

PROTEOMIKA V MOLEKULÁRNÍ TOXIKOLOGII: IDENTIFIKACE POTENCIÁLNÍCH ČASNÝCH PROTEINOVÝCH BIOMARKERŮ HEPATOKARCINOGENITY U KRYS

KERSTIN FELLA^a, MATTHIAS GLÜCKMANN^b,
VOLKER KRUFFT^b, PETER-JÜRGEN KRAMER^a
a MICHAELA KRÖGER^a

^aMerck KGaA, Institute of Toxicology, Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt, Německo, ^bApplied Biosystems, Darmstadt, Německo
michaela.kroeger@merck.de

Došlo 27.8.05, přijato 5.10.05.

Klíčová slova: MALDI TOF-TOF MS, proteomika, biomarkery, molekulární toxikologie, hepatokarcinogenita

Obsah

1. Úvod
2. Identifikace biomarkerů metodami dvourozměrné elektroforézy a hmotnostní spektrometrie
3. Instrumentace TOF/TOF
4. Biologický význam výsledků získaných 2DE/MS
 - 4.1. Histopatologická pozorování
 - 4.2. Analýza akutních toxických efektů
 - 4.3. Subakutní a chronické toxické účinky
 - 4.4. Potenciální proteinové biomarkery pro predikci
5. Závěr

1. Úvod

Metody, které jsou užívány v současné tradiční toxikologii ke studiu toxicity nových potenciálních léčiv a jiných chemických látek, jsou založeny zejména na klasických bezpečnostních studiích na zvířatech. Tyto postupy zahrnují rovněž histopatologické a biochemické výsledky. S ohledem na etické aspekty je nutno tradiční toxikologické metody podpořit moderními analytickými technikami, které umožňují postihnout změny na molekulární úrovni dříve, než se projeví morfologicky. Zejména výzkum karcinogenity je založen na dlouhodobých studiích, ve kterých mohou zvířata chronicky strádat. Detekce nových molekulárních biomarkerů už před tím, než se nádor projeví morfologicky, by mohla v budoucnu umožnit zkrácení experimentů.

V molekulární toxikologii, nově se etablojícím oboru, jsou jedním z přístupů k hledání biomarkerů proteomické techniky. Ke studiu molekulárních změn v krysích játrech vyvolaných hepatokarcinogenem jsme proto použili dvourozměrnou elektroforézu (2DE) a poté hmotnostní spektrometrii (MS). Tímto postupem jsme byli schopni detegovat potenciální časné proteinové biomarkery, které mohou do budoucna umožnit brzkou předpověď možných toxických i karcinogenních účinků vybraných látek¹. Analýza biologické významnosti nám navíc může pomoci objasnit základní fyziologické a patofyziologické mechanismy².

2. Identifikace biomarkerů metodami dvourozměrné elektroforézy a hmotnostní spektrometrie

Cílem této studie bylo monitorovat metodou 2DE proteinové změny vyvolané hepatokarcinogenem *N*-nitrosomorfolinem (NNM) v jaterní tkáni krys. Diferenční expresní analýza jater ovlivněných NNM vedla k vytipování proteinů, které pak byly vyříznuty z gelu, proteolyticky naštěpeny a identifikovány jak metodou peptidového mapování (peptide mass fingerprinting, PMF), tak také tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS).

K hledání potenciálních biomarkerů pro předpověď toxicity/karcinogenity jsme použili samce krys kmene Wistar, kteří byli vystaveni vlivu jaterního toxinu NNM (působícího na DNA) v koncentraci 20 mg kg⁻¹ tělesné hmotnosti po 7 týdňů následovaných osmnácti týdenním obdobím regenerace. Zvířata byla utracena v různých časových intervalech (po jednom dni, po 3 týdnech a po 25 týdnech), extrahované jaterní proteiny byly separovány metodou 2DE (cit.³). Proteiny v gelu byly barveny přes noc 1 μM roztokem barviva na bázi komplexu ruthenia v 20% ethanolu a zviditelněny skenováním gelu na fluorescenčním laserovém skeneru Molecular Imager FX (BioRad, Hercules, CA). Diferenční expresní analýza byla provedena s použitím software ProteomWeaver 2.0 (Definiens, Mnichov, Německo). Vybrané proteinové skvrny (landmarks, obr. 1) byly identifikovány ve všech gelech a umožnily tak přesné vzájemné přiřazení jednotlivých obrazových analýz. Proteinové skvrny, které vykazovaly signifikantní regulaci exprese proteinů (hladina významnosti $P \leq 0,02$), byly vyříznuty z gelu a přes noc štěpeny trypsinem (Promega, Madison, WA, USA). Peptidové vzorky pro UV-MALDI analýzu byly připraveny standardní metodou „schnoucí kapky“ s matricí 4-hydroxy- α -kyanoskořicové kyseliny (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2 mg ml⁻¹ ve směsi acetonitril : 0,1% kyselina trifluoroctová, 1:1 (v/v). MS a MS/MS analýza proběhla na hmotnostním spektrometru Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer MALDI TOF/TOF[®] (obr. 2) (cit.⁴). Kombinované hledání peptidovým mapováním a tandemovou hmotnostní spektrometrií bylo umožněno prohledávacími algoritmy MASCOT (Matrix Science Ltd., UK) v databázi SWISS-PROT.

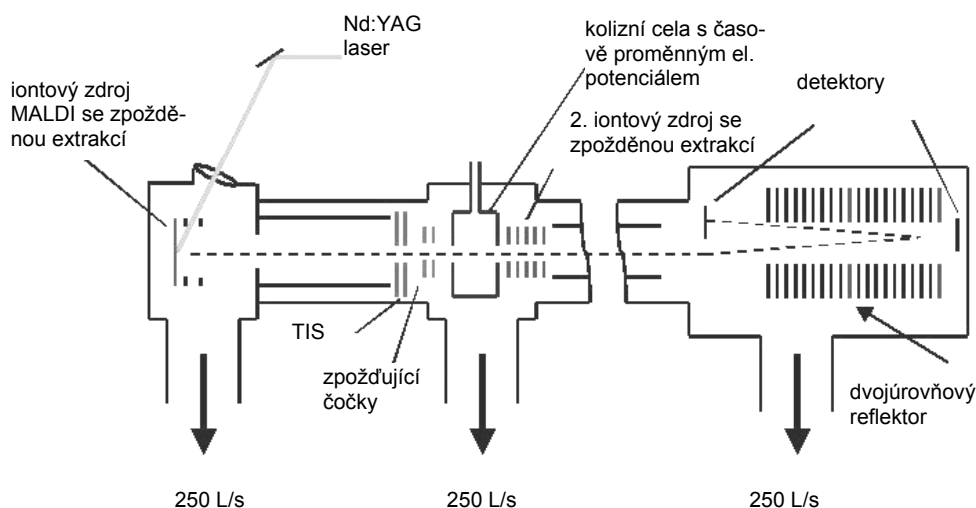
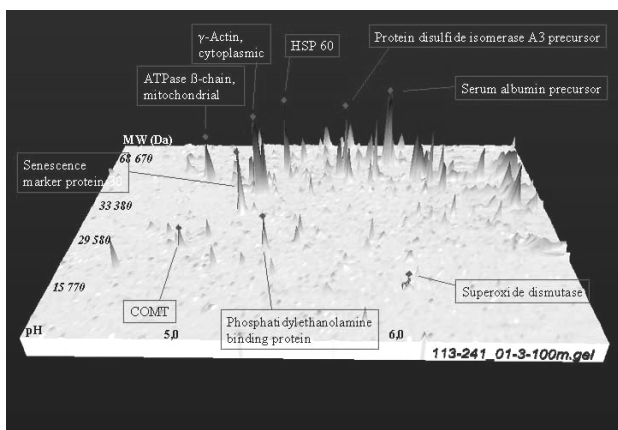


Schéma 1. MALDI-TOF/TOF instrumentace



Obr. 1. 2DE separace kryších jaterních proteinů kontrolního jedince; separace v prvním rozměru proběhla na 24 cm pruhu s imobilizovaným gradientem pH 4-7, pro separaci v druhém rozměru byla použita SDS-PAGE v 10% polyakrylamidovém gelu. Proteiny byly barveny fluorescenčně rutheniem. Identifikované proteiny považované za významné markery (landmarks) jsou zvýrazněny

3. Instrumentace TOF/TOF

Nejnovější konfigurace přístroje MALDI TOF/TOF je zobrazena na schématu 1 (cit.⁴). Pro odpaření a ionizaci vzorku je v přístroji Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer použit laser v tuhé fázi (diodový Nd:YAG laser) pracující při frekvenci 200 Hz a při vlnové délce $\lambda = 355$ nm. Před vstupem do průletového analyzátoru hmotnostního spektrometru jsou ionty urychleny elektrickým polem (MS mód 20kV, MS/MS mód 8kV). Protože všechny ionty jsou urychleny stejným napětím, ionty s odlišným poměrem hmotnost/náboj (m/z) budou putovat rozdílnou rychlostí a ionty s vysokou hodnotou m/z budou putovat pomaleji než menší ionty. Poměr m/z ionizovaných analytů



Obr. 2. Přístroj 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF™; patentovaná TOF/TOF optika umožňuje získávat data v lineárním a reflektorovém módu a následující analýzu sekvence v MS/MS módu

je stanoven měřením času dopadu na dvoukanálový detektor.

Systém přepočítává dobu letu na přesnou molekulovou hmotnost, která pak dovoluje identifikaci nebo charakterizaci testovaného vzorku. Dvoustupňový reflektor umožňuje fokusaci v širokém rozpětí fragmentů v MS/MS módu, aniž snižuje kvalitu dat v MS módu. Prvky iontové optiky, zobrazené v sekci druhého iontového zdroje, umožňují výběr prekurzoru a reakceleraci iontů jeho fragmentů v MS/MS módu (iontové selektory, zpomalovací čočky, kolizní cela a sekundární disociace indukovaná srážkami v oblasti kolizní cely přispívají k intenzitě iontového signálu v MS/MS módu). Obvyklá kolizní energie při MS/MS módu je 1 kV a je dána potenciálovým rozdílem mezi celkovým urychlovacím napětím ve zdroji (8 kV) a napětím v kolizní cele (7 kV). Všechny ionty fragmentů, které vznikly buď samovolným rozpadem nebo disociací

indukovanou srážkami v kolizní cele, přispívají k intenzitě signálu v MS/MS módu.

TOF/TOF optika přístroje Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer spolu s tandemovými průletovými analyzátory umožňuje velmi rychle získat úplnou strukturní informaci o vzorku. Konfigurace přístroje zajišťuje automatický sběr vysoce kvalitních dat za použití MALDI ionizace. TOF/TOF optika navíc poskytuje spektra typická pro vysokoenergetické kolize s důležitou strukturní informací, jako jsou např. immoniové ionty, štěpení v bočních řetězcích a interní fragmenty. Komplexní spektra s konzistentními sériemi iontů dovolují úplnou identifikaci proteinů a jejich kompletní charakterizaci při zachování vysoké rychlosti a přesnosti analýzy.

4. Biologický význam výsledků získaných 2DE/MS

4.1. Histopatologická pozorování

Korelace nových proteomických přístupů s klasickými toxikologickými metodami byla provedena histopatologickou analýzou krysích jater. U krys nebyly po prvním dnu vystavení vlivu *N*-nitrosomorfolinu pozorovatelné ani makroskopické, ani histologické změny, které by mohly být jednoznačně přiřítány účinku NNM. Po 3 týdnech expozice NNM vykazovala většina jater granulární povrch kapsuly a zmenšení. Histopatologicky byly zaznamenány akutní degenerativní a subakutní reaktivní léze. Po 7 týdnech vystavení vlivu NNM, která pokračovala osmnácti týdenním obdobím regenerace, vykazovala některá játra změny ve velikosti a barvě. Histopatologická vyšetření odhalila léze s poškozením buněk a oblasti regenerace, buněčné adenomy, a také buněčné karcinomy u 4 krys.

4.2. Analýza akutních toxických efektů

Na rozdíl od histopatologických nálezů odhalila diferenční 2DE analýza krysích jaterních tkání po jednom dni expozice NNM 13 statisticky signifikantních proteinových skvrn při více než 1,7 násobném zvýšení exprese ve srovnání s intenzitami skvrn v kontrolních gelech (významnosti $P \leq 0,02$). Všechny proteiny byly identifikovány metodou MS a následnými MS/MS experimenty. Při bližším pohledu na molekulární funkci těchto proteinů (tabulka I) je zřejmé, že se účastní obranných procesů při akutním buněčném stresu. Signifikantně se zvýšila exprese mnoha proteinů nezbytných pro redoxní buněčné regulace. Peroxiredoxin 2 hraje důležitou roli v eliminaci peroxidů prostřednictvím redukce reaktivních forem kyslíku („reactive oxygen species“, ROS) thioredoxinovým systémem⁵. O zvýšeném buněčném stresu vypovídá také indukce superoxididmutasy, která je známa tím, že odbourává radikály. „Heat shock“ protein 60 (HSP60) je významným proteinem usnadňujícím správné skládání proteinu, které je narušeno stresem. Zvýšená exprese HSP60 navíc indikuje zintenzivnění procesů apoptózy, což představuje sekundární efekt vyvolaný oxidativním poškozením buňky. Všechny

iniciované procesy a reakce vedou k různým modifikacím energetického metabolismu, které se projevují zvýšenou expesí aldehyddehydrogenasy, pyrokatechol-*O*-methyltransferasy, prekurzoru transthyretinu a 3-hydroxyanthranilát-3,4-dioxygenasy. Zvýšený metabolismus proteinů odráží zvýšené hladiny prekurzoru proteindisulfidomerasy A3 a také regulační podjednotky 6B proteasy 26S, která se podílí na proteinové degradaci.

4.3. Subakutní a chronické toxické účinky

Po třech týdnech expozice NNM byly ve srovnání se změnami pozorovanými v játrech po prvním dnu působení detegovány mnohé další deregulované proteiny. Změny zahrnuté v buněčné reakci na stres vyvolaný NNM byly ještě ve třetím týdnu detegovatelné, což dokazuje zvýšená exprese HSP60, 71 kDa „heat shock“ proteinu příbuzného a „heat shock“ proteinu 90-β (tabulka I).

Po třech týdnech se k proteinovým změnám pozorovaným na počátku studie přidaly procesy vztahující se k obranným mechanismům proti buněčnému stresu, které jsou doprovázeny zvýšenou deregulací anabolismu a katabolismu. Aldehyddehydrogenasa a glycerol-3-fosfátdehydrogenasa byly v této fázi deregulovány. Změněná exprese pyruvátkinasy a fruktosa-1,6-bisfosfatasy (F16P), které obě patří mezi enzymy glykolýzy, upozornila na závažné změny energetického metabolismu. Zejména snížení exprese F16P znamená metabolický posun od glukoneogeneze ke glykolýze, a proto je indikována zvýšená potřeba energie pro regeneraci a proliferaci jaterní buňky. Tento efekt, který je elementární pro karcinogenní procesy, mohl být proteomickým přístupem detegován mnohem dříve než konvenčními metodami dosud užívanými v toxikologii⁶.

Po 7 týdnech byla expozice zvířat účinku NNM zastavena a následovalo pozorovací období 18 týdnů bez karcinogenu, poté ve 25. týdnu byla jaterní tkáň analyzována. Histopatologie odhalila, že u většiny krys se v této fázi vytvořily nádory jater. Analýza této tkáně metodou 2DE prokázala deregulaci tumorových specifických markerových proteinů. Rho GDP inhibitor disociace, HSP 60 a prekurzor kaspasy-8 (tabulka I), které hrají klíčovou roli v mitochondriálním řízení apoptózy, vykazovaly sníženou expresi^{7,8}. To indikuje inhibici procesů apoptózy a následně podporuje nekontrolovaný růst maligních jaterních buněk. 2DE analýza odhalila, že v této poslední fázi bylo diferenčně exprimováno méně proteinů než ve třetím týdnu (75 signifikantních skvrn ve 3. týdnu versus 45 skvrn ve 25. týdnu). Deregulované proteiny svědčí o tom, že ve 25. týdnu, po 18 týdnech odpočinku a regenerace, už buňka nemusí reagovat na buněčný stres původně vyvolaný NNM. Expres některých proteinů normálně indukovaných buněčným stresem byla nyní jen lehce snížena, jako např. 71 kDa „heat shock“ proteinu příbuzného, jehož exprese byla naproti tomu ve 3. týdnu zvýšena více než dvakrát. Avšak proteiny anabolismu a katabolismu byly ještě deregulovány, jako např. aldehyddehydrogenasa, malátdehydrogenasa, F16P a β-řetězec ATP- synthasy.

Tabulka I

Proteiny, které byly diferencně exprimovány po 1 dnu, 3 týdnech a 25 týdnech expozice NNM, identifikovány peptidovým mapováním a následnou tandemovou hmotnostní spektrometrií. Hladiny významnosti (*P*) byly vypočteny testem podle Mann-Whitneye

Kategorie	Protein	Swiss Prot AN	Násobek změny	Hodnota <i>P</i>
<i>den 1</i>				
Buněčný stres	peroxiredoxin 2	P35704	2,05	0,0069
	superoxiddismutasa	P07632	2,37	0,0167
	60 kDa „Heat shock” protein	P19226	2,61	0,0019
Metabolismus	aldehyddehydrogenasa	P11884	2,21	0,0009
	3-Hydroxyanthranilát-3,4-dioxygenasa	P46953	2,13	0,0034
	pyrokatechol O-methyltransferasa	P22734	2,16	0,0060
<i>týden 3</i>				
Buněčný stres	60 kDa „Heat shock” protein	P19226	4,38	0,0000
	71 kDa „Heat shock” protein příbuzný	P08109	2,38	0,0002
	„Heat shock” protein HSP 90-beta	P11499	2,10	0,0000
Metabolismus	aldehyddehydrogenasa	P11884	2,80	0,0000
	pyruvátkinasa	P12928	0,23	0,0000
	prekurzor jaterní karboxylesterasy 10	P16303	0,28	0,0000
	ketoheksokinasa	Q02974	0,57	0,0000
	glycerol-3-fosfátdehydrogenasa	O35007	0,58	0,0000
	pyrokatechol O-methyltransferasa	P22734	0,43	0,0000
	fruktosa-1,6-bisfosfatasa	P19112	0,64	0,0000
<i>týden 25</i>				
Tumor specifické	prekurzor kaspasy-8	O89110	0,56	0,0051
	60 kDa „Heat shock” protein	P19226	0,66	0,0005
	Rho GDP inhibitor disociace	Q99PT1	0,73	0,0001
Buněčný stres	71 kDa „Heat shock” protein příbuzný	P19378	0,63	0,0103
Metabolismus	fruktosa-1,6-bisfosfatasa	P19112	0,68	0,0000
	ATP syntasa, β -řetězec	P10719	0,56	0,0005
	aldehyddehydrogenasa	P11884	0,67	0,0001
	malátdehydrogenasa	P14152	0,58	0,0000
	glycerol-3-fosfátdehydrogenasa	O35007	0,62	0,0011
	pyruvátkinasa	P12928	0,57	0,0054

4.4. Potenciální proteinové biomarkery pro predikci

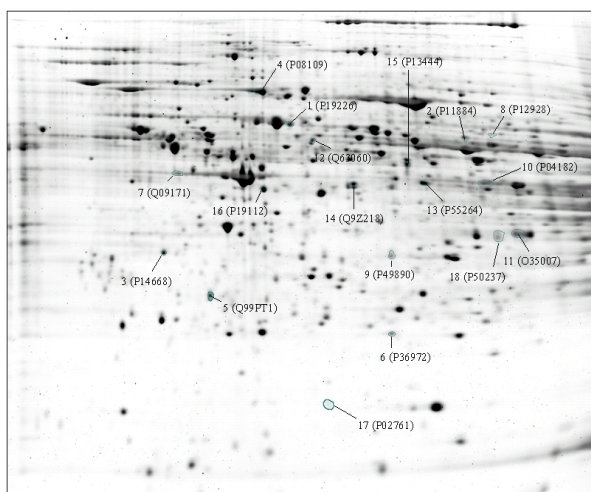
Naším hlavním cílem bylo detegovat časné proteinové biomarkery, které umožňují předpovědět pozdní stadia jaterní karcinogeneze. Tyto proteiny by mohly podpořit a posílit předpověď karcinogenních efektů chemických látek. Proto jsme se zaměřili na proteiny, které byly v jaterních vzorcích signifikantně regulovány jak po 3 týdnech, tak i po 25 týdnech. V poslední fázi jsme se soustředili pouze na tumorovou tkáň. Změny v sacharidovém metabolismu, které byly diskutovány jako významné prekancerogenní změny detegovatelné po 3 týdnech expozice, byly stejným způsobem regulovány i po 25 týdnech (F16P, pyruvátkinasa, glycerol-3-fosfátdehydrogenasa, tabulka I). Oproti tomu absence odpovědi na buněčný stres, stejně jako snížená aktivita vedoucí k apoptóze, vyplývá ze sní-

žené exprese 71 kDa „heat shock” proteinu příbuzného, CH60 a Rho GDP inhibitoru disociace v 25. týdnu, zatímco exprese všech těchto proteinů byla signifikantně zvýšena po 3. týdnu.

Závěrem konstatujeme, že náš přístup odhalil 18 diferencně exprimovaných proteinů (obr. 3) detegovatelných už po 3 týdnech chemické expozice. Použitelnost těchto proteinů jako biomarkerů pro předpověď hepatokarcinogenity musí být ještě potvrzena dalšími experimenty a v současné době se studuje.

5. Závěr

Naše výsledky ukazují, že postupy dvourozměrné elektroforézy a hmotnostní spektrometrie citlivě detegují změny na molekulární translační úrovni dokonce už po



Obr. 3. 2DE separace proteinů z lyzátu jaterních buněk pocházejících ze 3. týdne (pH 4-7); potenciální časné biomarkerové proteiny, které byly diferencně exprimovány ve 3. týdnu a na konci studie ve 25. týdnu, jsou zvýrazněny

jednom dni působení *N*-nitrosomorfolinu. Po třech dnech jsou tyto akutní projevy doprovázeny různými změnami energetického metabolismu, které mohou mít vztah k časným stádiím hepatokarcinogeneze. Tento typ změn nemůže být klasickými toxikologickými metodami v takovém rozsahu prokázán, čímž se potvrzuje význam proteomických technologií pro zlepšení predikce v toxikologii. Navíc jsme byli schopni nalézt specifické proteinové markery v tumorové jaterní tkáni a také „endpoint“ markerové proteiny dokonce po třech týdnech expozice. Posledně uvedené markery mohou fungovat jako užitečné časné proteinové biomarkery pro předpověď hepatocelulárního karcinomu. V budoucnu může tato raná detekce, umožněná zahrnutím proteomických přístupů do rutinních toxikologických studií, nahradit některé studie karcinogenity. Prezentované výsledky jsou příslibem tohoto potenciálu proteomických přístupů pro klasickou a predikční toxikologii.

Tento projekt byl podpořen grantem č. 0312619 německého Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).

LITERATURA

1. Bandara L. R., Kennedy S.: *Drug Discovery Today* 7, 411 (2002).
2. MacGregor J. T., Farr S., Tucker J. D.: *Fundam. Appl. Toxicol.* 26, 156 (1995).
3. Görg A., Weiss W., v knize: *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods*, (Rabilloud T., ed.), kap.4, str. 57. Springer-Verlag, Wien 2000.
4. Medzihradzsky K. F., Campbell J. M., Baldwin M. A.: *Anal. Chem.* 72, 552 (2000).
5. Yergey A. L., Coorsen J. R., Backlund P. S. Jr., Blank P. S., Humphrey G. A., Zimmerberg J., Campbell J. M., Vestal M. L.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 784 (2002).
6. Miranda-Vizuete A., Damdimopoulos A. E., Spyrou G.: *Antioxid. Redox Signal.* 2, 801 (2000).
7. Bannasch P., Hacker H., Klimek F., Mayer D.: *Adv. Enzyme Regul.* 22, 97 (1982).
8. Schramek K., Schumacher M., Wilflingseder D.: *Am. J. Physiol.* 272, C383-391 (1997).
9. Degterev A., Boyce M., Yan J.: *Oncogene* 22, 8543 (2003).

K. Fella^a, M. Glückmann^b, V. Kruff^b, P.-J. Kramer^a and M. Kröger^a (^a*Merck KGaA, Institute of Toxicology,* ^b*Applied Biosystems, Darmstadt, Germany*): **Proteomics in Molecular Toxicology: Identification of Potential Early Protein Biomarkers for Hepatocarcinogenicity in Rats**

Modern proteomics technology was used for identification of protein biomarkers for hepatocarcinogenicity. It replaced currently used methods for the studies of toxic effects of drug candidates. The detection of new biomolecular markers can shorten future studies.