

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

SYSTÉM PRACUJÍCÍ NA PRINCIPU DVOJROZMĚRNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE PROTEINŮ JAKO ALTERNATIVA K DVOJROZMĚRNÉ GELOVÉ ELEKTROFORÉZE

HELENA SKALNÍKOVÁ^{a,d}, HANA KOVÁŘOVÁ^{a,d},
JIRÍ MOOS^{b,d}, VANDA FILOVÁ^{b,d} a PETR
HALADA^{c,d}

^a Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky, Rumburská 89, 277 21 Liběchov, ^b Immunotech a.s., Radiová 1, 102 27 Praha 10, ^c Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ^d Společná proteomová laboratoř ÚŽFG, MBÚ, ÚEM AV ČR a Immunotech, a.s., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, <http://pf2d.science-research.net/>
skalnikova@iapg.cas.cz, kovarova@iapg.cas.cz,
jmoos@beckman.com, halada@biomed.cas.cz

Došlo 2.9.05, přijato 16.11.05.

Klíčová slova: proteomika, kapalinová chromatografie, inhibitor cyklin dependentních kinas

Úvod

Neuspokojivé výsledky léčby nádorových onemocnění silně stimulují výzkum a vývoj nových protinádorových léčiv. Tyto léky jsou obvykle směřovány proti novým cílům, o kterých se domníváme, že hrají důležitou úlohu v maligní transformaci buněk. Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou typickým představitelem takovýchto cílů díky jejich zvýšené aktivitě ve většině nádorových buněk. Synteticky připravené inhibitory CDK jsou tak jedním z perspektivních způsobů protinádorové léčby¹.

Od roku 1994, kdy byl popsán olomoucín jako první inhibitor CDK ze skupiny trisubstituovaných purinů², bylo syntetizováno mnoho derivátů odvozených od olomoucínu. Tyto látky zastavují buněčný cyklus na přechodech G1/S a G2/M, jsou velmi cytotoxické pro nádorové buňky v *in vitro* testech a jeden z derivátů, bohemín, je účinný rovněž *in vivo*³. Pro porozumění mechanismu účinku daného léku je nutné studovat jeho působení na molekulární úrovni. Analýza proteomu je nepochybně účinnou techni-

kou pro porozumění buněčné odpovědi na úrovni proteinů.

Proteomika představuje nové možnosti nejen pro laboratoře zabývající se studiem proteinů, ale i výzvu pro firmy zabývající se vývojem analytických přístrojů. Obtížnost úkolu vyplývá z velkého počtu analytů – proteinů či peptidů, které musíme separovat a charakterizovat v jedné globální analýze určitého proteomu. Zatímco projekt sekvenace lidského genomu pracoval s desítkami tisíc genů, problém proteomu je mnohem složitější a celkový počet možných proteinů v organismu se odhaduje až v řádu milionů⁴. Proteiny jsou značně různorodé, liší se velikostí, nábojem i hydrofobicitou. Mnohé z nich jsou navíc posttranslačně modifikovány nebo tvoří komplexy s jinými proteiny, či nukleovými kyselinami.

Dvojrozměrná gelová elektroforéza (2DE) je dnes základní metodou separace komplexních proteinových směsí. Proteiny jsou v prvním rozměru rozděleny podle svého izoelektrického bodu, ve druhém rozměru podle molekulové hmotnosti. Přes své nesporné přednosti má 2DE některé nedostatky, např. nízkou účinnost solubilizace membránových proteinů a omezení v dělení hydrofobních proteinů či proteinů o extrémní velikosti nebo náboji⁵.

V roce 2003 byl představen systém ProteomeLabTM PF 2D (Beckman Coulter Inc.), který má pomoci problémy 2D elektroforézy alespoň z části překlenout. PF 2D je analyzátor pracující na principu dvojrozměrné HPLC. Proteiny jsou tímto systémem separovány podle svého izoelektrického bodu a následně ve druhém rozměru podle hydrofobicity.

Cílem této studie bylo využití nového proteomického přístupu, dvojrozměrné kapalinové chromatografie PF 2D ke sledování proteinových změn v nádorových buňkách po působení protinádorové látky, bohemínu. Bylo provedeno srovnání proteinových map lyzátů CEM buněk (linie buněk T-lymfoblastické leukemie) ošetřených a neošetřených tímto inhibitorem cyklin-dependentních kinas a některé z ovlivněných proteinů byly identifikovány hmotnostní spektrometrií.

Experimentální část

Příprava buněk

Buněčná linie CEM byla kultivována v mediu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) s přidavkem 10% fetálního telecího séra, 50 U ml⁻¹ penicilinu a 0,1 mg ml⁻¹ streptomycinu. Buňky byly kultivovány při 37 °C v 5% CO₂ v přítomnosti nebo nepřítomnosti 60 μM bohemínu po dobu 12 h. Po kultivaci byly buňky opakovaně promyty v ledovém fosfátovém pufru (2,7 mM KCl a 137 mM NaCl v 10 mM fosfátovém pufru, pH 7,3) a zcentrifugovány.

Dvojrozměrná kapalinová chromatografie PF 2D

Buňky CEM byly lyzovány v roztoku obsahujícím 6 M močovinu, 2 M thiomčovinu, 50 mM TRIS, 2% w/v oktylglykosid, 5 mM (2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (TCEP), 10% glycerol a 1 mM koktejl proteasových inhibitorů (Sigma-Aldrich). Po následné centrifugaci byl lyzát odsolen na kolonkách PD 10 (kolonky jsou součástí PF 2D kitu, Beckman Coulter Inc.).

Dvojrozměrná kapalinová separace proteinů byla provedena na systému ProteomeLab™ PF2D podle pokynů výrobce. Kolony a chromatofokusační roztoky jsou dodávány výrobcem PF 2D. Pro analýzu bylo naneseno 0,5 až 1,8 mg celkového proteinu.

V prvním rozměru byly proteiny separovány na chromatofokusační koloně dle jejich interakce s kolonou v závislosti na pH. Bazické proteiny s pI nad 8,5 nejsou kolonou zachyceny, byly však detegovány a jímány sběračem frakcí. Po vytvoření gradientu pH v rozsahu 8,5–4 byly proteiny z kolony vymývány ve frakcích podle měnící se hodnoty pH. Kyselé proteiny s pI pod 4,0 byly pak vymyty roztokem o vysoké iontové síle (1M NaCl). Frakce separované chromatofokusační kolonou byly monitorovány integrovaným pH metrem s průtočnou elektrodou a UV detektorem při vlnové délce 280 nm. Bazické proteiny, proteiny vymyté gradientem pH i kyselé proteiny byly sbírány v celkem 27 frakcích a přímo automaticky nastřikovány na druhou kolonu.

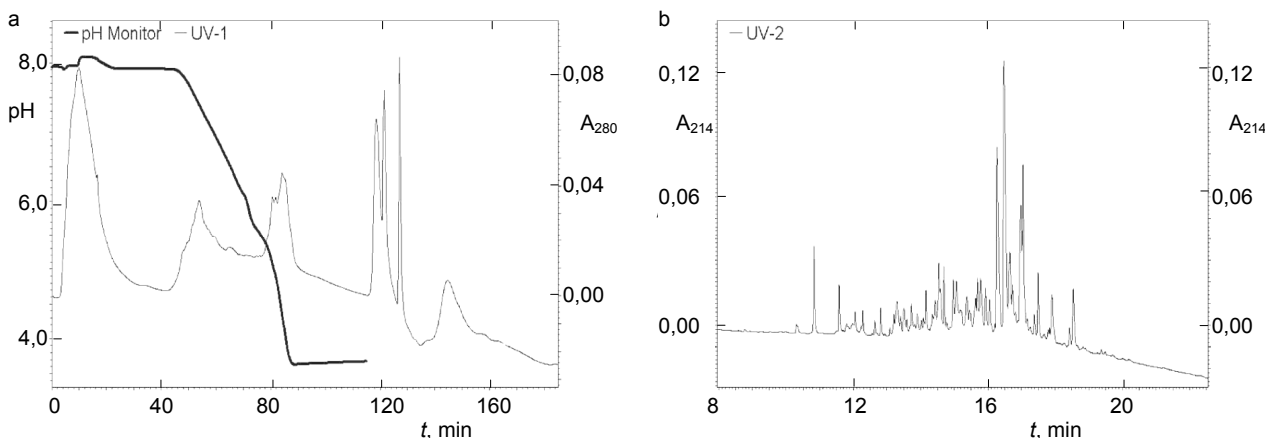
Proteiny byly ve druhém rozměru separovány pomocí kolony s reverzní fází, kde se proteiny dělí podle hydrofobicity. Náplň je speciálně upravený neporézní silikagel s malým průměrem (1,5 μm) a vysokou uniformitou velikosti částic zajišťující vysokou dělicí schopnost. Separace probíhala 35 min v lineárním gradientu 0–100 % acetonit-

rilu s přidavkem 0,8–1 % v/v trifluoroctové kyseliny (TFA). Rozdělené proteiny byly kvantifikovány UV detektorem při 214 nm. Interferující materiál neproteinového charakteru putuje při separaci s čelem. Jednotlivé proteinové frakce byly sbírány v intervalech 0,6 min sběračem frakcí FC204 (Gilson) do 96 jamkových mikrotitračních destiček a připraveny pro hmotnostní spektrometrickou analýzu.

Data byla zpracována softwarem ProteoVue. Vytvořené 2D proteinové mapy, znázorňující polohu proteinu v závislosti na pI a hydrofobicitě, byly pak porovnávány pomocí software Delta Vue. Celé softwarové vybavení je součástí systému PF 2D. Proteiny, jejichž hladina se více než dvojnásobně lišila mezi kontrolními a boheminem ošetřenými vzorky ve třech nezávislých opakovaných pokusech, byly vybrány pro identifikaci hmotnostní spektrometrií.

Hmotnostní spektrometrie

Vybrané frakce po druhém rozměru PF 2D byly kompletně vysušeny pomocí SpeedVac koncentrátoru Savant DNA 110–230 (důležité je úplné odstranění TFA). Proteiny byly štěpeny přes noc v 50 μl pufru obsahujícím 0,01% 2-merkptoethanol, 0,1 M 4-ethylmorfolin acetát, 1 mM CaCl₂, 10% acetonitril a 50 ng trypsinu. Získané peptidy byly extrahovány do 40% acetonitrilu/0,1% TFA a měřeny v pozitivním modu na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru BIFLEX II (Bruker). Roztok α-kyano-4-hydroxy-skořicové kyseliny v 30% acetonitrilu/30% methanolu/0,2% TFA (10 mg ml⁻¹) byl použit jako matrice MALDI. Spektrometr byl externě kalibrován pomocí peptidových standardů angiotenzinu II a insulinu.



Obr. 1. Dvojrozměrná chromatografická separace proteinů ProteomeLab™ PF 2D; a) průběh separace v prvním rozměru (chromatofokusace). Proteiny lyzátů CEM buněk ošetřených boheminem a neošetřených kontrolních buněk byly separovány v pH gradientu 8 až 4. Frakce byly sbírány v 0,3 pH intervalech, resp. po 1,5 ml objemech v době, kdy se pH nelišilo. b) Separace v druhém rozměru (HPLC s reverzní fází). Proteiny v pI frakcích z první dimenze byly dále separovány podle hydrofobicity. Příklad separace pI frakce č. 18 (pH 6,76–7,06)

Výsledky a diskuse

V naší předchozí práci^{6,7} byly metodou 2DE s následnou hmotnostně spektrometrickou analýzou úspěšně identifikovány proteiny, které byly rozdílně exprimovány po působení boheminu na CEM T-lymfoblastické leukemické buňky a na buňky plicního adenokarcinomu linie A549. Pomocí 2DE lyzátů buněk CEM bylo separováno až 2000 proteinových skvrn v jednom gelu, počítačová analýza diferenciální exprese odhalila 9 skvrn s výrazně odlišnou koncentrací v buňkách ošetřených boheminem. Šest z těchto devíti proteinů bylo pak identifikováno hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF.

Cílem této studie bylo rozšířit náš předchozí výzkum molekulárních mechanismů doprovázejících účinek boheminu novou technikou PF 2D. Při porovnání vlastního procesu analýzy 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 2DE. U analýz, kde je k dispozici pouze limitované množství vzorku, je pak výhodnější 2DE.

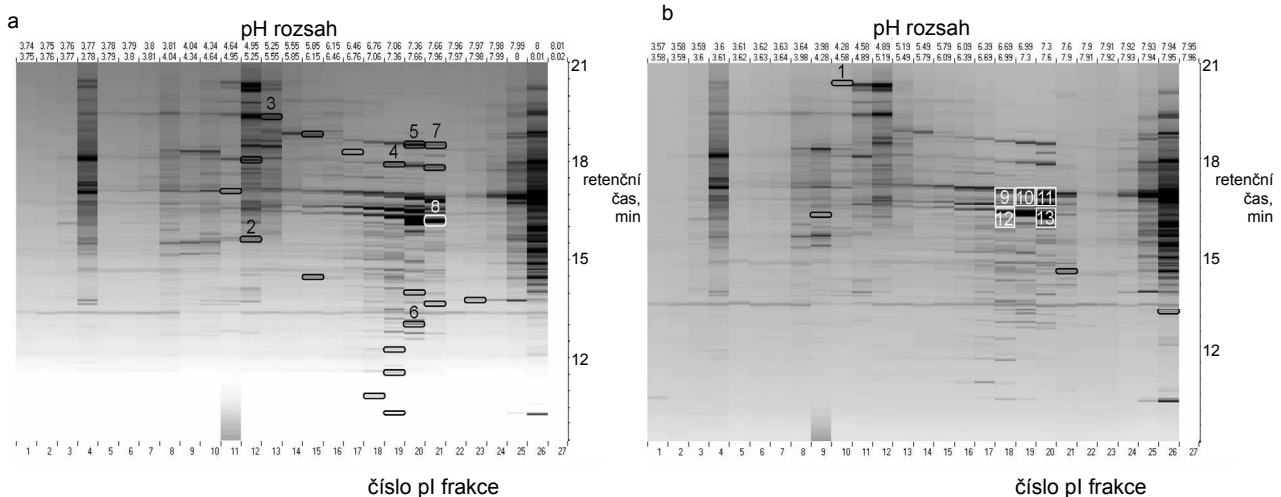
Po separaci buněčných lyzátů dvojrozměrnou kapalinovou chromatografií jsme detegovali 1500–2300 proteinových piků. Během separace v první dimenzi (obr. 1a) bylo sbíráno celkem 27 pI frakcí. Každá z těchto frakcí z prvního rozměru byla reverzně-fázovou chromatografií dále rozdělena do 60–70 piků (obr. 1b). I přes vysoké rozlišení tohoto systému mohou některé proteinové frakce a/nebo proteinové piky obsahovat více než jeden protein.

Tato skutečnost je obvykle později prokázána následnou analýzou hmotnostní spektrometrií.

Použití UV detektorů pro detekci separovaných proteinů umožňuje přesnou kvantifikaci (kromě piků obsahujících více než jeden protein) bez potřeby dalšího barvení proteinů. UV absorbance kvantitativně odpovídají množství proteinu. Porovnání kvalitativních a kvantitativních rozdílů mezi dvěma vzorky v dané specifické pI frakci po jejím rozdělení ve druhém směru umožňuje software DeltaVue, který srovnává relativní intenzity UV absorbance. Za významně rozdílné byly považovány proteinové zóny, u nichž se plocha piků lišila minimálně dvojnásobně ve 3 nezávislých opakovaných pokusech.

Většina rozdílně exprimovaných proteinů byla přítomna ve sníženém množství (celkem 20 proteinů) po působení boheminu (obr. 2a), pouze čtyři proteiny byly zvýšeny (obr. 2b). Některé z rozdílně exprimovaných proteinů byly úspěšně identifikovány hmotnostní spektrometrií (označené čísla v obr. 2). Přehled identifikovaných proteinů uvádí tabulka I. Tyto proteiny náleží k různým funkčním skupinám, zejména jaderným proteinům vázajícím DNA a adaptorovým proteinům.

Tři ze sníženě exprimovaných proteinů po působení boheminu, splňující kritérium „jeden protein v jednom píku“, byly identifikovány jako histon H2B.a (protein číslo 8 na obr. 2a a v tabulce I) a histon H3.3 (proteiny č. 4 a 5 na obr. 2a a v tabulce I). Výskyt různých forem histonů v oblasti pI 6,7–7,9 není typický, protože obvyklé pI histonů leží mezi 10 a 12. Nicméně detekce histonu H3 pomocí western blotu se specifickou protilátkou (data nepublikována) prokázala přítomnost tohoto histonu nejen ve frakcích s pH 7–8, ale zejména v pI frakci číslo 26, která obsahuje všechny bazické proteiny s pI > 8,5, které nejsou chromatofokusační kolonou zachyceny. Posun pI histonů



Obr. 2. Dvojrozměrná proteinová mapa kontrolních buněk (a) a boheminem ošetřených buněk (b) vytvořená softwarem ProteoVue; rozdílně exprimované proteiny jsou označeny podlouhlými rámečky. Čísla označují proteiny identifikované metodou MS (přehled viz tabulka I). Frakce označené čísly 9–13 obsahující vysoce abundantní proteiny, jejichž exprese se vlivem boheminu neměnila, ale byly identifikovány MS. a) V mapě jsou vyznačeny proteiny, jejichž exprese byla nižší v buňkách ošetřených boheminem oproti kontrolním buňkám. b) V mapě jsou v podlouhlých rámečcích proteiny, jejichž exprese byla zvýšená po působení boheminu

Tabulka I
Identifikované rozdílně exprimované proteiny po působení boheminu

Protein ^a	Název proteinu	Číslo v databázi SwissProt	Počet přiřazených peptidů	Pokrytí sekvence [%]	M_w teoret. [kDa]	pI teoret.	Rozdíl B vs C ^b
1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	7	26	61	5,7	+ 2 násobně
2	Crk-like protein	P46109	8	38	34	6,3	– 7 násobně
3	actin, cytoplasmic 1	P60709	8	29	42	5,3	– 4 násobně
	bifunctional purine biosynthesis protein PURH	P31939	7	17	64	6,3	– 4 násobně
4	histone H3.3	P84243	5	26	15	11,3	– 2 násobně
5	histone H3.3	P84243	8	37	15	11,3	– 10 násobně
6	nuclease sensitive element binding protein 1	P67809	10	48	36	9,9	– 7 násobně
7	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	P09012	8	28	31	9,8	nestanoveno
	histone H3.3	P84243	5	23	15	11,3	
8	histone H2B.a	P62807	10	59	14	10,3	– 10 násobně
9	histone H2A.e	Q99878	5	36	14	10,9	–
	histone H4	P62805	6	47	11	11,4	
10	histone H2A.e	Q99878	3	18	14	10,9	–
	histone H4	P62805	3	32	11	11,4	
11	histone H2A.e	Q99878	6	38	14	10,9	–
	histone H4	P62805	5	43	11	11,4	
12	histone H2B.a	P62807	4	27	14	10,3	–
13	histone H2B.a	P62807	3	26	14	10,3	–

^a Čísla proteinů v tabulce se shodují s číslováním na obrázku 1; ^b změna v hladině exprese proteinu v boheminem ošetřených vzorcích versus neošetřených kontrolách (založeno na ploše píků UV₂₁₄ absorbance)

do kyselejší oblasti může být způsoben jejich posttranslačními modifikacemi. Histon H3.3 může nahrazovat histon H3 v místech aktivní transkripce. Fosforylace *N*-konce histonu H3 na serinu 10 je klíčovou pro přestavbu chromatinu a vstup buňky do mitózy a meiózy. Interakce mezi fosforylací Ser 10 a/nebo acetylací lysinů 9 a 14 může též regulovat transkripci mnoha genů díky změnám ve struktuře chromatinu⁸. Podrobná analýza sekvence a modifikací histonu H3.3 nyní probíhá v našich laboratořích. Jako velmi abundantní proteiny, jejichž hladina se však vlivem boheminu nemění, byly identifikovány i další formy histonů, jmenovitě histonů H2A.e, H4 (protein č. 9–11 na obr. 2b a v tabulce I) a H2B.a (č. 12 a 13 na obr. 2b a v tabulce I).

Dalšími proteiny, jejichž hladina byla působením boheminu snížena, byly crk-like (crkl) protein a bifunkční protein biosyntézy purinů (bifunctional purine biosynthesis protein, PURH). Rodina crk (c-crkl, c-crklII, c-crklIII a crkl) adaptorových proteinů je součástí mnoha buněčných signalizačních drah. Tyto proteiny obsahují domény

SH2 a SH3, které umožňují tvorbu proteinových komplexů a jejich směrování do určitých míst v buňce. Proteiny Crk se účastní přenosu signálu od různých receptorů⁹. Poruchy regulace proteinů crk a mechanismů spojených s kontrolou buněčné migrace a přežívání se mohou podílet na progresi nádorů a jiných onemocněních^{10,11}. Snížená exprese proteinu crkl spojená s působením boheminu na nádorové buňky může být novým důležitým ukazatelem vypovídajícím o protinádorovém účinku boheminu.

Výsledky dvojrozměrné kapalinové analýzy změn proteomu po působení boheminu významně doplňují data získaná pomocí gelové 2DE. ProteomeLab™ PF 2D systém je vhodný pro srovnávací proteomické analýzy buněčných proteinových cílů a drah, které jsou zasaženy protinádorovým působením inhibitoru cyklin-dependentních kinas. Identifikované proteiny reprezentují potenciální bioindikátory buněčné odpovědi na léčbu boheminem, jejichž validace vyžaduje další ověření.

LITERATURA

1. Sausville E. A., Johnson J., Alley M., Zaharevitz D., Senderowicz A. M.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 910, 207 (2000).
2. Veselý J., Havlíček L., Strnad M., Blow J. J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D. S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S.: *Eur. J. Biochem.* 224, 771 (1994).
3. Hajduch M., Havlíček L., Veselý J., Novotný R., Michal V., Strnad M.: *Adv. Exp. Med. Biol.* 457, 341 (1999).
4. Patterson S. D.: *Current Proteomics* 1, 3 (2004).
5. Patterson S. D., Aebersold R. H.: *Nature Genetics Suppl.* 33, 311 (2003).
6. Kovářová H., Hajduch M., Kořínková G., Halada P., Krupičková S., Gouldsworthy A., Zhelev N., Strnad M.: *Electrophoresis* 21, 3757 (2000).
7. Kovářová H., Halada P., Man P., Dzubak P., Hajduch M.: *Technol. Cancer Res. Treat.* 1, 247 (2002).
8. Nowak S. J., Corces V. G.: *Trends Genet.* 20, 214 (2004).
9. Feller S. M., Posern G., Voss J., Kardinal C., Sakkab D., Zheng J., Knudsen B. S.: *J. Cell Physiol.* 177, 535 (1998).
10. Miller C. T., Chen G., Gharib T. G., Wang H., Thomas D. G., Misek D.E., Giordano T. J., Yee J., Oringer M. B., Hanash S. M., Beer D. G.: *Oncogene* 22, 7950 (2003).
11. Chodniewicz D., Klemke R. L.: *Biochim. Biophys. Acta* 1692, 63 (2004).

H. Skalníková^{a,d}, H. Kovářová^{a,d}, J. Moos^{b,d}, V. Filová^{b,d}, P. Halada^{c,d} (^a *Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Liběchov*, ^b *Immunotech Co., Prague*, ^c *Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, ^d *Joint Laboratory for Proteome Analysis, Prague*): **A System Based on Principle of Two-Dimensional Liquid Chromatography of Proteins as an Alternative to Two-Dimensional Electrophoresis**

New analytical systems alternative to two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-E) of proteins in very complex biological samples have been developed recently. One of them, two-dimensional liquid protein fractionation system PF 2D, has been used in our study and compared with previously used 2DE. PF 2D is based on 2D HPLC technique, where proteins are separated according their isoelectric point and hydrophobicity in the 1st and 2nd dimension, respectively. Fractions are collected in 96-well microplates; proteins remain in liquid phase during the entire separation process. Omitting solid phase is beneficial to subsequent protein identification by mass spectrometry. Separation data are processed using ProteoVue software and the resulting 2D protein maps are compared using DeltaVue software package generating a differential display view of up-regulated and down-regulated proteins. PF 2D approach have been used for interlysate comparison between cultured T-lymphoblastic leukemia CEM cells grown in the presence or absence of new synthetic cyclin-dependent kinase inhibitor, bohemine. The results indicate that both proteomics technologies applied to the same sample provide complementary data. The use of PF 2D contributes to a more complete understanding of the biological system studied.