

m.ladkova.jana@seznam.cz

3267

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra biochemie



Diplomová práce

**Studium rozdílů v expresi proteinů
vzájemných glutathion v buněčných
liniích nádorů prsu a v primárních
kulturách prsních epitelových buněk**

Jana Mládková

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Irena Selicharová, Dr.

Doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Praha 2009

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Mgr. Ireny Selicharové, Dr., a Doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc., a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum: PRAHA 29.4.2009

Podpis: 

PODĚKOVÁNÍ:

Úvodem bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Ireně Selicharové, Dr., za odborné vedení, cenné připomínky, trpělivost a pochopení a své garantce Doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc., za cenné připomínky, vstřícné jednání a podporu při realizaci diplomové práce.

Poděkování patří také celému vědeckému týmu RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc., na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí a Mgr. Miloslavu Šandovi za pomoc s identifikací proteinů.

Děkuji skupině RNDr. Evy Matouškové, CSc., na Ústavu molekulární genetiky AV ČR za pěstování a sklizení buněk.

V neposlední řadě velmi děkuji svým blízkým, kteří mi byli podporou a bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Děkuji.

OBSAH:

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:	7
1 ÚVOD	9
1.1 Karcinom prsu	9
1.1.1 Anatomie prsu	9
1.1.2 Historie	9
1.1.3 Statistické údaje	10
1.1.4 Vznik karcinomu	10
1.1.5 Rizikové faktory	12
1.2 Buněčné linie a primární kultury	12
1.2.1 Primární kultury	13
1.2.2 Buněčné linie	13
1.2.3 Buněčná linie EM-G3	14
1.2.4 Buněčná linie HCC 1937	14
1.2.5 Buněčná linie MDA-MB ₂₃₁	15
1.2.6 Buněčná linie MCF ₇	15
1.3 Glutathion a proteiny vázající glutathion	15
1.3.1 Glutathion S-transferasy	16
1.3.2 Glyoxalasa I	18
1.3.3 Další proteiny vázající GSH	19
1.4 Proteomika	20
1.4.1 Metody proteomiky	21
1.4.1.1 Příprava vzorku pro dvourozměrnou elektroforézu	23
1.4.1.2 Dvourozměrná elektroforéza	23
1.4.1.3 Vizualizace proteinů v gelu	25
1.4.1.4 Vyhodnocování dat	26
1.4.1.5 Hmotnostní spektrometrie	27
1.5 Afinity chromatografie	28
1.5.1 Afinity chromatografie proteinů vázající GSH	30
2 CÍL PRÁCE	31
3 MATERIÁL	32
4 METODY	34

4.1	Extrakce proteinů z buněčných linií a primárních kultur	35
4.1.1	Pěstování buněčných linií	35
4.1.2	Pěstování primárních kultur	35
4.1.3	Sklízení a lyze buněk	36
4.2	Stanovení množství proteinů	36
4.3	Afinitní chromatografie	36
4.3.1	Příprava kolony Glutathion Sepharosy 4B	37
4.3.2	Aplikace vzorku a průběh chromatografie	37
4.3.3	Eluce	37
4.3.4	Regenerace kolony.....	37
4.4	Ultrafiltrace.....	38
4.5	Stanovení enzymových aktivit.....	38
4.5.1	Stanovení enzymové aktivity glutathion S-transferas	38
4.5.2	Stanovení enzymové aktivity glyoxalasy I	39
4.6	Elektroforetické metody	40
4.6.1	SDS-PAGE	40
4.6.2	Dvourozměrná elektroforéza	41
4.6.2.1	Izoelektrická fokusace	41
4.7	Elektroforetická separace proteinů	43
4.7.1	Detekce proteinů v gelu a jejich vyhodnocení.....	44
4.8	Identifikace proteinů	45
4.8.1	Štěpení proteinů v gelu	45
4.8.2	Štěpení proteinů v roztoku.....	46
4.8.3	Hmotnostní spektrometrie	46
5	VÝSLEDKY	47
5.1	Extrakce proteinů z buněčných linií a primárních kultur	47
5.1.1	Stanovení množství proteinů	47
5.2	Separace proteinů pomocí afinitní chromatografie	
	na koloně GSH Sepharose 4B.....	49
5.2.1	Optimalizace afinitní chromatografie	49
5.2.2	Průběh afinitní chromatografie	50
5.3	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného	53

5.4	Stanovení aktivity glutathion <i>S</i> -transferas v průběhu afinitní chromatografie na koloně GSH Sepharose 4B.....	55
5.5	2-DE elektroforéza.....	58
5.6	Identifikace proteinů.....	61
5.6.1	Štěpení proteinů v roztoku.....	61
5.6.2	Štěpení proteinů v gelu.....	61
5.7	Stanovení aktivity glutathion <i>S</i> -transferas a glyoxalasy I.....	63
5.7.1	Stanovení aktivity glutathion <i>S</i> -transferas v buněčných liniích a primárních kulturách.....	63
5.7.2	Stanovení aktivity glyoxalasy I v buněčných liniích a primárních kulturách	65
5.8	Vyhodnocování gelů v programu PDQuest Advanced- 8.0.1	67
6	DISKUSE	69
	ZÁVĚR	77
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:	78

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

2-D/2-DE – dvojrozměrný/dvojrozměrná elektroforéza

ACN - acetonitril

BRCA 11/14/16/17 - primární kultury rakovinných prsních buněk s mutacemi tumor supresorového genu BRCA 1, z anglického „breast cancer“

BRCA-1/BRCA-2 – tumor supresorové geny, z anglického „breast cancer“

BSA – hovězí sérový albumin, z anglického „bovine serum albumin“

CDNB - 1-chloro-2,4-dinitrobenzen

DMSO - dimethylsulfoxid

DTT - dithiothreitol

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

EGF – epidermální růstový faktor, z anglického „epidermal growth factor“

ESI – metoda tvorby iontů rozprašováním roztoku do komůrky s hrotovou elektrodou, z anglického „electrospray ionization“

GLO I – glyoxalasa I

GLO II – glyoxalasa II

GSH – glutathion v redukované formě

GSSG – glutathion v oxidované formě

GST – glutathion S-transferasy

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z anglického „high performance liquid chromatography“

CHAPS – 3-(cyklo)-1-propansulfonová kyselina

CHAPSO - 3-(cyklohexylamino)-2-hydroxy-1-propansulfonová kyselina

IEF – izoelektrická fokusace

„IPG strip“ – plastový proužek pokrytý gelem s imobilizovaným pH gradientem, z anglického „immobilized pH gradient“

LC – kapalinová chromatografie, z anglického „liquid chromatography“

LTQ-ORBITRAP – analyzátor pro hmotnostní spektrometrii s iontovou kvadrupólovou lineární pastí, z anglického "linear trap quadrupole"

MALDI – ionizace laserem za účasti matrice, z anglického „matrix assisted laser desorption and ionization“

MilliQ - deionizovaná voda

MS – hmotnostní spektrometrie, z anglického „mass spectrometry“
MS/MS – hmotnostní spektrometrie s více analyzátory za sebou
Mr – relativní molekulová hmotnost, z anglického „relative molecular weight“
NADPH – redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NME - primární kultura zdravých prsních buněk, z anglického „normal mammary epithelial“
PTM – post-translační modifikace
SDS – dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE - elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného, PAGE z anglického „polyacrylamide gel electrophoresis“
TBP - tributylfosfin
TEMED – N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
TFA – trifluoroctová kyselina
Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

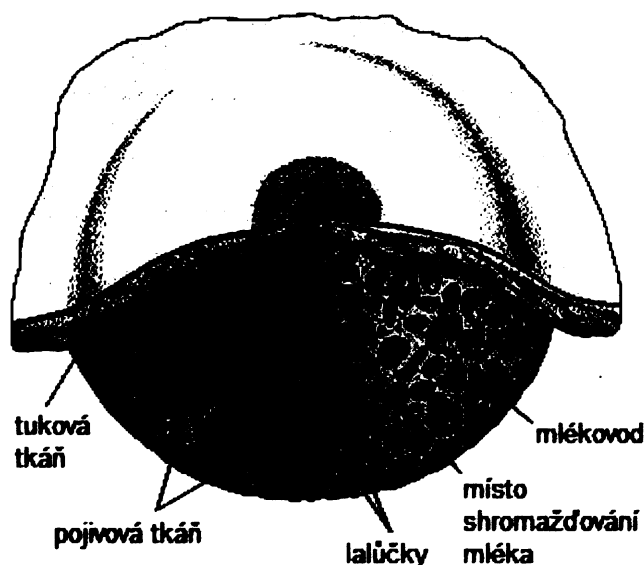
1 ÚVOD

1.1 Karcinom prsu

1.1.1 Anatomie prsu

Prs se skládá ze dvou částí - ze žlázy, která se podílí na produkci a transportu mléka, a ze stroma, tedy tukové a pojivové tkáně. Prsní žláza má 15-20 laloků. Laloky jsou složeny z váčků produkujících mléko. Jsou propojeny systémem kanálků a mlékovodů ústících v bradavce (viz *obrázek 1*) [1,2]. Histologická stavba prsní žlázy závisí na pohlaví, věku a funkčním stavu [3].

Luminální epiteliální buňky, které formují kanálky a lalůčky, produkují a sekretují různé složky mléka [1]. Jsou obklopeny vrstvou myoepiteliálních buněk, připojených na bazální membránu, která udržuje tubulární strukturu kanálků a lalůček [1,4].



Aby prsní žláza dosáhla své funkčnosti, epiteliální buňky musí dostat signály od hormonů (estrogeny, progesteron), ale také od sousedních buněk v jejich okolí (např. růstové faktory) [1].

Obrázek 1: Schematický nákres anatomie prsu [4].

1.1.2 Historie

První popis karcinomu prsu pochází z roku 1600 před Kristem ze starého Egypta. Ve starověkém Římě přirovnal Galén rozšířené lymfatické cévy u pokročilého karcinomu prsu ke krabím nohám, z čehož vznikl název „cancer“.

Teorii o vzniku nádoru prsu z epiteliálních buněk představil až v roce 1940 Rudolf Ludwig Karl Virchow. V této době byl karcinom prsu považován za lokální nemoc.

Od třicátých let minulého století se karcinom prsu začal považovat za systémové onemocnění. Začaly série pokusů, které našly souvislost mezi estrogény a proliferací mléčné žlázy. V šedesátých letech minulého století bylo provedeno mnoho srovnávacích i experimentálních studií, které potvrdily hypotézu karcinomu prsu jako systémového onemocnění.

Karcinom prsu je považován za hormonálně závislý nádor od roku 1896, kdy Tomas Beatson prokázal vymizení metastatického karcinomu prsu po oboustranné ovariectomii, tedy oboustranném odstranění vaječníků [5].

1.1.3 Statistické údaje

Karcinom prsu je nejčastější rakovinou u žen a její výskyt stále stoupá [5]. Každý rok u nás přibývá více než 5000 nových případů karcinomu prsu a zemře okolo 2000 lidí [6].

Nádory prsu jsou řazeny mezi nemoci staršího věku. Větší pravděpodobnost výskytu karcinomu prsu je u žen po 40. roce života. Před 40. rokem mají nádory horší prognózu a nebývají včas diagnostikovány [5]. Kromě mamografického vyšetření je základem pro včasnou diagnózu také samovyšetření prsů [2].

1.1.4 Vznik karcinomu

Karcinom prsu představuje vážný zdravotní problém. Doufá se, že identifikace genetických a environmentálních faktorů přispěje k výzkumu rakoviny prsu a také k prevenci. Karcinom prsu je komplexní onemocnění zapříčiněné více faktory [7]. Nádory prsu závisí na buněčném původu rakovinných buněk, histologických vlastnostech a také na vývoji nemoci. Jak prsní žlázy, tak nádory prsu jsou složité a dynamické struktury [1].

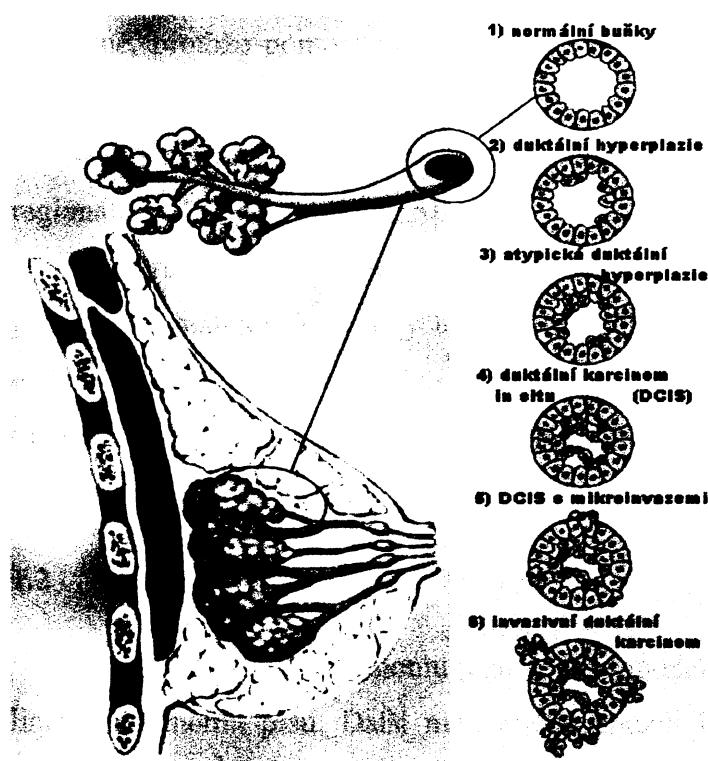
Karcinom prsu je hormonálně závislý nádor. Pro vznik karcinomu prsu a jeho růst je nejvýznamnější estrogen, ženský pohlavní hormon, který podněcuje k činnosti růstové faktory a onkogeny, které podporují buněčné dělení. Vysoká estrogenní aktivita pak může způsobit proliferaci [2].

V rakovinných buňkách je pozměněné buněčné dělení. Buněčná proliferace je kontrolována růstovými faktory, receptory na povrchu buňky, signálními molekulami, které přenášejí signály od receptorů do jádra (tzv. signální cesty), transkripčními faktory,

kteře se vazı na DNA a kteře spouští nebo zastavují produkci proteinů. Mutace jakéhokoli genu kódující tyto proteiny může ovlivnit proliferaci.

Pokud je DNA buňky poškozená, za normálních podmínek buňka zastaví buněčný cyklus. Několik proteinů bylo identifikováno jako ty, kteře pomáhají zastavení buněčného cyklu do té doby, neŹ je DNA opravená. Příkladem může bít protein p53, kteří upozorňuje na poškozenou DNA a napomáhá zastavení buněčného cyklu v G1 fázi nebo vede k apoptóze. Mutace v tumorsupresorovem genu p53 jsou nejčastějšími mutacemi, kteře se vyskytují v lidskych rakovinách. Tento protein chybí v mnoha typech rakoviny, a proto buňky nemohou zastavit své dělení, i kdyŹ je DNA poškozená [8,9]. Rakovinné buňky ztrácejí schopnost kontrolovat buněčné dělení, kteře se poté vymkne kontrole, vykazují ztrátu buněčné diferenciace a mají vysokı stupeň genomové nestability.

Maligní buňky se mohou během diferenciace vyskytovat v několika stádiích (viz obrázek 2) [8,10]. V prsní tkáni může docházet ke kumulaci mutací, kteře v konečném důsledku vedou k nádorovému bujení. Takto vzniká nádor u 75-85% nemocnych (tzv.



Obrázek 2: Nazorne zobrazení prsu, prsního kanálku (duktu) a proliferace epiteliálních buněk, podle stadia rakoviny [10].

sporadický karcinom). Ostatní nádory prsu jsou výsledkem dedicnych genetickych vad (tzv. hereditární karcinom), kteře vznikají mutacemi supresorovych genů, většinou BRCA-1 a BRCA-2, a často postihují Źeny do 35 let. Riziko onemocnění u nositelky tohoto genu je velmi vysoké [2].

Vetsına nádorů prsu jsou epiteliálního původu, proto většína maligních nádorů prsu je klasifikována jako karcinomy. Sarkomy, maligní nádory vyplývající z pojivové tkáně, jsou vyjimecne [1].

1.1.5 Rizikové faktory

I přesto, že 70% žen s diagnostikovaným karcinomem prsu nemá v anamnéze žádný z rizikových faktorů, vlivy z vnějšího i vnitřního prostředí mohou různými mechanismy zvyšovat riziko výskytu karcinomu prsu [2,5]. Je již dobře známo, že jedním z nejvíce rizikových faktorů vzniku rakoviny prsu je rodinná historie tohoto onemocnění. Přesto mnoho ostatních negenetických faktorů přispívá ke vzniku rakoviny prsu. Všeobecně mohou být rozděleny na hormonální a nehormonální rizikové faktory [7].

Mezi hormonální patří dlouhodobá nebo zvyšující se expozice estrogeny. Proto faktory, které zvyšují počet menstruačních cyklů, jsou spojovány se zvyšující se pravděpodobností výskytu rakoviny prsu. Tedy časný nástup první menstruace, krátká doba laktace a pozdní příchod menopauzy. Podobně se zdá, že snižující se počet ovulačních cyklů může zmírnit riziko onemocnění, čehož může být dosaženo dlouhou dobou laktace. Více ohroženy jsou ženy, které nerodily, ženy s vysokým příjmem tuků a nedostatkem fyzické aktivity. Větší zásoba tuků provází vyšší koncentrace estrogenů v plazmě, protože pomocí tukových tkání dochází k přeměně androsteronu na estrogen [2,5,7].

Nehormonální faktory, které zvyšují riziko karcinomu jsou: pohlaví, věk, ale i regionální rozdíly a alkohol [2,5].

Přes pokroky v genetickém výzkumu, objevení onkogenů, tumor supresorových genů, hormonálních a růstových faktorů a jejich úlohy v řízení proliferace normální a nádorové tkáně zůstává příčina tohoto onemocnění nejasná. Karcinom prsu je velmi různorodé onemocnění, a dá se předpokládat, že příčina nebude jedna [5].

1.2 Buněčné linie a primární kultury

Ve výzkumu karcinomu prsu se jako model *in vitro* nejčastěji používají buněčné linie z karcinomu prsu. Další metodou je použití kultur buněk získaných z primárních prsních karcinomů [11].

V klasifikaci a porovnávání rakovinných buněk odvozených z rakoviny prsu se zatím nezdají být žádná lepší kritéria než pomocí estrogenových receptorů (ER), které hrají hlavní roli v biologii a léčbě rakoviny prsu.

Objevení a progrese rakoviny prsu je doprovázena několika genetickými změnami. Ty zahrnují jednoduché nukleotidové mutace, amplifikaci (rozšíření) nebo delecii (vynechání) genů, inserci (vlození) a translokaci (přemístění), získání nebo ztracení celého nebo jen části chromosomu, a dokonce i výrazné chyby v počtu chromozomů (aneuploidii) [12].

1.2.1 Primární kultury

Místo použití buněčných linií je možné připravit primární kultury odvozené přímo z karcinomů. Tato možnost má několik výhod. Nejen že jsou buňky přímo izolovány z karcinomu, ale také detailní patologie dovoluje charakterizaci kultury pro srovnání s originálním karcinomem. Kultury jsou vyvinuty z malé části tkáně, nebo jako buněčná populace obohacená o určitý buněčný typ.

V některých případech jsou buňky udržovány v kultuře pouze do jejich buněčné smrti, a tak mají malou možnost prodělat transformace, které jsou patrné u dlouho kultivovaných buněk „nesmrtelných“ buněčných linií. Nicméně je tu možnost, že buňky izolované z karcinomu prsu se mohou v kulturách chovat jinak ve srovnání s jejich chováním, když jsou součástí tkáně či orgánu, protože se *in vivo* ztrácí interakce mezi buňkami. Může také dojít k růstu pouze specifických buněčných typů.

I primární kultury mají limitace, například pomalou dobu zdvojení a celkovou délku života. Často buňky přežijí jen dvojí nebo trojí pasážování. Pro některé experimentální metody je nutný velký počet buněk, kterého může být dosaženo až po několikáté pasáži [11]. Lidské nádory mléčné žlázy patří k nejobtížněji kultivovatelným buněčným typům [62].

Primární kultury, které byly používány v rámci této práce, byly: L 190 (pocházející z rakovinných prsních buněk), BRCA 11, BRCA 14, BRCA 16 a BRCA 17 (které pochází z rakovinných prsních buněk a které mají mutaci tumor supresorového genu BRCA 1), NME 23, NME 35, NME 36 a NME 37 (které reprezentují zdravou prsní tkáň).

1.2.2 Buněčné linie

Buněčné linie jsou v laboratořích široce používány a zejména ve výzkumu rakoviny jako *in vitro* model. Mají řadu výhod. Buněčné linie odvozené z rakoviny prsu

poskytují neomezený zdroj homogenního samoreplikačního materiálu, který může růst v nekonečném množství a snadno se s ním zachází [11,12]. Přesto mají i nevýhody.

Permanентní buněčné linie odvozené z rakoviny prsu byly izolovány, abychom lépe porozuměli základnímu mechanismu vzniku rakoviny a jejímu vývoji. Navzdory značné roli, kterou hrají, jsou stále považovány za nereprezentativní modely rakoviny, ze které jsou vyvinuty. Rakovinné buňky jsou geneticky nestálé. Mohou podstoupit specifické genotypové či fenotypové změny, které vyplývají z dlouhodobé kultivace [12]. V následných populacích mohou časem nastat fenotypové změny způsobené výběrem jen specifických, rychle rostoucích klonů. Pokud jsou buněčné linie považovány za modely, podle kterých se hodnotí patobiologie (nauka o základech chorobných stavů) rakoviny prsu a/nebo možná reakce na novou léčebnou terapii, měla by se tato možnost brát v úvahu.

Většina z dlouhodobě pěstovaných buněčných linií odvozených z rakoviny prsu, které se běžně používají, nejsou odvozeny z primárních karcinomů prsu, ale většina z nich je odvozena z agresivnějších a často metastazujících karcinomů. Více klinicky významné by ale bylo použití buněk, které jsou odvozeny z primárního karcinomu, obzvláště proto, že většina léčebných terapií je zacílena právě na tyto karcinomy [11].

V této práci byly používány buněčné linie EM-G3, HCC 1937, MDA-MB₂₃₁ a MCF₇.

1.2.3 Buněčná linie EM-G3

Nová buněčná linie EM-G3 byla odvozena z primární léze prostupující lidským prsním kanálkem v roce 2007. Buňky jsou schopny do určité míry diferencovat. Mají smíšené znaky jak luminálních, tak myoepiteliálních buněk. Předpokládá se, že představují zárodečné buňky, které byly přítomny v raném stádiu vývoje nádoru. EM-G3 je první permanentní lidská klonovaná linie pocházející z primárního karcinomu prsu s těmito vlastnostmi [13].

1.2.4 Buněčná linie HCC 1937

Speciální podskupina karcinomů je složena z těch, které vznikly u žen s genovými mutacemi. Pokusy o izolaci takových buněčných linií se zdají být většinou neúspěšné. Dosud byla popsána pouze jediná BRCA1 mutantní buněčná linie HCC 1937.

Byla vyvinuta ze vznikajícího primárního invazivního ductálního karcinomu u 24leté pacientky s dědičnou mutací. Buněčné linie jsou pro BRCA1 mutaci homozygotní. Ani v primárním karcinomu, ani v HCC 1937 buňkách nebyly objeveny žádné progesteronové ani estrogenové vazby na receptory. HCC 1937 buňky jsou často používány ke studii BRCA1 funkcí. Žádná vhodná buněčná linie s BRCA2 mutací není v současné době k dispozici [12].

1.2.5 Buněčná linie MDA-MB₂₃₁

Tato buněčná linie byla získána z metastázujících míst, konkrétně plicního výpotku, pacientky s karcinomem prsu. Představuje model vysoce metastázující a ER negativní buněčné linie [14].

1.2.6 Buněčná linie MCF₇

Buněčná linie MCF₇ je často považována za prototyp ER pozitivní buněčné linie. Dále je charakterizována luminálním fenotypem a pochází z plicního výpotku [12].

Buňky v *in vitro* kultuře budou bezesporu dále používány jako model rakoviny prsu kvůli jejich snadnému používání. Přesto je nezbytné, aby si vědci byli vědomi a porozuměli jejich omezením při experimentech a interpretacích dat. I přes více technických požadavků na vývoj nabízí primární kultura relevantní klinický model tohoto onemocnění, který poskytne více významných dat. Musí být ovšem správně charakterizována [11].

1.3 Glutathion a proteiny vázající glutathion

Je známo, že glutathion (GSH) a enzymy, které s ním kooperují, hrají důležitou roli v nádorových onemocněních a mají zásadní význam v boji proti reaktivním formám kyslíku. Vznik oxidativního stresu, který se zvyšuje v průběhu vývoje onemocnění, zahrnuje i zvyšování peroxidace lipidů [15].

GSH (γ -Glu-Cys-Gly) je tripeptid, který existuje v redukované (GSH) a oxidované (GSSG) formě. Jeho hlavní funkcí je udržení redoxní rovnováhy v buňce. Redukuje disulfidové vazby tvořící se v cytoplazmatických proteinech a cysteinu pomocí donoru elektronu. V procesu je GSH přeměněn na jeho oxidovanou formu (GSSG).

V redukované formě jsou thiolové skupiny cysteinu schopné poskytnout ($H^+ + e^-$) jiné nestabilní molekule, jako např. reaktivním sloučeninám kyslíku. Pak se sám GSH stává reaktivním, ale ochotně reaguje s jiným reaktivním GSH za vzniku GSSG. Reakce je možná díky relativně vysoké koncentraci glutathionu v buňkách (kolem 5mM v savčích buňkách). GSH je téměř výlučně nacházen v redukované formě, regenerace z GSSG probíhá pomocí glutathion reduktasy [16].

Poměr GSH ku GSSG v buňkách je často používán jako míra toxicity v buňce. Ve zdravých buňkách a tkáních je více než 90% zásoby GSH v redukované formě a méně než 10% ve formě GSSG. Rostoucí poměr GSSG ku GSH značí přítomnost oxidativního stresu [16]. Hladina GSH bývá v rakovinné tkáni nižší ve srovnání se zdravou tkání [15]. GSH je znám jako substrát v konjugačních reakcích i redukčních reakcích, které jsou katalyzovány GST (glutathion S-transferasy) v cytoplazmě, mikrozomech a mitochondriích. Je také schopný participovat na neenzymatických konjugacích [16].

1.3.1 Glutathion S-transferasy

Cytosolické GST (EC 2.5.1.18) se nacházejí v rostlinách, mikroorganismech, obratlovcích i bezobratlých. Jsou rodinou enzymů, které se obecně nacházejí většinou u aerobních organismů. [17,18]. Lidské GST se vyskytují v cytoplazmě, ale mohou být také lokalizovány v mitochondriích, jádře nebo jiných subcelulárních kompartmentech [19].

Funkce GST

GST tvoří superrodinu multifunkčních dimerních proteinů [20,21]. Tyto enzymy hrají důležitou detoxifikační roli v II. fázi biotransformace [22,23]. Katalyzují konjugaci thiolové skupiny tripeptidu GSH s cytotoxickými, genotoxickými, mutagenními a karcinogenními elektrofilními substráty endogenního i exogenního (xenobiotika) původu, jako jsou produkty oxidativního stresu, chemické karcinogeneze nebo terapeutických léčiv. Tato konjugační reakce by měla převést elektrofilní substráty na více hydrofilní a tím usnadnit jejich eliminaci z těla [18,20,23-28]. Látky spojené s GSH jsou rychleji metabolizovány díky odštěpení glutamových a glycinových zbytků. Následuje acetylace výsledné volné aminoskupiny- cysteinového zbytku, kde finálním produktem je merkapturová kyselina. Konjugovaná merkapturová kyselina je poté vyloučena z těla [26].

GST byly nejdříve známy jako buněčné katalyzátory spojující sulfhydrylové skupiny GSH s různými elektrofilními toxickými komponenty. Pozdější výzkumy GST

ukázaly ještě mnoho dalších možných funkcí a aktivit - regulační roli v buněčné signalizaci pomocí interakce s jinými makromolekulami, jako jsou protein kinázy, uskladnění a transport látek v játrech, peroxidázovou aktivitu, strukturní role, syntézu prostaglandinu, izomerázovou aktivitu, modulace propustnosti kanálů pro vápenaté ionty a jiné [19,22,29].

Dělení GST

GST jsou charakterizovány a začleněny do jednotlivých tříd na základě jejich aminokyselinové sekvence, struktury, kinetických a imunologických vlastností [21,17]. Pokroky v genomice, proteomice a bioinformatice usnadnily identifikaci a rozlišení mezi mnoha izoformami GST [22]. Třídy savčích cytoplazmatických GST byly pojmenovány alfa, mí, pí, théta, dzéta, sigma a omega. Někdy jsou označeny římskými písmeny A, M, P atd. Kappa GST je rozpustný mitochondriální nebo peroxizomální enzym, který je strukturně odlišný od ostatních. Další třídy GST byly nalezeny v nesavčích druzích, jako beta třída v bakteriích, fi a tau v rostlinách, delta ve hmyzu [18,20,22,24,28].

Stejně jako ostatní proteiny mají GST změny sekvencí způsobeny alelickým polymorfizmem [22]. Izoenzymy každé třídy vykazují silné strukturní a imunologické podobnosti [21]. GST jsou známy tím, že se velmi liší, ale zároveň překrývá jejich substrátová specifita [25]. Všeobecně podporují reakce mezi GSH a elektrofilů, ale jednotlivé transformace mají odlišnou substrátovou specifitu [22].

Struktura GST

Všechny cytoplazmatické GST jsou dimery složené z podjednotek o ~ 25 kDa. Každá podjednotka je složena ze dvou domén: N-terminální doména a α helikální C doména. Na každé podjednotce jsou minimálně dvě vazná místa pro ligand: GSH vazné místo (G-místo), které je konzervované a vysoce specifické pro GSH, a místo pro hydrofobní substrát (H-místo), které může vázat mnoho různých elektrofilů, což vede k rozdílům v substrátové selektivitě mezi různými třídami (viz *obrázek 3*, str. 18) [18,20,29].

Reprezentativní krystalová struktura GST ze skoro každé třídy je k dispozici [29].

Vliv GST na karcinogenezi

Množství GST v prsních tkáních je potenciálně důležitým prvkem v citlivosti tkáně na mutagenní vlivy chemické karcinogeneze a odpověď nádoru prsu na chemoterapii [17]. Polymorfismus GST genů způsobují variace v enzymové aktivitě, což může mít vliv na individuální náchylnost k rakovině. Větší výskyt lidských GST pí je potvrzen u několika lidských nádorů a přispívá jako diagnostický indikátor chemické karcinogeneze [20,30].



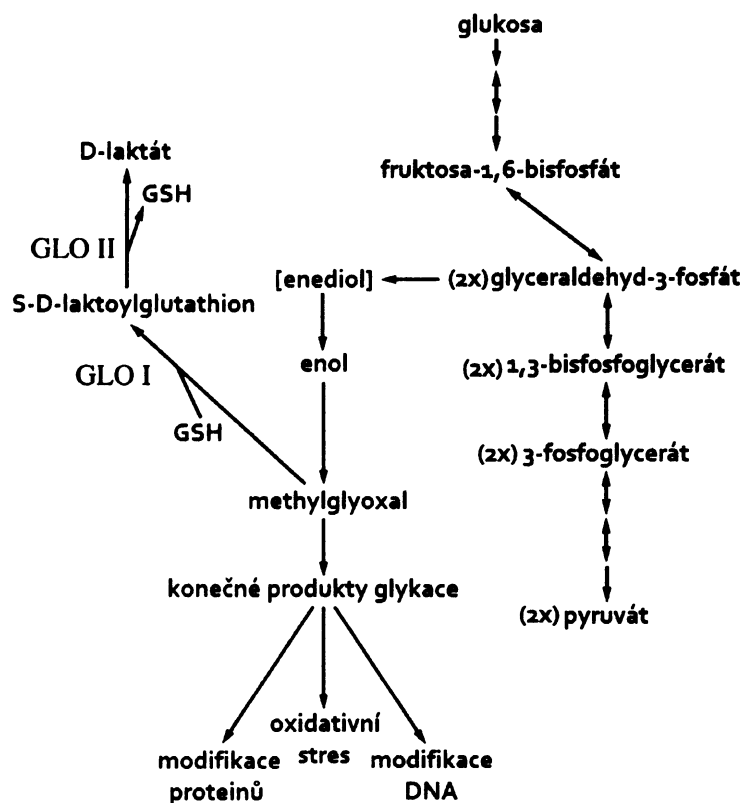
Obrázek 3: *Strukturní diagram vazného G-místa pro GSH a hydrofobního H-místa na homodimerní GST pí [29].*

1.3.2 Glyoxalasa I

Glykace proteinů, nukleotidů a kladně nabitých fosfolipidů pomocí glukosy, glyoxalu, methylglyoxalu, 3-deoxyglukosy a ostatních sacharidových derivátů je pro buňky potenciálně škodlivý a mutagenní proces. Je známo, že proti glykaci působí enzymy, respektive skupina enzymů, které eliminují fyziologické silné glykační složky a opravují glykované proteiny, jako např. glyoxalasa I (GLO I) a glyoxalasa II (GLO II). S procesem glykace je neoddělitelně spojen oxidativní stres. Kvůli spotřebě GSH a NADPH během oxidativního stresu se *in situ* zvyšuje aktivita GLO I a NADPH dependentní aldehyd reductasy [31].

GLO I (EC 4.4.1.5, laktoylglutathion lyasa) je homodimerní Zn^{2+} metaloenzym, který katalyzuje GSH závislou přeměnu mnoha aromatických a alifatických α -ketoaldehydů na α -hydroxy thioestery. Tento enzym hraje roli při detoxifikaci methylglyoxalu, vedlejšího produktu glykolýzy. Účastní se konjugace s thioester hydrolasou GLO II (EC 3.1.2.6, hydroxyacylglutathion hydrolasa), čímž z buněk odstraní cytotoxický metylglyoxal v podobě netoxického D-laktátu (viz *obrázek 4*, str. 19) [32,33,34]. Vznik methylglyoxalu je podstatný jev Embden-Mayerhofovi cesty. Methylglyoxal (>10mM) inhibuje glykolytické enzymy a inhibuje seskupení mikrotubulů. Fyziologická koncentrace methylglyoxalu se odhaduje v rozmezí 0,1-2 μ M [34]. GLO II je v glyoxalakovém systému rychlostně limitujícím enzymem, jehož koncentrace je

v porovnání se zdravými tkáněmi v rakovinných snížena. Takový enzymový systém je přítomný ve všech savčích buňkách a je zapojený do tkáňového růstu i buněčné smrti [32,33, 34].



Obrázek 4: Schéma vzniku toxického methylglyoxalu a jeho přeměna na netoxický D- laktát pomocí GLO I a GLO II. Schéma glykolýzy je vyznačeno černě, červeně je vyznačen vznik methylglyoxalu a jeho možné škodlivé působení. Glyoxalový systém představuje zelená část obrázku [35].

1.3.3 Další proteiny vázající GSH

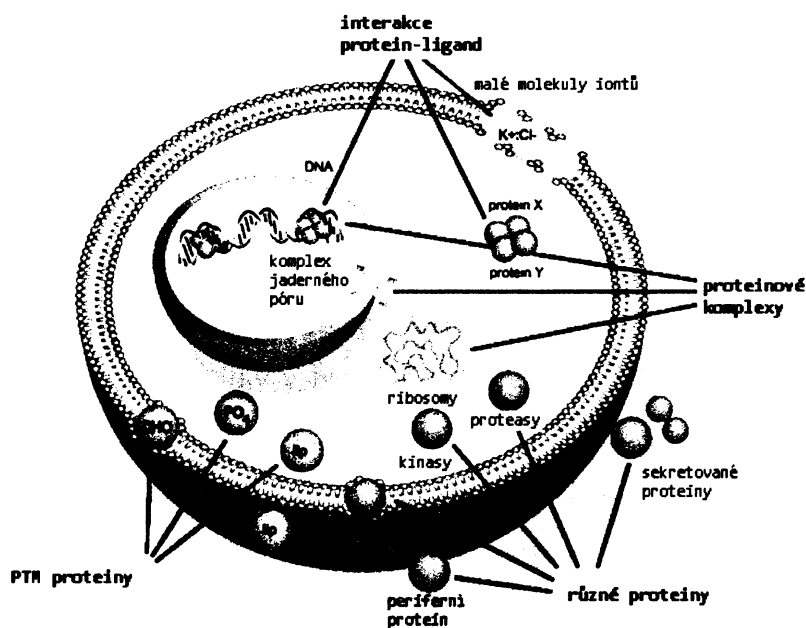
GSH peroxidasa 1 (EC 1.11.1.9) je savčí selenoprotein. Používá GSH ke katalýze redukce peroxidu vodíku a peroxidů lipidů za současné oxidace GSH. Dalšími proteiny, které se váží ke GSH jsou například GSH reduktasa (EC 1.8.1.7), γ -glutamyltranspeptidasa (EC 2.3.2.2), L-buthionin-sulfoximin (inhibitor GSH syntézy), γ -glutamylcysteinsynthetasa (EC 6.3.2.2) [36,37].

1.4 Proteomika

Proteomika je obor, který v současné době prožívá obrovský rozmach mimo jiné díky rozvoji molekulární biologie, neboť jsou k dispozici genomy několika organismů. Za definici proteomiky můžeme považovat kvantitativní analýzu proteinů, které jsou přítomny v organismu v určitém okamžiku za přesně definovaných podmínek [38].

Proteom představuje sadu proteinů kódovaných genomem v průběhu života buňky, odráží aktuální metabolický stav buňky, který je ovlivněn vnějšími i vnitřními faktory. Buňka je vysoce dynamický systém [38,39]. Informace uložená v genech je jednorozměrná, definovaná sekvencí čtyř znaků (A, G, T, C). Informace uložená v proteinech je mnohorozměrná, závislá na různých faktorech jako sestřih, post-translační modifikace, katalytická aktivita, buněčná distribuce a také na správném sbalení proteinu, který vede k trojrozměrné struktuře. Tyto faktory pak definují biologii každého proteinu [40].

Biologická aktivita proteinu často závisí na modifikaci proteinu, pokud je modifikován. Pomocí proteomiky mohou být zjištěny modifikace proteinů, které nejsou zřejmé ze sekvence nukleotidů v DNA. Jedná se například o interakce protein-protein, izoformy či post-translační modifikace, které kromě biologické aktivity také určují stabilitu, lokalizaci či rychlost odbourávání proteinů (viz *obrázek 5*, str. 21) [38,41].



Obrázek 5: Výzkum různých vlastností proteinů je úlohou proteomiky. Buněčná distribuce, množství, post-translační modifikace (PTM), katalytická aktivita a struktura přináší informace potřebné k popisu biologického systému [22].

Proteiny jsou funkčními molekulami a jsou tedy vhodnými farmaceutickými cíli. Proteomika představuje pro biomedicínu značnou naději při identifikování potenciálních patologických markerů, obzvláště v případě karcinomu [1].

Za posledních několik let se proteomika značně rozvinula. Technika dvourozměrné elektroforézy (2-DE), která představuje klíčovou metodu proteomiky, se zdokonalila a byla popsána řada vylepšení [1,39]. Rozvoj proteomiky nastal především tehdy, co se k 2-DE připojily ionizační techniky hmotnostní spektrometrie (MS) [42,43]. Hmotnostní spektrometrie umožňuje identifikaci proteinů a také přesnou studii protein-protein interakcí a post-translačních modifikací [1]. Vzárostající počet sekvenovaných genomů v proteinových databázích a vývoj počítačových algoritmů, které korelují MS nebo MS/MS data s informacemi, usnadňují identifikaci proteinů [43].

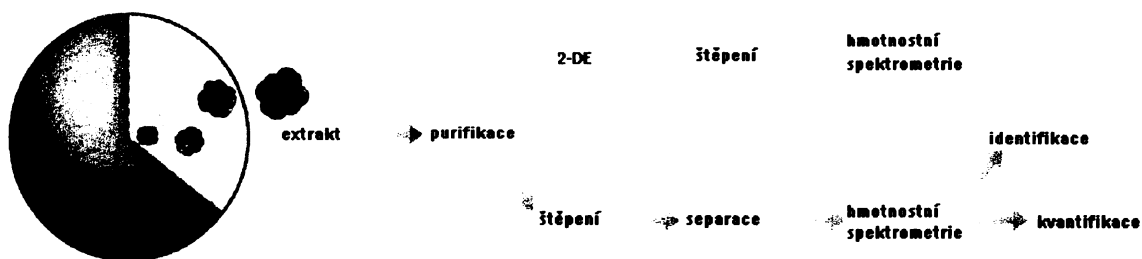
1.4.1 Metody proteomiky

Proteomika je obor založený na metodách analýzy proteinů v komplexních směsích. Cílem je detekovat a identifikovat co největší množství proteinů, které jsou přítomny v biologickém materiálu. Před zahájením proteomického experimentu by měly

být zváženy některé základní vlastnosti analyzovaného vzorku, například koncentrace proteinů, dynamický rozsah (od nejvíce po nejméně abundantní proteiny), rozpustnost proteinů atd [41,44].

Nejčastěji používanými technikami v proteomice jsou 2-D elektroforéza pro separaci proteinů a MS pro identifikaci separovaných proteinů (viz *obrázek 6*). Další metody používané v proteomice jsou například SELDI (laserová desorpce/ionizace s vylepšeným povrchem), ICAT (izotopově kódované afinitní značky), SILAC (stabilními izotopy značené aminokyseliny v buněčné kultuře) nebo iTRAQ (isobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci) [22,44].

Počet proteinů v proteomu z jednoho savčího buněčného typu není zcela definovaný, ale pravděpodobně se počet bude pohybovat kolem 10 000-20 000. 2-DE je v současné době jediná osvědčená metoda pro simultánní separaci proteinů a kvantitativní porovnání změn v proteinovém profilu buněk, tkání nebo celého organismu. Na standardních 2-DE gelech je rozeznáno jen okolo 1500 až 3000 skvrn, analyzována je tedy jen malá část proteinů [45].



Obrázek 6: Schéma analýzy buněčných proteinů, která vede k jejich identifikaci. Znáznorněny jsou jen dva nejčastější přístupy. Analýza označená růžovými šipkami vede přes separaci proteinů pomocí 2-DE, izolaci a naštěpení vybraných proteinů a hmotnostní spektrometrii. Druhý přístup (modré šipky) používá metody LC-MS/MS k analýze proteinových štěpů z proteinové směsi, kvantifikace je dosaženo po izotopovém označení peptidů. Oběma přístupům může předcházet prefrakcionace (např. chromatografická) nebo separační metoda [22].

1.4.1.1 Příprava vzorku pro dvourozměrnou elektroforézu

Příprava vzorku pro 2-DE by měla zajistit účinnou extrakci proteinů, jejich solubilizaci, denaturaci a redukci. Rozrušení proteinových agregátů a komplexů na jednotlivé proteiny je zásadním požadavkem při přípravě vzorku. Zlepšením rozpustnosti proteinů se zvýší počet rozlišitelných proteinů v gelech. Součástí přípravy vzorku mohou být i kroky vedoucí k odstranění neproteinových složek (např. DNA), které by později mohly komplikovat rozdělení a vizualizaci proteinů.

Proteiny jsou nejdříve extrahovány ze vzorku pufrům, který vyvolá rozklad buněk nebo vytvoří prostředí, ve kterém je rozklad buněk vyvolán jiným způsobem (např. sonikací) [39]. Základní součásti takového „lyzačního pufru“ jsou uvedeny v *tabulce 1*.

Tabulka 1: Základní složky „lyzačního pufru“ a jejich funkce [38].

	<i>Mechanismus působení</i>	<i>Význam</i>	<i>Příklady</i>
<i>Chaotropní činidla</i>	Přerušení vodíkových můstků, denaturace	Zvýšení solubilizace proteinů	Močovina, thiomočovina
<i>Detergenty</i>	Zamezení hydrofobních interakcí, pokles povrchového napětí	Zvýšení solubilizace hydrofobních proteinů a proteinů po denaturaci, odkrytí hydrofobního jádra	CHAPS, CHAPSO
<i>Redukční činidla</i>	Přerušení S-S můstků, udržení proteinů v redukovaném stavu	Rozvinutí mnoha proteinů, zlepšení rozdělení v gelu	DTT, TBP, komerční přípravky (DeStreak Reagent)
<i>Amfolyty</i>	Vysoká pufrující schopnost, rozpustnost a vodivost v oblasti jejich pI, omezení elektrostatických interakcí mezi proteiny	Tvorba pH gradientu, zvýšení solubilizace proteinů, minimalizace jejich agregace, zlepšení rozdělení v gelu	Komerční přípravky (Ampholyte, Pharmalyte)

1.4.1.2 Dvourozměrná elektroforéza

Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace (IEF) představuje tzv. první dimenzi, ve které jsou proteiny nejprve rozděleny v prostředí s gradientem pH na základě jejich izoelektrického bodu (pI). Proteiny jsou amfoterní molekuly. Mohou mít kladný, záporný nebo žádný náboj podle pH prostředí, ve kterém se vyskytují. V elektrickém poli proteiny putují k opačně nabitým elektrodám. Během migrace v pH gradientu ztratí nebo přijmou protony, tím

se snižuje jejich mobilita i náboj. Když se dostanou do bodu, kde se pH rovná jejich pI, nemají již žádný náboj a zastaví se.

V dnešní době se k vytvoření pH gradientu běžně používá komerčně dostupných tzv. „IPG stripů“, kde je pH gradient vytvořen několika akrylamidovými pufrů. Jsou to deriváty akrylamidu a obsahují reaktivní dvojné vazby a pufrující skupiny. Obecný vzorec je $CH_2=CH-CO-NH-R$, kde R je buď karboxyl ($-COOH$), nebo terciární aminoskupina ($-N(CH_3)_2$). Tyto akrylamidové deriváty jsou kovalentně začleněny do polyakrylamidového gelu, který je nanesen na tenkém plastickém proužku. Komerčně dostupné „IPG stripy“ jdou dehydratovány a před použitím musí být rehydratovány.

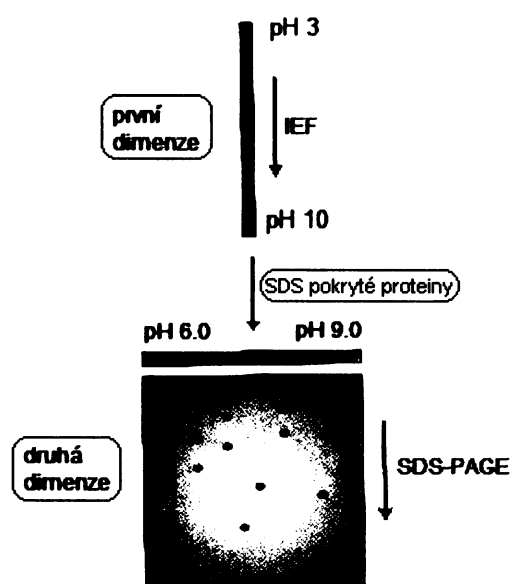
Nejčastějším, nejjednodušším a často nejefektivnějším způsobem je rehydratace gelu za přítomnosti vzorku.

Elektroforetická separace

Po IEF následuje tzv. „ekvilibrace“ proteinů, kde dochází ke štěpení S-S můstků redukčními činidly a následně k alkylationi volných $-SH$ konců cysteinových zbytků [46]. Jako detergent se zde používá SDS, které se naváže na proteiny podle jejich molekulové hmotnosti (1,4 g SDS na 1 g proteinu) [47,48]. Všechny proteiny s navázaným SDS mají

tvář elipsoidu. Záporný náboj, který SDS udělí, zamaskuje skutečný náboj proteinu. Veškeré proteiny proto mají uniformní záporný náboj úměrný jejich relativní molekulové hmotnosti [46,48].

„IPG strip“ s proteiny, které se během IEF zaostřily do zón podle jejich pI, vstupuje do druhého rozměru, kde jsou proteiny rozděleny podle jejich molekulových hmotností směrem kolmým k prvnímu rozměru, jak je vidět na obrázku 7.



Obrázek 7: Průběh 2-DE: izoelektrické fokusace a elektroforetická separace [49].

Gel se připravuje kopolymerací akrylamidu a N, N'-metylenbisakrylamidu v přítomnosti TEMEDu. Zesíťování lze ovlivnit koncentrací N, N'-metylenbisakrylamidu, čímž se ovlivňuje délka a počet řetězců polymeru [46].

Výhodami tohoto nosiče jsou jeho inertnost, mechanická pevnost, průhlednost a možnost přípravy nosiče s předem určenými vlastnostmi (např. zesíťování gelu, gradientu hustoty gelu, atd.) [47].

Běžně se používají buď gradientové gely nebo gely se stejným zesíťováním v celé své ploše. Gradientové gely mají dvě výhody: proteiny o širokém rozpětí molekulových hmotností jsou detekovatelné zároveň a klesající velikost pórů zaostruje zóny [46,47]. Naopak stejné zesíťování v celém gelu umožňuje lepší reprodukovatelnost a porovnávání gelů.

Nejčastěji používanou je diskontinuální PAGE. Pro dělení proteinů je zásadní změna v pH mezi startovním (velkopórovým) a dělicím (malopórovým) gelem [47].

Nevýhodou 2-DE je její časová náročnost, pracnost celého procesu a nutnost standardizace přípravy gelů, obzvláště gradientových [38].

1.4.1.3 Vizualizace proteinů v gelu

Gely jsou připravovány pro preparativní, nebo analytické účely, což určuje jak požadované množství proteinů ve vzorku, tak typ detekce. Intenzita zabarvení proteinových skvrn je určena množstvím barvy navázané na proteiny a rozdílem zbarvení proteinů a tzv. „pozadí“ gelu.

Nejběžnější používanou barvou pro detekci v polyakrylamidovém gelu je Coomassie Brilliant Blue. Její citlivost je 10 ng proteinu na jednu proteinovou skvrnu. Barvení je kvantitativní a zároveň kompatibilní s analýzou MS.

Fluorescentní barvení se vyznačuje vysokou citlivostí (srovnatelné s barvením pomocí AgNO_3) a jednoduchostí. Může být použito ke specifické detekci a je použitelné pro následnou identifikaci proteinů pomocí MS. Velkou nevýhodou je ovšem vysoká cena a náročnost při vybavování laboratoře.

Nejjednodušší, citlivou a zároveň levnou metodou vizualizace pro 2-D analýzu je barvení pomocí AgNO_3 . Tato metoda je 10krát citlivější než detekce Coomassie Brilliant Blue. Nevýhodou této vizualizace je neslučitelnost s následnou analýzou MS. Zároveň není

plně kvantitativní metodou, jelikož stříbrné ionty se váží jen na některé aminokyselinové zbytky (Asp, Glu, His, Cys, Met) [46].

1.4.1.4 Vyhodnocování dat

Aby mohly být 2-D gely analyzovány, musí být nejdříve digitalizovány. Nejčastěji používané přístroje jsou denzitometr, fotoaparát a fosforový nebo fluorescenční skener [46].

Analýza 2-D gelů může probíhat vizuálně. I přesto, že je tato metoda rychlá a účinná, spíše než subjektivní metodu je dnes pro objektivitu nutné používat vyhodnocování 2-D gelů pomocí počítačového programu.

Komerčně jsou dostupné programy PDQuest, Phoretix, Decodon, ProFinder, Bio Numerics a další. Volně jsou přístupné například GelSpace nebo Open2Dprot [50].

Počítačový program PDQuest

Program PDQuest nabízí účinnou metodu srovnávací analýzy a je určen speciálně pro srovnávání více 2-D gelů najednou. Analytické nástroje odhalí mezi gely, které jsou analyzovány, i jemné rozdíly. Program umožní vybrat gely, které chceme analyzovat, určit proteinové skvrny, které nás zajímají, a vytvořit tzv. „match-set“ experiment. Detekce proteinových skvrn je rychlá. Program také umí pomocí filtru rozpoznat pozadí proteinových skvrn a odečíst ho (viz *obrázek 8 A*, str. 27). Odstranění různého zabarvení tzv. „pozadí“ zaručí správnost v kvantitavních porovnáních i pro málo abundantní proteiny.

Dále jsou v programu nástroje, které umožňují přejít na manuální ovládání, a tak například vybrat celý obrys skvrny a kvantifikovat ji jako celek. Kvantifikační tabulka pak uvádí poměr intenzit oproti skvrně na vzorovém gelu pro všechny označené proteinové skvrny (viz *obrázek 8 B*, str. 27).

PDQuest je schopným nástrojem pro získání a uchování informací. Ke každé proteinové skvrně na vzorovém gelu umožňuje ukazovat prakticky všechna získaná data. Uživatel tedy může jednoduše vidět a sdílet informace, které jsou spojovány s identifikovaným proteinem [51].

A)

Spot	Area	Intensity	Volume	Height	Width	Length	Position	Label
101	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
102	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
103	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
104	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
105	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
106	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
107	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
108	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
109	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
110	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
111	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
112	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
113	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
114	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
115	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
116	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
117	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
118	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
119	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
120	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	

B)



Obrázek 8: A) Kvantifikační tabulka programu PDQuest, která udává poměr intenzit proteinových skvrn na analyzovaných gelech. B) Detekce proteinových skvrn v počítačovém programu PDQuest.

1.4.1.5 Hmotnostní spektrometrie

Při proteomické analýze jsou nejčastěji kombinovány metody hmotnostní spektrometrie spolu s 2-DE.

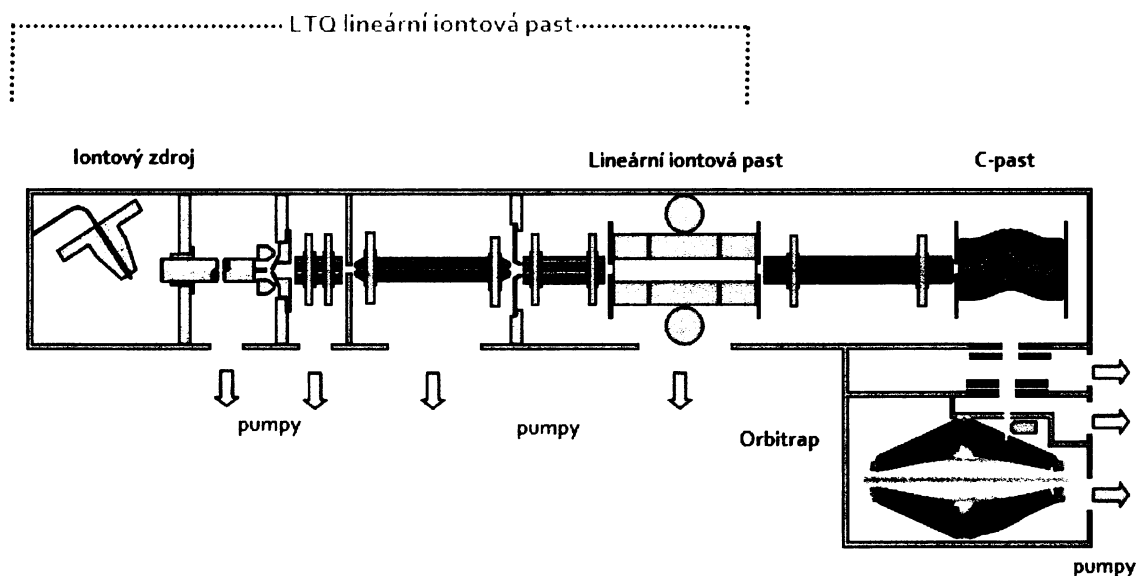
Separované a obarvené proteiny mohou být z gelu roboticky vyříznuty a následně štěpeny specifickou proteasou (např. trypsinem, chymotrypsinem). Při MS dochází k separaci vzniklých ionizovaných peptidů magnetickým polem podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Takto probíhá identifikace proteinů technikou hmotnostní spektrometrie MALDI nebo ESI [38].

Hmotnostní analyzátor Orbitrap je nový a užitečný doplněk proteomických metod. Hlavní vlastností tohoto analyzátoru je měření dosahující přesných hmotností a vysokého rozlišení. Analyzátor Orbitrap je iontová past, kde jsou ionty zachyceny elektrostatickým polem. Elektrostatická přitažlivost směrem k centrální elektrodě je kompenzována odstředivou silou. K získání frekvencí oscilace pro ionty s různou hmotností, vyplývající z přesného čtení jejich m/z , je použita Fourierova transformace. Rozlišovací schopnost analyzátoru se snižuje s rostoucí m/z měřeného iontu, současně maximum rozlišovací schopnosti analyzátoru Orbitrap je přes 100 000. Tak vysoká kvalita měření jde ruku v ruce

s cenou, která zde představuje čas analýz, který přímo úměrně roste s rozlišovacím požadavkem. Schematické znázornění analyzátoru Orbitrap je na *obrázku 9*.

U typického proteomického experimentu je proteinová směs nebo jednotlivé proteiny štěpeny na peptidy (pomocí například trypsinu nebo chymotrypsinu), které jsou separovány na reverzní fázi HPLC a analyzovány on-line pomocí MS a MS/MS. Pro takovéto experimenty určující peptidy může přesnost hmotnosti jen 1 ppm velmi usnadnit jeho identifikaci. Ve skutečnosti velmi přesné měření hmotnosti iontů napomáhá značnému snížení falešně pozitivních peptidových identifikací. Porovnáním určitého peptidu a jeho fragmentace s databázemi může být protein identifikován včetně jeho modifikací [52].

Tato výkonná a citlivá metoda hmotnostní spektrometrie nahradila dříve používané Edmannovo odbourávání, které bylo neúčinné při blokováném N- konci proteinů, pomalé a s nízkou citlivostí [22,38].



Obrázek 9: Schéma zařízení pro hmotnostní analýzu, které je zakončené hmotnostním analyzátozem Orbitrap [52].

1.5 Afinitní chromatografie

Hlavní překážka, která zůstává pro kompletní analýzu proteinů, je detekce a identifikace málo abundantních proteinů. Ani nejlepší 2-DE gely nemohou běžně rozeznat víc než několik stovek proteinů, proto pouze nejvíce abundantní proteiny mohou být na elektroforetickém gelu vizualizovány [44,53]. Toto je velká nevýhoda, protože se předpokládá, že většina regulačních proteinů je produkována v malém množství. Je tedy

zřejmé, že separace proteinů s nízkou koncentrací v buňce a v množství dostačujícím pro následnou analýzu, je důležitou součástí proteomických studií k dokončení kompletního popisu proteomu jakéhokoli buněčného typu [43]. Zvyšující se počet málo abundantních proteinů vzhledem k počtu ostatních proteinů ulehčí analýzu 2-DE a MS [44].

Často citovaným přístupem pro řešení tohoto problému je prefrakcionace proteinové směsi před nanesením vzorku na 2-DE gely [41,43,44,53,]. Princip chromatografického kroku pro prefrakcionaci 2-DE vzorků je použití třetí dimenze v proteinové separaci. Umožňuje proteinům být adsorbovány na povrch a eluovány za jiných podmínek. Toto opatření způsobí odstranění jednoho proteinu nebo třídy proteinů, které mohou interferovat ve výsledcích 2-DE, a koncentrování málo abundantních proteinů umožní jejich vizualizaci v gelu. Proteiny, které byly „schované“ za velké skvrny jim odpovídající, poté budou viditelné v gelu z jiných frakcí [43, 44].

Neobyčejnou charakteristikou mnoha proteinů je jejich schopnost specificky vázat molekuly, a to pevně, ale nekovalentně. Tato vlastnost může být využita na purifikaci proteinů afinitní chromatografií. Afinitní chromatografie je separační metoda založená na specifických interakcích mezi imobilizovanými ligandy a cílovými proteiny, které mají být separovány [44, 48].

V této technice je molekula- ligand, která specificky váže protein, kovalentně připojena k inertní pórovité matici. Roztok proteinové směsi prochází chromatografickým nosičem a cílový protein je vázán na imobilizovaný ligand, zatímco ostatní látky jsou z kolony vymyty pufrům. Cílový protein může být eluován změnou elučních podmínek, které protein uvolní z chromatografické matrice. Jednou metodou je eluce kolony pomocí roztoku, jehož složky mají vyšší afinitu k matici než ligand. Jinou možností je upravit vlastnosti roztoku tak, aby komplex protein-ligand byl nestálý, například změnou pH, iontové síly a nebo teploty. Matrice používaná v afinitní chromatografii musí být chemicky inertní, mít vysokou pórovitost a mít velký počet funkčních skupin.

Důležité je, aby změna podmínek nebyla pro izolovaný protein nevhodná, neboť by mohl být nevratně zničen. Obrovskou výhodou afinitní chromatografie je její schopnost využívat unikátních biochemických vlastností daného proteinu [48].

Mělo by být také zmíněno, že afinitní chromatografie může najednou obohatit pouze jeden málo abundantní protein nebo skupinu proteinů. Proto tedy k dosažení požadovaného výsledku může být nutné použití několika afinitních kolon a purifikací [44].

Viditelnost polypeptidu na 2-D gelu bude záviset na množství proteinu v buňce, celkovém množství proteinů nanesených na gel a metodě detekce. Množství proteinů, které může být nanášeno na gel, je ale omezeno [43].

Možnosti prefrakcionace vzorků před 2-DE se zdá být nejslibnějším přístupem, jak zvýšit počet proteinových složek viditelných v komplexu proteinů jak v savčích buňkách, tkáních, nebo tělních tekutinách [45].

1.5.1 Afinitní chromatografie proteinů vázajících GSH

V této práci byla používána GSH Sepharosa 4B, která byla vyrobena pro rychlou jednokrokovou purifikaci GST, GSH vázajících proteinů a rekombinantních proteinů, kde GST slouží jako fúzní kotva.

V poslední době byla afinitní chromatografie pro GSH vazebné proteiny používána v několika laboratořích především za účelem izolace glutathion S-transferas (GST). Purifikací a jejich následnou identifikací byly dle literatury většinou identifikovány pouze GST třídy pí, mí a théta. Izolace GST často probíhala z neobvyklých materiálů, jako je motolice jaterní, octomilka obecná či z žáber krevetky pacifické. K analýze byla po afinitní chromatografii používána především 2-DE, popřípadě pouze SDS-PAGE, ve spojení s MS [18,23,67,80].

Dle našich informací používali pouze v laboratoři pana Chunga CH. (Oklahoma, USA) spojení afinitní chromatografie na GSH Sepharose a 2-DE s cílem určit GSH vázající proteiny v savčím centrálním nervovém systému. Těmito metodami purifikovali a následně identifikovali kromě GST pí a GST mí také LanCL 1 protein [80].

2 CÍL PRÁCE

- Ověřit možnosti prefrakcionace proteinů z buněčných linií EM-G3, HCC 1937, MDA-MB₂₃₁ a MCF₇ odvozených z rakoviny prsu pomocí afinitní chromatografie na koloně GSH Sepharose 4B pro následnou 2-D elektroforézu.
- 2-D elektroforetické porovnání proteinů z lyzátů, frakcí s proteiny bez afinity ke GSH a frakcí s proteiny s afinitou ke GSH v rámci každé buněčné linie.
- Identifikovat izolované GSH afinitní proteiny, které jsou potenciálně důležité pro karcinogenezi, pomocí MS.
- Porovnat enzymovou aktivitu GST a GLO I v buněčných liniích odvozených z rakoviny prsu a primárních kulturách zdravých i rakovinných prsních buněk.

3 MATERIÁL

Chemický materiál:

1-chloro-2,4-dinitrobenzen	Sigma-Aldrich, USA
40% roztok methylglyoxalu	Sigma-Aldrich, USA
Acetonitril	Sigma-Aldrich, USA
Akrylamid	Fluka, Švýcarsko
Amfolyty pH 3-10	Fluka, Švýcarsko
BSA	Serva, Německo
Coomassie® Brilliant Blue G-250	Fluka, Švýcarsko
Dithiothreitol	Fluka, Švýcarsko
Dodecylsulfát sodný	Sigma-Aldrich, USA
Filtrační papíry (Electrode wicks)	Bio-Rad, USA
Glutathion Sepharose™ 4B	GE Healthcare, Švédsko
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
CHAPS	Sigma-Aldrich, USA
„IPG strip“	GE Healthcare, Švédsko
Jodoacetamid	Bio-Rad, USA
L-glutathion redukovaný	Sigma-Aldrich, USA
Minerální olej	Bio-Rad, USA
N, N'-metylenbisakrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Persíran amonný	Fluka, Švýcarsko
Protease inhibitor cocktail for use with mammalian cell and tissue extracts, DMSO solution (obsahuje: 4-(2-aminoethyl)benzensulfonyl fluorid hydrochlorid, aprotinin, bestatin hydrochlorid, N-(trans-epoxysukciny)-L-leucin 4-guanidynobutylamid, leupeptin hemisulfát, pepstatin A)	Sigma-Aldrich, USA
Proteinový standard pro elektroforézu	Bio-Rad, USA
Readyprep Overlay Agarose	Bio-Rad, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, USA
Trifluorooctová kyselina	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin (Trypsin Gold Mass Spektrometry Grade)	Promega, USA

Ultrafiltrační zkumavky (centrifugal filter devices) Amicon, USA

Dále byly v laboratoři používány běžně dostupné chemikálie v analytické čistotě dodávané firmou Fluka, Švýcarsko a Sigma-Aldrich, USA. Na přípravu veškerých pufrů byla použita deionizovaná voda MilliQ.

Biologický materiál:

Rakovinné buněčné linie EM-G3, HCC 1937, 1.LF UK Praha
MCF₇ a MDA-MB₂₃₁

Primární kultury epitelových prsních buněk: 1.LF UK Praha
rakovinné- BRCA 11, BRCA 14, BRCA 16,
BRCA 17 a L 190

zdravé- NME 23, NME 35, NME 36 a NME 37

Použité přístroje:

Centrifuga CR3i - rotor AC 1.14, Jouan, USA

Spektrofotometr - 6105 UV/VIS, Jenway, UK

Spektrofotometr - Lambda 25 UV/VIS, Perkin Elmer, USA

Přístroj na IEF - PROTEAN IEF Cell, Bio-Rad, USA

Nádoba na nalévání gelů na elektroforézu MP3 MULTI-GEL CASTING CHAMBER,
Bio-Rad, USA

Elektroforetická aparatura - PROTEAN II xi Cell, Bio-Rad, USA

Elektroforetická aparatura - Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, USA

Zdroj používaný při elektroforéze - POWER PAC 1000, Bio-Rad, USA

Kalibrovaný densitometr GS 800, Bio-Rad, USA

Termostat s mícháním - Thermomixer comfort, Eppendorf, Německo

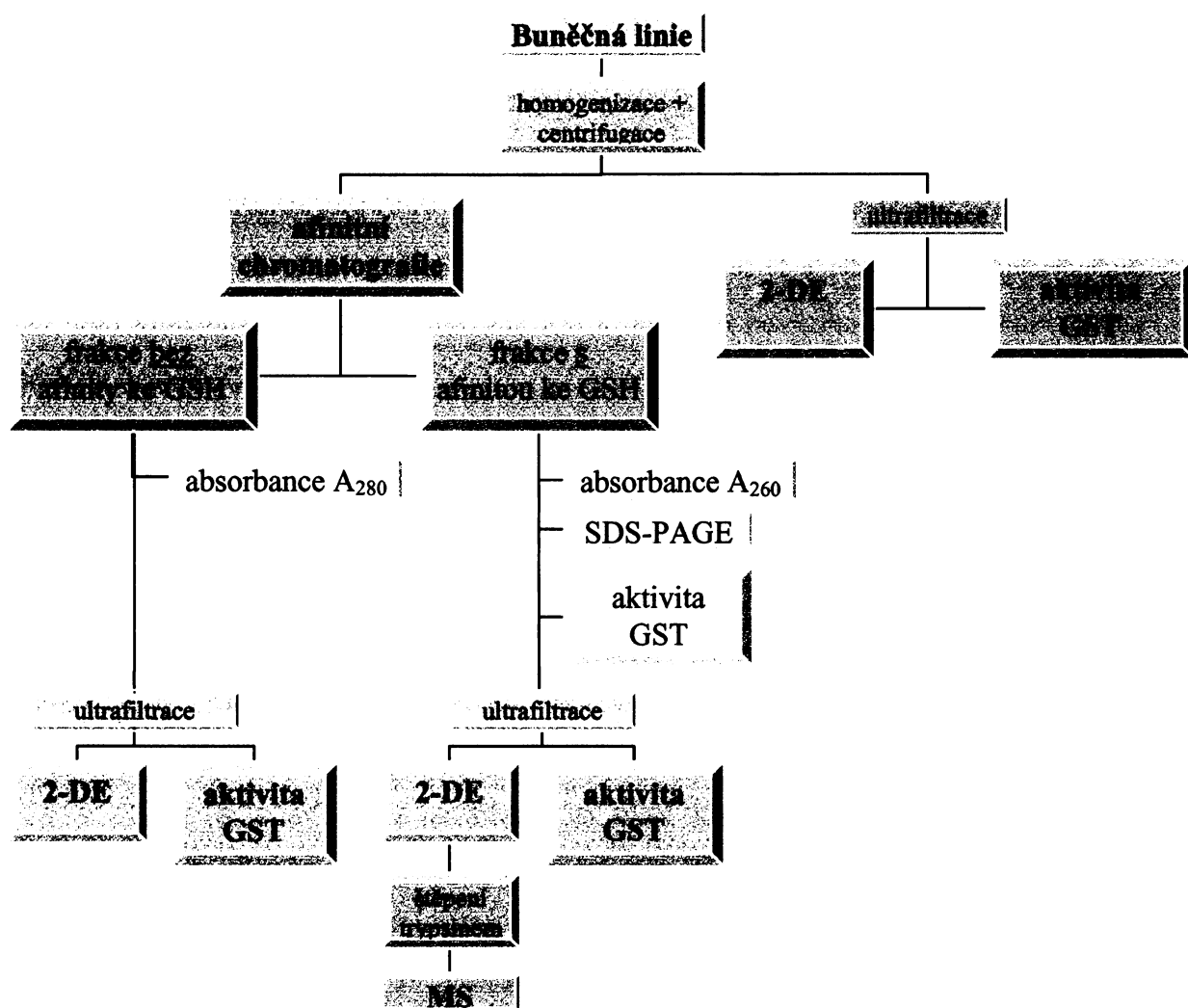
„SpeedVac Concentrator“, Thermo Fisher Scientific, USA

Teflonový homogenizátor, double ended, rounded tip, Scienceware, USA

Počítačový program PDQuest Advanced- 8.0.1, Bio-Rad, USA

4 METODY

Schéma zpracování buněčného lyzátu je na *obrázku 10*. V lyzátu buněčné linie byla změřena enzymová aktivita GST a následně byl analyzován pomocí 2-DE a afinitní chromatografií. Afinitní chromatografií byly získány frakce proteinů bez afinity ke GSH a frakce proteinů s afinitou ke GSH. Ve spojených, zahuštěných a odsolených frakcích proteinů s afinitou i bez afinity ke GSH byla změřena enzymová aktivita GST a byla provedena 2-DE. Proteinové skvrny z 2-DE proteinů s afinitou ke GSH byly následně analyzovány MS.



Obrázek 10: Orientační schéma postupu práce s buněčnou linií.

4.1 Extrakce proteinů z buněčných linií a primárních kultur

Buněčné linie a primární kultury byly dodány 1. lékařskou fakultou Univerzity Karlovy v Praze a dále pěstovány a sklizeny na Ústavu molekulární genetiky AV ČR.

4.1.1 Pěstování buněčných linií

Na kultivaci buněčné linie EM-G3 bylo používáno medium H-MEM doplněné neesenciálními aminokyselinami, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ hydrokortizonu, 5 $\mu\text{g/ml}$ insulínu, 10^{-10} M toxinu cholery, 5 ng/ml epidermálního růstového faktoru (EGF), 10% hovězího séra, 2% fetálního hovězího séra, 0,12 g/l pyruvátu sodného, 100 U/ml penicilínu G a 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinu [13,54].

Buněčné linie MCF₇ a MDA-MB₂₃₁ byly pěstovány v mediu H-MEM doplněné 100 U/ml penicilínu G a 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinu, 300 mg/l glutaminu, 10% hovězího séra a 2% fetálního hovězího séra.

V mediu H-MEM doplněné 100 U/ml penicilínu G a 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinu, 300 mg/l glutaminu, 10% hovězího séra a 5% fetálního hovězího séra byla kultivována buněčná linie HCC 1937.

4.1.2 Pěstování primárních kultur

Primární kultury BRCA11, BRCA 14, BRCA 16, BRCA 17 a L 190 jsou odvozeny z nádoru prsu. NME buňky byly získány ze zdravé prsní tkáně při plastické operaci prsu. Zdravá tkáň byla zpracována stejným způsobem jako rakovinná tkáň na Ústavu molekulární genetiky AV ČR.

Tkáň (0,3 cm³) byla nastříhána na malé kousky a enzymaticky rozvolněna kolagenázou A (Roche, Penzberg, Germany) při 37°C. Získané buňky byly nasety do kultivační lahvičky obsahující jeden den starý porost smrtelně ozářených NIH 3T3 (tzv. „feeder“) buněk (100 Gy; $2,5 \times 10^4$ buněk na cm²) [13].

Kultivační medium H-MEM bylo doplněno neesenciálními aminokyselinami, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ hydrokortizonu, 5 $\mu\text{g/ml}$ insulínu, 10^{-10} M toxinu cholery, 5 ng/ml EGF, 10% hovězího séra, 2% fetálního hovězího séra, 0,12 g/l pyruvátu sodného, 100 U/ml penicilínu G a 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinu [13,54].

4.1.3 Sklizení a lyze buněk

Narostlé buňky byly dvakrát promyty pufrům PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,8mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄, pH 7,3) a krátce opláchnuty v 3 ml pufru PBS, do kterého byl přidán 1,5 mg trypsinu a 0,66 mg EDTA pro uvolnění přisedlých buněk. Následně bylo přidáno 5 ml media H-MEM doplněné sérem pro zastavení enzymové aktivity trypsinu a buňky byly centrifugovány při 800 g po dobu 10 minut.

Sedimenty byly třikrát promyty pufrům PBS, poté byl pufr odfiltrován a k buňkám byl přidán lyzační pufr (0,1% CHAPS, 20mM Tris, 0,1M NaCl, 0,25M sacharosa, 5mM DTT a inhibitory proteas, pH 8,0). Pufru bylo používáno 60 μ l na 10⁶ buněk, inhibitorů proteas 1 μ l na 10⁶ buněk. Lyzát byl homogenizován teflonovým homogenizátorem, v průběhu 30 minut sonikován v lázni s ledem (3 x 3 sec.) a centrifugován při 4°C, 9 000 g (Jouan CR3i, rotor AC 1.14) po dobu 10 minut. Supernatant byl odebrán a sediment znovu homogenizován v lyzačním pufru (10 μ l na 10⁶ buněk), sonikován v lázni s ledem (1 x 3 sec.) a centrifugován při 4°C, 9 000 g (Jouan CR3i, rotor AC 1.14) po dobu 5 minut. Supernatant byl přidán k prvnímu odebranému a spojené supernatanty byly centrifugovány při 4°C, 16 000 x g (Jouan CR3i, rotor AC 1.14) po dobu 20 minut [13,54]. Získaný supernatant byl považován za konečný buněčný extrakt, se kterým bylo dále pracováno, jak je popsáno níže.

4.2 Stanovení množství proteinů

V extraktu z buněk byl stanoven obsah proteinů podle Bradfordové [55]. Na spektrofotometru (Jenway 6105 U.V./VIS.) byl každý buněčný lyzát či roztok proteinů měřen třikrát při vlnové délce 595 nm. Z těchto tří hodnot byl vypočten průměr jako konečná hodnota. Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí hovězího sérového albuminu (BSA) pro rozmezí koncentrací 0 μ g/ μ l až 10 μ g/ μ l.

Po stanovení množství proteinů byly vzorky zamrazeny na -70°C [54].

4.3 Afinitní chromatografie

Chromatografie probíhala na koloně Glutathion Sepharose 4B (pH 7,3) při 4°C.

4.3.1 Příprava kolony Glutathion Sepharosy 4B

Nosič uchovaný v 20% ethanolu byl pomíchán a 2 ml byly nality do kolony (rozměry nosiče v koloně byly 1x1,5 cm). Po ustálení nosiče byla kolona ekvilibrována 15 ml pufru PBS (při 4°C) s přidanými 7,5 µl inhibitorů proteas.

4.3.2 Aplikace vzorku a průběh chromatografie

Na ekvilibrovanou kolonu byl nanesen lyzát z 11-12 milionů homogenizovaných buněk. Proteiny byly inkubovány na koloně 1 hodinu za stálého míchání.

Po aplikaci vzorku byla kolona promyta 10 ml pufru PBS s přidanými 5µl inhibitorů proteas a 5mM DTT. Byly jímány frakce o objemu 0,5-1 ml. V jednotlivých frakcích bylo sledováno množství proteinů měřením absorbance při 280 nm (spektrofotometr Jenway 6105 U.V./VIS.) a jejich objem.

4.3.3 Eluce

Kolona byla inkubována po nanesení 1 ml elučního pufru (10mM Tris/HCl, 0,5 µl inhibitorů proteas, pH 8,0) s přidaným 5mM GSH při 4°C po dobu 30 minut. Následně byly proteiny interagující s GSH eluovány 10 ml elučního pufru s přidaným 5mM GSH. Eluované frakce byly jímány o objemu 0,5-1 ml. V jednotlivých frakcích bylo sledováno množství proteinů měřením absorbance při 260 nm (spektrofotometr Jenway 6105 U.V./VIS.), celková aktivita GST a jejich objem. Analyzovány byly metodou SDS-PAGE.

4.3.4 Regenerace kolony

Kolona byla regenerována střídáním 3 ml bazického pufru (0,1M Tris/HCl, 0,5M NaCl, pH 8,5) a 3 ml kyselého pufru (0,1M NaCOOH, 0,5M NaCl, pH 4,5). Tento cyklus byl opakován čtyřikrát. Následně byla kolona promyta 6 ml pufru PBS, 6 ml 70% ethanolu a ihned 7 ml pufru PBS.

Kolona byla uchovávána v 20% ethanolu při 4°C.

4.4 Ultrafiltrace

Vybrané frakce proteinů nezachycených na koloně a vybrané frakce specificky eluované byly spojeny, zahuštěny a odsoleny v ultrafiltračních zkumavkách (centrifugal filter devices, Amicon, USA) na centrifuze (Jouan CR3i., rotor AC 1.14) na přibližně 50 μ l. V tomto objemu byla změřena aktivita GST. Poté byla zkumavka propláchnuta 300 μ l rehydratačního lyzačního roztoku (RLB) (7M močovina, 2M thiomočovina, 2% CHAPS, 0,8% amfolity pH 3-10) s přidaným 50mM DTT z důvodu minimalizace ztrát během ultrafiltrace.

4.5 Stanovení enzymových aktivit

Enzymová aktivita se standardně vyjadřuje v jednotkce (U), což je množství enzymu, které přemění 1 μ mol substrátu za 1 minutu za standardních podmínek (pH optimum enzymu a 25°C). Koncentrace enzymu se často vyjadřuje v aktivitě vztážené na jednotku objemu, tedy (U/ml). Specifická aktivita je aktivita vztážená na množství proteinů (U/mg), která udává míru čistoty enzymového preparátu [56].

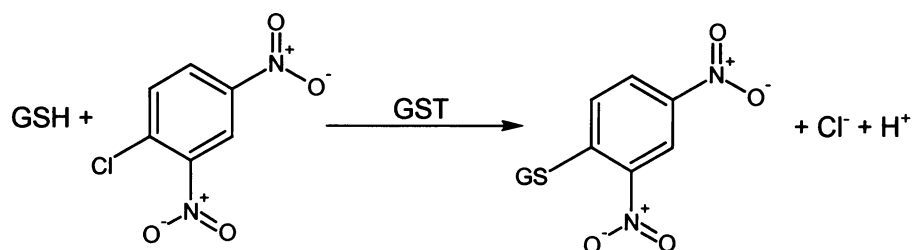
4.5.1 Stanovení enzymové aktivity glutathion S-transferas

Pro stanovení enzymové aktivity GST byl substrátem 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), který za pomoci GST tvořil konjugát s GSH. Reakci vystihuje *obrázek 11* (str. 39). Do křemenné kyvety bylo napipetováno 1890 μ l pufru pro měření enzymové aktivity (50mM KH_2PO_4 , 50mM K_2HPO_4 , pH 6,6), 50 μ l 1mM GSH a 50 μ l 1mM CDNB v methanolu. Roztok byl promíchán a při laboratorní teplotě za stálého míchání inkubován po dobu 10 minut. Následně bylo do roztoku přidáno 10 μ l vzorku a okamžitě byla měřena časová změna absorbance při 340 nm a 25°C po dobu 5 minut za stálého míchání na spektrofotometru (Perkin Elmer, Lambda 25 UV/VIS).

Poté byla ze získaných hodnot spočtena aktivita GST (mU/ml), celková aktivita (U) a specifická aktivita (mU/mg). Pro výpočet byl použit následující vzorec:

$$a_{GST} = \frac{(\Delta A_{340nm} / \text{min} TEST - \Delta A_{340nm} / \text{min} BLANK) R}{\epsilon} \quad (mU / ml)$$

kde R je faktor ředění v určitém konkrétním případě a ε je molární extinkční koeficient mezi CDNB-GSH při 340 nm, který je $0,0096 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ [57].



Obrázek 11: *Reakce, která probíhá při měření aktivity GST. Interakce mezi glutathionem a CDNB je naprosto závislá na přítomnosti aktivní GST [20,58].*

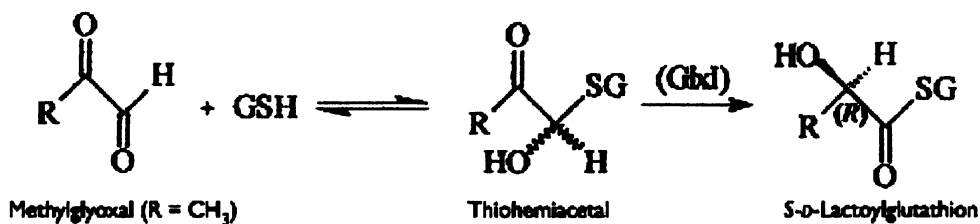
4.5.2 Stanovení enzymové aktivity glyoxalasy I

Pro stanovení enzymové aktivity GLO I byl substrátem thiohemiacetal, který vzniká neenzymaticky z methylglyoxalu a GSH. GLO I katalyzovala přeměnu thiohemiacetalu na S-D-laktoylglutathion. Reakci vystihuje *obrázek 12* (str. 40). V křemenné kyvetě bylo smícháno 1885 μl fosfátového pufru (50mM KH_2PO_4 , 50mM K_2HPO_4 , pH 6,6), 53 μl 65mM methylglyoxalu a 53 μl 65mM GSH. Takto připravený roztok byl za stálého míchání inkubován při laboratorní teplotě po dobu 10 minut, za kterou se vytvořil hemithioacetal. Poté bylo do roztoku přidáno 10 μl vzorku, roztok byl promíchán a ihned následovalo měření časové závislosti změny absorbance při 240 nm. Stanovení enzymové aktivity glyoxalasy I (GLO I) probíhalo na spektrofotometru (Perkin Elmer, Lambda 25 UV/VIS) při 25°C po dobu 10 minut.

Pro výpočet enzymové aktivity byl použit vzorec:

$$a_{GLOI} = \frac{(\Delta A_{240nm} / \text{min} TEST - \Delta A_{240nm} / \text{min} BLANK) R}{\varepsilon} \quad (mU / ml)$$

kde R je faktor ředění a ε je molární extinkční koeficient S-D-laktoylglutathionu při 240 nm, který je $0,00337 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ [59].



Obrázek 12: *GLO 1* (zde jako *GlxI*) katalyzuje vznik *S-D*-laktátglutathionu z thiohemiacetalu, který vzniká neenzymaticky z methylglyoxalu a *GSH* [34].

4.6 Elektroforetické metody

V této práci byla použita elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), kde byly molekuly proteinů rozděleny podle jejich molekulových hmotností (M_r), a dvourozměrná elektroforéza (2-DE), kde byly molekuly proteinů výsledně rozděleny na základě jejich izoelektrického bodu (pI) a zároveň jejich M_r .

4.6.1 SDS-PAGE

SDS-PAGE byla provedena dle Laemmliho [60]. Analytický gel o rozměrech 8 x 8 x 0,1 cm byl připraven z 12% dělicího gelu (pH 9,1) a 4% zaostřovacího gelu.

Analytické gely byly provedeny pro orientační zjištění přítomnosti proteinů ve vybraných frakcích získaných z afinitní chromatografie. Z roztoku eluovaných proteinů vybraných frakcí bylo odebráno 15 μl a smícháno s 10 μl vzorkového pufru (4% SDS, 10% β -merkптоethanol, 20% glycerol, 0,1% Brilliant Blue G-250, 0,124M Tris/HCl, pH 6,8). Vzorky proteinů byly denaturovány při 100°C po dobu 5 minut. Bylo aplikováno 25 μl vzorku do jamky. Elektroforéza probíhala v elektrodovém pufru (0,1% SDS, 0,192M glycin, 0,025M Tris, pH 8,3) prvních 10 minut při napětí 120V, následně při 200 V dalších 50-60 minut.

Preparativní gel o rozměrech 20 x 11 x 0,15 cm byl taktéž připraven z 12% dělicího gelu (pH 9,1) a 4% zaostřovacího gelu.

Ultrafiltrovaný roztok eluovaných proteinů o neznámé koncentraci byl smíchán s RLB s přidaným 50mM DTT do výsledného objemu 300 μl . Do 150 μl takto připraveného roztoku bylo přidáno 15 μl glycerolu a 1 μl 1% roztoku bromfenolové modři. Výsledných 166 μl roztoku proteinů bylo aplikováno do jamky. Elektroforetická separace probíhala

v systému PROTEAN II xi Cell za použití zdroje POWER PAC 1000 v elektrodovém pufru za podmínek uvedených v *tabulce 2*. Elektroforéza byla zastavena ve chvíli, kdy linie bromfenolové modři dosáhla spodního okraje gelu.

Tabulka 2: Podmínky elektroforetické separace v prostředí SDS platné pro 1 gel.

<i>krok</i>	<i>limitní napětí (V)</i>	<i>proud (mA)</i>	<i>čas (hod)</i>
1	1 000	16	1
2	1 000	24	5
3	20	5	10-15
Po třetím kroku bylo manuálně nastaveno 24 mA na jeden gel.			

4.6.2 Dvourozměrná elektroforéza

4.6.2.1 Izoelektrická fokusace

Příprava vzorků na izoelektrickou fokusaci

Mikrozkumavka s buněčným extraktem smíchaným s RLB po afinitní chromatografii byla rozmrazena. Roztok byl smíchán s RLB s přidaným 50mM DTT tak, aby výsledná koncentrace proteinů byla 15 µg/150 µl na malý „IPG strip“ a 70 µg/330 µl na velký „IPG strip“ určený na analytický gel. Na velký „IPG strip“, určený na preparativní gel, byl použit celý ultrafiltrovaný objem proteinů získaný po afinitní chromatografii, který byl smíchán s RLB s přidaným 50mM DTT do výsledného objemu 330 µl. Redukční činidlo DTT bylo přidáno těsně před použitím. Takto připravené vzorky proteinů byly míchány za laboratorní teploty po dobu 1 hodiny a poté ihned použity pro IEF.

Pro rozdělení proteinů na základě jejich pI byly použity 7 cm nebo 18 cm „IPG stripy“ s lineárním rozpětím pH 3-10.

Aktivní rehydratace za přítomnosti vzorku

Vzorek proteinů s RLB a DTT byl nanesen do příslušného žlábků desky určené na IEF a poté byl na vzorek pomocí pinzet položen „IPG strip“ gelem dolů. Vzorek byl ponechán stát 40 minut při laboratorní teplotě a následně převrstven 2 ml (pro 18 cm „IPG stripy“) nebo 1 ml (pro 7 cm „IPG stripy“) minerálním olejem (Bio-Rad). Aktivní

rehydratace probíhala 12 hodin při teplotě 20°C a napětí 50 V v přístroji pro izoelektrickou fokusaci PROTEAN IEF Cell.

Po skončení rehydratace byl „IPG strip“ v místě elektrod podložen proužky filtračního papíru (Electrode wicks, Bio-Rad) navlhčenými 8 μ l MilliQ. Následná izoelektrická fokusace probíhala podle rozpisu v *tabulce 3a)* nebo *3b)*. Po ukončení izoelektrické fokusace bylo udržováno napětí 500 V, aby proteiny zůstaly rozdělené, než byl přístroj vypnut. Průměrně bylo dosahováno hodnoty kolem 75 000 Vh u 18 cm „IPG stripů“ a 18 000 Vh u 7 cm „IPG stripů“. „IPG strip“ byl ihned použit na elektroforetickou separaci, nebo v čistém platě zamrazen na -70°C.

Tabulka 3: Podmínky izoelektrické fokusace

a) pro 18 cm „IPG strip“

<i>krok</i>	<i>počáteční napětí (V)</i>	<i>konečné napětí (V)</i>	<i>čas (hod)</i>	<i>teplota (°C)</i>
1	250	250	1	20
2	250	500	1	20
3	500	1 000	2	20
4	1 000	10 000	3	20
<i>krok</i>	<i>napětí (V)</i>	<i>volthodin (Vh)</i>	<i>čas (hod)</i>	<i>teplota (°C)</i>
5	10 000	40 000	teor. 4	20
6	500		až 99	20

b) pro 7 cm „IPG strip“

<i>krok</i>	<i>počáteční napětí (V)</i>	<i>konečné napětí (V)</i>	<i>čas (hod)</i>	<i>teplota (°C)</i>
1	150	150	1	20
2	150	500	1	20
3	500	750	1	20
4	4 000	4 000	2	20
<i>krok</i>	<i>napětí (V)</i>	<i>volthodin (Vh)</i>	<i>čas (hod)</i>	<i>teplota (°C)</i>
5	4 000	10 000	teor. 2,5	20
6	500		až 99	20

4.7 Elektroforetická separace proteinů

Příprava gelů

Elektroforéza byla prováděna v polyakrylamidovém gelu o tloušťce 1 mm a rozměrech 19 x 22 cm nebo 8 x 8 cm . Dělicí gely pro analytické i preparativní účely byly z 12% polyakrylamidového gelu (pH 9,1). Velké gely byly nalévány po čtyřech v nádobě „MP3 MULTI-GEL CASTING CHAMBER“, malé gely jednotlivě.

Dělicí gel byl po nalití převrstven 1,5 ml 50% methanolu a nechán polymerovat při laboratorní teplotě. Poté byl nalit 4% zaostřovací gel, do něhož byl zasunut hřeben pro vytvoření komůrky pro „IPG strip“ a standardy. Zaostřovací gel polymeroval taktéž při laboratorní teplotě.

Ekvibrace

„IPG strip“ s rozdělenými proteiny byl převrstven 2,5 ml (pro 18 cm „IPG stripy“) nebo 1,5 ml (pro 7 cm „IPG stripy“) ekvilibračního pufru (6M močovina, 20% glycerol, 2% SDS a 0,05M Tris/HCl, pH 8,8) s 2% DTT a nechán 30 minut inkubovat, aby došlo k redukci S-S můstků. Poté byl roztok vylit a „IPG strip“ byl převrstven 2,5 ml (pro 18 cm „IPG stripy“) nebo 1,5 ml (pro 7 cm „IPG stripy“) ekvilibračního pufru s 2,5% iodoacetamidem a inkubován dalších 30 minut za účelem alkylace volných –SH skupin. Nakonec bylo do žlábků s iodoacetamidem přidáno 5 μ l (pro 18 cm „IPG stripy“) nebo 1,5 μ l (pro 7 cm „IPG stripy“) 1% roztoku bromfenolové modři na 2-3 minuty.

Průběh elektroforézy

„IPG strip“ byl opláchnut v elektrodovém pufru, pomocí pinzet položen do vzniklé komůrky v zaostřovacím gelu a převrstven roztokem ReadyPrep Overlay Agarose (Bio-Rad) až do zaplnění komůrky. Takto připravené gely byly na několik minut ponechány při – 4°C, aby agarosa ztuhla.

Elektroforetická separace velkých gelů probíhala v systému PROTEAN II xi Cell za použití zdroje POWER PAC 1000 v elektrodovém pufru za podmínek uvedených v *tabulce 4 a*) (str. 44).

Elektroforéza malých gelů probíhala v systému Mini-PROTEAN 3 Cell se stejným zdrojem a elektrodovým pufrem za podmínek uvedených v *tabulce 4 b*) (str. 44).

Tabulka 4: Podmínky elektroforetické separace 2 gelů za použití

a) 18 cm „IPG stripů“ a konstantního proudu

<i>krok</i>	<i>limitní napětí (V)</i>	<i>proud (mA)</i>	<i>čas (hod)</i>
1	1 000	32	1
2	1 000	48	5
3	20	5	10-15

Po třetím kroku bylo manuálně nastaveno 24 mA na jeden gel.

b) 7 cm „IPG stripů“ a konstantního napětí

<i>krok</i>	<i>napětí (V)</i>	<i>limitní proud (mA)</i>	<i>čas (min)</i>
1	120	500	10
2	200	500	50-60

Elektroforéza byla zastavena ve chvíli, kdy linie bromfenolové modři dosáhla spodního okraje gelu.

4.7.1 Detekce proteinů v gelu a jejich vyhodnocení

Analytické gely byly barveny pomocí AgNO₃ dle Bluma [55]. Preparativní gely byly barveny Coomassie® Brilliant Blue G-250 [61].

Obarvené gely byly převedeny do elektronické podoby pomocí kalibrovaného denzitometru GS 800 Calibrated Densitometer při rozlišení 400 dpi. Získaná data byla zpracována vizuálně pomocí metody tzv. „vytváření souhvězdí“. Jedná se o spojování výrazných proteinových skvrn v obrazu 2-DE gelu. Následně je porovnávána intenzita těchto skvrn a rozmístění slabších skvrn v jejich okolí. Jde o subjektivní metodu, která je ovšem rychlá, účinná a zároveň přesná.

Obrazy 2-DE gelů byly zároveň analyzovány v počítačovém programu PDQuest Advanced- 8.0.1. Ve vytvořeném analytickém souboru „match-set“ byly programem detekovány proteinové skvrny a vzájemně přiřazeny ve skupinách gelů. Kvantifikace proteinových skvrn byla normalizována na intenzitu všech detekovaných skvrn v daném gelu. Přiřazení proteinových skvrn bylo manuálně kontrolováno a v případě nutnosti

upraveno. Pro detekci velkých proteinových skvrn s nepravidelným tvarem byla využita funkce umožňující vybrat obrys skvrny a kvantifikovat ji jako celek.

4.8 Identifikace proteinů

4.8.1 Štěpení proteinů v gelu

Z preparativních 2-DE či SDS-PAGE gelů byly vyříznuty vybrané proteinové skvrny či pruhy, které byly následně odbarvovány v 200 μ l roztoku obsahujícím 25mM uhličitán amonný a 50% acetonitril (ACN). V mikrozkuhavce byly 30 minut zahřívány v termostatu s mícháním (Thermomixer comfort, Eppendorf, Německo) nastaveného na 30°C a poté byl odebrán odbarvovací roztok. Odbarvovací postup byl opakován, dokud nebyly vyříznuté skvrny zcela zbaveny modrého zabarvení způsobeného Coomassie Blue G-250. Následně proběhlo sušení gelu v 200 μ l 100% ACN a termostatu za míchání při 30°C po dobu 5 minut. Roztok byl odebrán a gel byl dále sušen v termostatu, dokud se zbylý ACN neodpařil. K vysušeným proteinovým vzorkům bylo přidáno 20 μ l 25mM uhličitánu amonného a 0,4 μ g trypsinu (Trypsin Gold Mass Spektrometry Grade, Promega). Dalších 8 hodin probíhalo v termostatu za stálého míchání štěpení při 37°C.

Supernatant nad gelem byl odebrán do čisté mikrozkuhavky. Následovala extrakce peptidů z gelu, ke kterému bylo přidáno 30 μ l 2% TFA a 20 μ l 60% ACN. Roztok s gelem byl promíchán, 10 minut sonikován v lázni s ledem. Supernatant byl odebrán a přemístěn do mikrozkuhavky. Ke gelu bylo přidáno dalších 20 μ l 2% TFA a 30 μ l 60% ACN. Roztok byl znovu promíchán, sonikován a supernatant odebrán do mikrozkuhavky, jak bylo popsáno výše. Naposledy bylo ke gelu přidáno 50 μ l 60% ACN a znovu proběhlo promíchání, sonikace a odebrání supernatantu. Spojené supernatanty byly v mikrozkuhavce zahuštěny na „speedvac“ (Thermo Fisher Scientific, USA) na objem přibližně 10 μ l.

K takto připraveným peptidům bylo přidáno 15 μ l 0,1% TFA a byly podrobeny analýze pomocí LTQ-ORBITRAP hmotnostního spektrometru (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.8.2 Štěpení proteinů v roztoku

Ze spojených a ultrafiltrovaných frakcí proteinů s afinitou ke GSH získaných z afinitní chromatografie na koloně GSH Sepharose 4B (pH 7,3) bylo odebráno 15 μ l z každé buněčné linie. Proteiny byly smíchány s 22,5 μ l 25mM uhličitanu amonného, 2,25 μ l 100mM DTT a objem byl doplněn MilliQ na konečných 40,5 μ l. Připravený roztok byl inkubován 5 minut při 95°C a následně nechán za laboratorní teploty do ustálení jeho teploty. Po přidání 4,5 μ l 100mM jodoacetamidu byl roztok ve tmě inkubován 20 minut při laboratorní teplotě. Dále byly přidány 0,8 μ g trypsinu (Trypsin Gold Mass Spektrometry Grade, Promoga) a roztok byl inkubován při 37°C v termostatu za stálého míchání přes noc. Před analýzou na LTQ-ORBITRAP hmotnostním spektrometru bylo do roztoku přidáno 15 μ l 0,1% TFA.

4.8.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla měřena v laboratoři hmotové spektrometrie ÚOCHB AV ČR za pomoci Mgr. Miloslava Šandy.

Analýza byla provedena metodou LC-MS/MS pomocí LTQ-ORBITRAP hmotnostního spektrometru (Thermo Fisher Scientific, USA) spojeného s dvourozměrnou kapilární chromatografií Rheos 2000 (Flux Instruments). První chromatografický rozměr proběhl pomocí kolony Symetry C18 (180 μ m x 20 mm x 3 μ m, Waters), na které došlo k oddělení peptidů od interferujících látek. Druhý rozměr proběhl pomocí kolony PepMap C18 (75 μ m x 150 mm x 3 μ m, LC Packings), kde proběhlo rozdělení peptidové směsi. Hmotnostní spektrometr pracoval v režimu „DDA skenu“, což znamená daty podporovaný MS/MS experiment složený z jednoho plného MS spektra (rozlišení 60 000) a následně ze třech MS/MS experimentů (rozlišení 7 500) vícenásobně nabitých iontů (2krát nebo 3krát), které měly v plném spektru maximální odezvu. Hmotnosti identifikovaných peptidů byly potvrzeny nejméně třemi fragmentačními ionty. Sekvence proteinů byly vyhledávány v databázi Uniprot pomocí Bioworks Browser 3.3.1 SP1 a Sequest 2.0 software (Thermo Fisher Scientific, USA), které byly vymezeny pouze na lidské proteiny.

5 VÝSLEDKY

5.1 Extrakce proteinů z buněčných linií a primárních kultur

Buněčný materiál, který byl lyzován a se kterým bylo dále pracováno, obsahoval v buněčných liniích EM-G3 a MDA-MB₂₃₁ vždy 12 milionů buněk, v buněčných liniích HCC 1937 a MCF₇ vždy 11 milionů buněk a v primárních kulturách 2-3 milionů buněk.

5.1.1 Stanovení množství proteinů

V buněčném materiálu bylo stanoveno množství proteinů podle Bradfordové [55]. Sledována byla koncentrace proteinů v průběhu celé práce, tedy v lyzátu z jednotlivých buněčných linií, ve spojených a ultrafiltrovaných frakcích proteinů bez afinity ke GSH a spojených a ultrafiltrovaných frakcích proteinů s afinitou ke GSH. Vzhledem k velmi nízké koncentraci proteinů ve frakcích s afinitou ke GSH je toto stanovení uváděno jen jako přibližné (označené symbolem „~“). Další stanovení, vyplývající z tohoto, jsou taktéž označeny symbolem „~“.

Množství proteinů bylo také stanoveno v 9 různých primárních kulturách reprezentujících jak zdravou (označenou NME), tak rakovinnou (označenou BRCA, která má mutaci tumor supresorového genu BRCA 1, nebo L 190) prsní tkáň. Výsledné změřené hodnoty koncentrací bílkovin jsou shrnuty v *tabulkách 5A, 5B, 5C* (str. 48).

Dle změřených hodnot je v buněčné linii HCC 1937 oproti ostatním buněčným liniím přibližně dvojnásobné množství proteinů. V případě primárních kultur je výrazně nižší množství proteinů v lyzátu rakovinné primární kultury BRCA 14 a také v primární kultuře zdravé prsní tkáně NME 23. Při porovnání tabulky 5A a C zjistíme, že po afinitní chromatografii a ultrafiltraci nám zůstala přibližně polovina proteinů, které byly na kolonu naneseny.

Tabulka 5A: Koncentrace bílkovin v lyzátech buněčných linií.

Buněčná linie	Koncentrace proteinů (μg/μl)	Celková koncentrace proteinů (μg)
EM-G3 – lyzát	1,68	1431,4
HCC 1937 – lyzát	4,63	3616,0
MDA-MB ₂₃₁ - lyzát	1,93	1644,4
MCF ₇ - lyzát	2,75	2147,8

Tabulka 5B: Koncentrace bílkovin v lyzátech primárních kultur.

Primární kultura	Koncentrace proteinů (μg/μl)
BRCA 11	2.10
BRCA 14	0.45
BRCA 16	3.55
BRCA 17	3.00
NME 23	1.55
NME 35	3.10
NME 36	3.40
L 190	3,00

Tabulka 5C: Koncentrace bílkovin ve frakcích po afinitní chromatografii na koloně Glutathion Sepharosy 4B. Vzhledem k nízké koncentraci proteinů ve frakcích proteinů s afinitou ke GSH je tato hodnota pouze přibližná.

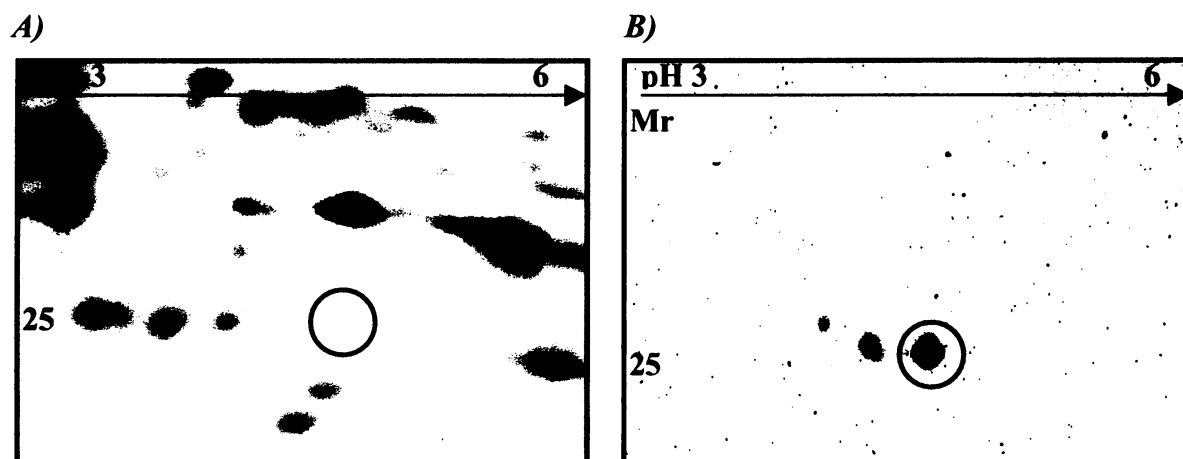
Frakce proteinů po afinitní chromatografii	Koncentrace proteinů (μg/μl)	Celková koncentrace proteinů (μg)
EM-G3 – bez afinity k GSH	16,17	808,5
EM-G3 – s afinitou k GSH	~ 0,26	~ 13
HCC 1937 – bez afinity k GSH	30,16	1508,0
HCC 1937 – s afinitou k GSH	~ 0,26	~ 13
MDA-MB ₂₃₁ - bez afinity k GSH	15,87	793,5
MDA-MB ₂₃₁ - s afinitou k GSH	~ 0,27	~ 13,5
MCF ₇ - bez afinity k GSH	12,38	619
MCF ₇ - s afinitou k GSH	~ 0,26	~ 13

5.2 Separace proteinů pomocí afinitní chromatografie na koloně GSH Sepharose 4B

Afinitní chromatografie byla využita za účelem selektivní prefrakcionace buněčného lyzátu. Aby bylo možné v gelech po dvojrozměrné elektroforetické separaci detekovat a dále vyhodnocovat proteinové skvrny, bylo nutno tyto proteiny oddělit od ostatních v buňce se vyskytujících proteinů. Poté s nimi bylo možno pracovat samostatně.

5.2.1 Optimalizace afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie byla nejprve provedena pro všechny buněčné linie na jedné koloně s nosičem GSH Sepharosa 4B, který byl mezi jednotlivými afinitními chromatografiemi regenerován dle návodu doporučeném k tomuto nosiči. Kolonka tedy byla regenerována promytím 3 ml bazického pufru (0,1M Tris/HCl, 0,5M NaCl, pH 8,5) a 3 ml kyselého pufru (0,1M NaCOOH, 0,5M NaCl, pH 4,5), kdy tento cyklus byl opakován čtyřikrát. Z *obrázku 13 A) a B)* (str. 50) je zřejmé, že tento postup regenerace je v tomto případě nedostatečný, protože proteiny nevyskytující se ani v buněčném lyzátu se objevují ve frakcích s afinitou ke GSH. Proteinová skvrna, přítomná na *obrázku 13 b)* (str. 50), je výsledkem nedostatečné regenerace kolony mezi jednotlivými afinitními chromatografiemi. Proteiny zůstaly vázané na koloně a eluovaly se až v příští chromatografii. Z těchto důvodů byla připravena kolona s nosičem GSH Sepharosa 4B pro každou buněčnou linii zvlášť a mezi jednotlivé chromatografie bylo navíc zařazeno promytí PBS a následně ethanolem (viz 4.3.4 regenerace kolony, str. 37). Po tomto opatření byla již kolonka dostatečně regenerována a připravena k dalšímu použití.



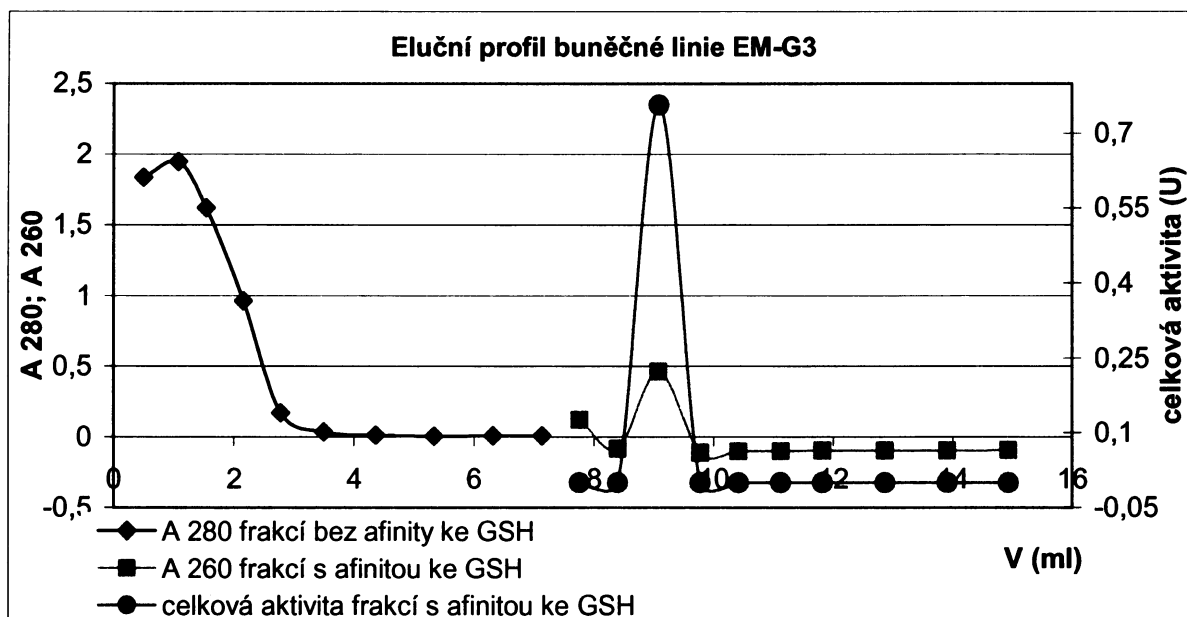
Obrázek 13: Výřezy z 2-D elektroforetického gelu buněčné linie MCF₇. A) lyzátu a B) spojených a ultrafiltrovaných frakcí s afinitou ke GSH. Elektroforéza probíhala na 18 cm „IPG stripech“ v rozmezí pH 3-10.

5.2.2 Průběh afinitní chromatografie

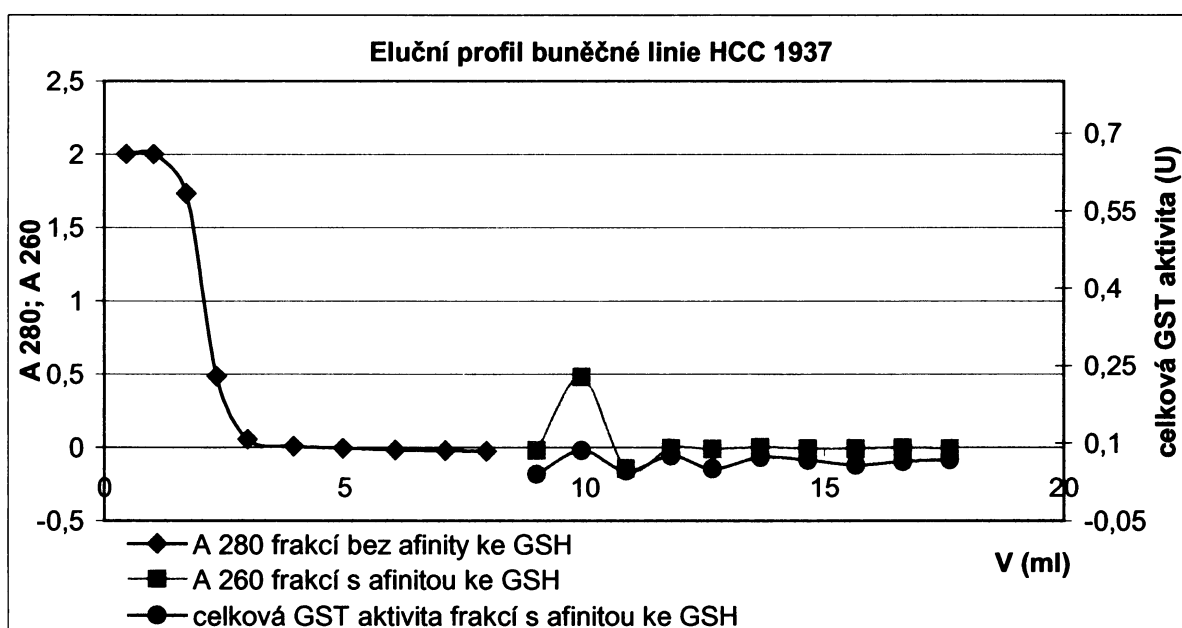
Proměřením objemů a absorbancí byly získány hodnoty, ze kterých byl vytvořen eluční profil. Graficky jsou tyto hodnoty znázorněny na *grafech 1, 2, 3, 4* (str. 51-52).

Absorbance frakcí bez afinity ke GSH byla měřena při 280 nm. Při eluci byl vyměněn pufr PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,8mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄, pH 7,3) za eluční pufr (10mM Tris/HCl, 0,5 μl inhibitorů proteas, pH 8,0) s přidaným 5mM GSH. I přes to, že byl spektrometr překalibrován, hodnoty při vlnové délce 280 nm klesaly do záporných hodnot. Proto se přistoupilo na měření při 260 nm. Nepřítomnost nukleových kyselin, které při 260 nm absorbují, byla ověřována pomocí poměru A_{280}/A_{260} (výsledky nejsou uvedeny). Přítomnost proteinů ve frakcích byla ověřována metodou SDS-PAGE, viz kapitola 5.3 (str. 53).

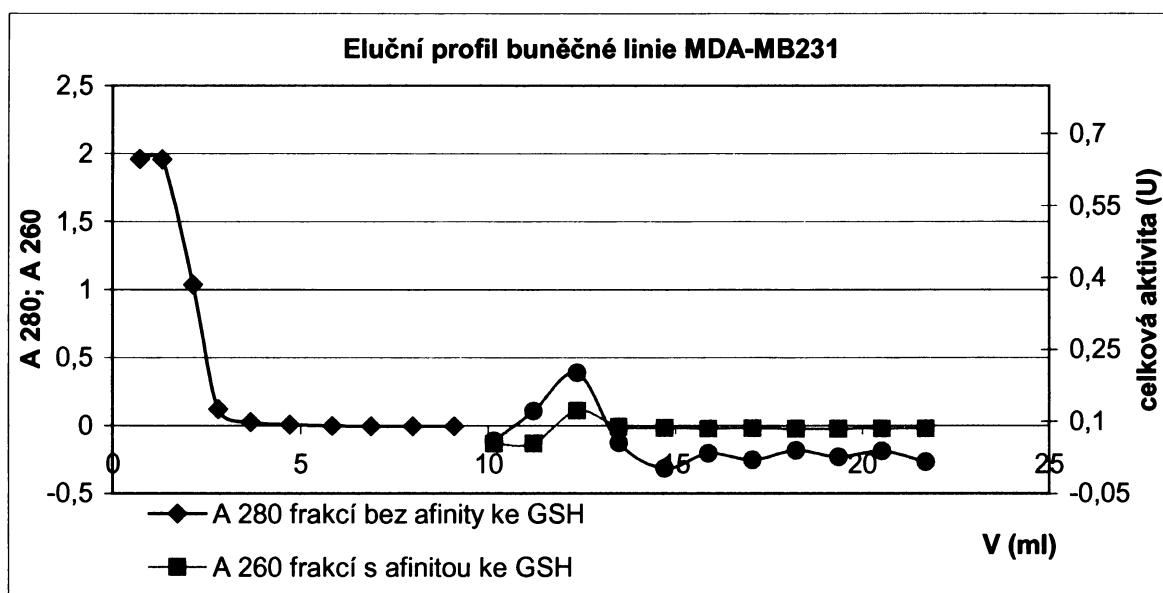
Eluční profily dokumentují rozdělení proteinů. Nejprve došlo k vymytí proteinů, které nemají afinitu ke GSH (modrá křivka) a následně elucí 5mM GSH se z kolony uvolnily proteiny, které se ke GSH na nosiči kolony navázaly (červená křivka). Afinitní chromatografie lyzátní všech buněčných linií probíhaly za stejných podmínek.



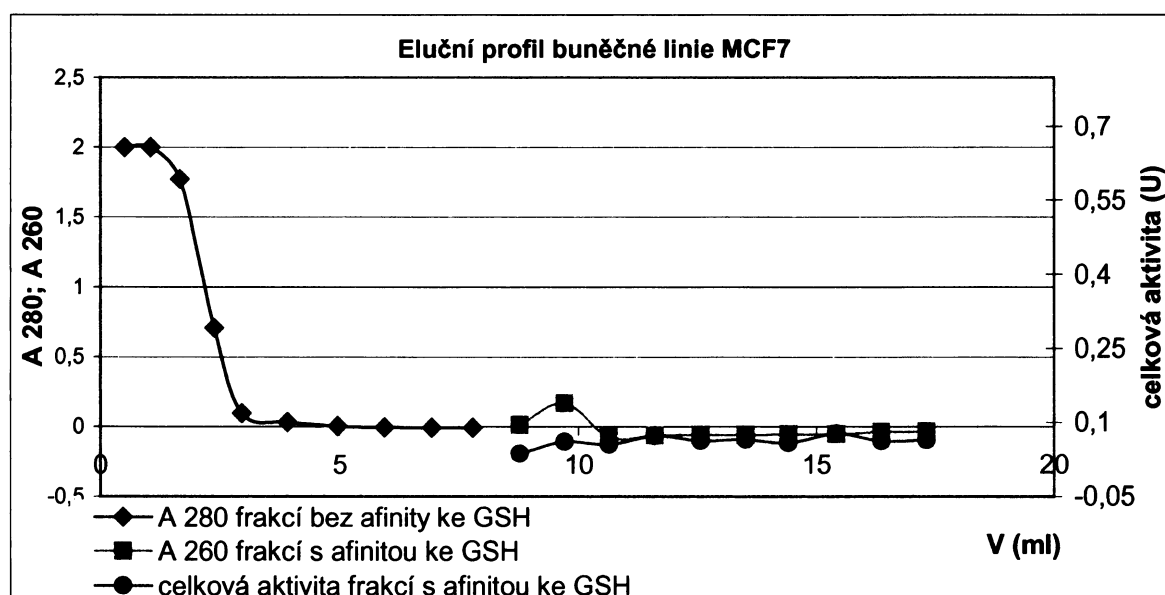
Graf 1: Eluční profil afinitní chromatografie na koloně GSH Sepharose 4B lyzátu buněčné linie EM-G3. Modře jsou označeny frakce, které byly získány při promývání kolony pufrem PBS a červeně frakce, které byly získány elucí 5mM GSH. Zelené body představují celkovou GST aktivitu ve frakcích s afinitou ke GSH.



Graf 2: Eluční profil afinitní chromatografie na koloně GSH Sepharose 4B lyzátu buněčné linie HCC 1937. Modře jsou označeny frakce, které byly získány při promývání kolony pufrem PBS a červeně frakce, které byly získány elucí 5mM GSH. Zelené body představují celkovou GST aktivitu ve frakcích s afinitou ke GSH.



Graf 3: Eluční profil afinitní chromatografie na koloně GSH Sepharose 4B lyzátu buněčné linie MDA-MB₂₃₁. Modře jsou označeny frakce, které byly získány při promývání kolony pufrem PBS a červeně frakce, které byly získány elucí 5mM GSH. Zelené body představují celkovou GST aktivitu ve frakcích s afinitou ke GSH.



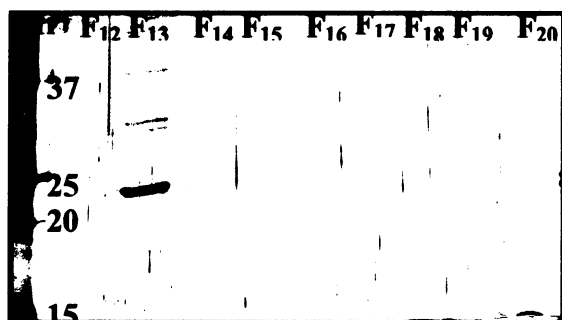
Graf 4: Eluční profil afinitní chromatografie na koloně GSH Sepharose 4B lyzátu buněčné linie MCF₇. Modře jsou označeny frakce, které byly získány při promývání kolony pufrem PBS a červeně frakce, které byly získány elucí 5mM GSH. Zelené body představují celkovou GST aktivitu ve frakcích s afinitou ke GSH.

5.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného

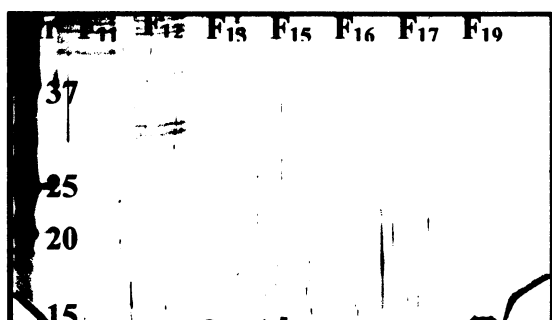
Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) probíhala jako kontrola přítomnosti proteinů ve frakcích z afinitní chromatografie, které byly získány elucí 5mM GSH. Na *obrázcích 14 (str. 54)* jsou zachyceny analýzy SDS-PAGE s vybranými frakcemi. Frakce byly vybírány dle hodnot A_{260} tak, aby z výsledků byla získána ucelená informace o průběhu eluce proteinů interagujících s GSH.

Již z těchto obrázků je patrné, že se v buněčných liniích HCC 1937 a MCF₇ nevyskytuje větší množství proteinů vázajících GSH. Kdežto v buněčných liniích EM-G3 a MDA-MB₂₃₁ je patrný větší výskyt těchto proteinů, obzvláště v oblasti kolem 25 kDa.

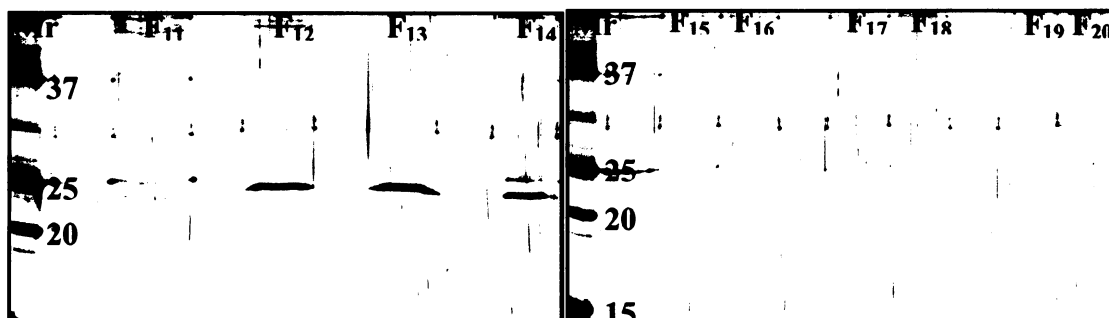
A) buněčná linie EM-G3



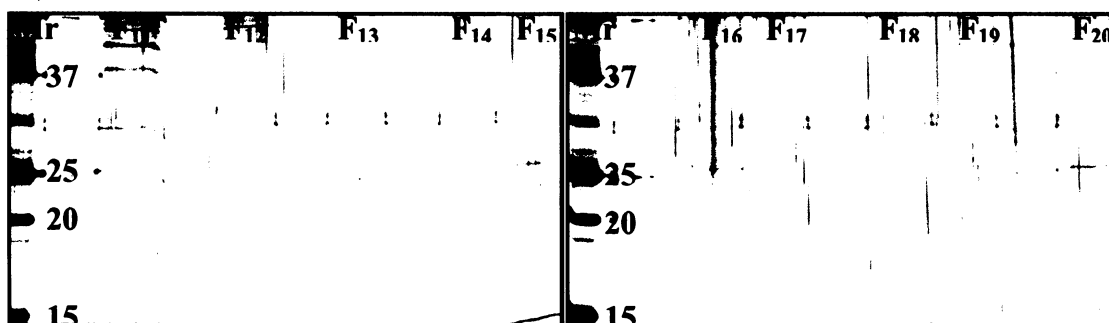
B) buněčná linie HCC 1937



C) buněčná linie MDA-MB₂₃₁



D) buněčná linie MCF₇



Obrázky 14: Elektroforeticky rozdělené vybrané frakce získané během eluce 5mM GSH na koloně GSH Sepharose 4B. Čísla vlevo označují relativní molekulové hmotnosti v kDa dle standardů. Písmeno „F“ s dolním indexem značí číslo vybrané frakce.

5.4 Stanovení aktivity glutathion *S*-transferas v průběhu afinitní chromatografie na koloně GSH Sepharose 4B

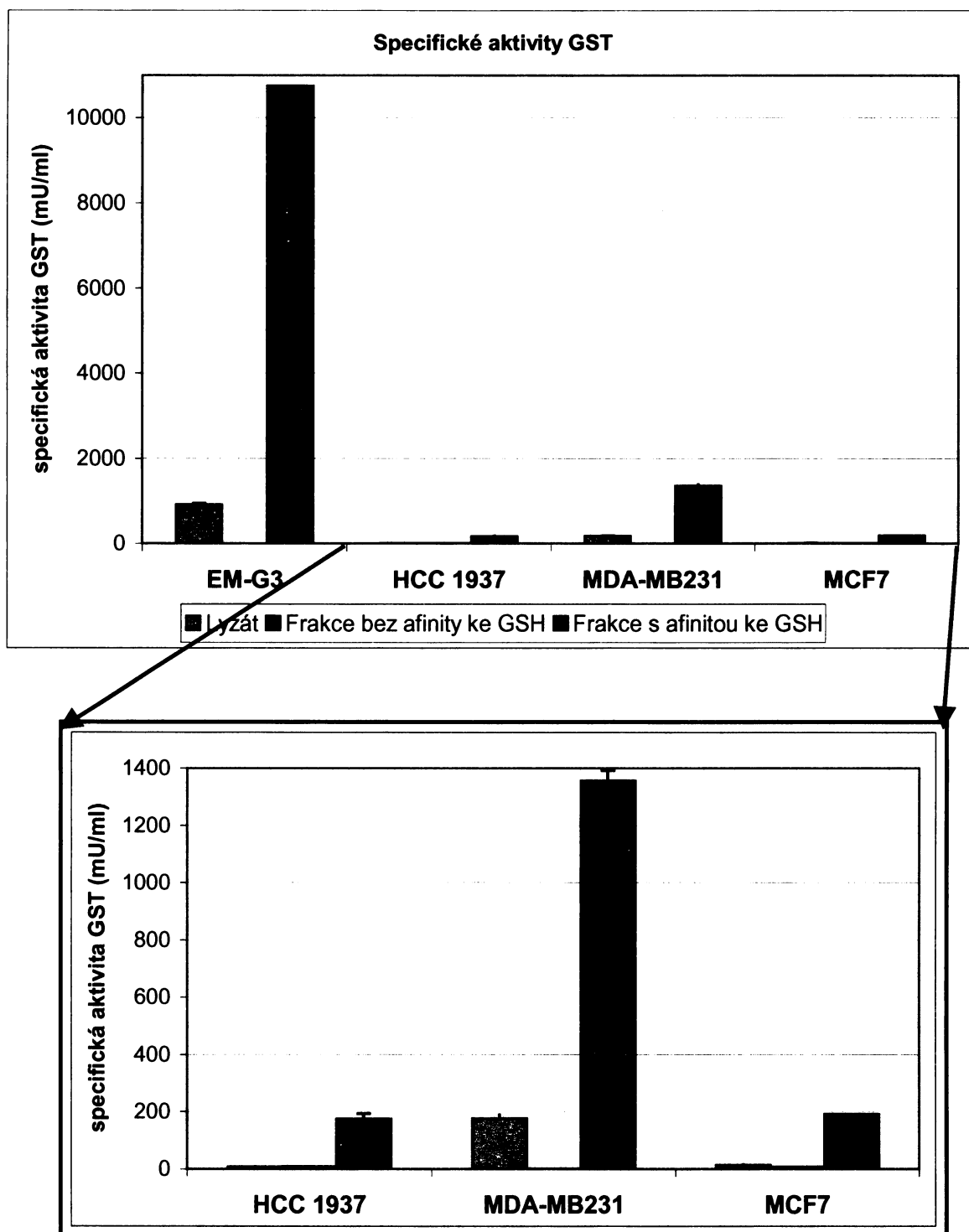
Aktivita GST byla měřena v lyzátech buněčných linií, jednotlivých frakcí z afinitní chromatografie získaných po eluci 5mM GSH, spojených a ultrafiltrovaných frakcí proteinů bez afinity ke GSH a spojených a ultrafiltrovaných frakcí proteinů s afinitou ke GSH (viz kapitola 4.4 Ultrafiltrace, str. 38).

Hodnoty enzymových aktivit GST, získaných z frakcí obsahující proteiny interagující s GSH každé buněčné linie, jsou znázorněny v *grafech 1, 2, 3 a 4* (str. 51-52).

Dále byly měřeny hodnoty aktivit GST v lyzátech buněčných linií, spojených a ultrafiltrovaných frakcí s a bez afinity ke GSH. Tyto údaje a další, z nich vyplývající, uvádí *tabulka 6* (str. 56). Z výsledných hodnot byla vytvořena bilanční tabulka, ze které je patrné určité načištění GSH afinitních proteinů. Hodnota načištění proteinů je pouze přibližná a vzhledem k velmi nízké koncentraci proteinů, která byla obtížně měřitelná, se dá předpokládat, že tato hodnota načištění bude ve skutečnosti větší. Ovšem výtěžky purifikovaných proteinů se pohybují pouze mezi 6-30%. Názornější porovnání je vidět na *grafu 5* (str. 57). Na *grafech* je patrný nárůst specifických aktivit GST ve frakcích proteinů interagujících s GSH, tedy purifikace těchto proteinů.

Tabulka 6: Aktivity GST v lyzátech buněčných linií, ve frakcích s proteiny bez afinity ke GSH a ve frakcích s proteiny s afinitou ke GSH byly stanoveny proměřením absorbance při 340 nm a 25°C. Z těchto hodnot byla dále spočtena specifická aktivita GST, celková GST aktivita, načištění proteinů a celkový výtěžek. Symbol „~“ označuje přibližnou hodnotu vzhledem k nízkým hodnotám koncentrací proteinů ve frakcích s proteiny s afinitou ke GSH (viz 5.1.1 Stanovení množství proteinů). Z výsledných hodnot byla vytvořena bilanční tabulka.

Buněčná linie		aktivita GST (mU/ml)	Koncentrace proteinů (µg/µl)	specifická aktivita GST (mU/mg)	celková GST aktivita (mU)	načištění	výtěžek %
EM-G3	<i>Lyzát</i>	1532,6	1,68	912,2	1305,7		100,0
	<i>Frakce bez afinity ke GSH</i>	46,9	16,17	2,9	2,3		0,2
	<i>Frakce s afinitou ke GSH</i>	2796,1	~ 0,26	~ 10754,3	139,8	~ 11,8	10,7
HCC 1937	<i>Lyzát</i>	35,2	4,63	7,6	27,5		100,0
	<i>Frakce bez afinity ke GSH</i>	206,7	21,70	9,5	10,3		37,6
	<i>Frakce s afinitou ke GSH</i>	45,3	~ 0,26	~ 174,3	2,3	~ 22,9	29,9
MDA-MB₂₃₁	<i>Lyzát</i>	341,1	1,93	176,7	290,6		100,0
	<i>Frakce bez afinity ke GSH</i>	23,9	15,87	1,5	1,2		0,4
	<i>Frakce s afinitou ke GSH</i>	365,9	~ 0,27	~ 1355,0	18,3	~ 7,7	6,3
MCF₇	<i>Lyzát</i>	40,2	2,75	14,6	31,4		100,0
	<i>Frakce bez afinity ke GSH</i>	92,6	12,38	7,5	4,6		14,8
	<i>Frakce s afinitou ke GSH</i>	55,0	~ 0,26	~ 211,5	2,8	~ 14,5	8,8



Graf 5: Grafické znázornění specifických aktivit GST lyzátů a frakcí buněčných linií EM-G3, HCC 1937, MDA-MB₂₃₁ a MCF7. Afinitní chromatografií na GSH Sepharose 4B byly získány frakce bez afinity ke GSH a následnou elucí 5mM GSH frakce s afinitou ke GSH. Spodní graf přibližuje vyznačenou oblast na horním grafu. $n = 3$.

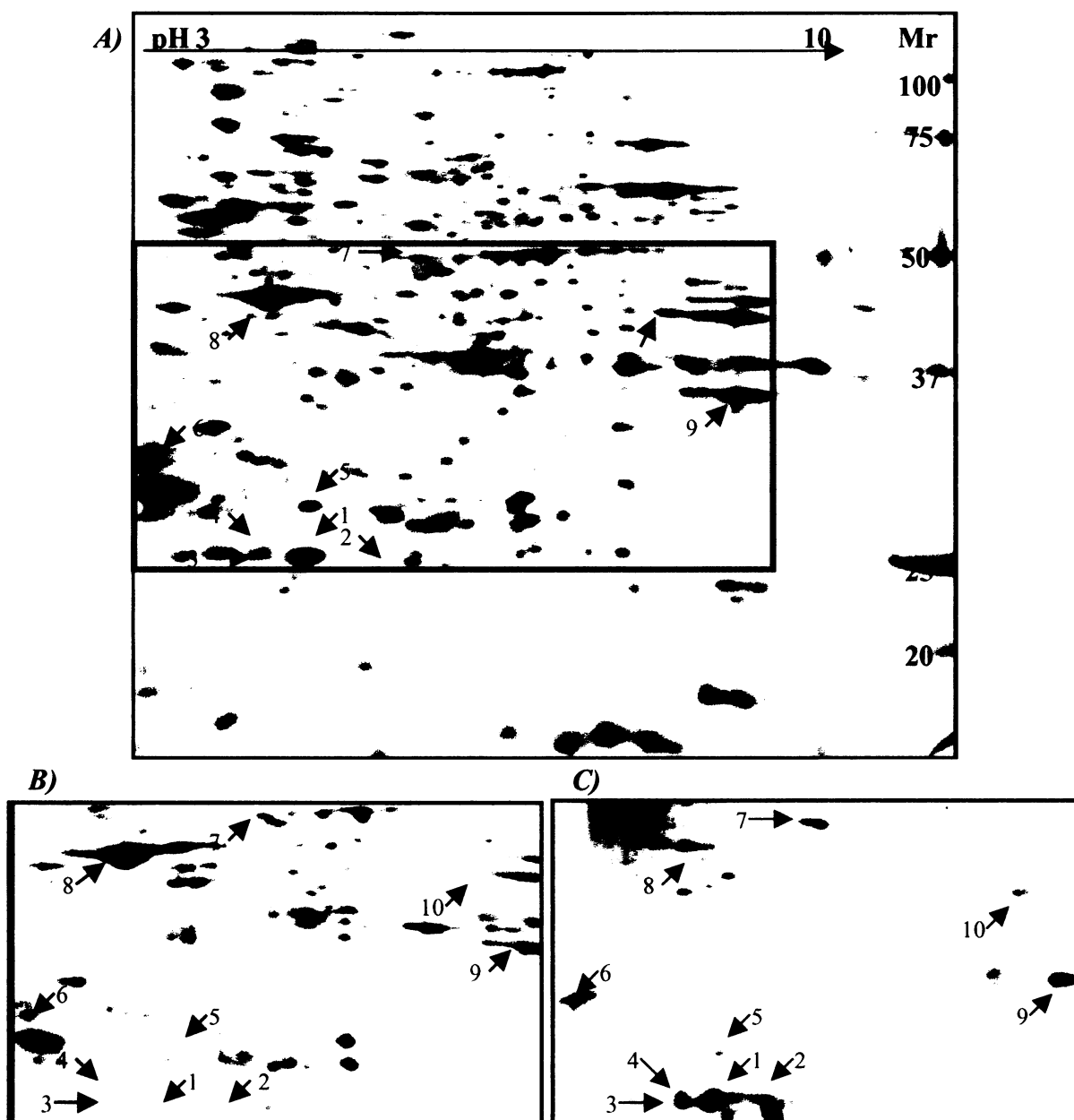
5.5 2-DE elektroforéza

Nejprve byla provedena analytická 2-D elektroforéza z buněčných lyzátů o rozmezí pH 3-10 způsobem popsaným v kapitole 4.6.2 (str. 41). Následovala analytická 2-D elektroforéza ze spojených a ultrafiltrovaných frakcí proteinů bez afinity ke GSH a frakcí proteinů s afinitou ke GSH, taktéž o rozmezí pH 3-10. Frakce proteinů bez afinity ke GSH byly spojovány na základě změřené A_{280} (viz *grafy 1, 2, 3, 4*, str. 51-52). V tomto případě byly spojeny u všech buněčných linií vždy první čtyři frakce.

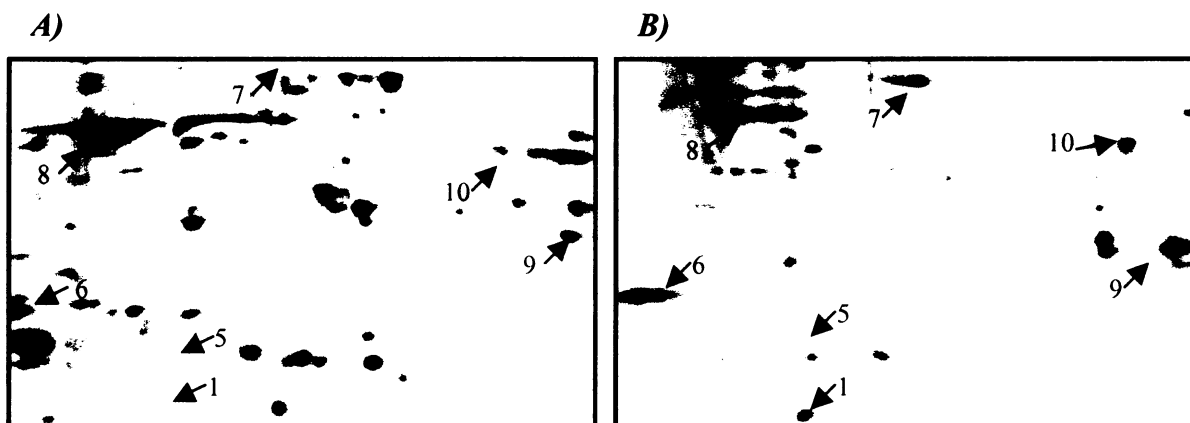
Gely z těchto elektroforéz buněčné linie EM-G3 jsou uvedeny na *obrázku 15A, B, C* (str. 59). Gely s proteiny s afinitou a bez afinity ke GSH jsou zobrazeny pouze ve formě výřezů z těchto gelů. Oblast výřezů na *obrázcích 16, 17 a 18* (str. 60) je totožná se zeleným obdélníkem, který je vyznačen na *obrázku 15A* (str. 59). Šípkami jsou na *obrázcích* všech gelů s proteiny s afinitou ke GSH vyznačeny proteiny, které byly identifikovány (viz *tabulka 7*, str. 62).

Z těchto obrázků je patrné, že některé proteiny se opravdu podařilo purifikovat a proteinová skvrna na gelu s proteiny bez afinity ke GSH zcela chybí. Některé proteinové skvrny se zdají být přítomny na gelech obou frakcí (viz například proteinová skvrna číslo 6, *obrázky 16, 17, 18*, str. 60). Což ovšem neznamená, že se jedná o stejný protein. V této oblasti M_r a pI se mohou překrývat dva i více proteinů. Toto zkoumání ale nebylo cílem této práce.

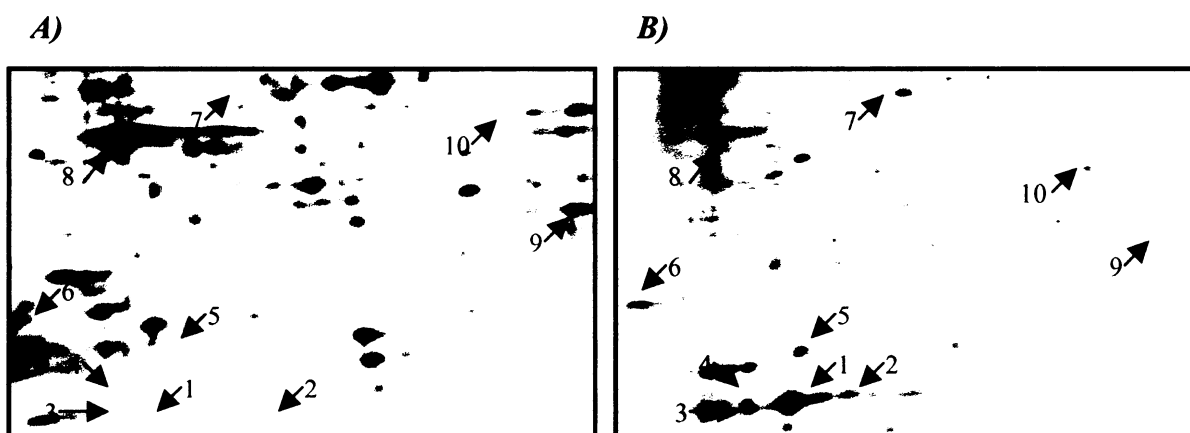
Pro ověření, zda se během afinitní chromatografie některé proteiny na nosič nenavázaly, byla provedena afinitní rechromatografie na glutathion Sepharose 4B (pH 7,3), která probíhala za stejných podmínek jako afinitní chromatografie. Afinitní rechromatografie se ukázala jako zbytečný krok, který v následujících experimentech nebyl prováděn (výsledky nejsou uvedeny).



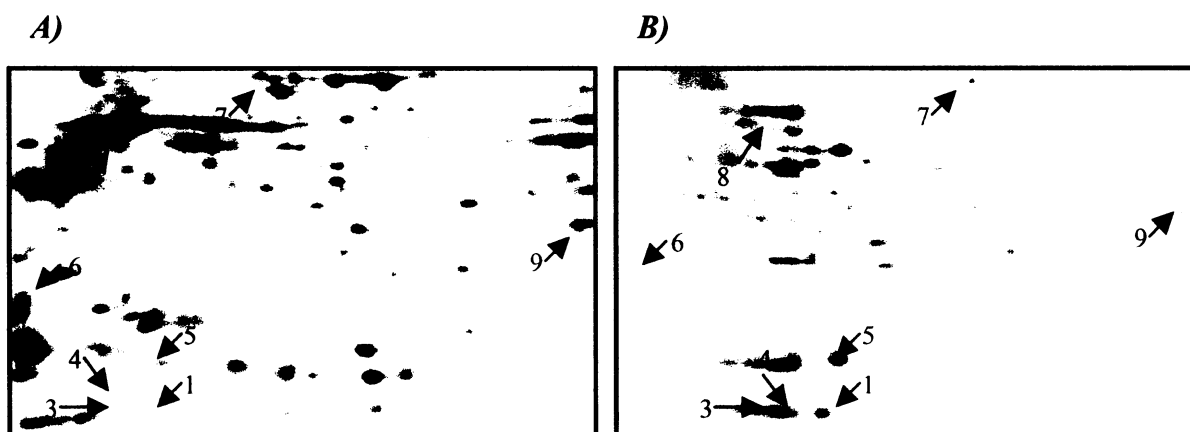
Obrázek 15: 2-D elektroforetické gely z buněčné linie EM-G3. Na obrázku A) jsou elektroforeticky rozděleny proteiny z lyzátu buněčné linie EM-G3. Červenou šipkou je vyznačeno rozmezí pH. Vpravo jsou naneseny molekulové standardy, čísla označují relativní molekulovou hmotnost v kDa. Přiblížený výřez z 2-DE gelu proteinů bez afinity ke GSH představuje obrázek B) a proteinů s afinitou ke GSH představuje obrázek C). Oblast označená zeleným obdélníkem na gelu A) vymezuje stejnou oblast jako na gelech B) a C).



Obrázek 16: Proteiny bez afinity ke GSH **A)** a proteiny s afinitou ke GSH **B)** buněčné linie HCC 1937 separované 2-D elektroforézou. Zobrazena je oblast v rozmezí pH 3-9 a *Mr* 25-50 kDa.



Obrázek 17: Proteiny bez afinity ke GSH **A)** a proteiny s afinitou ke GSH **B)** buněčné linie MDA-MB₂₃₁ separované 2-D elektroforézou. Zobrazena je oblast v rozmezí pH 3-9 a *Mr* 25-50 kDa.



Obrázek 18: Proteiny bez afinity ke GSH **A)** a proteiny s afinitou ke GSH **B)** buněčné linie MCF₇ separované 2-D elektroforézou. Zobrazena je oblast v rozmezí pH 3-9 a *Mr* 25-50 kDa.

5.6 Identifikace proteinů

Bylo provedeno štěpení proteinů v roztoku a také štěpení proteinů v preparativním gelu po SDS-PAGE nebo 2-D elektroforéze na 18 cm „IPG stripech“ s lineárním rozpětím pH 3-10, které byly obarveny Coomassie Brilliant Blue postupem uvedeným v kapitole 4.7.1 (viz str. 44) [61].

5.6.1 Štěpení proteinů v roztoku

Štěpení proteinů v roztoku se ukázalo jako neúspěšné. Tato metoda vyžaduje pro optimální podmínky koncentraci proteinů mezi 0,1-1,0 mg/ml. Množství proteinů v eluovaných frakcích s proteiny interagujícími s GSH je ovšem velmi nízké. Vzhledem k tomu, že koncentrace proteinů byla měřena dle Bradfordové, u které se citlivost uvádí okolo 1 µg/µl [55] a koncentrace v ultrafiltrovaných frakcích s afinitou ke GSH bylo možno změřit pouze orientačně, neboť spadá pod tuto hranici citlivosti, neúspěch této metody byl očekáván. Analýza pomocí LTQ-ORBITRAP hmotnostního spektrometru (Thermo Fisher Scientific, USA) vyhodnotila obsah ve vzorcích pouze jako keratiny (výsledky nejsou uvedeny), což bylo považováno za kontaminaci (např. pokožkou, vlasy).

5.6.2 Štěpení proteinů v gelu

Štěpení proteinů probíhalo v preparativním gelu, který byl získán buď z jednorozměrné SDS-PAGE nebo 2-DE, na kterých byly elektroforeticky rozděleny proteiny s afinitou ke GSH získané pomocí afinitní chromatografie na koloně GSH Sepharose 4B a obarveny Coomassie Brilliant Blue.

Proteiny, které byly identifikovány analýzou na LTQ-ORBITRAP hmotnostním spektrometru (Thermo Fisher Scientific, USA), jsou zapsány v *tabulce 7* (str.62). Identifikováno bylo celkem 7 různých proteinů, které jsou vyznačeny na *obrázcích 15-18* (str. 59-60), čísla proteinových skvrn na obrázcích odpovídají číslům proteinových skvrn uvedených v *tabulce 7* (str. 62). Za úspěšně určené byly považovány proteiny, u kterých přibližně souhlasil izoelektrický bod a molekulová hmotnost s údaji získanými z elektroforetických gelů. Některé proteinové skvrny se bohužel identifikovat nepodařilo.

Nejčastějším a nejvíce zastoupeným proteinem je GST třídy pí, která se v menší či větší míře vyskytuje ve všech čtyřech analyzovaných buněčných liniích.

Tabulka 7: Proteiny vázající GSH, které byly separovány pomocí 2-DE nebo SDS-PAGE a následně identifikovány MS z buněčných lysátů nádorů prsu.

Číslo proteinové skvrny	Přístupové číslo	Název proteinu	Teor. MW (kDa)/pI	Změřené MW (kDa)/pI	Pokrytí sekvence (%)	Počet přiřazených peptidů	Identifikace z buněčné linie/elektroforetického gelu
1	P09211	Glutathion S-transferasa pí	23,2/5,4	25/5,6	52	15	EM-G3/2-DE
2	P09211	Glutathion S-transferasa pí	23,2/5,4	25/5,8	47	7	EM-G3/2-DE
3	P09211	Glutathion S-transferasa pí	23,2/5,4	25/5,2	51	10	EM-G3/2-DE
4	P09211	Glutathion S-transferasa pí	23,2/5,4	26/5,2	42	10	EM-G3/2-DE
5	P21266	Glutathion S-transferasa mí 3	26,4/5,4	28/5,1	33	8	HCC 1937/2-DE HCC 1937/1-DE
6	P24534	Elongační faktor 1- beta	24,6/4,5	30/4,0	4	6	EM-G3/2-DE
7	P26641	Elongační faktor 1- gama	50,0/6,3	50/nd	18	7	EM-G3/1-DE HCC 1937/1-DE
8	P60709	Beta aktin	41,6/5,3	44/5,3	18	7	EM-G3/2-DE EM-G3/1-DE HCC 1937/1-DE
9	P16152	Karbonyl reduktasa (NADPH) 1	30,2/8,8	32,5/8,7	20	5	EM-G3/2-DE HCC 1937/1-DE
10	O43813	Lanthionin syntetasa C-like protein 1	45,3/7,9	40/nd	5	2	HCC 1937/1-DE

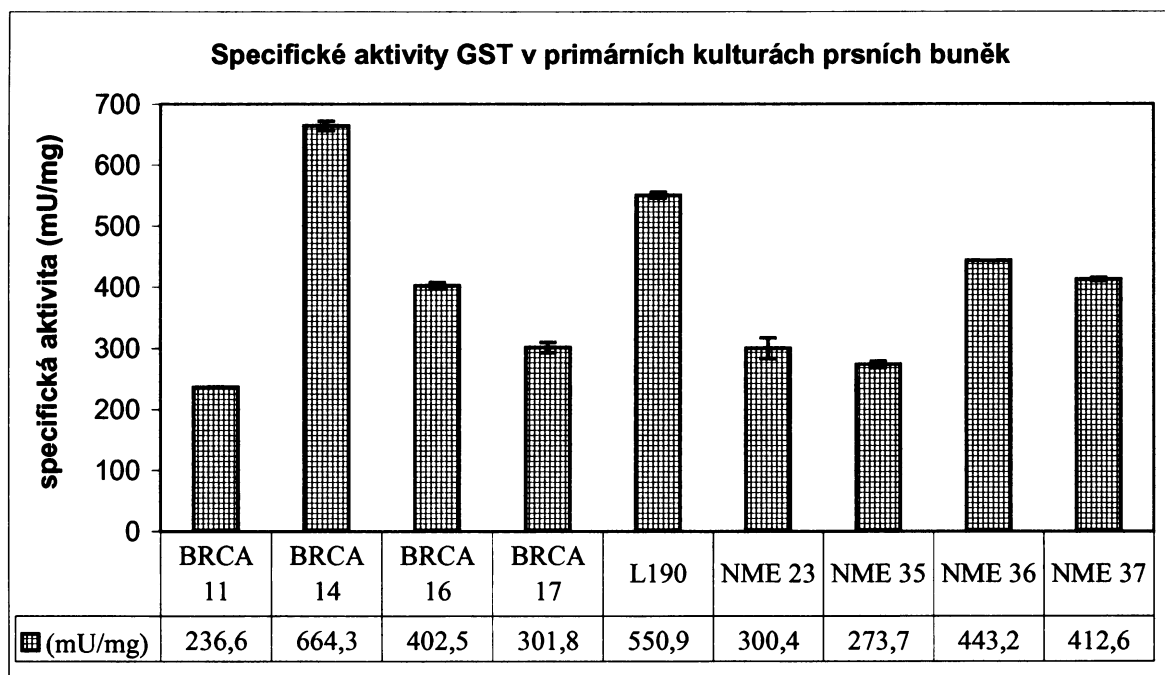
5.7 Stanovení aktivity glutathion *S*-transferas a glyoxalasy I

Vzorky primárních kultur odvozených ze zdravých pacientek i pacientek s rakovinou prsu byly použity k proměření aktivit dvou významných dotoxifikačních enzymů- GST a GLO I, abychom získali představu o aktivitách v těchto vzorcích v porovnání s buněčnými liniemi.

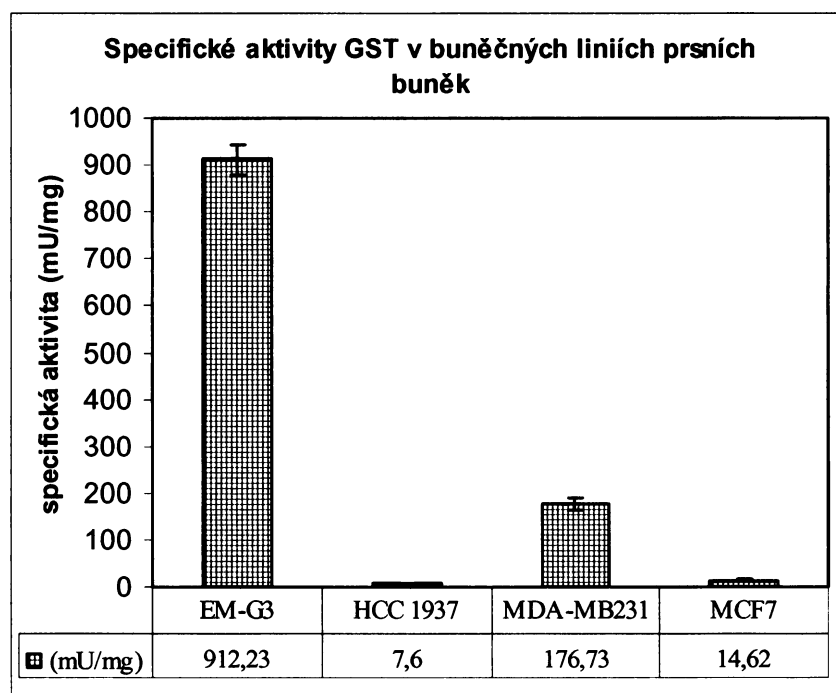
5.7.1 Stanovení aktivity glutathion *S*-transferas v buněčných liniích a primárních kulturách

Lidské nádory mléčné žlázy patří k nejobtížněji kultivovatelným buněčným typům [62]. Buněčné kultury odvozené z normální či nádorové tkáně mléčné žlázy obvykle v kultuře přežívají jen 2-3 měsíce, tudíž množství vzorku je omezené [63,64]. Vzhledem k tomuto faktu a také k časové náročnosti byla v těchto buňkách měřena aktivita GST pouze v jejich lyzátech a vzorky nebyly analyzovány afinitní chromatografií.

Hodnoty aktivit GST jsou zaznamenány v *grafu 6* (str. 64) pro primární kultury a *grafu 7* (str. 64) pro buněčné linie. Nejvyšší a zároveň i nejnižší specifická aktivita GST je na *grafu 7* v primární kultuře rakovinných prsních buněk. Specifické aktivity v primárních kulturách zdravých prsních buněk se zdají být v průměru nižší oproti rakovinným a hodnoty jsou konstantnější. Specifická aktivita buněčné linie EM-G3 výrazně převyšuje specifické aktivity v ostatních buněčných liniích, obzvláště buněčných liniích HCC 1937 a MCF₇, kde jsou hodnoty specifických aktivit GST téměř nulové.



Graf 6: Porovnání specifických aktivit GST v primárních kulturách rakovinných i zdravých prsních buněk. Hodnoty specifických aktivit GST jsou uvedeny ve spodní části grafu, $n=3$.



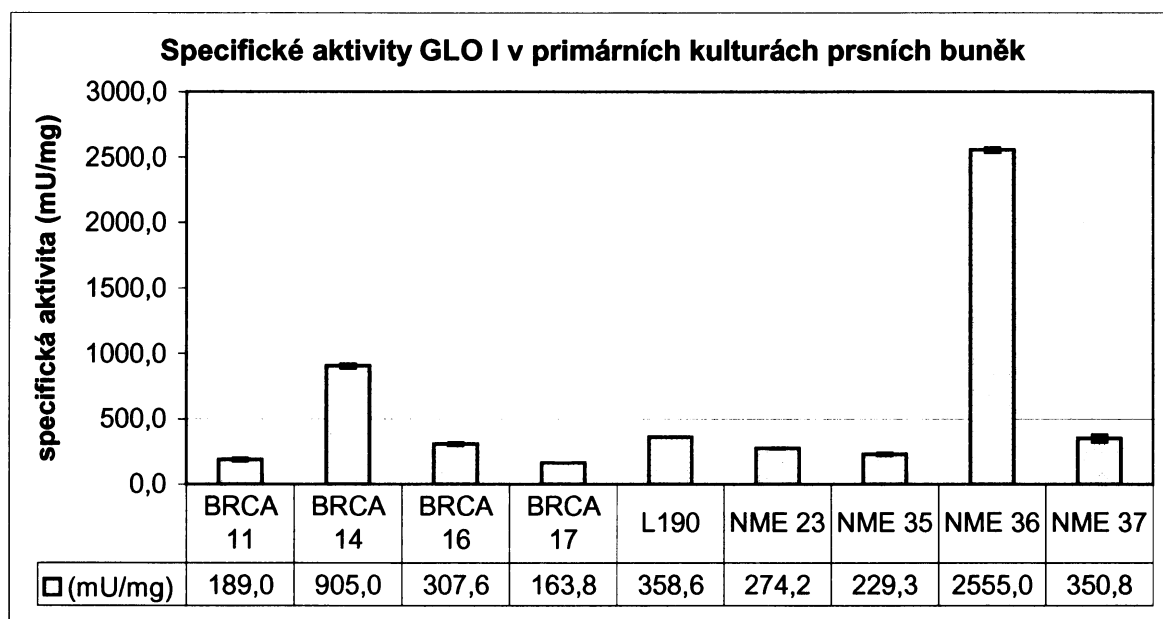
Graf 7: Na grafu jsou znázorněny specifické aktivity GST v buněčných liniích. Hodnoty specifických aktivit GST jsou uvedeny ve spodní části grafu, $n=3$.

5.7.2 Stanovení aktivity glyoxalasy I v buněčných liniích a primárních kulturách

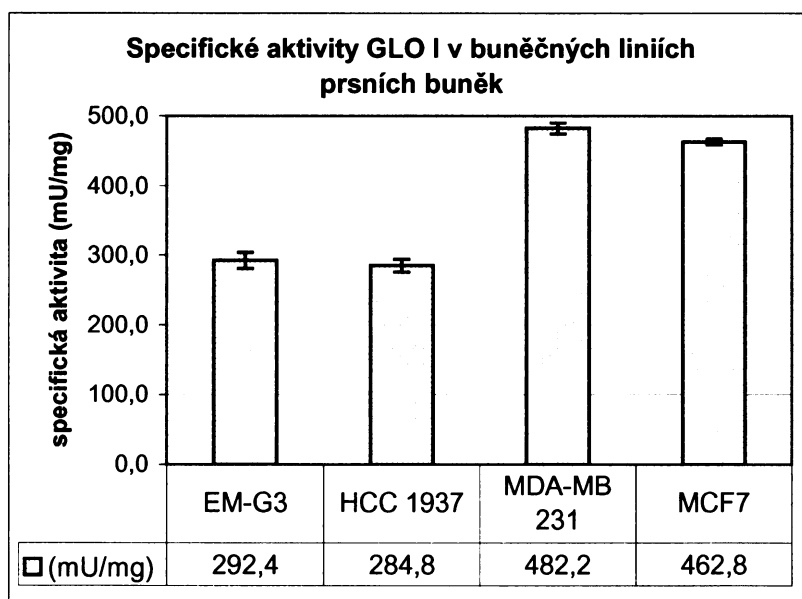
GLO I je jedním z proteinů, který má afinitu ke GSH a který byl již dříve v naší laboratoři na 2-D elektroforetických gelech rakovinných i zdravých prsních buněk identifikován. Identifikován byl také jeho polymorfismus, kdy jedna proteinová skvrna byla identifikována jako GLO I s kyselinou glutamovou v poloze 111 a druhá jako GLO I s alaninem v poloze 111. Na gelech byla vždy přítomna minimálně jedna z těchto proteinových skvrn, někdy obě. Cílem bylo ověřit případné rozdíly v aktivitách GLO I.

Aktivita GLO I byla měřena pouze v lyzátech buněčných linií a v lyzátech primárních kultur.

Výsledné hodnoty a jejich porovnání je vidět na *grafu 8 a grafu 9* (str. 66). Na *grafu 8* je vidět specifická aktivita GLO I v kultuře ze zdravé tkáně, označená NME 36, která výrazně převyšuje specifické aktivity GLO I v ostatních primárních kulturách. Na *grafu 9* je v buněčné linii EM-G3 a HCC 1937 téměř poloviční specifická aktivita GLO I oproti hodnotám v buněčných liniích MDA-MB₂₃₁ a MCF₇, které byly získány z pokročilých metastazujících stádií karcinomu prsu.



Graf 8: Na grafu jsou vidět specifické aktivity GLO I v primárních kulturách jak zdravých tak rakovinných prsních buněk. Hodnoty specifických aktivit GST jsou uvedeny ve spodní části grafu, $n=3$.



Graf 9: Na grafu jsou znázorněny specifické aktivity GLO I v buněčných liniích. Hodnoty specifických aktivit GST jsou uvedeny ve spodní části grafu, $n=3$.

5.8 Vyhodnocování gelů v programu PDQuest Advanced- 8.0.1

Cílem tohoto zkoumání bylo posoudit vztah mezi velikostí proteinové skvrny na 2-DE gelu, tedy její relativní intenzity a změřenou aktivitou buď GST nebo GLO I. Analýzy probíhaly ve vytvořeném analytickém souboru „match-set“, ve kterém byly programem detekovány proteinové skvrny a vzájemně přiřazeny ve skupinách gelů. Přiřazení proteinových skvrn bylo nutno manuálně kontrolovat a v případě nutnosti upravit. Analyzovány byly pouze gely z 2-D elektroforézy na 18 cm „IPG stripech“ s lineárním rozpětím pH 4-7 z lyzátů buněčných linií a primárních kultur, které byly v laboratoři získány činností několika pracovníků v průběhu 4 let. Analyzovány byly proteinové skvrny v určitém prostoru na gelu, ale pozornost byla věnována hlavně proteinovým skvrnám představující GST pí, GST omega (kyselé i bazické izoformě), GLO I-A (glyoxalasa I s alaninem v poloze 111) a GLO I-E (glyoxalasa I s kyselinou glutamovou v poloze 111). Tyto proteiny reagují s GSH a byly již dříve nalezeny na 2-D elektroforetických gelech z buněčného lyzátu [54].

Hodnoty intenzit pouze těchto vybraných proteinových skvrn, spočítaných programem, jsou uvedeny v *tabulce 8* (str. 68), v níž jsou tyto hodnoty také porovnány se specifickou aktivitou GST a GLO I, které byly změřené v lyzátech buněčných linií a primárních kultur. Velmi zajímavé je porovnání intenzit proteinových skvrn izoform GLO I-A s GLO I-E a GST omega kyselé s bazickou izoformou, které zřetelně dokumentují heterogenní a homogenní jedince.

Tabulka 8: Uvedeny jsou hodnoty celkových intenzit proteinových skvrn představující GLO 1 na 2-DE gelech lyzátů buněčných linií a primárních kultur, procentuální zastoupení těchto intenzit mezi polymorfismy GLO I-E a GLO I-A a specifické aktivity GLO I. Dále jsou zde uvedeny hodnoty celkových intenzit proteinových skvrn představující GST, procentuální zastoupení izoformem GST omega, procentuální zastoupení dvou izoformem GST pí a specifické aktivity GST v buněčných liniích a primárních kulturách.

primární kultura/ buněčná linie	zastoupení GLO I		celková intenzita GLO I (mU/mg)	specifická aktivity GLO I (mU/mg)	zastoupení GST omega		zastoupení GST pí		celková intenzita GST (mU/mg)	specifická aktivity GST (mU/mg)
	GLO I- E	GLO I- A			GST omega bazičká	GST omega kyselá	GST pí (proteínová skvrna č. 1)	GST pí (proteínová skvrna č. 3)		
BRCA 11	0%	100%	991	189	0%	100%	94%	6%	100010	224
BRCA 14	42%	58%	10611	905	100%	0%	85%	15%	81147	629
BRCA 16	100%	0%	8223	308	100%	0%	86%	14%	84801	381
BRCA 17	45%	55%	724	164	48%	52%	92%	8%	75575	286
NME 23	0%	100%	10972	274	43%	57%	100%	0%	29724	285
NME 35	48%	52%	1219	2555	100%	0%	92%	8%	187578	259
NME 36	51%	49%	3869	351	0%	100%	84%	16%	202477	420
NME 37	59%	41%	7911	nd	100%	0%	82%	18%	132698	391
L 190	0%	100%	7334	359	0%	100%	89%	11%	84392	522
EM-G3	100%	0%	3006	398	42%	58%	79%	21%	151844	912
HCC	48%	52%	6478	312	0%	100%	24%	76%	10393	8
MDA-MB ₂₃₁	100%	0%	27505	523	100%	0%	85%	15%	99921	177
MCF ₇	57%	43%	12589	478	100%	0%	0%	0%	951	15

6 DISKUSE

V proteomice je jedním z nejstudovanějších karcinomů právě karcinom prsu [21]. Dvěma hlavními cíli při proteomické analýze karcinomu prsu je objevit nový marker pro včasnou diagnózu a proliferaci karcinomu prsu a rozluštit intracelulární signální dráhy, které vedou ke vzniku karcinomu [1].

Na jediném 2-DE gelu může být teoreticky rozlišeno až 10 000 proteinů [38]. V buněčném lyzátu je ovšem daleko větší množství proteinů, než jsme schopni separovat. Intenzita zabarvení proteinových skvrn je určena množstvím barvy, která je úměrná množství proteinů, proto mohou velmi abundantní proteiny zakrývat svým obsahem zajímavé minoritně se vyskytující proteiny, které mají izoelektrický bod (pI) a molekulovou hmotnost (Mr) blízké abundantnímu proteinu. V dnešní době je v literatuře popsáno mnoho postupů 2-D elektroforézy, ale žádná z nich není univerzální [65]. Jednou ze slabých stránek této proteomické metody jsou právě potíže s analýzou proteinů, které jsou ve vzorku v malém množství.

Rakovina, stejně jako ostatní onemocnění, má genetické i environmentální příčiny vzniku. Klinické srovnávací studie ukázaly, že genetické rozdíly, například lidské GST izoenzymy, mohou hrát roli v citlivosti na vznik rakoviny a její léčbu [28]. 2-DE mapování výskytu GST izoform může být velmi užitečným nástrojem, protože tyto proteiny hrají hlavní roli v detoxifikační fázi II, obzvláště při odezvě na oxidativní stres a léčiva [23].

Tato práce je součástí projektu na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR. Jedním z cílů této práce bylo ověření možnosti prefrakcionace proteinů buněčného lyzátu z buněčných linií nádoru prsu pro 2-DE pomocí afinitní chromatografie na koloně GSH Sepharose 4B umožňující separaci proteinů vázajících GSH.

Afinitní chromatografií na koloně GSH Sepharose 4B se nám podařilo purifikovat proteiny vázající se ke GSH ze čtyř rakovinných buněčných linií (EM-G3, HCC 1937, MDA-MB₂₃₁ a MCF₇), ovšem pravděpodobně ne všechny, které byly v buňkách přítomny. Jedním z důležitých kroků pro vylepšení výsledků prefrakcionace proteinů na koloně GSH Sepharose 4B se ukázala regenerace kolony. Mezi jednotlivými chromatografiemi docházelo k nedostatečné regeneraci kolony, proteiny zůstávaly vázané na nosiči a eluovaly se až v další chromatografii (viz *obrázek 13*, str. 50). Z těchto důvodů bylo mezi

jednotlivé chromatografie zařazeno navíc, oproti původnímu postupu, promytí PBS a následně ethanolem pro odstranění precipitovaných nebo denaturovaných proteinů, nespecificky vázaných proteinů a hydrofobně vázaných proteinů. Pro každou buněčnou linii byla také připravena samostatná kolona GSH Sepharosa 4B. Proteiny, které se podařilo identifikovat, jsou popsány níže.

Vzhledem k velkému počtu experimentálních kroků, které byly od přípravy buněčného lyzátu až po analýzu 2-DE nutné, byly předpokládány velké ztráty proteinů vázajících se ke GSH, a tudíž také velmi obtížná jejich identifikace. Výtěžky purifikace GSH afinitních proteinů byly poměrně nízké, od 6 do 30% (viz *tabulka 6*, str. 56). Vyhodnocení načištění proteinů, vzhledem k velmi nízké koncentraci proteinů vázajících GSH, bylo pouze přibližné. Intenzita proteinových skvrn na 2-DE gelech proteinů po afinitní chromatografii nemůže být použita jako informace pro spolehlivé a kvantitativní odvození množství proteinů přítomných v původním vzorku. Jak již bylo zmíněno, výtěžky proteinů vázajících GSH po afinitní chromatografii byly pouze 6-30%. Během afinitní chromatografie se ustanovují rovnováhy mezi vázajícími se proteiny a proteiny bez afinity, tudíž se specificky nenaváží všechny afinitní proteiny [81]. Dále přibližně 44-80% (záleží na množství proteinů ve vzorku) zůstane po adsorpci vzorku do „IPG stripu“ z celkového množství proteinů. Během samotné IEF jsou ztráty menší (okolo 7-14%). Dalších 17-24% proteinů je ztraceno v pufru během tzv. „ekvilibrace“ [66].

Pro srovnávací proteomickou analýzu je hlavním úkolem najít reprodukovatelné, odlišně exprimované proteiny a poté je identifikovat [65]. Rozdíly v přítomnosti proteinů, dle rozdílných molekulových hmotností v buněčných liniích byly patrné již při analýze SDS-PAGE v průběhu afinitní chromatografie. V této práci bylo identifikováno celkem 7 GSH afinitních proteinů z buněčných linií EM-G3, HCC 1937, MDA-MB₂₃₁ a MCF7. Některé proteiny, jako například GLO I, GSH peroxidasa či GSH reduktasa, ovšem purifikovány nebyly, anebo byly purifikovány nedostatečně pro následnou identifikaci. Proteiny byly izolovány pomocí SDS-PAGE nebo 2-DE. Po vizualizaci Coomassie Brilliant Blue, následným odbarvením a tryptickým štěpením proteinů v gelu byly identifikovány pomocí MS-Orbitrap. Identifikované proteiny jsou na 2-DE gelech znázorněny na *obrázcích 15-18* (str. 59-60) a zároveň v *tabulce 7* (str. 62).

Proteiny, označené na obrázcích číslem 1, 2, 3 a 4, byly určeny jako **GST pí**. Jedná se o cytosolický enzym patřící do GST „superrodiny“ o molekulové hmotnosti 23,2 kDa a izoelektrickém bodu 5,4. GST třídy pí, stejně jako ostatní lidské cytosolické GST, katalyzují konjugaci GSH s velkým počtem exogenních a endogenních hydrofobních elektrofilních látek, což jsou například produkty oxidativního stresu či chemické karcinogeneze. Touto reakcí jsou cytotoxické látky převedeny na hydrofilní a jsou vyloučeny z těla. Funkce GST a její vazba ke GSH je podrobněji popsána v kapitole 1.3.1 (viz str. 16). K_d vazby GSH a GST je přibližně 1 μM [67].

Za poslední dobu přitáhla GST třídy pí velkou pozornost jakožto možný marker chemické karcinogeneze. GST pí izoenzymy, charakterizované z různých lidských tkání, vykazovaly pozoruhodné rozdíly v jejich izoelektrickém bodě, kinetických vlastnostech a peptidových mapách stejně jako v našem případě. Tyto rozdíly mohou být vysvětleny buď různou genovou expresí, post-translačními modifikacemi, polymorfismem, nebo kombinací výše uvedených [17]. Polymorfismus u GST pí je odpovědný za různě silnou odpověď buňky na toxický stres [72].

GST pí byla v této práci identifikována z buněčné linie EM-G3, kde se také vyskytuje ve čtyřech námi identifikovaných izoenzimech a zároveň v nejvyšších koncentracích. Všechny izoenzymy byly také zaznamenány v buněčné linii MDA-MB₂₃₁ ovšem už v menší míře. V buněčných liniích HCC 1937 a MCF₇ byly identifikovány jen některé izoenzymy a ve velmi nízké koncentraci. Hlubší poznání mechanismů, jakými se regulace GST pí může podílet na maligní transformaci, by zřejmě pomohlo lépe pochopit proces samotné onkogeneze [74].

Z buněčné linie HCC 1937 byla identifikována **GST mí 3**, která je na obrázcích označena číslem 5. Funkce GST mí je stejná jako u všech ostatních GST, jak je popsáno výše. Proteinová skvrna, představující GST mí, byla na 2-DE gelech nalezena u všech čtyř buněčných linií přibližně o stejné velikosti.

Proteinová skvrna pod číslem 6 byla stanovena jako **elongační faktor 1-beta** (EF-1-beta). EF-1 je složen ze čtyř podjednotek: alfa, beta, gamma a delta. Elongační faktor 1-gamma byl v této práci také identifikován (viz dále). EF-1-beta podporuje výměnu GDP, který je vázaný k EF-1-alfa, za GTP. EF-1-beta obsahuje GST C-terminální doménu, která obsahuje dvě helikální smyčky, již tvoří jednu stranu GSH vazného místa. Další přítomné aminokyseliny podporují tvorbu vodíkových můstků k GSH [20,75]. EF-1-beta je na 2-D elektroforetických gelech buněčných lyzátů proteinovou skvrnou, která se zřejmě

vyskytuje ve shluku několika dalších skvrn, proto přesnější lokalizace není možná, viz *obrázky 15-18* (str. 59-60). Proteinová skvrna přítomná v 2-DE gelech proteinů bez afinity ke GSH nemusí být pouze EF-1 beta. Tato skvrna může obsahovat dva i více jiných proteinů, které mají shodné Mr a pI. Vzhledem k časové náročnosti celého procesu vedoucího k identifikaci nebylo toto zjištění možné provést. Afinitní nosič GSH Sepharosa 4B je pravděpodobně nejvíce afinitní ke GST. Zároveň vzhledem k rovnováhám, které se během afinitní chromatografie ustanovují, se domníváme, že počet vazebných míst pro EF-1-beta byl omezený, a proto nemusel být purifikován v celé své koncentraci i přes to, že kapacita nosiče byla dostatečná.

Dalším stanoveným elongačním faktorem byl pod číslem 7 určen **elongační faktor 1-gamma** (EF-1-gamma). EF-1-gamma byl identifikován z SDS-PAGE buněčných linií EM-G3 a HCC 1937, z těchto důvodů jsme nebyli schopni určit pI tohoto proteinu. Vzhledem k teoretické hodnotě pI a změřené i teoretické Mr byla lokalizace EF-1-gamma na 2-DE gelech odhadnuta jako proteinová skvrna číslo 7. EF-1-gamma pravděpodobně hraje roli při ukotvení komplexu k ostatním buněčným komponentám během elongační fáze translace. Obsahuje jak C-terminální, tak N-terminální GST doménu. Obsahuje tedy specifické vazné místo pro GSH. EF-1-gamma je taktéž patrně přítomen ve 2-DE gelech proteinů afinitních ke GSH i proteinů bez afinity ke GSH. I když ve 2-DE gelech proteinů bez afinity ke GSH je přítomen o poznání méně. Důvod je pravděpodobně stejný jako v případě EF-1-beta, jak je popsáno výše.

Na 2-DE gelu buněčné linie EM-G3 a zároveň na SDS-PAGE buněčných linií EM-G3 a HCC 1937 byl identifikován cytoplasmatický **beta aktin (ACTB)**, označen číslem 8. Aktiny jsou vysoce konzervované proteiny, které jsou zapojeny do různých typů buněčného pohybu a jsou přítomny ve všech eukaryotických buňkách [75]. V savčích buňkách existuje několik izoform aktinu s různou distribucí ve tkáních [76].

Aktin je běžný stavební velmi abundantní protein, což ho staví na první místo pro S-glutathionylaci. Molekulární mechanismus, který zprostředkovává glutathionylaci *in vivo* je nejasný. Glutathionylace úspěšně inhibuje polymerizaci aktinu, a proto ovlivňuje cytoskelet [76]. Cysteinové zbytky, lokalizované v bazickém prostředí, mohou mít nízké pK_a hodnoty, které z nich dělají cíle pro adici GSH [77]. Glutathionylace proteinu je reverzibilní a redukce disulfidu GSH-protein je efektivně katalyzována glutaredoxinem [76]. Fyziologicky významná polymerace aktinu je regulována reversibilní glutathionylací předposledního cysteinu (Cys-374), což je zprostředkováno stimulací růstového faktoru

[78]. Tyto modifikace mohou regulovat buněčnou odezvu na oxidativní stres, ovšem tvorba S-S můstků s GSH vzniká i v nepřítomnosti exogenního oxidativního stresu. Modifikace cysteinových zbytků způsobuje změnu v signalizačních procesech [76,77]. Proteinová skvrna představující ACTB je na 2-DE gelech s afinitou i bez ní ke GSH všech buněčných linií. Je tedy možné, že byl specificky purifikován pouze S-glutathionylovaný ACTB, nebo byla izolována pouze jeho část, a nebo došlo k nespecifické vazbě ACTB na nosič.

Proteinová skvrna číslo 9 byla určena jako **karbonyl reduktasa (NADPH) 1**. Funkcí tohoto cytoplasmatického proteinu je redukovat širokou škálu karbonylových látek. Lidská karbonyl reduktasa (NADPH) 1 je enzym s velmi širokou substrátovou specifikou a pravděpodobně je také zodpovědný za *in vivo* redukci chinonů, rozeznání velké skupiny anthracyklinových protirakovinných látek (jako jsou například prostaglandiny) a ostatních látek obsahujících karbonyl, včetně xenobiotik [75,79]. Karbonyl reduktasa (NADPH) 1 je spojována s detoxifikací reaktivních aldehydů a jejich GSH konjugátů. Interakce mezi GSH a karbonyl reduktasou jsou zprostředkovány podél celé GSH tripeptidové struktury, převážně díky interakcím hlavního polárního řetězce, včetně gamma karboxylu glutamové kyseliny k-NH₂ skupině alaninu a tyrosinu. Avšak struktura spojení s GSH nebo GSH konjugáty zatím nebyla popsána.

Karbonyl reduktasa představuje jedinou známou NADPH dependentní reduktasu, která se účastní katabolismu S-nitrosoglutathionu (GSNO). GSNO tak může být důležitým karbonyl reduktasovým substrátem, jako je mnoho xenobiotik [79]. Proteinová skvrna, představující tento protein, je přítomna na 2-DE gelech proteinů s afinitou i bez afinity ke GSH ve všech čtyřech buněčných liniích. Ovšem na 2-DE gelech proteinů s afinitou ke GSH buněčných linií MDA-MB₂₃₁ a MCF₇ je tato proteinová skvrna velmi malá a nevýrazná.

Posledním identifikovaným proteinem je pod číslem 10 označena **lanthionin syntetasa C-like protein 1 (LanCL 1)**. LanCL 1 byl identifikován z jednorozměrné SDS-PAGE buněčné linie HCC 1937, z tohoto důvodu jsme nemohli změřit jeho pI a lokalizace na 2-DE gelech byla odhadnuta dle teoretické hodnoty pI a změřené hodnoty Mr. LanCL 1 je savčím homologem prokaryotického enzymu, který je zodpovědný za syntézu thioetheru- lanthioninu. LanCL 1 byl poprvé identifikován jako periferní membránový protein a možný receptor pro G-proteiny, který se váže na lipidové části a váže se se stomatinem (integrálním membránovým proteinem červených krvinek). LanCL 1 je protein o neznámé funkci. Polypeptid LanCL 1 je přibližně z 30% homologní

s prokaryotickou Lanthionin synthetasou (LanC), která je vytvářena mnoha gram-pozitivními bakteriemi. LanCL 1 nemá jiné významné homologní části s jinými známými GSH využívajícími savčími enzymy, včetně GST [80]. V tuto chvíli nejsme schopni vysvětlit specifickou vazbu mezi GSH a LanCL 1. Vzhledem ke zjištění, že LanCL 1 je afinitní ke GSH, se můžeme domnívat, že LanCL 1 může katalyzovat alkylační reakce mezi GSH a dosud neidentifikovanou elektrofilní látkou. Je tedy možné, že LanCL 1 reprezentuje novou třídu GSH vázajících proteinů. Není také vyloučeno, že LanCL 1 se stává afinitním ke GSH díky post-translačním modifikacím. V literatuře byla popsána izolace LanCL 1 taktéž pomocí afinitní chromatografie na koloně GSH Sepharose [67]. Identifikace následovala po štěpení trypsinem pomocí MALDI-TOF-MS a zároveň byla identifikace potvrzena rozeznáním LanCL 1 protilátkou. Proteinová skvrna, která nejspíše představuje LanCL 1, byla nalezena na 2-DE gelech proteinů afinitních ke GSH u buněčných linií EM-G3, HCC 1937 a MDA-MB₂₃₁.

Identifikace beta aktinu, karbonyl reduktasy (NADPH) 1 a lanthionin syntetasy C-like proteinu 1 pro nás byly překvapením. Afinita ke GSH byla v literatuře popsána u beta aktinu (rok 2001), karbonyl reduktasy (NADPH) 1 (rok 2008) a lanthionin syntetasy C-like proteinu 1 (rok 2007) teprve v nedávné době, jak je uvedeno v závorkách za názvy proteinů.

Posledním cílem této práce bylo porovnat enzymové aktivity GST a GLO I v lyzátech buněčných linií odvozených z rakoviny prsu a primárních kulturách zdravých i rakovinných prsních buněk. Vzhledem k nízkému počtu vzorků, které jsme měli k dispozici, bylo toto měření orientační a statisticky málo významné.

Značně purifikovaným proteinem byla GST třídy pí, která se vyskytuje ve všech čtyřech analyzovaných buněčných liniích (EM-G3, HCC 1937, MDA-MB₂₃₁ a MCF₇). Ví se, že GST izoformy mají různou podjednotkovou strukturu, pí, kinetiku a imunologické vlastnosti [18]. I přes to, že byla identifikována GST mí a také několik izoform GST pí, izoforma GST pí, na *obrázcích 15-18* (str. 59-60) a v *tabulce 7* (str. 62) označená jako číslo 1, je v buňce v nejvyšších koncentracích (výjimkou je MCF₇, kde převažuje GST mí), jak je patrné z *tabulky 7* (str. 62). Pokud je izoforma GST pí (proteinová skvrna číslo 1) v buňce ve velmi vysoké koncentraci oproti ostatním GST pí izoformám, specifická aktivita vzhledem k intenzitě proteinové skvrny číslo 1 je nižší. Tato situace může být vysvětlena modifikací GST pí, čímž dochází ke ztrátě aktivity enzymu

[82]. Zajímavé je také porovnání izoform GST omega, která byla v naší laboratoři na 2-DE gelech identifikována již v dřívějších experimentech, ale překvapivě nebyla purifikována afinitní chromatografií na koloně GSH Sepharose 4B. Důvodem může být pravděpodobně vyšší afinita nosiče GSH Sepharosy 4B ke GST třídy pí. V buňkách se tento enzym vyskytuje v kyselé a bazické izoformě buď v poměru přibližně 1:1, nebo 1:0, respektive 0:1. Toto rozložení izoform je způsobeno geneticky, kdy vzniká buď homozygotní, či heterozygotní jedinec.

Specifická aktivita GST v primárních kulturách rakovinných tkání byla v průměru vyšší ve srovnání s nekarzinogenní tkání rakoviny prsu, což je ve shodě s literaturou [68]. Zvýšený výskyt GST pí v lidských nádorech spojují se špatnou prognózou i další studie [69,70]. Zároveň buněčné linie rakovinné prsní tkáně vykazovaly v průměru nižší specifickou aktivitu GST než v primárních kulturách rakovinné i zdravé tkáně a byly zaznamenány také velké výkyvy v těchto hodnotách. Zdůvodnit tuto skutečnost je velmi obtížné a vyvstává tu otázka, do jaké míry buněčné linie charakterizují mateřské buňky a do jaké míry jsou výzkumy klinicky aplikovatelné.

Z dřívějšího proteomického mapování 2-DE gelů těchto buněčných linií pracovníky v naší laboratoři bylo zjištěno, že se v buňkách vyskytuje také GLO I. Tento protein se nám bohužel v gelech s proteiny vázajícími se ke GSH identifikovat nepodařilo.

Specifické aktivity GLO I jsou v průměru ve zdravých prsních tkáních vyšší vzhledem k rakovinným, a to jak u primárních kultur, tak buněčných linií. Toto zjištění je také ve shodě s literaturou [32-34]. Snížená koncentrace GLO I v buňce způsobuje zvýšenou koncentraci cytotoxického methylglyoxalu a zvýšený proces glykace proteinů, což je pro buňku mutagenním procesem. Glykace je v biologickém systému všudypřítomný proces jako důsledek reaktivity monosacharidových intermediátů glykolysy a α -oxoaldehydů vzniklých jejich spontánní degradací [31].

GLO I se v buňkách vyskytuje ve dvou izoformách. Některé studie naznačují, že polymorfismus Ala111Glu u GLO I rozhoduje o redukční aktivitě enzymu. Přítomnost dodatečného náboje zbytku 111Glu rozhoduje o konformační změně proteinu, což je spojeno se sníženou enzymovou aktivitou [71]. Toto vysvětlení vyplývá i z této studie, ovšem experimenty probíhaly s malým počtem vzorků, tedy bez statistiky. Z tabulky 7 (str. 62) vyplývá skutečnost, že pokud se v buňce vyskytuje pouze GLO I s kyselinou glutamovou v poloze 111 (GLO I-E), specifická aktivita GLO I oproti hodnotě intenzit proteinových skvrn GLO I je nižší. Pokud se podíváme na podíl těchto polymorfismů

v buňce, tedy GLO I-A ku GLO I-E zjistíme, že se v buňce vyskytují v poměru buď 1:0, respektive 0:1, nebo přibližně 1:1. Tento poměr je způsoben geneticky stejně jako v případě GST omega. U buněčných linií je specifická aktivita GLO I vyšší v buněčných lyzátech z agresivnějších metastazujících typů buněk, tedy buněčné linie MDA-MB₂₃₁ a MCF₇.

Naše výsledky naznačují, že vztah mezi intenzitou skvrny a specifickou aktivitou je ovlivněn několika faktory a vše je velice komplikované, ale potenciálně zajímavé. Vzhledem k tomu, že k takovému porovnání je potřeba více vzorků jak rakovinné, tak zdravé prsní tkáň, je toto vyhodnocování statisticky málo významné, a nelze z něj vyvozovat závěry. Jistě by bylo zajímavé porovnávat tyto vlastnosti u buněk získaných ze zdravých i rakovinných tkání prsu s klinickými, histologickými, prognostickými a dalšími faktory. Takovéto údaje bohužel nemáme v tuto chvíli k dispozici.

Podobná studie, tedy spojení prefrakcionace proteinů s afinitou ke GSH s 2-DE k analýze a následné identifikaci proteinů z jakékoli lidské tkáň, není v současné době v literatuře popsána.

ZÁVĚR

V této práci byla provedena prefrakcionace GSH afinitních proteinů pomocí afinitní chromatografie na koloně GSH Sepharose 4B z buněčných linií EM-G3, HCC 1937, MDA-MB₂₃₁ a MCF₇ odvozených z rakoviny prsu. Pomocí analytických 2-DE byly ukázány rozdíly v přítomnosti GSH afinitních proteinů v rámci těchto čtyř buněčných linií.

Afinitní chromatografií na koloně GSH Sepharose 4B v kombinaci s preparativními 2-DE nebo SDS-PAGE a MS bylo identifikováno 7 zajímavých proteinů, které mají vazbu ke GSH a převážně také ke karcinogenezi: GST pí, GST mí, EF-1-beta, EF-1-gamma, ACTB, karbonyl reductasa (NADPH) 1 a LanCL 1.

Dále byly porovnány enzymové aktivity dvou významných detoxifikačních enzymů- GST a GLO I v buněčných liniích odvozených z rakoviny prsu a primárních kulturách zdravých i rakovinných prsních buněk. Výsledné hodnoty jsou v souladu s dostupnou literaturou, ovšem počet dostupných a testovaných vzorků není statisticky významný.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

- [1] Hondermarck, H.: *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 281-289 (2003).
- [2] Prausová, J: *Vesmír* **83**, 495-501 (2004).
- [3] Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O., v knize *Základy histologie*, 7. vydání (Prentice Hall International Inc., Appleton & Lange,), str. 438-443 (1992).
- [4] Ross, M. H., Pawlina, W., v knize *Histology, A text and atlas with correlated cell and molecular biology*, 5. Edition, (Lippincott Williams & Wilkins), str. 804-809 (2006).
- [5] Senologická sekce ČGPS, dostupné z: <http://www.senologie.cz/cinnost/atestace-02.html>, (5.3.2009).
- [6] Webový portál o epidemiologii nádorů České republiky, dostupné z: <http://www.svod.cz/>, (5.3.2009).
- [7] Martin, A.M., Weber, B.L.: *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1126-1135 (2000).
- [8] Fred Hutchinson Cancer Research Center, dostupné z: <http://www.fhrc.org/index.html>, (3.4.2009).
- [9] Kleer, C.G., van Golen, K.L., Merajver, S.D.: *Breast Cancer Res.* **2**, 423-429 (2000).
- [10] Organizace Breastcancer.org dostupné z: <http://www.breastcancer.org/>, (5.3.2009).
- [11] Burdall, S.E., Hanby, A.M., Lansdown, M.R., Speirs, V.: *Breast Cancer Res.* **5**, 89-95 (2003).
- [12] Lacroix, M., Leclercq, G.: *Breast Cancer Res. Treat.* **83**, 249-289 (2004).
- [13] Brožová, M., Kleibl, Z., Netiková, I., Ševčík, J., Scholzová, E., Březinová, J., Chaloupková, A., Veselý, P., Dundr, P., Zadinová, M., Krásná, L., Matoušková, E.: *Breast Cancer Res. Treat.* **103**, 247-57 (2007).
- [14] Selicharová, I., Šanda, M., Mládková, J., Ohri, S.S., Vashishta, A., Fusek, M., Jiráček, J., Větvička, V.: *Oncol. Rep.* **19**, 1237-1244 (2008).
- [15] Czeczot, H., Scibior, D., Skrzycki, M., Podsiad, M.: *Acta Biochim. Pol.* **53**, 237-241 (2006).
- [16] Dalton, T. P., Dieter, M. Z., Yang, Y., Shertzer, H. G., Nebert, D. W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 324-329 (2000).
- [17] Forrester, L. M., Hayes, J. D., Millis, R., Barnes, D., Hartus, A. L., Schlager, J. J., Powis, G., Wolf, C. R.: *Carcinogenesis* **11**, 2163-2170 (1990).

- [18] Contreras-Vergara, C. A., Valenzuela-Soto, E., García-Orozco, K. D., Sotelo-Mundo, R. R., Yepiz-Plascencia, G.: *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **21**, 62-67 (2007).
- [19] Edalat, M. H., Mannervik, B.: *Meth. Enzymol.* **401**, 354-367 (2005).
- [20] Hegazy, U. M., Tars, K., Hellman, U., Mannervik, B.: *J. Mol. Biol.* **376**, 811-826 (2008).
- [21] Ahmad, H., Wilson, D.E., Fritéz, R.R., Singh, S.V., Medh, R.D., Nagle, G.T., Awasthi, Y.C., Kurosky, A.: *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 398-408 (1990).
- [22] Mannervik, B., Board, P. G., Hayes, J. D., Listowsky, I., Pearson, W. R.: *Meth. Enzymol.* **401**, 1-8 (2005).
- [23] Chemale, G., Morphey, R., Moxon, J. V., Morassuti, A. L., Lacourse, E. J., Barrett, J., Johnston, D. A., Brophy, P. M.: *Proteomics* **6**, 6263-6273 (2006).
- [24] Kurtovic, S., Grehn, L., Karlsson, A., Hellman, U., Mannervik, B.: *Anal. Biochem.* **375**, 339-344 (2008).
- [25] Eklund, B. I., Gunnarsdottir, S., Elfarra, A. A., Mannervik, B.: *Biochem. Pharmacol.* **73**, 1829-1841 (2007).
- [26] Habig, W. H., Past, M. J., Jakoby, W. B.: *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139 (1974).
- [27] Martin, A. M., Weber, B. L.: *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1126-1135 (2000).
- [28] Marahatta, S. B., Punyarit, P., Bhudisawasdi, V., Paupairoj, A., Wongkham, S., Petmitr, S.: *Cancer Lett.* **236**, 276-281 (2006).
- [29] Cromer, B. A., Morton C. J., Board P. G., Parker M. W.: *Eur. Biophys. J.* **31**, 356-364 (2002).
- [30] Hamilton, D. S., Creighton D. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* **387**, 1-10 (2001).
- [31] Thornalley, P. J.: *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1341-1342 (2003).
- [32] Creighton, D. J., Zheng, Z. B., Holewinski, R., Hamilton, D. S., Eiseman, J. L.: *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1378-1382 (2003).
- [33] Sakamoto, H., Mashima, T., Sato, S., Hashimoto, Y., Yamori, T., Tsuruo, T.: *Clin. Cancer Res.* **2513**, 2513-2518 (2001)
- [34] Thornalley, P.J.: *Biochem. J.* **269**, 1-11 (1990).
- [35] Gnerer, J.P., Kreber, R.A., Ganetzky, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 14987-14993 (2006).
- [36] Lei, X. G., Cheby, W. H., McClung, J. P.: *Annu. Rev. Nutr.* **27**, 41-61 (2007).
- [37] Kaynar, H., Meral, M., Turhan, H., Keles, M., Celik, G., Akcay, F.: *Cancer Lett.* **227**, 133-139 (2005).

- [38] Collinsová, M., Jiráček, J.: *Chem. listy* **98**, 1112-1118 (2004).
- [39] Váňa, P., Šmarda, J.: *Chem. listy* **98**, 1130-1134 (2004).
- [40] Patterson, S.D., Aebersold, R.H.: *Nat. Genet.* **33**, 311-323 (2003).
- [41] Graham, D.R., Elliott, S.T., Van Eyk, J.E.: *J. Physiol.* **563**, 1-9 (2004).
- [42] Multimediální učebnice lékařské biologie, genetiky a genomiky, dostupné z: <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/proteomika.htm#obr2>, (5.3.2009).
- [43] Lescuyer, P., Hochstrasser, D. F., Sanchez, J. C.: *Electrophoresis* **25**, 1125-1135 (2004).
- [44] Lee, W. C., Lee, K. H.: *Anal. Biochem.* **324**, 1-10 (2004).
- [45] Zuo, X., Echan, L., Hembach, P., Tang, H. Y., Speicher, K. D., Santoli, D., Speicher, D. W.: *Electrophoresis* **22**, 1603-1615 (2001).
- [46] Metodická příručka firmy Bio-Rad: 2-D Electrophoresis for Proteomics, a Methods and Product Manual.
- [47] Anzenbacher, P., Kovář, J.: *Metody chemického výzkumu pro biochemiky*, (1986).
- [48] Voet, D., Voet, J., G. v knize *Biochemistry*, 3rd Edition (Wiley International Edition) U.S.A., str. 141-151 (2004).
- [49] Nelson, D. L., Cox, M. M. v knize *Lehninger, Principles of Biochemistry*, 4th Edition (W H Freeman & Co) U.S.A. str. 89-96 (2004).
- [50] Ústav hematologie a krevní transfuse, dostupné z: http://www.uhkt.cz/files/proteomika/Prvni_den_2007-proteomika_a_2DE.pdf, (5.3.2009).
- [51] Bio-Rad Laboriem, dostupné z: <http://www.bio-rad.com/>, (5.3.2009).
- [52] Scigelova, M., Makaron, A.: *Proteomics* **6**, 16-21 (2006).
- [53] Polez, M. F., Kristal, B. S., Chernokalskaya, E., Lazarev, A., Shestopalov, A. I., Bogdanova, A., Robinson, M.: *Electrophoresis* **21**, 3427-3440 (2000).
- [54] Selicharová, I., Smutná, K., Šanda, M., Ubik, K., Matoušková, E. Buršíková, E., Brožová, M., Vydra, J., Jiráček, J.: *Proteomics* **7**, 1549-1559 (2007).
- [55] Rabilloud, T.: *Electrophoresis* **13**, 429-439 (1992).
- [56] Kolektiv: *Biochemie, skriptum PřF UK Praha*, str. 53 (1995).
- [57] Sigma-Aldrich spol. s r.o., dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/enzyme%20assay/g4385enz.pdf>, (19.3.2009).
- [58] Blikstad, C., Shokeer, A., Kurtovic, S., Mannervik, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1780**, 1458-1463 (2008).

- [59] Sigma-Aldrich spol. s r.o., dostupné z:
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/glyoxalase_i.Par.0001.File.dat/glyoxalase_i.pdf, (19.3.2009).
- [60] Laemmli, UK.: *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- [61] Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., et al.: *Electrophoresis* **25**, 1327-1333 (2004).
- [62] Band, V., Sanger, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 1249-1253 (1989).
- [63] Somiari, R. I., Russel, S., Sullivan, A., Somiari, S. A., Brzeski, H., Hu, H., Jordan, R., Hooke, J., Shriver, C. D.: *Breast Cancer Res. Treat.* **82**, S140-S140 (2003).
- [64] Bini, L., Magi, B., Marzocchi, B., Arcuri, F., Tripodi, S., Cintorino, M., Sanchez, J. C., Frutiger, S., Hughes, G., Pallini, V., Hochstrasser, D. F., Tosi, P.:
Electrophoresis **18**, 2823-2841 (1997).
- [65] Yuan, Q., An, J., Liu, D., Sun, L., Ge, Y., Huang, Y., Xu, G., Zhao, F.:
Electrophoresis **25**, 1160-1168 (2004).
- [66] Zhou, S., Bailey, M. J., Dunn, M. J., Preedy, V. R., Emery, P. W.: *Proteomics* **5**, 2739-2747 (2005).
- [67] Chung, C.H., Kurien, B.T., Mehta, P., Mhatre, M., Mou, S., Pye, Q.N., Stewart, C., West, M., Williamson, K.S., Post, J., Liu, L., Wang, R., Hensley, K.: *Biochemistry* **46**, 3262-3269 (2007).
- [68] Sreenath, A.S., Kumar, K.R., Reddy, G.V., Sreedevi, B., Praveen, D., Monika, S., Sudha, S., Reddy, M.G., Reddanna, P.: *Clin. Biochem.* **38**, 436-443 (2005).
- [69] Chao, C.C., Huang, Y.T., Ma, C.M., Chou, W.Y., Lin-Chao, S.: *Mol. Pharmacol.* **41**, 69-75 (1992).
- [70] Keith, W.N., Stallard, S., Brown, R.: *Br. J. Cancer* **61**, 712-716 (1990).
- [71] Politi, P., Minoretti, P., Falkone, C., Martinelli, V., Emanuele, E.: *Neurosci. Lett.* **396**, 163-166 (2006).
- [72] Hu, X., Ji, X., Srivastava, S.K., Xia, H., Awasthi, S., Nanduri, B., Awasthi, Y.C., Zimniak, P., Singh, S.V.: *Arch. Biochem. Biophys.* **345**, 32-38 (1997).
- [73] Gilbert, L., Elwood, L., Merino, M., Masood, S., Barnes, R., Steinberg, S., Lazarus, D., Pierce, L., d'Angelo, T., Moscow, J.A., Townsend, A.J., Cowan, K.H.: *J. Clin. Oncol.* **11**, 49-58 (1993).
- [74] Satoh, K., Kitahara, A., Soma, Y., Inaba, Y., Hatayama, I., Sato, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 3964-3968 (1984).

- [75] Proteomický server ExPASy, dostupné z: <http://www.expasy.ch/sprot/>, (15.3.2009).
- [76] Johansson, M., Lundberg, M.: *BMC Biochem.* **8**, 26 (2007).
- [77] Townsend, D.M., Findlay, V.J., Fazilev, F., Ogle, M., Fraser, J., Saavedra, J.E., Ji, X., Keefer, L.K., Tew, K.D.: *Mol. Pharmacol.* **69**, 501-508 (2006).
- [78] Wang, J., Boja, E.S., Tan, W., Tekle, E., Fales, H.M., English, S., Mieyal, J.J., Chock, P.B.: *J. Biol. Chem.* **276**, 47763-47766 (2001).
- [79] Bateman, R.L., Rauh, D., Tavshanjian, B., Shokat, K.M.: *J. Biol. Chem.* **283**, 35756-35762 (2008).
- [80] Alias, Z., Clark, A.G.: *Proteomics* **7**, 3618-3628 (2007).
- [81] Wilchek, M., Jakoby, W.B.: *Meth. Enzymol.* **34**, 3-10 (1974).
- [82] Letelier, M.E., Martínek, M., González-Lira, V., Faúndez, M., Aracena-Parks, P.: *Chem. Biol. Interact.* **164**, 39-48 (2006).