

**UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH
LEKÁRSKA FAKULTA**

**ZBORNÍK ODBORNÝCH A VEDECKÝCH PRÍSPEVKOV
PROJEKTOV ZO ŠTRUKTURÁLNYCH FONDOV
EURÓPSKEJ ÚNIE**



**Košice
25. November 2013**

Košice 2013

**ZBORNÍK ODBORNÝCH A VEDECKÝCH PRÍSPEVKOV PROJEKTOV ZO
ŠTRUKTURÁLNYCH FONDÓV EURÓPSKEJ ÚNIE**

Editori:

Dr.h.c. prof. MUDr. Leonard Siegfried, CSc.

prof. Ing. Mária Mareková, CSc.

Ing. Jaroslav Majerník, PhD.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani jeho žiadnu časť nemožno reprodukovat', ukladať do informačných systémov alebo inak rozširovať bez súhlasu majiteľov práv.

Za odbornú a jazykovú stránku tohto zborníka zodpovedajú autori jednotlivých príspevkov. Rukopis príspevkov neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

ISBN 978-80-8152-073-0

EAN 9788081520730

OBSAH

1 Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky	9
Charakteristika exozómov a ich význam pre medicínu	
<i>Bencková M., Bober P., Talian I., Sabo J.</i>	11
Proteomická analýza extracelulárnych vezikúl izolovaných z moču pomocou diferenciálnej ultracentrifugácie	
<i>Bober P., Talian I., Kováčová V., Chmelová M., Karabinoš A., Sabo J.</i>	17
Diagnostika neurodegeneratívnych ochorení	
<i>Dubayová K., Čakanová G., Vašková J., Lučková I., Bochová I., Sabo J., Karabinoš A.</i>	24
Metabolomický fluorescenčný fingerprinting moču	
<i>Dubayová K., Lučková I., Sabo J., Karabinoš A.</i>	28
Mutačný stav génu TP53 u vybraných pacientov s chronickou lymfocytovou leukémiou (CLL)	
<i>Karabinoš A., Dubayová K., Čakanová G., Vašková J., Lučková I., Bochová I., Tóthová E., Palášthy S., Štecová N., Sabo J.</i>	36
Proteomická analýza vzoriek leukocytov iónovou pascou	
<i>Kováčová V., Chmelová M., Bober P., Talian I., Tóthová E., Géci I., Karabinoš A., Sabo J.</i>	42
Proteomický profil mononukleárnych buniek leukocytov potkanov pomocou dvojdimenzionálnej gélovej elektroforézy a hmotnostnej spektrometrie	
<i>Kováčová V., Chmelová M., Bober P., Talian I., Petrášová D., Géci I., Karabinoš A., Sabo J.</i>	47
Proteomická analýza celkových nestimulovaných ľudských slín	
<i>Laputková G., Bober P., Trebuňová M., Sabo J.</i>	55
Neurochémia suicidálneho správania	
<i>Pálová E., Sabo J.</i>	65
Prínos dátovo nezávislej MS/MS analýzy v oblasti proteomickej analýzy karcinómu prsníka	
<i>Petrovič M., Talian I., Andrašina I., Sabo J.</i>	71
2 Centrum excelentnosti pre elektromagnetické polia v medicíne.....	77
Videokonferencie a live streaming vo vedeckej spolupráci	
<i>Majerník J.</i>	79
Zdravotný profil marginalizovaných rómskych komunít na Slovensku	
<i>Stupák M., Stupáková N., Veselá J., Guzy J., Mareková M.</i>	85
3 Centrum excelentnosti pre výskum faktorov ovplyvňujúcich zdravie so zameraním na skupinu marginalizovaných a imunokompromitovaných osôb	91
Monitorovanie faktorov ovplyvňujúcich zdravie so zameraním na marginalizované etnické minority	
<i>Bódy G., Hubková B., Mašlanková, Stupák M., Veselá J., Guzy J., Mareková M.</i>	93
Výskyt urogenitálnych chlamýdiových infekcií v marginalizovanej skupine obyvateľstva na východnom Slovensku	
<i>Čechová L., Halánová M., Čisláková L., Kalinová Z., Jarčuška Pa.</i>	104

Možnosti odstraňovania následkov obezity u marginalizovaných skupín (kazuistika) <i>Donič V., Tomori Z., Hnát B.</i>	111
Epidemiologické aspekty výskytu vybraných oportúnných nákaz u imunodeficientných pacientov <i>Halánová M., Pohorencová A., Kalinová Z., Čechová L., Čisláková L., Jarčuška Pa.</i>	115
Detekcia génov adhérencie u Escherichia coli izolovaných z rôzneho klinického materiálu od imunokompromitovaných pacientov <i>Kmeťová, M., Čurová, K., Lovayová, V., Sabol, M., Siegfried, L.</i>	124
Výskyt parazitárnych a infekčných ochorení v rómskej populácii vo Východoslovenskom regióne <i>Lovayová V., Rimárová K., Pastvová L., Nagyová M., Kmeťová M., Sabol M., Siegfried L.</i>	130
Využitie informačných a komunikačných technológií na zvyšovanie vzdelanostnej úrovne a kvalifikácie pre uplatnenie na trhu práce u rómskej populácie <i>Majerník J., Švida M.</i>	134
Infertilita u mužov: príčiny a možné riešenia <i>Mihálik J., Rybárová S., Kluchová D.</i>	141
Hostility and health quality of life in Roma and non-Roma coronary heart disease patients <i>Nagyova J., Silarova B.</i>	152
Prehľad výsledkov štúdií zdravotného stavu minoritnej rómskej populácie v oblasti rastu detí, vplyvu na graviditu a frekvencie infekčných ochorení <i>Rimárová K.</i>	159
Hodnotenie držania tela v mladšej školskej populácii rómskych a nerómskych detí v závislosti od vplyvu antropometrických ukazovateľov <i>Rimárová K.</i>	168
Predictors of eight year's mortality of Roma and non-Roma patients after coronary angiography <i>Sudzinova A., Rosenberger J., Nagyova I.</i>	176
4 Centrum výskumu inovatívnych terapeutických postupov molekulárnej medicíny	183
Proteomická analýza kmeňových buniek choriónovej membrány s využitím MALDI TOF/TOF hmotnostnej spektrometrie <i>Chmelová M., Kováčová V., Bober P., Géci I., Urdzík P., Rosocha J., Sabo J.</i>	185
Problematika identifikácie biomarkerov pre klinickú prax <i>Petrovič M., Talian I., Andrašina I., Sabo J.</i>	194
Stanovenie profilu DNA buniek MCF-7 liečených cytostatikami v MDR1 géne vysokorozlišovacou analýzou kriviek topenia (HRM analýzou) <i>Trebuňová M., Laputková G., Sabo J.</i>	199
5 Špecializované laboratórium magnetickej rezonancie pre kardiovaskulárny výskum	207
Výskumné aplikácie kardiovaskulárnej magnetickej rezonancie v klinickej arytmiológii a elektrofyziológii a ich ďalšie perspektívy <i>Mitro P.</i>	209
Význam myokardiálnej fibrózy pri chronickom srdcovom zlyhávaní a jeho detekcia pomocou kardiovaskulárnej magnetickej rezonancie <i>Mitro P.</i>	214

6 Probiotické mikroorganizmy a bioaktívne látky naturálneho pôvodu pre zdravšiu populáciu Slovenska.....	221
Vplyv <i>Lactobacillus plantarum</i> na výskyt infekčných komplikácií u kriticky chorých <i>Hudák V., Grochová M., Capková J., Firment J.</i>	223
Možnosti využitia probiotík v liečbe a prevencii infekčných chorôb u marginalizovaných skupín <i>Jarčuška Pa., Paraličová Z.</i>	234
Optimalizácia prípravy vzorky pre proteomickú analýzu bunkových proteínov probiotického kmeňa <i>Lactobacillus Plantarum</i> LS/07 <i>Tkáčiková S., Bober P., Sabo J., Strojný L.</i>	240
7 Kompetenčné centrum pre biomodulátory a výživové doplnky.....	247
Selekcia bakteriocíny produkujúcich kmeňov a výber vhodných indikátorových mikroorganizmov <i>Mareková M., Lauková A.</i>	249
8 Budovanie infraštruktúry v centre excelentnosti SEPO-II.....	255
Prognostické a prediktívne biomarkery karcinómov prsníka <i>Fröhlichová L., Habalová V., Švajdler M.</i>	257
Vplyv genetického pozadia na terapiu u pacientov s hepatitídou C <i>Hermanová H., Hudáková T.</i>	266
Biomarkery vo vzťahu k terapii a prognóze u pacientov s folikulovým lymfómom <i>Klimčáková L., Tóthová E., Slabá E., Šalagovič J.</i>	274
9 Výskumné centrum moderných technológií a diagnostiky ochorení ohrozujúcich verejné zdravie	281
Toxíny <i>E. coli</i> a ich uplatnenie v patogenéze infekcií <i>Čurová K., Kmeťová M., Siegfried L.</i>	283
Expresia génu pre katelicidín u pediatrických pacientov s infekciou močového aparátu <i>Hrabovský V., Kolvek G., Lovayová V., Hrabovská Z., Siegfried L.</i>	290
Molekulová charakterizácia <i>Escherichia coli</i> izolovaných z krvi kriticky chorých pacientov <i>Kmeťová M., Čurová K., Vargová R., Lovayová V., Sabol M., Siegfried L.</i>	295



**Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej
diagnostiky**

Proteomický profil mononukleárných buniek leukocytov potkanov pomocou dvojdimenziónej gélovej elektroforézy a hmotnostnej spektrometrie

Kováčová V.¹, Chmelová M.¹, Bober P.¹, Talian I.¹, Petrášová D.², Géci I.¹, Karabinoš A.³, Sabo J.¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach
040 11 Košice

²Laboratórium výskumných biomodelov, Lekárska fakulta UPJŠ
040 11 Košice

³SEMBID, s.r.o., Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky
080 01 Prešov

*Korešpondujúci autor: V.Kováčová, Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach, Trieda SNP1, 040 11 Košice
Tel: +421 918 790 069, e-mail:veronika.kovacova@student.upjs.sk

Abstrakt

Leukocyty sa v krvi nachádzajú v minoritnom zastúpení (menej ako 1%), preto ich analýza nie je jednoduchá. Napriek tomu sme uskutočnili proteomickú analýzu leukocytov z krvi potkanov rodu Wistar. Proteíny získané precipitačnou metódou sme separovali pomocou dvojdimenziónej gélovej elektroforézy, analyzovali a následne identifikovali. Určili sme 50 proteínov, vďaka ktorým sme získali cenné informácie o jednotlivých proteínoch v bunkách leukocytov. Zistili sme, že niektoré zo stanovených proteínov sa podieľajú na signálnych dráhach v bunke, iné sú súčasťou cytoskeletu, alebo sú významné v metabolizme bunky. Výsledky ukazujú, na možnosť študovania expresie proteínov z leukocytov na báze proteomiky. Cieľom je vytvorenie rozsiahlej databázy proteínov, ktoré budú použité pre ďalšie štúdie.

Kľúčové slová: proteomika, leukocyty, hmotnostná spektrometria, dvojdimenzióna elektroforéza

1.Úvod

Proteomika je dôležitým nástrojom pri študovaní proteínov prítomných v bunkách, telesných tekutinách a tkanivách (Sullivan, Freedman, 2009). Zároveň je jedným z možných nástrojov na určenie zmien prebiehajúcich v bunkách na molekulárnej úrovni (Aebersold, Mann, 2003). Proteomika je založená na hmotnostnej spektrometrii, ktorá rôznymi metódami úspešne realizuje analýzu proteómu rôznych vzoriek. V našej práci sme venovali pozornosť analýze krvi. Krv je životne dôležitá tekutina, ktorá plní v organizme významné funkcie. Krv pozostáva z plazmy a krvných elementov (leukocyty, erytrocyty, trombocyty). Najmenší podiel z krvi tvoria leukocyty (Lymfoidné bunky), ktoré sú obsiahnuté v krvi iba 1%. Na základe morfológických charakteristík sú rozdelené do 5 tried (neutrofilý, eozinofilý, bázofilý, monocytý

a lymfocyty). Neutrofilny, eozinofily a bázofily sú známe ako granulocyty, pretože obsahujú granule v cytoplazme. Na rozdiel od nich monocyty a lymfocyty sa nazývajú agranulocyty, lebo v ich cytoplazme sa granule nevyskytujú. Okrem toho sa označujú aj pod spoločným názvom mononukleárne bunky, pretože sú tvorené iba jedným jadrom (Gartner, L. P. a Hiatt, J. L., 2007).

V mnohých štúdiách sú leukocyty využité výhradne k študovaniu bunkového imunitného systému. Štúdie sa zameriavajú na objasnenie povahy imunitného systému, alebo na študovanie úloh imunitného systému v rámci rôznych druhov chorôb napr. zápal, lymfómy atď. V súčasnosti sa proteomickou analýzou leukocytov zaoberá málo publikácií. Po prvýkrát bol proteóm leukocytov z krvi potkanov popísaný v roku 2002 v práci Piubelli a kol., ktorý identifikovali 52 proteínov pomocou 2DE a hmotnostného spektrometra MALDI-TOF (Piubelli a kol., 2002).

V našej štúdií sme rozdelili proteíny z MNB leukocytov potkana pomocou 2 DE a následne sme ich identifikovali pomocou MALDI-TOF MS. Cieľom našej štúdie bolo vytvorenie referenčnej mapy proteínov, ktorá by mohla byť použitá pri ďalších experimentoch.

2. Materiál a metodiky

2.1 Izolácia mononukleárných buniek z krvi potkanov pre proteomickú analýzu

Podmienky a výkon experimentu zodpovedali požiadavkám na ochranu zvierat používaných na pokusné a iné účely v súlade s paragrafom 8 NV SR č. 23/2009 Z.z. Experiment bol schválený Etickou komisiou na LF UPJŠ. Krv bola odobratá z potkanov rodu Wistar v objeme 7ml a nariedila sa roztokom PBS v pomere 1:1. Nariedená krv sa čo najskôr a opatrne navrstvila na médium na separáciu lymfocytov, ktorý delí bunky na princípe hustotných gradientov (PAA the cell culture company, Canada). Jedna skúmavka pozostávala z 3 ml gradientu a 6 ml krvi nariedenej s PBS. Následne sa vzorka centrifugovala a na rozhraní medzi gradientom a plazmou sa vytvoril prstenec MNB, ktorý sa stiahol 1 ml mikropipetou do skúmavky. Nariedil sa PBS v pomere 1:1. Obsah skúmavky sa miešal 2 s a centrifugoval. Po odstránení supernatantu sa k peletu znova pridal 1 ml PBS premiešal a centrifugoval. Na odstránenie erytrocytov sa pridal 1 ml erytrocytárneho lyzačného roztoku (0,87% NH₄Cl). Vzorka sa inkubovala 5 min. pričom sa nesmeli prevýšiť 5 min. inak by už došlo aj k lýze leukocytov. Vzorka sa centrifugovala a pelet sa resuspendoval v 1 ml PBS na prečistenie MNB. Premytie buniek v PBS sa zopakovalo. MNB sa lyzovali lyzačným tlmivým roztokom (50mM TRIS, 15mM NaCl, 1% TWEEN 20, 1mM EDTA, 0,1% SDS) pH=7,4. Proteíny sa izolovali metódou zrážania pomocou 10% trichloroctovej kyseliny a acetónu. Koncentrácia jednotlivých proteínov sa určila Bradfordovou metódou podľa štandardného protokolu.

2.2 Dvojdimenziálna elektroforéza

Na platničku sa naniesla vzorka proteínov (600 $\mu\text{g}/125 \mu\text{l}$) a prikryla sa s IPG prúžkom (ReadyStrip IPG Strips, pH 3-10 o dĺžke 7cm, Bio-Rad, USA). Na IPG prúžok sa napipetoval minerálny olej. Fokusačná platnička sa vložila do izoelektrického fokusátora Protean IEF Cell (Bio-Rad, USA). Vzorka sa rehydratovala aktívne pri 50 μA na gél 15 h pri 20 °C. Po rehydratácii sa uskutočnila separácia proteínov v prvom rozmere tzv. IEF. Podmienky IEF boli: 250 V pomalý gradient 2 h, 4000 V lineárny gradient 20 h. IPG prúžky sa preniesli na plastovú platničku a redukovali sa 10 min v ekvilibračnom roztoku pozostávajúcom zo 6 mol dm^{-3} močoviny, 2% SDS, 0,375 mol dm^{-3} Tris-HCl, pH= 8,8, 20 % glycerolu a 0,130 mol dm^{-3} DTT. Následne sa alkylovali rovnaký čas v druhom ekvilibračnom roztoku rovnakého zloženia ako prvý ekvilibračný roztok iba miesto DTT obsahoval jodoacetamid. IPG prúžky sa trikrát namáčali do roztoku TRIS/glycín/SDS a vložili sa do 0,5 % agarózy vyhriatej na 96 °C. Agarózou sa zaliali 4% gély navrstvené na 12,5% polyakrylamidové gély. Elektroforéza v druhom rozmere sa uskutočnila v systéme Protean II Cell (Bio-Rad, USA) v elektroforetickom tlmivom roztoku za 60 min. pri 200 V a 400 mA. Gély sa premyli trikrát po dobu 5 min v dH_2O na odstránenie elektrolytu. Po 60 min sa farbili roztokom Comassie brilliant Blue G-250. Odfarbovali sa trikrát po 20 min v deionizovanej vode a oskenovali na denzitometri GS-800TM Calibrated Densitometer (Bio-Rad, USA).

2.3 Digescia proteínov

Po analyzovaní gélov sa jednotlivé spoty manuálne vyrezali. Do mikroskúmavky s kúskom gélu sa pridal 25 mM NH_4HCO_3 v 50 % ACN. Mikroskúmavka sa miešala, kým sa gél neodfarbil. Ku gélu sa pridal 100 % ACN. Po 10 min. gél zbelel a supernatant sa odsal. Kúsok gélu sa nechal vysušiť na vzduchu. Ku gélu sa pridal trypsín. Mikroskúmavky sa následne inkubovali 60 min. na ľade a ku gélu sa pridal NH_4HCO_3 . Vzorky sa inkubovali 12 h pri 37 °C na termocykléry. Potom sa centrifugovali a supernatant bol vyextrahovaný proteín. Ku gélu sa pridal roztok pozostávajúceho z 50 % ACN a 0,1 % TFA v dH_2O . Mikroskúmavka sa miešala 15 min. pri 16 000 rpm. Supernatant sa pridal k vyextrahovanému proteínu a krok s pridaním 50% ACN a 0,1% TFA v dH_2O sa zopakoval. Vzorka s konečným množstvom 65 μl sa zahustila na vákuovom koncentrátore na objem 10 μl .

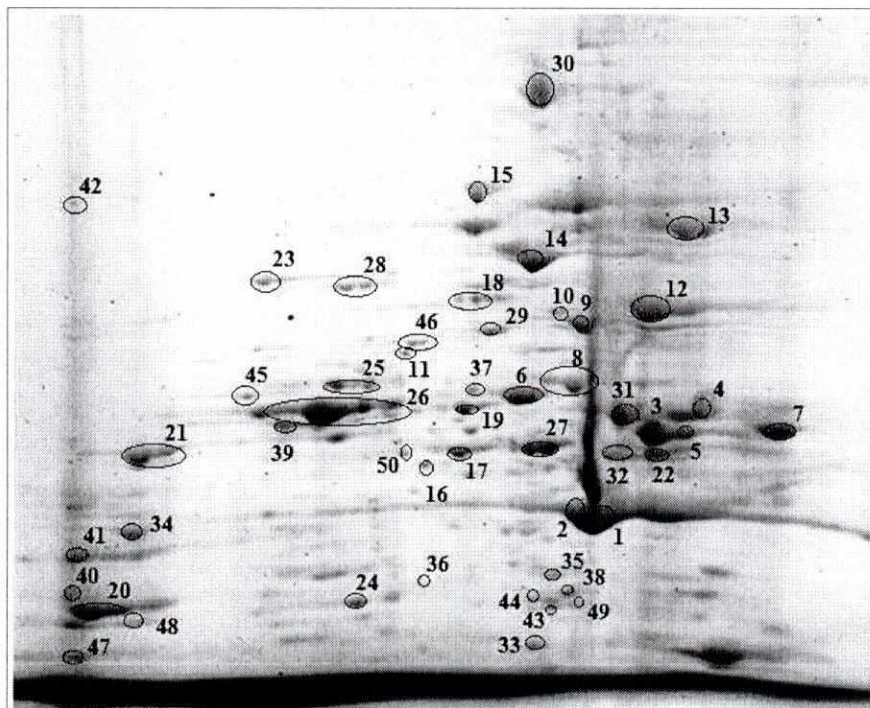
2.4 Stanovenie proteínov na hmotnostnom spektrometri MALDI-TOF

Roztok z extrahovaných peptidov bol zmiešaný s roztokom matrice (6 mg/ml kyseliny α -kyano-4-hydroxyškoriceovej v acetonitril/metanol/0.1 % TFA vo vode, 84/14/2 v/v/v), v pomere 2:1. Zmes 1 μl peptidov/matrice bola aplikovaná na oceľovú platňu a vyschnutá. Vzorky boli analyzované hmotnostným spektrometrom MALDI TOF/TOF UltrafleXtreme (BrukerDaltonik, Nemecko). Spektrá boli získané v reflektor móde v rozsahu 700 - 3500 Da. Hmotnostná kalibrácia bola vykonaná pomocou PepCal (BrukerDaltonik, Nemecko) štandardu. Údaje boli vyhodnotené pomocou Mascot algoritmu (MatrixScienceLtd, UK). Hmotnostné spektrá peptidov boli porovnané s NCBIr databázou. Pri hľadaní boli použité tieto parametre: taxonómia *Rattus norvegicus* (potkan), globálne modifikácie Carbamidomethyl (C), variabilné

modifikácie oxidácia (M), enzým trypsin, počet maximálne vynechaných štepov 1, tolerancia chyby hmotnosti 100 ppm v MS a 0,3 Da v MS/MS móde.

3. Výsledky a diskusia

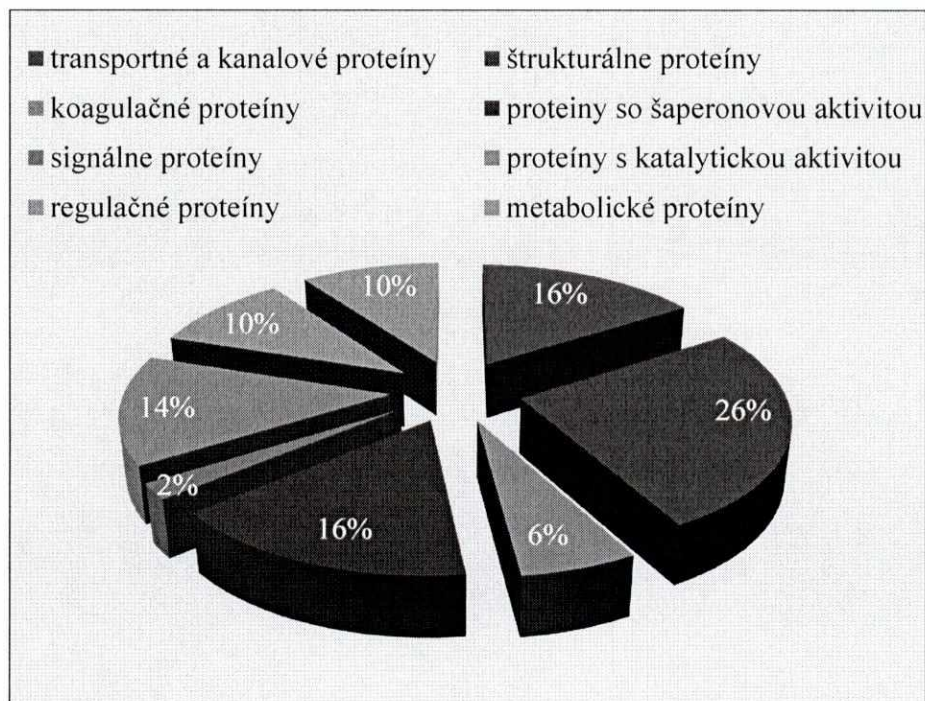
Uskutočnili sme 2DE a jednotlivé proteíny sme odseparovali v prvom rozmere na IPG pásiku s pH 3-10 (Obr. 1).



Obr. 1: 2DE proteínová mapa MNB potkana:

2 DE mapalyzátu MNB 500 µg proteínov separované na 7 cm IPG prúžku pH 3-10 v prvom rozmere. V druhom rozmere separácia prebiehala na SDS-polyakrylamidovom gély 12,5 %. Gél bol zafarbený farbivom Comassie brilliant blue G-250.

Proteíny z gélu sme získali prostredníctvom porovnávania identifikovaných peptidov pomocou MALDI-TOF/TOF s databázou proteínov swissprot. Všetky identifikované proteíny sme zhrnuli do tab.1 (vid'. príloha). Čísla proteínov na 2DE mapách zodpovedajú číslam proteínov v tabuľke. Na obrázku 1 môžeme sledovať proteíny s molekulovou hmotnosťou od 30-250 kDa. Na danom 2DE gély sme pomocou hmotnostnej spektrometrie identifikovali 50 proteínov. 12 proteínov MNB sme identifikovali s vysokým maskot skóre nad 100. Najvyššie skóre mal reťazec **tubulínu beta-2A až 219**. Proteíny s nízkym maskot skóre sa vyskytovali predovšetkým v oblasti nízkych molekulových hmotností od 30-50 kDa. Jednotlivé proteíny sme rozdelili do tried podľa funkcie, ktoré v bunke zastávajú. Percentuálne zastúpenie jednotlivých proteínov podľa funkcie sme graficky znázornili (Obr.2).



Obr. 2: Grafické zobrazenie percentuálneho zastúpenia jednotlivých proteínov podľa funkcie:

Najpočetnejšiu skupinu tvoria štrukturálne proteíny (26 %). Rovnaké percento (16 %) majú proteíny so šaperonovou a katalytickou aktivitou. Najmenšou skupinou proteínov sú proteíny s koagulačnou funkciou (5 %).

Väčšina proteínov (26%) patrí do skupiny štrukturálnych proteínov. Tieto proteíny tvoria súčasť cytoskeletu bunky. Tvoria aktínové filamenty alebo súvisia s tvorbou aktínových filamentov. Patria sem proteíny ako gelzolín, vinkulín, aktín. Proteíny ako tubulín spolu so svojimi izoformami sú súčasťou mikrotubúl.

Početnú skupinu proteínov tvoria proteíny teplotného šoku (16%) vyskytujú sa v bunke buď v dôsledku stresovej reakcie a ako antiapoptické faktory (napr. **stresom indukovaný fosfoproteín 1, 78 kDa glukózu-regulovaný proteín, proteín teplotného šoku s molekulovou hmotnosťou 71 kDa, stresový proteín 70, mitochondriálny, 60 kDa proteín teplotného šoku, mitochondriálny**), alebo sú dôležité v procese správneho zbalovania proteínov ako napr. **proteín disulfid-izomeráza, kalretikulín, endoplazmín**.

K rovnako početnej skupine (16%) patria aj proteíny s katalytickou aktivitou. Zástupcovia proteínov tejto skupiny majú katalytickú aktivitu z čoho vyplýva, že sú schopný urýchľovať alebo spomaľovať chemické reakcie.

Približne 5% identifikovaných proteínov patrí ku koagulačným proteínom, ktoré sa vyskytujú v plazme. Ich prítomnosť v MNB je znakom kontaminácie. Pravdepodobne v priebehu izolácie MNB pri nedostatočnom odstránení plazmy sa fragmenty fibrinogénových reťazcov pripojili k MNB leukocytov. Dôkazom kontaminácie sú aj serotransferín a sérum albumín patriace do skupiny transportných proteínov. Do tejto

skupiny (16%) sme zaradili ATP syntetázu, ktorá okrem syntézy ATP aj prenáša protón cez membránu.

Regulačné proteíny tvoria 10%. Tieto proteíny majú za úlohu regulovať procesy prebiehajúce v bunke. Napr. Alfa-enoláza reguluje rast bunky a riadi alergickú odpoveď bunky. Myozín-9 má dôležitú úlohu v cytokinéze.

Skupinu signálnych proteínov (2%) tvoria proteíny, ktoré sú nezastupiteľné v bunkovej signalizácii ako napr. proteín viažuci guanín nukleotid podjednotka beta 5.

Nadobudnuté výsledky ukazujú na možnosť skúmať proteíny leukocytov a študovať expresiu proteínov vybraných MNB na proteomickej úrovni.

Skratky

ACN - acetonitril; ATP - adenosíntrifosfát; 2DE - dvojdimenzionálna gélová elektroforéza; dH₂O - deionizovaná voda; DTT - ditiotreitol; EDTA - kyselina ethyléndiamíntetraoctová; IEF - izoelektrická fokusácia; IPG - prúžok s imobilizovaným lineárnym pH gradientom; MALDI – TOF - matrixom spojenej laserovej desorbčnej ionizácie času letu; MNB - mononukleárne bunky; MS - hmotnostná spektrometria; NaCl - chlorid sodný; NH₄Cl - chlorid amónny; NH₄HCO₃ - hydrogénuhličitan amónny; PBS - fosfátový tlmivý roztok; SDS - dodecylsírán sodný; TFA - trifluoroctová kyselina; TRIS - tris(hydroxymetyl)aminometán

PodĎakovanie

Publikácia vznikla na základe finančnej podpory Agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ pri riešení projektu s ITMS kódom: 26220220143 (100%).

4. Referencie

1. Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2007). *Color Textbook of Histology* (3rd ed.). Philadelphia, PA: SAUNDERS Elsevier. p. 225.
2. Mann, M., Aebersold, R. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, vol. 422, p.198–207
3. O'Sullivan, B.P., Freedman, S.D. (2009). Cystic fibrosis. *Lancet*. vol. 373, no. 9678, p.1891 – 1904
4. Piubelli, Ch., Galvani, M., Hamdan, M., Domenici, E., Righetti, P.G. (2002). Proteome analysis of rat polymorphonuclear leukocytes: A two-dimensional electrophoresis/mass spectrometry approach. *Electrophoresis*, vol. 23, p. 298–310

5. Príloha

Tab. 1: Identifikované proteíny mononukleárných buniek z potkana na 2D gély

Škvrna	SwissProt	Názov proteínu	skóre	Mw (kDa)	pI
1	P60711	aktín, cytoplazmatický 1	68	42,1	5,2
2	P63259	aktín, cytoplazmatický 2	103	42,1	5,2
3	Q5XIF6	4A reťazec tubulínu alfa	120	50,6	4,8
4	P85108	2A reťazec tubulínu beta	219	50,3	4,6
5	P04785	proteín disulfid-isomeráza	74	57,3	4,7
6	P11598	Proteín disulfid-isomeráza A3	199	57	5,8
7	P18418	kalretikulín	55	42,1	4,2
8	P63039	60 kDa proteín teplotného šoku, mitochondriálny	101	61,1	5,8
9	P63018	71 kDa proteín teplotného šoku	142	71	5,2
10	F1M953	70 proteín stresu, mitochondriálny	58,2	73,7	5,8
11	O35814	Stresom indukovaný fosfoproteín 1	49,6	63,2	6,4
12	P06761	78 kDa proteín regulovaný glukózou	87	72,5	4,9
13	Q66HD0	endoplazmín	76	93	4,6
14	Q68FP1	gelzolin	72,6	86,4	5,7
15	P85972	vinkulín	139	117,1	5,7
16	P50442	glycínamidinotransferáza, mitochondriálna		48,7	7,8
17	P04764	alfa-enoláza	147	47,4	6,2
18	Q62736	nesvalový kaldezmon	59	60,3	6,3
19	P11884	aldehyddehydrogenáza, mitochondriálna	132	57	9,7
20	P04797	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	83	36,1	9
21	P15999	ATP syntetáza podjednotka alfa mitochondriálna	110	59,8	9,7
22	P10719	ATP syntetáza podjednotka beta, mitochondriálna	205	56,3	5,1
23	Q9ER34	Akonitát hydratáza, mitochondriálna	53	86,1	8,7
24	Q6AYD6	PDZ a LIM doménový proteín1	115	36	7
25	P06399	fibrinogén alfa reťazec	66	87,4	5,4
26	P14480	fibrinogén beta reťazec	129	54,8	8,8
27	P02680	fibrinogén gama reťazec	83	51,2	5,6
28	P12346	serofransferín	103	78,5	7,8
29	P02770	sérový albumín	69,6	68,7	6
30	Q62812	myozín-9	103	226,3	5,5
31	Q6P9T8	4B reťazectubulínu beta	46	50,2	4,6
32	Q4QRB4	beta-3tubulín	52	50,6	4,7
33	Q5X132	F-aktín proteín podjednotky beta	133	31	5,6
34	P16617	fosfoglycerát kináza 1	91	44,9	9
35	P62882	guanín nukleotid-viažúci proteín podjednotky beta-5	93,4	38	5,6
36	Q9Z244	GMP-reduktáza 1	35,3	37,9	6,6
37	P05370	glukóza-6-fosfát 1 dehydrogenáza	74,4	59,8	5,9
38	Q68FW4	syntaxín-18	39	38,7	5,5
39	Q08163	Adenylyl cyklázou spojený proteín 1	43,2	51,9	7,8
40	D4A6A2	Heterogén jadrový ribonukleoproteín A3	87,3	37,5	9,3

41	P05065	fruktóza – biofosfát aldoláza A	151	39,8	9,2
42	P32198	KarnitínO-palmitoyltransferáza 1, izoforma pečene	38	88,8	9,5
43	A0JPM9	Eukaryotický translačno iniciačný faktor 3 podjednotky 1	62	36	5,3
44	Q7TNY1	BTB/POZ doména-adaptér CUL3-mediátor RhoA degradačný proteín 2	50,7	36,1	5,8
45	P11974	izozým M1/M2 pyruvát kinázy	111	58,3	6,7
46	Q5RKI0	WD opakovania obsahujúci proteín 1	35,9	66,8	6,2
47	Q9Z2L0	Napät'ovo závislý aniónový selektívny kanálový proteín 1	109	30,9	9,2
48	P81155	Napät'ovo závislý aniónový selektívny kanálový proteín 2	72,7	32,4	8,7
49	Q4KM37	centrozomálny proteín 41 kDa	37,1	37,3	5,3
50	Q4V8G8	tektín-3	30,8	56,9	6,6

Proteomická analýza celkových nestimulovaných ľudských slín

Laputková G., Bober P., Trebuňová M., Sabo J.

Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta, UPJŠ, Trieda SNP1, Košice

*Korešpondujúci autor: G. Laputková, Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach, Trieda SNP1, 040 11 Košice

Tel: +421 918 790 069, e-mail:galina.laputkova@upjs.sk

Abstrakt

K výhodám využitia slín ako diagnostického nástroja nesporne patrí ľahkosť a neinvazívnosť odberu, menšia komplexnosť v porovnaní so sérom a skutočnosť, že sliny presnejšie a rýchlejšie reflektujú zmeny prebiehajúce v organizme. Proteíny slín separované 2D elektroforézou boli po enzymatickom štiepení v géli identifikované pomocou MALDI-TOF MS. V proteínovom profile sa vyskytli niektoré proteíny v minulosti izolované z iných telesných tekutín a tkanív: Zn- α 2 glykoproteín; synaptotagmín-1; reťazec A, štruktúra ľudského sekretórneho komponentu; alfa-enoláza a 78 kDa proteín regulujúci glukózu, ktoré môžu odrážať zdravotný stav ľudského organizmu.

Kľúčové slová: sliny, 2D elektroforéza, MALDI-TOF MS

1. Úvod

Ľudské sliny obsahujú veľký počet rozmanitých peptidov a proteínov v širokom intervale koncentrácií. K výhodám využitia slín ako diagnostického nástroja nesporne patrí ľahkosť a neinvazívnosť odberu, menšia komplexnosť v porovnaní so sérom a skutočnosť, že sliny presnejšie a rýchlejšie reflektujú zmeny prebiehajúce v organizme. K nedostatkom možno zaradiť veľký podiel amylázy, ktorá pri koncentrácii rádovo mg ml^{-1} maskuje prítomnosť menej hojných proteínov, ktoré sú často z hľadiska stanovenia možných biomarkerov slinách najdôležitejšie [1].

Zdokonalenie proteomických metód v posledných rokoch sa odrazilo na náraste identifikovaných proteínových zložiek u zdravých jedincov [2], ľudí trpiacimi ochoreniami ústnej dutiny [3,4] alebo systematickými ochoreniami [5,6].

Cieľom tejto práce bolo skúmať proteínový profil plných nestimulovaných ľudských slín dvojrozmernou gélovou elektroforézou a MALDI-TOF hmotnostnou spektrometriou a identifikovať proteíny dôležité z hľadiska klinického výskumu. Práca predstavuje významný krok pri ďalšom úsilí zameranom na pochopenie zmien prebiehajúcich v ústnej dutine a vývoj neinvazívnych spôsobov stanovenia skorých štádií chorôb.

2. Materiály a metódy

Koktejl inhibítorov proteáz [CIP] (Sigma), kyselina trichlóroctová [TCA] (AppliChem), ditiotreitól [DTT] (BioRad), voda pre HPLC/MS (Merck), acetón (AppliChem), močovina (BioRad), tiomočovina (BioRad), CHAPS (Sigma), brómfenolová modrá (Sigma), súprava na Bradfordovu skúšku koncentrácie proteínov (BioRad), bovinný albumín zo séra (BioRad), minerálny olej (BioRad), tris (BioRad), jodoacetamid [IAA] (BioRad), agaróza (BioRad), tris/glycín/SDS 10x koncentrovaný (BioRad), amfolyty pH 3-10 (BioRad), farbiaci roztok Coomassie blue (BioRad), 30% akrylamid/0,8% bis-akrylamid (BioRad), persulfát amónny (BioRad), TEMED (BioRad), hydrouhličitan amónny (AppliChem), acetonitril [ACN] (Merck), trypsin (Promega), kyselina trifluóroctová [TFA] (Merck), dodecylsulfát sodný [SDS] (BioRad). Všetky použité chemikálie, vrátane izopropylalkoholu a glycerolu, boli v čistote vhodnej pre elektroforézu resp. v čistote vhodnej pre MS.

Vzorky slín použité v experimentoch boli odobraté od zdravých dobrovoľníkov. Žiaden z nich netrpel na ochorenie ústnej dutiny, v minulosti neprekonal žiadne malígne ochorenie, nelieči sa na autoimúnne ochorenie, hepatitídu ani HIV. Sliny v objeme asi 5 ml boli odoberané po predchádzajúcom vypláchnutí ústnej dutiny vodou do sterilných 50 ml skúmaviek (Falcon, BD Biosciences), ktoré boli počas manipulácie so vzorkou uložené na ľade. Ihneď po odbere, ktorý netrval viac ako 10 min, bol na každý ml slín pridaný 1 μ l kokteilu inhibítorov proteáz ako prevencia degradácie proteínov počas prípravy vzorky. Hrubé nečistoty, bunky a nerozpustné úlomky zo slizníc boli zo slín odstránené centrifugáciou pri 14000xg trvajúcou 30 min pri 4°C.

Na prípravu proteínovej vzorky pre 2D elektroforézu bol použitý precipitačný roztok ml salivy bol pridaný rovnaký objem roztoku 20% w/v TCA, 90% v/v acetónu a 20mM DTT [7]. Po krátkom vortexovaní nasledovala inkubácia vzorky cez noc pri -20°C. Po nej boli centrifugáciou pri 14000xg trvajúcou 30 min pri 4°C oddelené proteíny od supernatantu. Peleta bola dva krát premytá chladeným acetónom obsahujúcim ditiotreitól [8]. Prvý krát 90% v/v chladeného acetónu a 20 mM DTT, v druhom prípade 80% v/v acetónu a 10 mM DTT. Peleta bola pri 24°C vysušaná 10 min vákuovou centrifúgou, aby bol zo vzorky odstránený zvyškový acetón. V nasledujúcom kroku boli proteíny rozpustené v solubilizačnom roztoku vhodnom pre 2D elektroforézu.

Precipitáty proteínov boli solubilizované v rehydratačnom roztoku, ktorý slúži súčasne na rehydratáciu IPG prúžkov. V priebehu experimentov bol použitý nasledujúce rehydratačné roztok pozostávajúci z: 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 1% DTT, 1% pH 3-10 amfolyty a 0,002% brómfenolovej modrej.

Koncentrácia proteínov bola stanovená pomocou súpravy na Bradfordovu skúšku koncentrácie proteínov (Quick Start Bradford Protein Assay, BioRad). Stanovenie prebiehalo podľa odporúčaní výrobcu s pomocou nanospektrofotometra (NanoPhotometer, Implen GmbH) pri 595 nm s použitím bovinného albumínu zo séra

ako proteínového štandardu. Pretože solubilizované proteíny ponechané pri izbovej teplote znovu precipitujú, pred stanovaním koncentrácie bola vzorka vortexovaná a asi 5 min centrifugovaná pri $14000 \times g$, aby sme z nej odstránili nerozpustené zložky. Každé stanovenie koncentrácie bolo opakované tri krát.

Pred aplikáciou proteínovej vzorky na IPG prúžky bola, v závislosti od experimentu, upravená jej koncentrácia v intervale od 1,2 mg/ml do 2,0 mg/ml. Štandardne bolo na rehydratáciu lineárnych 7 cm dlhých IPG prúžkov s pH 3-10 (BioRad) použitých 125 μ l vzorky. Izoelektrická fokusácia vo fokusačnom prístroji (Protean IEF Cell, BioRad) prebiehala nasledovne: prvých 45 min boli IPG prúžky rehydratované pasívne bez nanosenia vrstvy minerálneho oleja. Po ich uplynutí bol každý prúžok pokrytý 2 ml minerálneho oleja, ktorý bráni ich vysušaniu. Nasledovala aktívna rehydratácia prebiehajúca 12 hod pri 50 V. V prvom kroku – 250 V, 5 hod - boli prúžky odsolené. Nasledoval lineárny nárast napätia na 500 V v trvaní 1,5 hod. Po ukončení tohto kroku prebiehala fokusácia pri 500 V 2,5 hod. Nasledoval lineárny nárast napätia na 1000 V v trvaní 2 hod, s dvojhodinovou fokusáciou pri 1000 V. Ďalším krokom bol lineárny rast napätia do konečnej hodnoty 4000 V (2,5 hod) a fokusácia pri 4000 V (20000 Vhod).

Pred uskutočnením elektroforézy v druhom rozmere boli IPG prúžky ekvilibrované v dvoch krokoch: Ekvilibračný roztok I pozostával z 50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M urei, 30% glycerolu, 2% SDS; 0,002% brómfenolovej modrej a 1% DTT – pôsobenie 15 min. Ekvilibračný roztok II pozostával z 50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M urei, 30% glycerolu, 2% SDS, 0,002% brómfenolovej modrej a 2,5% IAA – pôsobenie 10 min.

Po izoelektrickej fokusácii boli ekvilibrované a osušené IPG prúžky umiestnené na polyakrylamidovom géli pozostávajúcom z dvoch vrstiev: spodnej - 12,5% tzv. resolving gél a hornej - 4% tzv. stacking gél. Kontakt IPG prúžku s géлом poskytovala vrstva 0,5% agarózy v roztoku tris/glycín/SDS s 0,003% brómofenolovej modrej. Proteíny boli separované podľa ich molekulovej hmotnosti horizontálne v elektroforetickom zariadení (Mini-PROTEAN Tetra Cell, BioRad) 60 min pri konštantnom napätí 200 V v roztoku tris/glycín/SDS. Sledovať migráciu proteínov v horizontálnom smere umožňovali farebné proteínové štandardy (Precision Plus Protein Dual Xtra Standards, BioRad). Na vizualizáciu proteínových spotov boli gély zafarbené Coomassie blue (Bio Safe Coomassie Stain, BioRad). Pre účely dokumentácie a následnú analýzu boli gély naskenované pomocou kalibrovaného densitometra (GS-800 densitometer, BioRad) s použitím softvéru Quantity One (BioRad) s rozlíšením 700 dpi.

2D proteínové mapy boli analyzované pomocou softvéru PDQuest (PDQuest Advanced 8.0.1 2D Gel Analysis Software, BioRad). Z máp boli „vystrihnuté“ oblasti obsahujúce rovnaké klastery spotov. Na vytvorenie súborov zodpovedajúcich spotov boli vybraté dva až tri reprezentatívne gély. Spoty boli detekované automaticky a spárované vzhľadom k vzorovému (master) gélu, ktorý vybral softvér automaticky.

Nasledovalo manuálne editovanie detekovaných a spárovaných spotov. Zo súboru spotov boli vylúčené artefakty, ktoré softvér nesprávne detekoval ako spoty. Niektoré unikátne spoty boli doplnené do „master“ gélu manuálne. Na normalizáciu bola zvolený model založený na metóde lokálnej regresie LOESS, ktorá umožňuje korigovať rozdiely v účinnosti vyfarbenia v jednotlivých géloch. Pri analýze gélov boli zvolené najmenej tri „landmark“ značky. Pre každý identifikovaný spot bola stanovená relatívna molekulová hmotnosť (Mr) a izoelectrický bod (pI) zodpovedajúceho proteínu z jeho pozície na 2D mape.

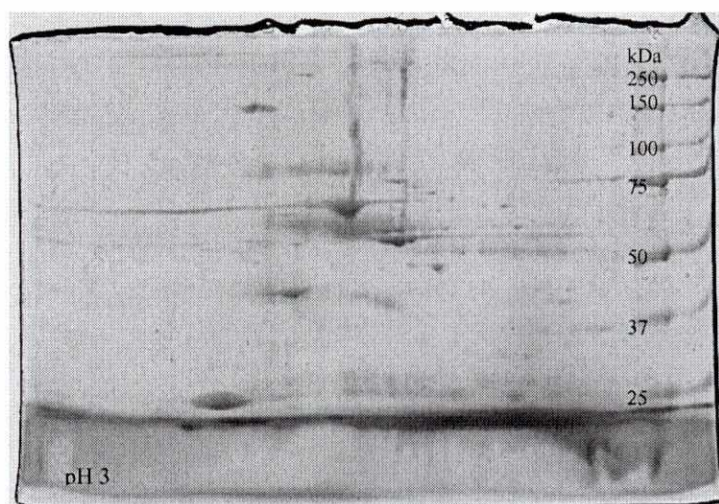
Pri digescii v géli sme postupovali modifikovanou metódou navrhnutou autormi publikácií [8,9]. Zvolené proteínové spoty boli vyrezané pomocou zariadenia na automatické vyrezávanie spotov (EXQuest Spot Cutter, BioRad) do 96 jamkovej PCR platničky. Kúsky gélu boli najprv odfarbené preplachovaním v 25 mM NH_4HCO_3 (~10 min) a opakovaným preplachovaním v 25 mM NH_4HCO_3 /50% acetonitril do úplného odfarbenia. Odfarbené kúsky gélu boli dehydrované 100% acetonitrilom a vysušené s pomocou vákuovej centrifúgy pri izbovej teplote (~10 min). Vysušené kúsky gélu boli pokryté 25 mM NH_4HCO_3 obsahujúcim 0,5 μM trypsínu. Po 1 hod inkubácii na ľade bol roztok trypsínu, ktorý sa nevsiakol do gélu, odsatý a nahradený 25 μl 25 mM NH_4HCO_3 ako prevencia pred vyschnutím gélu. Po enzymatickom štiepení trvajúcom 12 hod pri 37°C boli peptidy z gélu dvakrát extrahované 50% ACN a 0,1% TFA. Pred zahustením vzorky na konečný objem cca 10 μl pomocou vákuovej centrifúgy bolo pH zhromaždeného roztoku upravené 4% TFA.

V práci bola použitá matrica zložená z: 1,5 mg/ml HCCA (alfa-kyano-4-hydroxyškoricová kyselina), 84 % ACN, 14 % metanol, 2 % (0,1 % roztok TFA). Táto matrica bola zmiešaná so vzorkou v pomere 2:1 a následne bol 1 μl nanosený na oceľovú platňu.

Pri určovaní proteínov slín sme použili metódu peptidového mapovania (PMF - Peptide Mass Fingerprinting) pozostávajúcu z niekoľkých krokov. Vzorka proteínu je najprv podrobená selektívnemu enzymatickému štiepeniu, najčastejšie trypsínom (hydrolyza peptidovej väzby). Zmes tryptických peptidov sa potom analyzuje metódou MALD-TOF MS. Hmotnosti peptidov odčítané z MS spektra sa porovnávajú s dátami v databáze pomocou programov umožňujúcich štatistickú analýzu (Protein Prospector, Mascot, Proteomics, Proteinscape, atď.). Výsledkom takéhoto hľadania je zoznam proteínov, ktorých štiepením mohli vzniknúť peptidy s nameranými hmotnosťami. Následným použitím MALDI LID (laser-induced dissociation) techniky sme určili a overili sekvenciu aminokyselín vo vybraných peptidoch (MS/MS spektrum).

3. Výsledky

Na Obr. 1. je zobrazený SDS-PAGE gél so vzorkou plných nestimulovaných slín obsahujúcou 200 μg proteínov.



Obr. 1. SDS-PAGE vzorky WUS. IPG 7 cm, lineárny, pH 3-10. Gély boli zafarbené Coomassie blue.

Proteínové mapy gélov obsahujúce vzorky plných nestimulovaných slín patriacich tej istej osobe, ktoré boli použité na vyrezanie spotov, následné enzymatické štiepenie v géli a identifikáciu pomocou hmotnostného spektrometra. Identifikované spoty sú označené jedinečným SSP číslom. V Tabuľke II sú uvedené identifikované proteíny. Pre porovnanie je v nej uvedený odhad Mr a pI a hodnoty určené MS.

Tabuľka II. Zoznam identifikovaných proteínov.

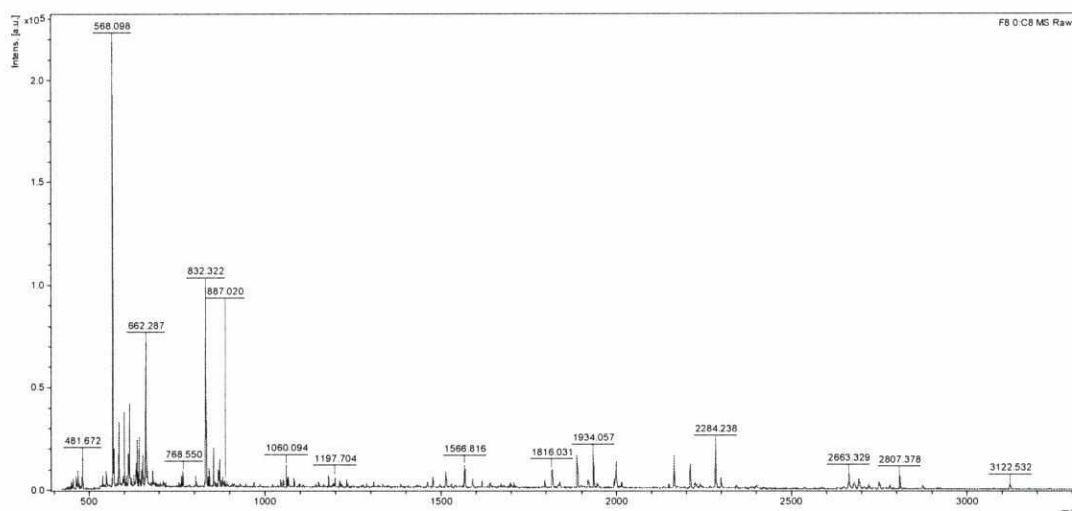
SSP	Názov proteínu	Názov proteínu	Odhadnuté, Mr, kDa	Odhadnuté, pI	Stanovené MALDI, Mr, kDa	Stanovené MALDI, pI	Skóre
609	albumin, isoform CHRA_h	albumín, izoforma CHRA_h	56	3,6	70,6	5,9	94
1604	chain A, structure of human serum albumin	reťazec A, štruktúra albumínu ľudského séra	58,6	4,2	67,8	5,6	260
2601	actin cytoplasmic 1	cytoplazmatický aktín 1	60,21	4,94	42,1	5,2	52
2802	polymeric immunoglobulin receptor	polymérny imunoglobulínový receptor	93,08	4,88	84,4	5,5	87
3203	actin cytoplasmic 1	cytoplazmatický aktín 1	39,97	5,35	42,1	5,2	99,7
3305	predicted: actin cytoplasmic 2-like isoform 3	predpovedaný: izoforma 3 podobná cytoplazmatickému aktínu 2	40,29	5,21	40,1	5,1	90
3501	Ig alpha 2 chain C region	Ig alfa-2 reťazec C oblasť	52,87	5,36	37,3	5,7	66
4202	zinc alpha 2 glycoprotein	zinok-alfa-2 glykoproteín	39,32	5,69	34,5	5,7	40,5
4301	ACTB protein, partial	ACTB proteín, parciálny	40,56	5,48	40,5	5,5	134

4404	chain A, solution structure of human secretory component	reťazec A, rozpustná štruktúra ľudského sekretórneho komponentu	47,86	5,82	65,4	6,3	125
4503	Ig alpha 2 chain C region	Ig alfa-2 reťazec C oblasť	51,52	5,91	37,3	5,7	53
4705	chain A, structure of human serum albumin	reťazec A, štruktúra albumínu ľudského séra	74,1	5,89	67,8	5,6	125
5005	Ig kappa chain C	Ig kappa reťazec C	26,9	6,4	11,8	5,5	
5006	Ig kappa chain C	Ig kappa reťazec C	27,1	6,6	11,8	5,5	
5007	Ig lambda 6 chain C	Ig lambda 6 reťazec C	29,1	6,6	11,4	7,7	
5204	leucocyte elastase inhibitor	inhibitor leukocytárnej elastázy	39,35	6,11	42,8	5,9	49
5207	carbonic anhydrase 6	karbonát hydrolyáza 6	38,41	6,29	35,5	6,6	57
5302	chain A, human serum albumin in a complex with miristic acid and tri-iodobenzoic acid	reťazec A, albumínu ľudského séra v komplexe s kyselinou myristolenovou a kyselinou 2,3,5-trijódbenzoovou	41,03	6,15	68	5,6	171
5503	alpha amylase 1	alfa amyláza 1	49,38	6,45	58,4	6,5	123
5602	serum albumin	sérum albumín	56,03	6,04	71,3	5,9	73
5604	chain A, structure of human serum	reťazec A, štruktúra albumínu ľudského séra	57,92	6,25	5,6	67,8	96
6009	Ig kappa chain C	Ig kappa reťazec C	26,9	6,9	11,8	5,5	
6203	carbonic anhydrase 6 precursor	prekursor karbonát hydrolyázy 6	37,92	6,45	35,5	6,6	98
6206	carbonic anhydrase VI	karbonát hydrolyáza VI	37,21	6,57	35,4	6,6	137
6301	actin cytoplasmic 2	cytoplazmatický aktín 2	40,93	6,5	42,1	5,2	73
6504	alpha amylase 1	alfa amyláza 1	49,22	6,63	58,4	6,5	200
6601	chain A, crystal structure of the Ga module complexed with human serum albumin	reťazec A, kryštalická štruktúra Ga modulu v komplexe s ľudským sérum albumínom	58,38	6,39	67,2	5,5	172
6709	serotransferin	serotransferín	76,08	6,74	79,3	7,0	110
7004	Ig lambda 6 chain C	Ig lambda 6 reťazec C	28,4	7,9	11,4	7,7	
7304	alpha enolase	alfa enoláza	44,32	7,25	47,5	7,7	59
7602	chain A, human serum albumin mutant R218p complexed with thyroxine (3,3',5,5'-	reťazec A, ľudský sérum albumín mutant R218p v komplexe s tyroxínom ((3,3',5,5'-	59,55	6,89	68,4	5,5	261

	tetraiodo-L-tyronine)	tetraiodo-L-tyronín)					
7604	chain A, structure of human serum albumin with S-naproxen and Ga module	reťazec A, štruktúra albumínu ľudského séra s S-naproxénom a ga modulom	60,06	7,12	67,8	5,6	272
8003	Ig kappa chain C	Ig kappa reťazec C	26,1	8,3	11,8	5,5	
8205	synaptotagmin 1	synaptotagmín 1	42,4	8,9	47,9	9	
4802	polymeric immunoglobulin receptor	polymérny imunoglobulínový receptor	84,71	5,78	84,4	5,5	80
6502	alpha amylase 2B	alfa amyláza 2B	71,2	7,47	58,3	6,7	95
3701	78 kDa glucose regulated protein	78 kDa proteín regulujúci glukózu	78,64	5,68	72,4	4,9	73
6503	1c8q, Chain A: Structure Solution and Refinement of the Recombinant Human Salivary Amylase	1c8q, reťazec A, štruktúrna forma a zdokonalenie rekombinantnej ľudskej amylázy zo slín	70,8	7,1	56,5	6,3	70
6801	Pancreatic alpha amylase	pankreatická alfa amyláza	87,5	7,32	58,4	6,7	46

4. Diskusia a záver

Proteomické metódy vedúce k identifikácii proteínového zloženia predstavujú sľubný smer pri štúdiu ľudských slín. Porovnanie vzoriek získaných od zdravých a chorých ľudí môže odhaliť unikátne proteíny alebo zmenenú úroveň expzie špecifických proteínov, ktoré môžu byť použité ako biomarkery. Pri proteomickom prístupe je možné získať informácie o semikvantitatívnych zmenách na úrovni každého proteínu a odhaliť prítomnosť izoforiem vznikajúcich v dôsledku takých post-translačných modifikácií ako je fosforylácia alebo glykozilácia. Neutícha rast záujmu o identifikáciu biomarkerov zo salivy ako prostriedok na monitorovanie zdravotného stavu a včasnej diagnostiky takých chorôb ako je imunodeficiencia spôsobená HIV, systematické ochorenia ovplyvňujúce činnosť slinných žliaz, cystická fibróza, cirhóza pečene, nádorové ochorenia ústnej dutiny, kardiovaskulárne ochorenia či diabetes mellitus. Tento záujem je spôsobený mnohými výhodami, ktoré má sliva v porovnaní s inými telovými tekutinami alebo vzorkami tkanív. Jednoduchý neinvazívny odber vzorky v množstve dostatočnom pre analýzu je jednou z mnohých.



Obr. 2. Hmotnostné spektrum identifikovaného 78 kDa glucose regulated protein, Mw (72,4), pI (4,9), (MS spektrum).

Po softvérovom vyhodnotení 2D SDS-PAGE máp, vyrezaní niektorých spotov a enzymatickej digescii proteínov boli pomocou MALDI-TOF identifikované niektoré proteíny alebo ich skupiny.

Veľkú skupinu identifikovaných spotov tvorila alfa amyláza, ktorá predstavuje najväčšiu a zároveň najviac preskúmanú zložku ľudských slín. Nedávne proteomicke štúdie naznačujú, že tento proteín môže tvoriť viac ako dvadsať spotov na 2D géloch s proteínmi slín. Autori práce [6] zistili s pomocou 2D elektroforézy a MALDI-TOF, že viac ako 140 spotov alfa amylázy vytvára na proteínovej mape stabilnú a veľmi komplexnú skupinu. Analýzou spektier a elektroforetických máp prišli k záveru, že pozorované spoty možno rozdeliť do troch skupín. Hlavná skupina, pozostávajúca z 90 spotov, zodpovedá alfa amyláze s plnou dĺžkou a pravdepodobne aj izoformy a post-translačne modifikované formy. V druhej skupine sa nachádzajú alfa amylázy s krátkymi reťazcami s rozličnou dĺžkou, ktoré vznikajú náhodným štiepením pravdepodobne v ústnej dutine. V poslednej skupine, podľa autorov, sú také formy proteínu, ktorých molekulová hmotnosť predstavuje len asi polovicu molekulovej hmotnosti natívneho enzýmu, má však s ním zhodné N- and C-terminálne sekvencie.

Zinok-alfa-2 glykoproteín, ktorého prítomnosť sme určili v slinách, je relatívne hojným glykoproteínom, ktorý sa vyskytuje predovšetkým v plazme. Izolovaný z plazmy bol skúmaný ako potenciálny biomarker pre rakovinu prostaty [1]. Autori práce [2] ho tak isto považujú za vhodný biomarker určovaný zo séra v prípade fibrózy pečene pacientov s hepatitídou C. Jeho nepomerne jednoduchší spôsob získania zo slín ho robí v tomto zmysle ešte atraktívnejším.

Pri proteomickej analýze v našich vzorkách WUS sme identifikovali i 78 kDa proteín regulujúci glukózu (78grp). Nedávno bol zaznamenaný v literatúre pokus využiť 78grp ako biomarker identifikujúci karcinóm ústnej dutiny. Autori práce [3] pri

proteomickej analýze buniek sliznice ústnej dutiny našli významnú koreláciu medzi poklesom expície proteínu a výskytom malignančných tumorov tohoto typu.

Alfa enoláza patrí ku skupine cytoplazmatických a glykolytických enzýmov. Protilátky proti alfa enoláze boli detekované v prípade mnohých infekčných a autoimúnnych ochorení [4]. 2D elektroforézou s následným použitím LC-MS/MS vzoriek pečene bolo zistené, že jej zvýšená expícia môže súvisieť so vznikom hepatocelulárneho karcinómu u pacientov, ktorí prekonali hepatitídu C [5]. Snáď je cestou poznania patogenézy tohto procesu i skúmanie výskytu alfa enolázy, ktorú sme identifikovali v slinách.

Jedným z určených proteínov bol aj reťazec A: štruktúra ľudského sekretórneho komponentu (chain A, solution structure of human secretory component), ktorý, asociovaný s polymerickým IgA, vytvára sekretórny IgA predstavujúci významnú protilátku aktívnu na mukózných povrchoch. Napriek jeho dôležitosti, nie je stále známa ani jeho podrobná štruktúra [10].

V slinách sme identifikovali i synaptotagmín 1, ktorý je spúšťačom rýchleho uvoľňovania neurotransmiterov citlivého na Ca^{2+} napomáhajúc vzájomnému pôsobeniu medzi SNARE proteínmi (Soluble NSF Attachment Protein Receptor) na synaptických vezikulách a plazmatickou membránou. Relatívne slabé elektrostatické interakcie medzi synaptotagmínom-1 and membránami dokážu podstatne akcelerovať ich fúziu [11].

Proteíny slín separované 2D elektroforézou boli po enzymatickom štiepení v géli identifikované pomocou MALDI-TOF MS. V proteínovom profile sa vzskytly niektoré proteíny v minulosti izolované z iných telesných tekutín a tkanív: Zn- α 2 glykoproteín; synaptotagmín-1; reťazec A, štruktúra ľudského sekretórneho komponentu; alfa-enoláza a 78 kDa proteín regulujúci glukózu, ktoré môžu odrážať zdravotný stav ľudského organizmu.

Pod'akovanie

Publikácia vznikla na základe finančnej podpory Agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ pri riešení projektu s ITMS kódom: 26220220143 (100%).

Literatúra

1. Bondar OP, Barnidge DR, et al. LC-MS/MS quantification of Zn- α 2 glycoprotein: A potential serum biomarker for prostate cancer. Clin Chem. 2007;53:673-8.
2. Gangadharan B, Antrobus R, et al. Novel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients. Clin Chem. 2007;53:1792-9.

3. Huang TT, Chen JY, et al. Decreased GRP78 protein expression is a potential prognostic marker of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2010;109:326-7.
4. Terriera B, Degand N, et al. Alpha-enolase: A target of antibodies in infectious and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2007;6:176-2.
5. Takashima M, Kuramitsu Y, et al. Overexpression of alpha enolase in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: Association with tumor progression as determined by proteomic analysis. *Proteomics.* 2005;5:1686-92.
6. Hirtz Ch, Chevalier F, et al. MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. *Proteomics.* 2005;5:4597-607.
7. Jessie K, Hashim OH, Rahim YHA. Protein precipitation method for salivary proteins and rehydration buffer for two-dimensional electrophoresis. *Biotechnology.* 2008;7:686-93.
8. Shevchenko A, Wilm M, et al. Mass Spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996;68:850-8.
9. Havliš J, Thomas H, et al. Fast-Response Proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem.* 2003;75:1300-6.
10. Bonner A, Perrier C, et al. Solution structure of human secretory component and implications for biological function. *J Biol Chem.* 2007;282:16969-80.
11. Van den Bogaart G, Thutupalli S, et al. Synaptotagmin-1 may be a distance regulator acting upstream of SNARE nucleation. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18:805-12.

Prínos dátovo nezávislej MS/MS analýzy v oblasti proteomickej analýzy karcinómu prsníka

Petrovič M.¹, Talian I.¹, Andrašina I.², Sabo J.¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska Fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šarária, Trieda SNP1, 040 11 Košice

²Klinika rádioterapie a onkológie, Východoslovenský onkologický ústav, a. s., Rastislavova 43, 041 91 Košice

*Korešpondujúci autor: M.Petrovič, Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach, Trieda SNP1, 040 11 Košice

Tel: +421 918 790 069, e-mail:marian.petrovic@student.upjs.sk

Abstrakt

Ochorenie karcinómu prsníka predstavuje vo svete ochorenie s druhou najvyššou mortalitou u žien. Diferenciálna proteomická analýza karcinogénnych ochorení môže vniesť kľúčové poznatky o priebehu a terapií týchto ochorení. Tento článok popisuje proteomickú analýzu bunkovej línie MCF7 bez a s ošetrením Doxorubicínom (Dox) dvoma hmotnostno-spektrometrickými metódami: dátovo nezávislou MS/MS analýzou a dátovo závislou MS/MS analýzou. Ako dátovo závislá analýza bola uskutočnená tandemová MS/MS ako dátovo nezávislá PACiFIC MS/MS metóda. Použitím PACiFIC metódy bolo v neoštrenej vzorke stanovených 2400 proteínov (FDR < 1%, minimálne 6 jedinečných peptidov) a viac ako 290 proteínov bolo stanovených s viac ako 40 % -ým pokrytím sekvencie. Vo vzorke oštrenej Dox bolo stanovených 2440 proteínov, z toho 310 s viac ako 40 % -ým pokrytím sekvencie.

Úvod

Karcinóm prsníka je celosvetovo najviac sa vyskytujúce karcinogénne ochorenie u žien a ochorenie s druhou najvyššou mortalitou vôbec [1]. Jednou z uznávaných terapií pre tento typ ochorenia je chemoterapia. Jedným dnes najviac používaným chemoterapeutikom je Doxorubicín (Dox), ktoré patrí do skupiny antracyklínov, pričom jeho účinok je založený na interkalácii DNA [2, 3]. Bližší mechanizmu účinku tohto veľmi potentného chemoterapeutika však nie je známy. Taktiež ostáva otvorená otázka vzniku vedľajších účinkov pri liečbe s Dox, ako je kardiotoxicita. Proteomická analýza modelových systémov ako je laboratórna línia MCF7, môže slúžiť k objasneniu týchto procesov. Hmotnostná spektrometria ako kľúčový analytický nástroj v proteomickej analýze zaznamenáva v posledných dvoch rokoch vývoj od dátovo závislej k dátovo nezávislej MS/MS analýzy. Tento posun je podnietený potrebou dosiahnutia vyššieho pokrytia proteínovej sekvencie, potrebou zvýšiť dynamický rozsah pri komplexných vzorkách, ale aj potrebou zvýšenia reprodukovateľnosti analýzy. K metódam, ktoré môžu zvýšiť požadovanú kavalitu proteomickej analýzy v tomto smere, patria

PACiIFC (Precursor Acquisition Independent From Ion Count) a SWATH [4]. Obe metodiky využívajú prednosti dátovo nezávislej MS analýzy a môžu výrazným spôsobom prispieť k riešeniu dodnes neobjasnených biologických procesov.

Tento článok porovnáva dátovo závislú (PACiFIC) s dátovo nezávislou (tandemovou) proteomickou analýzou laboratórnej línie MCF7, ktorá je následne analyzovaná za tých istých podmienok, avšak ošetrovaná Dox, za cieľom vykonania diferenciálnej proteomickej analýzy.

Metódy

Kultivácia buniek

Laboratórna línia karcinómu prsníka MCF7 (ATCC, USA) bola kultivovaná v T75 kultivačných fľašiach s DMEM médiom s prídavkom 10 % teľacieho séra a 1% streptomycínu/penicilínu pri 37°C a 5 % atmosfére CO₂. Po dosiahnutí 90 % konfluentnosti bola jedna séria ošetrovaná s 1μM Dox (Sigma Aldrich, USA) po dobu 12 hodín. Následne boli všetky vzorky trikrát premyté TBS tlmivým roztokom.

Príprava vzorky

Do každej kultivačnej fľaše bolo pridaných 1.8 ml lyzačného tlmivého roztoku pozostávajúceho z 8 M roztoku močoviny v 50 mM TRIS/HCl (pH = 8), 10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄ a jednej tablety proteázových inhibítorov/10 ml lyzačného tlmivého roztoku (Roche, Švajčiarsko). Takto spracovaná vzorka bola prenesená do centrifugačnej skúmavky a sonifikovaná počas 10 min. Následne bola vzorka centrifugovaná 10 min. pri 15 000 g. V supernatante bola stanovená koncentrácia proteínov pomocou Bradfordovho testu. Vzorka o koncentracii 1 mg/ml bola následne redukovaná pri 37 °C s 0.1 M dithiothreitolom (DTT) a alkylovaná pri 37°C v tme s 0.5 M iodoacetamidom. Proteíny boli precipitované s ľadovým acetónom počas noci. Vzorka bola centrifugovaná 30 min. pri 15 000 g. Supernatant bol odstránený a pelet bol rozpustený v 8 M roztoku močoviny v 50 mM TRIS/HCl (pH = 8). Použitím 20mM TRIS/HCL (pH=8) s prídavkom 2mM CaCl₂ bola vzorka nariadená na finálnu koncentráciu 2 M močoviny a štiepená trypsínom v pomere 1:50 pri 37°C cez noc. Štiepeie trypsínom bolo zastavené prídavkom 20 % TFA do finálnej koncentrácie 20 % TFA.

LC-MS analýza

Vzorka peptidov bola nariadená s vodou na konečnú koncentráciu 100 ng/μl a separovaná na HPLC systéme Thermo Ultimate 3000 na predkolóne PepMap100 (20 mm x 75 μm ID) so stacionárnou fázou 100 Å C₁₈ (Dionex, Germany). Vzorka bola následne z predkolóny vymytá mobilnou fázou A (5μl/min) a vylučovaná na analytickú kolónu (150 mm x 75 μm ID) so stacionárnou fázou 100 Å Magic C₁₈. Gradient mobilných fáz s prítokom 400nL/min bol vytváraný nasledovne (%A/%B): 95:5 počas 6 min, prechod k 60:40 počas 60 min, 40:60 počas 2 min, prechod k 20:80 počas 1 min, konštante opčas 5 min, prechod k 95:5 počas 1 min. Mobilné fázy A a B pozostávali

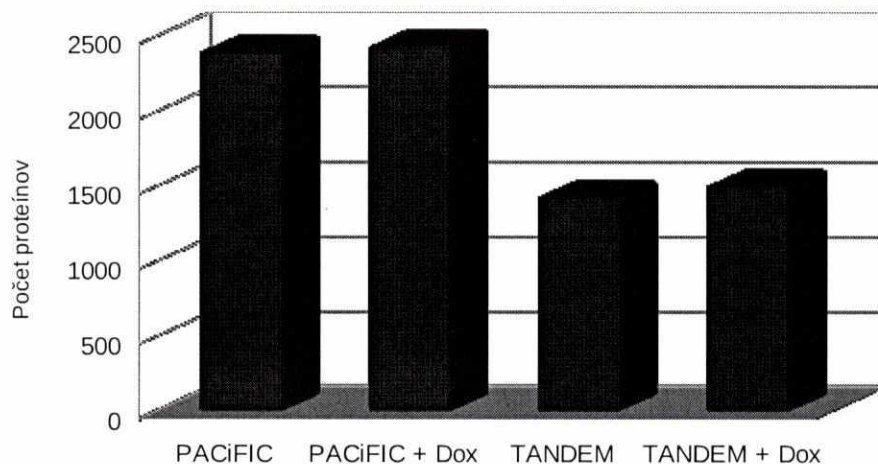
z vody a acetonitrilu v pomere 98:2 a 5:95 s prídavkom 0.1% (v/v) kyseliny mravčej. Peptidy boli analyzované pomocou Velos LTQ Iontrap (Thermo Fisher Scientific, USA) s využitím dátovo nezávislej a dátovo závislej MS/MS analýzy.

Dátová analýza

Namerané dáta boli z RAW formátu prekonvertované do formátu MGF pomocou ProteomeDiscoverer 1.4 (ThermoFisher) a následne podrobené vyhľadávaniu proteínov pomocou EasyProt-u (SIB, Switzerland) a použitím proteínovej databázy Uniprot_SwissProt human. Tolerancia hmotnosti rodičovských iónov bola 3.5 Da, s karbamidometyláciou cysteínu ako fixnou a oxidáciou metionínu ako variabilnou modifikáciou.

Namerané výsledky

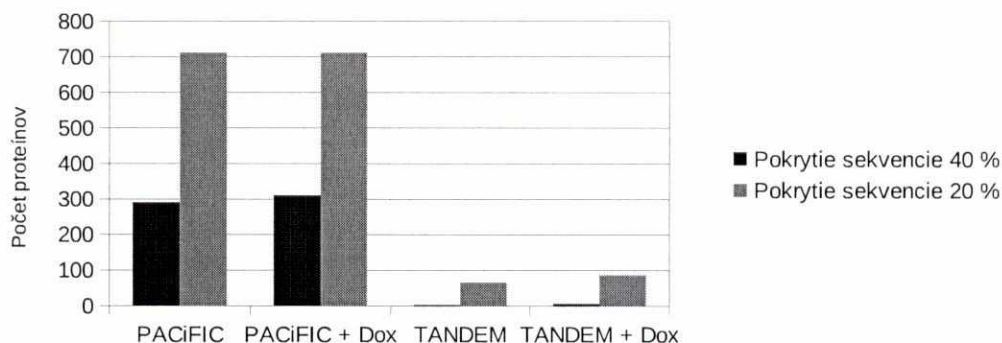
Zo vzoriek laboratórnej línie MCF7 ako aj s Dox ošetrovanej línie MCF7 bola prevedená diferenciálna proteomická analýza použitím PACiFIC-u, pomocou ktorého bolo identifikovaných 2400 proteínov (FDR < 1%, minimálne 6 jedinečných peptidov na proteín, minimálne 6 aminokyselín na jednu peptidovú sekvenciu) vo vzorke bez ošetrenia Dox a 2440 proteínov s ošetrením Dox za tých istých podmienok. Pomocou tandemovej MS/MS analýzy bolo identifikovaných za tých istých vyhodnocovacích parametrov 1435 proteínov vo vzorke bez ošetrenia a 1510 vo vzorke ošetrovej Dox (Obr. 1)



Obr. 1 Distribúcia počtu analyzovaných proteínov vzorky bez a s ošetrením s Dox v súvislosti s použitím PACiFIC-u a tandemovej MS/MS analýzy

Namerané dáta boli následne vyhodnotené v závislosti od pokrytia proteínovej sekvencie daných proteínov. Použitím PACiFIC metódy, 290 proteínov neošetrovej MCF7 bunkovej línie vykazovalo pokrytie proteínovej sekvencie viac ako 40 %,

u oštrenej vzorky to bolo až 310 proteínov pri tých istých parametroch . Viac ako 710 zo všetkých proteínov pri oštrenej a viac ako 711 pri neoštrenej vzorke vykazovalo pokrytie proteínovej sekvencie viac ako 20 %. Analogicky boli vyhodnotené namerané dáta z tandemovej hmotnostnej spektrometrie. Pri neoštrenej vzorke len 2 proteíny mali vyššie pokrytie sekvencie ako 40 % a len 65 vyššie ako 20 %. U vzorky oštrenej



Dox bol počet proteínov presahujúci 40 % pokrytie sekvencie v počte 6 a v počte 85 presahujúci pokrytie 20 % (Obr. 2)

Obr. 2 Distribúcia počtu analyzovaných proteínov vzorky v závislosti od pokrytia ich sekvencií bez a s oštrením s Dox v súvisi s použitím PACiFIC a tandemovej MS/MS analýzy.

Diskusia

Sada identických vzoriek laboratórnej línie karcinómu prsníka MCF7 bola podrobená proteomickej anlyze dvoma spôsobmi – dátovo nezávislou analýzou PACiFIC (Precursor Acquisition Independent From Ion Count) a dátovo závislou metódou tandemovej MS/MS spektrometrie. Použitím PACiFIC metódy boli získané proteomické dáta z oštrenej a neoštrenej línie s Doxorubicínom. V tomto zmysle bolo zaznamenaných 2400 respektíve 2440 proteínov s pokrytím sekvencie vyššej ako 20 % u 710 respektíve u 711 proteínov. Porovnaním zaznamenaných výsledkov tých istých vzoriek a tých istých vyhodnocovacích parametrov bolo zaznamenaných použitím tandemovej MS/MS metódy 1435 respektíve 1510 proteínov. V počte stanovených proteínov bolo možné zaznamenať signifikantný rozdiel. Treba však podotknúť, že aj tandemová MS/MS poskytla hodnotné výsledky v zmysle počtu identifikovaných proteínov (kritériá vyhľadávania boli stanovené relatívne konzervatívne, aby sa vylúčila možnosť falošne pozitívnej identifikácie). Pokrytie sekvencie použitím tandemovej MS/MS vykazovalo pri neoštrenej vzorke len 2 proteíny s viac ako 40 % pokrytím, u oštrenej vzorky to bolo 6 proteínov. Pri vyhodnotení 20 % pokrytia sekvencie, 65 respektíve 85 proteínov bolo identifikovaných. Môžeme pozorovať výrazne menšiu schopnosť pokrytia proteínovej sekvencie pri tandemovej MS/MS v porovnaní s dátovo nezávislou PACiFIC metódou. Táto skutočnosť je relevantná najmä pri kvalitatívnej identifikácii proteínov. Zvýšením

pokrytia sekvencie proteínu sa znižuje geometrickým radom pravdepodobnosť falošne pozitívnej identifikácie. Máme z nameraných výsledkov za to, že dátovo nezávislé vyhodnocovacie hmotnostno-spektrometrické metodiky budú predstavovať budúcnosť proteomickej analýzy, nielen kvôli jej schopnosti veľmi kvalitne identifikovať proteíny, ale aj kvôli svojej časovej a finančnej nenáročnosti.

Pod'akovanie

Publikácia vznikla na základe finančnej podpory Agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ pri riešení projektu s ITMS kódom: 26220220143 (100%).

Literatúra

- [1] Gangopadhyay S, Nandy A, Hor P, Mukhopadhyay A. Breast Cancer Stem Cells: A Novel Therapeutic Target. Clin Breast Cancer 2003;13:7-15.
- [2] Zhang N, Klegerman M, Deng H, Shi Y, Goluski E, An Z. Trastuzumab-Doxorubicin Conjugate Provides Enhanced Anti-Cancer Potency and Reduced Cardiotoxicity. Journal of Cancer Therapy, 2013;4:308-22.
- [3] Evans A, Miriyala S, Clair D, Butterfield D, Roninson R. Global Effects of Adriamycin Treatment on Mouse Splenic Protein Level. J Proteome Res. 2012;11:1054-64.
- [4] Panchaud A, Scherl A, Shaffer S, Haller P, Kulasekara H, Miller S, et al. PACIFIC: how to dive deeper into the proteomics ocean. Anal Chem. 2009;81:6481-88.

Charakteristika exozómov a ich význam pre medicínu

Bencková M., Bober P., Talian I., Sabo J.

Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach, Trieda SNP1, 040 11 Košice

*Korešpondujúci autor: J. Sabo, Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach, Trieda SNP1, 040 11 Košice
Tel: +421 918 790 069, e-mail: jan.sabo@upjs.sk

Abstrakt

Hlavným cieľom klinickej proteomiky je identifikácia biomarkerov ochorení nachádzajúcich sa v telesných tekutinách, ktoré môžu byť sledované relatívne finančne menej náročnou metódou pre skorú diagnostiku ochorenia. Dôležitú úlohu v tomto procese zohráva redukcia komplexity proteómu vzoriek telesných tekutín, aby sa zvýšila detekovateľnosť proteínov, ktoré sú vo vzorke prítomné v relatívne nízkych množstvách a ktoré môžu mať špeciálny patofyziologický význam. Najviac proteomických analýz je aplikovaných na vzorky krvného séra a plazmy, ale čoraz väčšia pozornosť sa venuje aj vzorke moču, ktorý je získavaný neinvazívnym spôsobom vo väčších množstvách a preto poskytuje atraktívnu alternatívu. Významnú úlohu v proteomike čoraz častejšie zohrávajú exozómy - nanovezikuly, ktoré sú vylučované rôznymi typmi buniek do extracelulárneho priestoru a ktoré obsahujú dôležité biomarkery ochorení [1-3].

Úvod

Eukaryotické bunky obsahujú okrem intracelulárnych organel aj organely extracelulárne, ktoré sú uvoľňované do mikroprostredia obklopujúceho bunku. Podľa mechanizmu, ktorým sú tieto extracelulárne membránové organely uvoľňované do mikroprostredia ich delíme na exozómy, ektozómy a apoptické pľuzgieriky. Ektozómy sú veľké membránové vezikuly (priemer > 100 nm), ktoré sú vylučované priamo z cytoplazmatickej membrány do extracelulárneho priestoru. Aj apoptické pľuzgieriky sú membránové vezikuly, ktoré sú uvoľňované do extracelulárneho priestoru cez cytoplazmatickú membránu ale od ektozómov sa líšia tým, že kým ektozómy sú uvoľňované počas prvých fáz apoptózy, apoptické pľuzgieriky sú uvoľňované počas posledných fáz bunkovej smrti [2]. V ďalšej časti článku budeme venovať pozornosť exozómom, ktoré sú uvoľňované do extracelulárneho priestoru splynutím multivezikulárnej organely (MVB) s cytoplazmatickou membránou[3]. V tabuľke 1 sú uvedené vlastnosti jednotlivých extracelulárnych membránových organel.

Tabuľka 1: Vlastnosti extracelulárnych organel [2,4]

Vlastnosť	Exozómy	Ektozómy	Apoptické pl'uzgieriky
veľkosť (priemer)	30-100 nm	100-1000 nm	50-500 nm
morfológia	homogénne-v tvare pohára	heterogénne-rôzne tvary	heterogénne
spôsob uvoľnenia do extracelulárneho priestoru	regulovaný	regulovaný	regulovaný
zloženie	proteíny, lipidy, mRNA, mikroRNA	proteíny, mRNA, mikroRNA	proteíny, mRNA, mikroRNA, DNA
proteínové markery	Alix, TSG101, HSC70, CD63, CD81, CD9	selektíny, integríny, CD40, metalloproteínázy	históny

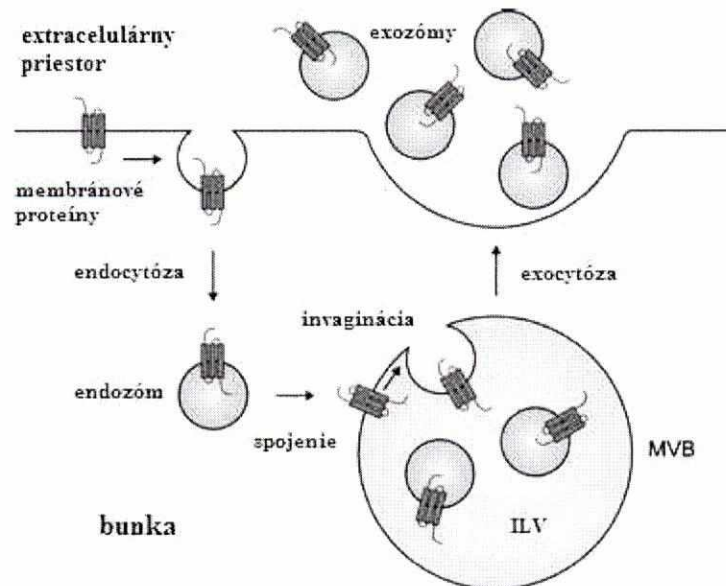
Exozómy

Exozómy sú nanovezikuly (priemer 30-100 nm) endocytového pôvodu, ktoré sú vylučované do extracelulárneho priestoru alebo telesných tekutín rôznymi typmi buniek a hrajú významnú úlohu v medzibunkovej komunikácii [2,3].

Exozómy obsahujú proteíny, lipidy, mRNA a mikroRNA molekuly. Okrem súboru spoločných proteínov obsahujú aj proteíny a RNA molekuly, ktoré sú charakteristické pre rôzne typy buniek alebo tkanív, ktorými sú exozómy vylučované a preto je ich proteínová štruktúra vysoko špecifická. Exozómy obsahujú nielen membránové ale aj cytosolické proteíny buniek, z ktorých sú uvoľňované do extracelulárneho priestoru [2-5].

Mechanizmus tvorby a sekrécie exozómov

Mechanizmus tvorby a vylučovania exozómov môže byť popísaný 3 krokmi (obrázok 1). V prvej etape tohto procesu podliehajú apikálne membránové proteíny, nachádzajúce sa v cytoplazmatickej membráne bunky, endocytóze. V druhej etape je endozóm spojený s vonkajšou membránou MVB. V tejto fáze endozómy môžu prijať proteíny, mRNA a mikroRNA z cytoplazmy bunky a lipidy bunky. Zároveň sú apikálne membránové proteíny delené vo vonkajšej membráne MVB a následne sú invaginované membránou. MVB obsahuje intralumenálne vezikuly (ILV). V tretej etape vonkajšia membrána MVB splynie s cytoplazmatickou membránou a dochádza k uvoľneniu ILV do extracelulárneho priestoru a takéto uvoľnené malé častice sa nazývajú exozómy [4,5].



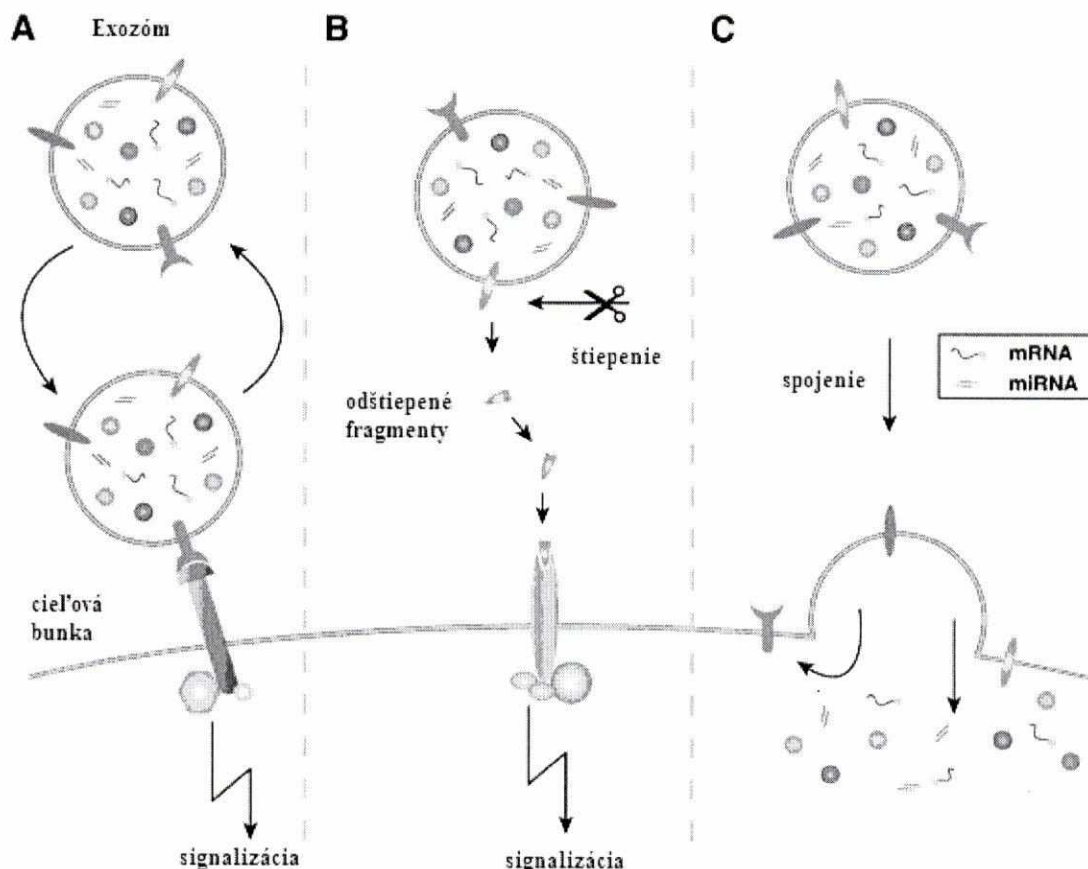
Obrázok 1: Mechanizmus tvorby a uvoľňovania exozómov z buniek [5]

Medzibunková komunikácia

Čoraz častejšie sa ukazuje, že exozómy zohravajú dôležitú úlohu v medzibunkovej komunikácii. V súčasnosti je známych niekoľko mechanizmov, ktoré sa uplatňujú pri interakcii exozómov s cieľovými bunkami:

- A) exozomálne membránové proteíny môžu interagovať s receptormi cieľových buniek a tak vyvolať intracelulárnu signalizáciu
- B) exozomálne membránové proteíny môžu byť rozštiepené protézami v extracelulárnom priestore a odštiepené fragmenty môžu potom vystupovať ako rozpustné ligandy, ktoré sa viažu na povrchový receptor cieľovej bunky. Následne sa týmto mechanizmom aktivuje signalizačná kaskáda v cieľovej bunke.
- C) exozómy sa zlúčia s membránami cieľových buniek a uvoľnia svoj obsah do bunky neselektívnym spôsobom. Povrchová membrána cieľových buniek môže byť takto modifikovaná pridaním nových membránových receptorov (z membrán exozómov) a rôznych lipidov. Exozómové molekuly (proteíny, mRNA a mikroRNA) môžu následne aktivovať viacero signalizačných udalostí v príjemcovskej cieľovej bunke.

Spomenuté mechanizmy medzibunkovej komunikácie uskutočňované prostredníctvom exozómov sú znázornené na obrázku 2 [2,6].



Obrázok 2: Mechanizmy uplatňované pri medzibunkovej komunikácii sprostredkované exozómami [2]

Prenos molekúl mRNA a mikroRNA prostredníctvom exozómov je spojený s výmenou genetických informácií medzi bunkami. Pri výmene genetickej informácie medzi kmeňovými bunkami a poškodenými bunkami sprostredkovanej exozómami môžu nastať dve situácie:

1. Exozómy uvoľnené z poškodených buniek tkaniva môžu preprogramovať fenotyp kmeňových buniek. Kmeňové bunky získavajú doručeníím molekúl mRNA a/alebo mikroRNA prostredníctvom exozómov vlastnosti špecifické pre poškodené bunky tkaniva.
2. Prenos génových produktov (molekúl mRNA a/alebo mikroRNA) z kmeňových buniek do poškodených buniek prostredníctvom exozómov môže preprogramovať poškodené bunky a tak môže dochádzať k oprave poškodených tkanív [6].

Funkcie exozómov

Záujem o tématiku exozómov čoraz viac rastie, pretože zohrávajú dôležitú úlohu v mnohých fyziologických prípadoch. Exozómy majú dôležitý význam pri medzibunkovej komunikácii. Vykonávajú aj mnoho ďalších úloh v ľudskom tele či už

v zdraví: stimulácia alebo potlačenie imunitnej odpovede, aktivácia molekúl a mRNA prenos, ale aj pri ochorení: prenos a potlačenie infekcií, podporovanie zápalu pri autoimunitných ochoreniach, kontrola nad tumorom [3].

Metódy používané na proteomickú analýzu exozómov

Medzi najčastejšie používané techniky, ktoré nachádzajú svoje uplatnenie pri identifikácii proteínov prítomných v telesných tekutinách a vo vzorkách tkanív, patrí hmotnostná spektrometria [5].

Pred proteomickou analýzou exozómov je potrebné exozómy izolovať zo vzorky a prečistiť ich. Najčastejšou metódou, ktorá sa používa na izoláciu exozómov je ultracentrifugácia a čoraz častejšie sa začínajú používať aj rôzne filtračné metódy. Na izoláciu exozómov sa taktiež používajú aj ďalšie metódy ako adsorpcia a dialýza. Na čistenie izolovaných exozómov sa používajú metódy ako sedimentácia cez sacharózovú gradientovú ultracentrifugáciu a imunoizolácia založená na princípe protilátok. Očistené exozómy určené pre proteomickú analýzu sú použité na separáciu proteínov alebo peptidov, ktoré sú následne identifikované hmotnostnými spektrometrami [3].

Predtým ako je proteín použitý na identifikáciu, je potrebné proteín podrobiť digescii, počas ktorej je proteín štiepený na peptidy. Na digesciu sa najčastejšie používa trypsin a až následne sú hmotnostným spektrometrom merané hmotnostné spektrá vzniknutých peptidov (peptide-mass fingerprint, PMF – metóda odtlačkov prstov). Každý proteín má jedinečný PMF, na základe ktorého je proteín identifikovaný porovnaním tohto hmotnostného spektra s teoretickým hmotnostným spektrom všetkých známych proteínov. Najčastejšie sa pri metóde odtlačkov prstov používa 2D elektroforéza, ktorá slúži na separáciu a izoláciu jednotlivých proteínov a následne sú proteíny (po digescii) identifikované hmotnostným spektrometrom s MALDI a TOF. Na analýzu zložitejších vzoriek sa používa tandem 2 hmotnostných analyzátorov (MS-MS) v spojení s kvapalinovou chromatografiou (LC), ktorej úlohou je počiatočná separácia peptidov získaných pri digescii. Ak je na analýzu použitá metóda LC-MS/MS, môžu byť jednotlivé proteíny obsiahnuté v komplexnej vzorke identifikované bez potreby ich počiatočného čistenia [5].

Záver

Exozómy okrem určitého množstva spoločných proteínov obsahujú aj proteíny, ktoré sú špecifické pre bunku z ktorej boli uvoľnené. Táto ich vlastnosť v spojení so skutočnosťou, že exozómy môžu byť lokalizované v extracelulárnom priestore robí z nich dokonalý materiál pre identifikáciu potenciálnych biomarkerov dôležitých v patofyziológii určitých ochorení. Cieľom proteomickej analýzy exozómov je identifikovať tie proteíny, ktoré sú potenciálnymi biomarkermi špecifických ochorení [2].

Ďalšie skúmanie molekulovej špecificity exozómov by mohlo byť prospešné pre identifikáciu proteínov, ktoré by znamenali nový význam pre diagnostiku. Exozómy nám môžu poskytnúť informácie o prognózach rôznych ochorení ako napríklad pri chronickom zápale, kardiovaskulárnych ochoreniach, ochoreniach obličiek a pri tumore. Prítomnosť exozómov v telesných tekutinách robí z nich ľahko dostupné častice, ktorých množstvo, bunkový pôvod, zloženie a funkcia sú závislé od štádia ochorenia. Spoznávanie mechanizmov, ktorými exozómy spúšťajú signály v bunkách, môže v budúcnosti priniesť aj nové stratégie v terapii [6].

Pod'akovanie

Publikácia vznikla na základe finančnej podpory Agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ pri riešení projektu s ITMS kódom: 26220220143 (100%).

Použitá literatúra

- [1] Pisitkun, T. , Shen, R-F., Knepper. M. A.: Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. PNAS, 101 (36), 2004, s. 13368–13373.
- [2] Mathivanan, S., Ji, H., Simpson, R. J.: Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. Journal of proteomics, 73, 2010, s. 1907-1920.
- [3] Dimov, I., Velickovic, L. J., Stefanovic, V.: Urinary Exosomes. The Scientific World JOURNAL, 9, 2009, s. 1107–1118.
- [4] Moon, P-G. et al.: Urinary exosomes and proteomics. Mass Spectrometry Reviews, 30, 2011, s. 1185–1202.
- [5] Hoorn. E.J. et al.: Prospects for urinary proteomics: Exosomes as a source of urinary biomarkers. Nephrology, 10, 2005, s. 283–290.
- [6] Camussi, G. et al.: Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. Kidney International, 78, 2010, s. 838–848.

Proteomická analýza extracelulárnych vezikúl izolovaných z moču pomocou diferenciálnej ultracentrifugácie

Bober P.¹, Talian I.¹, Kováčová V.¹, Chmelová M.¹, Karabinoš A.², Sabo J.¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach,
040 11 Košice

²SEMBID, s.r.o., Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky,
080 01 Prešov

*Korešpondujúci autor: J. Sabo, Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach, Trieda SNP1, 040 11 Košice
Tel: +421 918 790 069, e-mail: jan.sabo@upjs.sk

Abstrakt

Exozómy, ktoré sú súčasťou extracelulárnych vezikúl moču boli navrhnuté ako východiskový materiál pre objav proteínových biomarkerov rôznych ochorení. Súčasný protokol pre ich izoláciu používa dvojstupňovú diferenciálnu ultracentrifugáciu. Kvôli ich nízkej hustote predpokladáme, že v prvom kroku centrifugácie pri 17000 g ostali v supernatante. Western blot analýzou a pomocou elektronickej mikroskopie sa zistilo, že exozómy moču boli tiež prítomné v nízko-rýchlostnom pelete pri 17000g zachytené abundantnými polymernými Tamm-Horsfallovými proteínmi, tým došlo k zníženiu ich reprodukovateľnosti. Pridaním dithiotreitolu k nízko-rýchlostnému peletu došlo k narušeniu polymérnej siete Tamm-Horsfallových proteínov redukciovými disulfidickými väziami medzi monomérmi. Týmto krokom sme posunuli exozomálne proteíny z nízko-rýchlostného peletu (17000 g) do vysoko-rýchlostného peletu (200000 g) a zvýšili ich výťažok.

Úvod

Telesné tekutiny obsahujú 20-1000 nm extracelulárne vezikuly (ELV), ktoré sú rozdelené do troch skupín: exozómy (20-100 nm), ektozómy (100-1000 nm) a apoptické pľuzgieriky (50-5000 nm) (Mathivanan a kol., 2010).

Exozómy sú membránové vezikuly endocytozového pôvodu, ktoré sa uvoľňujú z rôznych typov buniek (glomerulárnych podocytov, renálnych tubúl) do extracelulárneho priestoru moču (Simpson R.J. a kol., 2008). Preto exozómy moču poskytujú vhodný východiskový materiál pre objav proteínových biomarkerov rôznych chorôb: akútne poškodenie obličiek - ATF3, WT-1 (Zhou a kol., 2008), rakovina močového mechúra – Resitin Mucin-4, GSA, Galectin-3, EHDP4 (Smalley a kol., 2008), rakovina prostaty – PSA, PSMA (Mitchell a kol., 2009), renálna ischémia – AQP1 (Sonoda a kol., 2009), glomerulárne ochorenie obličiek (Gutwein a kol., 2010).

Izoláciou extracelulárnych vezikúl (ELV) z moču sa zbavíme abudantných proteínov Tamm-Horsfallových proteínov (THP) a proteínov pochádzajúcich z krvnej plazmy (Pieper a kol. 2004), ktoré môžu nepriaznivo vplývať na analýzu.

V tejto štúdii boli izolované extracelulárne vezikuly dvojkrokovou diferenciálnou centrifugáciou (Pisitkun T. a kol., 2004). V prvom kroku centrifugáciou pri 17000 g boli odstránené vysoko-hustotné membrány a polymerizované THP proteíny. V druhom kroku ultracentrifugáciou pri 200000 g boli izolované extracelulárne vezikuly.

Chemikálie

Izolačný roztok (10 mM trietanolamin \geq 99,0 % (GC) (Sigma Live Science) , 50 mM sacharóza \geq 99,5 % (GC), ultračistá H₂O (Millipore, Bedford, MA, USA), Laemmliho buffer (1,5 % SDS (Bio-Rad Laboratories), 6 % glycerol, 10 mM Tris (Bio-Rad Laboratories) – HCl (Sigma Aldrich) pH 6,8), azid sodný \geq 99,0 % (Fluka), proteázový inhibitorový koktail (Sigma Aldrich), NaOH p.a. (Mikrochem), acetón \geq 99,9 % pre HPLC (Sigma Aldrich), močovina (Bio-Rad), CaCl₂ (Lachema N.P. Brno), NH₄HCO₃ (AppliChem), TFA (99.5 %) Acros-Organics (New Jersey, USA), FA, trypsín Promega (Medison, USA), iodacetamid (Bio-Rad).

1. Odber a príprava vzorky moču

1.1 Zber čerstvej vzorky moču

Najlepšia moč je obyčajne prvý ranný moč. Niekedy vzorky moču obsahujú vysoké množstvo fosfátových zrazenín. To môže byť evidentné v čase zberu alebo po uskladnení. Pretože zrazenina môže strhnúť exozómy, zakalené vzorky moču mali by byť odstránené. Celkový objem moču odporúčaný k výťažku dostatočného množstva exozómov pre proteomickú analýzu je 200 ml (Christopher Y. a kol., 2013)

1.2 Pridanie proteazových inhibítorov

Hneď po zbere k 200 ml moču bolo pridaných 6,68 ml 100 mM azidu sodného NaN₃ a proteázový inhibitorový koktail - 2,5 ml 10 mM AEBSF, 50 ul 2mM leupeptinu (Christopher Y. a kol., 2013)

1.3 Peletová bunková suť

Vzorka moču bola centrifugovaná počas 30 min., 4000 g pri izbovej teplote. Pelet obsahoval celé bunky, veľké membránové fragmenty a iné sute. (Christopher Y. a kol., 2013)

1.4 Dialýza a skoncentrovanie vzorky

1. Vzorka moču bola odsolená v dialyzačnom rukávniku pri 4 °C v deionizovanej vode (3 krát vymenenej, moč:voda = 1:10, každých 24 hodín)
2. Objem moču bol potom skoncentrovaný použitím vákuového koncentrátora (SpeedVac)

2. Izolácia exosomov z moču pomocou diferenciálnej ultracentrifugácie a odstránenie abudantných Tamm-Horsfallových proteínov z moču pomocou DTT

1. Vzorka moču bola centrifugovaná pri 17000 g počas 15 min. pri 25 °C
2. Supernatant (SN 1) sme si ponechali
3. Pelet sme resuspendovali v izolačnom roztoku
4. Pridali sme 200 mg/ml DTT a inkubovali pri 37 °C počas 5-10 min. Počas inkubácie sme vzorku vortexovali každé 2 minúty
5. Skúmavku sme doplnili izolačným roztokom a centrifugovali pri 17000 g počas 15 min. pri 25 °C
6. Supernatant (SN 2) sme si ponechali
7. Zmiešali sme (SN1) a (SN2)
8. Zmiešaný supernatant sme centrifugovali pri 200000 g počas 1 h pri 25 °C
9. Odstránili sme supernatant
10. Získali sme pelet obsahujúci ELVs (exozómy, ektozómy a apoptické pľuzgieriky) (Fernandez-Llama P. a kol., 2010).

3. Lyzácia extracelulárnych vezikúl (ELVs)

Pelet obsahujúci ELVs bol lyzovaný v Laemliho bufery

4. Precipitácia (ELVs) proteínov pomocou acetónu

1. K lyzátu vzorky bol pridaný absolútny acetón (uskladnený pri -20°C) v pomere 1:3
2. Roztok bol uložený na 1 h do chladničky (-20°C)
3. Po vybratí z chladničky bol centrifugovaný pri 18000 g 15 min
4. Supernatant bol odsatý a odstránený
5. Vzniknutý pelet bol vysušený na SpeedVacu

5. Stanovenie koncentrácie proteínov

Pomocou Bradfordovej metódy sme na Nanophotometry stanovili koncentráciu proteínov

6. Digescia ELVs proteínov v roztoku

1. K 80 ug proteínov sme pridali 80 ul 8 M močoviny (v 100 mM TRIS/HCl, pH=8)
2. K roztoku sme pridali 8 ug 0,1 M DTT (v 100 mM TRIS/HCl, pH=8) a nechali 30 min inkubovať pri 37 °C
3. Pridali sme 8,8 ul 0,5 M IAA (v 100 mM TRIS/HCl, pH=8) a nechali 30 min inkubovať v tme pri 37 °C
4. Pridali sme 500 ul absolútneho acetónu (-20°C) a nechali počas 1 hodiny v chladničke pri -20°C
5. Centrifugovali pri 4000 g 50 minút, vzniknutý pelet bol vysušený na speedvacu
6. Pelet sme rozpustili v 80 ul množstve 8 M močoviny (v 100 mM TRIS/HCl, pH=8)
7. Následne sme pridali 320 ul 2 mM chlorid vapatý (v 10 mM TRIS/HCl, pH=8)
8. Pridali sme trypsín rozpustený v 25 mM NH₄HCO₃ v pomere (1:50) a nechali inkubovať 6 hodín pri 37 °C
9. Pridali sme 30 ul 20 % TFA
10. Použili sme ziptip a následne zriedili vzorku s 0,1 % kyselinou mravčou na 100 ng/ul

7. Separácia a analýza ELVs peptidov pomocou nano-HPLC a iónovej pasci 2D separácia

ELV peptidy (500 ng) boli separované v 2-rozmernej nano-HPLC (SCX v prvom a C₁₈ v druhom rozmere) v salt plug nastavení. Separácia peptidov na reverznej fáze bola vykonaná v 110 min gradiente 0-55 % ACN, 0,1 % kyselina mravčia, 300 nl/min. Parametre SCX kolóny boli 300 μm x 10 cm, 10 μm, 500 - 10000 Å, C₁₈ kolóny - 75 μm, 150 mm (2 μm PepMap, C₁₈ 100 Å, Dionex) a trap kolóny - 75 μm, 20 mm (3 μm, PepMap C₁₈). Amazon ETD iónová pasca bola vybavená online nano zdrojom captive sprejom. Auto MS/MS zber dát bol vykonaný so 4 MS/MS prekurzormi z MS spektra, vybrané jednotlivé spektra po 20 s, vylučujú samostatne nabité prekurzorové ióny. Vyhľadávanie bolo vykonané pomocou SwissProt databázy spustením ProteinScape. Parametre pre Mascot 2,4 boli 0,5 Da prekurzorová tolerancia, jeden ¹³C izotop, 0,8 Da MSMS tolerancia, falošne objavená hodnota < 1 %.

Výsledky a diskusia

Pomocou Mascot 2,4 vyhľadávacieho programu bolo stanovených 152 extracelulárnych vezikulárnych proteínov.

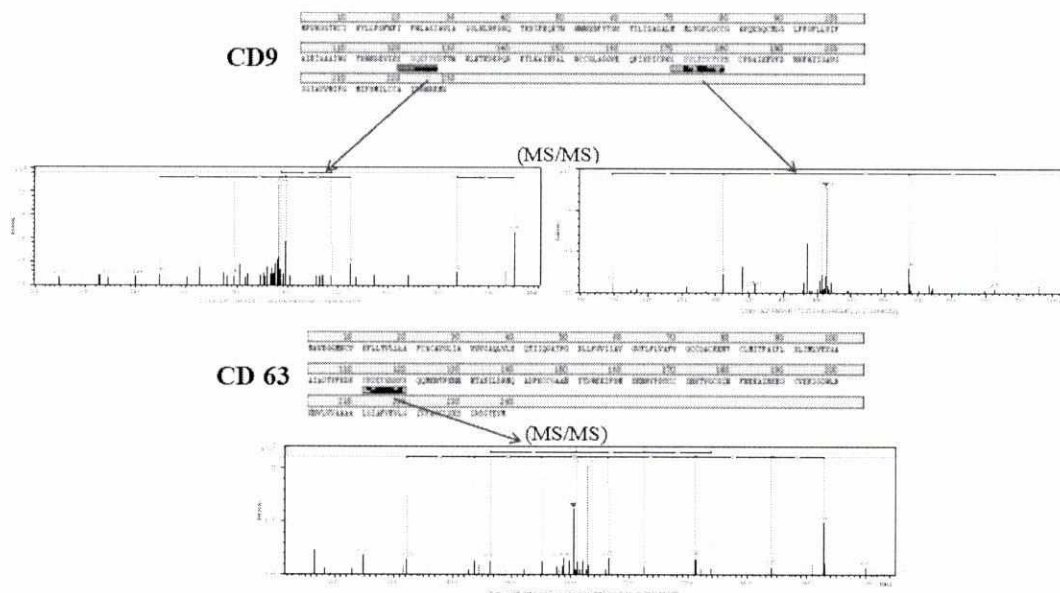
Tamm-Horsffalové proteíny (THP), ktoré predstavujú najabudantnejšiu skupinu proteínov moču boli odstránené v prvom kroku diferenciálnej centrifugácie pri 17000 g.

To je potvrdené aj výsledkami merania, kde spomedzi 152 pozitívne stanovených proteínov sa Tamm-Horsfallov proteín nenachádzal.

THP vytvárajú veľmi vysoké molekulové hmotnostné komplexy prostredníctvom disulfidických väzieb. Tieto komplexy zachytávajú extracelulárne vezikuly (ELV) a sedimentujú pri 17000 g Pomocou redukčného činidla dithiotreitolu (DTT) sú disulfidické väzby štepené, čím sa uvoľnia ELV z týchto komplexov, a tým sa dosiahne ich vyššia výťažnosť (Fernandez-Llama P. a kol., 2010).

Spomedzi všetkých extracelulárnych vezikúl patria exozómy medzi najlepšie charakterizované vezikuly. Biogenéza exozómov začína invagináciou endozómov multivezikulárnymi organelmi (MVB). Splynutím MVB s bunkovou membránou dochádza k uvoľneniu malých invaginovaných vezikúl z MVB do vonkajšieho prostredia (moču) v podobe exozómov. Klasické exozómy majú v transmisnom elektronovom mikroskope tvar „futbalovej lopty“ s približne 100 nm v priemere. (Christopher Y. a kol., 2013). Medzi exozomálne biomarkery patria: membránové proteíny CD9 a CD63 a cytosolické proteíny podieľajúce sa na biogenéze multivezikulárnych endozómov Alix, TSG101 (Taylor & Gerzel-Taylor, 2005; They a kol., 2001).

Spomedzi 152 ELV proteínov boli identifikované dva membránové proteíny CD9 a CD63 predstavujúce biomarkery exozómov moču (Obr. 1). Na základe týchto výsledkov potvrdzujeme účinnosť izolácie ELV z moču pomocou diferenciálnej ultracentrifugácie.



Obr. 1 MS/MS spektrum CD9 a CD63 stanovených membránových proteínov pomocou iónovej pascy predstavujúcich biomarkery exozómov moču

Záver

Extracelulárne vezikuly sú vylučované rôznymi typmi buniek močových ciest a hrajú dôležitú úlohu v bunkovej komunikácii. Poskytujú vhodný východiskový materiál pre objav biomarkerov (ochorení obličiek, rakoviny prostaty), ktoré nie sú detekované pri štandardnej analýze moču. Izoláciou ELV z moču sa zbavíme abundančných proteínov, kde dôležitú úlohu v tomto procese zohráva redukcia komplexnosti vzorky proteómu moču a zvýšenie detekovateľnosti proteínov, ktoré sú vo vzorke prítomné v relatívne nízkych koncentráciách a ktoré môžu mať špeciálny patofyziologický význam.

Pod'akovanie

Publikácia vznikla na základe finančnej podpory Agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ pri riešení projektu s ITMS kódom: 26220220143 (100%).

Použitá literatúra

- Gutwein P. a kol.. (2010). ADAM10 is expressed in human podocytes and found in urinary vesicles of patients with glomerular kidney diseases. *Journal of Biomedical Science*, 17 (1), 3.
- Christopher Y. Ch, Marie C. H., Christopher J. W., (2013). Purification of Exosome-Like Vesicles from Urine, *Methods in Enzymology*, 524.
- Mathivanan, S., Ji, H., Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73, 1907–1920.
- Mitchell, P., Welton, J., Staffurth, J., Court, J., Mason, M., Tabi, Z., Clayton, A. (2009). Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *Journal of Translational Medicine*, 7 (1), 4.
- Patricia Fernandez-Llama a kol., (2010). Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation, *Kidney International* 77, 736–742
- Pieper, R., a kol., (2004). Characterization of the human urinary proteome: A method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics*, 4, 1159–1174
- Pisitkun T, Shen R.F, Knepper M.A., (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13368–13373
- Simpson R.J, Jensen S.S, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 2008;8:4083–99.

- Smalley, D. M., Sheman, N. E., Nelson, K., Theodorescu, D. (2008). Isolation and Identification of Potential Urinary Microparticle Biomarkers of Bladder Cancer. *Journal of Proteome Research*, 7 (5), 2088-2096
- Sonoda, H., a kol., (2009). Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 297 (4)
- Taylor, D. D., Gercel-Taylor, C., (2005). Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *British Journal of Cancer*, 92, 305–311
- They, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., a kol. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *The Journal of Immunology*, 166, 7309–7318.
- Zhou, H., a kol., (2008). Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. *Kidney International*, 74 (5), 613-621.

Proteomická analýza vzoriek leukocytov iónovou pascou

*Kováčová V.¹, Chmelová M.¹, Bober P.¹, Talian I.¹, Tóthová E.¹, Géci I.¹,
Karabinoš A.², Sabo J.¹*

¹Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach
040 11 Košice

²SEMBID, s.r.o., Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky
080 01 Prešov

*Korešpondujúci autor: V. Kováčová, Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach, Trieda SNP1, 040 11 Košice
Tel: +421 918 790 069, e-mail:veronika.kováčová@upjs.sk

Abstrakt

Proteomika je jednou z metodík, ktoré je možné použiť na analýzu buniek na molekulárnej úrovni. V našej štúdii sme sa zamerali na bunky leukocytov, izolovaných z ľudskej krvi. Uskutočnili sme ich proteomický profil a na základe iónovej pasce sme stanovili celkovo 230 proteínov. Z identifikovaných proteínov je 14 exprimovaných priamo v bunkách leukocytov a 18 má nezastupiteľné miesto v regulácii imunitného systému. Identifikovaním všetkých proteínov v bunkách leukocytov je možné získať dostatok potrebných informácií o leukocytoch a tým vyriešiť mnohé biologické problémy.

Kľúčové slová: leukocyty, proteomika, iónová pasca, imunitný systém

1. Úvod

Biele krvinky sú jedným z typov buniek v krvi. Na rozdiel od červených krviniek, ktoré prenášajú kyslík z pľúc do tkanív, biele krvinky majú funkciu imunitného systému. Snáď najznámejšia skupina z bielych krviniek sú B-lymfocyty, ktoré produkujú protilátky. Iné typy bielych krviniek sú T-lymfocyty, NK bunky a makrofágy. Makrofágy sú veľké bunky, ktoré fagocytózou odstraňujú časti vírusov a baktérií (Garrett a Grisham., 2007). T a B lymfocyty sú súčasťou špecifického imunitného systému. Špecifický imunitný systém alebo špecifická imunita je založená na špecifickej odpovedi organizmu voči patogénom, to znamená, že bunky patriace do špecifického imunitného systému dokážu rozoznať, odpovedať a zapamätať si určitú látku – antigén (Pancer a Cooper, 2006). Na rozdiel od mononukleárných leukocytov (lymfocyty a makrofágy), polymorfonukleárne leukocyty sú vysoko špecializované bunkové komponenty, nazývané tiež granulocyty, pretože obsahujú množstvo intracelulárnych granúl, ktoré je možné farbiť kyslými, zásaditými alebo neutrálnymi farbivami a tak rozlíšiť jednotlivé typy granulocytov (neutrofil, bazofil, eozinofil). Najpočetnejšiu skupinu granulocytov tvoria neutrofil, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v obrane organizmu pred patogénmi (Ganz a Lehrer, 1997 a Levy, 1996). Sú primárne

zodpovedné za fagocytózu. Bázofily a eozinofily sú dôležité v zápalových reakciách. Všetky typy granulocytov tiež monocyty a NK bunky patria k zložkám nešpecifického imunitného systému. Nešpecifický imunitný systém je vrodený, prítomný od narodenia (Matzinger, 2002).

Možnosť študovať bunky leukocytov na úrovni proteínov nám zabezpečuje proteomická analýza (Tomazella a kol., 2009, Chung a kol., 2009). Príprava vzoriek na proteomické účely nie je jednoduchá. Preto sa niektoré z publikácií zaoberajú vytváraním vhodných metód na izoláciu jednotlivých typov buniek leukocytov pre proteomické účely (Barderas a kol., 2007).

V našej štúdií sme skúmali vzorky leukocytov z krvi zdravých ľudí. Vyizolované leukocyty sme následne podrobili proteomickej analýze, ktorá bola uskutočnená pomocou hmotnostnej spektrometrie, iónovej pasce.

2. Metodiky

2.1 Izolácia leukocytov z krvi pre účely proteomickej analýzy

Všetky experimenty boli vykonané s povolením zodpovedného etického výboru lekárskej fakulty, univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach. Krvné vzorky boli odobraté od 29 zdravých ľudí. Každá vzorka krvi podstúpila okamžitú izoláciu cirkulujúcich leukocytov. 9ml krvi zriedených s PBS bolo navrstvených na 3ml separačné médium (PAA the cell culture company, Canada). Vzorka bola centrifugovaná, leukocyty prenesené do inej skúmavky, premyté a resuspendované v PBS. Na odstránenie leukocytov bol pridaný roztok na lyzáciu červených krviniek (0,87% NH₄Cl). Po 5 min. bol roztok leukocytov centrifugovaný a pelet buniek leukocytov trikrát premytý s PBS. Bunky leukocytov boli následne lyzované roztokom obsahujúcim 50 mM TRIS, 15 mM NaCl, 1 % TWEEN 20, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS, pH=7,4. Z lyzátu buniek boli vyražané proteíny roztokom 10% trichloroctovej kyseliny a acetónu. Koncentrácia proteínov bola stanovená Bradfordovou metódou.

2.2 Digescia proteínov v roztoku

Proteíny boli rozpustené (100 mM Tris-HCl a 8M močovina) a roztok proteínov bol redukovaný 0,1M DTT v 100 mM TRIS-HCl pH=8. Vzorka bola inkubovaná pri 37°C počas 30 minút. Po pol hodine bola alkylovaná 0,5 M jodoacetamidom v 100 mM TRIS-HCl pH=8. Roztok bol inkubovaný 30 minút pri 37°C v tme. Po inkubácii bolo pridané 5 násobné objemové množstvo ľadovo chladného acetónu. Po 60 minútach inkubácie pri -25°C bola vzorka centrifugovaná a pelet vysušený na vzduchu do nasledujúceho dňa. Pelet proteínov bol rozpustený v roztoku 8M močoviny v 100 mM TRIS-HCl pH=8, ktorý bol nariadený na 2M koncentráciu močoviny. Do vzorky bol pridaný trypsin a vzorka bola inkubovaná pri 37°C 6 hodín. Proces štiepenia bol zastavený pridaním 20 % TFA. Následne bola vzorka centrifugovaná a supernatant odsolený pomocou špičiek ziptip.

2.3 Odsolenie vzorky pomocou špičky Zip-Tip

Ziptipová špička bola koncentrovaná v ACN 1 deň. Nasledujúci deň bol do špičky nasatý ACN odstránený do odpadu. Tento postup bol zopakovaný. Špička bola ekvilibrovaná v 0,1% TFA. Roztok proteínov o vypočítanom objeme a presnej koncentrácii bol napipetovaný do mikroskúmavky. 10 krát boli nasávané a vypúšťané proteíny, aby boli naviazané do špičky (maximálne 5 ng proteínov). Soli boli odstránené premývaním špičky s 0,1% TFA. Premývanie bolo uskutočnené 2 krát. Do mikroskúmavky bol pridaný elučný roztok (voda/metanol/kys.mravčia = 49 %/ 50 %/ 1 %) a do tohto roztoku sa eluovali naviazané proteíny zo špičky. Približne 5 krát bol elučný roztok o 4μl natiahnutý do špičky a následne vysatý späť do roztoku. Celý postup od koncentrovania špičky v ACN až po elúciu proteínov sa zopakoval celkovo 4 krát, aby bola dosiahnutá koncentrácia 20 ng/20 μl. Roztok proteínov bol zriedený pomocou 0,1% kys. mravčej. Koncentrácia vzorky po riedení bola 20 ng/200 μl čiže 100 ng/μl. Vzorka bola ešte zakoncentrovaná na 1500 ng/μl analyzovaná pomocou iónovej pasce.

2.4 Stanovenie proteínov na iónovej pasci

Peptidy boli separované na nanoLC v 110 min. gradiente z 0 na 55% ACN, 0,1 % kyselina mravčia, 300 nl/min. Kolóna bola 75 μm, 150 mm (2 μm PepMap C₁₈ 100 Å, Dionex), prekoncentračná kolóna mala 75μm, 20 mm (3 μm, PepMap C₁₈). The ionová pasca Amazon speed ETD bola naladená s on line nano zdrojom *captive spray*. Akvizičné dáta boli namerané v Auto-MS/MS móde s nastavením 4 MS/MS precurzory pre 1 MS sken, v rámci aktívneho vylúčenia po zbere spektra boli vylúčené prekurzorové ióny s 1 nábojom. Hľadanie bolo uskutočnené v databáze SwissProt pomocou ProteinScape. Parametre pre Mascot 2.4 boli - tolerancia 0.5 Da, jeden ¹³C izotop, 0.8 Da MS/MS tolerancia, FDR (false discovery rate) bol nastavený na <1%.

3. Výsledky a diskusia

Z leukocytov sme vyizolovali proteíny, ktoré sme podrobili proteomickej analýze pomocou iónovej pasce. Identifikovali sme celkovo 230 proteínov, z ktorých až 166 mali skóre vyššie ako 80. Z týchto stanovených proteínov 80 bolo pre nás dôležitých, pretože boli priamo súčasťou buniek leukocytov alebo súviseli s imunitným systémom. V bunkách leukocytov bolo exprimovaných 14 proteínov, ktoré sú v Tab.1. Okrem týchto proteínov existujú aj také, ktoré sú exprimované iba v bunkách lymfocytov (Histon-lyzín N-metyltransferáza 2A) alebo len v jednom type buniek napr. v T lymfocytoch (FYN-viažúci proteín) alebo len v B lymfocytoch (B-bunkový proteín s ankyrinovým opakovaním).

Tab.1: Proteíny exprimované v bunkách leukocytov

	Názov proteínu	Skratka	Swiss-prot
1	myozín-9	MYH9	P35579
2	Fermitín rodinný homolog 3	URP2	Q86UX7
3	Glutathion S-transferáza omega-1	GSTO1	P78417
4	Proteínviažúci integrátor 2	BIN2	Q9UBW5
5	Antigén CD 31	PECA1	P16284
6	Nesprin-1	SYNE1	Q8NF91
7	Heparanáza	HPSE	Q9Y251
8	RAS guanyl-releasing proteín 4	GRP4	Q8TDF6
9	Proteín unc-13 homolog D	UN13D	Q70J99
10	proteín Wiskott -Aldrichovho syndromu 2	WASF2	Q9Y6W5
11	základný proteín obsahujúci variabilný mófiv imunoglobulínu	BIVM	Q86UB2
12	Nipped-B-like proteín	NIPBL	Q6KC79
13	Poly(rC)-viažúci proteín 1	PCBP1	Q15365
14	PDZ a LIM doménový proteín 7	PDLI7	Q9NR12

Keďže leukocyty sú bunky imunitného systému nie je prekvapujúce, že niektoré identifikované proteíny sa podieľajú na procesoch spojených s imunitným systémom (Tab.2).

Určité proteíny sú súčasťou receptorov signálnych dráh T a B buniek a iné sú zodpovedné za aktiváciu jednotlivých druhov lymfocytov. Určili sme tiež zopár proteínov, ktoré majú funkciu regulácie T bunkovej diferenciácie a proliferácie a B bunkovej diferenciácie a proliferácie. Stanovili sme niekoľko proteínov, ktoré zabezpečujú pohyb leukocytov medzi odlišnými tkanivami v organizme.

Tieto predbežné výsledky jasne ukazujú na možnosť študovať proteíny prostredníctvom proteomických metód. Štúdiom jednotlivých proteínov v bunkách leukocytov je možné získať dostatok informácií o ich funkciách. Dosiadnutím identifikácie všetkých proteínov v bunkách leukocytov môže byť vyriešených veľa biologických problémov (úloha chemokínov, adhezívnych molekúl, aktivácia imunitného systému).

Tab.2: Proteíny tvoriace súčasť imunitného systému

Funkcia	Názov proteínov
Imunitná odpoveď	CD29
	Transformujúci rastový faktor beta-1regulácie
	MHC triedy I antigén A*69
	MHC triedy I antigén B*18
	MHC triedy I antigén B*8
	Ig gamma-1 reťazec C regionu
	Ig kappa reťazec C regionu
	Aktín-related proteín 2/3 complex podjednotka 5,4,3,2
	F-aktín-capping proteín podjednotka alfa-1
	Klusterin
	Proteín teplotného šoku HSP 90-alfa a beta
	Kalmodulín
	Wiskott-Aldrich syndrom proteínovej rodiny member 2
	Cyklický AMP-závislý transkripčný faktor ATF-1
	cAMP-závislý proteín kinázy katalytická podjednotka beta
	Vitronektin
	Guanín-nucleotid zmenený faktor VAV3
Endoplazmín	

Skratky

ACN - acetonitril; DTT - ditiotreitol; EDTA - kyselina ethyléndiamintetraoctová; MS - hmotnostná spektrometria; NaCl - chlorid sodný; NH₄Cl - chlorid amónny; PBS - fosfátový tlmivý roztok; SDS - dodecylsírán sodný; TFA - trifluoroctová kyselina; TRIS - tris(hydroxymethyl)aminometán

Pod'akovanie

Publikácia vznikla na základe finančnej podpory Agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ pri riešení projektu s ITMS kódom: 26220220143 (100%).

4. Referencie

1. Barderas, M., Dardé, V., M., Durán, M.,C., Egido,J., Vivanco, F. (2007). Characterization of Circulating Human Monocytes by Proteomic Analysis. *Methods in Molecular Biology*, vol. 357, p. 319-328
2. Ganz, T., Lehrer, R. I. (1997). *Antimicrobial peptides of leukocytes. Curr. Opin. Hematol.* vol. 4, p.53–58
3. Garrett, R., Grisham, Ch. (2007). *Biochemistry*
4. Levy, O. (1996). *Eur. J. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. Haematol.* vol. 56, no. 5, p. 263–277
5. Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science*, vol. 296, no. 5566, p. 301–305.
6. Pancer, Z., Cooper, M.D. (2006). The evolution of adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*, vol. 24, no. 1, p. 497–518.
7. Tomazella, G.G., da Silva, I., Laure, H.J., Chammas, R. J.C, Wiker, H.G.,de Souza, G.A., Greene, L.J. (2009). Proteomic analysis of total cellular proteins of human neutrophils *Proteome. Science*,vol. 7, p.32

Neurochémia suicidálneho správania

Pálová E., Sabo J.

¹Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska Fakulta UPJŠ v Košiciach

*Korešpondujúci autor: E.Pálová, Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach, Trieda SNP1, 040 11 Košice
Tel: +421 918 790 069, e-mail: tasiik@gmail.com

Úvod

Samovražda je často označovaná ako porucha pudu sebazáchovy. Jedná sa o ukončenie vlastného života úmyselne a dobrovoľne. Podľa údajov WHO spácha ročne samovraždu vyše 1 milión ľudí. Výskumy naznačujú, že pravdepodobne existuje istá genetická predispozícia pre suicidálne správanie, a že táto predispozícia nemusí byť totožná s genetickou vulnabilitou pre depresívnu poruchu¹. Medzi významnejšie rizikové faktory suicidálneho správania patria okrem iných aj impulzivita a agresivita². Súčasný neurobiologický výskum samovraždného správania sa sústreďuje najmä na serotonínerný systém a jeho markery v mozgovo-miešnom moku^{1,3}. Patológia daného systému sa prejavuje prevažne redukovanou neurotransmisiou, alteráciou receptorov, a/alebo zmenou v neurónoch a gliových bunkách. Predpokladá sa, že u jedincov so suicidálnym správaním dochádza k zmene v oblasti PFC (prefrontálneho kortexu), kde prebieha exekutívny rozhodovací proces. Zdravý mozog je schopný nájst alternatívne riešenie pre ťažkú životnú situáciu, mozog s deficitom v PFC však nenájde dôvod, prečo samovraždu nevykonať⁴.

Vyše 90 % samovrahov alebo jedincov, ktorí sa o samovraždu pokúsili, majú diagnostikovateľnú psychiatrickú poruchu, a to najčastejšie poruchu nálady¹¹. U psychiatrických pacientov, ktorí dokonali samovraždu, malo zhruba 60% poruchu nálady, zvyšné diagnózy boli najmä schizofrénia, alkoholizmus, drogové závislosti a poruchy osobnosti¹¹. Väčšina prác ohľadom suicidalite alebo samovraždného správania preto zahŕňa skupiny depresívnych pacientov s kontrolnou skupinou zdravých jedincov resp. neliečených pacientov. Aj preto je ťažké určiť, či zistené zmeny možno pripísať suicidalite alebo depresívnej poruche, ktorá k suicidálnemu správaniu môže viesť.

Neurochémia suicidalite

1. Sérotonínerný systém

Serotonín je jednou z najstarších biologicky aktívnych látok, prítomný od eukaryotických buniek, cez huby, rastliny až po cicavce. Distribúcia 5-HT v organizme človeka je prevažne v gastrointestinálnom trakte, pľúcach, srdci, pankrease, krvných cievach a trombocytoch, čo predstavuje približne 90%⁶. Zvyšné relatívne malé

množstvo 5-HT sa nachádza v centrálnom nervovom systéme (CNS). Väčšina tiel sérotonínerných neurónov je v CNS prevažne lokalizovaná v nucleii raphé v rámci formatio reticularis v mozgovom kmeni⁵. Biologická štúdia obetí samovraždy poukazuje na zvýšené množstvo sérotonínerných neurónov v dorzálnom nuceus raphé v porovnaní s kontrolnou skupinou¹³.

Existuje niekoľko sérotonínových receptorových rodín. Výskumy sa v súčasnosti sústreďujú na receptorové rodiny 5-HT₁ a 5-HT₂. Pri podtype 5-HT_{1A}, sa zistilo, že agonisti tohto receptora oslabujú ofenzívno-agresívne správanie u zvierat v experimentálnych modeloch⁷. To pravdepodobne reflektuje anxiolytický efekt 5-HT_{1A} autoreceptora, ako aj úlohu anxiety ako primárneho „spúšťača“ agresívnej dopovede⁵. Postsynaptické sérotonínové 5-HT_{1A} a 5-HT_{2A} receptory sú podľa výsledkov niektorých štúdií v PFC oblasti samovrahov upregulované. Môže sa jednať o kompenzačnú odpoveď na nízku aktivitu sérotonínerných neurónov v danej oblasti¹². Cervantes et al.¹⁵ predpokladajú, že antagonisti receptorovej rodiny 5-HT₃ dokážu redukovať agresivitu. Výskumy 5-HT receptorov však v súčasnosti majú skôr inkonzistentné výsledky a vyžadujú tak dôkladnejšie preskúmanie.

Syntéza 5-HT závisí od enzýmu tryptofán hydroxylázy (TPH), ktorá má u človeka dve izoformy: TPH₁ sa nachádza prevažne v periférnych tkanivách, TPH₂ je predominantne v CNS. V prípade, že sa opierame o teóriu že dochádza k dysbalansu sérotonínového metabolizmu u suicidálnych pacientov a množstvo sérotonínu a jeho metabolitov je tak znížené, mohlo by sa jednať o zníženú aktivitu TPH₂. Boldrini et al.¹⁴ zistili, že koncentrácia TPH₂ je v nucleii raphe v mozgovom kmeni zvýšená u suicidálnych pacientov s depresívnou poruchou. Predpokladajú, že by tento nárast mohol byť istým kompenzačným mechanizmom na základe nízkej koncentrácie sérotonínu v danej oblasti, resp. nízkej aktivity samotnej hydroxylázy.

Kovacic et al.¹⁶ sa zamerali na úlohu trombocytov, v ktorých zistili zníženú koncentráciu serotonínu u suicidálnych pacientov. Je otázne, či trombocyty v periférnej krvi reflektujú sérotonínerný metabolizmus v CNS, viaceré výskumy však naznačujú možnosť istej podobnosti. Medzi spoločné charakteristiky patrí napríklad to, že trombocyty aj serotonínové nervové zakončenia sú embryologicky odvodené z neurálnej lišty a obe obsahujú 5-HT_{2A} receptory, MAO typ B a serotonínový transportér (SERT). Trombocyty skladujú sérotonín intracelulárne vo vezikulách, avšak nie sú schopné ho syntetizovať²⁵. Rao et al.²⁶ porovnával 45 suicidálnych psychiatrických pacientov (s poruchami nálady, schizofréniou, poruchou prispôsobenia) s 20 zdravými kontrolami, pričom v prvej skupine pacientov zistil signifikatne vyššie množstvo väzobných miest (B_{max}) pre 5-HT_{2A} receptory na trombocytoch a taktiež nižšiu hladinu sérotonínu v ich krvi.

Prvotnú prácu o zníženej hladine 5-HIAA (5-hydroxy-indoloctová kyselina) v mozgovo-miešnom moku uverejnila Mary Åsberg et al. už v roku 1976²⁷. Nasledovalo mnoho ďalších prác, ktoré potvrdzovali tento jej nález a doplnili ho ešte o negatívnu

koreláciu medzi 5-HIAA v mozgovo-miešnom moku a úmrtnosťou na suicidálny pokus²⁸. Podľa týchto zistení predikuje biochemická stopa t.j. nízka hladina 5-HIAA v mozgovo-miešnom moku budúce TS a suicídium samotné^{29,30}.

2. Katecholamínerný systém a ďalšie neurotransmitterové systémy

Medzi hlavných zástupcov katecholamínov patria adrenalín, noradrenalín a dopamín. Hlavné receptory noradrenalínu sú klasifikované do tried α a β . Každá trieda má viacero podtypov. Výskum Aranga et al.²² zistil zvýšenú koncentráciu noradrenalínu spolu so zníženými $\alpha 2$ -adrenergými receptorovými väzbami v PFC u obetí samovraždy.

Escriba et al.²³ zaznamenali signifikantné zvýšenie počtu $\alpha 2$ -adrenergých receptorov v hippocampe a vonkajších vrstvách frontálneho kortexu u obetí samovraždy. Iná štúdia však poukazuje na zníženie počtu $\alpha 2$ -adrenergých receptorov v oblastiach PFC u samovrahov so syndrómom závislosti od alkoholu²⁴.

Dopamínerný systém je preskúmaný oveľa menej, doposiaľ bolo publikovaných iba zopár štúdií skúmajúcich jeho vzťah k suicidálnej problematike. Zmeny dopamínu alebo jeho hlavného metabolitu kyseliny homovanilovej (HVA) skúmal Sher et al.²⁵ a zistil, že koncentrácia HVA v mozgovo-miešnom moku bola znížená u depresívnych pacientov, ktorí vykonali suicidálny pokus (TS) v porovnaní s depresívnymi pacientmi bez suicidálneho pokusu. Toto zistenie poukazuje na fakt, že metabolizmus HVA môže mať súvis so suicidálnym správaním bez ohľadu na prítomnosť depresívnej poruchy.

V PFC sa nachádzajú podtypy GABA (kyseliny γ -aminomaslovej) interneurónov a pyramídových glutamátergných neurónov, ktoré sú prepojené s dopamínerným systémom. Analýzy vzoriek mozgového tkaniva post mortem poukazujú aj na GABAergnú a glutamátergnú transmisiu, ktorá môže hrať úlohu v neurobiológii samovrážd⁸. Kékesi et al.⁹ zistili pomocou proteomickej analýzy post mortem vzoriek mozgovej oblasti PFC a amygdaly zmeny v proteínoch cytoskeletového systému, ktoré sú funkčne prepojené s GABA, glutamátovým a serotonínovým receptorom. Napriek zisteniam, že dopamínerný systém funguje abnormálne pri depresii, existuje len málo výskumov, ktoré by potvrdili jeho význam v neurobiológii samovrážd.

Katecholamínerná dysfunkcia môže hrať úlohu v samovražednom správaní. Výsledky niektorých štúdií poukazujú na zvýšenie počtu, alebo snáď väzby na $\alpha 2$ -adrenergé receptory. Je však nevyhnutné hlbšie preskúmať danú problematiku, nakoľko štúdie ostatných neurotransmitterových receptorov, resp. metabolitov ukazujú skôr inkonzistentné výsledky, než priame závery.

3. Neuroimunitný systém

Stres zvyšuje citlivosť na infekciu, autoimunitné ochorenia a viaceré štúdie predpokladajú, že je možné pomocou stresu vyvolať imunosupresiu¹⁹. Janelidze et al.²⁰ určoval hladinu prozápalových cytokínov v plazme suicidálnych depresívnych pacientov versus depresívnych pacientov bez známk suicidálneho správania. Zistil, že hladina cytokínov IL-6 a TNF- α boli významne zvýšené v skupine suicidálnych pacientov v porovnaní s kontrolnou skupinou. Na základe týchto výskumov je možné

predpokladať, že prozápalové cytokíny môžu hrať úlohu v neurobiológii samovraždy. Pandey et al.²¹ skúmal prozápalové cytokíny u mladých obetí samovraždy a sústredil sa najmä na oblasť PFC. Vo svojom výskume pozoroval významné zvýšenie proteínov a mRNA prozápalových cytokínov, TNF- α , IL-1 β a IL-6 v PFC (BA-10).

4. Zobrazovacie techniky

V súčasnej dobe došlo k zdokonaleniu zobrazovacích techník natoľko, že je možné sledovať funkciu mozgu in vivo. Prehľadová práca C. van Heeringena¹⁷ et al. poukazuje na zmeny v "suicidálnych mozgoch" najmä v orbitofrontálnej a dorzolaterálnej oblasti PFC. Predpokladá sa, že tieto zistené odchýlky môžu viesť k neuropsychologickým poruchám v schopnosti rozhodovať sa a schopnosti riešenia problémov. Heeringen predpokladá, že v dôsledku týchto zmien (na štrukturálnej až biochemickej úrovni) má suicidálne správanie tri hlavné charakteristiky: 1. špecifickú zraniteľnosť na odmietnutie spoločnosťou, 2. výber možnosti s okamžitou vysokou odmenou a 3. znížená schopnosť predstaviť si pozitívne udalosti v budúcnosti¹⁷. Wagnera kol. poukazujúv svojej práci na stenčenie mozgovej kôry najmä v dorzolaterálnej, ventrolaterálnej oblasti PFC a v prednom cingule u pacientov s depresívnou poruchou a vysokým rizikom samovražedného správania v porovnaní so zdravými kontrolami¹⁸. Iný výskum poukazuje na fakt (pomocou PET), že pri zvýšenej suicidálnej ideácii je u depresívnych pacientov v PFC oblasti znížený metabolizmus¹⁰.

Záver

V prípade, že by bolo možné identifikovať niektoré biomarkery suicidálneho správania, bolo by snád' možné stanoviť riziko suicidality už pri preventívnom vyšetrení, efektívnejšie zachytiť takýchto pacientov a v konečnom dôsledku zahájiť aj efektívnejšiu liečbu. Z biomarkerov, ktoré by mohli priamo súvisieť s neurobiológiou samovraždy, sa v súčasnosti ako sľubné do budúcnosti javia najmä sérotonínerné metabolity, ako 5-HIAA (5-hydroxy-indoloctová kyselina) v mozgovo-miešnom moku, množstvo serotonínu v trombocytoch, ako aj ich receptory 5-HT_{2A} v periférnej krvi. Ak by sa napríklad dokázala súvislosť medzi hodnotami 5-HIAA v mozgovo-miešnom moku a serotonínom a jeho receptormi v trombocytoch na periférii, mohli by sa otvoriť nové možnosti na vytvorenie vhodnej skrínigovej metódy.

V súčasnosti už takmer neexistujú pochybnosti o tom, že pri suicidálnom správaní dochádza k istým poruchám v neurobiologických systémoch, a to ako na úrovni štrukturálnej, tak aj molekulovej. Na identifikáciu predisponujúcich faktorov je však potrebné dôkladnejšie preskúmanie danej problematiky.

Pod'akovanie

Publikácia vznikla na základe finančnej podpory Agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ pri riešení projektu s ITMS kódom: 26220220143 (100%).

Literatúra

1. Turecki G., Suicidal behaviour: is there a genetic predisposition? *Bipolar Disorder* 3:335-349 (2001)
2. Koller G., et al., Impulsivity and aggression as predictors of suicide attempts in alcoholics. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 252:155-160 (2002)
3. Brunner J., et al., Neurobiological correlates of suicidal behaviour. *Fortschr Neurol Psychiatr* 67:391-412 (1999)
4. Underwood M., D., Arango V., Evidence for Neurodegeneration and Neuroplasticity as Part of the Neurobiology of Suicide, *Biol Psychiatry* 70:306-307 (2011)
5. Cirillo C., et al., Role of serotonin in gastrointestinal physiology and pathology. *Minerva Endocrinol* 36:311-324
6. Lopez-Mendoza D., et al., Combined effects of gepirone and (+) WAY 100135 on territorial aggression in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 61:1-8
7. Sequeira A., et al., Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. *PLOS One* 4: e6585 (2009)
8. Kékesi K., A., et al., Altered Functional Protein Networks in the Prefrontal Cortex and Amygdala of Victims of Suicide, *PLOS One* 7: e50532 (2012)
9. Jimenez-Trevino L., et al., Endophenotypes and suicide behavior, *Actas Esp Psiquiatr* 39: 61-69.
10. Beautrais A., L., et al., Prevalence and comorbidity in mental disorders in persons making serious suicide attempts: A case-control study *Am J Psychiatry* 153:1009-1014 (1996)
11. Mann J. J., Neurobiology of suicidal behaviour, *Nature Reviews - Neuroscience*, Vol. 4:819-826 (october 2003)
12. Underwood M., D., et al., Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims. *Biol Psychiatry* 46:473-483 (1999)
13. Boldrini M., et al., Increased tryptophan hydroxylase concentration in the brainstem raphe nuclei of depressed suicide victims compared to controls, *American College of Neuropsychopharmacology 40th Annual Meeting*, 70 (2001)
14. Cervantes M., C., et al., Differential responses to serotonin receptor ligands in an impulsive-aggressive phenotype, *Behav Neurosci* 124:455-469
15. Kovacic Z., et al., Platelet serotonin concentration and suicidal behavior in combat related posttraumatic stress disorder, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 32:544-551 (2008)

16. Heeringen C., et al., Suicidal brains: A review of functional and structural brain studies in association with suicidal behavior, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35:688-698 (2011)
17. Wagner G., et al., Prefrontal cortical thickness in depressed patients with high-risk for suicidal behavior, *Journal of Psychiatric Research* 46:1449-1455 (2012)
18. Leonard B., E., Stress, depression and the immune system, *Stress Medicine* 16:133-137 (2000)
19. Janelidze S., et al., Cytokine levels in the blood may distinguish suicide attempters from depressed patients, *Brain Behaviour and Immunity* 105:751-756 (2011)
20. Pandey G., N., et al., Proinflammatory cytokines in the prefrontal cortex of teenage suicide victims, *Journal of Psychiatric Research* 46:57-63 (2012)
21. Arango V., et al., Quantitative autoradiography of alpha 1- and 2 adrenergic receptors in the cerebral cortex of controls and suicide victims, *Brain Research* 630:271-282 (1993)
22. Escriba P., V., et al., Increased mRNA expression of alpha2A-adrenoreceptors, serotonin receptors and mu-opioid receptors in the brains of suicide victims, *Neuropsychopharmacology* 37:442-447 (2004)
23. Underwood M., D., et al., Serotonergic and noradrenergic neurobiology of alcoholic suicide, *Alcohol Clin Exp Res* 28:57S-69S (2004)
24. Owens M., J., Ritchie J., C., *Clinical neurochemistry in neurobiology of mental illness*, London: Oxford University Press (1999)
25. Rao M., L., et al., Upregulation of the platelet serotonin_{2A} receptor and low blood serotonin in suicidal psychiatric patients, *Neuropsychobiology* 38:84-89 (1998)
26. Åsberg M., et al., *5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? Arch Gen Psychiatry* 33:1193-1197 (1976)
27. Bondy B., Zill P., *Neurobiology of suicide, Nucleid Acids and Molecular Biology, Vol. 23, Molecular Biology of Neuropsychiatric Disorders*, P:205-227 (2009)
28. Cooper S., J., et al., 5-Hydroxyindolacetic acid in cerebrospinal fluid and prediction of suicidal behaviour in schizophrenia, *Lancet* 340:940-941 (1992)
29. Nordström P., et al., CSF 5-HIAA predicts suicide risk after attempted suicide, *Suicide Life Threat Behav* 24: 1-9 (1994)