšené apoptóze neuronů. Po opětovné transfekci genu kódujícího HO-2 došlo ke snížení apoptózy. Jednou z příčin může být anti-oxidační účinek nanomolárních koncentrací bilirubinu syntetizovaného HO-2 [46].

Dále byla u diferencovaných nervových buněk nalezena zvýšená hladina molekul MEK3 a RafB, které jsou součástí MAP kinázové signální dráhy Raf – Mek – Erk. Raf kináza je nezbytná pro vznik neuronů, jejich vývoj a prodlužování axonů. Úplné vyřazení („knock-out“) obou alel RafB u myši vede ke snížení fosforylace Erk kinázy v nervové tkáni, k poruše vývoje mozku, ke zpomalení růstu a embrya hynou ve stádiu E13 [47].

závěr

Protilátkový mikročip poskytl bližší náhled na regulaci proliferace a diferenciaci nervových kmenových buněk. Pro nervové kmenové buňky byly typické zvýšené fosforylace signálních proteinů související s proliferací. U diferencovaných nervových buněk dominovaly zejména proteiny MAP kinázové signální kaskády a hem-oxygenáza. Specifické funkce proteinů regulovaných během nervové diferenciaci a jejich potenciální využití jako bioznaků vývoje nervového systému vyžaduje další výzkum.

5.4 Proteinové změny doprovázející protinádorový účinek inhibitoru cyklin-dependentních kináz: Identifikace kandidátních biomarkerů pomocí 2-D kapalinové separace a následné hmotnostní spektrometrie

Protein Fingerprints of Anti-cancer Effects of Cyclin-dependent Kinase Inhibition: Identification of Candidate Biomarkers Using 2-D Liquid Phase Separation Coupled to Mass Spectrometry.

Skalníková H., Halada P., Džubák P., Hajdúch M., Kovářová H.

Technology in Cancer Research and Treatment 2005, 4:447-454.

Cílem této studie bylo použití nově vyvinutého separačního systému ProteomeLab™ PF 2D (Beckman Coulter) k analýze odpovědi nádorových buněk T-lymfoblastické leukemie linie CEM na působení inhibitoru cyklin dependentních kináz boheminu. Proteiny byly separovány podle svých izoelektrických bodů chromatofokusací a během gradientu pH od 8,5 do 4 byly jímány frakce po 0,3 pH. Jednotlivé frakce byly v druhém směru nastříknuty na kolonu s reverzní fází a proteiny byly eluovány podle hydrofobicity pomocí vzrůstající koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi. Eluované proteiny byly detekovány UV detektorem při 214 nm a z naměřených dat byly softwarem ProteoVue (Beckman Coulter) sestrojeny dvojrozměrné proteinové mapy kontrolních neošetřených buněk a buněk ovlivněných boheminem. Za využití dvojrozměrné chromatografie PF 2D bylo mapováno a UV-kvantifikováno kolem 1500 proteinových píků pro každý vzorek.

Vyhodnocením výsledků ze tří opakování experimentu za použití software DeltaVue (Beckman Coulter) bylo vytipováno 24 proteinů, jejichž hladina se výrazně a reprodukovatelně měnila po působení boheminu. Hladina většiny ovlivněných proteinů se po působení CDKI snižovala, mezi nimi byly identifikovány Crk-like protein, nuclease sensitive element binding protein 1, histon H3.3, histon H2B.a, bifunctional purine biosynthesis protein PURH a cytoplasmatický aktin. Naopak hladina mitochondriálního 60 kDa heat shock proteinu se po působení boheminu zvýšila. Identifikované proteiny reprezentují potenciální bioindikátory buněčné odpovědi na léčbu boheminem a jejich validace vyžaduje další experimenty.

Zajímavá byla detekce různých variant histonů eluovaných z chromatofokusační kolony v oblasti pH 7-8. Izelektrické body histonů přitom leží v pH kolem 10-12. Nedávno bylo popsáno, že posun izoelektrických bodů o několik jednotek pH do kyselější oblasti může být způsoben fosforylacemi nebo delecemi a jinými změnami sekvence proteinu [48]. U histonů je známo, že podléhají mnoha posttranslačním modifikacím, včetně fosforylací, metylací, acetylací. Analýza posttranslačních modifikací histonů a jejich změn po inhibici CDK kináz v současné době probíhá ve spolupráci s laboratoří N. Kellehera na University of Illinois, USA.

Při použití ProteomeLab™ PF 2D byly identifikovány nové proteiny, které nebyly zachyceny v předchozích studiích za použití 2-D elektroforézy ke sledování účinku boheminu na buňky linie CEM a na linii plicního adenokarcinomu A549 [24; 49]. Díky účinnější solubilizaci buněk a odlišnému principu separace doplňuje 2-D chromatografie výsledky získané 2-D elektroforetickou separací proteinů. 2D elektroforéza a 2D HPLC

poskytují komplementární data a díky kombinaci více analytických metod můžeme získat ucelenější pohled na studovaný objekt.

5.5 Systém založený na dvojrozměrné kapalinové chromatografii proteinů jako alternativa k dvojrozměrné gelové elektroforéze

The System Based on Principle of Two-Dimensional Liquid Chromatography of Proteins as an Alternative to Two-Dimensional Electrophoresis.

Skalníková H., Kovářová H., Moos J., Filová V., Halada P.

Chemické listy 2005, 99:952-956.

Pro speciální číslo Chemických listů věnované proteomice byla představena nová technika dvojrozměrné kapalinové separace proteinů ProteomeLabTM PF 2D. Byl popsán princip separace a ukázány dosavadní výsledky analýzy vlivu inhibitoru cyklin-dependentních kináz na nádorové buňky.

Při porovnání vlastního procesu analýzy s jinými metodami se jeví výhodou systému PF 2D možnost plně automatické analýzy. Ta je, mimo jiné, umožněna i tím, že proteiny zůstávají po celou dobu analýzy v roztoku. Systém PF 2D má také vyšší kapacitu a můžeme na něj nanášet až 5 mg celkového proteinu, pokud je takové množství snadno dostupné. Z našich dosavadních zkušeností však vyplývá, že PF 2D vykazuje větší ztráty proteinů během analýz než dvojrozměrná gelová elektroforéza. U analýz, kde je k dispozici pouze limitované množství vzorku, je pak výhodnější použít 2-DE.

5.6 Inhibitory cyklin-dependentních kináz a rakovina: využití proteomových studií k určení molekulárních mechanismů a účinnosti nových léčiv

Cyclin-dependent kinase inhibitors and cancer: usefulness of proteomic approaches in assessment of the molecular mechanisms and efficacy of novel therapeutics.

Hajdúch M., Skalníková H., Halada P., Vydra D., Džubák P., Dziechciarková M., Strnad M., Radioch D., Kovářová H.

kapitola v knize Clinical Proteomics, editoři M. Dunn and J. Van Eyk, VCH a Wiley Company, Germany, v tisku.

Kapitola v knize “Clinical Proteomics” shrnuje dosavadní výsledky získané studiem vlivu inhibitorů cyklin-dependentních kináz na nádorové buňky. Je zde představena historie objevení inhibitorů CDKs na bázi trisubstituovaných purinů na pracovišti v Olomouci a testování jejich vlivu na dělící se buňky. Byl pozorován inhibiční účinek olomoucínu na dělení a vývoj zygoty *Fucus*, gametofytu *Laminaria*, protoplastů z mezofylu *Petunia*, zpomalení zrání oocytů měkkýšů, ježovek a myši a zejména na proliferaci nádorových buněk. U dvou inhibitorů CDKs, a to olomoucínu a roscovitinu, byla stanovena krystalová struktura, která vysvětlila specifickou vazbu inhibitorů na kinázu CDK2. Kromě přímé vazby inhibitorů na CDK2 mohou tyto preparáty ovlivňovat další CDKs. Deriváty olomoucínu inhibují také kinázu CDK7, která fosforyluje další kinázy na threoninu 160/161. U leukemických buněk je aktivační fosforylace na Thr161 CDK1 po přidání inhibitoru inhibována, což bylo prokázáno fosfo-specifickými protilátkami při imunoblotu proteinů separovaných dvojrozměrnou gelovou elektroforézou (viz příloha str. P52, obr. 3B). Roscovitin silně inhibuje syntézu RNA (viz příloha str. P53, obr. 4) a cytotoxicita roscovitinu může souviset s inhibicí CDK kináz, které fosforylují C-terminální doménu RNA-polymerázy II.

Pro důkladnější pochopení biochemické podstaty protinádorového účinku inhibitorů CDKs byly použity komplexní proteomické přístupy. Pro analýzu buněčné odpovědi byly použity nádorové linie CEM (T-lymfoblastická leukemie) a A549 (plicní adenokarcinom). Buňky byly pěstovány v přítomnosti nebo nepřítomnosti (kontrola) inhibitoru CDKs, boheminu. Buněčné proteiny byly extrahovány a separovány 2-DE, u linie CEM i 2-D chromatografií. Těmito přístupy bylo nalezeno několik proteinů, jejichž hladina byla ovlivněna působením inhibitoru CDKs. Identifikované proteiny a jejich funkce jsou shrnuty v příloze na str. P59 a P60, tabulka 1 a 2. Pro srovnání je uvedena i změna hladiny mRNA pro daný protein. Z tabulek je patrné, že změna v hladině proteinu nemusí nutně kopírovat změnu exprese příslušného genu (hladinu mRNA), což podtrhuje význam analýz na úrovni proteinů.

Jedním z proteinů, jehož hladina se působením boheminu snižovala, je Crk-like protein. Funkce Crk-like proteinu je dobře prostudována u buněk chronické myeloidní leukemie exprimujících fúzní gen bcr-abl. Crk-like je adaptorový protein, který se podílí na vzniku komplexů chimerického receptoru Bcr-Abl s C3G, který aktivuje malou GTPázu Rap1. Aktivace Rap1 zprostředkovaná komplexem Crk-like a C3G se účastní rozvoje leukémie u buněk nesoucích translokaci bcr-abl.

Pokles hladiny Crk-like proteinu u buněk CEM T-lymfoblastické leukemie byl potvrzen několika analýzami. U proteinů separovaných PF 2D byly pH frakce obsahující Crk-like protein a také okolní frakce separovány SDS elektroforézou. Po přenosu proteinů na membránu a detekci protilátkami proti Crk-like fosforylované na Tyr207 a proti celkové formě Crk-like byl pozorován pokles fosforylované i celkové formy proteinu po působení inhibitoru CDKs (viz příloha str. P57, obr. 8B). Tento zajímavý nález byl také potvrzen imunoblotem po separaci celobuněčného lyzátu CEM buněk (viz příloha str. P57, obr. 8C).

Role Crk-like proteinu jako potenciálního biomarkeru inhibice CDKs byla potvrzena i v následující *in vivo* studii. Pro studii byly použity buňky myeloidní leukemické linie K562, protože je lze snadněji transplantovat a také obsahují vyšší a lépe detekovatelné hladiny Crk-like proteinu ve srovnání s CEM linií. Buňky K562 byly transplantovány do imunodeficitní SCID myši a za několik dní došlo k tvorbě solidního nádoru. Myši byla perorálně podána léčebná dávka roscovitinu a po 12 hodinách byla imunohistochemicky detekována hladina Crk-like proteinu v nádorové tkáni. *In vivo* model potvrdil pokles fosforylace Tyr207 i pokles celkové hladiny Crk-like proteinu po podání inhibitoru cyklin-dependentních kináz (viz příloha str. P58, obr. 9).

Naše studie prokázala značný pokles v hladině Crk-like adaptorového proteinu po aplikaci inhibitoru CDKs a potvrdila vhodnost proteomických studií pro identifikaci potenciálních biomarkerů charakterizujících působení a účinnost podaného preparátu. Charakterizace nádoru na histologické a molekulární úrovni a sledování účinku protinádorové léčby přispěje ke snížení toxicity a zajištění maximální účinnosti léčby.

5.7 Frakcionace a relativní kvantifikace proteinů pomocí systému ProteomeLabTM PF 2D a aminoreaktivního izobarického značení iTRAQ následovaného tandemovou hmotnostní spektrometrií

Fractionation and relative quantitation of proteins using ProteomeLabTM PF 2D system and amine-reactive isobaric tagging iTRAQ coupled to tandem mass spectrometry.

Skalníková H., Řehulka P., Chmelík J., Suresh G., Kovářová H.

Podáno jako „Technical Brief“ do Proteomics.

Z hmotnostně-spektrometrických identifikací proteinů v jednotlivých píkách po dvojrozměrné HPLC separaci proteinů vyplývá, že i přes vysokou rozlišovací schopnost dvojrozměrné chromatografie mohou některé píky obsahovat více než jeden protein. Detekce pomocí UV detektoru během eluce proteinů z kolony s reverzní fází pak neumožňuje kvantifikovat jednotlivé proteiny eluované ve stejném retenčním čase. V poslední době bylo představeno několik technik pro kvantifikaci proteinů (peptidů) pomocí hmotnostní spektrometrie, většinou založených na izotopovém značení. Mezi nimi iTRAQ izobarické značení pro relativní a absolutní kvantifikaci se jeví jako vhodné pro kvantifikaci koeluovaných proteinů z ProteomeLabTM PF 2D systému.

iTRAQ značení modifikuje aminoskupiny peptidů (N-konec a aminoskupinu lyzinu) kovalentním navázáním chemické značky. Během MS/MS experimentu při fragmentaci peptidu se ze značky odštěpí reportérová skupina o dané molekulové hmotnosti. V současnosti jsou k dispozici značky s relativními hmotnostmi reportérových skupin 114, 115, 116 a 117 Da. Intenzita signálu reportérové skupiny odpovídá množství daného peptidu. Při relativní kvantifikaci více vzorků jsou jednotlivé vzorky označeny jednotlivými iTRAQ značkami, smíchány a poté analyzovány v jednom MS/MS experimentu. Z každého peptidu se odštěpí reportérová skupina a poměr intenzit reportérových iontů vypovídá o množstvích peptidů a tím i o relativních množstvích původních proteinů v jednotlivých vzorcích.

iTRAQ značení je vyvinuté pro kvantifikaci peptidů vzniklých proteolytickým štěpením 5-100 mikrogramů proteinů. Při nanáše na ProteomeLabTM PF 2D systém kolem 3,5 mg buněčného lyzátu CEM buněčné linie obsahují jednotlivé píky získané PF 2D separací pouze desítky až stovky nanogramů proteinů, proto musel být protokol pro iTRAQ značení upraven. Protokol byl nejprve optimalizován pro detekci 50, 5, 0,5 a 0,05 μg bovinního sérového albuminu. Teprve po získání měřitelného signálu i u 0,05 μg proteinu byly činnidlem označeny i frakce z PF 2D. Hlavní modifikací protokolu bylo snížení reakčních objemů pro zvýšení koncentrace reagujících složek a také použití 1 M močoviny místo 0,2 % SDS pro solubilizaci proteinů. Nezbytná byla také úprava štěpení proteinů trypsinem.

V souhrnu lze říci, že se nám podařilo optimalizovat protokol pro relativní kvantifikaci peptidů pomocí iTRAQ izobarického značení proteinů separovaných systémem ProteomeLabTM PF 2D. Poměr koncentrací proteinů ve dvou vzorcích detekovaný iTRAQ značením odpovídal poměru absorbancí píků měřených UV detektorem na konci RP kolony PF 2D.

6 ZÁVĚR

U nervových kmenových buněk byly pomocí dvojrozměrné gelové elektroforézy a následné hmotnostní spektrometrie identifikovány konstitutivně syntetizované proteiny v 66 proteinových skvrnách. Nejčastěji byly zastoupeny proteiny účastníci se metabolismu a úprav RNA a proteinů, následované cytoskeletárními proteiny a anexiny, metabolickými proteiny a enzymy, proteiny účastníci se tvorby energie, obrany buňky a buněčných signalizací.

Bylo identifikováno 16 proteinů, jejichž hladina se statisticky významně měnila během diferenciaci nervových kmenových buněk do nervových buněk. Zvýšení hladiny α -B crystallinu, hnRNP A1 a hnRNP A2/B1 a jejich lokalizace v nervových buňkách byly potvrzeny imunoblotem a imunocytochemií.

Pomocí protilátkových mikročipů byly u nervových kmenových buněk detekovány fosforylace signálních proteinů související většinou s buněčnou proliferací (CDK1 a 2, PKC μ , PKC γ , Erk5 a α -B crystallinu) a zvýšená hladina proteinu GRK2. Naopak u diferencovaných buněk byl prokázán nárůst hladiny protein fosfatázy 4 (její katalytické podjednotky), hem-oxygenázy 2, kináz MEK3 a RafB a pro-kaspázy 1 a zvýšená fosforylace 40 kDa substrátu Akt kinázy bohatého na prolin.

U nádorových buněk bylo po separaci proteinů systémem ProteomeLabTM PF 2D identifikováno 8 proteinů, jejichž hladina byla ovlivněna inhibítorem cyklin-dependentních kináz. Pokles hladiny signálního adaptorového Crk-like proteinu a jeho fosforylace na Tyr207 byl potvrzen následnými studiemi *in vitro* i *in vivo*.

Pro kvantifikaci proteinů eluovaných z ProteomeLabTM PF 2D systému ve stejném retenčním čase byla zavedena metoda relativní kvantifikace pomocí aminoreaktivního izobarického značení iTRAQ. Optimalizovaný protokol na rozdíl od původně publikovaného iTRAQ značení [50] umožnil zvýšit citlivost relativní kvantifikace o 1-2 řády.

7 CITOVANÁ LITERATURA

- 1 Sell S., *Stem Cells Handbook* (editor S. Sell), kapitola 1, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2004, 509 stran.
- 2 Park C.H., Bergsagel D.E., McCulloch E.A. *Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay*. J. Natl. Cancer Inst. 1971, 46:411-422.
- 3 Beachy P. A., Karhadkar S. S., Berman D. M. *Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis*. Nature 2004, 432:324-331.
- 4 Kopper L., Hajdú M. *Tumor stem cells*. Pathol. Oncol. Res. 2004, 10:69-73.
- 5 Reynolds B. A., Weiss S. *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. Science 1992, 255:1707-1710.
- 6 Richards L. J., Kilpatrick T. J., Bartlett P. F. *De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89:8591-8595.
- 7 Morrison S. J. *Neuronal potential and lineage determination by neural stem cells*. Curr. Opin. Cell. Biol. 2001, 13:666-672.
- 8 Martínez-Serrano A., Rubio F. J., Navarro B., Bueno C., Villa A. *Human Neural Stem and Progenitor Cells: In Vitro and In Vivo Properties, and Potential for Gene Therapy and Cell Replacement in the CNS*. Curr. Gene. Ther., 2001, 1:279-299.
- 9 Riquelme P. A., Drapeau E., Doetsch F. *Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain*. Phil. Trans. R. Soc. B 2007, 15 stran [Epub ahead of print].
- 10 Ramalho-Santos M., Yoon S., Matsuzaki Y., Mulligan R. C., Melton D. A. *"Stemness": Transcriptional Profiling of Embryonic and Adult Stem Cells*. Science 2002, 298:597-600.
- 11 Vodička P., Smetana K. Jr., Dvorankova B., Emerick T., Xu Y. Z., Ourednik J., Ourednik V., Motlik J. *The miniature pig as an animal model in biomedical research*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005, 1049:161-171.
- 12 Sridhar J., Akula N., Pattabiraman N. *Selectivity and Potency of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors*. AAPS J. 2006, 8:E204-E221.
- 13 Harper J. W., Adams P. D. *Cyclin-Dependent Kinases*. Chem. Rev. 2001, 101: 2511-2526.
- 14 Veselý J., Havlíček L., Strnad M., Blow J. J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D. S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S. *Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues*. Eur. J. Biochem. 1994, 224:771-786.
- 15 Hajdúch M., Skalníková H., Halada P., Vydra D., Džubák P., Dziechciarková M., Strnad M., Radioch D., Kovářová H. *Cyclin-dependent kinase inhibitors and cancer: usefulness of proteomic approaches in assessment of the molecular mechanisms and efficacy of novel therapeutics*. Kapitola v knize Clinical Proteomics (editoři M. Dunn and J. Van Eyk), VCH a Wiley Company, Německo, v tisku.
- 16 Yamashita M., Fenn J. B. *Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme*. J. Phys. Chem. 1984, 88:4451-4459.

- 17 Karas M., Hillenkamp F. *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal. Chem. 1988, 60:2299-2301.
- 18 O'Farrell P. H. *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J. Biol. Chem. 1975, 250:4007-4021.
- 19 Bjellqvist B., Ek K., Righetti P. G., Gianazza E., Gorg A., Westermeier R., Postel W. *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications*. J. Biochem. Biophys. Methods 1982, 6:317-39.
- 20 Chong B. E., Yan F., Lubman D. M., Miller F. R. *Chromatofocusing nonporous reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry of proteins from human breast cancer whole cell lysates: a novel two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry method*. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001, 15:291-296.
- 21 Cohen, P. *Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century?* Nat. Rev. Drug Discov. 2002, 1:309-15.
- 22 Mandell J.V. *Phosphorylation State-Specific Antibodies: Applications in Investigative and Diagnostic Pathology*. Am. J. Pathol. 2003, 163:1687-1698.
- 23 Jensen O. N. *Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry*. Curr. Opin. Chem. Biol. 2004, 8:33-41.
- 24 Kovářová H., Hajdúch M., Kořínková G., Halada P., Krupičková S., Gouldsworthy A., Zhelev N., Strnad M. *Proteomics approach in classifying the biochemical basis of the anticancer activity of the new olomoucine-derived synthetic cyclin-dependent kinase inhibitor, bohemine*. Electrophoresis 2000, 21:3757-3764.
- 25 Kratchmarova I., Blagoev B., Haack-Sorensen M., Kassem M., Mann M. *Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation*. Science 2005, 308:1472-1477.
- 26 Unwin R.D., Smith D.L., Blinco D., Wilson C.L., Miller C.J., Evans C.A., Jaworska E., Baldwin S.A., Barnes K., Pierce A., Spooncer E., Whetton A.D. *Quantitative proteomics reveals post-translational control as a regulatory factor in primary hematopoietic stem cells*. Blood 2006, 107:4687-4694.
- 27 Kurisaki A., Hamazaki T. S., Okabayashi K., Iida T., Nishine T., Chonan R., Kido H., Tsunasawa H., Nishimura O., Asashima M., Sugino H. *Chromatin-related proteins in pluripotent mouse embryonic stem cells are downregulated after removal of leukemia inhibitory factor*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005, 335:667-675.
- 28 Elliott S. T., Grider D. G., Garnham C. P., Boheler K. R., Van Eyk J. *Two-dimensional gel electrophoresis database of murine R1 embryonic stem cells*. Proteomics 2004, 12:3813-3832.
- 29 Nagano K., Taoka M., Yamauchi Y., Itagaki Ch., Shinkawa T., Nunomura K., Okamura N., Takahashi N., Izumi T., Isobe T. *Large-scale identification of proteins expressed in mouse embryonic stem cells*. Proteomics 2005, 5:1346–1361.
- 30 Hoffrogge R., Mikkat S., Scharf C., Beyer S., Christoph H., Pahnke J., Mix E., Berth M., Uhrmacher A., Zubrzycki I.Z., Miljan E., et al. *2-DE proteome analysis of a proliferating and differentiating human neuronal stem cell line (ReNcell VM)*. Proteomics 2006, 6:1833-1847.

- 31 Zenzmaier C., Gesslbauer B., Grobuschek N., Jandrositz A., Preisegger K.H., Kungl A.J. *Proteomic profiling of human stem cells derived from umbilical cord blood*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 328:968-972.
- 32 Feldmann R.E. Jr., Bieback K., Maurer M.H., Kalenka A., Burgers H.F., Gross B., Hunzinger C., Kluter H., Kuschinsky W., Eichler H. *Stem cell proteomes: a profile of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood*. *Electrophoresis* 2005, 26:2749-2758.
- 33 Prowse A.B., McQuade L.R., Bryant K.J., Van Dyk D.D., Tuch B.E., Gray P.P. *A proteome analysis of conditioned media from human neonatal fibroblasts used in the maintenance of human embryonic stem cells*. *Proteomics* 2005, 5:978-989.
- 34 Hayman M. W., Przyborski S. A. *Proteomic identification of biomarkers expressed by human pluripotent stem cells*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 316:918-923.
- 35 Maurer M. H., Feldmann R. E. Jr., Fütterer C. D., Butlin J., Kuschinsky W. *Comprehensive Proteome Expression Profiling of Undifferentiated versus Differentiated Neural Stem Cells from Adult Rat Hippocampus*. *Neurochemical Research* 2004, 29:1129–1144.
- 36 Guo X., Ying W., Wan J., Hu Z., Qian X., Zhang H., He F. *Proteomic characterization of early-stage differentiation of mouse embryonic stem cells into neural cells induced by all-trans retinoic acid in vitro*. *Electrophoresis* 2001, 22:3067-3075.
- 37 Wang D., Gao L. *Proteomic analysis of neural differentiation of mouse embryonic stem cells*. *Proteomics* 2005, 5:4414-4426.
- 38 Wang D., Park J.S., Chu J.S., Krakowski A., Luo K., Chen D.J., Li S. *Proteomic profiling of bone marrow mesenchymal stem cells upon transforming growth factor beta1 stimulation*. *J. Biol. Chem.* 2004, 279:43725-43734.
- 39 Evans C.A., Tonge R., Blinco D., Pierce A., Shaw J., Lu Y., Hamzah H.G., Gray A., Downes C.P., Gaskell S.J., Spooncer E., et al. *Comparative proteomics of primitive hematopoietic cell populations reveals differences in expression of proteins regulating motility*. *Blood* 2004, 103:3751-3759.
- 40 Tannu N.S., Rao V.K., Chaudhary R.M., Giorgianni F., Saeed A.E., Gao Y., Raghov R. *Comparative proteomes of the proliferating C(2)C(12) myoblasts and fully differentiated myotubes reveal the complexity of the skeletal muscle differentiation program*. *Mol. Cell. Proteomics* 2004, 3:1065-1082.
- 41 DeLany J.P., Floyd Z.E., Zvonick S., Smith A., Gravois A., Reiners E., Wu X., Kilroy G., Lefevre M., Gimble J.M. *Proteomic analysis of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation by Adipogenesis*. *Mol. Cell. Proteomics* 2005, 4:731-740.
- 42 Amadio M., Battaini F., Pascale A. *The different facets of protein kinases C: old and new players in neuronal signal transduction pathways*. *Pharmacological Research* 2006, 54:317–325.
- 43 Yan L., Carr J., Ashby P.R., Murry-Tait V., Thompson C., Arthur J.S.C. *Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development*. *BMC Dev. Biol.* 2003; 3: 11.
- 44 Liu L., Cundiff P., Abel G., Wang Y., Faigle R., Sakagami H., Xu M., Xia Z. *Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 5 is necessary and sufficient to specify cortical neuronal fate*. *PNAS* 2006, 103:9697–9702.

- 45 Baranano D.E., Snyder S.H. *Neural roles for heme oxygenase: Contrasts to nitric oxide synthase*. PNAS 2001, 98:10996–11002.
- 46 Doré S., Goto S., Sampei K., Blackshaw S., Hester L.D., Ingi T., Sawa A., Traystman R.J., Koehler R.C., Snyder S.H. *Heme oxygenase-2 acts to prevent neuronal death in brain cultures and following transient cerebral ischemia*. Neuroscience 2000, 99:587-592.
- 47 Zhong J., Li X., McNamee C., Chen A.P., Baccarini M., Snider W. D. *Raf kinase signaling functions in sensory neuron differentiation and axon growth in vivo*. Nature Neuroscience 2007, 10:598-607.
- 48 Zhu K., Zhao J., Lubman D.M., Miller F.R., Barder T.J. *Protein pI shifts due to posttranslational modifications in the separation and characterization of proteins*. Anal. Chem. 2005, 77:2745-2755.
- 49 Kovářová H., Halada P., Man P., Džubák P., Hajdúch M. *Application of proteomics in the search for novel proteins associated with the anti-cancer effect of the synthetic cyclin-dependent kinases inhibitor, bohemin*. Technol. Cancer Res. Treat. 2002, 1:247-256.
- 50 Ross P.L., Huang Y.N., Marchese J.N., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainovski N., Pillai S., Dey S., Daniels S., Purkayastha S., Juhasz P., Martin S., Bartlett-Jones M., He F., Jacobson A., Pappin D.J. *Multiplexed Protein Quantitation in Saccharomyces cerevisiae Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents*. Molecular & Cellular Proteomics 2004, 3:1154–1169.

PŘEHLED PUBLIKACÍ V PŘÍLOZE

The Characterization of Stem Cell Proteomes. Current Opinion in Molecular Therapeutics 2006, 8:232-239.
strana P1-P8

A proteomic approach to studying the differentiation of neural stem cells. Proteomics 2007, 14 stran, v tisku.
strana P9-P22 + 3 nečíslované listy „Supporting material“

Protein Fingerprints of Anti-cancer Effects of Cyclin-dependent Kinase Inhibition: Identification of Candidate Biomarkers Using 2-D Liquid Phase Separation Coupled to Mass Spectrometry. Technology in Cancer Research and Treatment 2005, 4:447-454.
strana P23-P30

Systém pracující na principu dvojrozměrné kapalinové chromatografie proteinů jako alternativa k dvojrozměrné gelové elektroforéze. Chemické listy 2005, 99:952-956.
strana P31-P35

Cyclin-dependent kinase inhibitors and cancer: usefulness of proteomic approaches in assessment of the molecular mechanisms and efficacy of novel therapeutics. Kapitola v knize Clinical Proteomics (editoři M. Dunn and J. Van Eyk), VCH a Wiley Company, Germany, v tisku.
strana P36-P60

Fractionation and relative quantitation of proteins using ProteomeLab™ PF 2D system and amine-reactive isobaric tagging iTRAQ coupled to tandem mass spectrometry. Podáno do Proteomics.
strana P61-P75