



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Ústav patologie 3. LF UK a FNKV

Markéta Kostrouchová

**Změny proteomu maligních buněk
navozené krátkodobým působením
valproové kyseliny**

*Proteomic changes of malignant cells induced
by short-term treatment with valproic acid*

Diplomová práce

Praha, 2008

Autor práce: **Markéta Kostrouchová**

Studijní obor: **Všeobecné lékařství**

Vedoucí práce: **Prof. MUDr. Václav Mandys, CSc.**

Pracoviště vedoucího práce: **Ústav patologie 3. LF UK a
FNKV**

Datum a rok obhajoby:

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze dne 10.11.2008

Markéta Kostrouchová

Poděkování

Děkuji panu profesorovi MUDr. Václavovi Mandysovi, CSc. za jeho pomoc a podporu během celého projektu, za rady a kritické čtení diplomové práce. Děkuji paní Ivaně Tučkové a slečně Veronice Kostrouchové za pomoc s buněčnými kulturami a paní Martině Černé za pomoc s metodou určení koncentrace proteinů podle Bradfordové. Také bych chtěla poděkovat členům laboratoře Dr. Zdeňka Kostroucha za podporu a pomoc při práci s přístrojem ProteomeLab PF2D Protein Fractionation System. Práce byla podporována výzkumnými záměry č. MSM0021620806 a MSM0021620808 poskytnutými Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a grantem č. 304/07/0529 poskytnutým Grantovou agenturou České republiky.

Obsah

ÚVOD	6
1. MATERIÁL A METODY	9
1.1 <i>Buněčné kultury</i>	
1.2 <i>Světelná mikroskopie</i>	
1.3 <i>Bradford assay</i>	
1.4 <i>Dvou-dimenzionální chromatografie</i>	
1.4.1 <i>Příprava vzorků</i>	
1.4.2 <i>Příprava proteinových lysátů</i>	
1.4.3 <i>Výměna pufrů a odhad proteinové koncentrace</i>	
1.4.4 <i>První dimenze chromatografie: separace proteinů modulem HPCF (High Performance Chromatofocusing)</i>	
1.4.5 <i>Druhá dimenze chromatografie: separace proteinů modulem HPRP (High Performance Reversed Phase)</i>	
2. VÝSLEDKY	15
3. DISKUSE	18
ZÁVĚR	22
SOUHRN	23
SUMMARY	25
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	27
SEZNAM PŘÍLOH.....	29
PŘÍLOHY	30

Úvod

Epigenetická regulace je proces umožňující diferenciální expresi genů v buňkách, které vycházejí ze stejného buněčného progenitoru.

Epigenetická regulace zahrnuje metylaci DNA na CpG ostrůvcích (Feltus et al. 2003), post-translační modifikaci RNA (Ryazansky and Gvozdev 2008) a post-translační modifikaci proteinů jako jsou chromatinové proteiny (Cheung and Lau 2005).

Organizaci chromatinu lze rozdělit na několik úrovní. První úroveň organizace představuje nukleosom (Sternier and Berger 2000).

Nukleosom je opakující se jednotka chromatinu, která se skládá z DNA (146 párů basí) omotané kolem histonového jádra. Histonové jádro (histonový oktamer) je tvořen dvěma kopiemi následujících histonových proteinů: H2A, H2B, H3 a H4. Na bazi nukleosomu blízko DNA vstupu a výstupu se nachází spojovací (linker) histon H1.

Množství histonu H1 na jeden nukleosom je variabilní (Sancho et al. 2008) a jeho přítomnost způsobuje vyšší úroveň organizace chromatinu (Verdone et al. 2006). Histony z histonového oktameru mají N- a C-terminálové konce uspořádané tak, že přesahují DNA a tím jsou přístupné pro kovalentní post-translační modifikace (Fingerman, Du and Briggs 2008) (Příloha č.1).

Mezi post-translační modifikace aminokyselinových zbytků histonů patří fosforylace, acetylace, metylace, poly(ADP ribosylace), ubiquitinace a sumoylace (Chew et al. 2006), (Fingerman, Du and Briggs 2008). Aminokyseliny, na kterých se tyto změny uskutečňují jsou: lysin, arginin, serin, treonin a glutamát (Chew et al. 2006).

Známa post-translační modifikace je acetylace na ϵ -amino skupině některých lysinových zbytků N-terminálních konců histonů (lysinová acetylace, K^{AC}), která byla objevena již v 60. letech 20. století (Cheng et al. 2008). Enzymy zprostředkující tuto modifikaci se nazývají histon

acetyltransferázy (HATs, histone acetyltransferases) a přenášejí acetylovou skupinu z acetyl-CoA. Lysinová acetylace má vliv na náboj dané oblasti histonového konce a způsobuje, že dříve pozitivní oblast histonového konce je po acetylaci neutrální. Tímto mechanismem je oslabena interakce buď mezi histonem a DNA (DNA má negativní náboj) nebo mezi nukleosomem a jiným nukleosomem a/nebo signalizuje konformační změnu a tím destabilizuje strukturu nukleosomu nebo jeho uspořádání a umožňuje přístup jiným jaderným faktorům (např. transkripčnímu komplexu) na genetický lokus (Stern and Berger 2000).

S acetylací chromatinu je spojená transkripční aktivace a naopak s nízkou acetylací chromatinu transkripční inhibice. Enzymy odstraňující acetylové zbytky z postranních řetězců histonů se nazývají histon deacetylázy (HDACs, histone deacetylases).

Abnormální stav histonové acetylace byl dán do souvislosti se vznikem vývojových poruch a nádorových onemocnění. V poslední době se poukazuje na možné terapeutické využití inhibitorů histon deacetylás (HDACIs, histone deacetylase inhibitors) v prevenci nádorů, a to pro jejich schopnost „reaktivovat“ epigeneticky inhibované geny (Jones et al. 2008). Inhibitory histon deacetylás se dělí podle chemické struktury do těchto kategorií: deriváty kyseliny hydroxamové, mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short chain fatty acids, SCFAs), benzamidy, epoxyketony, ne-epoxyketony obsahující cyklické tetrapeptidy a hybridní molekuly. Široce používanou a klinicky efektivní skupinou je skupina SCFAs, jejíž hlavním zástupcem je kyselina valproová (Santini, Gozzini and Ferrari 2007).

Kyselina valproová (2-propylpentanová kyselina) je malá rozvětvená mastná kyselina (Kostrouchova, Kostrouch and Kostrouchova 2007) (Příloha č.2). Používá se k léčbě epileptických záchvatů (absence,

tonicko-klonické a komplexní parciální záchvaty) (Kostrouchova, Kostrouch and Kostrouchova 2007), bipolární poruchy (hlavně manie) (Bowden 2003) a k profylaxi migrény (Evers 2008). Ze studií provedených na kultivovaných nádorových buňkách byl objeven antiproliferační a pro-diferenciační účinek kyseliny valproové. Tyto účinky spolu s dalšími protinádorovými vlivy (indukce apoptózy, zvýšená imunogenicita, inhibice exprese angiogenních proteinů) činí z kyseliny valproové potenciální terapeutické agens pro léčbu nádorů (Kostrouchova, Kostrouch and Kostrouchova 2007).

V naší práci jsme se zaměřili na hodnocení vlivu kyseliny valproové na buněčnou linii uroteliálního karcinomu 5637 použitím objektivní metody, komparativní dvourozměrné chromatografie (Příloha č.3). Tato metoda byla úspěšně použita k charakterizaci proteomu mutantant v genu *nhr-40* u *Caenorhabditis elegans* (Pohludka et al. 2008).

1. Materiál a metody

1.1 Buněčné kultury

Buněčná linie uroteliálního karcinomu 5637 byla získána z Laboratory of Pharmacotoxicology, National Institute for Cancer Research, Genova, Italy. Buňky byly pěstovány v kultivačním mediu D-MEM (Sigma, Praha) doplněném 10% fetálního bovinního séra a 50 µg/ml Gentamycinem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Buňky byly inkubovány v termostatu při 37°C ve zvlhčované atmosféře obsahující 5% CO₂.

1.2 Světelná mikroskopie

Pro morfologickou evaluaci byly 5637 buňky nasazeny do dvojitého kultivačního komůrek (100 000 buněk/komůrku ve 2ml media). Po třídní kultivaci bylo medium odsáto a nahrazeno médiem s kyselinou valproovou při finální koncentraci 1mmol/l a 5mmol/l. Do kontrolních komůrek bylo přidáno medium s ekvivalentním množstvím vody místo kyseliny valproové. Inkubace trvala 6 hodin. Následně byly buňky 3x opláchnuty PBS, fixovány metanolem a obarveny podle Giemsy. Evaluace buněk byla provedena na optickém mikroskopu (Nikon ECLIPSE E 400).

1.3 Bradford assay

5637 buňky byly nasazeny do 96-jamkových mikrotitračních destiček s víčkem (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY): 100µl buněčné suspence/jamku (20 000 buněk/jamku) a uloženy do termostatu do druhého dne. Následný den bylo medium odsáto a do každé jamky bylo přidáno 200µl kultivačního media obsahujícího kyselinu valproovou o finální koncentraci 1mM a 5mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Do kontrolních jamek bylo přidáno medium s

ekvivalentním množstvím vody místo kyseliny valproové. Všechny testy byly provedeny minimálně v triplikátech a ukončovány po 6, 24 a 48 hodinové inkubaci. Medium bylo odsáto, buňky 3x opláchnuty 200 μ l PBS. Po opláchnutí bylo do každé jamky přidáno 50 μ l 0.05% roztoku tritonu x-100. Po 20min. inkubaci na třepačce bylo přidáno 150 μ l barvicího roztoku Bradford Reagent (B6916) (Sigma, St. Louis, MO) a ponecháno dalších 5min. na třepačce. Množství proteinu bylo měřeno na spektrofotometru Biotek EL800 při absorbanci 595nm proti 405nm. Výsledky byly dále statisticky vyhodnoceny Studentovým testem pro zjištění statistické signifikance (programem dostupným na http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test_bulk_form.html).

1.4 Dvourozměrná chromatografie

1.4.1 Příprava vzorků

Buňky linie 5637 byly kultivovány za výše zmíněných podmínek v plastických kultivačních lahvičkách do doby experimentu. Staré médium bylo odstraněno a nahrazeno médiem obsahujícím vodu nebo kyselinu valproovou (při 1mM nebo 5mM finální koncentraci). Inkubace trvala 6 hodin. Médium bylo opět odstraněno a buňky 3x opláchnuty 10ml 1x PBS. Následně bylo k buňkám přidáno 5ml 1x PBS, buňky byly seškrabány ze dna kultivační láhvičky a přeneseny do zkumavky. Následovalo 7min. stočení buňek při 2000rpm na stolní centrifuze (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen Germany). Supernatant byl následně odstraněn a buňky uloženy při -80°C.

1.4.2 Příprava proteinových lysátů

Do každého rozmraženého buněčného vzorku bylo přidáno 1.6ml stock lysis pufru [7.5M urea, 2.5M thiourea, 12.5% glycerol, 50mM Tris,

2.5% n-octylglucoside, 6.25mM Tris-(carboxyethyl) phosphine hydrochloride supplemented with 1x Protease Inhibitor Cocktail (Boehringer Mannheim, Germany)] a vzorky byly intenzivně promíchány na Vortexu. Po odstranění celé nerozpustné frakce byly vzorky stočeny (60 minut při 20000xg a teplotě 4°C). Supernatant byl odstraněn a vzorky byly buď ihned dále použity nebo zamraženy v -80°C a použity později.

1.4.3 Výměna pufru a odhad proteinové koncentrace

Stock lysis pufr byl vyměněn za Start pufr (Beckman Coulter, Fullerton, CA) pomocí kolony PD-10 (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). Nejprve byl Start pufr přidán k výše zmíněnému buněčnému lysátu do finálního objemu 2.5ml a pak byl tento roztok resuspendován pomocí Vortexu. Kolona PD-10 byla ekvilibrována 25ml Start pufru. 2.5ml vzorku bylo naloženo na kolonu PD-10 a první eluát vypuštěn. Proteiny byly eluovány Start pufr; pouze první 3.5ml frakce bylo odebráno k další analýze. Proteinová koncentrace byla pak změřena pomocí BCA Assay Kit (Pierce, Rockford, IL).

1.4.4 První dimenze chromatografie: separace proteinů modulem HPCF (High Performance Chromatofocusing)

První i druhá dimenze byly provedeny na ProteomeLab Protein Fractionation 2 Dimensional (PF 2D) systému (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

A. Příprava roztoků

Čtyři různé roztoky byly použity: Start pufr, Eluent pufr, High-ionic Strength Wash a voda (stupeň čistoty HPLC). pH Start pufru a Eluent pufru (Beckman Coulter, Fullerton, CA) bylo měřeno na kalibrovaném

pH monitoru HPCF modulu. pH Start pufru bylo správné již v originálním balení ($\text{pH } 8.5 \pm 0.1$). Eluent pufr byl upraven pomocí saturovaného roztoku (50mg/ml) iminodiacetové kyseliny (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) na $\text{pH } 4.0 \pm 0.1$. Oba pufrы byly uloženy v 4°C do doby spuštění pokusu (run procedure). High Ionic Strength Wash byl připraven rozpuštěním 58.44g NaCl v 1000ml destilované vody a byl poté filtrován.

B. Příprava HPCF modulu

Hadička A4 (solvent line A4) HPCF modulu byla umístěna do roztoku A4 (voda stupně čistoty HPLC). Do hadičky A4 bylo vytlačeno pomocí stříkačky přibližně 10ml roztoku A4, aby bylo zajištěno, že žádný vzduch v hadičce nezůstal. Stejný krok se stříkačkou a A4 roztokem byl proveden na HPCF modulu. Voda byla puštěna o rychlosti toku 0.2ml/min na 15 minut. Poté co byla provedena kalibrace pH monitoru bylo změřeno pH Start pufru a Eluent pufru. Hadičky A1-A3 byly vloženy do příslušných roztoků: hadička A1 do Start pufru, hadička A2 do Eluent pufru, hadička A3 do High Ionic Strength Wash. Hadičky pak byly primovány, opět aby v nich nezůstal žádný vzduch. Na HPCF modul byla instalována kolona HPCF 1D (Beckman Coulter, Fullerton, CA) a voda byla puštěna přes kolonu rychlostí 0.2ml/min na 45 minut. Mezitím byla zapnuta UV-1 lampa. Po promytí kolony následovala její ekvilibrace 100% Start pufrém, která trvala 130 minut při rychlosti toku 0.2ml/min . Asi 10 minut po začátku předchozího kroku byla kalibrována lampa UV-1.

C. Příprava modulu FC/I (Fraction Collector/Injection)

Z přímé kontroly obrazovky (Direct Control mode) bylo zapnuto chlazení pro FC/I podložku. 96-jamková destička s hlubokými a

okrouhlými jamkami (96-deep round well plate, Beckam Coulter) byla vložena na podložku.

D. Vlastní analýza (run procedure)

Potom, co byla HPCF kolona ekvilibrována Start pufrem, byl spuštěn konstantní tok kolonou. Pro vložení vzorku bylo držátko na manuálním injektoru posunuto do pozice pro vložení vzorku. Vzorek byl nabrán do plastické stříkačky s jehlou s plochým koncem a 2ml (1-5mg proteinu) vzorku bylo vstříknuto do přístroje. Stříkačka byla ponechána v injektoru během celé analýzy. Manuální injektor byl posunut do pozice "inject" po ohlášení zprávy "Waiting for trigger" a metoda byla spuštěna. První dimenze zkončila po 185 minutách a frakce byly uchovány v -80°C.

1.4.5 Druhá dimenze chromatografie: separace proteinů modulem HPRP (High Performance Reversed Phase)

A. Příprava roztoků

Roztok A (0.10% triflorooctová kyselina (TFA, trifluoroacetic acid) ve vodě): 1000ml nádoba byla naplněna přibližně 90% objemu vodou (stupně čistoty HPLC). 1ml TFA byl přidán do nádoby v digestoři a zbývajících 10% objemu doplněno vodou (stupně čistoty HPLC).

Roztok B (0.08% TFA v acetonitrilu): 1000ml nádoba byla naplněna přibližně 90% objemu acetonitrilem. 0.8ml TFA bylo přidáno do nádoby v digestoři a zbývajících 10% objemu doplněno acetonitrilem.

B. Příprava modulu HPRP

Hadičky (solvent lines) z modulu HPRP byly umístěny do následujících roztoků: hadička A1 do Roztoku A, hadička B1 do Roztoku B. Obě hadičky a HPRP pumpa A a HPRP pumpa B byly upraveny odsátím

vzduchu. Kolona HPRP 2D (Beckman Coulter, Fullerton, CA) byla nainstalována na modul HPRP. Pět minut bylo kolonou HPRP 2D puštěno 100% Roztoku B o rychlosti toku 0.75ml/min. Mezitím byly zapnuty ohřívač kolony a UV-2 lampa. Pak bylo puštěno přes kolonu 100% Roztoku A alespoň na 10 minut o rychlosti 0.75ml/min. Během tohoto času se provedla kalibrace UV-2 lampy. Po uplynutí požadovaného času se tok nastavil na 0ml/min.

C. Příprava FC/I modul

Z Direct Control obrazovky bylo zapnuto chlazení pro FC/I podložku. 96-jamková destička s frakcemi z první dimenze byla vložena na podložku.

D. Vlastní analýza (run procedure)

Frakce sesbírané v první dimenzi byly všechny puštěny jednotlivě v druhé dimenzi. Po aktivaci metody (vyznačené tlačítko start), 200 μ l z jedné specifikované frakce z první dimenze bylo nasáto automatickým modulem a proteiny z této frakce separovány v druhé dimenzi. Separované proteiny (reprezentovány jako hroty na chromatogramu) byly monitorovány spektroskopicky (měřeno při 214nm v UV-2 okénku). Po asi 6-8 minutách od začátku metody byl zaznamenán první hrot a od toho okamžiku jsme tuto druhou separaci proteinů sbírali opět do 96-jamkové destičky. Separaci jsme přestali sbírat, když žádné hroty se již nezobrazovaly v UV-2 okénku. Každá analýza trvala 45 minut.

E. Chromatografická analýza

Chromatogramy druhé dimenze byly zpracovány programem 32 Karat a exportovány do zásobního souboru .asc. Stejně chromatogramy

druhé dimenze z různého materiálu (z 5637 buněk ovlivněné 1mM nebo 5mM kyselinou valproovou nebo z 5637 kontrolních buněk) byly porovnány programem 32 Karat k identifikaci stejných chromatografických hrotů, které se od sebe lišily velikostí. Chromatogramy druhé dimenze byly dále analyzovány pomocí programu ProteoVue od Beckman Coulter. Tento program zprostředkoval konverzi na .dat soubory, které umožňují grafické zobrazení hrotů individuálních chromatogramů.

Diferenciální mapy pro frakce se stejnými chromatografickými charakteristikami byly vytvořeny programem DeltaVue, který byl rovněž poskytnut firmou Beckman Coulter. Tento program byl použit i k vytvoření diferenciálních proteinových map porovnávaných celých proteomů. Frakce, které byly identifikovány programem DeltaVue jako diferenciálně exprimované v porovnávaném materiálu, byly zpětně analyzovány v porovnávaných chromatogramech druhých dimenzí zobrazených v překrývaných grafech vytvořených programem 32 Karat. Hroty na chromatogramech, které se jednoznačně lišily v porovnávaných materiálech, byly vybrány pro následnou analýzu hmotnostní spektrometrií.

2. Výsledky

2.1 Morfologie buněk

Buňky narostlé v kultivačních komůrkách byly malé, převážně trojúhelníkové, polygonální nebo hvězdicovité s poměrně chudou cytoplazmou a kulatým jádrem. Buňky krátkodobě inkubované (6 hodin) s kyselinou valproovou nevykazovaly žádné zřetelné morfologické změny v porovnání s kontrolními buňkami (Příloha č.4).

2.2 Růst buněk

Růstová dynamika buněčné kultury 5637 byla hodnocena pomocí stanovení celkového proteinu. Bylo zjištěno, že kyselina valproová inhibuje růst sledovaných nádorových buněk. Inhibice růstu buněk byla statisticky signifikantní již po 24 hodinové inkubaci s 5mM kyselinou valproovou (Příloha č.5). Statisticky signifikantní účinek po inkubaci s 1mM kyselinou valproovou se projevil až po 48 hodinách.

2.3 Vliv kyseliny valproové na proteom kultivovaných buněk

2.3.1 Separace proteinů v první dimenzi

Proteiny získané po buněčné lýze zkoumaných buněk vykazovaly charakteristický profil v celém rozsahu sledovaného pH a NaCl gradientu. pH profily kontrolních buněk, buněk po inkubaci s 1mM kyselinou valproovou a buněk po inkubaci s 5mM kyselinou valproovou svědčí pro vysoký stupeň reprodukovatelnosti (Příloha č.6A). Eluční gradient pH trval přibližně 110 minut a začínal na pH 8.5 a končil na pH 4.5. Zbývající proteiny byly dále eluovány zvyšující se koncentrací NaCl. Nejvýraznější změny chromatogramů první dimenze bylo možno odhadovat ze změn absorpance v UV-1 části spektra (měřeného při 280nm). Projevovaly se jako změny ve velikosti jednotlivých hrotů ve stejném elučním čase při porovnání všech tří experimentálních (Příloha č.6B).

2.3.2 Separace proteinů v druhé dimenzi

Chromatogramy druhé dimenze kontrolních 5637 buněk, 5637 buněk inkubovaných v 1mM kyselině valproové a 5637 buněk inkubovaných v 5mM kyselině valproové ukázaly rozdíly v chromatografických

profilech. V příloze č.7A a 7B je znázorněn chromatogram frakce C6 ze všech tří zkoumaných materiálů. Příloha č.7A ukazuje posun eluovaných proteinů pro kontrolní buňky (26. minuta) a buňky po inkubaci s 5mM kyselinou valproovou (26.5 minuta) oproti buňkám po inkubaci s 1mM kyselinou valproovou (23.9 minuta). Po manuálním posunu chromatogramů se zvyrazňuje rozdíl ve velikosti porovnávaných hrotů (Příloha č.7B), čímž se usnadňuje výběr částí frakcí k následné analýze hmotnostní spektrometrií. Ve frakci C6 druhé dimenze se jako kandidáti k analýze hmotnostní spektrometrií jeví vysoké hroty po 28. minutě a kolem 30. minuty, a to u buněk inkubovaných v obou koncentracích kyseliny valproové.

2.3.3 Diferenciální zobrazení kontrolních buněk a buněk inkubovaných s kyselinou valproovou

Integrace všech chromatogramů druhých dimenzí (celý proteom) jednotlivých experimentů (kontrolních buněk, buněk po inkubaci s 1mM nebo 5mM kyselinou valproovou) do grafického zobrazení podobného elektroforetickému gelu je možná pomocí programu ProteoVue. Celý proteom je znázorněn v Příloze č.8A (kontrolní buňky), č.8B (buňky po inkubaci s 1mM kyselinou valproovou) a č.8C (buňky po inkubaci s 5mM kyselinou valproovou). Na ose x je pI profil, kterým byly rozděleny proteiny na basické (na začátku osy x) a kyselé (na konci osy x) v první dimenzi. Na ose y je profil hydrofobicity, kterým byly proteiny rozděleny na proteiny s nízkým stupněm hydrofobicity (na začátku osy y) a s vysokým stupněm hydrofobicity (na konci osy y) v druhé dimenzi. Porovnání Příloh č.8A, 8B a 8C ukazuje, že síla zbarvení proteinů ve sloupci 28 (lane 28) u všech příloh v obrázku s fialovým pozadím odpovídá různě vysokým hrotům v obrázku v levé části. Obrázek dokumentuje, že odlišně přítomné

proteiny je možné pozorovat v celém rozsahu pH. Proteom 5637 buněk ovlivněných 1mM kyselinou valproovou ukazuje prominentní hroty v hydrofobní části spektra (Příloha č.8B). Tento trend je také pozorovatelný v proteomu buněk 5637 ovlivněných 5mM kyselinou valproovou (Příloha č.8C).

Program DeltaVue umožnil porovnávat individuální frakce z jednotlivých chromatogramů, jakož i diferenciální zobrazení celých proteomů porovnávaných buněk (Příloha č.9A, 9B, 9C). Příloha č.9A porovnává sloupec 28 (lane 28) kontrolních buněk (vlevo) se stejným sloupcem buněk inkubovaných s 1mM kyselinou valproovou (vpravo). Ve střední části je diferenciální zobrazení celých proteomů kontrolních buněk a buněk po inkubaci s 1mM kyselinou valproovou. Porovnávání individuálních frakcí získaných z různých experimentálních materiálů umožňuje snadný výběr frakcí s výraznými rozdíly ve velikosti hrotů a jejich následnou analýzu hmotnostní spektrometrií.

3. Diskuse

Kapalinová chromatografie je metoda jejíž původ sahá do začátku 20. století. Tato metoda má významnou pozici v biochemických separačních postupech. Separace molekul pomocí kapalinové chromatografie je založena na několika fyzikálních vlastnostech, jako jsou isoelektrický bod (pI, isoelectric point) a hydrofobicita. Reprodukovatelnost současných chromatografických nástrojů umožňuje porovnávání různých materiálů a hledání variabilně se vyskytujících molekul. Komerčně dostupný systém ProteomeLab PF2D od firmy Beckman Coulter reprezentuje zařízení výjimečné kvality,

které separuje proteiny z komplexních materiálových směsí na základě pI v první dimenzi a hydrofobicity dimenzi druhé.

V této práci jsme zkoumali vliv kyseliny valproové (1mM nebo 5mM) na buněčnou linii uroteliálního karcinomu 5637. Efekt valproové kyseliny na růst kultivovaných nádorových buněk byl charakterizován dříve. Inhibice růstu buněčných linií neuroblastomu myši (Neuro-2A) a gliomu krysy (C6) byla popsána Reganem již v roce 1985 (Kostrouchova, Kostrouch and Kostrouchova 2007). Lidské buněčné linie jejichž růst byl inhibován valproovou kyselinou jsou následující: mnohočetný myelom, lymfoidní nádory, maligní gliom, meduloblastom, endometrální karcinom, karcinom děložního čípku, ovariální karcinom, adenokarcinom prsu, adenokarcinom tlustého střeva, karcinom štítné žlázy a maligní melanom (Greenblatt et al. 2007). V naší práci jsme zjistili, že růstová aktivita buněk linie 5637 je závislá na dávce. Inhibice růstu byla statisticky signifikantní v buňkách ovlivněných 5mM kyselinou valproovou po 24 hodinách; v buňkách ovlivněných 1mM kyselinou valproovou se statisticky signifikantní efekt projevil až po 48 hodinách. Krátkodobá expozice (6 hodin) kyseliny valproové neměla vliv na buněčný růst. Tyto výsledky jsou ve shodě s dříve publikovanými pracemi.

Dále jsme sledovali vliv krátkodobé inkubace (6 hodin) s kyselinou valproovou na morfologii 5637 buněk. Rozdíl v morfologii kultivovaných buněk inkubovaných v médiu s kyselinou valproovou proti buňkám kontrolním jsme nepozorovali.

Hlavním cílem naší práce bylo celoproteomové porovnání buněk 5637 po šestihodinové inkubaci s médiem obsahujícím kyselinu valproovou

(1mM nebo 5mM) s kontrolními buňkami 5637 po 6 hodinové inkubaci s médiem obsahujícím vodu. Dvourozměrná chromatografie umožňuje analýzu téměř celého proteomu kultivovaných buněk nebo tkání, a reprezentuje objektivní proteomovou strategii. Analyzovaný materiál je tvořen všemi proteiny získanými po lýze vzorku puřrem obsahujícím ureu. Jediný omezující krok této metody je eliminace malých proteinů a peptidů (<10 kDa), které mohou obsahovat produkty proteinové degradace. Chromatografická separace první dimenze (isoelektrická chromatofokusace) potvrdila vysokou reprodukovatelnost metody ve všech třech zkoumaných materiálech: pH profily byly prakticky identické (Příloha č. 6A) a proteinové chromatogramy vykazovaly stejný profil (Příloha č. 6B). Chromatogramy separace v druhém rozměru (separace podle hydrofobicity) ukázaly podstatné rozdíly v odpovídajících frakcích (Příloha č. 7A, 7B). Tyto rozdíly se projevují jako rozdílně vysoké hroty proteinů s identickými chromatografickými charakteristikami ve zkoumaných materiálech. Analýza celoproteomových zobrazení a individuálních chromatogramů v programu 32 Karat ukázala, že kyselina valproová způsobuje změny závislé na dávce kyseliny valproové. Předpokládáme, že frakce odpovídající odlišným chromatografickým hrotům obsahují proteiny diferenciaciálně exprimované proteiny v souvislosti s expozicí kyselině valproové. Více než 20 frakcí s takto změněnými proteiny je nyní určeno k analýze hmotnostní spektrometrií.

Naše práce potvrdila možnost použití dvourozměrné chromatografie k odhalení diferenciaciálně exprimovaných proteinů v porovnávaných materiálech. Nicméně komplikovanost přístupu a požadavek identických chromatografických charakteristik v opakovaných analýzách ukázaly na některé technické problémy, které mohou

ovlivnit chromatografické určení sledovaných proteinů a které je nutno mít na zřeteli při konečném hodnocení porovnávaných analýz. Tyto problémy se týkají především práce s druhou dimenzí chromatografie a mohou se projevit jako chromatografický posun eluovaných proteinů v těchto chromatogramech. Program 32 karat umožňuje kompenzaci takového problému, a to manuální korekcí (posunem) celých chromatogramů. Je také možné opakovat analýzu druhé dimenze, protože pouze část z frakcí první dimenze (200 μ l z 600 μ l) je použita k separaci v druhé dimenzi. Některé analýzy druhé dimenze vykazovaly velmi odlišné základní linie (baseline) (Příloha č.8B, sloupec č.5). Takové analýzy nebyly dále používány pro výběr diferencially exprimovaných proteinů. Tyto analýzy mohou být opětovně provedeny z uchovaných frakcí první dimenze.

Možnost porovnávat celé proteomy bez úvodních separačních kroků je stále ještě ojedinělá. Vyhledávání v literatuře pomocí PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) ukázalo 19 publikací, které použily metodu ProteomeLab PF 2D. V poslední době se také objevily další možnosti rozšíření této metody a to použitím speciálních kultivačních médií obohacených stabilními isotopy (Wu WW, Wang G, Yu MJ, Knepper MA, Shen RF) (Wu et al. 2007); použití této metody může znásobit počet identifikovaných proteinů přítomných v odlišných koncentracích ve sledovaných materiálech o jeden nebo dva řády. Dvourozměrná komparativní chromatografie by tak mohla představovat metodu volby pro první detailní analýzu srovnávaných kompletních proteomů.

Závěr

Naše výsledky prokázaly možnost diferenciální analýzy kompletních proteomů metodou dvourozměrná chromatografie při použití ProteomeLab Protein Fractionation 2 Dimensional (PF 2D) systému vyvinutého firmou Beckman Coulter. Prokázali jsme, že kyselina valproová v koncentraci 1mM a 5mM způsobuje posun určitých proteinů, a to jak v zásaditém tak kyselém pI spektru. Takto identifikované proteiny mohou být dále blíže charakterizovány hmotnostní spektrometrií.

Souhrn

Nádory jsou klonální onemocnění mnohobuněčných organismů, které vznikají akumulací genetických mutací a postupnou indukci epigenetických jevů jež mají za následek transkripční útlum tumor supresorových genů a naopak aktivací exprese tumor propagujících genů. Toto umožňuje nádorovým buňkám, v kombinaci se změnou odpovědi hostitelského organismu, aby překonaly regulační kaskády, které řídí správnou kooperaci buněk v mnohobuněčném organismu. Epigenetická regulace se uskutečňuje na úrovni DNA metylací CpG ostrůvků a na úrovni post-translační modifikace chromatinových proteinů, histonů na prvním místě. Post-translační modifikace histonů zahrnuje fosforylaci, acetylaci, metylaci, biotinylní, poly(ADP ribosylaci), ubiquitinaci a sumoylaci. Histonová acetylace je spojena s transkripční aktivací neboli „otevřeností“ chromatinu k regulaci transkripčními faktory. Histony jsou acetylované histon acetyltransferásami (HATs, histone acetyltransferases). Histonová acetylace je dynamický proces, který je zvrátitelný histon deacetylásami (HDACs, histone deacetylases), což jsou enzymy odstraňující acetylový zbytek z acetylovaných histonů.

Snížená genová exprese navozená nízkou acetylací histonů je součástí nádorově specifického transkripčního profilu, který je charakterizován utlumenou expresí nebo kompletní eliminací exprese tumor supresorových genů. Zdá se, že by bylo možné použít inhibitory histon deacetylás (HDACIs, histone deacetylase inhibitors) jako nástroje k indukci exprese inhibovaných genů.

Kyselina valproová je široce používaným lékem v léčbě epilepsie a manie u bipolární poruchy. V poslední době bylo zjištěno, že kyselina

valproová působí jako silný inhibitor HDAC (HDACi) s relativně malými nežádoucími účinky.

V této práci jsme zkoumali vliv kyseliny valproové na téměř celý proteom buněčné linie uroteliálního karcinomu 5637 prostřednictvím dvourozměrné komparativní chromatografie. Tento přístup odhalil velké množství diferencially exprimovaných proteinů v širokém rozsahu pI spektra.

Naše výsledky ukazují, že krátkodobé působení kyseliny valproové indukuje komplexní proteomové změny, které nejspíše souvisejí s alteracemi četných regulačních proteinů.

Summary

Cancers are clonal disorders of multicellular organisms that arise by accumulation of genetic mutations and step-wise induction of epigenetic events that silence transcription of tumor suppressing genes and facilitate expression of tumor promoting genes. This allows cancer cells in combination with altered response of host organism to overcome the regulatory cascades that orchestrate proper cooperation of cells within the multicellular organism.

Epigenetic regulation is executed on the level of DNA by methylation of CpG islands and on the level of post-translational modification of chromatin proteins, histones in the first place.

Post-translational modifications of histones include histone phosphorylation, acetylation, methylation, biotinylation, poly(ADP ribosylation), ubiquitination and sumoylation. Histone acetylation is connected with transcription activation or "openness" of chromatin to regulation by transcriptional factors. Histones are acetylated by histone acetyltransferases (HATs). Histone acetylation is a dynamic process that is reversed by histone deacetylases (HDACs), enzymes that are able to remove the acetyl residue from the acetylated histones.

A decrease in gene expression brought about by low acetylation of histones is part of the cancer specific transcription profile that is characterized by low expression or complete elimination of expression of tumor suppressor genes. It seems possible to use inhibitors of HDACs (HDACi) as tools for the induction of expression of silenced genes.

Valproic acid is a drug widely used for the treatment of epilepsy and mania in bipolar disorder. Recently it was discovered that valproic acid acts as a potent HDAC inhibitor (HDACi).

Here, we examined the effect of valproic acid on the near-complete proteome of urothelial carcinoma cell line 5637 using two-dimensional comparative chromatography. This approach revealed a large number of differentially expressed proteins in a wide range of pI spectrum. Our results show that short-term treatment with valproic acid induces complex proteomic changes that are likely to be related with alterations of multiple regulatory proteins.

Seznam použité literatury

- Bowden, C. L. 2003. "Acute and maintenance treatment with mood stabilizers." *Int J Neuropsychopharmacol* 6:269-75.
- Cheng, Z., Y. Tang, Y. Chen, S. Kim, H. Liu, S. S. Li, W. Gu, and Y. Zhao. 2008. "Molecular characterization of propionyllysines in non-histone proteins." *Mol Cell Proteomics*.
- Cheung, P., and P. Lau. 2005. "Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants." *Mol Endocrinol* 19:563-73.
- Chew, Y. C., G. Camporeale, N. Kothapalli, G. Sarath, and J. Zempleni. 2006. "Lysine residues in N-terminal and C-terminal regions of human histone H2A are targets for biotinylation by biotinidase." *J Nutr Biochem* 17:225-33.
- Evers, S. 2008. "Treatment of migraine with prophylactic drugs." *Expert Opin Pharmacother* 9:2565-73.
- Feltus, F. A., E. K. Lee, J. F. Costello, C. Plass, and P. M. Vertino. 2003. "Predicting aberrant CpG island methylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12253-8.
- Fingerman, I. M., H. N. Du, and S. D. Briggs. 2008. "Controlling histone methylation via trans-histone pathways." *Epigenetics* 3.
- Greenblatt, D. Y., A. M. Vaccaro, R. Jaskula-Sztul, L. Ning, M. Haymart, M. Kunnimalaiyaan, and H. Chen. 2007. "Valproic acid activates notch-1 signaling and regulates the neuroendocrine phenotype in carcinoid cancer cells." *Oncologist* 12:942-51.
- Jones, J., E. Juengel, A. Mickuckyte, L. Hudak, S. Wedel, D. Jonas, and R. A. Blaheta. 2008. "The Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Alters Growth Properties of Renal Cell Carcinoma in Vitro and in Vivo." *J Cell Mol Med*.
- Kostrouchova, M.Jr., Z. Kostrouch, and M. Kostrouchova. 2007. "Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways." *Folia Biol (Praha)* 53:37-49.
- Pohludka, M., K. Simeckova, J. Vohanka, P. Yilma, P. Novak, M. W. Krause, M. Kostrouchova, and Z. Kostrouch. 2008. "Proteomic analysis uncovers a metabolic phenotype in *C. elegans* after nhr-40 reduction of function." *Biochem Biophys Res Commun* 374:49-54.
- Ryazansky, S. S., and V. A. Gvozdev. 2008. "Small RNAs and cancerogenesis." *Biochemistry (Mosc)* 73:514-27.
- Sancho, M., E. Diani, M. Beato, and A. Jordan. 2008. "Depletion of human histone H1 variants uncovers specific roles in gene expression and cell growth." *PLoS Genet* 4:e1000227.
- Santini, V., A. Gozzini, and G. Ferrari. 2007. "Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as a premise to clinical application." *Curr Drug Metab* 8:383-93.

- Sterner, D. E., and S. L. Berger. 2000. "Acetylation of histones and transcription-related factors." *Microbiol Mol Biol Rev* 64:435-59.
- Verdone, L., E. Agricola, M. Caserta, and E. Di Mauro. 2006. "Histone acetylation in gene regulation." *Brief Funct Genomic Proteomic* 5:209-21.
- Wu, W. W., G. Wang, M. J. Yu, M. A. Knepper, and R. F. Shen. 2007. "Identification and quantification of basic and acidic proteins using solution-based two-dimensional protein fractionation and label-free or 18O-labeling mass spectrometry." *J Proteome Res* 6:2447-59.

Seznam příloh

Příloha č.1) Histonový oktamer rozložený na dvě části a schematické znázornění hlavních post-translačních modifikací

Příloha č.2) Kyselina valproová (2-propylpentanová kyselina)

Příloha č.3) Dvourozměrná kapalinová chromatografie

Příloha č.4) Morfologie buněčné linie uroteliálního karcinomu 5637

Příloha č.5) Vliv kyseliny valproové (1mM a 5mM) na růstovou dynamiku 5637 buněk (Bradford assay)

Příloha č.6A) pH profil první dimenze

Příloha č.6B) Chromatografický profil první dimenze v UV-1 části spektra (měřeno při 280nm)

Příloha č.7A) Komparativní chromatografie druhé dimenze frakce C6

Příloha č.7B) Komparativní chromatografie druhé dimenze frakce C6 s manuální korekcí

Příloha č.8A) Celý proteom kontrolních 5637 buněk zpracován programem ProteoVue

Příloha č.8B) Celý proteom 5637 buněk po ovlivnění 1mM kyselinou valproovou zpracován programem ProteoVue

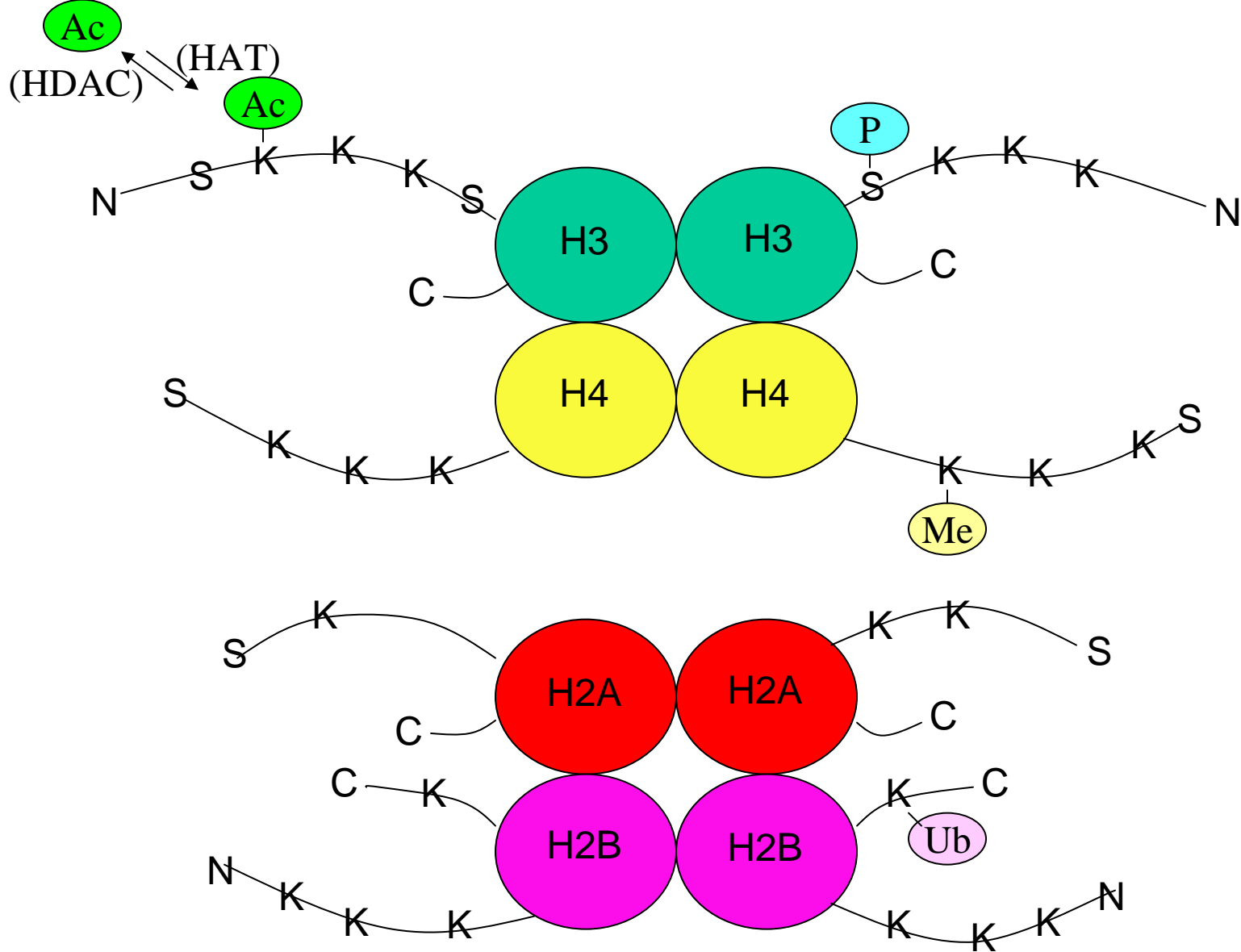
Příloha č.8C) Celý proteom 5637 buněk po ovlivnění 5mM kyselinou valproovou zpracován programem ProteoVue

Příloha č.9A) Diferenciální zobrazení celých proteomů kontrolních 5637 buněk a 5637 buněk po inkubaci s 1mM kyselinou valproovou pomocí programu DeltaVue

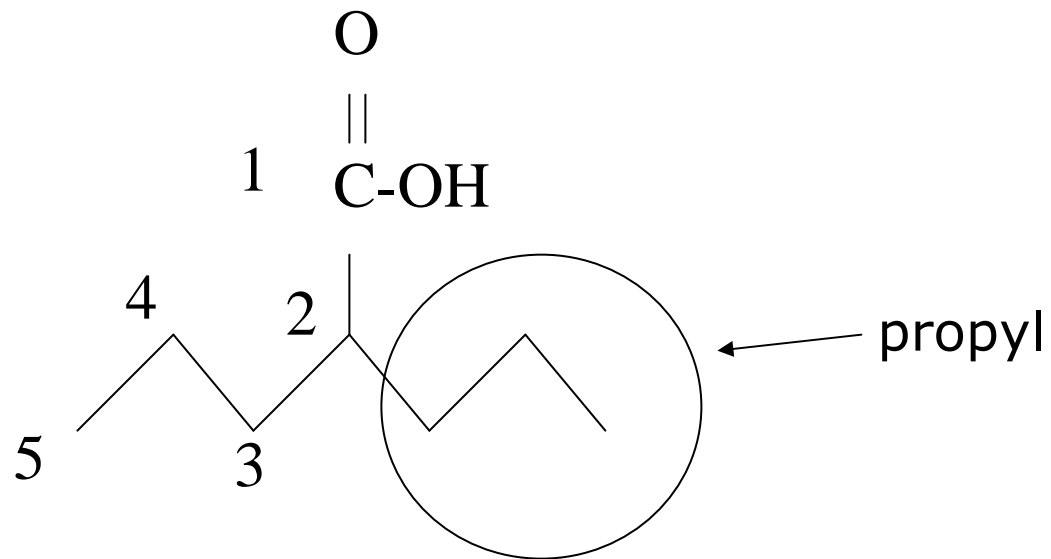
Příloha č.9B) Diferenciální zobrazení celých proteomů kontrolních 5637 buněk a 5637 buněk po inkubaci s 5mM kyselinou valproovou pomocí programu DeltaVue

Příloha č.9C) Diferenciální zobrazení celých proteomů 5637 buněk po inkubaci s 1mM a 5mM kyselinou valproovou pomocí programu DeltaVue

Přílohy

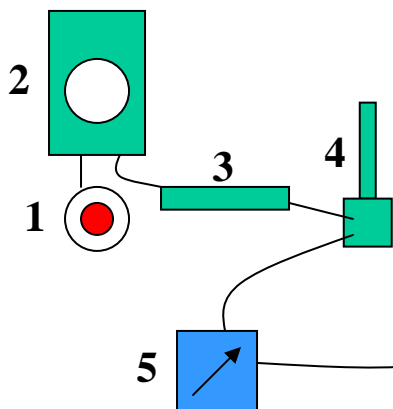


Příloha č.1) Histonový oktamer rozložený na dvě části a schematické znázornění hlavních post-translačních modifikací

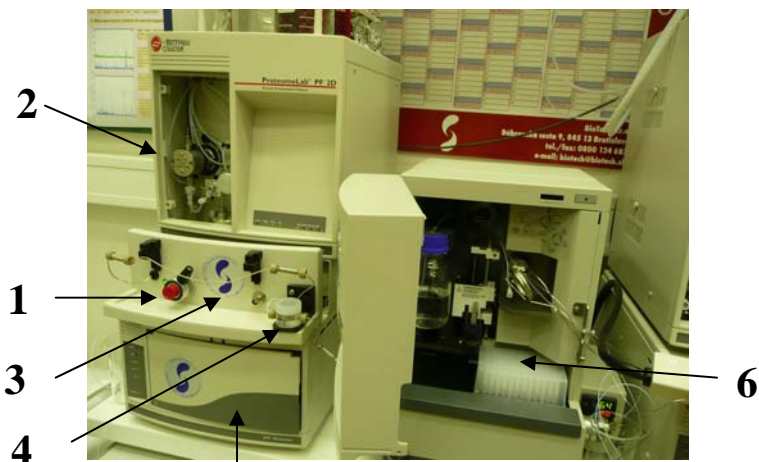
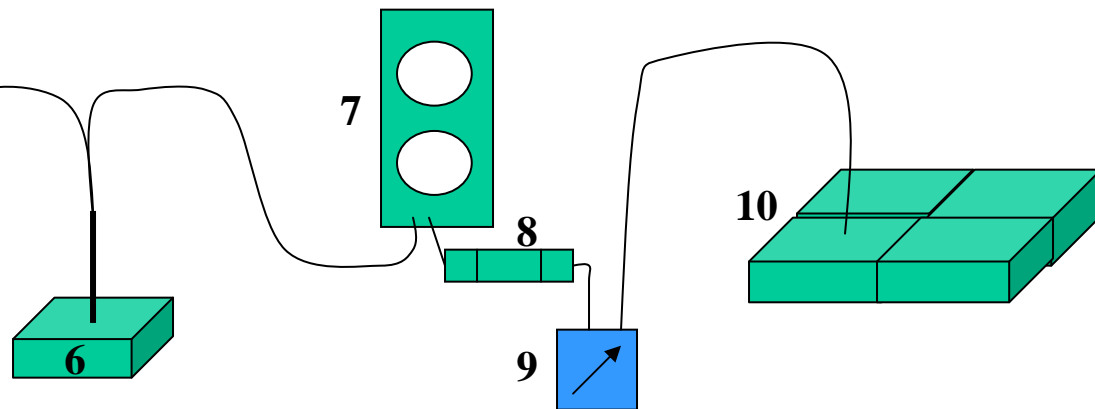


Příloha č.2) Kyselina valproová (2-propylpentanová kyselina)

I. První dimenze (Chromatofokusace)



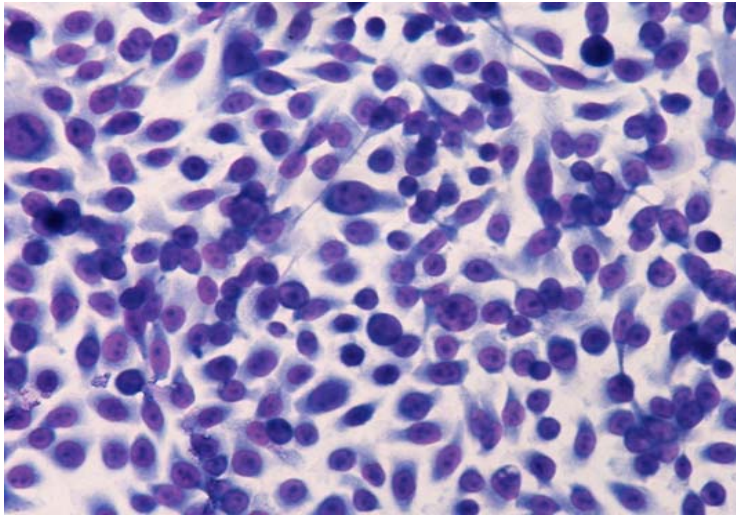
II. Druhá dimenze (Reversed-Phase Chromatografie)



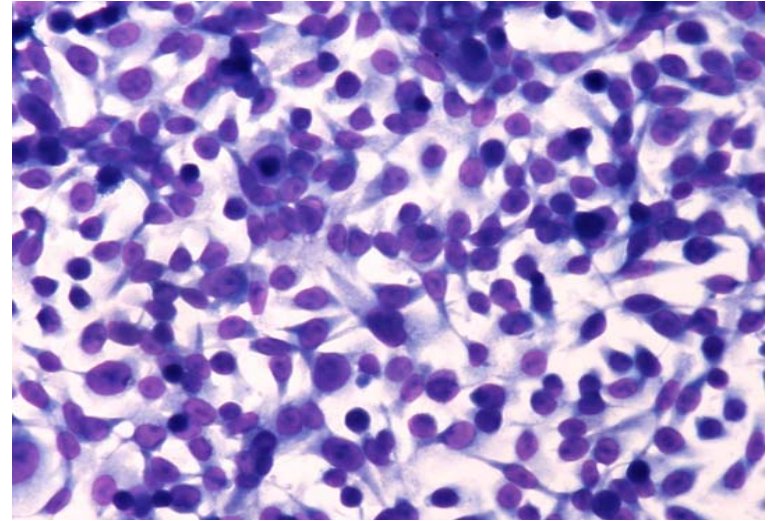
1. Manuální injektor pro vzorek
2. Modul HPCF s pumpou
3. Kolona HPCF 1D (na fotografii není instalována)
4. Místo pro pH metr
5. UV-1 detektor (280nm)

6. Fraction Collector/Injection (FC/I) Modul
7. Modul HPRP s pumpou A (dole) a pumpou B (nahore)
8. Kolona HPRP 2D
9. UV-2 detektor (214 nm)
10. Kolektor frakcí druhé dimenze

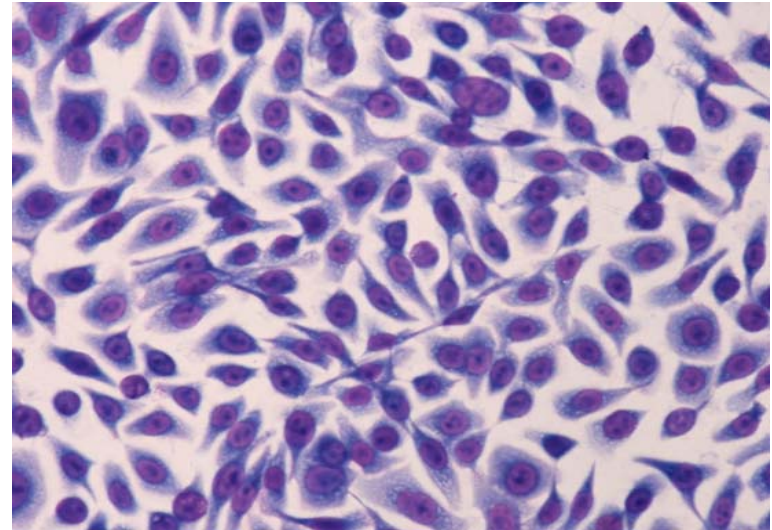
A



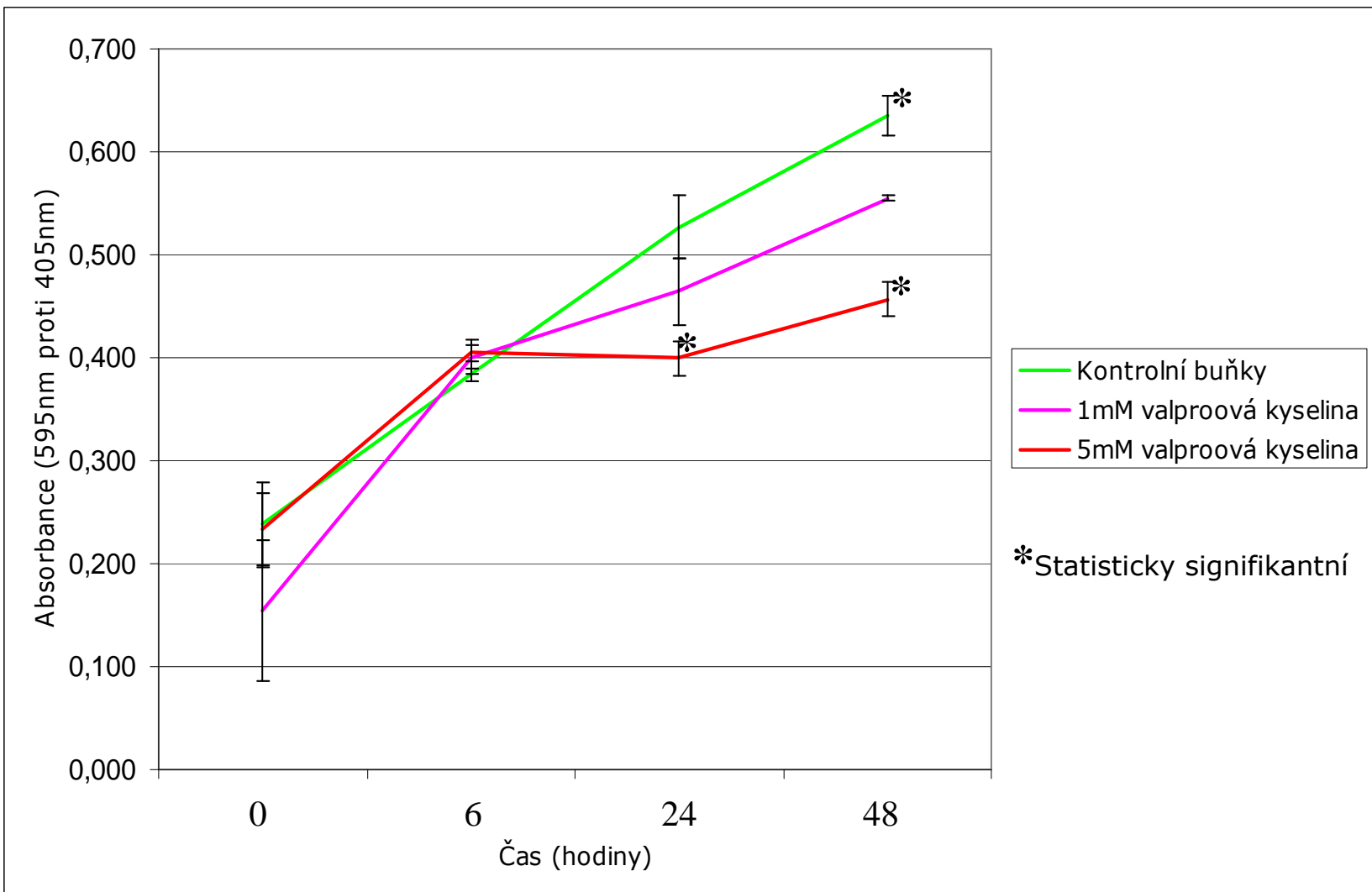
B



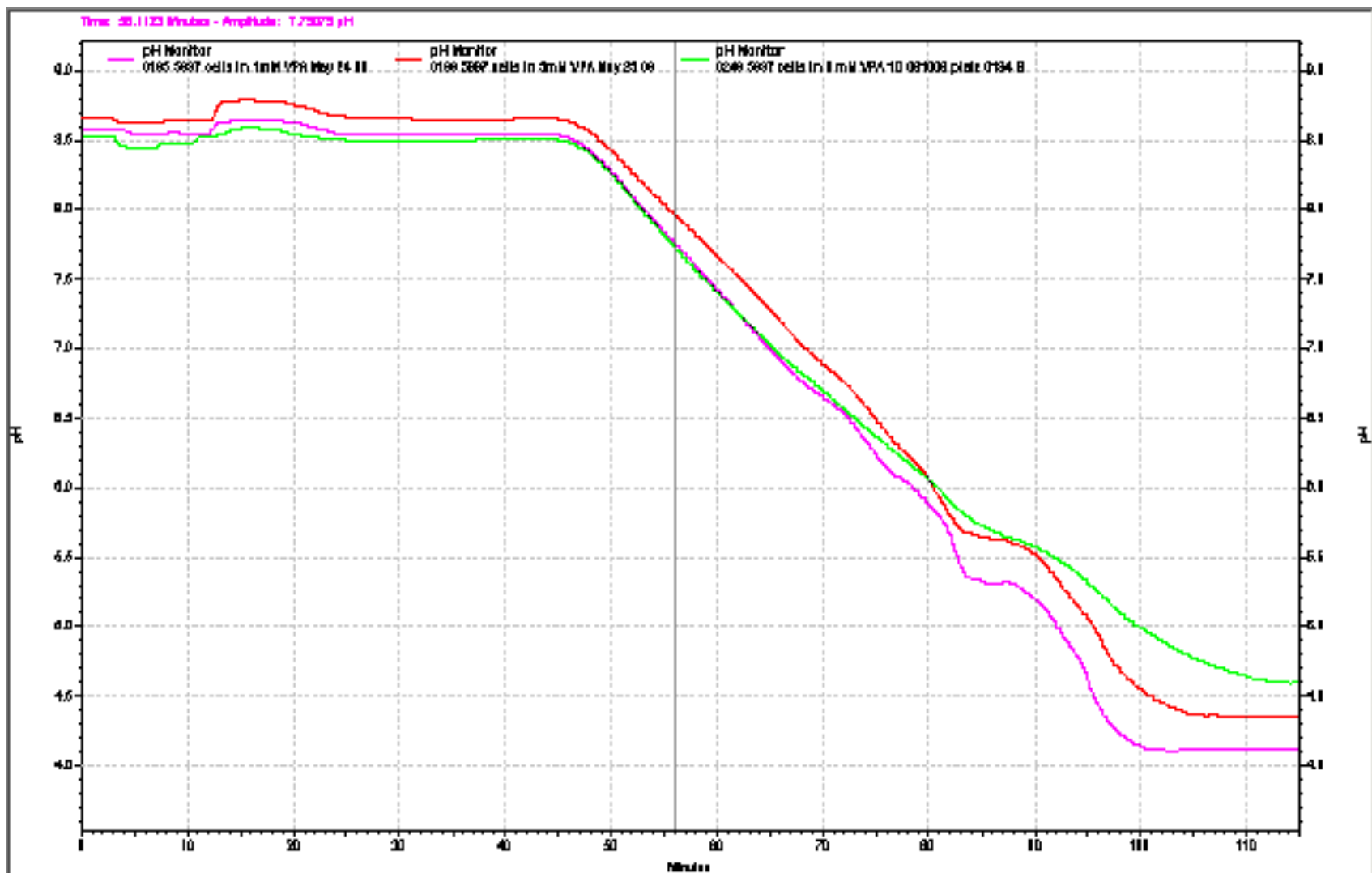
C



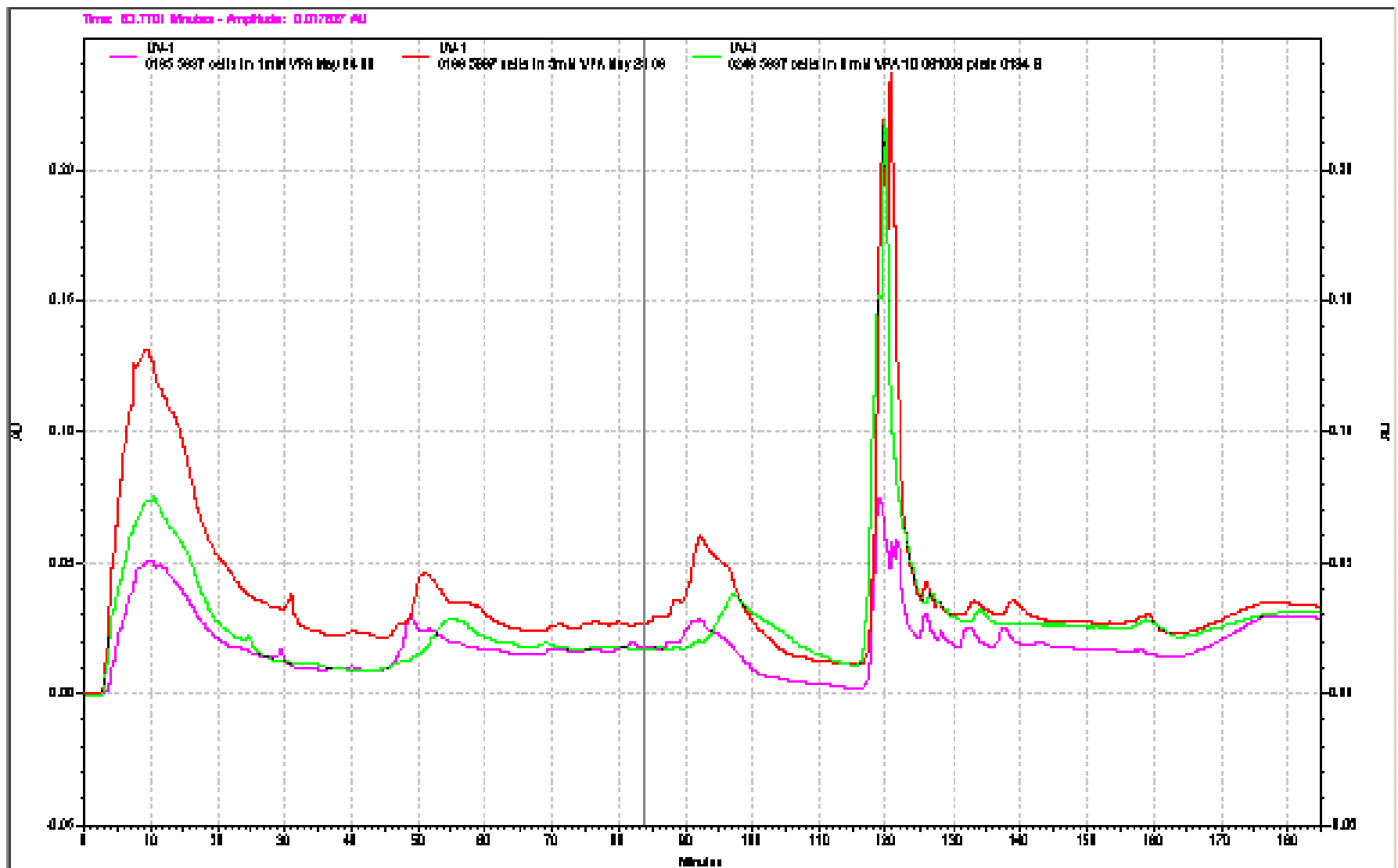
Příloha č.4) Morfologie buněčné linie uroteliálního karcinomu 5637;
A. Kontrolní buňky, B. Buňky po 6 hod. inkubaci s 1mM kyselinou valproovou, C. Buňky po 6 hod. inkubaci s 1mM kys. valproovou



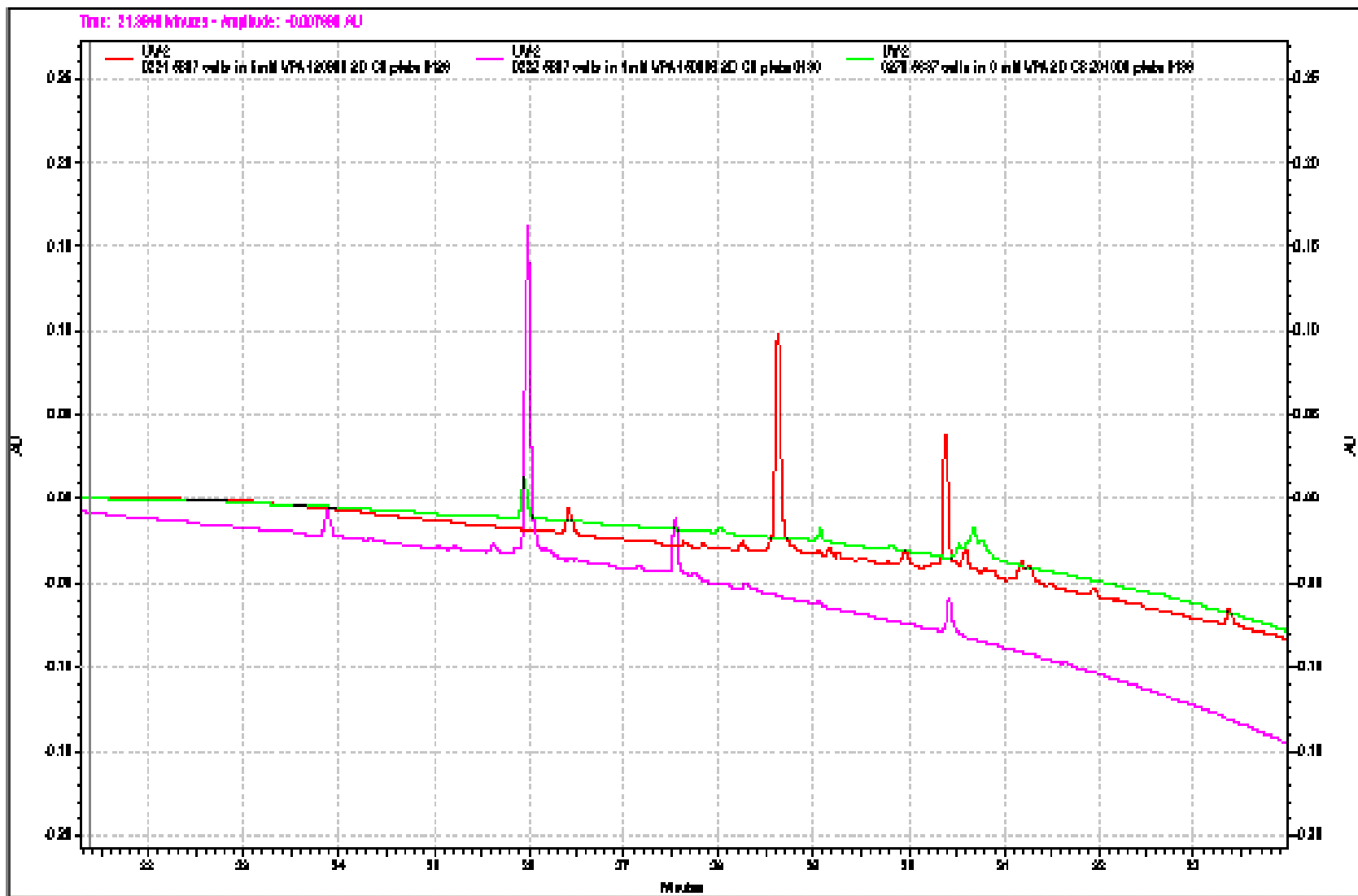
Příloha č.5) Vliv kyseliny valproové (1mM a 5mM) na růstovou dynamiku 5637 buněk (Bradford assay)



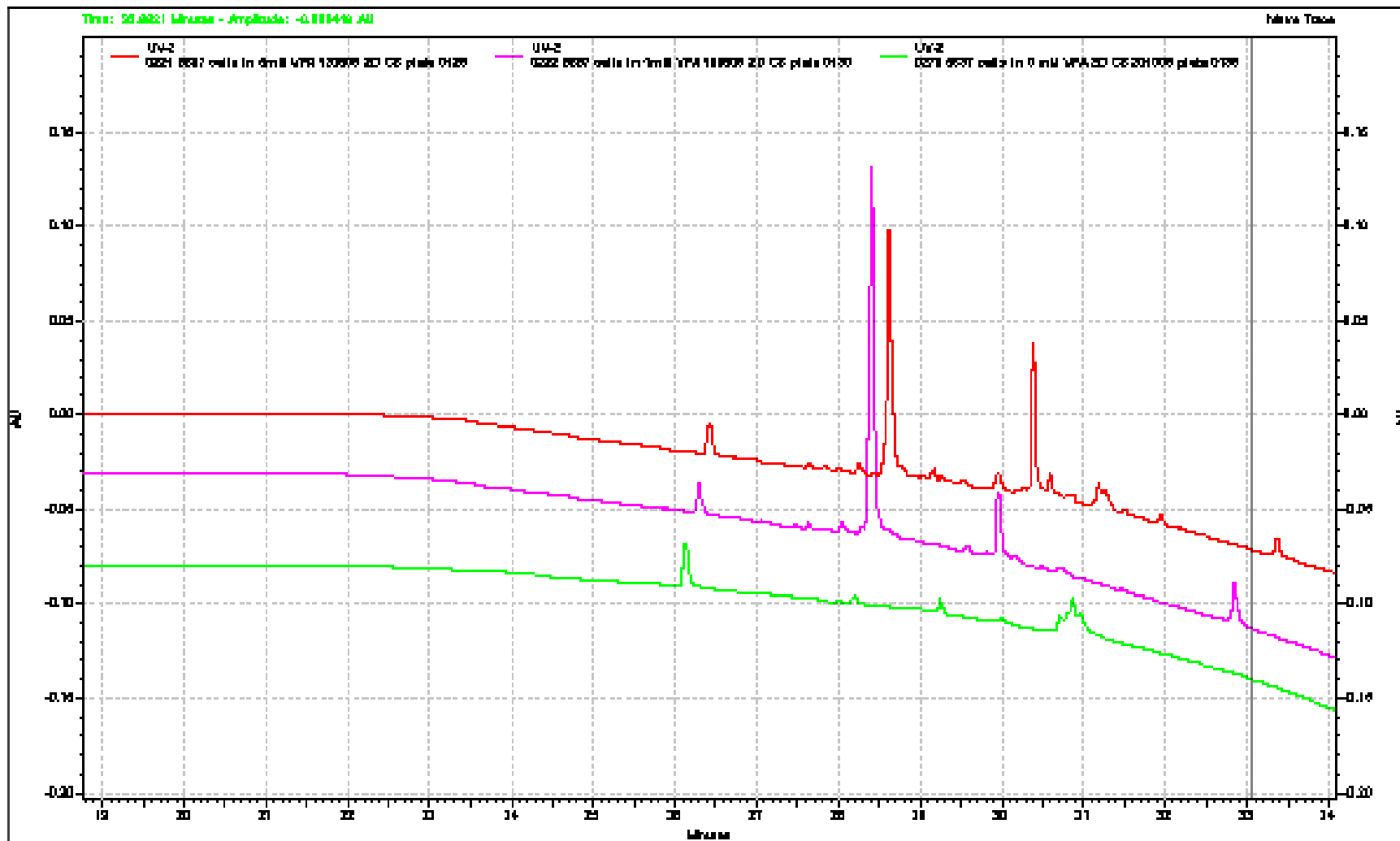
Příloha č. 6A) pH profil první dimenze; kontrolní buňky (zeleně), buňky po inkubaci s 1mM valproovou kyselinou (růžově), buňky po inkubaci s 5mM valproovou kyselinou (červeně)



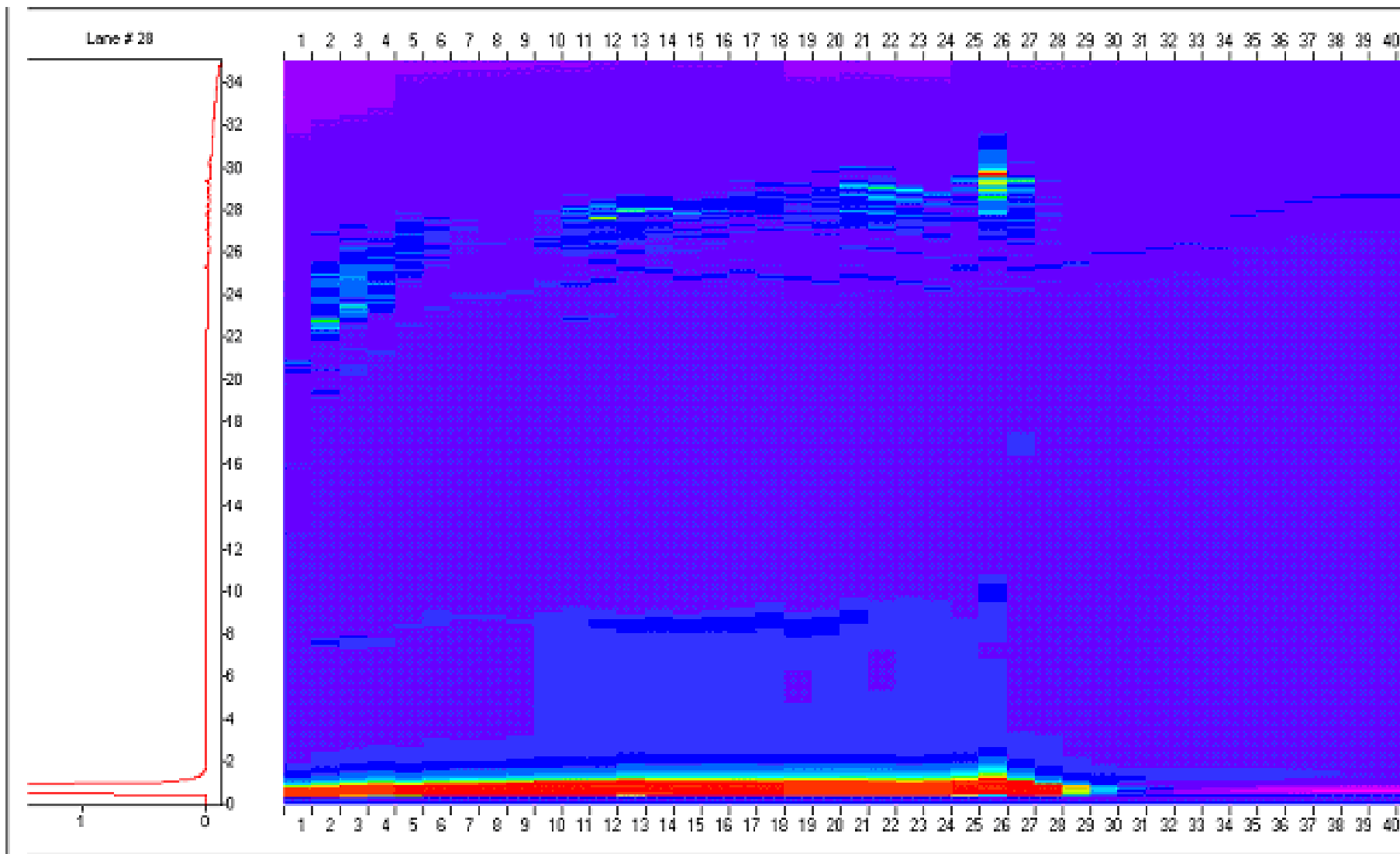
Příloha č. 6B) Chromatografický profil první dimenze v UV-1 části spektra (měřeno při 280nm); kontrolní buňky (zeleně), buňky po inkubaci s 1mM valproovou kyselinou (růžově), buňky po inkubaci s 5mM valproovou kyselinou (červeně)



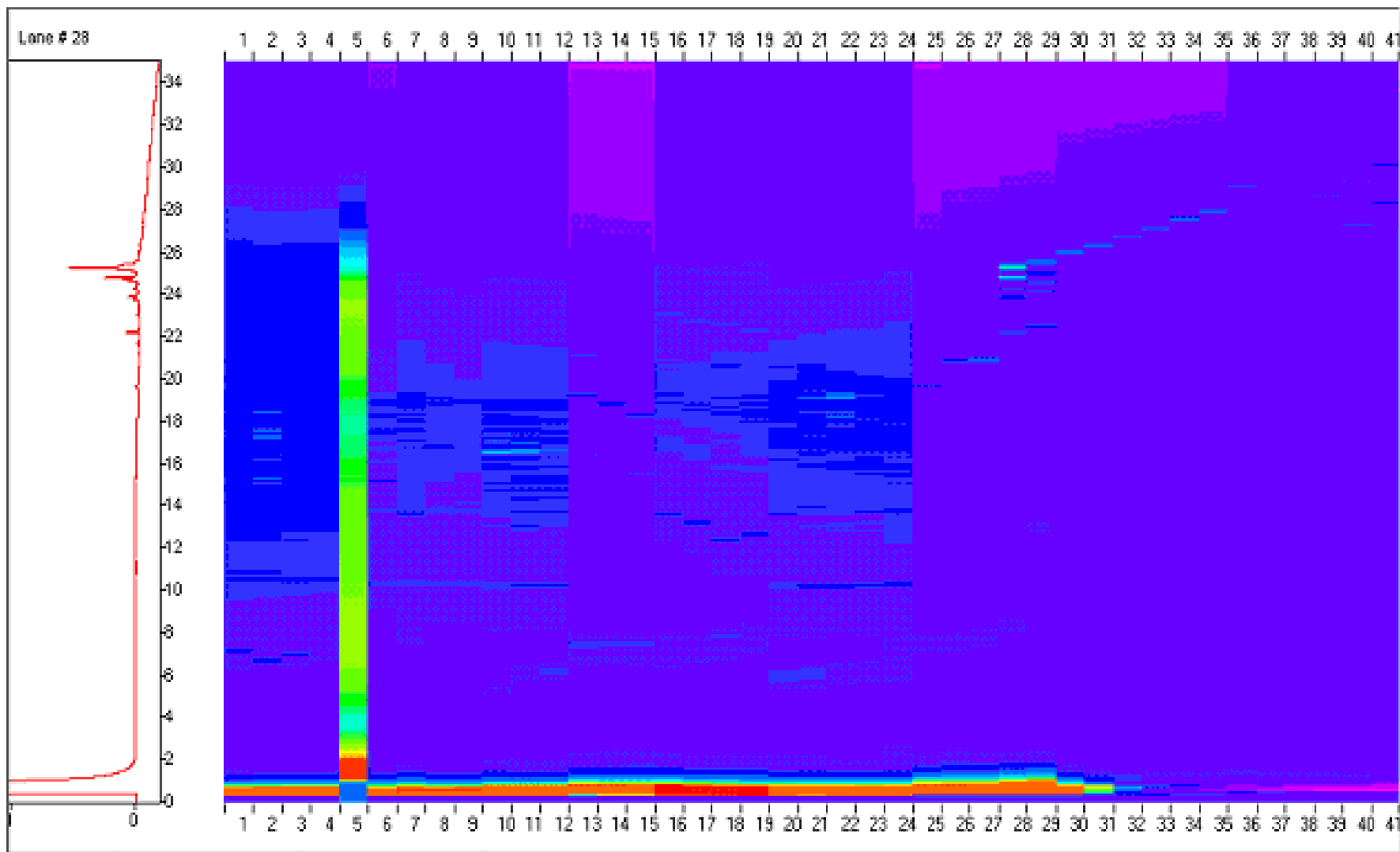
Příloha č.7A) Komparativní chromatografie druhé dimenze frakce C6 kontrolních buněk (zeleně), buněk ovlivněných 1mM kyselinou valproovou (růžově) a buněk ovlivněných 5mM kyselinou valproovou (červeně)



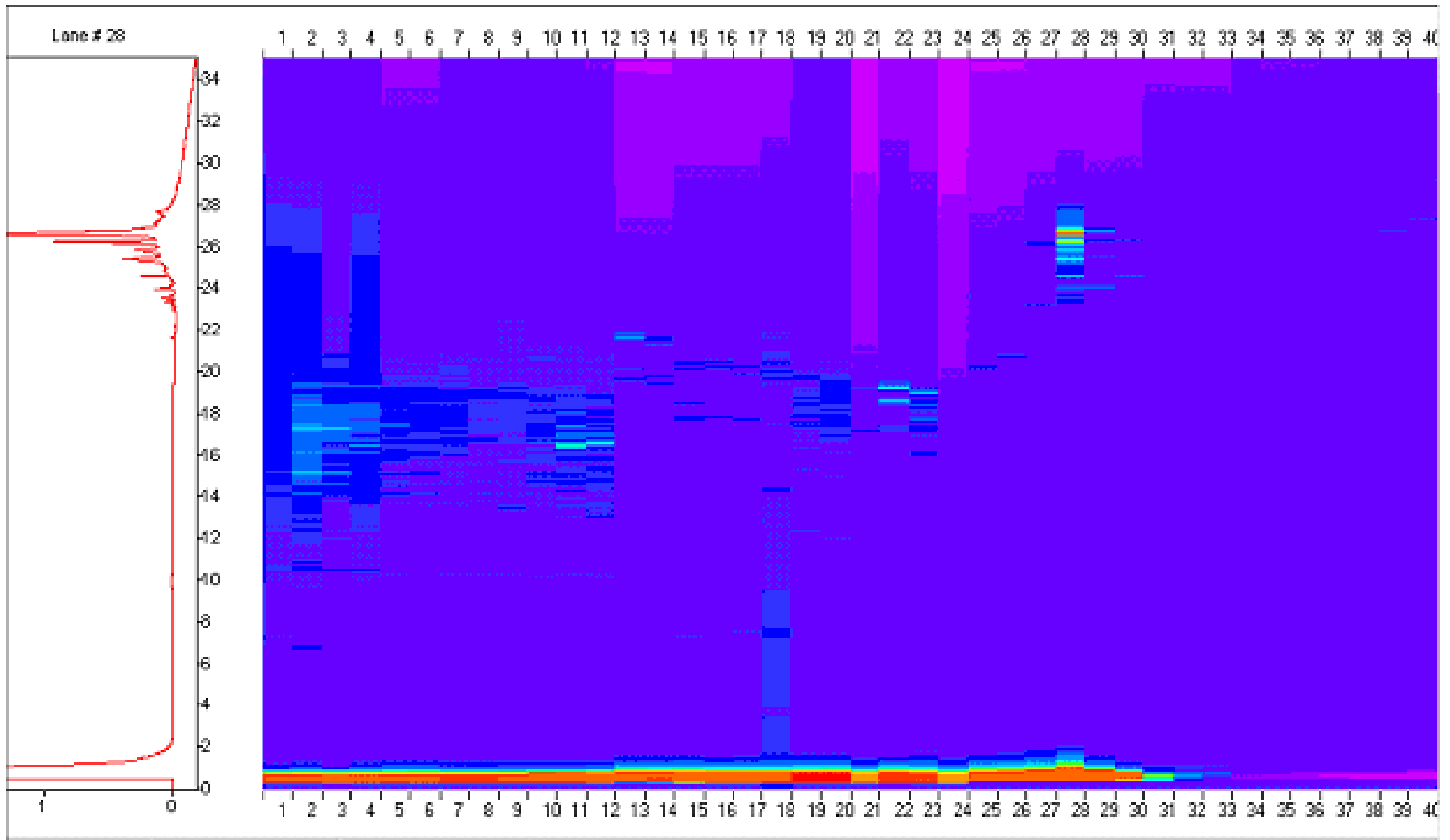
Příloha č.7B) Komparativní chromatografie druhé dimenze frakce C6 kontrolních buněk (zeleně), buněk ovlivněných 1mM kyselinou valproovou (růžově) a buněk ovlivněných 5mM kyselinou valproovou (červeně) s manuální korekcí



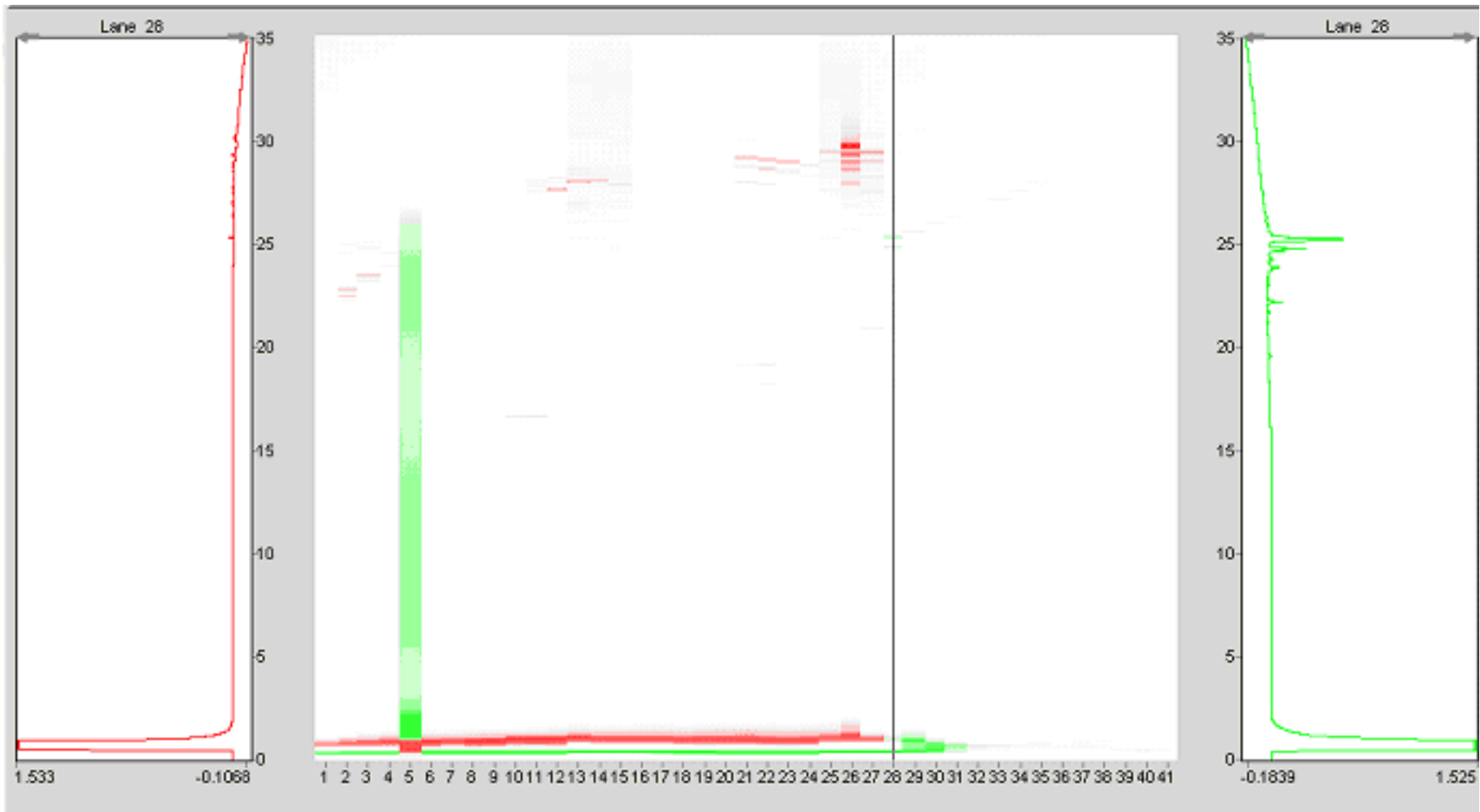
Příloha č.8A) Celý proteom kontrolních 5637 buněk zpracován programem ProteoVue



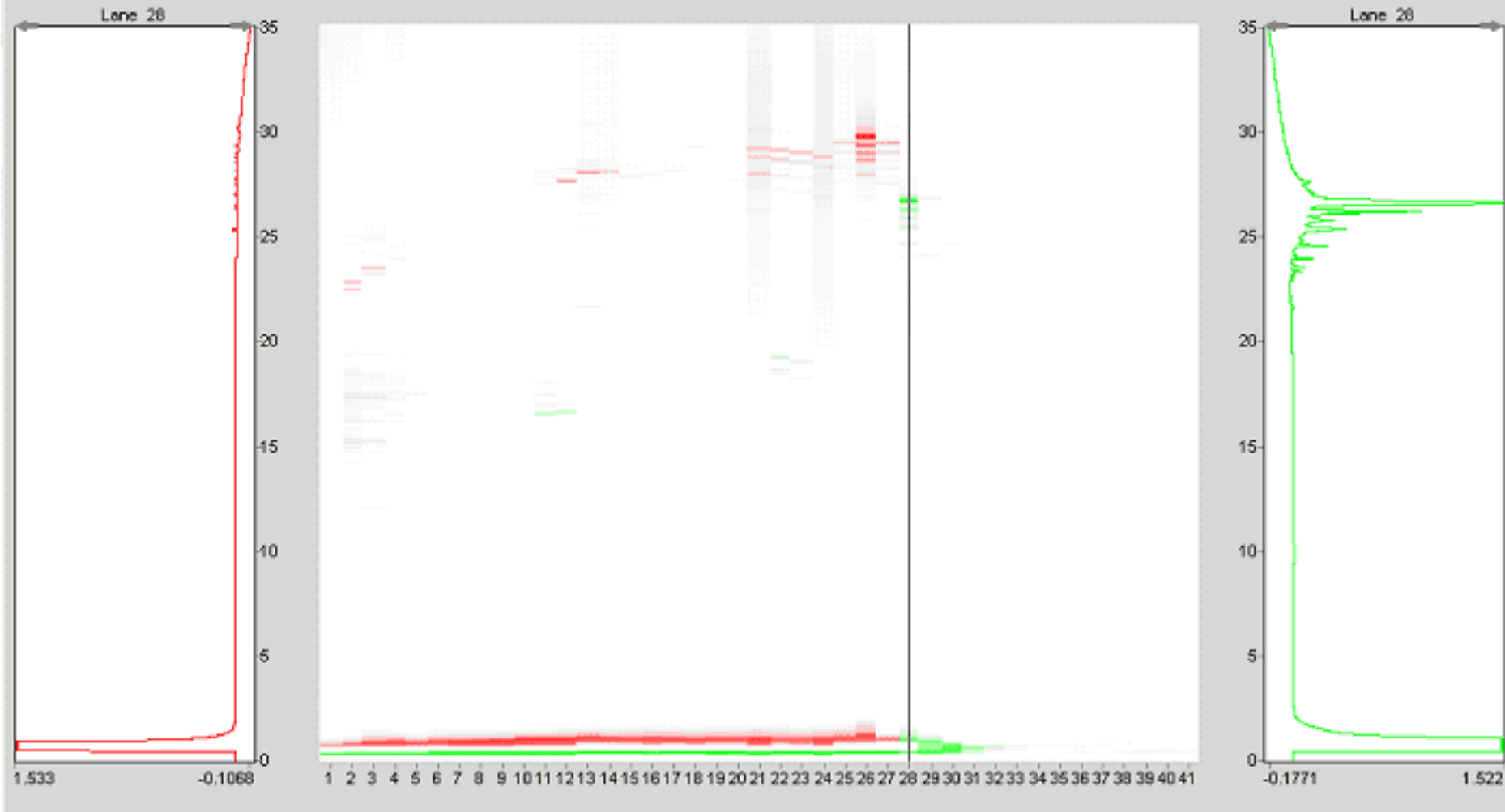
Příloha č.8B) Celý proteom 5637 buněk po ovlivnění 1mM kyselinou valproovou zpracován programem ProteoVue



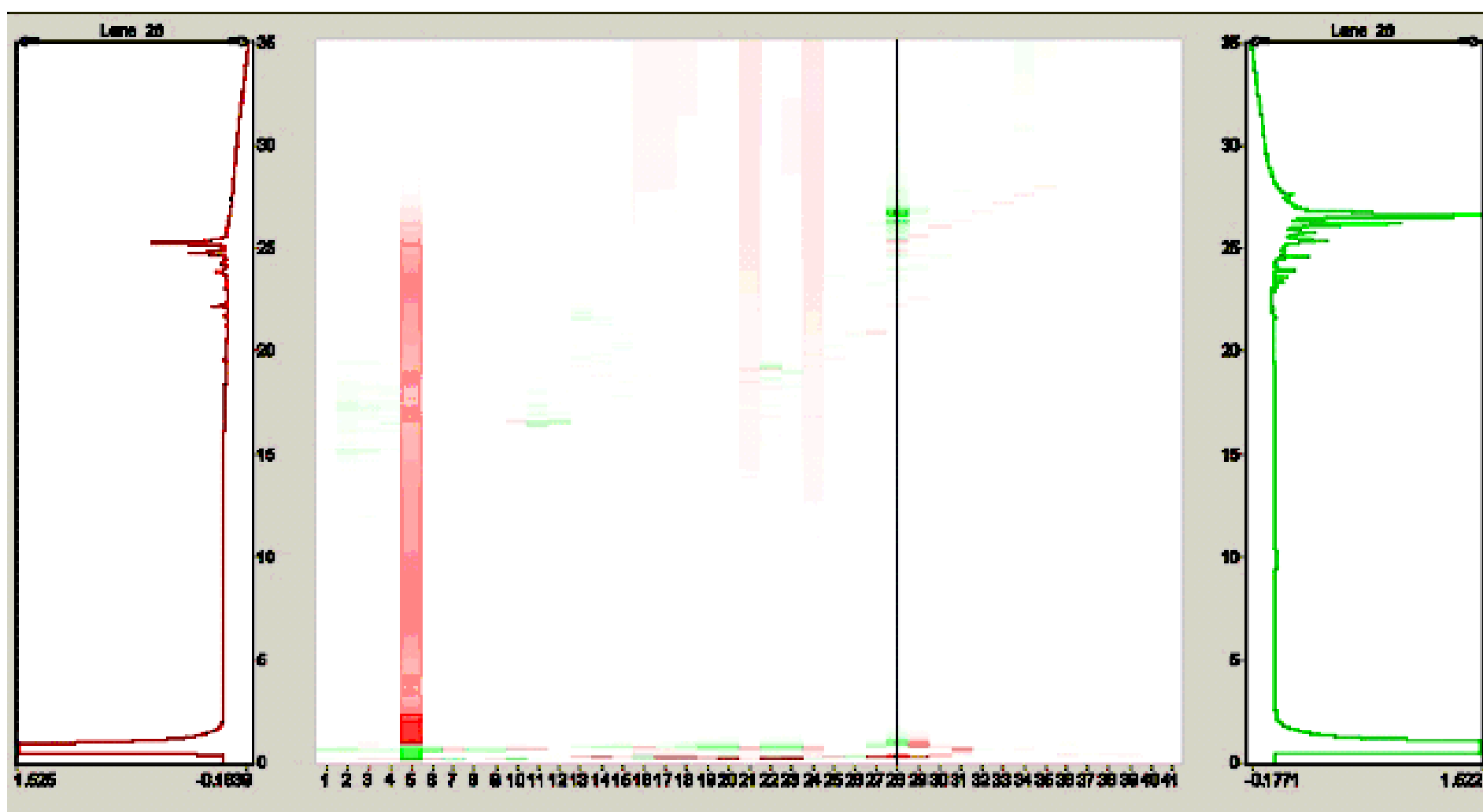
Příloha č.8C) Celý proteom 5637 buněk po ovlivnění 5mM kyselinou valproovou zpracován programem ProteoVue



Příloha č.9A) Diferenciální zobrazení celých proteomů kontrolních 5637 buněk a 5637 buněk po inkubaci s 1mM kyselinou valproovou pomocí programu DeltaVue; levý panel zobrazuje druhou dimenzi sloupce 28 kontrolních buněk; pravý panel zobrazuje druhou dimenzi sloupce 28 buněk ovlivněných 1mM kyselinou valproovou



Příloha č.9B) Diferenciální zobrazení celých proteomů kontrolních 5637 buněk a 5637 buněk po inkubaci s 5mM kyselinou valproovou pomocí programu DeltaVue; levý panel zobrazuje druhou dimenzi sloupce 28 kontrolních buněk; pravý panel zobrazuje druhou dimenzi sloupce 28 buněk ovlivněných 5mM kyselinou valproovou



Příloha č.9C) Diferenciální zobrazení celých proteomů 5637 buněk po inkubaci s 1mM a 5mM kyselinou valproovou pomocí programu DeltaVue; levý panel zobrazuje druhou dimenzi sloupce 28 buněk ovlivněných 1mM kyselinou valproovou; pravý panel zobrazuje druhou dimenzi sloupce 28 buněk ovlivněných 5mM kyselinou valproovou