

Dešifriranje proteoma raka z analitičnimi metodami

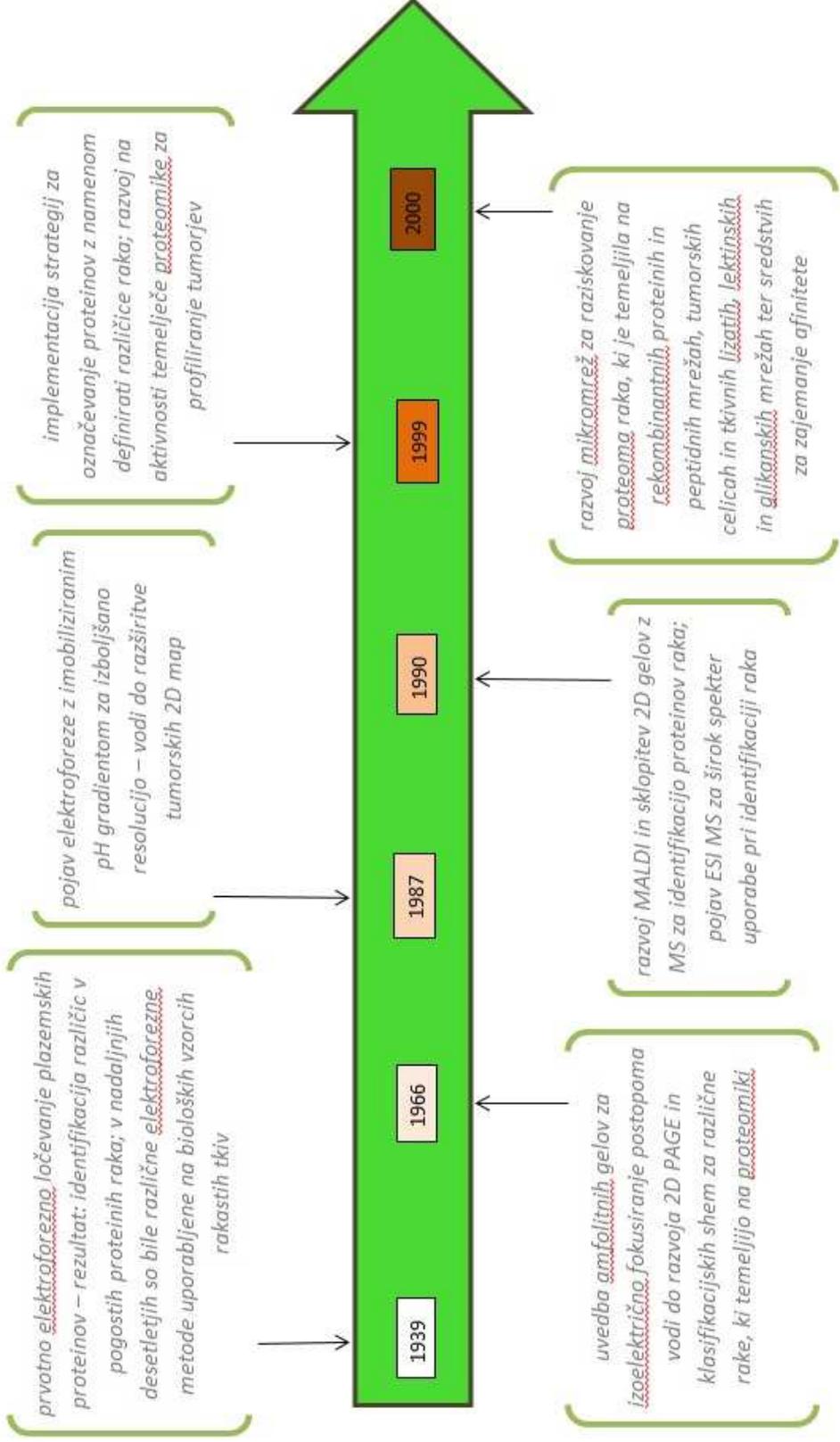
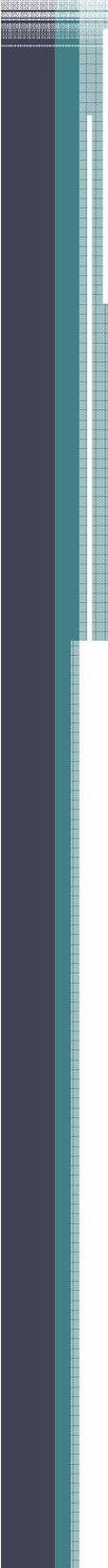
(članek: S. Hanash in Ayumu Taguchi: The grand challenge to decipher the cancer proteome)

Jana Verbančič,
Špela Pohleven,
Maja Remškar



Proteom in proteomika

- **PROTEOM:** skupek vseh proteinov in proteinskih oblik (vključno z modifikacijami, izooblikami, ...), ki jih nek organizem proizvede tekom življenja. Istim celicam oz. organizmom se proteom spreminja glede na zdravstveno stanje, vplive iz okolice (npr. stres), določen čas (npr. starost) itd.
- **PROTEOMIKA:** ukvarja se s proučevanjem celotnih sistemov proteinov, pri tem pa veliko pripomorejo tehnike, ki omogočajo analizo proteinov v kompleksnih bioloških vzorcih.
- *proteom raka: vsi proteini, ki so kakorkoli povezani z rakom (z njegovim razvojem, metaboličnimi potmi, ...)



Začetek - 1D elektroforeza

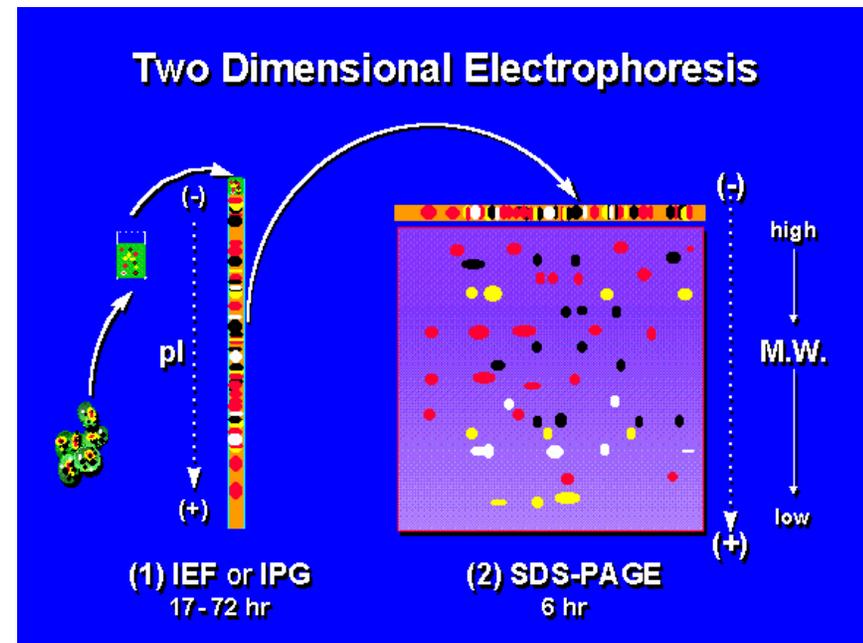
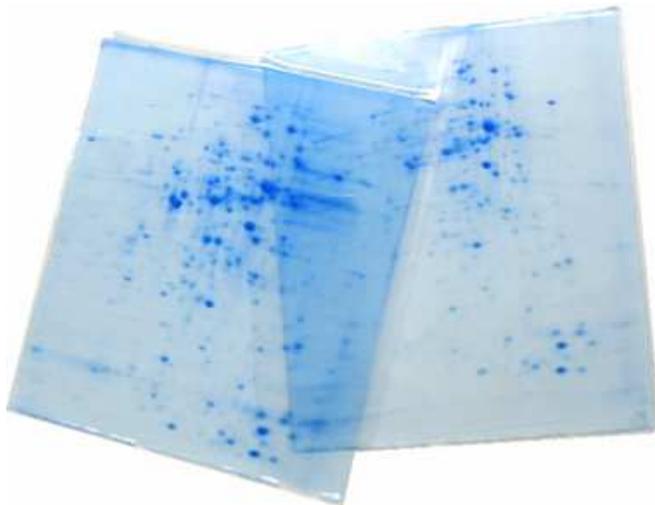
- škrobna gelska elektroforeza: nativna - nedenaturirani proteini se ločujejo glede na naboj in velikost
- detekcija glavnih lis (najbolj pogostih proteinov) v serumu in plazmi z 1D elektroforezo – primer študije mieloma in makroglobulinemije pred ~50 leti



slika: Hanash, Taguchi: The grand challenge to decipher the cancer proteome

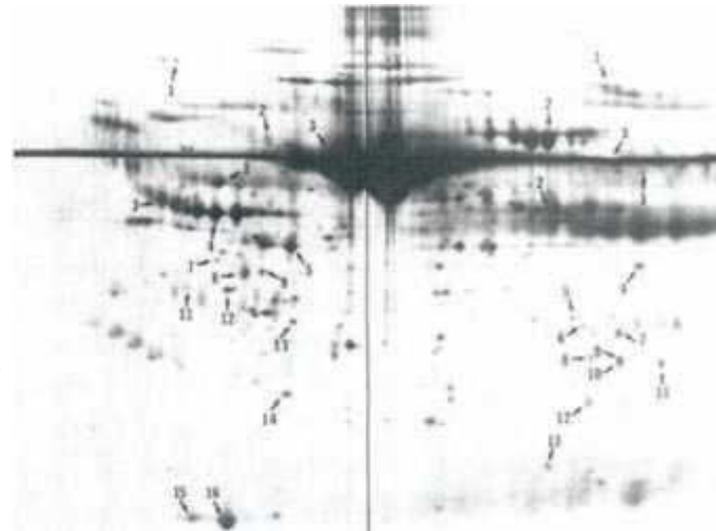
2D PAGE

- sestavljena iz dveh delov:
 - izoelektirčno fokusiranje (IEF)
 - SDS PAGE



2D PAGE

- študije z 2D PAGE so pokrile skoraj vse vrste raka – širok obseg uporabe (identifikacija veliko novih proteinov, delitev na novo odkritih proteinov v skupine) –> vzpostavitev baz podatkov
- akutna limfoblastna levkemija (413 proteinov)
- rak na mehurju (sistematična analiza – baza podatkov, ki vključuje proteinsko izražanje; identifikacija markerjev)

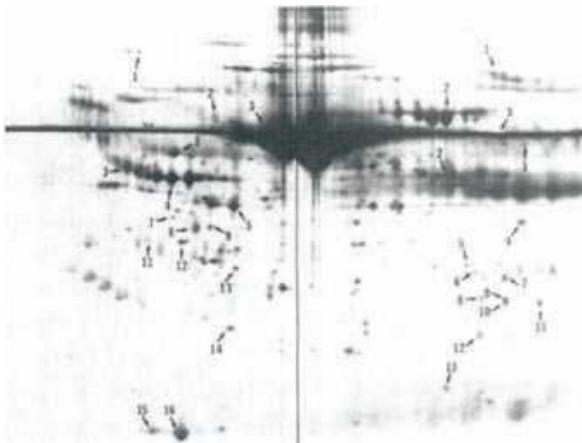


slika: Hanash, Taguchi: The grand challenge to decipher the cancer proteome

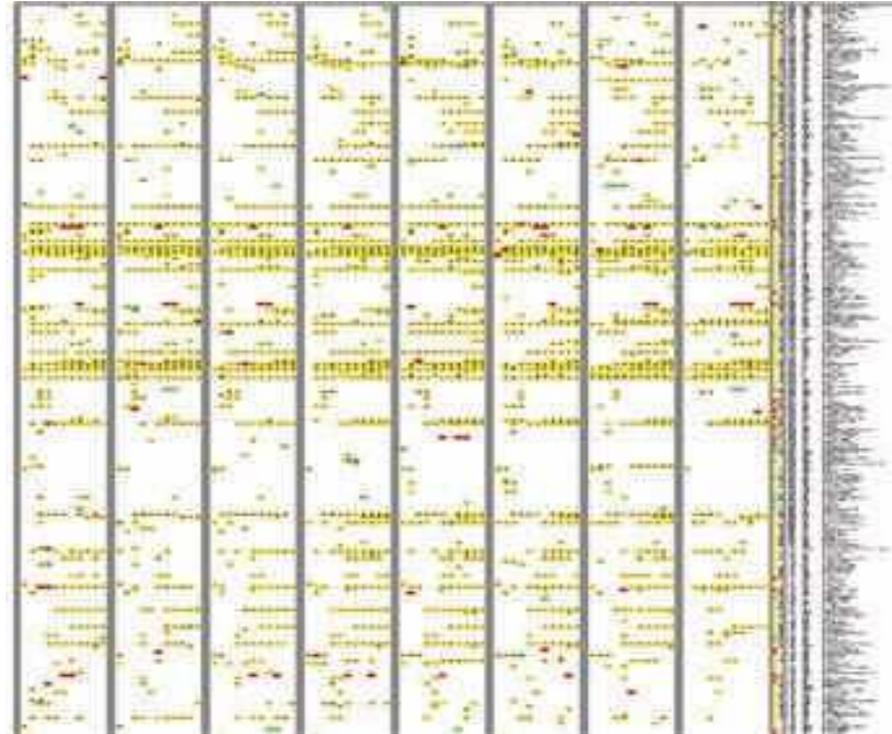
Izoliranje proteomskih tehnologij



1D elektroforeza



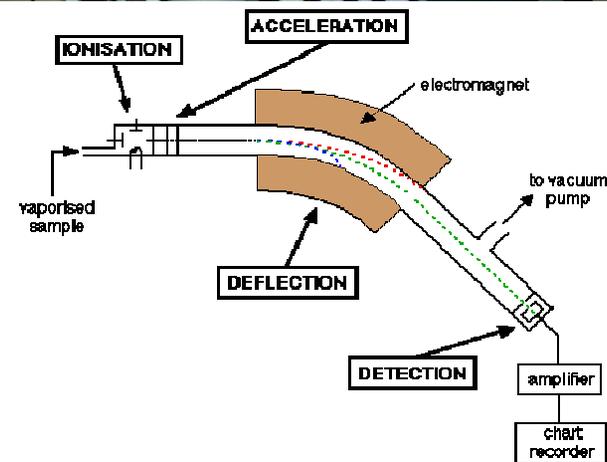
2D elektroforeza



LC-MS/MS

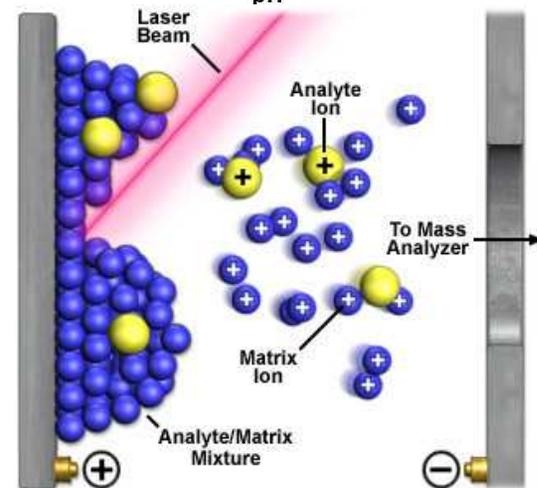
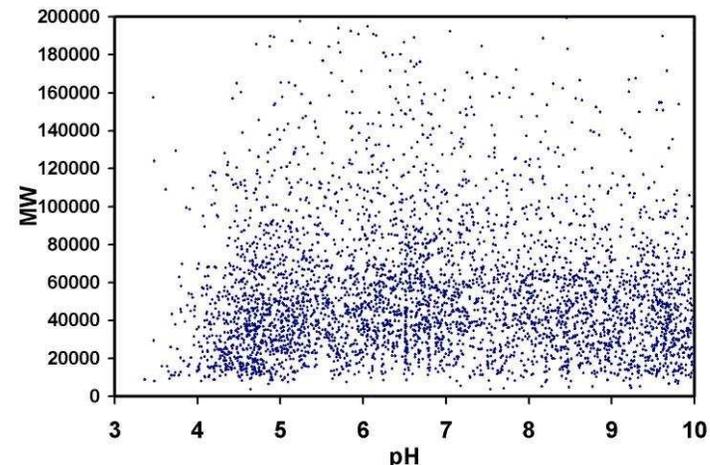
Masna spektrometrija

- Masni spektrometri:
 - vir ionov, ki proizvaja ione iz vzorca
 - masni analizator, ki ločuje ione glede na njihovo razmerje med maso in nabojem
 - detektor, ki zazna ione.
 - komponente v vzorcu → ioni → → analiza na podlagi njihovega m/z .
- Napredek je odvisen predvsem od razvoja instrumentov.



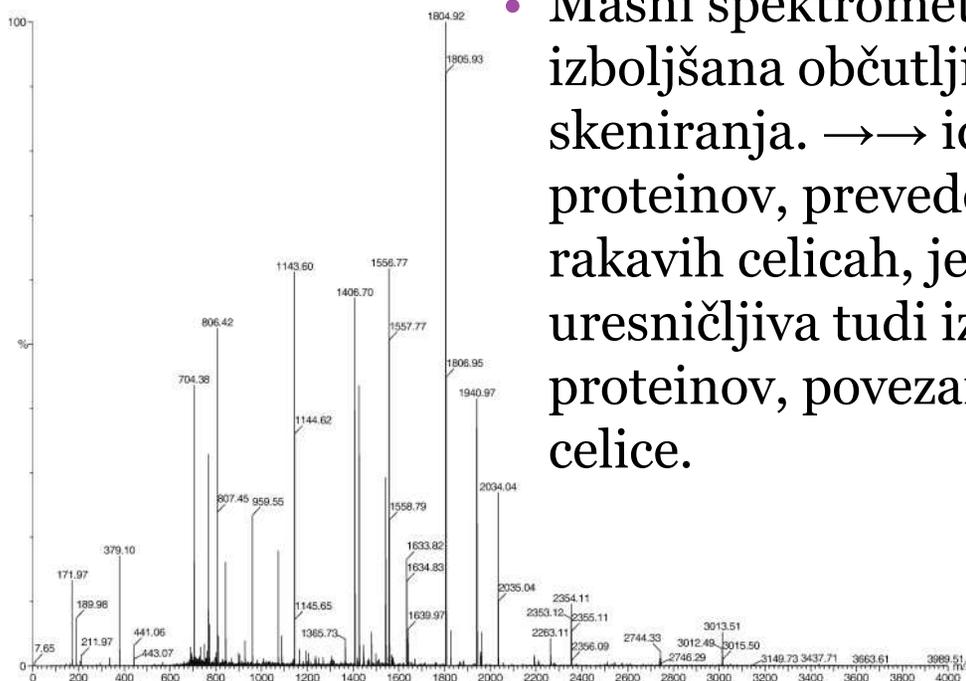
Masna spektrometrija

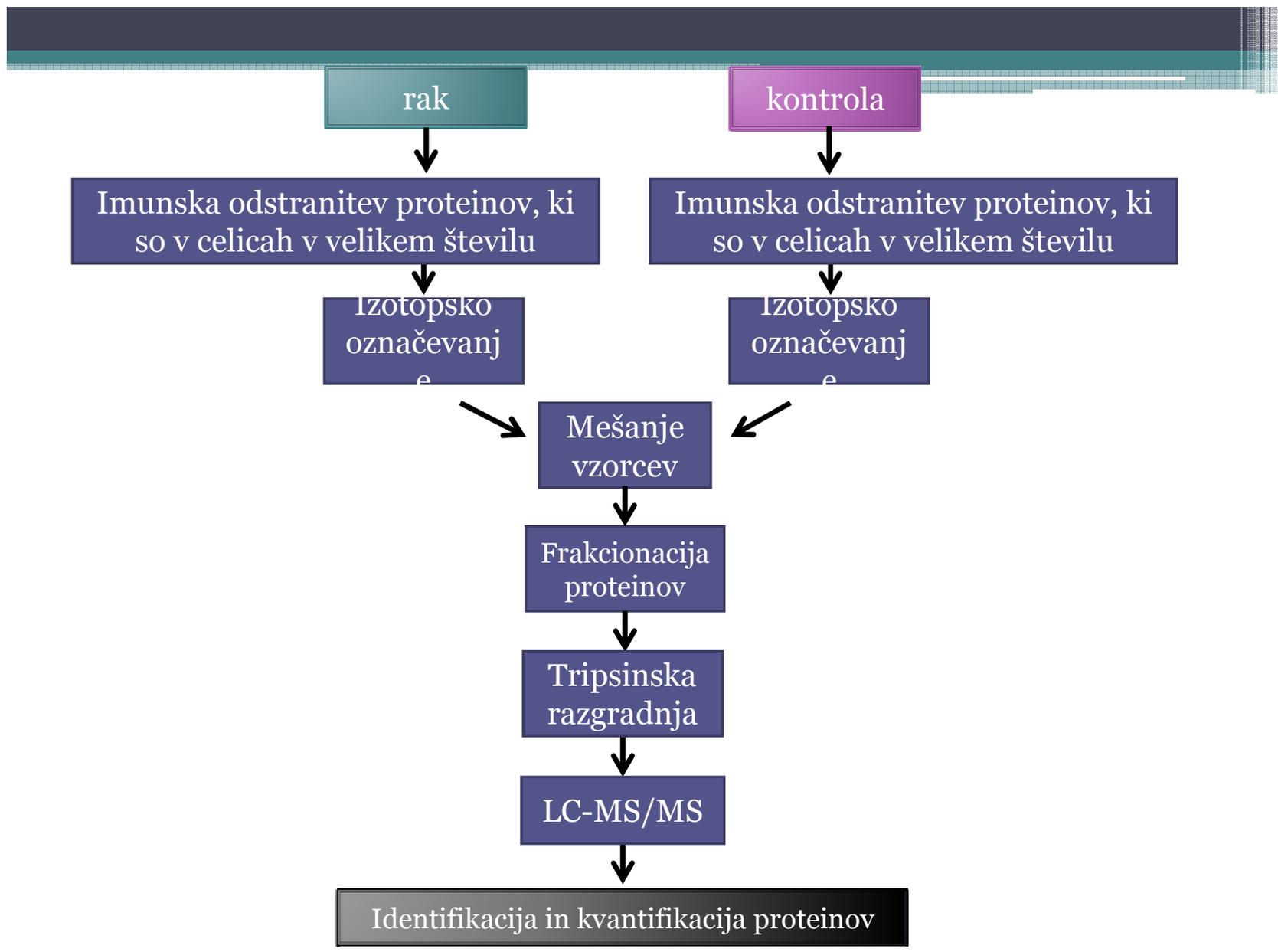
- Zgodnja uporaba MS: identifikacija proteinov v 2D gelskih ekstraktih celic.
- Učinkovito sredstvo za pridobitev peptidnih prstnih odtisov mase za proteine.
- Razvoj MALDI: lahko proteinske lise ali črte izrezali iz gelov in proteine prenesli na MALDI MS za identifikacijo.
→ 2D zemljevidi za različne vrste raka.



Masna spektrometrija

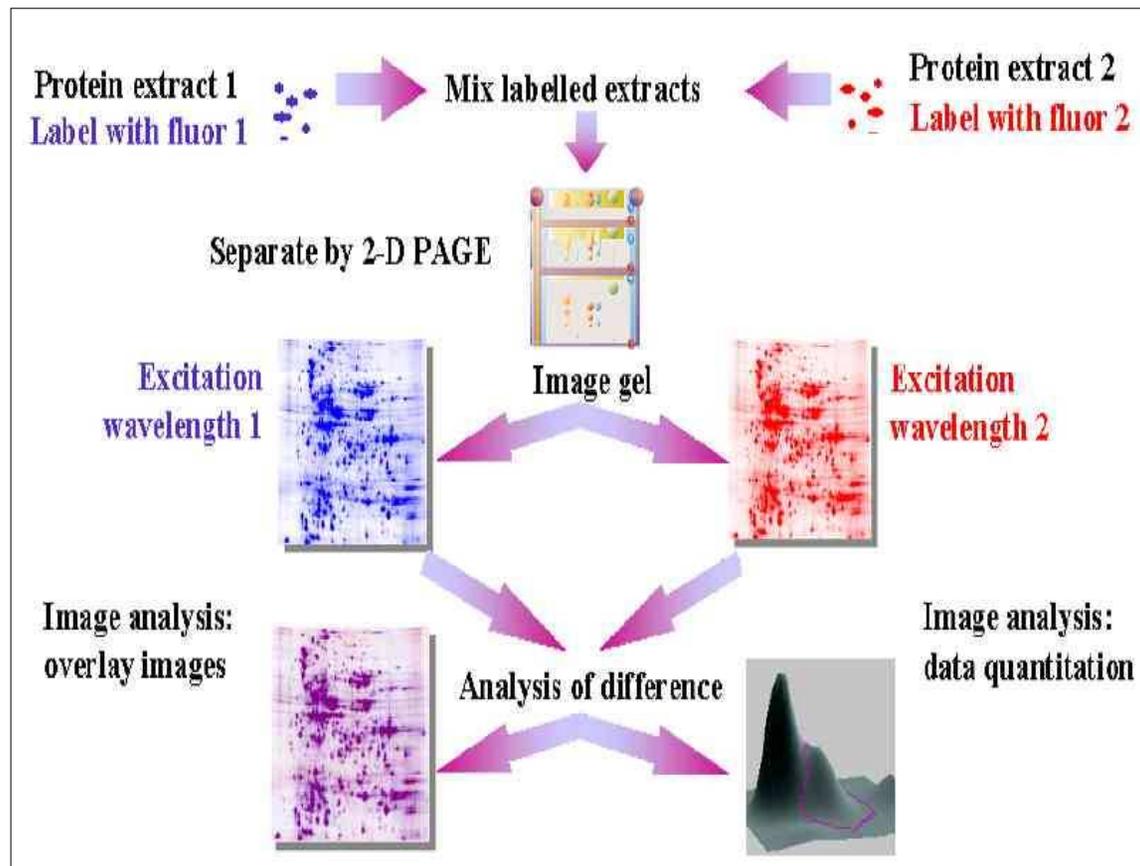
- ESI MS → kvantitativna analiza vse večih proteinov iz celic, tkiv in bioloških tekočin.
- Masni spektrometri danes → močno izboljšana občutljivost ter hitrost skeniranja. →→ identifikacija skoraj vseh proteinov, prevedenih iz izraženih genov v rakavih celicah, je postala dosegljiva. + uresničljiva tudi izčrpna identifikacija proteinov, povezanih z določenimi predeli celice.





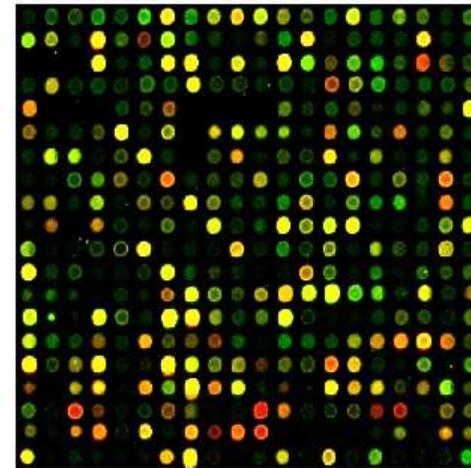
DIGE

- Proteini - 2D PAGE, MS, DIGE.
- DIGE (difference gel electrophoresis)
 - Oblika gelske elektroforeze
 - Vzorci fluorescentno označeni – zmešani – 2D PAGE – analiza
- Opredelili so proteine za razvrstitev 42 celičnih linij, glede na stopnjo diferenciacije.



Proteinske mikromreže

- Odlična alternativa za MS
- Uporaba:
 - za profiliranje izražanja proteinov
 - za determinacijo interakcij proteinov in peptidov z zdravili, majhnimi ligandi in drugimi biomolekulami, npr. z drugimi proteini in avtoprotitelesi za tumorske antigene
- Imobilizacija proteinov na površino čipa, dodatek s fluorescenco označenih sond – fluorescentni signal



Primer proteinske mikromreže

Povezovanje glikomike in proteomike

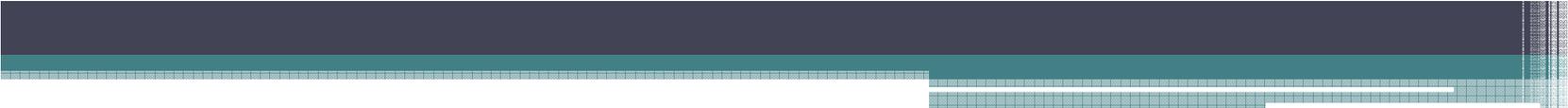
OBETAJOČE PODROČJE RAZISKOVANJA

- Glikoproteini – afiniteta za lektine; sledi analiza z MS
- Glikoproteini, izjemno bogati s potencialnimi diagnostičnimi markerji raka

PRIMERI:

Vrsta raka		Primer
Adenokarcinom pljuč	Odkritje proteinov selektivnih za raka	plazemski kalikrein 1 (KLKB1) inter- α -tripsin inhibitor teške verige 3 (ITIH3)
Rak debelega črevesa	Diferenciacija celic – sprememba glikozilacije	30 tarčnih proteinov N-acetilglukozaminil-transferaze V (GNTV)

- Abnormalna glikozilacija TIMP1 je zmanjšala inhibicijo MMP2 in MMP9, ter sovpadala z invazijo in metastazo rakastih celic *in vivo* in *in vitro*



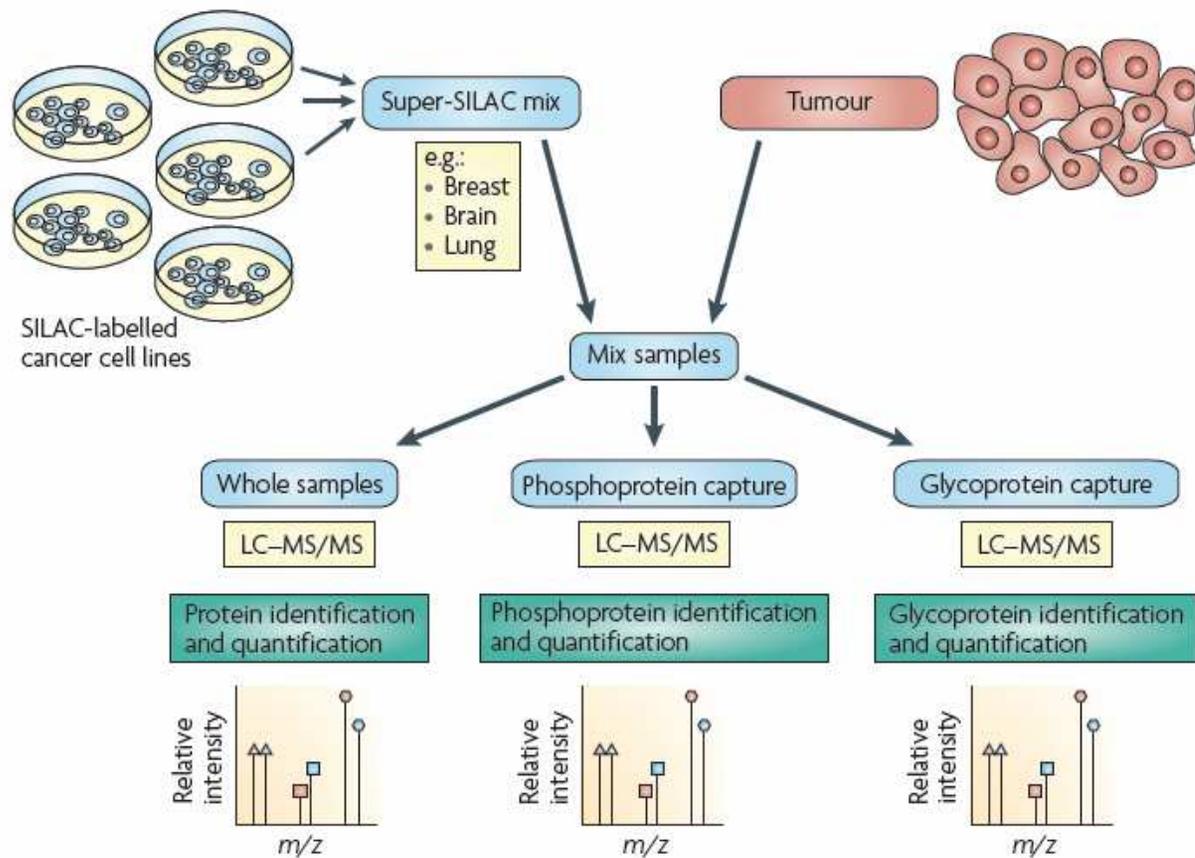
Profiliranje proteoma raka v tumorjih

- dešifriranje signalnih poti, identifikacija znakov pomembnih pri iniciaciji tumorja, invaziji in metastazah, ter odkritju biomarkerjev
- Metode: SILAC in kvantitativna MS

Študija celic raka debelega črevesa:

- povečana fosforilacija tirozinov 136 proteinov vpliva na ekspresijo SRC (protoonkogen tirozin kinaza)
- SRC fosforilira tirozin kinaze (SYK, EPHA2, SGK223, FAK, MET), ki so potrebne za invazivno aktivnost SRC

- 
- Pljučni rak: KRAS in EGFR
 - Fosforilacija tirozinov, SILAC, kvantitativna MS – celična linija HBEC in človeškega pljučnega adenokarcinoma
 - Izražen vsaj en mutiran alel EGFR ali mutiran KRAS alel
 - Več fosforilacije v HBEC z mutiranim EGFR kot v HBEC z mutiranim KRAS in normalnim EGFR
 - Diferencialna fosforilacija proteina: gefitinib (EGFR inhibitor)



Kvantitativno profiliranje proteinov v tumorskem tkivu s SILAC strategijo

Kroženje biomarkerjev

- Izdelava kataloga izločenih proteinov izraženih v rakastih celicah
- Proteini v mediju - povezani z adhezijo celic
- Iskanje biomarkerjev resistantnih na zdravilo
 - Set proteinov, ki se odzivajo na gefitinib in tistih, ki se ne
- Napisali so algoritem za paciente z NSCLC– proteomska analiza seruma, zdravljenje z EGFR inhibitorjem
- Algoritem je bil uspešen

ANALIZA MEDIJEV:

Vrsta raka	Št. proteinov
Rak na pljučih	1830
Rak na ovarijih	6400
Rak pankreasa	145

PRIMERI:

Protein	Status
RBAP46 – retinoblastoma vezavni protein 7	Prekomerno izražen v mediju, v tumorskem tkivu, serumu pacientov
Aktivacijski peptid vezavnega tkiva III (CTAPIII)	V višjih koncentracijah pri pacientih z rakom

koncentracija zmanjšana po izrezu tumorja





Izraba imunskega odziva pri zdravljenju raka

- avtoprotitelesa kot biomarkerji za zgodnjo diagnozo raka
- uspešno že pri pljučnem raku (avtoprotitelesa odkrili do 5 let pred razvojem tumorja!) – zelo natančna in zanesljiva metoda
- prihodnost: odkrivanje protiteles in odkrivanje tumorskih antigenov, ki inducirajo avtoprotitelesa pri pljučnem raku, raku trebušne slinavke, raku dojk
-> različna reaktivnost na ploščicah z antigeni (metoda proteinskih mikromrež) – s tem lahko ločimo med zdravimi in obolelimi celicami, prav tako pa tudi med različicami enake vrste raka

EarlyCDT -Lung

Find lung cancer at its earliest stages.



> 0 MM

8 MM

40 MM

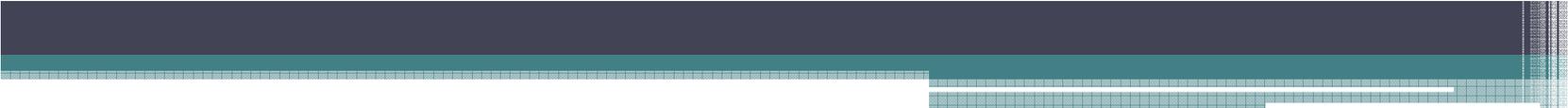
100 MM

Potentially detectable
by the *EarlyCDT-Lung*
blood test / 5-year survival
greater than 50%

Clearly visible
by CT Scan

Physical symptoms
present / 5-year survival
rate as low as 4%

Likely fatal



Perspektive

- **problemi:**
 - velika količina informacij, ki jih je treba urediti in prenesti v baze podatkov
-> BIOINFORMATIKA!
 - kompleksnost proteoma in potencial za različice na več nivojih raka
- **izziv:**
 - razviti nove diagnostike za ugotavljanje raka, ki temeljijo na uporabi proteomskih tehnologij za plazemski proteom

Takšen izziv bi vključeval:

- analizo plazemskih proteinov pri osebah, pri katerih so kasneje diagnosticirali raka in so bile del velike populacijske generacije za identifikacijo proteinov, ki bi lahko napovedali začetek rizika za glavne vrste raka;
- analizo komponent plazemskih proteinov med na novo diagnosticiranimi osebami z rakom, da bi lahko pojasnili podskupine, ki doprinašajo informacije o določenih celičnih linijah in signalnih poteh, ki vodijo razvoj raka, napredovanje in odziv na tarčne terapije;
- določitev proteinskih podskupin, ki se spreminjajo z biološkimi parametri – starost, spol in narodnost;
- določitev proteinskih podskupin, ki se spreminjajo s prehrano in skupno izpostavljenostjo, še posebej tobačnemu dimu;
- razvoj znanstvenih baz podatkov, ki bi vsebovale različice plazemskih proteinov v rakih;
- razvoj afinitetnih kolon s sredstvi, ki bi ujele plazemske proteine, ki ustrezajo rakastim;
- razvoj proteotipskih peptidov za rezane in modificirane plazemske proteine, ki so povezani z rakom;
- razvoj standardiziranih kompletov referenčnih vzorcev, ki bi mogli biti na voljo preiskovalcem.