

BIONIKA PROTEOMICKEJ ANALÝZY

prof. MVDr. Jan Danko, PhD.

Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie
Komenského 73,04181 Košice
e-mail: danko@uvlf.sk

Ing. Ľudmila Guthova

Technická univerzita Košice
Letná 9,04001 Košice
e-mail: ludila.guthova@tuke.sk

Abstract

The term "proteome" refers to the entire complement of proteins, including the modifications made to a particular set of proteins, produced by an organism or a cellular system. This will vary with time and distinct requirements, such as stresses, that a cell or organism undergoes. The term "proteomics" is a large-scale comprehensive study of a specific proteome, including information on protein abundances, their variations and modifications, along with their interacting partners and networks, in order to understand cellular processes. Cancer, in particular, is a model disease for applying such technologies to identify unique biosignatures and biomarkers responsible for the diagnosis, prognosis and therapeutic prediction of such disease. Biomarkers are biological molecules found in blood, other body fluids, or tissues that are a sign of a normal or abnormal process, or of a condition or disease. They may also be used to see how well the body responds to a treatment for a disease or condition [1].

Key words: proteomics, proteins, genomics, bionics, biomedical research

ÚVOD

Biologické systémy sú tvorené z proteínových zložiek, ktoré sú v bunke zastúpené v rôznom množstve, od miliónov kópií molekúl jedného druhu na bunku až po menej ako jednu kópiu na bunku [2]. Základný princíp „DNA je podkladom pre tvorbu RNA a RNA je podkladom pre tvorbu proteínu“ je stavebným kameňom v súčasnej molekulárnej a bunkovej biológii a je predmetom záujmu troch vedných disciplín: genomiky, transkriptomiky a proteomiky. K týmto disciplinám môžeme zaradiť aj bioniku, pričom pod pojmom bionika rozumieme hraničný odbor systematicky zameraný na uplatňovanie poznatkov zo štúdia živých organizmov a ich štruktúr pri vývoji nových technológií. Každá z týchto oblastí je zabezpečená vlastnými technológiami a každá sa snaží čo najlepšie využiť svoj potenciál na získavanie nových vedomostí v diagnostike a terapii ľudských ochorení [3]. V genomickej ére kládla moderná medicína svoje ťažisko na určenie presnej štruktúry a sekvencie genómu v oblasti

genomiky a na otázky exprese hlavných produktov transkripcie mRNA v oblasti transkriptomiky [4]. Hlavnou náplňou bioniky je vytvoriť veľmi úzku vzájomnú väzbu medzi biológiou a technikou s prirodzenou väzbou na ďalšie hraničné obory biológie. Táto vzájomná väzba umožňuje ako pomocou biológie tak aj jej príbuzných vedných odborov rozvoj v technických vedách, ale tiež využitím inžinierskych metód a postupov pokrok vo vedách biologických. Bionika má tiež umožňovať predovšetkým úzky vzájomný kontakt pri poznávaní zákonitostí živej a neživej prírody a zaistiť obojstranné výhodné využitie výsledkov tohto výskumu.

Genóm a proteóm

Vo svojej podstate sa genomika zaoberá štúdiom genómu daného organizmu ako celku, čo zahŕňa identifikáciu všetkých génov, regulačných elementov a sekvencií celej DNA, ktorá tvorí genetický materiál [3]. Ľudský genóm tvorí približne 2,9 miliardy nukleotidov. Táto sekvencia genetického kódu je tvorená nekódujúcimi oblasťami, intrónmi a kódujúcimi oblasťami, exónmi. Práve tieto kódujúce oblasti tvoria len 1% ľudskej DNA a aj napriek tomu je v nich definovaných takmer 55 000 génov, ktoré pôsobia ako templát pre všetky biologické funkcie organizmu [4]. Ľudský genóm musí byť analyzovaný od začiatku do konca ako celok a je pevne daný individuálne pre každého jedinca [2].

Projekt ľudskeho genómu a ďalšie genómové sekvenčné programy sa prejavujú rýchlou kompletizáciou genómových sekvencií špecifických druhov. Program sekvenácie celého ľudskeho genómu a genómov množstva iných špecifických druhov bol mimoriadne úspešný. Dosiahla sa kompletizácia 46 mikrobiálnych druhov a zároveň ďalších 120 druhov je v procese sekvenácie a čaká na dokončenie. Súčasne došlo ku sekvenácii veľkej časti genómu eukaryotických organizmov (Aebersold a Goodlett, 2001 [5,6,7]).

Expresia genómu vedie ku formácii transkriptómu, teda súboru všetkých primárnych mRNA, ktoré sú prítomné v bunke v danom čase a za daných podmienok. Transkriptomika musí v prvom rade vziať do úvahy fakt, že transkripcia genómu je citlivá na veľké množstvo faktorov, ktoré závisia nielen od bunky, ale aj od samotného prostredia, v ktorom sa bunka nachádza. To znamená, že ak sa zmenia podmienky, exprimovaný transkriptóm sa tiež zmení [3]. Hoci analýza génovej exprese objasnila veľké množstvo faktov vo vzťahu medzi relatívnou zmenou exprese génov a vznikom chorobných stavov, jej výsledok neposkytuje vždy dostačujúci popis zmien v bunkách a ich porušenie v rôznych situáciách, pretože v mnohých prípadoch sú to práve proteíny,

ktoré realizujú zmenu bunkovej funkcie. Avšak pre úplné pochopenie bunkovej fyziológie a patológie je potrebná komplexná analýza transkriptómu a proteómu [8].

Prevedenie transkriptómu na jeho proteínové produkty vytvára korešpondujúci súbor proteínov - proteóm [3]. Význam proteómu je v jeho prechodnom, dynamickom a plastickom charaktere a pre jeho definíciu je základom kvalitatívna analýza proteínov a polypeptidov s posttranslačnými modifikáciami a katabolickými procesmi, ktoré sú produkované veľkým množstvom génov [2]. Avšak proteóm je od genómu a transkriptómu odlišný aj v ďalšej, veľmi dôležitej charakteristike. Zatiaľ čo genóm a transkriptóm sú informácie esenciálne lineárne (sekvenčné), proteóm je definovaný oboma charakteristikami, lineárnou aj trojdimenzionálnou [3]. Proteóm bunky odráža okamžitú zmenu okolia, v ktorom je študovaný. Práve reakciou na vnútorné alebo vonkajšie podnety sa proteíny môžu posttranslačne modifikovať (acetyláciou, fosforyláciou, adenyláciou, glykozyláciou a pod.), prekonať translokáciu vo vnútri bunky, byť syntetizované alebo degradované [9]. Proteíny len veľmi výnimočne vykonávajú svoju funkciu ako individuálne molekuly, väčšinou sú súčasťou veľmi zložitých proteínových komplexov, ktoré sú cieľom výskumu v proteomike [10].

Identifikácia zmien v skupinách proteínov vedie ku rozpoznaniu rozdielov medzi zdravým a poškodeným tkanivom, napomáha zistiť zmeny v bunkách po ich cielej expozícii liečivám a v neposlednom rade dáva možnosť identifikovať biomarkery nádorových aj nenádorových ochorení [11,12].



Obr.1 Štruktúra proteínu (Zdroj:[3])

Využitie proteomiky

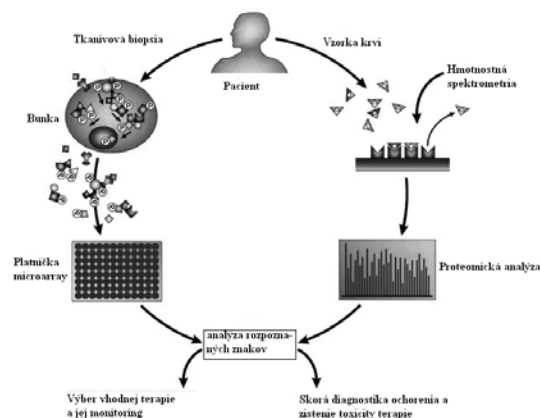
Genomické štúdie v súčasnosti celosvetovo popisujú zmeny v expresii individuálnych génov počas rôznych fyziologických a patologických stavov. Avšak tieto štúdie dávajú informácie len o tvorbe mRNA, nie o množstve, štruktúre, stabilite a aktivite proteínov, ktoré sú rozhodujúcimi reagentami a tvorcami fenotypu. V skutočnosti nebola nájdená korelácia medzi štádiom tvorby mRNA a množstvom korešpondujúcich proteínov v bunke. Dalo by sa

povedať, že len identifikácia proteínov vedie ku pochopeniu rozdielov medzi zdravým a chorým tkanivom, ku nájdeniu relevantných zmien v bunkách, ktoré sú vystavené účinku liekov a ku odhaleniu prítomnosti biomarkerov rozličných ochorení [11,12].

Proteomika v biomedicíne môže byť využitá v základnom aj aplikovanom výskume a taktiež v klinickej doméne s cieľom objaviť biomarkery a zlepšiť terapiu [14,15]. V posledných rokoch pokračuje proteomický výskum míľovými krokmi dopredu s množstvom inovácií, využívajúc hlavné technológie, ako je 2D elektroforéza [16], vysokotlaková kvapalinová chromatografia (HPLC), hmotnostná spektrometria (MS), a s rôznorodosťou stále sa tvoriacich vedeckých programov. V mnohých oblastiach medicíny sa vynárajú dobre anotované biomedicínske proteomické databázy a poskytujú základ pre systematický výskum a čiastočne aj sľubnú progresiu v klinických aplikáciách [17]. Proteomické štúdie sa zatiaľ zaoberajú hlavne výskumom v oblasti kardiológie a onkológie [9].

V tkanivách sa nachádzajú početné interakcie proteín-proteín, ktoré riadia prežívanie buniek a ich vzájomnú komunikáciu. Zabezpečujú tok vitálnych signálov v bunkách. Tieto informácie sú v ustavičnom kolobehu prenášané z jedného proteínu na ďalší. Modifikáciou týchto vzťahov dochádza ku patologickému správaniu buniek, aké môžeme pozorovať napríklad pri nádorovom bujení, kedy bunky strácajú kontrolu nad svojím rastom a delením a sú schopné zakladať metastázy [18].

Jedným z posledných cieľov proteomiky okrem katalogizácie proteínov buniek, ktoré sú exprimované v zdravom organizme a počas choroby, bolo zistiť organizáciu a dynamiku metabolizmu, signalizačných a regulačných sietí, ktoré sa počas života bunky menia. Proteomika vedie ku pochopeniu týchto sietí, ktoré sa stávajú počas ochorenia nefunkčné a predpovedá, ako môže byť ich funkcia zmenená pôsobením liekov a genetických manipulácií [17].



Obr. 2 Klinické aplikácie tkanivovej proteomiky [18].

Primárny defekt vedúci ku malígnemu ochoreniu môže byť ukrytý v nukleových kyselinách bunky. Avšak patofyziologický mechanizmus tohto ochorenia je determinovaný poškodením proteínov, ktoré kódujú chromozómové delécie a prestavby, čiže mutácie. Takýmto mechanizmom dochádza ku procesu tumorigenézy, pretože práve zmätok, ktorý vzniká v prostredí proteínov je dôležitý pre vznik a prežitie tumoru [18]. Neoplastické bunky rôznych typov rakoviny vykazujú rovnaké funkčné vlastnosti. Zahŕňajú samostatnosť v rastových signáloch, desenzibilizáciu na zastavenie rastu, vyhýbanie sa apoptóze, zrýchlenie procesu angiogenézy, nelimitovaný replikačný potenciál, tkanivovú inváziu a metastázovanie [19]. Všetky tieto vlastnosti vedú ku modifikácii proteómu a zvýšenej senzitivite organizmu na nádorové ochorenie [14]. Avšak poškodenie časti proteínu nemusí viesť ku zmenám pôvodných polypeptidových sekvencií, ale stačí, ak zahŕňa posttranslačné modifikácie [18]. Zložitosť popisu nádorových ochorení spočíva v tom, že tumorózne masy tkaniva sú zložené z veľkého množstva buniek rôzneho typu. Nachádzajú sa tu fibroblasty, endotelové bunky, normálne epitelové bunky, bunky tvoriace imunitný systém a iné [14].

Ďalšou limitáciou je príprava vzorky z nádorového tkaniva. Bola popísaná neenzymatická metóda prípravy nádorových buniek, ktorá na rozdiel od enzymatickej nezneškodzuje vzorku. Pri enzymatickej príprave dochádzalo ku strate vysokomolekulárnych proteínov väčšej hmotnosti, ktoré nemohli byť analyzované (Franzen et al., 1995[20]). Využívajú sa tiež metodiky imunoselekcie buniek pred proteomickou analýzou.

Na proteomické analýzy v oblasti výskumu nádorov sú často využívané laboratorne pestované bunkové línie z toho dôvodu, že sú oveľa jednoduchšie použiteľné ako tkanivo odobraté počas biopsie. Na rozdiel od bioptovaného tkaniva, počet buniek v pestovanej bunkovej línii prakticky nie je limitovaný [14].

V súčasnosti sú vytvárané proteínové databázy rôznych typov nádorových ochorení z údajov zistených 2D elektroforézou.

Hmotnostná spektrometria je metódou prvej voľby pri identifikácii proteínov a charakterizácii posttranslačných modifikácií. Princípom hmotnostnej spektrometrie je analýza hmotnosti iónov (katiónov alebo aniónov) [10].

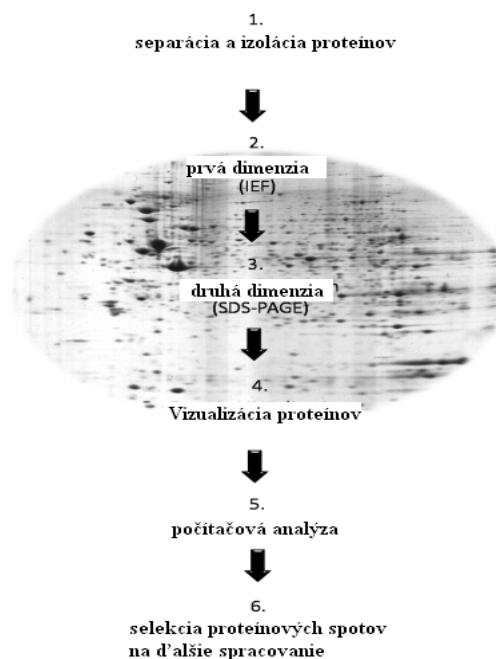


Obr. 3 MALDI hmotnostný spektrometer

Metódy v proteomike

Neoddeliteľnou súčasťou zdokonaľovania výskumu v oblasti proteomiky - bioniky sú pokroky týkajúce sa vedeckých metodík a technológií. V časoch objavu 2D elektroforézy existovalo len veľmi málo prostriedkov na spracovanie vzorky a technológie na hodnotenie výsledkov neboli dostačujúce. Od tohto obdobia vedci urobili veľké pokroky, ktoré sa týkali hlavne separácie proteínov, ale aj ich identifikácie [9]. Vzhľadom na zložitosť stále sa rozvíjajúcich metodík v proteomike bol proteomický experiment rozdelený do šiestich základných krokov [21]:

- separácia a izolácia proteínov z bunkovej línie, tkaniva, organizmu
- prvá dimenzia zahŕňajúca izoelektrickú fokusáciu (IEF)
- druhá dimenzia (SDS-PAGE)
- vizualizácia proteínových spotov získaných gélovou elektroforézou
- počítačová analýza proteínových spotov
- selekcia proteínových spotov na ďalšie spracovanie pomocou MS



Obr. 4: Postup proteomickej analýzy [21].

ZÁVER

Proteomické biomedicínske analýzy sú významné pre potvrdzujúce exprese proteínov v súvislosti s účinkom liekov, pričom tento prístup otvára cestu definovania terapeutických cieľov pre liečbu onkologických, rovnako ako aj iných ochorení.

Literatúra

- [1] <http://proteomics.cancer.gov/whatisproteomics>
- [2] Kettman, J. R., Frey, J. R., Lefkowitz, I.: Proteome, transcriptome and genome: top down or bottom up analysis? 2001, Biomolecular Engineering. Vol.18, No.5, p.207-212.
- [3] Bradshaw, R. A.: Proteomics Today, Proteomics Tomorrow. In Hondermarck, H.: Proteomics: Biomedical and Pharmaceutical Applications. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004. ISBN 978-1-4020-2322-4. p.1-17
- [4] Sung, J. C., Lee, A. I., Yeatman, T. J.: Fundamentals of Cancer Genomics and Proteomics. In Norton, J.A. et al.: Surgery: Basic Science and Clinical Evidence, 2nd edition. New York: Springer, 2008. ISBN 978-0-387-30800-5. p.1925-1932
- [5] Aebersold, R., Goodlett, D. R.: Mass Spectrometry in Proteomics. In *Chem.Rev.* 2001, Vol.101, No.2, p.269-295
- [6] Trebuňová, M., Laputková, G., Lacjaková, K. a kol.: Molecular melting profile of MDR1 gene in doxorubicin and docetaxel treated MCF-7 and natural MCF-7 cell line. European journal of experimental biology. Vol. 2, no. 3, 2012, p. 449-453
- [7] Trebuňová, M., Laputková, G., Živčák, J.: Assessment of DNA damage of women using oral contraceptives by high resolution melt analysis. European Journal of Experimental Biology. Vol. 3, no. 6 (2013), p. 207-211
- [8] Patterson, S. D.: How Much of the Proteome Do We See with Discovery-Based Proteomics Methods and How Much Do We Need to See?. In *Current Proteomics*.2004, Vol.1, No.1, p.3-12
- [9] Graves, P. R., Haystead, T. A. J.: Molecular Biologists Guide to Proteomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2002, Vol.66, No.1, p.39-63
- [10] Trebuňová, M., Lacjaková, K., Laputková, G., Sabo, J.: Proteomika - "nový smer vo vedeckom výskume". Folia medica Cassoviensia. Roč. 66, č. 1-2 (2011), s. 1-4.
- [11] Petrák, J.: Proteomics and its role in medicine. In *Časopis lékaře českých*. 2005, Vol.144, No.6, p.365-371
- [12] Trebuňová, M., Laputková, G., Sabo, J., Lacjaková, K.: Proteomická analýza bunkovej línie MCF-7 2D elektroforézou pred a po aplikácii cytostatík v programe PDQuest Advanced. Folia Medica Cassoviensia. Roč. 67, č. 1 (2012), s. 12-15. - ISSN 1337-7817
- [13] <http://www.boinc.sk/clanky/rosetta-home-tajomstvo-bielkovin>
- [14] Sanchez, J.C.H. et al.: Biomedical Application of Proteomics. In Wilkins, M. R. et al.: Proteome research: Concepts, Technology and Application. Berlin: Springer, 2007. ISBN 978-3-540-71240-4. p.193-221
- [15] Laputková, G., Bober, P., Trebuňová, M., Benedeková, L., Sabo, J.: Proteomická analýza ľudských slín - nový neinvazívny prístup k detekcii chorôb. In: 36. Dny lekárske biofyziky : 29. - 31.5.2013, Lázně Belohrad. - Praha : Univerzita Karlova, 2013, ISBN 978 - 80 - 87727 - 04 - 1, p. 49.
- [16] Laputková, G., Trebuňová, M., Géci, I., Sabo, J.: Dvojrozmerná gélová elektroforéza ako súčasť proteomickej analýzy. 35. Dny lekárske biofyziky : zborník abstrakt : 4. - 6.6.2012, Rožnov pod Radhoštěm. - Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2012, ISBN 9788024431253, p. 58
- [17] Anderson, N. L., Matheson, A. D., Steiner, S.: Proteomics: applications in basic and applied biology. In *Current Opinion in Biotechnology*. 2000, Vol.11, No.7, p.408-412
- [18] Geho, D. H., Liotta, L. A., Petricoin, E. F.: Proteomic Applications. In Emmert-Buck et al.: Dissecting the molecular anatomy of tissue. New York: Springer, 2005. ISBN 3-540-22006-2. p.145-162
- [19] Hanahan, D., Weinberg, R. A.: The Hallmarks of cancer. In *Cell*. 2000, Vol.100, No.1, p.57-70
- [20] Franzen, B. et al.: Sample preparation of human tumors prior to twodimensional electrophoresis of proteins. In *Electrophoresis*. 1995, Vol.16, No.10, p.1087-1089
- [21] Penque, D.: Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery. In *Proteomics Clin. Appl.* 2009, Vol.3, No.2 p.155-172

Práca vznikla za podpory grantových projektov VEGA 1/0515/13 „Návrh konštrukčného usporiadania a architektúry inteligentných implantátov“ a KEGA 036TUKE4/2013 „Implementácia nových technológií pri návrhu a výrobe implantátov do edukačného procesu v biomedicínskom inžinierstve a príbuzných odboroch“.