

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



Ing. Lucie Lorková

Proteomické přístupy ke studiu nádorových onemocnění

Proteomic approaches in cancer biology

Dizertační práce

Vedoucí dizertační práce:

Doc. RNDr. Jiří Petrák, PhD.

Laboratoř klinické proteomiky

Ústav patologické fyziologie, 1. lékařská fakulta,

Univerzita Karlova, Praha

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 4.srpna 2014

Lucie Lorková

Seznam použitých zkratk

2-DE	dvojměrná elektroforéza <i>two-dimensional gel electrophoresis</i>
2-D DIGE	dvojměrná diferenční gelová elektroforéza <i>two-dimensional difference gel electrophoresis</i>
APRT	adenin fosforibosyl transferáza <i>adenine phosphoribosyltransferase</i>
ara-C	cytosin arabinosid <i>cytosine arabinoside</i>
ara-CMP	cytarabinmonofosfát <i>cytarabine monophosphate</i>
ara-CTP	cytarabintrifosfát <i>cytarabine triphosphate</i>
ara-U	uridin arabinosid <i>uridine arabinoside</i>
ara-UMP	uridinmonofosfát arabinosid <i>uridine arabinoside monophosphate</i>
ATP	adenosin trifosfát <i>adenosine triphosphate</i>
AUC	plocha píku <i>area under curve</i>
BMI	index tělesné hmotnosti <i>body mass index</i>
CA125	nádorový antigen 125 <i>cancer antigen 125</i>
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CDA	cytidin deamináza <i>cytidine deaminase</i>
CDK	cyklin-dependentní kináza <i>cyclin-dependent kinase</i>
CID	kolizí indukovaná disociace <i>collision induced dissociation</i>

DCK	deoxycytidin kináza <i>deoxycytidine kinase</i>
DCTD	deoxycytidin deamináza <i>deoxycytidylate deaminase</i>
dGTP	deoxyguanosin trifosfát <i>deoxyguanosine triphosphate</i>
DISC	signální komplex indukující buněčnou smrt <i>death inducing signaling complex</i>
DTT	<i>dithiothreitol</i>
ECD	disociace záchytem elektronu <i>electron capture dissociation</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENT	<i>equilibrative nucleoside transporter</i>
ESI	ionizace elektrosprejem <i>electrospray ionization</i>
ETD	disociace přenosem elektronu <i>electron transfer dissociation</i>
FIGO	<i>International federation of gynecology and obstetrics</i>
FT	Fourierova transformace <i>Fourier transform</i>
GMP	guanosin monofosfát <i>guanosine monophosphate</i>
HCCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová <i>α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid</i>
HDAC	vysokodávkovaný cytarabin <i>high-dose cytarabine</i>
HE4	lidský epididymální protein 4 <i>human epididymis protein 4</i>
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie <i>high-performance liquid chromatography</i>
HPRT	hypoxantin-guanin fosforibosyl <i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
HUGO	<i>Human genome project</i>
HUPO	<i>Human proteome project</i>

CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonát <i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
CHOP	cyklofosfamid, vinkristin, doxorubicin a prednison <i>cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, prednisone</i>
ICR	iontová cyklotronová rezonance <i>ion cyclotron resonance</i>
IEF	izoelektrická fokusace <i>isoelectric focusing</i>
IMAC	afinity chromatografie na imobilizovaných kovových iontech <i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IMP	inosin-5'-monofosfát <i>inosine-5'-monophosphate</i>
IMPDH2	inosin-5'-monofosfát dehydrogenáza 2 <i>inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2</i>
IPG	imobilizovaný pH gradient <i>immobilized pH gradient</i>
iTRAQ	izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci <i>isobaric tag for relative and absolute quantitation</i>
KEGG	<i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
LC	kapalinová chromatografie <i>liquid chromatography</i>
MALDI	ionizace molekul analytu laserem v přítomnosti matrice <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MARS	<i>Multiple affinity removal system</i>
MCL	lymfom z buněk plášťové zóny <i>mantle cell lymphoma</i>
MS	hmotnostní spektrometrie <i>mass spectrometry</i>
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie <i>tandem mass spectrometry</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MudPIT	vícerozměrná technologie identifikace proteinů <i>multidimensional protein identification technology</i>

NT5C2	5'-nukleotidáza <i>5'-nucleotidase</i>
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PCR	polymerázová řetězcová reakce <i>polymerase chain reaction</i>
PMF	peptidový fingerprinting <i>peptide mass fingerprinting</i>
PNP	purin nukleosid fosforyláza <i>purine nucleoside phosphorylase</i>
ppm	<i>parts per milion</i>
PRPP	fosforibosyl pyrofosfát <i>phosphoribosyl pyrophosphate</i>
PSD	fragmentace za iontovým zdrojem <i>post source decay</i>
RP	reverzní fáze <i>reversed phase</i>
SDS	dodecylsulfát sodný <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SILAC	aminokyseliny značené stabilními izotopy v buněčné kultuře <i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
TNF	faktor nádorové nekrózy <i>tumor necrosis factor</i>
TOF	doba letu iontů <i>time of flight</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1	Proteom a proteomika.....	2
2.2	Od genu k proteinu	2
2.3	Elektroforéza	3
2.3.1	2-DE.....	4
2.4	Kapalinová chromatografie	7
2.5	Hmotnostní spektrometrie	9
2.5.1	Hmotnostní spektrometrie v proteomice - identifikace proteinů	11
2.6	Proteomické přístupy	14
2.7	Kvantifikace proteinů a peptidů	15
2.7.1	SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture).....	15
2.7.2	Značení ¹⁸ O	18
2.7.3	iTRAQ (Izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci)	18
2.7.4	„Label-free“ značení	19
2.7.5	Shrnutí.....	19
3	PROTEOMIKA JAKO NÁSTROJ K ANALÝZE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	21
3.1	Identifikace potenciálních diagnostických markerů karcinomu ovaria.....	23
3.1.1	Karcinom ovaria	23
3.1.2	Diagnostické biomarkery	23
3.1.3	Krevní sérum, plazma a jejich proteomická analýza	25
3.1.4	Porovnávací proteomická analýza sér zdravých žen a sér žen s karcinomem ovariva	27
3.1.5	Diskuze	32

3.2	Objasnění molekulárního mechanismu rezistence lymfomu z buněk pláštěvé zóny na cytarabin	36
3.2.1	Lymfom z buněk pláštěvé zóny	36
3.2.2	Cytarabin a rezistence	37
3.2.3	Odvození buněk MCL rezistentních na cytarabin	39
3.2.4	Analýza buněk MCL rezistentních na cytarabin.....	40
3.2.5	Stanovení <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> senzitivity cytarabin-rezistentních subklonů k jiným terapeutickým molekulám	44
3.2.6	Diskuze	47
3.3	Hledání nových zásahových míst - identifikace molekulárních změn v buňkách lymfomu z buněk pláštěvé zóny (MCL) rezistentních na molekulu TRAIL	49
3.3.1	TRAIL.....	49
3.3.2	Odvození buněk MCL rezistentních na TRAIL	51
3.3.3	Analýza TRAIL receptorů průtokovou cytometrií	51
3.3.4	Proteomická analýza MCL buněk rezistentních na TRAIL.....	52
3.3.5	Diskuze	55
4	SHRNUTÍ A DISKUZE	59
4.1	Možnosti a omezení proteomických metod.....	59
4.2	Přínosy a limity představených prací.....	61
4.2.1	Identifikace RBP4 jako biomarkeru karcinomu ovaria	61
4.2.2	Odhalení snížené exprese DCK jako mechanismus rezistence na cytarabin.....	63
4.2.3	Hledání zásahových míst v buňkách MCL rezistentních na TRAIL	63
4.3	Závěr.....	65
5	LITERARURA	66
6	PŘÍLOHY	Ошибка! Закладка не определена.

1 Úvod

K pochopení podstaty fyziologických a patologických mechanismů přispívá kvantitativní a kvalitativní popis proteomu, tedy všech proteinů v organismu, tkáni, buňce či tělních tekutinách. Charakterizací proteomu/ů se zabývá mladý obor či spíše soubor metod, technik a konceptů, nazývaný proteomika.

Tato dizertační práce dokumentuje úspěšnou aplikaci různých proteomických postupů a metod v experimentální onkologii. Řešili jsme tři projekty zaměřené na diagnózu a terapii onkologických onemocnění. První práce se zabývá identifikací potenciálních diagnostických biomarkerů karcinomu ovaria, zatímco další dvě se soustřeďují na odhalení molekulárních mechanismů rezistence lymfomových buněk na terapii, na její optimalizaci a na hledání nových zásahových míst (druggable targets).

2 Literární přehled

2.1 Proteom a proteomika

Termín **proteom** poprvé použil v roce 1994 M. R. Wilkins pro označení proteinového komplementu kódovaného genomem (Wilkins, 1996). Pojem proteom popisuje soubor všech proteinů, které se nacházejí v organismu, tkáni nebo buňce v určitém okamžiku. Proteom zahrnuje všechny formy proteinů včetně molekul získaných alternativním sestřihem, dále veškeré jejich post-translační modifikace, jejich metabolický obrat, lokalizaci a vzájemné proteinové interakce. V porovnání s genomem je proteom dynamický a změny hladin jednotlivých proteinů jsou odrazem působení mnoha vnějších a vnitřních faktorů.

Proteomika se zabývá kvantitativním a kvalitativním popisem stavů proteomu za různých podmínek a jejich porovnáním. Využitím různých technik a přístupů usiluje o identifikaci všech přítomných proteinů, jejich post-translačních modifikací, o určení množství proteinů a stanovení jejich lokalizace a rovněž o popis vzájemných interakcí proteinů. **Expresní proteomika** pak usiluje o kvantitativní popis proteomů a jejich změn za různých fyziologických či patologických stavů. V této práci je expresní proteomika využívána k identifikaci proteinů, jejichž exprese nebo koncentrace se mění v souvislosti s přítomností nádorového onemocnění nebo je spojena s odpovědí na protinádorovou léčbu za vzniku rezistence na terapii. Proteomická analýza nám tak umožňuje identifikovat molekulární mechanismy, které se na výše uvedených procesech podílejí a rovněž nám poskytuje příležitost k hledání potenciálních nádorových markerů.

2.2 Od genu k proteinu

Díky Human Genome Project (HUGO, 1989) se podařilo určit sekvenci lidského genomu, který obsahuje přibližně 20 000 genů (Pennisi, 2012). K identifikaci a charakterizaci proteinů kódovaných lidským genomem byl navržen projekt Human Proteome Project (HUPO, 2001) (Omenn et al., 2005). Jeho cílem je popsat všechny proteiny nacházející se v různých typech lidských buněk a tkáních nebo biologických tekutinách. Proteom je však svojí povahou dynamický, to znamená, že v určitém čase a místě se nachází různé zastoupení proteinů. Dynamiku lidského proteomu zajišťuje přibližně 100 000 různých proteinových molekul (Gstaiger a Aebersold, 2009), počet lidských proteinů tedy zásadně převyšuje počet genů. To je dáno tím, že jedním genem jsou kódovány různé varianty proteinu, které se liší

strukturou a funkcí. Tyto „varianty“ vznikají vlivem alternativního sestřihu, RNA editace a post-translačních modifikací. Pro tyto varianty proteinů kódované jedním genem byl nedávno navržen termín „proteofomy“ (Kelleher, 2012). Z existence mnoha hladin regulace genové (a proteinové) exprese vyplývá, že nelze spolehlivě odvodit množství proteinu (a případnou změnu produkce) z exprese (a změny exprese) mRNA. To bylo potvrzeno i experimentálně - korelace mezi hladinami mRNA a jejich změnami, a tím, jak se projeví na skutečné expresi proteinů, je nízká (Schwanhäusser et al., 2011). Proteomika je tak nezbytným nástrojem, který technicky snazší analýza exprese mRNA nemůže nahradit.

Kromě velmi vysokého počtu jednotlivých proteinů či proteoforem je studium proteomu komplikováno i rozsahem koncentrací jednotlivých proteinů či proteoforem. Počet kopií jednotlivých proteinů v lidské buňce se pohybuje v rozmezí od 1 molekuly až po 10^7 kopií na buňku (Beck et al., 2011). Vysoký počet proteinů i vysoký rozsah jejich koncentrací v buňce přesahuje možnosti většiny dostupných analytických metod. Proto jsou komplexní proteomické analýzy založeny na účinných separačních metodách a jejich vícerozměrných kombinacích. **Základními technickými pilíři proteomiky jsou tedy separační elektroforetické a chromatografické techniky a hmotnostní spektrometrie sloužící k identifikaci proteinů a peptidů. Těmto základním nástrojům bych ráda věnovala následující stránky.**

2.3 Elektroforéza

Princip elektroforézy je založen na pohybu nabitých částic v elektrickém poli, který byl objeven již počátkem 19. století. Tehdy Ferdinand F. Reuss popsal elektroosmotický tok vody, který nastal v U-trubicí s jílem v jejím ohbí po zapojení do stejnosměrného elektrického proudu (Reuss, 1809). Elektrokinetických jevů, jako jsou elektroforéza a elektroosmotický tok, později využil švédský elektrotechnik Arne Tiselius k vývoji techniky dělicí proteiny krevního séra na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli (Tiselius, 1930). Arne Tiselius je považován za zakladatele elektroforézy a za jeho přínos mu byla v roce 1948 udělena Nobelova cena. Volný roztok jako nosič nabitých částic v elektroforéze byl postupně nahrazen podpurnými médii - papírem, škrobem a agarózou (von Klobusitzky a König, 1939, Hjerten, 1961, Smithies, 1955). Další pokrok v účinnosti elektroforézy nastal v 60. letech, kdy byla představena elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (Raymond et al., 1962) a v souvislosti s elektroforézou byly objeveny možnosti využití detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS). Hlavním přínosem detergentu SDS je jeho

schopnost proteiny denaturovat a zároveň zajistit separaci proteinů pouze podle jejich molekulové hmotnosti. To je možné propůjčením záporného náboje vazbou SDS na proteiny a také jednotkovým množstvím SDS, které se naváže na molekulu proteinu (1,4 g SDS na 1 g proteinu) (Shapiro et al., 1967, Laemmli, 1970). Vznikla tak účinná elektroforetická metoda rozdělující proteiny podle jejich molekulové hmotnosti, známá jako SDS-PAGE (SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza).

Jinou elektromigrační technikou vhodnou k separaci proteinů i peptidů je izoelektrická fokusace (IEF). Princip IEF je založen na pohyblivosti proteinů a peptidů v prostředí gradientu pH a elektrického pole. Proteiny a peptidy migrují v elektrickém poli do oblasti pH odpovídající jejich izoelektrickému bodu. V tomto bodě je celkový náboj proteinu nulový a dochází k zastavení migrace proteinů. Metoda byla vyvinuta v šedesátých letech minulého století (Svensson, 1961, Vesterberg, 1969) a následně byla zdokonalena o pH gradienty ukotvené v polyakrylamidovém gelovém proužku (Imobilizovaný pH gradient, IPG) (Bjellqvist et al., 1982), což vedlo k zásadnímu zvýšení reprodukovatelnosti a rozlišení této metody.

Zvýšit rozlišení separovaných proteinů kombinací obou technik do dvojrozměrné separace se podařilo Patrickovi O'Farellovi za vzniku dvojrozměrné elektroforézy (2-DE) (Obrázek 1). Precizním spojením separace proteinů nejprve podle jejich pI a následně podle jejich molekulové hmotnosti (MW) se mu podařilo rozdělit 1100 proteinových skvrn lyzátu *E. coli* (O'Farell, 1975). 2-D elektroforéza tak umožnila a stále umožňuje analyzovat komplexní směsi bílkovin i přes nástup nových technik a v proteomice má dosud své pevné místo.

2.3.1 2-DE

Separace proteinů 2-DE technikou (Obrázek 1) probíhá za denaturujících podmínek při zajištění vysoké rozpustnosti proteinů. Dostatečná rozpustnost proteinů je podmínkou pro jejich vstup do IPG gelu (Görg et al., 2004). Za účelem zvýšení rozpustnosti a dosažení denaturace jsou proteiny vystaveny vlivům chaotropních látek (močovina, thiomočovina), zwitteriontového detergentu (CHAPS) a redukčního činidla (DTT) (Laemmli, 1970). Denaturované proteiny jsou nanášeny na dehydratovaný IPG gel. Po vstupu proteinů do IPG gelu a jeho vložení do elektrického pole dochází k migraci proteinů v pH gradientu podle jejich izoelektrických bodů. V oblastech pH odpovídajících jejich pI (proteiny mají nulový náboj) se proteiny zastavují. Pro druhý rozměr dělení a zároveň pro snadný přestup

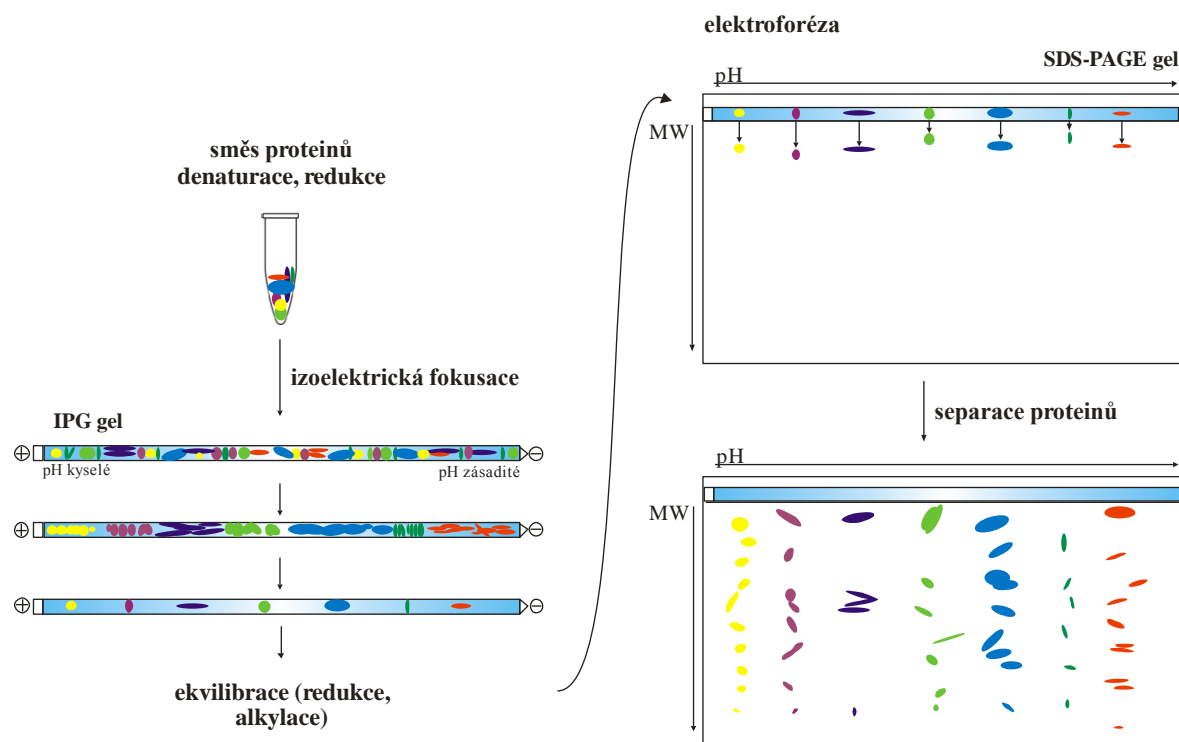
zaostřených proteinů z IPG gelu do SDS-PAGE gelu je potřeba vytvořit vhodné podmínky. Ekvilibrace IPG gelu se zaostřenými proteiny slouží především k zajištění úplné redukce reoxidovaných -SH skupin cysteinů pomocí DTT a následné alkylation cysteinů iodacemidem nebo jiným alkylačním činidlem. Kromě toho je potřeba zaručit obalení proteinů detergentem SDS, aby jejich separace v druhém rozměru proběhla dle jejich molekulové hmotnosti. Samotný přestup proteinů mezi jednotlivými rozměry 2-DE usnadňuje přítomnost glycerolu, který snižuje elektroosmotický tok (Görg et al., 1988). Po ekvilibraci a ukotvení IPG gelu na horním okraji SDS-PAGE gelu dochází v elektrickém poli k přesunu zaostřených proteinů z IPG gelu do SDS-PAGE gelu. Poté jsou proteiny separovány podle jejich molekulové hmotnosti.

Výsledkem 2-DE je dvojrozměrná proteinová mapa, kterou je možné vizualizovat několika způsoby. Jedním z běžných způsobů barvení proteinů je vazba modrého barviva, koloidní Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250, zejména na pozitivně nabitě aminokyseliny. Během barvení proteinových skvrn zároveň dochází k fixaci proteinů do gelu. Detekční limit koloidní CBB G-250 je přibližně 1 pikomol proteinu ve skvrně (Kinter a Sherman, 2000). Citlivější barvicí technikou je barvení proteinů redukcí dusičnanu stříbrného na kovové stříbro (Switzer et al., 1975). Pomocí této techniky je možné vizualizovat stovky až desítky femtomolů proteinu ve skvrně (Mortz et al., 2001). Jiný způsob vizualizace proteinových skvrn představuje použití fluorescenčních barviv. Jsou to například často využívaná Sypro Ruby a RuBPS, které vykazují podobnou citlivost, jako je tomu při barvení proteinů kovovým stříbrem (Rabilloud et al., 2001), ale i jiné komerční varianty jako například Flamingo, Lava Purple a Krypton. Do popředí se dostávají cyaninová fluorescenční barviva (Cy2, Cy3, Cy5) s reaktivní skupinou sloužící ke kovalentnímu navázání na proteiny, jež se využívají ve speciální variantě 2-DE separace, tzv. DIGE (Unlü et al., 1997). Ke značení jednotlivých proteinových směsí dochází v tomto případě ještě před elektroforetickou separací. Vzorky k porovnání jsou poté smíchány a rozděleny na jednom SDS-PAGE gelu. Odlišná excitační i emisní maxima jednotlivých značek (Cy2, Cy3, Cy5) umožňují získat z jednoho gelu 3 proteinové „mapy“.

Při srovnání detekčních limitů barvicích technik využívajících koloidní CBB G-250 a kovové stříbro, je zřejmé, že barvení kovovým stříbrem je metodou citlivější. Barvicí technika využívající kovové stříbro však trpí nízkou reprodukovatelností, omezenou linearitou a náročnou proveditelností. V praxi, tam, kde je to možné, je upřednostňována technika barvení koloidní Coomassie Blue G-250, jež má sice nižší citlivost, ale její použití

je vhodnější pro následnou identifikaci proteinů hmotnostní spektrometrií. To je dáno jednoduchým odstraněním modrého barviva z proteinových skvrn a dále tím, že vizualizovaná proteinová skvrna koloidní Coomassie Blue G-250 obsahuje takové množství proteinu, které je dostačující pro jeho identifikaci hmotnostní spektrometrií (Lauber et al., 2001).

Každá obarvená skvrna na 2-DE gelu teoreticky reprezentuje jeden konkrétní protein/proteoformu určený/-ou jeho/jejím izoelektrickým bodem a molekulovou hmotností. Optická denzita skvrny nese informaci o relativním množství proteinu nebo proteoformy. 2-DE technika je schopna rozdělit přibližně 2000 proteinových skvrn (Görg et al., 2004). Výsledné proteinové mapy proteomů lze mezi sebou porovnávat a nalézat odlišně exprimované proteiny/proteoformy. Tyto molekuly je možné přímo v gelu podrobit proteolytickému štěpení specifickou endoproteázou (nejčastěji trypsinem) za vzniku peptidů, které lze z gelu snadno extrahovat. Peptidy jsou následně analyzovány hmotnostní spektrometrií za účelem identifikace proteinů.



Obrázek 1: Schéma dvojrozměrné elektroforézy (2-DE). Denaturovaná směs proteinů je nanesena na dehydratovaný IPG gel. Po vstupu proteinů do gelu a jeho vložení do elektrického pole dochází k separaci proteinů podle jejich pI. V oblastech pH odpovídajících pI proteinů dochází k jejich zastavení, proteiny mají nulový náboj. Po ekvalibraci IPG gelu se zaostřenými proteiny je IPG gel nanesen na horní okraj SDS-PAGE gelu. Po vložení do elektrického pole dochází k přesunu zaostřených proteinů do SDS-PAGE gelu a dále k jejich separaci podle molekulové hmotnosti. Výsledkem je proteinová mapa, kterou je možné vizualizovat například koloidní Coomassie Blue G-250.

2.4 Kapalinová chromatografie

K účinnému dělení komplexních proteinových a hlavně peptidových směsí lze v proteomice využít kapalinovou chromatografii. Separace je založena na rozdílné distribuci směsi analytů v roztoku mezi stacionární a mobilní fází.

Chromatografie byla představena v roce 1903 ruským botanikem Michaiilem S. Tswetem, který na sloupci jemně rozemletého vápence rozdělil listová barviva (Tswett, 1905). Chromatografie, začala nabývat na významu až v roce 1941, kdy byla vyvinuta rozdělovací chromatografie. K dělení směsi aminokyselin a oligopeptidů došlo na základě rozpustnosti složek ve dvou nemísitelných kapalinách, kde stacionární fází byl hydratovaný silikagel a mobilní fází chloroform (Martin a Synge, 1941). Separace biomolekul

na silikagelu však měla nízkou reprodukovatelnost. Později byl silikagel nahrazen za filtrační papír a vznikla tak papírová chromatografie (Consdén et al., 1944). Nezávisle na vzniku papírové chromatografie došlo současně k vývoji tenkovrstvé chromatografie prováděné na tenké vrstvě adsorbentu na pevné podložce (Schreiber, 1975).

V 60. letech vývoj malých sférických částic a ligandů na pevném nosiči jako stacionární fáze umožnil dále rozvíjet kapalinovou chromatografii (LC). Došlo tak k vývoji gelové, adsorpční, afinitní a iontoměničové chromatografie využívající různé dělicí principy (Moore, 1964, Porath a Flodin, 1959, Cuatrecasas et al., 1968). Snaha posunout dělení směsí k lepšímu rozlišení vedla k neustálému zmenšování sférických částic a ke zvyšování nároků na vstupní tlaky na koloně. To vedlo k vývoji vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Horvath et al., 1966). Se zavedením nových sorbentů a jejich modifikací došlo k vývoji (v té době již známé) kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-LC) (Howard a Martin, 1950). Princip RP-LC je založen na hydrofóbních vlastnostech separované směsi. Stacionární fáze jsou nepolární alkylové řetězce o různém počtu uhlíků (C_4 - C_{18}) navázané na povrchu silikagelu, kopolymeru styrenu, atd. Vzhledem k nepolárnímu charakteru stacionární fáze se RP-LC využívá k separaci biologických molekul jako jsou peptidy, proteiny a oligonukleotidy. Náplň kolony s délkou alkylového řetězce C_4 a C_8 se přednostně využívá k separaci proteinů, C_{18} k separaci peptidů (Neverova a Van Eyk, 2005). RP-LC je v současné proteomice standardní separační technikou pro peptidy. Je provozována především na kolonách s mikrolitrovými až nanolitrovými průtoky. Vyniká nejen vysokou rozlišovací schopností, ale také reprodukovatelností a především kompatibilitou s následnou hmotnostně-spektrometrickou analýzou.

Kapalinová chromatografie si kromě dělení peptidů našla své uplatnění i v separaci intaktních proteinů. Často používanou technikou je gelová filtrace (Size exclusion chromatography), v níž jsou intaktní proteiny nebo proteinové komplexy děleny na základě jejich velikosti. Jinou běžně používanou technikou je iontoměničová chromatografie (Ion exchange chromatography), na které jsou proteiny děleny podle jejich náboje. Obě tyto metody našly své uplatnění při studiu proteinů nebo jejich komplexů v jejich nativním stavu. K izolaci jednoho proteinu nebo skupiny proteinů se společným znakem ze směsi se uplatňuje afinitní chromatografie. Využívá specifických interakcí proteinů s ligandem, jenž je navázán na povrchu nosiče. V afinitní chromatografii může být typicky využita interakce avidinu s biotinylovanými proteiny nebo interakce protilátky s antigenem. Jiným příkladem je izolace fosforylovaných proteinů nebo peptidů ze směsi založená na interakci

fosfátové skupiny s pozitivně nabitými kovy (Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech, IMAC) (Porath et al., 1975).

Separace komplexních směsí proteinů a hlavně peptidů v jedno- nebo vícerozměrné chromatografii, především RP-LC, je nezbytným krokem ve značné části současných proteomických analýz.

2.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je technika, která umožňuje stanovení hmotnosti nabitých molekul. Je založená na dělení částic podle veličiny m/z , kde m je jejich hmotnost a z jejich náboj. Jednotlivé kroky analýzy v hmotnostní spektrometrii probíhají podle obecného schématu:

- ionizace a převod molekul do plynné fáze v iontovém zdroji
- rozdělení iontů podle m/z v hmotnostním analyzátoru (ve vakuu)
- detekce iontů, stanovení m/z a určení relativní intenzity jednotlivých iontů v detektoru

Měření hodnot m/z molekul hmotnostní spektrometrií je náročné na instrumentaci, jejíž vývoj byl dlouhý, plný technologických inovací a doprovázený několika Nobelovými cenami. Počátky hmotnostní spektrometrie sahají do konce 19. století, kdy byly popsány principy pohybu částic v elektrickém a magnetickém poli. Za zakladatele hmotnostní spektrometrie je považován Joseph J. Thomson, kterému se podařilo v prvním sestrojeném hmotnostním spektrometru separovat ionty izotopů ^{20}Ne a ^{22}Ne v plynné fázi (Thomson, 1897). Následující vývoj ionizačních technik a analyzátorů v hmotnostní spektrometrii umožnil nalézt nové stabilní izotopy, zjistit jejich zastoupení a určit jejich přesné atomové hmotnosti (Aston, 1919, Stephens, 1946, Paul, 1953, Johnson a Nier, 1953). Později začala být hmotnostní spektrometrie využívána k analýze složitých směsí organických látek a jiných malých molekul. Průlom v aplikovatelnosti hmotnostní spektrometrie na proteiny, peptidy a další biologické molekuly nastal v 80. letech se zavedením takzvaných „měkkých“ ionizačních technik, kterými jsou ionizace elektrosprejem (ESI) (Fenn et al., 1989) a ionizace molekul analytu laserem v přítomnosti matrice (MALDI) (Karas et al., 1985, Tanaka et al., 1988). „Měkké“ techniky umožňují ionizovat biologické molekuly tak, aniž by došlo k jejich fragmentaci. Při ionizaci elektrosprejem je vzorek rozpuštěný v těkavém rozpouštědle a přiveden na kovovou kapiláru, na kterou je vloženo vysoké napětí (3-5 kV).

Po rozptýlení analytu na výstupu z kapiláry vznikají kapičky nesoucí na svém povrchu velké množství náboje. Odpařováním rozpouštědla se zvyšuje hustota povrchového náboje a při dosažení kritické hodnoty kapičky explodují. Rozpadem vznikají menší kapičky s rozděleným původním nábojem. Opakování tohoto procesu vede až k uvolnění iontů v plynné fázi, které dále postupují do analyzátoru. Jinak je tomu u techniky MALDI, která ionizuje molekuly vzorku za přítomnosti matrice na kovovém terčíku. Matricí je slabá organická kyselina (např. α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, 2,5-dihydroxybenzoová kyselina), která je společně s analytem ozařována krátkými pulzy laseru. Energie laserového pulzu je adsorbována převážně matricí, čímž dochází k její rychlé desorpci. Odpařující se částice matrice sebou strhávají molekuly analytu a převádějí je do plynného skupenství. Zároveň dochází k přenosu protonu z matrice na molekuly analytu za vzniku iontů analytu.

Před vstupem do hmotnostního analyzátoru jsou ionty urychleny elektrickým polem a zaostřeny pomocí iontové optiky. K dělení iontů analytu v plynné fázi podle veličiny m/z dochází v hmotnostním analyzátoru. Byla vyvinuta celá řada analyzátorů, ve kterých je možné ionty dělit podle m/z na základě různých fyzikálních principů:

- zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický analyzátor)
- různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past)
- různá doba rychlosti letu iontů (TOF)
- různé frekvence harmonických oscilací (Orbitrap)
- pohyb iontů po cyklotrónové orbitě v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (ICR)

Signál může být zachycen různými detektory založenými na přímém měření elektrického proudu, který vzniká při srážce iontu s dynodou a následně je zesilován pomocí násobičů. Obvykle se používají elektronové násobiče, které amplifikují elektrony pomocí sady dynod nebo kontinuálním dynodovým elektronovým násobičem. Výsledkem je hmotnostní spektrum zobrazující četnosti výskytů jednotlivých iontů v závislosti na jejich m/z . Lineární iontová past, ICR a Orbitrap využívají Fourierovu transformaci (FT) a představují kombinaci analyzátoru a detektoru. Indukcí proudu v důsledku pohybu iontů v hmotnostním analyzátoru se generuje komplexní „proudový obraz“ všech přítomných iontů s různými hodnotami m/z . Vygenerovaný signál je zpracován FT.

Spojením dvou nebo více hmotnostních analyzátorů může být **k analýze komplexních molekul (včetně proteinů či peptidů)** využito **tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS)**. V prvním hmotnostním analyzátoru je nejprve stanovena molekulová hmotnost intaktní molekuly. Ta je v dalším hmotnostním analyzátoru fragmentována (v případě peptidu často v peptidické vazbě) a následně je stanovena hmotnost jednotlivých fragmentů molekuly. K rozpadu peptidické vazby v hmotnostním spektrometru dochází buď kolizí s inertním plynem (CID) nebo přenosem elektronu o nízké energii ve fragmentačních technikách, jako jsou disociace záchytem elektronu (ECD) a disociace přenosem elektronu (ETD). V popsáných experimentech této práce byly peptidy fragmentovány technikou „fragmentace za iontovým zdrojem“ (PSD) v MALDI TOF-TOF. Fragmentace je prováděna zvýšenou energií laserového paprsku za vzniku iontu s přebytkem vnitřní energie (metastabilní ion). Ten je vybrán pomocí iontového selektoru (Ion gate) nacházející se za iontovým zdrojem, na který je přiváděno napětí vychylující všechny ionty směrem od detektoru. V okamžiku, kdy iontovým selektorem prolétá prekurzorový ion, je napětí vypnuto a volený ion pokračuje k detektoru. Během letu se metastabilní ion rozpadá na fragmenty a jeho kinetická energie se rozdělí mezi dceřiné ionty v poměru k jejich hmotnosti. K separaci dceřiných iontů dochází na základě jejich různých kinetických energií a ionty dopadají na detektor v čase, který je funkcí jejich hodnoty m/z .

Základními parametry hmotnostní spektrometrie jsou rozlišení a přesnost stanovené hodnoty m/z . Rozlišení hmotnostního spektrometru je míra schopnosti analyzátoru rozlišit blízké hodnoty m/z . Přesnost udává míru shody mezi naměřenou a teoretickou hodnotou m/z . Dalšími důležitými parametry hmotnostních spektrometrů jsou citlivost a rozsah m/z hodnot, ve kterém mohou být spektra naměřena. V současnosti umožňuje hmotnostní spektrometrie stanovit m/z peptidů už z attomolového množství s přesností až 0,1 ppm (Mallick a Kuster, 2010).

2.5.1 Hmotnostní spektrometrie v proteomice - identifikace proteinů

Určení částečné primární struktury (aminokyselinové sekvence) proteinů bylo možné již v 50. letech, kdy byla vyvinuta technika chemického sekvenování proteinů označovaná jako Edmanovo odbourávání. Sekvenování proteinů je založeno na postupném chemickém odbourávání jednotlivých aminokyselin z N-konce proteinů značených fenylizothiokyanátem (Edman, 1949). Jestliže se na N-konci nenachází žádná modifikace, je možné touto metodou z N-konce proteinů získat sekvenci o délce až 30 aminokyselin. Se sekvenováním genomů

a vznikem genových databází v 90. letech byla identifikace proteinů Edmanovým odbouráváním nahrazena **identifikací proteinů hmotnostní spektrometrií**.

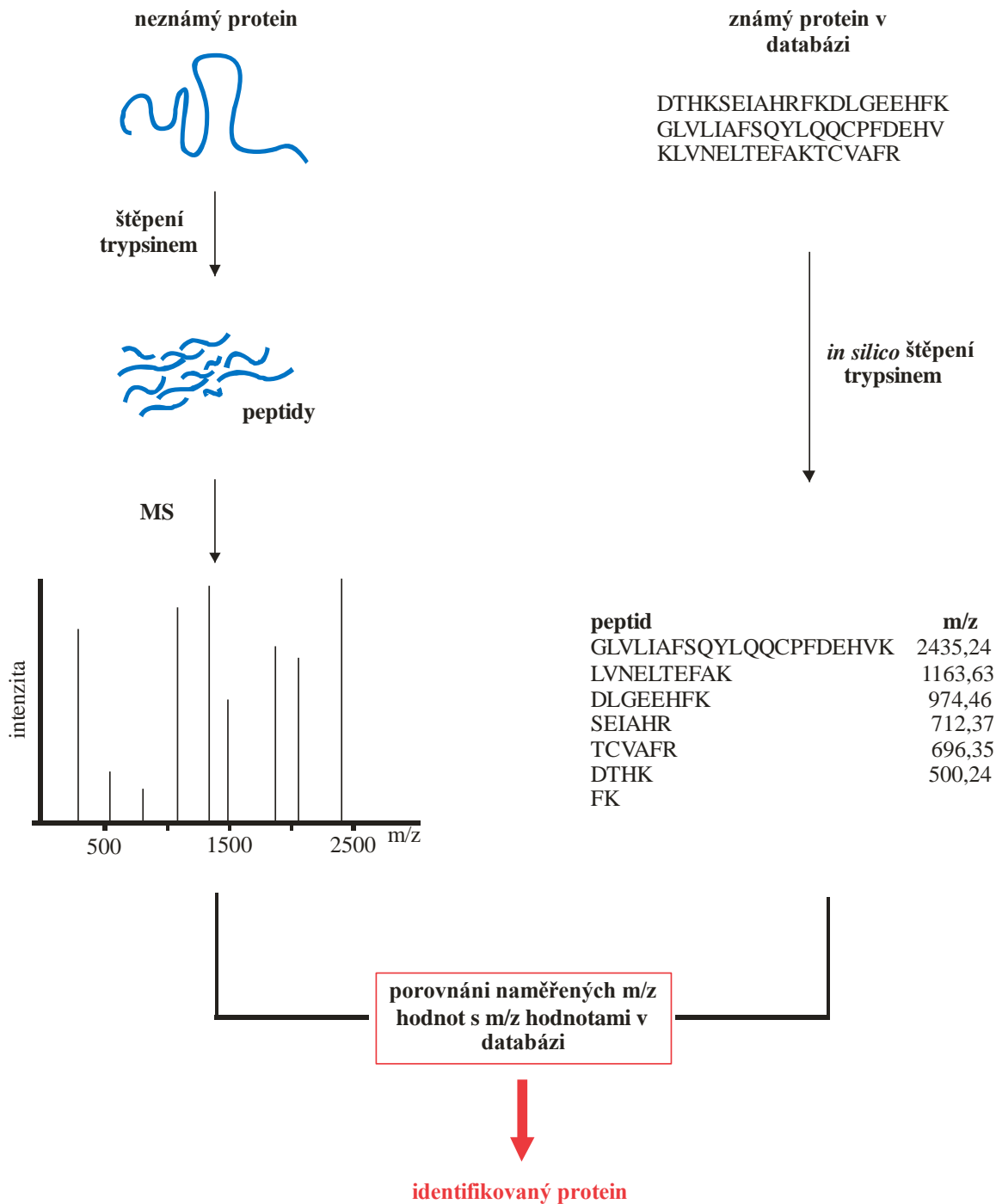
Na základě stanovení molekulových hmotností peptidů nebo jejich fragmentů hmotnostní spektrometrií je možné s využitím proteinových a genových databází proteiny identifikovat. K identifikaci proteinů nabízí hmotnostní spektrometrie dva základní přístupy.

První způsob se označuje jako **peptidové mapování nebo-li peptidový fingerprinting (Peptide mass fingerprinting, PMF)** (Obrázek 2) a je založen na stanovení přesných molekulových hmotností peptidů pocházejících z jednoho proteinu. Neznámý protein určený k identifikaci je naštěpený *in vitro* specifickou proteázou (nejčastěji trypsinem) za vzniku specifických peptidů. Molekulová hmotnost peptidů o průměrné délce zhruba 6-30 aminokyselin je měřena hmotnostním spektrometrem. Naměřené hodnoty m/z specifické pro jednotlivé peptidy a tedy i analyzované proteiny jsou vstupními daty pro vyhledávání a identifikaci proteinů v dostupných proteinových a genových databázích. Principem identifikace je nalezení shody experimentálních dat m/z peptidů s predikovanými hodnotami m/z peptidů, pomocí pravděpodobnostního skórovacího algoritmu. Predikované hodnoty m/z peptidů jsou vytvořeny *in silico* z primární sekvence proteinů, cDNA nebo kódujících genů.

Druhý způsob identifikace proteinů využívá **tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS)**. Mikrosekvenace v tomto případě umožňuje identifikovat neznámý protein určením aminokyselinové sekvence peptidů. Identifikace proteinů je založena na fragmentaci peptidové vazby analyzovaného peptidu v MS za vzniku směsi fragmentů. Jednotlivé fragmenty jsou různě dlouhé a ve srovnání s původním analyzovaným peptidem se vždy liší o jednu nebo více aminokyselin. Z rozdílů naměřených hmotností jednotlivých fragmentů v kombinaci se znalostmi molekulových hmotností všech aminokyselin je možné porovnáním s proteinovými databázemi identifikovat protein a zároveň určit sekvenci peptidu.

Dnes je hmotnostní spektrometrie neodmyslitelnou součástí proteomiky. Kromě identifikace proteinů umožňuje hmotnostní spektrometrie také:

- stanovení hmotnosti celého proteinu
- určení aminokyselinové sekvence peptidů
- určení post-translačních modifikací
- kvantifikacei peptidů



Obrázek 2: Identifikace proteinů peptidovým mapováním. Naměřené hodnoty m/z analyzovaného proteinu se porovnává s teoretickými hodnotami proteinu m/z . Predikované hodnoty m/z peptidů jsou získány *in silico* z primární sekvence proteinů, cDNA nebo kódujících genů.

2.6 Proteomické přístupy

Získávání informací o sekvenci lidského genomu, ale také o genomech mnoha modelových organismů, vedlo k vytvoření genových databází, které našly již v 90. letech své uplatnění i při identifikaci proteinů hmotnostní spektrometrií. V té době byla 2-D elektroforéza ve spojení s hmotnostní spektrometrií jediným nástrojem proteomiky, jež umožňovala studovat komplexní proteinové vzorky. 2-D elektroforézou je možné rozlišit sta až tisíce proteinových skvrn, určit jejich relativní kvantitu a identifikovat je hmotnostní spektrometrií. Kombinaci 2-D elektroforézy založené na dělení intaktních proteinových molekul s hmotnostní spektrometrií lze označit za „**klasický**“ přístup.

Na konci 90. let v souvislosti s rozvojem hmotnostní spektrometrie i separačních technik se začalo uvažovat o výkonnější a reprodukovatelnější alternativě k separaci intaktních proteinů. Inspirací byla sekvenace celého genomu tzv. „shot-gun“ přístupem, ve kterém je celý genom štěpen na fragmenty, jež jsou po sekvenaci na základě překryvů seřazeny zpět do původního genomu. Vznikl tak přístup založený na separaci peptidů vzniklých proteolytickým štěpením komplexního proteinového vzorku. V typickém proteomickém experimentu typu „**shot-gun**“ je proteinový vzorek štěpen specifickou endoproteázou (nejčastěji trypsinem) za vzniku vysoce komplexní směsi peptidů. Ta je separována některou ze vhodných separačních metod a následně podrobena analýze MS/MS. Identifikace bílkovin pomocí MS probíhá mikrosekvenací peptidů. Směs peptidů vzniklá naštěpením biologického vzorku se zpravidla vyznačuje velmi vysokou komplexitou (až stovky tisíc různých peptidů), a proto je nutné k úspěšné analýze proteinového vzorku zvolit vícestupňovou separaci. Pionýrská práce, která iniciovala „shot-gun“ přístup ke studiu proteinů, se s komplexností peptidového vzorku homogenátu kvasinky vypořádala dvojrozměrnou (2-D) chromatografií. Peptidy byly nejprve děleny podle jejich náboje chromatograficky na katexové koloně a poté podle jejich hydrofobicity na koloně s reverzní fází. Bylo tak identifikováno téměř 1500 proteinů *Saccharomyces cerevisiae* (Washburn et al., 2001). Tento způsob separace peptidů je dnes hojně využíván a je někdy také označován jako „multidimensional protein identification technology“ (MudPIT). Za účelem získávání co největšího množství identifikovaných proteinů byly zavedeny i jiné kombinace separačních technik. Například je tak možné efektivně separovat peptidy izoelektrickou fokusací na imobilizovaných pH gradientech (Cargile et al., 2005) s následnou chromatografickou (například RP-LC) separací nebo lze intaktní proteiny nejdříve rozdělit 1-D SDS elektroforézou (Daully et al., 2006) a následně jednotlivé frakce naštěpit trypsinem

a získané peptidy separovat chromatograficky. Eluované peptidy jsou potom identifikovány pomocí MS. Precizní vícerozměrnou separací proteinů a peptidů a použitím hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením se v současnosti daří identifikovat až 10 000 lidských proteinů ve vzorku (Beck et al., 2011, Nagaraj et al., 2011).

2.7 Kvantifikace proteinů a peptidů

K popisu buněčných regulací a odpovědí tkáně či buňky na různé vnější a vnitřní podněty je nutné sledovat kvantitativní změny hladiny proteinů. Jak řeší proteomika relativní kvantifikaci proteinů v porovnávacích (expresních) experimentech?

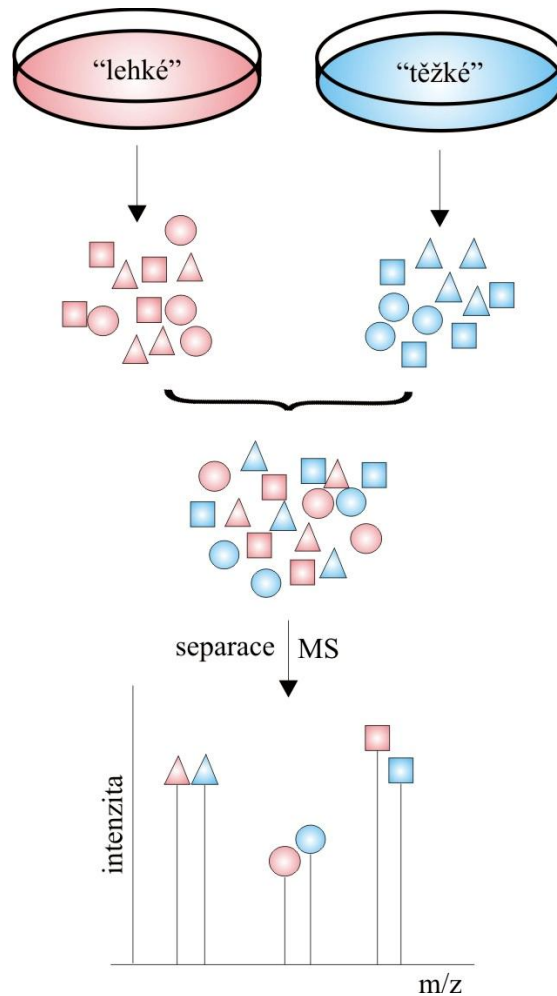
Relativní kvantifikaci proteinů je možné provádět „klasickým“ přístupem, tedy pomocí 2-DE s vizualizací proteinových skvrn. Informace o změně exprese proteinu (tedy relativní kvantitě konkrétního proteinu ve dvou nebo více porovnávaných vzorcích) je získávána z integrovaných optických denzit porovnávaných proteinových skvrn.

Odlišná je ovšem situace v případě „shot-gun“ experimentů, kde nedochází k žádnému barvení nebo jiné vizualizaci. Zde lze získat relativní kvantitativní informaci hmotnostní spektrometrií s využitím stabilních izotopů. Hmotnostní spektrometrie ve své podstatě není technikou kvantitativní, přestože intenzita MS signálu peptidu do jisté míry závisí na množství ionizovaných peptidů. Důvodem je vliv samotné ionizace peptidu na intenzitu jeho MS signálu, neboť účinnost ionizace je závislá na chemických vlastnostech peptidů a na kompetici peptidů o náboj při jejich ionizaci a převodu do plynného skupenství. Jiná situace nastává při porovnávání intenzity MS signálu v rámci jednoho hmotnostního spektra chemicky ekvivalentních, ale hmotnostně odlišných peptidů. V takovém případě je možné peptidy kvantifikovat. K odlišení chemicky ekvivalentních peptidů ze dvou různých vzorků se využívá izotopických značek, jež jsou do porovnávaných biologických vzorků inkorporovány metabolickou (Značení aminokyselin stabilními izotopy v buněčné kultuře, SILAC), enzymatickou (Značení stabilním izotopem ^{18}O) nebo chemickou (Izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci, iTRAQ) cestou. Postupy zmíněných metod značení využívající izotopy jsou podrobněji popsány v následujících odstavcích.

2.7.1 SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture)

Podstatou techniky SILAC je metabolická inkorporace esenciálních aminokyselin, jako jsou arginin a lyzin obsahující stabilní izotopy prvků ^{13}C , ^{15}N , do proteinů buněk rostoucích

v buněčné kultuře (Ong et al., 2007). Buňky jsou kultivovány v médiu s izotopově značenými aminokyselinami, které jsou metabolicky inkorporovány do nově vznikajících proteinů. Po několika buněčných děleních dochází k vyředění neznačeného proteinu a jsou tak proznačeny i proteiny s velmi pomalým metabolickým obratem (Ong et al., 2007). Typický SILAC experiment probíhá kultivací dvou různých buněčných populací (jejichž proteomy chceme porovnat) v médiu obsahujícím buď arginin a lyzin s přírodními izotopy ^{12}C a ^{14}N („lehký“ arginin a lyzin) nebo izotopově značený ^{13}C , ^{15}N arginin a/nebo lyzin („těžký“ arginin a lyzin) (Obrázek 3). K úplnému naznačení buněk (97%) „těžkými“ aminokyselinami dochází zhruba po pátém buněčném dělení (Ong et al., 2007). Smícháním „lehkého“ a „těžkého“ vzorku v poměru 1:1 před jejich homogenizací a dalším zpracováním se minimalizuje množství vnesených chyb a vznik artefaktů. Štěpením proteinové směsi trypsinem (na C-koncích argininu a lyzinu) je zajištěna přítomnost peptidů obsahujících pouze jednu „těžce“ značenou aminokyselinu, jež jsou porovnávány s neznačenými „lehkými“ peptidy. V závislosti na kombinaci a počtu izotopů v aminokyselinách v SILAC technice se „těžké“ peptidy od „lehkých“ liší od 4 do 10 Da. Rozdíl hmotností je dostačující k tomu, aby je bylo možné rozlišit v hmotnostních spektrech. Porovnáním intenzit signálu „lehkého“ peptidu a jeho „těžkého“ ekvivalentu se získá relativní kvantitativní informace, tedy informace o relativní změně exprese proteinu. K identifikaci daného peptidu/proteinu dochází mikrosekvenací. Ačkoliv se SILAC technika výhradně používá ke značení buněčných linií, nedávné studie ukazují, že přístup SILAC je možné rozšířit i na vyšší organismy a rostliny. Podařilo se tak *in vivo* značení myši (Krüger et al., 2008), hád'átka (Gouw et al., 2008), octomilky (Sury et al., 2010), huseníčku a dalších organismů (Gouw et al., 2010).



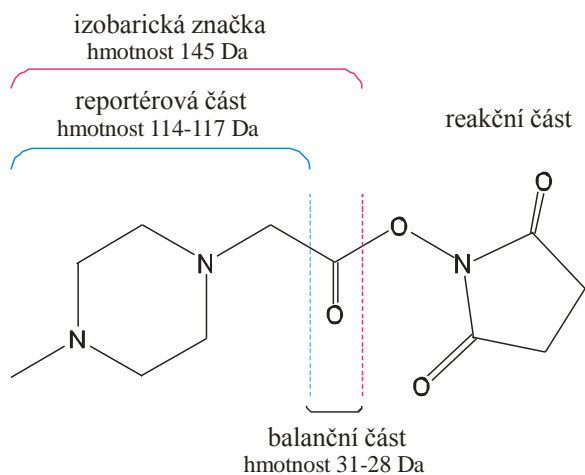
Obrázek 3: Princip SILAC techniky. Dvě různé populace buněk jsou kultivovány v normálním médiu („lehké” médium) a v médiu s izotopově značenými aminokyselinami („těžké” médium), které se metabolicky inkorporují do nově vznikajících proteinů. Po několika buněčných cyklech, kdy dojde v „těžkém” médiu k proznačení celého proteomu, jsou buňky sesbírány a smíchány v poměru 1:1. Směsný vzorek je poté separován a dále jsou hmotnostní spektrometrií proteiny identifikovány a kvantifikovány. Na výsledném MS spektru se k získání kvantitativní informace proteinů porovnávají intenzity signálu peptidů získaných z buněčných populací rostoucích na „lehkém” a „těžkém” médiu. Identifikace daného peptidu/proteinu se provádí MS/MS.

2.7.2 Značení ¹⁸O

Principem této metody je reakce trypsinu s peptidovým řetězcem, při níž se v průběhu štěpení v přítomnosti vody začleňují do C-konce peptidu jeden nebo dva atomy kyslíku (Mirgorodskaya et al., 2000). Porovnávané proteinové směsi jsou štěpeny trypsinem v přítomnosti H₂¹⁶O nebo H₂¹⁸O. Naštěpené peptidy jsou smíchány a analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie. V hmotnostním spektru jsou MS signály ekvivalentních peptidů odlišeny hmotností 2 nebo 4 Da, v závislosti na počtu ¹⁸O atomů začleněných v průběhu štěpení. Z poměru intenzit MS signálu peptidů je možné proteiny relativně kvantifikovat. Identifikace proteinů se provádí MS/MS.

2.7.3 iTRAQ (Izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci)

iTRAQ je kvantitativní technika založena na chemickém značení peptidů izobarickými značkami, to znamená odlišnými značkami stejné hmotnosti (Ross et al., 2004). Tento přístup umožňuje porovnávat (nejčastěji) čtyři biologické vzorky v jednom experimentu. Izobarické značky jsou tvořeny reakční, balanční a reportérovou částí (Obrázek 4). Reakční část je pro všechny značky identická. Balanční a reportérové části jsou pro jednotlivé značky chemicky identické, ale izotopově odlišné a jejich celková hmotnost je 145 Da. Reportérová část je izotopická značka s hmotnostmi od 114 do 117 Da, jejíž variabilita je dána kombinacemi izotopů ¹³C a ¹⁵N. K dorovnání reportérových částí na stejné hmotnosti se využívá balančních částí s různým zastoupením izotopů o hmotnostech v rozmezí 28-31 Da. iTRAQ značky se reakční částí vážou na N-konce peptidů a na volné aminoskupiny lyzinů. Po označení jednotlivých vzorků iTRAQ značkami jsou vzorky smíchány a po separaci identifikovány a kvantifikovány MS/MS. Kvantitativní informace o proteinech zastoupených ve studovaných vzorcích je poskytnuta až při samotné fragmentaci peptidů. Při fragmentaci značených peptidů se odštěpuje neutrální balanční část a nabitý reportérový ion, jenž je podle hmotnosti použité značky viditelný na hmotnostním spektru v oblasti 113 až 118 m/z. Ve výsledném spektru pro jednotlivý peptid se nacházejí píky reportérových iontů příslušných hmot a fragmenty peptidového iontu, ze kterých je získána informace o identitě (sekvenci) peptidu.



Obrázek 4: Izobarická značka je složená z reakční, balanční a reportérové části. Reakční část je pro všechny značky chemicky identická a slouží k vazbě na peptid. Balanční a reportérové části jsou pro jednotlivé značky chemicky identické, ale izotopově odlišné a jejich celková hmotnost je 145 Da. Reportérová část je izotopickou značkou s různými hmotnostmi 114-117 Da, které jsou získané kombinacemi izotopů ^{13}C a ^{15}N . K dorovnání hmotnosti reportérových částí slouží balanční část s různým zastoupením izotopů o hmotnostech v rozmezí 28-31 Da.

2.7.4 „Label-free“ značení

Moderní alternativou k provádění relativní kvantifikace proteinů s využitím stabilních izotopů jsou takzvané „label-free“ techniky. „Label-free“ metody vycházejí z předpokladu, že při zachování zcela stejných separačních podmínek lze intenzity signálu porovnávat, čímž je možné získat informaci o relativním množství proteinů ve dvou a více vzorcích. Lze toho dosáhnout dvěma různými přístupy založenými na odlišné intenzitě signálu nebo relativním počtu spekter přiřazených k danému proteinu. Prvním přístupem je porovnání intenzit MS signálů dvou identických peptidů. Předpokládá se, že plocha píku MS signálu (Area under the curve, AUC) je úměrná množství proteinu ve vzorku (Neilson et al., 2011). Ve druhém přístupu se vychází z předpokladu, že počet získaných MS/MS spekter přiřazených k jednomu proteinu závisí na množství tohoto proteinu ve vzorku. Proteiny jsou tak relativně kvantifikovány počtem naměřených MS/MS spekter (Spectral counting) v analyzovaných vzorcích (Zhu et al., 2010).

2.7.5 Shrnutí

O spolehlivosti a limitech „label-free“ kvantifikace se stále vedou spory. V současné době se v expresních proteomických studiích využívají především metody SILAC a iTRAQ,

přičemž jejich využití se odvíjí od typu studovaného biologického vzorku. Chemické značení iTRAQ je možné aplikovat na každý proteinový vzorek včetně odebraných tkání či tělních tekutin. SILAC lze použít pouze na značení proteinů v buňkách, které jsou schopné dělení *in vitro*. Zatímco při SILAC značení se aminokyseliny s izotopickou značkou přirozeně inkorporují do buněčných proteinů, značení iTRAQ značkami zahrnuje množství manipulací a kroků, během kterých může dojít ke vzniku artefaktů ovlivňujících výsledky a přesnost analýzy. Při využití iTRAQ značek jsou před vlastním značením vzorky porovnávaných proteinů zpracovávány odděleně. Jinak je tomu při značení SILAC, které umožňuje smíchat označené vzorky již na úrovni buněk, přičemž homogenizace buněk, případná frakcionace homogenátu a samozřejmě následná MS analýza jsou provedeny na jednom smíšeném vzorku.

3 Proteomika jako nástroj k analýze nádorových onemocnění

V České republice jsou nádorová onemocnění druhou nejčastější příčinou úmrtí. Ročně na malignity umírá více než 27 tisíc osob, což představuje 23% z celkové úmrtnosti. Incidence malignit v České republice je 785 případů na 100 000 obyvatel a z dlouhodobého pohledu stále roste (www.uzis.cz). Nádorová onemocnění se vyskytují především u osob vyššího věku (60 a více let). Mezi nejpočetnější diagnózy zhoubných novotvarů patří novotvary kolorekta, průdušnice, průdušek a plic, malignity prsu u žen a prostaty u mužů. V evropském i celosvětovém srovnání se Česká republika řadí k zemím s nejvyšším výskytem i úmrtností na některé malignity (např. kolorektální karcinom) (www.uzis.cz).

Nádorová onemocnění jsou charakterizována jako genetická onemocnění na úrovni somatické buňky za spoluúčasti genové výbavy jedince a vlivů zevního prostředí. Přeměna buněk v buňky nádorové je dlouhodobý a několikastupňový proces, ke kterému dochází v mnohobuněčných organismech. Každá buňka nese přesně regulovaný genetický program kontrolující buněčný růst, proliferaci, diferenciaci i buněčnou smrt. Nádorový buněčný klon vzniká při porušení těchto regulačních mechanismů, což je podmíněno aktivací protoonkogenů, inaktivací supresorových genů, získáním neomezeného replikačního potenciálu a mutací genů regulujících buněčnou smrt. V nádorových buňkách tak nacházíme mutace specifických genů, chromozomové aberace nebo epigenetické změny, jež poskytují nádorovým buňkám selektivní výhodu v porovnání se zdravými buňkami. Obecnými charakteristickými vlastnostmi nádorových buněk jsou (Hanahan a Weinberg, 2011):

- soběstačnost v produkci růstových signálů
- necitlivost k signálům zastavující buněčný cyklus
- narušení regulace apoptózy
- únik imunitě
- neomezený replikační potenciál
- posílení angiogeneze
- nestabilita genomu
- schopnost tkáňové invazivity a metastázování

Nádorovou transformací buněk mohou být postiženy zřejmě všechny typy buněk a tkání. Podrobnější pochopení mechanismů vzniku nádorových onemocnění je podmínkou k vývoji nových a účinných diagnostických a léčebných metod. Časná diagnóza je hlavním předpokladem úspěšné léčby nádorových onemocnění. Jedním z cílů této práce byla

identifikace nových markerů, které by mohly usnadnit časnou diagnózu ovariálního karcinomu.

Nezastupitelnou onkologickou léčebnou metodou je především klasická chemoterapie. Její necílenost spojená s vysokou toxicitou a vedlejšími příznaky vede k hledání nových cílenějších přístupů v podobě cílené a biologické terapie. Jednou z častých komplikací klasické chemoterapie i moderních cílených terapií je vznik rezistence.

Právě na **vznik rezistence na terapii** antimetabolity a popis jejich molekulárních mechanismů v buňkách lymfomu jsme se zaměřili ve druhé studii. Naše třetí práce se zabývala rezistencí lymfomových buněk na experimentální biologickou terapii a **hledáním nových zásahových míst** k likvidaci rezistentních buněk.

3.1 Identifikace potenciálních diagnostických markerů karcinomu ovaria

3.1.1 Karcinom ovaria

Nádory ovaria jsou pátou nejčastější příčinou úmrtí žen na malignitu. V 90% případech jde o epitelový nádor ovaria (Scully, 1987). V České republice je ročně diagnostikováno přibližně 1200 žen s nádorem ovaria, z nichž 700 žen každý rok onemocnění podlehnou. Výskyt nádoru ovaria roste s věkem žen, nejrizikovější skupinou jsou ženy starší 50 let (www.svod.cz). Vysoká úmrtnost žen je dána nepřítomností symptomů v počátečních stádiích onemocnění a dosud neexistujícími senzitivními biomarkery pro jeho časně odhalení. Zatímco pětileté přežití žen s časným stádiem (FIGO I/II) překračuje 80%, u žen s karcinomem ovaria v pokročilém stádiu (FIGO III/IV) klesá pětileté přežití na pouhých 10% (Heintz et al., 2006).

Mechanismus maligní transformace karcinomu ovaria není dobře známý. V 50-80% případech karcinomu ovaria je přítomná mutace nebo ztráta heterozygoty genu *TP53* (Kupryjańczyk et al., 1993, Skilling et al., 1996) a mutace genů *K-RAS* a *BRAF* (Mok et al., 1993, Singer et al., 2003). Přibližně 10% žen s ovarialním karcinomem má dědičnou mutaci genů *BRCA1* a *BRCA2* (Antoniou et al., 2003).

Počet ovulačních cyklů (Fathalla, 1971), časná menarché, pozdní menopauza a nuliparita (Riman, 2002) zvyšují riziko vzniku karcinomu ovaria. Rizikovou skupinu představují ženy vystavené nadměrné koncentraci gonadotropních hormonů (např. ženy se syndromem polycystických ovarií) (Schildkraut et al., 1997) nebo ženy po hormonální léčbě (Garg et al., 1998).

Časná stádia karcinomu vaječníku jsou asymptomatická. V případě podezření výskytu karcinomu ovaria, jež se většinou nacházejí již v pokročilém stádiu, je možné je odhalit pomocí zobrazovacích metod (ultrasonografie, počítačová tomografie) a stanovením hladiny nádorových markerů CA125 a HE4 v krvi. Typ nádoru a stupeň diferenciac se určuje histologickým vyšetřením odebrané tkáně ovarialního tumoru.

3.1.2 Diagnostické biomarkery

Pro ovarialní karcinom byly do klinické praxe zavedeny dva sérové biomarkery: CA125 a HE4. Tumorový antigen 125 (CA125) byl v roce 1981 objeven v krevním séru jako protein, jehož hladina byla zvýšená téměř u 80% žen s karcinomem ovaria (Bast et al.,

1981). CA125 je transmembránový glykoprotein patřící do proteinové rodiny mucinů. Je exprimovaný různými epiteliálními tkáněmi a mezotelem lemující tělní dutiny. Specifita detekce karcinomu ovaria pomocí CA125 a jeho senzitivita se liší v závislosti na stádiu onemocnění. Pro rozpoznání karcinomu v jeho časném stádiu se uvádí senzitivita 50-60% při 90% specifitě, zatímco pro pokročilá stádia karcinomu je senzitivita 80% při 90% specifitě (Sarojini et al., 2012).

Druhým klíčovým markerem v detekci karcinomu ovaria v krevním séru je epididymální glykoprotein 4 (HE4) (Kirchhoff et al., 1991). Funkce tohoto glykoproteinu není dosud známá. V porovnání s markerem CA125 HE4 vykazuje vyšší senzitivitu u karcinomu ovaria v jeho časném stádiu a dále umožňuje rozlišit benigní nález od maligního (Hellström et al., 2003).

Zdá se, že zvýšit senzitivitu a specifitu detekce ovariálního karcinomu je možné kombinací obou zmíněných biomarkerů. Bylo prokázáno, že touto kombinací je při detekci ovariálního karcinomu dosahováno senzitivity 76,4% při 95% specifitě (Moore et al., 2008). Pro detekci časných stádií karcinomu ovaria je však senzitivita kombinace CA125 a HE4 stále nedostatečná (senzitivita 39,5% při 95% specifitě) (Moore et al., 2008). Současná klinická praxe postrádá biomarkery pro časnou diagnostiku karcinomu ovaria.

Epidemiologické a intervenční studie ukazují, že **časná detekce nádorů** zvyšuje šanci na léčbu a snižuje výskyt komplikací, které pokročilé nádorové onemocnění a jeho léčba přináší. U většiny nádorů trvá několik let, než se svým růstem klinicky projeví a začnou ohrožovat svého nositele na životě. To poskytuje relativně dostatečný časový prostor k časně detekci karcinomu a zvyšuje šanci na jeho eradikaci. Lze tedy předpokládat, že použití molekulárních diagnostických markerů k časně detekci nádorů může přispět k dalšímu snížení morbidit a mortality spojené s těmito chorobami.

Právě nepřítomnost dostatečně specifických a senzitivních biomarkerů pro časnou detekci karcinomu ovaria nás motivovala k jeho hledání v krvi pacientek.

Za biomarker lze považovat teoreticky jakoukoliv molekulu vykazující reprodukovatelné rozdíly v koncentraci či struktuře, jež jsou specifické pro daný patologický proces, pro dané onemocnění. Vhodným a prakticky využitelným biomarkerem mohou být například proteiny, pokud se nacházejí ve snadno dostupné tkáni nebo nejlépe v tělní tekutině.

Za biomarker ve snadno dostupném biologickém vzorku tak může být považován:

- protein, který je nádorem uvolňován do krve
- protein uvolněný z okolní tkáně v reakci na přítomnost nádoru
- fragment sérového proteinu štěpený nádorovými proteázami
- jiný protein v krvi, např. vyvolaný imunitní odpovědí, zánětem, apod.

Vhodný biomarker by měl být detekovatelný analytickou metodou, která by měla být nejenom spolehlivá a měla by zaručovat dostatečnou reprodukovatelnost měření, ale s ohledem na praktické použití by měla být dostupná a použitelná i pro rutinní klinickou praxi (biochemické stanovení, imunodetekce, PCR, atd.). Diagnostická hodnota biomarkeru závisí na prevalenci onemocnění v populační skupině a na specifitě a senzitivitě daného biomarkeru, které jsou definovány:

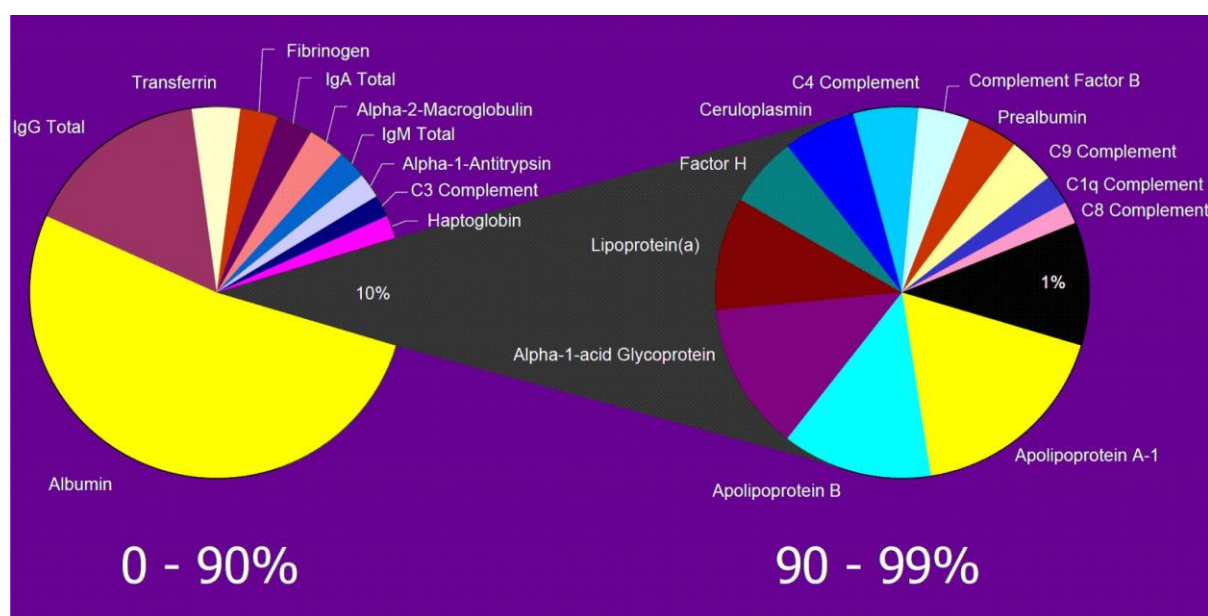
- senzitivita - pravděpodobnost, s jakou má jedinec s malignitou pozitivní výsledek
- specifita - pravděpodobnost, s jakou má jedinec bez malignity negativní výsledek na přítomnost biomarkeru

3.1.3 Krevní sérum, plazma a jejich proteomická analýza

Krev nepřetržitě cirkuluje oběhovým systémem. Zajišťuje přenos krevních plynů, přívod živin, vitaminů, minerálů, hormonů, růstových faktorů a dalších molekul k cílovým orgánům, udržuje stálost vnitřního prostředí, odvádí z tkání odpadní produkty a dále má obrannou a termoregulační funkci. Proteom plazmy a séra tak nese informaci o aktuálním stavu organismu i jednotlivých tkání. Vzhledem k výjimečnosti obsahu informací v krvi a dostupnosti krve jsou plazma a sérum považovány za nejvhodnější materiál k hledání biomarkerů. Zároveň je však proteom krevní plazmy či séra směsí neobyčejně komplexní – dosud bylo identifikováno více než 3000 plazmatických a sérových proteinů (www.peptideatlas.org). Proteiny v plazmě a séru mají navíc velmi vysoký rozsah koncentrací - až 10 řádů (Anderson a Anderson, 2002). Koncentrace nejvíce zastoupeného proteinu albuminu se udává 30-45 mg/ml, zatímco koncentrace proteinů s nejnižší rutinně stanovovanou koncentrací (např. interleukiny) se pohybuje v jednotkách pg/ml. V lidské plazmě a séru představuje 22 nejkoncentrovanějších proteinů zhruba 99% hmotnosti všech proteinů v plazmě a séru. Na zbývající tisíce proteinů připadá pouhé 1% (Anderson a Anderson, 2002). Mezi proteiny s nejvyšší koncentrací v plazmě a séru patří albumin (55%), IgG, transferin, IgA, apolipoproteiny, antitrypsin, komponenty C a další (Obrázek 5). Proteinová směs krevní plazmy a séra tak z proteomického hlediska představuje

pravděpodobně nejobtížněji studovaný vzorek vůbec, neboť dynamický rozsah koncentrací sérových a plazmatických proteinů výrazně překračuje analytické možnosti dosud existujících proteomických technik.

Přítomnost abundantních proteinů činí detekci proteinů o nízkých koncentracích (ng/ml a pg/ml) (mezi kterými lze přítomnost biomarkeru spíše očekávat) extrémně obtížnou. Proto je nutné před samotnou analýzou zavést krok, jež vede k překonání rozdílů v koncentracích sérových a plazmatických proteinů. Jedna z metod je založená na **afinitní depleci (odstranění)** několika nejhojněji zastoupených proteinů ze séra nebo plazmy. Zcela odlišný princip využívá druhý přístup, jehož podstatou je vyrovnávání, **ekvalizace**, koncentrací jednotlivých proteinů pomocí knihovny hexapeptidových ligandů.



Obrázek 5.: Zastoupení majoritních proteinů v krevní plazmě a séru.

Afinitní deplece

Albumin a imunoglobuliny G zaujímají přibližně 80% hmotnosti všech proteinů v plazmě a séru. K odstranění albuminu se využívá jeho afinity k modrému barvivu Cibacron blue (Travis et al., 1976) a k depleci IgG zase afinity k bakteriálním proteinům A a G (Björck a Kornvall, 1981, Guss et al., 1986). Jinou možností je odstranění albuminu a IgG specifickými protilátkami (Björhall et al., 2005). Aby však bylo možné dostat se hlouběji do proteomu séra a plazmy, je nezbytné odstranit i další abundantní proteiny (transferin, fibrinogen, IgA, haptoglobin, α -1-antitrypsin, apolipoprotein A1, IgM, makroglobulin, transthyretin, apolipoprotein A2, komplement C3, α -1- kyselý glykoprotein, atd.) (Pieper et al., 2003, Björhall et al., 2005, Echan et al., 2005, Zolotarjova et al., 2005). Za tímto účelem

se rovněž využívají příslušné protilátky imobilizované na nosičích, kterými je tak možné v jednom kroku odstranit až 20 nejhojněji zastoupených proteinů v plazmě a séru (Pieper et al., 2003, Echan et al., 2005).

Ekvalizace hexapeptidovou knihovnou

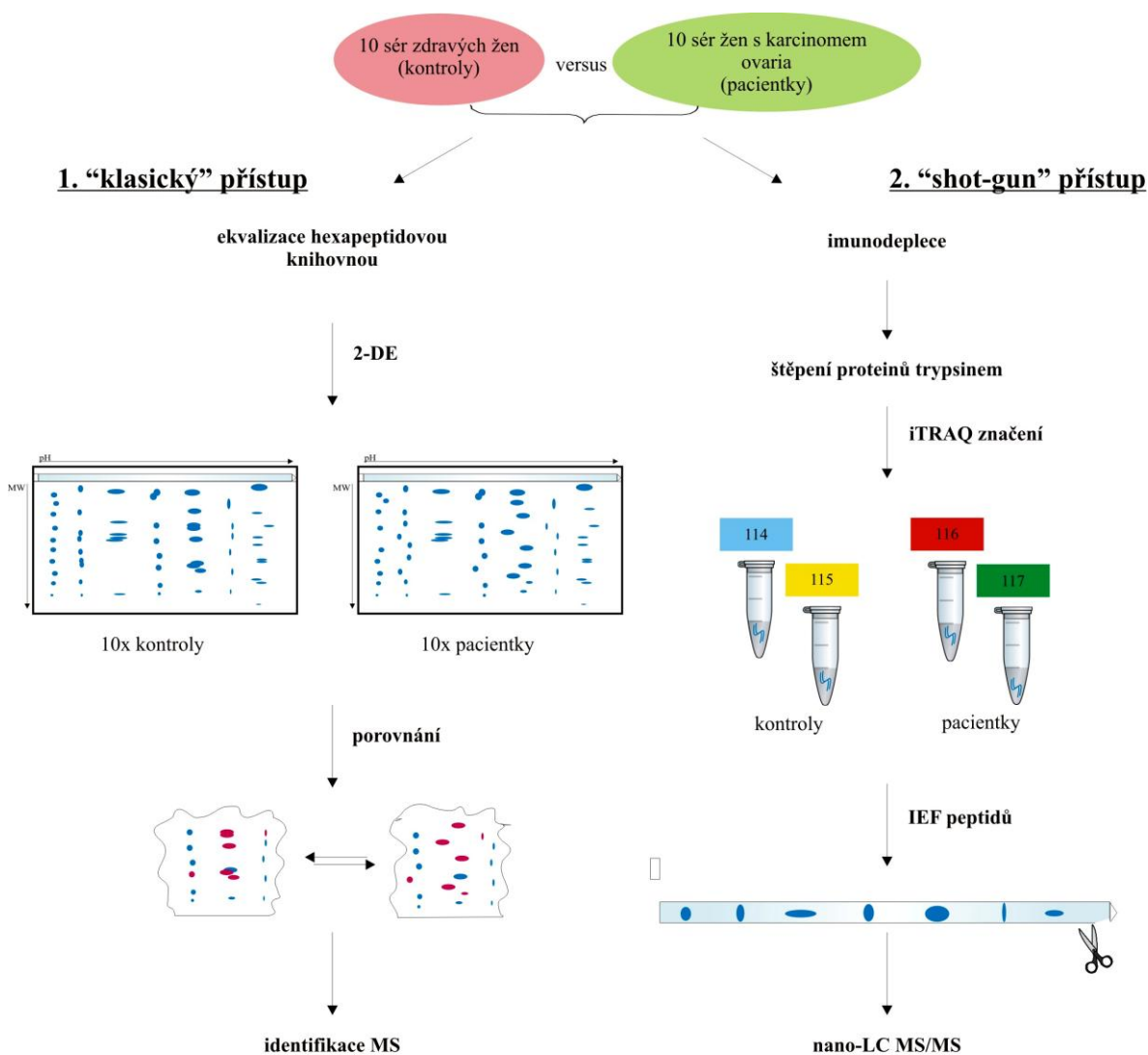
Druhou možností, jak se vypořádat s rozdíly v koncentracích proteinů v séru a plazmě, je takzvaná **ekvalizace hexapeptidovou knihovnou** (Thulasiraman et al., 2005). Metoda je známá pod komerčním názvem ProteoMiner. Při použití této metody dochází k obohacení minoritních proteinů a zároveň ke snížení koncentrace abundantních proteinů. Ekvalizace koncentrací proteinů je založena na rozdílech ve vazebných afinitách přítomných proteinů ke knihovně hexapeptidů navázaných na povrchu nosiče. Knihovna je tvořena 6⁸ hexapeptidy, které vznikly kombinatoricky z 8 aminokyselin (Arg, Lys, His, Phe, Tyr, Trp, Val a Leu). V koloně jsou ve stejném množství přítomny odlišné hexapeptidy, přitom každý hexapeptid vykazuje rozdílnou vazebnou specifitu k jednotlivým proteinům ve vzorku. Výsledkem je omezená celková vazebná kapacita kolony pro nejhojnější proteiny. Vysoce abundantní proteiny jsou tak na koloně zachyceny jen částečně, kdežto proteiny o nízké vstupní koncentraci jsou naopak zachyceny poměrově více.

3.1.4 Porovnávací proteomická analýza sér zdravých žen a sér žen s karcinomem ovaria

Výchozím materiálem pro proteomickou analýzu byla krevní séra žen s karcinomem ovaria před zahájením léčby a skupiny zdravých žen. U pacientek zahrnutých v této studii byla histologicky potvrzena přítomnost karcinomu ovaria. Věkový průměr (53,6±5,3) pacientek odpovídal věkovému průměru zdravých žen (51,4±5,8). Vzhledem k náročnosti analýzy a k potlačení individuálních rozdílů v rámci skupiny, byly sérové vzorky 10 žen s diagnostikovaným karcinomem ovaria smíchány a stejně tak tomu bylo u 10 sérových vzorků zdravých žen. K hledání sérových proteinů jako potenciálních biomarkerů karcinomu ovaria byly zvoleny dva odlišné proteomické přístupy (Obrázek 6).

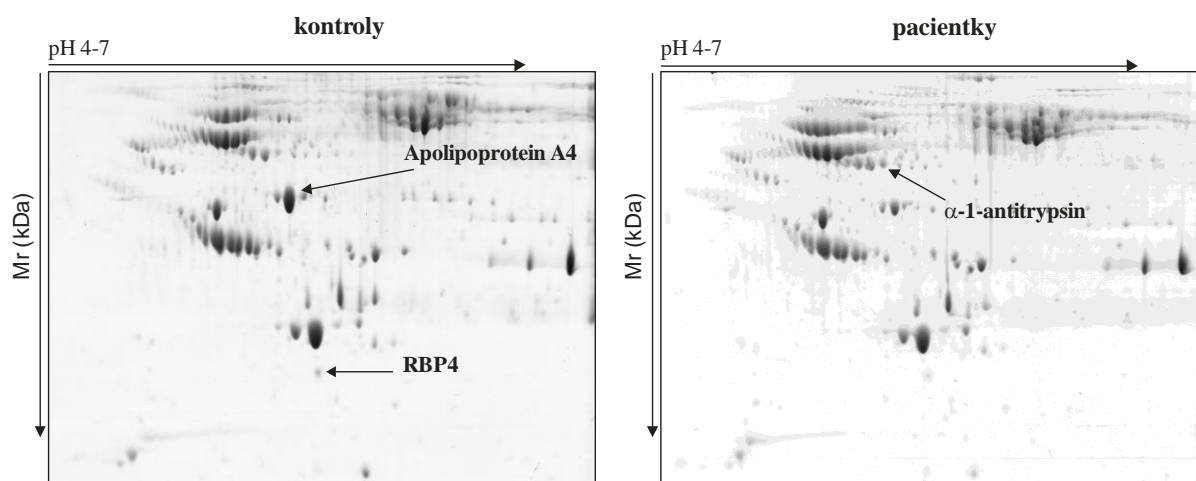
K porovnávací analýze jsme zvolili dva paralelní proteomické přístupy kombinující dva různé způsoby deplece majoritních proteinů a dva přístupy separace a kvantifikace:

1. přístup (2-DE) - ekvalizace koncentrace proteinů hexapeptidovou knihovnou s následnou 2-D elektroforézou a identifikací proteinů hmotnostní spektrometrií
2. přístup („shot-gun“) - imunoafinitní deplece 14 nejvíce zastoupených proteinů s následným štěpením a značením peptidů izotopickými iTRAQ značkami, jejich separací izoelektrickou fokusací na imobilizovaných pH gradientech a nano-LC systémem s identifikací proteinů hmotnostní spektrometrií



Obrázek 6: Postup experimentu. Identifikace proteinů se změnou koncentrací v séru pacientek s ovariálním karcinomem použitím dvou odlišných proteomických přístupů.

V prvním přístupu založeném na 2-DE analýze byl dynamický rozsah koncentrací sérových proteinů snížen ekvalizací hexapeptidovou knihovnou (ProteoMiner) a následně byly směsné vzorky sér pacientek a zdravých žen rozděleny pomocí 2-D elektroforézy (Obrázek 7). Kvantitativní analýzou přibližně 750 proteinových skvrn obarvených koloidní Coomassie Blue G-250 byly odhaleny statisticky významné rozdíly optických denzit u 3 proteinových skvrn, které byly identifikovány hmotnostní spektrometrií (MALDI TOF-TOF) (Tabulka 1). Byl to protein **α -1-antitrypsin** se zvýšenou koncentrací (2x) a proteiny **apolipoprotein A4** (2,3x) a **retinol-binding protein 4 (RBP4)** (2,2x) oba se sníženou koncentrací v séru žen s karcinomem ovaria.

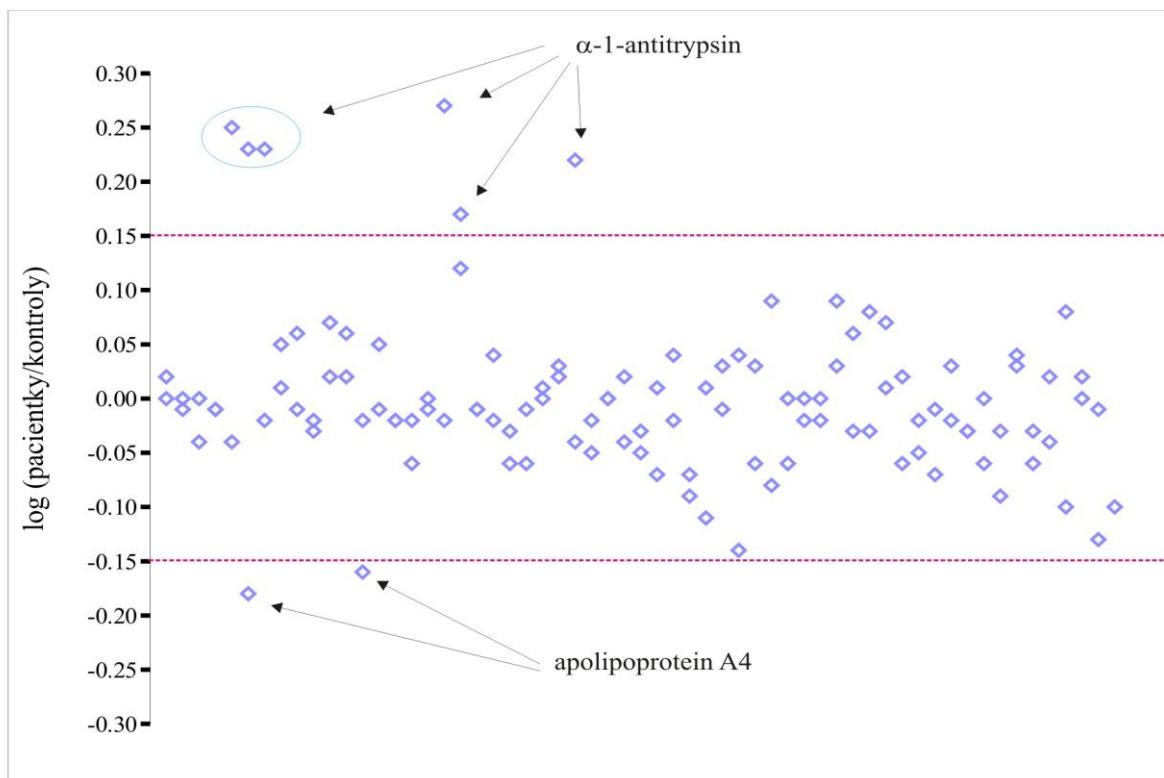


Obrázek 7: Dvojměrná elektroforéza sér po ekvilizaci knihovnou hexapeptidových ligandů. 2-DE byla provedena ze séra zdravých žen (kontroly) a žen s karcinomem ovaria (pacientky). U vizualizovaných skvrn Coomassie Blue G-250 byla stanovena jejich optická denzita. Byly nalezeny tři skvrny s významně změněnou denzitou mezi analyzovanými skupinami.

Swiss-Prot číslo	Název proteinu	Změna exprese proteinu	Mascot skóre	Sekvenční pokrytí (%)	Mr	pI
Proteiny se sníženou koncentrací v séru pacientek						
P06727	Apolipoprotein A4	2,3	335	58	45399	5,3
P02753	RBP4	2,2	153	57	23010	5,8
Proteiny se zvýšenou koncentrací v séru pacientek						
P01009	α -1-antitrypsin	2,0	115	42	46737	5,4

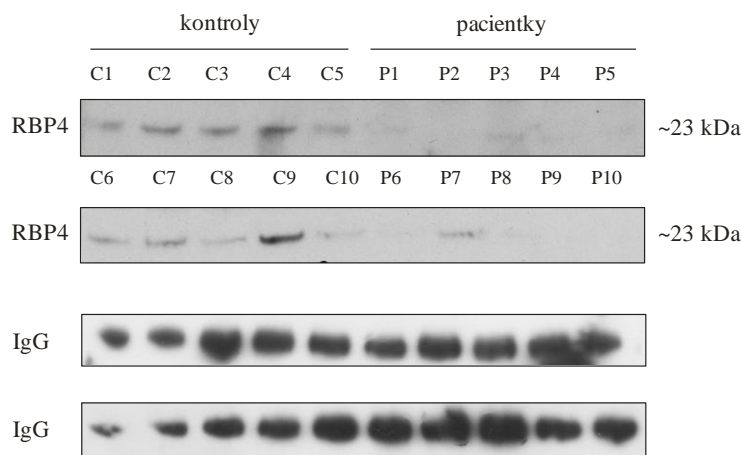
Tabulka 1: Změna koncentrace proteinů v séru žen s karcinomem ovaria (minimální změna 1,5x se statistickou významností $p < 0,05$).

S použitím druhého přístupu („shot-gun“) bylo nejprve imunoafinitní deplecí (**M**ultiple **a**finity **r**emoval **s**ystem, MARS) odstraněno 14 nejhojněji zastoupených proteinů. Depletované směsi vzorků byly štěpeny trypsinem a získané peptidy značeny izotopickými iTRAQ značkami. V dalším kroku proběhla dvojrozměrná separace peptidů, nejdříve izoelektrickou fokusací (rozsah pH 4-7) a následně chromatografií na reverzní fázi (nano-LC). Eluované peptidy a HCCA matrice (kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová) se roboticky nanášely na ocelový MALDI terčik určený pro hmotnostní spektrometrii. Poté byly proteiny identifikovány a kvantifikovány hmotnostní spektrometrií (MALDI-MS). Tímto přístupem jsme našli pouze dva proteiny s významně změněnou koncentrací (Obrázek 8). Prvním proteinem byl opět **α -1-antitrypsin**, jehož koncentrace v séru pacientek byla významně zvýšená (1,7x) a druhým proteinem byl taktéž **apolipoprotein A4**, jehož koncentrace v séru pacientek byla statisticky významně snížena (1,6x).

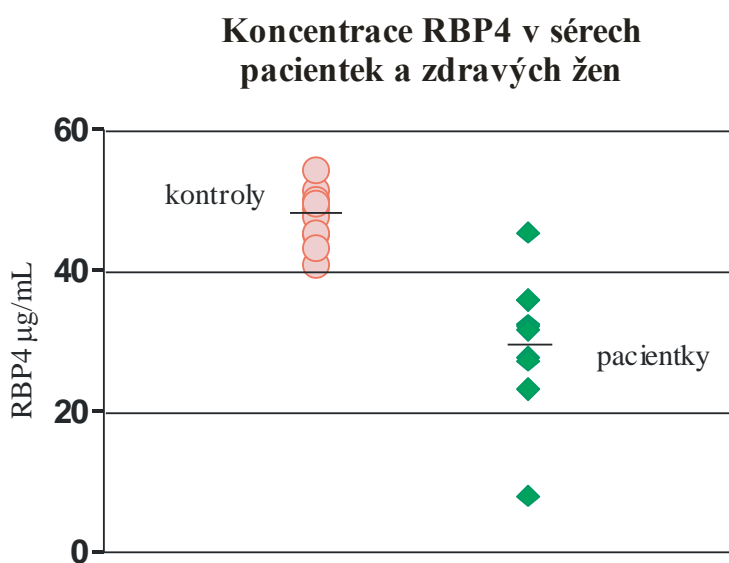


Obrázek 8: Relativní kvantifikace sérových proteinů žen s karcinomem ovaria metodou iTRAQ. Byly nalezeny dva proteiny s významně změněnou koncentrací proteinů v séru pacientek (statistická významnost odpovídala hodnotě $p < 0,05$).

Vztah mezi změnou koncentrace sérového apolipoproteinu A4 a α -1-antitrypsinu a karcinomem ovaria byl již publikován a oba proteiny jsou považovány za potenciální markery ovariálního karcinomu (Chen et al., 2008, Dieplinger et al., 2009). Změna koncentrace RBP4 však dosud nebyla popsána ve spojení s ovariálním karcinomem. Proto jsme se zaměřili na ověření snížené exprese RBP4 v individuálních sérových vzorcích pacientek a zdravých žen western blotem (Obrázek 9) a stanovili jsme jeho absolutní koncentraci metodou ELISA (Obrázek 10). Průměrná koncentrace RBP4 v sérových vzorcích pacientek (29,9 $\mu\text{g/ml}$) byla 1,6x snižená v porovnání s kontrolními vzorky (47,7 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,007$). Rozložení koncentrace RBP4 v séru (38-40 mg/ml) umožňuje rozlišit zdravou skupinu žen od většiny pacientek s ovariálním karcinomem ve studované skupině. Z naměřených výsledků můžeme konstatovat, že ženy s karcinomem ovaria zařazené do naší studie měly statisticky významně sníženou koncentraci RBP4 v krevním séru v porovnání s naměřenými hodnotami RBP4 v sérech zdravých žen.



Obrázek 9: Ověření snížené exprese RBP4 v jednotlivých sérech žen s karcinomem ovaria metodou western blot. K relativnímu porovnání bylo na každý SDS-PAGE gel naneseno 5 vzorků sér zdravých žen a 5 vzorků sér pacientek (10 mg proteinů/vzorek). Jako vnitřní standard byl zvolen IgG.



Obrázek 10: Ověření změny koncentrace RBP4. Absolutní koncentrace RBP4 v individuálních sérových vzorcích byla stanovena metodou ELISA. Každá hodnota odpovídá průměrné hodnotě získané ze tří replikátů.

3.1.5 Diskuze

Jaká je však souvislost mezi hladinou RBP4 a ovariálním karcinomem? **RBP4** je lipokalin, který je exprimován játry, adipocyty a některými epitelu včetně ovariálního epitelu. V krvi slouží RBP4 jako přenašeč retinolu (vitamin A). Množství RBP4 v krvi pozitivně koreluje s množstvím retinolu (Erikstrup et al., 2009). Retinoidy hrají důležitou roli v hematopoeze,

buněčné proliferaci a reprodukci. Dále mají přirozený protinádorový účinek (Clarke et al., 2004). Byla prokázána souvislost mezi změnami metabolismu retinoidů a vznikem karcinomu ovaria (Roberts et al., 2002, Cvetković et al., 2003, Williams et al., 2009).

Koncentrace RBP4 v krvi je udržována v úzkém rozmezí a sekrece RBP4 z jater podléhá regulaci hladinou retinolu. To znamená, že v případě nedostatku vitamínu A zůstává RBP4 v játrech a naopak při nadbytku vitamínu A dochází k uvolnění RBP4 do krve (Muto et al., 1972, Peterson et al., 1973). K objasnění příčiny snížené koncentrace RBP4 v sérech pacientek s ovariálním karcinomem jsme stanovili sérové hladiny vitamínu A u analyzovaných skupin. Průměrné koncentrace sérového retinolu byly srovnatelné mezi pacientkami a zdravými ženami. Z toho vyplývá, že pokles koncentrace RBP4 u žen s ovariálním karcinomem není způsobený změnami hladin vitamínu A v séru.

Jaký je tedy vztah RBP4 ke karcinomu ovaria? Pozorovaný pokles koncentrace proteinu RBP4 v séru pacientek by mohl být důsledkem snížené produkce RBP4 v ovariích. Vzhledem k tomu, že hlavními producenty RBP4 jsou játra a adipocyty, otázkou zůstává, zdali je vůbec možné pokles koncentrace RBP4 v séru pacientek přisuzovat jeho snížené produkci v ovariích. Snížená koncentrace RBP4 může být také odrazem systémových změn doprovázejících nádorové onemocnění.

Co ještě víme o RBP4?

Změny v koncentraci RBP4 v séru provázejí změny v metabolismu glukózy a mastných kyselin (Yang et al., 2005, Usui et al., 2009). Zvýšená koncentrace RBP4 navozuje u myši inzulinovou rezistenci a lze ji také detekovat u pacientů s poruchou glukózové tolerance a diabetes mellitus 2. typu (Yang et al., 2005, Graham et al., 2006). Dále je změna v koncentraci RBP4 zmiňována v souvislosti s obezitou, polycystickým ovariálním syndromem, dyslipidemií, arteriální hypertenzí a dále s dysfunkcí ledvin a kardiovaskulárním onemocněním u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (Cabré et al., 2007, Norseen et al., 2012).

K vyloučení výše uvedených faktorů, jež by mohly ovlivňovat koncentraci RBP4 v krvi a které bezprostředně nesouvisí s karcinomem ovaria, byla u pacientek a zdravých žen prověřena anamnéza. U žádné z žen zahrnutých do této práce nebyl diagnostikován diabetes mellitus 2. typu ani jiné závažné onemocnění.

Změny v koncentraci RBP4 jsou kromě metabolismu glukózy spojovány s obezitou (Graham et al., 2006) a změnami BMI (body mass index). Data jsou však nejednoznačná.

Významně zvýšená koncentrace sérového RBP4 byla nalezena u obézních žen v porovnání s ženami s normální hodnotou BMI (Graham et al., 2006). Jiná práce ukázala, že u skupiny pacientů s patologickou obezitou došlo po snížení BMI gastrickou bandáží ke snížení koncentrace RBP4 v krvi (Haider et al., 2007). Vztah RBP4 s BMI vyvracela pouhá jedna publikace, ve které hladina sérového RBP4 při různých hodnotách BMI zůstala nezměněna (Kowalska et al., 2008). Na základě těchto publikací jsme testovali hypotézu o vztahu mezi poklesem koncentrace RBP4 v sérech pacientek a změnou jejich BMI. Porovnáním BMI zdravých žen a pacientek jsme však zjistili, že není mezi nimi statisticky významný rozdíl ($p=0,126$), a proto jsme vyloučili korelaci koncentrace RBP4 s hodnotami BMI.

Důvod snížení koncentrace RBP4 u pacientek s ovariálním karcinomem zatím neznáme. Teoreticky by však snížená koncentrace RBP4 v krvi pacientek mohla být časným markerem metabolických změn souvisejících s růstem nádoru ještě před tím, než se tyto změny nápadně projeví ve formě nádorové kachexie a sníženého BMI. Nádorová kachexie je syndrom progresivní ztráty tělesné hmoty, kdy metabolické změny podmíněné aktivitou protizánětlivých cytokinů vedou v konečném důsledku k vyčerpání svalové a tukové hmoty. Kachexie představuje vážnou komplikaci při terapii a je příčinou až 20% úmrtí u pacientů s nádorovým onemocněním (Inui, 2002, MacDonald et al., 2003). Pokud by byl RBP4 časným markerem nastupující nádorové kachexie a nikoliv specifickým diagnostickým znakem ovariálního karcinomu, měl by i tak svou značnou praktickou využitelnost.

Pomocí dvou paralelních přístupů jsme identifikovali 3 proteiny s významnou změnou v koncentraci. Detekované proteiny **α -1-antitrypsin** (zvýšená koncentrace) a **apolipoprotein A4** (snížená koncentrace) v sérech žen s ovariálním karcinomem jsou považovány za potenciální markery tohoto onemocnění. Třetím proteinem byl **RBP4**, jehož koncentrace je statisticky významně snížená v sérech pacientek v porovnání se zdravými ženami porovnatelného věku. Byly vyloučeny na růstu nádoru nezávislé faktory, které by mohly být zodpovědné za snížení hladiny sérového RBP4 (hladiny vitamínu A, přítomnost diabetes mellitus 2. typu, nižší BMI). Pokles koncentrace RBP4 v sérech pacientek je zřejmě spojen buď se změnami v metabolismu retinoidů a tvorbou RBP4 v ovariu, nebo je odrazem nespecifických paraneoplastických projevů doprovázejících karcinom ovaria. Statisticky významná změna v koncentraci sérového RBP4 pravděpodobně představuje informaci související s přítomností nádorového onemocnění a RBP4 tak lze považovat za potenciální biomarker karcinomu ovaria. K ověření tohoto vztahu však budou

muset být provedeny další studie na větší skupině žen s karcinomem ovaria a zdravých žen se zohledněním přesného typu nádoru a jeho stadia.

Práce byla publikována v roce 2012 v časopise *Oncology Reports* (**Příloha I, strana 82**):

Lorkova L, Pospisilova J, Lacheta J, Leahomschi S, Zivny J, Cibula D, Zivny J, Petrak J.; Decreased concentrations of retinol-binding protein 4 in sera of epithelial ovarian cancer patients: a potential biomarker identified by proteomics. *Oncology Reports* 2012;27:318.

3.2 Objasnění molekulárního mechanismu rezistence lymfomu z buněk pláštěvé zóny na cytarabin

Chemoterapie je v současné době jedním z nejeftivnějších postupů v léčbě nádorových onemocnění. Nejčastější příčinou komplikací a selhání protinádorové léčby, ať už v případě klasické chemoterapie nebo moderní cílené terapie nebo terapie biologické, je vznik **rezistence**. Některé maligní buněčné populace mohou být vůči terapeutikům rezistentní již v průběhu primární léčby. V takovém případě jde o takzvanou přirozenou rezistenci. Získaná rezistence vzniká až v průběhu léčby, kdy se původně citlivé buňky stávají k dané cytostatické látce rezistentní. Pokud při ztrátě citlivosti k jednomu terapeutiku vzniká současně rezistence na jiná, avšak strukturně příbuzná, protinádorová léčiva, mluvíme o tzv. **křížové rezistenci**.

3.2.1 Lymfom z buněk pláštěvé zóny

Lymfom z buněk pláštěvé zóny (Mantle cell lymphoma, MCL) patří mezi nehodgkinské lymfomy. MCL je vzácným, ale agresivním lymfomem s incidencí v Evropě 0,45 na 100 000 osob (Sant et al., 2010). MCL je biologicky a klinicky heterogenním onemocněním, které vzniká maligní transformací zralých naivních B-buněk v pláštěvé zóně obklopující zárodečné centrum sekundárního lymfoidního folikulu. Charakteristickou cytogenetickou změnou je interchromosomální translokace t(11;14) (q13;q32). Translokací dochází k chybnému spojení genu pro těžké řetězce imunoglobulinů a pod kontrolu transkripce pro těžký řetězec imunoglobulinu se tak dostává gen *CCND1* kódující protein cyklin D1. Důsledkem je nadměrná a nekontrolovatelná exprese cyklinu D1. Cyklin D1 je důležitý regulátor buněčného cyklu, který je zodpovědný za přechod buňky z G1 fáze do S fáze prostřednictvím aktivace cyklin-dependentních kináz 4 a 6 (CDK4 a CDK6) (Jares et al., 2012).

Základem léčby nehodgkinského lymfomu MCL jsou kombinační terapie, například CHOP (Cyklofosamid, Hydroxydaunorubicin (doxorubicin), Oncovin (vinkristin), Prednison) a cytarabin ve vysokých dávkách, nově doplněné také anti-CD20 protilátkou – Rituximabem (R-CHOP). Odezva na léčbu u MCL pacientů je krátkodobá a i po dosažení kompletní remise dochází dříve nebo později k opětovnému propuknutí nemoci (relapsu). Pro tyto pacienty neexistuje standardní léčebný režim a jejich další léčba spočívá v podávání několika cyklů vysokodávkované terapie kombinací účinných látek, kterými jsou fludarabin (purinový nukleosidový analog), gemcitabin (pyrimidinový nukleosidový analog),

bendamustin (alkylační činidlo), cisplatina (distorze řetězce DNA), bortezomib (inhibitor proteazomu) nebo temsirolimus (inhibitor mTOR). Prognóza pacientů s chemorezistentní a postupující MCL je velmi nepříznivá.

MCL je nevléčitelným nádorovým onemocněním s průměrnou dobou přežití 5-7 let (Pérez-Galán et al., 2011). **Za selhání léčby MCL je zodpovědný především vývoj rezistence k protinádorovým molekulám, proto jsme se zaměřili na objasnění molekulárního mechanismu rezistence na klinicky používanou terapii (cytarabin) v buňkách MCL.**

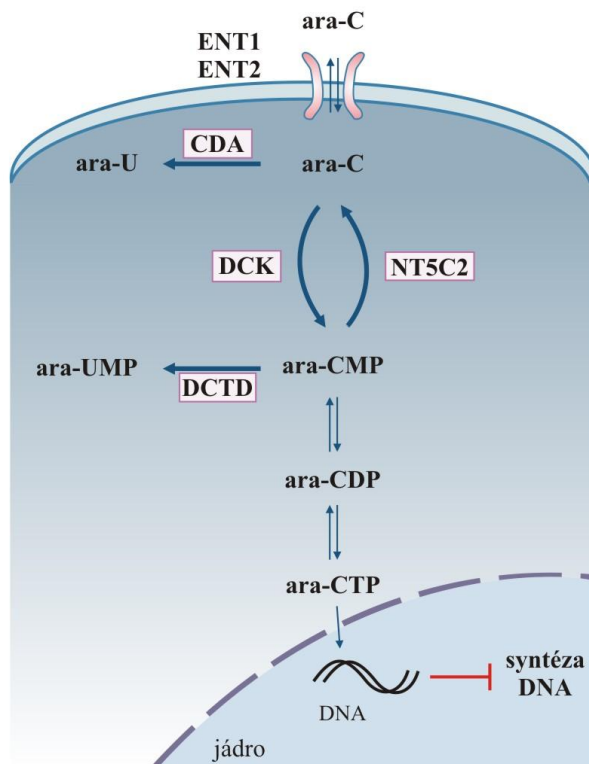
3.2.2 Cytarabin a rezistence

Cytarabin (cytosin arabinosid, ara-C) je nukleosidový antimetabolit se silným terapeutickým účinkem především u malignit bílých krvinek, jako jsou například akutní myeloidní leukémie (AML) a nehodgkinské lymfomy, včetně studovaného onemocnění MCL (Kantarjian et al., 1983, Capizzi, 1996). Zavedení vysokých dávek cytarabinu do protinádorové terapie MCL vedlo k rychlejší odezvě na léčbu a prodloužení doby přežití pacientů (Delarue et al., 2013, Lefrere et al., 2002, Merli et al., 2012).

Cytarabin je strukturním analogem deoxycytidinu, jež je do buňky transportován přes přenašeče ENT1 a ENT2 (Ward, 2000, Cai et al., 2008, Molina-Arcas et al., 2009). Po vstupu do buňky je cytarabin metabolizován prostřednictvím dráhy, která slouží k syntéze nukleotidů. Fosforylací cytarabinu klíčovým enzymem **deoxycytidin kinázou** (DCK) dochází k jeho aktivaci za vzniku cytarabinmonofosfátu (ara-CMP) (Obrázek 11). První fosforylace cytarabinu enzymem DCK je limitujícím krokem dráhy nukleosidového analogu. Aktivovaná molekula je sledem reakcí fosforylována na cytarabintrifosfát (ara-CTP) dalšími dvěma kinázami. Pak ara-CTP vstupuje do jádra a inkorporuje se do nově syntetizované DNA, čímž dochází k zastavení replikace DNA. Akumulace molekulárních senzorů na DNA v místě zastavení replikace vede k vyvolání buněčné odpovědi, kterou je aktivace kontrolních bodů v buněčném cyklu využívajících signálních mechanismů buď k pozastavení buněčného cyklu a opravy DNA nebo ke spuštění apoptózy.

Antagonistickou funkci k DCK má enzym 5'-nukleotidáza (NT5C2), který defosforyluje ara-CMP zpět na cytarabin. Na metabolismu (inaktivaci) cytarabinu se může podílet cytidin deamináza (CDA), která konvertuje cytarabin na neaktivní ara-U

(uridin arabinosid). Ara-CMP může být také konvertován deoxycytidylát deaminázou (DCTD) na ara-UMP (Hubeek et al., 2005, Cai et al., 2008, Lamba, 2009, Tang et al., 2012).



Obrázek 11: Schéma mechanismu působení cytarabinu v nádorové buňce. Cytarabin (ara-C) vstupuje do buňky přes přenašeče ENT1 nebo ENT2 (Equilibrative nucleoside transporter). Po vstupu do buňky dochází k aktivaci cytarabinu fosforylací deoxycytidin kinázou (DCK) za vzniku cytarabinmonofosfátu (ara-CMP). Aktivovaný cytarabin je sledem reakcí dále fosforylován dvěma kinázami za vzniku cytarabintrifosfátu (ara-CTP). Tato molekula vstupuje do jádra a dochází k inkorporaci do DNA, k zastavení replikace a spuštění drah vedoucích k apoptóze. Cytarabin může být inaktivován cytidin deaminázou na ara-U. K deaktivaci ara-CMP rovněž dochází aktivitou 5'-nukleotidázy (NT5C2) a deoxycytidylát deaminázy (DCTD).

Vývoj rezistence v průběhu podávání cytarabinu pacientům s MCL onemocněním v léčebném režimu první linie je bohužel častý, rezistence je následně zodpovědná za progresi a/nebo za relaps nemoci. V takovém případě je prognóza MCL pacientů velmi nepříznivá. V současné době neexistuje žádný doporučený léčebný režim druhé linie pro pacienty s MCL s rezistencí na terapii. K následné (*salvage*) terapii je k dispozici například cisplatina, fludarabin, kladribin, gemcitabin, temsirolimus, bortezomib, bendamustin, lenalidomid a ibrutinib (Johnson, 2004, Goy et al., 2005, Witzig et al., 2005, Morschhauser et al., 2007, Robak et al., 2007, Ansell et al., 2011, Vose, 2012, Goy et al., 2013, Visco et al., 2013, Wang et al., 2013). Terapie je však zpravidla neúspěšná.

Obecným mechanismem rezistence na nukleosidové antimetabolity může být změna exprese některých genů, jejichž produkty se podílejí na vstupu těchto analogů do buňky a jejich následné aktivaci fosforylací. Rezistence může být i výsledkem změn exprese genů detoxifikujících protinádorovou molekulu, dále signálních drah vedoucích ke zvýšené buněčné proliferaci, kompenzačních mechanismů a genů účastnících se apoptózy (Fodale et al., 2011, Rebutti et al., 2013).

Mechanismy rezistence na cytarabin jsou dosud nedostatečně popsány a většina informací pochází z leukemických buněk. Byly popsány změny exprese genů nukleotidových transportérů, deoxycytidin kinázy, 5'-nukleotidázy, cytidin deaminázy, ribonukleotid reduktázy, DNA polymerázy, *TP53* a genů, jejichž produkty potlačují apoptózu (geny kódující proteiny Bcl-2, Bcl-X a podobně) (Galmarini et al., 2008). Mechanismus rezistence na cytarabin v lymfomových buňkách včetně MCL však dosud nebyl podrobně studován. Vývoj rezistence u pacientů s MCL na cytarabin je častou komplikací primární léčby a stále není jasně stanovena standardní či doporučená terapie pacientů s MCL rezistentní na cytarabin. **Cílem této práce proto bylo popsat molekulární mechanismus rezistence na cytarabin a testovat citlivost cytarabin-rezistentních buněčných linií MCL na ostatní protinádorové molekuly a odhalit případnou křížovou rezistenci.**

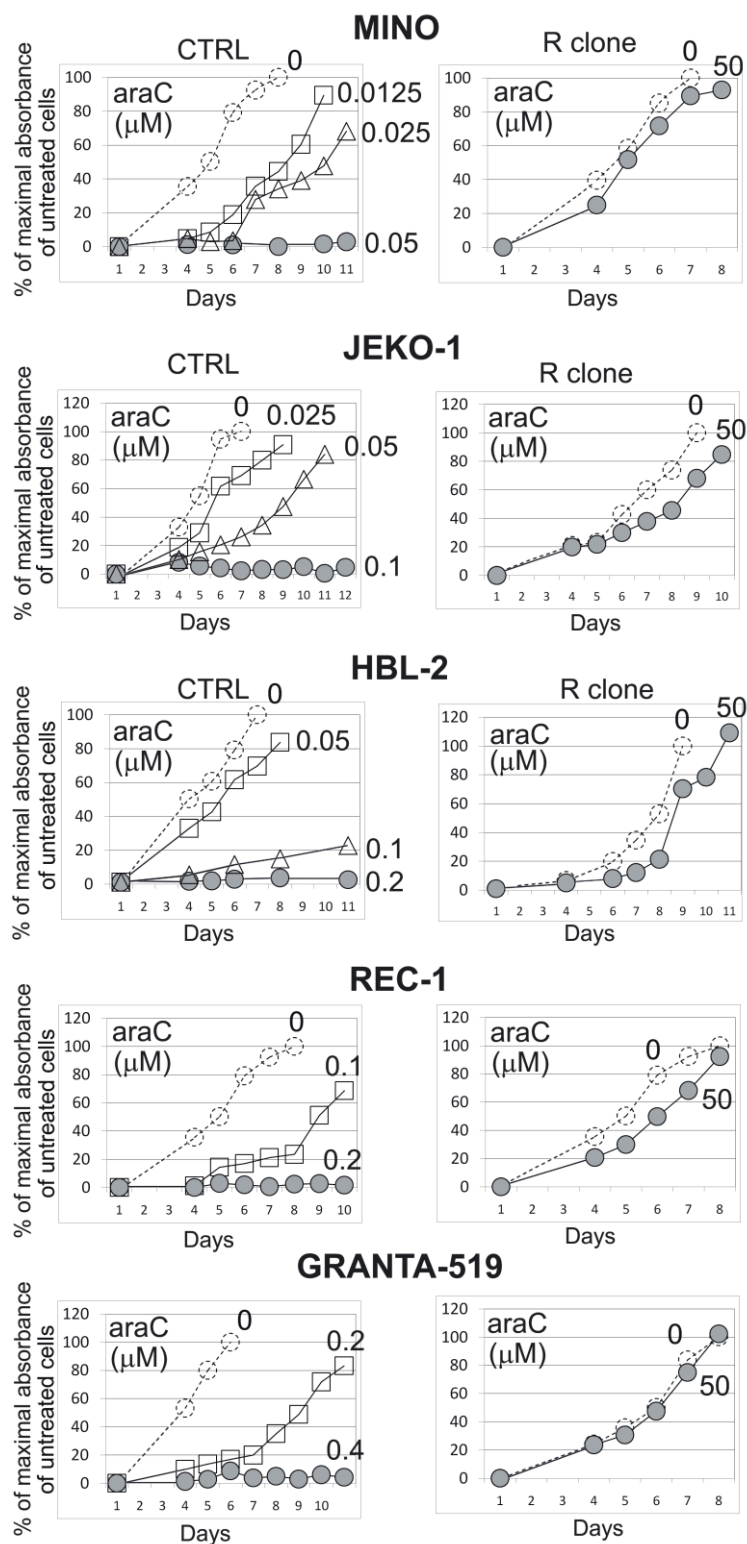
3.2.3 Odvození buněk MCL rezistentních na cytarabin

Ke studiu rezistence k cytarabinu v MCL byly zvoleny buněčné linie JEKO-1, MINO, REC-1, HBL-2, GRANTA-519 odvozené z MCL, které jsou senzitivní na nukleosidový analog cytarabin. Nicméně při dlouhodobé expozici subletálními dávkami cytarabinu mohou buňky na cytarabin vyvinout rezistenci a dochází k vyselektování rezistentní subpopulace nebo subklonu. Pět buněčných linií MCL bylo vystaveno postupně se zvyšujícími koncentracemi cytarabinu (až do 50 μM) v kultivačním médiu (DeAngelis et al., 1992). Po pěti týdnech jsme získali subklony MCL rezistentní na cytarabin (JEKO-1/R, MINO/R, REC-1/R, HBL-2/R, GRANTA-519/R), které v porovnání se senzitivními buňkami MCL vykazovaly toleranci ke 125-1000x vyšší koncentraci cytarabinu (Obrázek 12). Po získání těchto rezistentních subklonů jsme provedli expresní profilování mRNA a proteomickou analýzu.

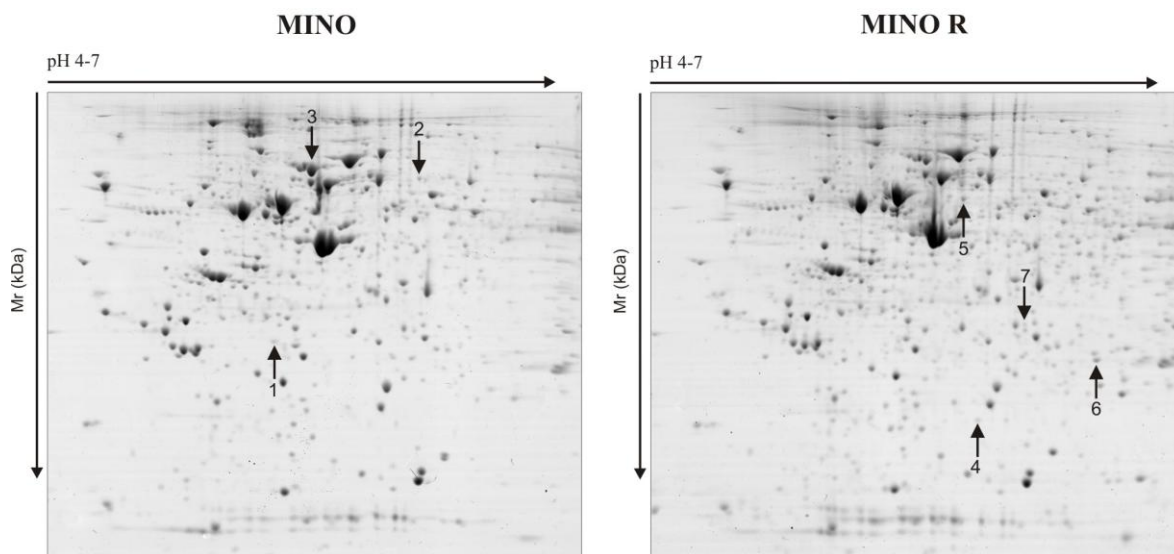
3.2.4 Analýza buněk MCL rezistentních na cytarabin

Buněčné lyzáty linie MINO a MINO/R byly nejprve zaostřeny pomocí IPG-IEF a poté v druhém rozměru rozděleny na polyakrylamidovém gelu obsahujícím SDS (Obrázek 13). Po rozdělení proteinů byly skvrny vizualizovány barvivem Coomassie Blue G-250 a skvrny byly dále podrobeny obrazové analýze k nalezení rozdílů v jejich optické denzitě. Proteiny ve vybraných skvrnách, jejichž exprese byla mezi senzitivními a rezistentními buňkami významně změněna, byly po vystavení štěpení trypsinem v gelu identifikovány hmotnostní spektrometrií (MALDI-MS/MS) (Tabulka 2). 2-D elektroforézou jsme odhalili významně sníženou expresi enzymu **deoxycytidin kinázy (DCK)** v buňkách MINO rezistentních na cytarabin (4,6x snížená exprese).

Paralelně s proteomickou analýzou byla provedena expresní analýza mRNA jednotlivých buněčných liniích MCL senzitivních a rezistentních na cytarabin. Napříč analyzovanými mRNA všech pěti buněčných liniích MCL byla nalezena pouze jedna společná změna a to snížená exprese genu pro deoxycytidin kinázu (*DCK*).



Obrázek 12: Křivky přežití buněčných populací MINO, HBL-2, REC-1, GRANTA-519 v přítomnosti protinádorové molekuly cytarabinu. Buňky MCL senzitivní a rezistentní na cytarabin byly vystaveny působení cytarabinu v kultivačním mediu (plná čára). Jako kontrola byly buňky MCL senzitivní a rezistentní na cytarabin kultivovány bez přítomnosti cytarabinu (přerušovaná čára).



Obrázek 13: Dvozměrná elektroforéza proteinů z buněk MINO (senzitivní) a MINO/R (rezistentní) na cytarabin. Po vizualizaci skvrn Coomassie Blue G-250 byla stanovena jejich optická denzita. Porovnáním optických denzit jednotlivých skvrn mezi gely MINO a MINO/R byly detekovány skvrny 1-7 se změnou optickou denzitou, jež byly identifikovány hmotnostní spektrometrií (Tabulka 2).

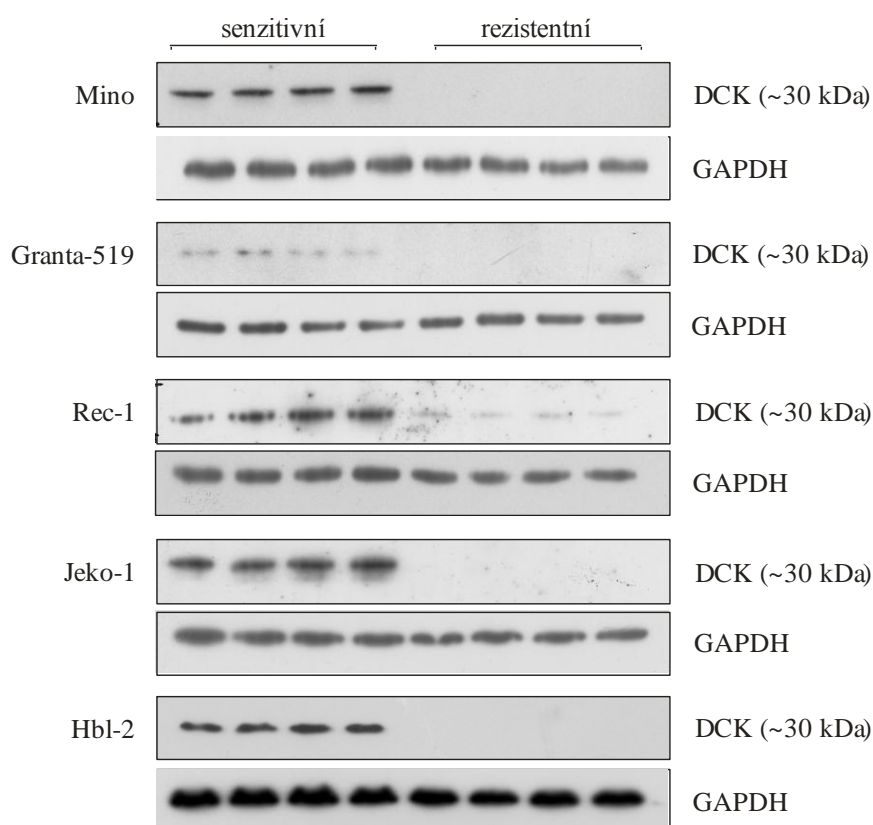
Číslo skvrny	Swiss-Prot číslo	Název proteinu	Změna exprese proteinu	Mascot skóre	Sekvenční pokrytí (%)	Mr
Proteiny se sníženou expresí v MINO						
1	P27707	Deoxycytidine kinase	4.6	44*	16	30841
2	Q99829	Copine-1	4.7	102	17	59649
3	P13796	Plastin-2	2	453	65	70814
Proteiny se zvýšenou expresí MINO R						
4	P07741	Adenine phosphoribosyltransferase	41.5	70	40	19766
5	P68363	Tubulin alpha-1B chain	5	169	32	50804
6	P04792	Heat shock protein beta-1	2.3	73	32	22826
7	P31937	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	2.1	4*		35712

*MS/MS potvrzení identifikace

Číslo skvrny	Swiss-Prot číslo	Název proteinu	sekvence peptidu	Skóre
1	P27707	Deoxycytidine kinase	LKDAEKPVLFER, QLCEDWEVPEPVAR	41, 46
7	P31937	3-Hydroxyisobutyrate Dehydrogenase, mitochondrial	DFSSVFQFLREEETF SPILGSLAHQIYR	49, 28

Tabulka 2: Identifikace diferenciálně exprimovaných proteinů v buňkách MINO/R hmotnostní spektrometrií (minimální změna 1,5x se statistickou významností $p < 0,05$).

Deoxycytidin kináza je klíčovým enzymem v aktivaci cytarabinu po jeho vstupu do nádorové buňky. V následujících reakcích je ara-CMP fosforylován na ara-CTP, který inkorporací do syntetizované DNA zastavuje replikaci a indukuje apoptózu. K ověření snížené exprese DCK byla použita technika western blot. Potvrdili jsme zásadní snížení exprese DCK ve všech pěti studovaných rezistentních subklonech. Ve třech z těchto pěti subklonů (JEKO-1/R, HBL-2/R, GRANTA-519/R) poklesla exprese DCK pod detekční limit (Obrázek 14).



Obrázek 14: Ověření snížené exprese deoxycytidin kinázy (DCK) v jednotlivých buněčných liniích MCL metodou western blot.

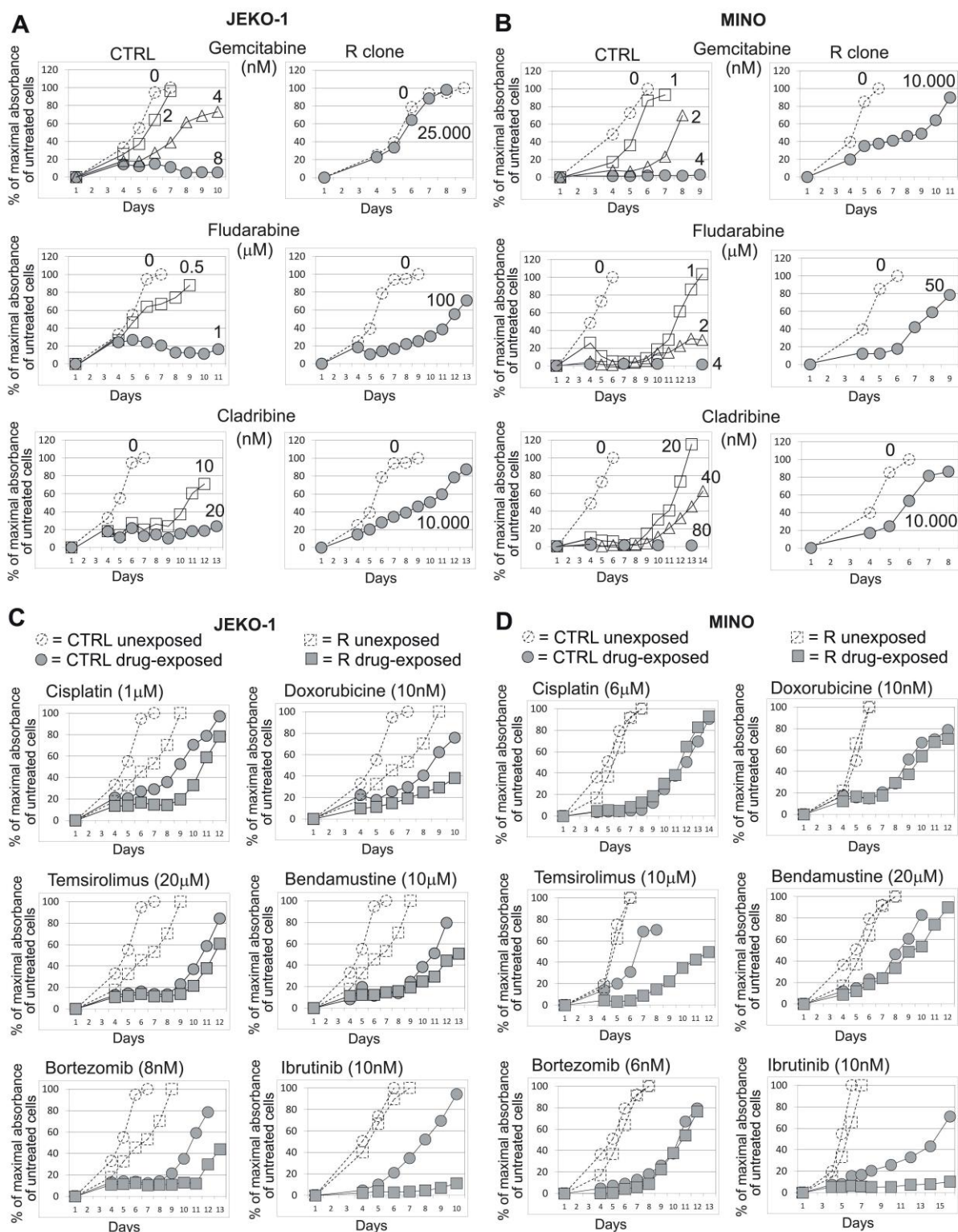
Expresa DCK v primárních patientských buňkách

Snížená exprese DCK na úrovni mRNA a proteinu byla rovněž ověřena na primárních buňkách MCL (CD19 pozitivní populace izolovaná z mononukleárních buněk z krve) získaných z 8 pacientů v době zahájení terapie a 8 pacientů, u kterých došlo k progresi a relapsu onemocnění po léčbě cytarabinem. U pěti pacientů, u kterých došlo po terapii k relapsu či progresi, jsme pozorovali sníženou expresi DCK. U jednoho z nich bylo snížení patrné jen na úrovni proteinu.

3.2.5 Stanovení *in vivo* a *in vitro* senzitivity cytarabin-rezistentních subklonů k jiným terapeutickým molekulám

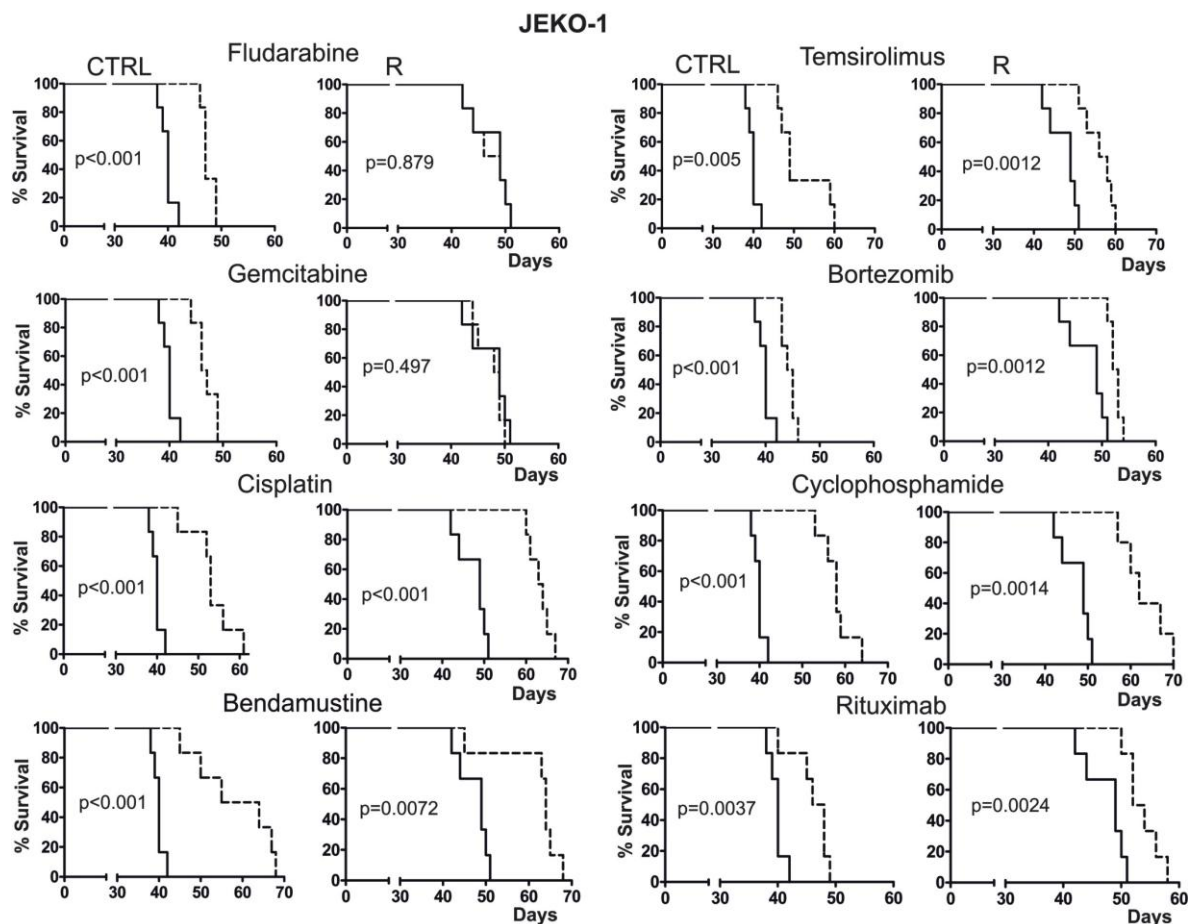
Ke zvolení optimální strategie léčby MCL rezistentních na cytarabin byla stanovena senzitivita všech pěti cytarabin-rezistentních subklonů na jiné dostupné látky s protinádorovým účinkem. Rezistentní buňky byly *in vitro* vystaveny různým koncentracím protinádorových molekul s různým mechanismem účinku - cisplatinu (distorze DNA), doxorubicinu (interkalace do DNA) a bendamustin (alkylace guaninů v DNA), nukleosidových analogů gemcitabinu, kladribinu a fludarabinu a dále bortezomibu (inhibitor proteazomu), temsirolimu (inhibitor mTOR) a ibrutinibu (inhibitor Brutonovy tyrosin kinázy).

Ukázalo se, že subklony rezistentní na cytarabin jsou kromě cytrabinu rezistentní také na pyrimidinový nukleosidový antimetabolit gemcitabin (Obrázek 15) a zároveň na purinové analogy fludarabin a kladribin (Obrázek 15). Tuto křížovou rezistenci, jak k purinovým tak k pyrimidinovým antimetabolitům, lze vysvětlit právě sníženou expresí DCK. Tato kináza je promiskuitní - jejími substráty jsou nejen pyrimidinové nukleosidy a jejich analogy, ale i purinové nukleosidy (Staub a Eriksson, 2007). Citlivost na ostatní terapeutické molekuly u cytarabin-rezistentních subklonů byla zachována (Obrázek 15), což naznačuje, že rezistence není způsobena „downstream“ procesy, například vyhýbáním se apoptóze. Naše výsledky jasně naznačují, že pacienti s cytarabin-rezistentním MCL by neměli být léčeni purinovými ani pyrimidinovými analogy nukleotidů, ale k jejich terapii by měly být využity jiné typy protinádorových látek.



Obrázek 15: Křivky přežívání buněčných populací MINO a JEKO-1 senzitivních a rezistentních na cytarabin v přítomnosti gemcitabinu, fludarabinu, kladribinu, cisplatinu doxorubicinu, temsirolimu, bendamustinu, bortezomibu, ibrutinibu (plná čára). Jako kontrola, byly buňky MINO a JEKO-1 senzitivní a rezistentní na cytarabin kultivovány v mediu bez přítomnosti protinádorových molekul (přerušovaná čára).

In vitro testy buněčné toxicity umožňují snadné zjištění přímých účinků některých protinádorových látek. *In vitro* testování však opomíjí farmakokinetické a farmakodynamické proměnné, jež mohou hrát důležitou roli v účinnosti léku *in vivo*. Kromě toho, některá léčiva není možné tímto způsobem testovat, neboť jejich protinádorový účinek je závislý právě na kontextu *in vivo*. Tak například k aktivaci cyklofosfamidu dochází v jaterních mikrosomech, k správné funkci rituximabu je nutná přítomnost komplementu a buněk imunitního systému a pro aktivaci temsirolismu jsou potřebné antiangiogenní komponenty. Proto jsme k *in vivo* testování toxicity některých protinádorových molekul použili model xenotransplantace lidských nádorových buněk do imunodeficientních myší. Buňky JEKO-1 a JEKO-1/R byly intravenózně aplikovány do myší s absencí B a T buněk, komplementů, NK buněk a deficiencí makrofágů a dendritických buněk (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ myší model) (www.jax.org/jaxmice). Zvířata s takto vzniklými modelovými MCL lymfomy v lymfatických uzlinách, v játrech a v dalších orgánech byla léčena podáváním protinádorových molekul s různým mechanismem účinku (temsirolismus, bendamustin, bortezomib, gemcitabin, cyklofosfamid, cisplatina, fludarabin, rituximab). Potvrdili jsme, že xenotransplantované cytarabin-rezistentní nádory z buněk MCL byly na terapii purinovým analogem fludarabinem a pyrimidinovým analogem gemcitabinem rezistentní (Obrázek 16). Křížová rezistence k těmto nukleosidovým analogům, původně zjištěná *in vitro* testováním (způsobená sníženou expresí enzymu deoxycytidin kinázy), tak byla potvrzena *in vivo*. Senzitivita cytarabin-rezistentních transplantovaných buněk JEKO-1 na ostatní terapeutické molekuly - cisplatinu, temsirolimus, bendamustin, bortezomib, cyklofosfamid a rituximab zůstala zachována a byla tak potvrzena validita našich *in vitro* experimentů (Obrázek 16).



Obrázek 16: Křivky přežití imunodeficientních myši s xenografem JEKO-1 senzitivní a rezistentní na cytarabin po podání fludarabinu, gemcitabinu, cisplatinu, bendamustinu, tensirolimu, bortezomibu, cyklofosfamidu, rituximabu (přerušovaná čára). Jako kontrola byly imunodeficientní myši s xenografem JEKO-1 senzitivní a rezistentní bez aplikace terapeutických léčiv (plná čára).

3.2.6 Diskuze

V této práci jsme usilovali o popis molekulárních mechanismů zodpovědných za vývoj rezistence buněk MCL na cytarabin. Transkriptomickou a proteomickou analýzou buněčných liniích MCL rezistentních na cytarabin jsme našli významně **sníženou expresi deoxycytidin kinázy (DCK)** jak na úrovni mRNA tak proteinu. Snížení exprese DCK jsme potvrdili i na primárních patientských buňkách MCL.

Enzym DCK katalyzuje první fosforylaci nukleosidů a jejich analogů vedoucí k jejich aktivaci. Nukleosidmonofosfáty jsou dalšími dvěma kinázami fosforylovány a následně inkorporovány do DNA. Charakteristickou vlastností DCK je nízká substrátová specifita, díky které může fosforylovat nukleosidy jak s pyrimidinovými tak i s purinovými bázemi (Staub a Eriksson, 2007). Snížená exprese DCK ve studovaných buněčných modelech MCL

je pravděpodobně molekulárním mechanismem vzniku rezistence. Křížovou rezistenci k jiným purinovým (gemcitabin) a pyrimidinovým (fludarabin, cladribin) terapeutickým molekulám, kterou jsme pozorovali jak v *in vivo* tak v *in vitro* experimentech, je snadno vysvětlitelná sníženou expresí promiskuitní DCK (Galmarini et al., 2001, Ewald et al., 2008). Jiné významné sekundární změny na úrovni mRNA a proteinů v buněčných liniích MCL rezistentních na cytarabin jsme nepozorovali.

Častou příčinou selhání protinádorové léčby, relapsu a progresu MCL nemoci je vznik rezistence nádorových buněk k terapii. Přizpůsobení se nádorových buněk účinkům terapeutických molekul vede ke změně různých buněčných procesů. Popis těchto změn je nutným předpokladem ke vhodné volbě následné léčebné strategie.

Ze snížené exprese DCK a rovněž z *in vivo* a *in vitro* testování toxicity různých protinádorových molekul v buněčných liniích MCL rezistentních na cytarabin lze odvodit, že snížená exprese DCK je pravděpodobně příčinou rezistence MCL na cytarabin. Z toho vyplývá, že k léčbě pacientů s MCL rezistentní na cytarabin není vhodné používat nukleosidové analogy aktivované DCK. Pacientům s MCL onemocněním, kteří již ztratili senzitivitu vůči terapii cytarabinem, by měly být podávány jiné typy protinádorových látek, např. genotoxická cisplatina, alkylační činidla nebo cílené látky jako jsou temsirolimus, bortezomib nebo rituximab.

Práce byla publikována v roce 2014 v časopise *Molecular Cancer* (Příloha II, strana 90):

Klanova M, Lorkova L, Vit O, Maswabi B, Molinsky J, Pospisilova J, Mavis C, Lateckova L, Kulvait V, Vejmelkova D, Jaksá R, Hernandez F, Trneny M, Vokurka M, Petrak J, Klener P Jr.; Downregulation of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant mantle cell lymphoma cells confers cross-resistance to nucleoside analogs gemcitabine, fludarabine and cladribine, but not to other classes of anti-lymphoma agents. *Molecular Cancer* 2014;13:159.

3.3 Hledání nových zásahových míst - identifikace molekulárních změn v buňkách lymfomu z buněk plášťové zóny (MCL) rezistentních na molekulu TRAIL

Jak již bylo uvedeno v předchozí části, MCL je vzácný, nehodgkinský lymfom, který vzniká transformací zralých naivních B-buněk v plášťové zóně obklopující zárodečné centrum sekundárního lymfoidního folikulu. Účinnost léčby MCL je však bohužel velmi nízká. Proto se hledají nové protinádorové molekuly, které by vedly k úspěšné eliminaci lymfomových buněk. Ačkoliv mají klasická cytostatika v protinádorové léčbě své pevné místo, směr současného výzkumu se ubírá k **terapii cílené nebo biologické**. Od klasické chemoterapie se cílená odlišuje tím, že usiluje o eliminaci nádorových buněk při omezení toxicity vůči buňkám ostatních nenádorových tkání. Biologická terapie se snaží využívat biologických procesů a molekul, například terapeutických protilátek, cytokinů a pro-apoptotických molekul. Jedním z nadějných (dosud experimentálních) biologických látek s protinádorovým účinkem je i TRAIL.

3.3.1 TRAIL

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) je proapoptotický cytokin se silným protinádorovým účinkem a předpokládaným terapeutickým potenciálem k léčbě různých typů malignit včetně MCL. TRAIL je transmembránový protein II. typu patřící do rodiny proteinů TNF (tumor necrosis factor), který je exprimován buňkami imunitního systému a to včetně buněk NK (Natural killer cells), cytotoxickými T-lymfocyty, makrofágy, monocyty a dendritickými buňkami (Wiley et al., 1995, Pitti et al., 1996). Tato molekula je pravděpodobně součástí imunitního dohledu (tumor immune-surveillance), který slouží k eliminaci transformovaných buněk předtím, než jsou schopny uniknout imunitnímu systému a vytvořit nádorovou masu. Přesná fyziologická funkce TRAILu v imunitním systému není dosud objasněna.

Molekula TRAILu vazbou na receptor na povrchu cílových buněk umožňuje spouštět apoptózu přes tzv. „death“ doménu receptoru (Ashkenazi a Dixit, 1998). Pro TRAIL existují čtyři odlišné receptory nacházejících se na povrchu buněk (DR4, DR5, DcR1, DcR2). Receptory DR4 a DR5 se vyznačují intracelulární „death“ doménou potřebnou ke spuštění apoptotického signálu. Interakcí TRAILu s DR4 a DR5 dochází k trimerizaci receptoru a k vazbě s adaptorovými molekulami (FADD) za vzniku DISC komplexu. Adaptorové molekuly obsahují efektorovou „death“ doménu, pomocí které na sebe vážou iniciační

prokaspázy. Ty se na úrovni DISCu štěpením aktivují, aby mohly dále aktivovat efektorové prokaspázy, jež spouštějí samotnou apoptózu (Peter a Krammer, 2003). DcR1 a DcR2 – takzvané „decoy“ receptory, nemají „death“ doménu, a proto nejsou schopny indukovat apoptotický signál, ale naopak zřejmě inhibují nebo zeslabují signál vedoucí k apoptóze kompeticí o TRAIL s receptory DR4 a DR5. Kromě toho „decoy“ receptory mohou přímo interagovat s receptory DR4 a DR5 a ovlivňovat jejich aktivitu (Lee et al., 2005).

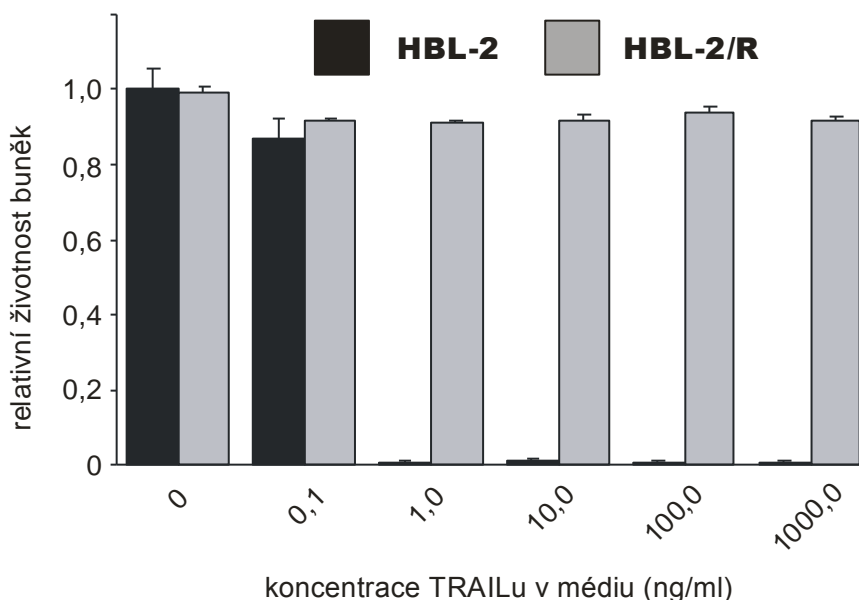
Rekombinantní TRAIL (solubilní část molekuly) si uchovává svojí biologickou proapoptotickou aktivitu. Na různé typy nádorových buněk, včetně leukémických a lymfomových, působí rekombinantní TRAIL cytostaticky a cytotoxicky *in vitro* (Wen et al., 2000, Plasilova et al., 2002, Klener et al., 2009, Petrak et al., 2009, Castro Alves et al., 2012, Molinsky et al., 2013, Leahomschi et al., 2013). V několika studiích bylo prokázáno, že podáváním rekombinantního TRAILu imunodeficientním myším s transplantovanými lidskými nádory dochází k zastavení růstu nádorů nebo dokonce k jejich zmenšení (Castro Alves et al., 2012). Proto byl TRAIL a protilátky cílené na jeho receptory zařazeny do několika klinických studií a je považován za molekulu se značným terapeutickým potenciálem (Wiley et al., 1995, Pitti et al., 1996, Castro Alves et al., 2012).

Komplikací léčby nádorových onemocnění je vývoj rezistence vůči protinádorovým molekulám, která je zodpovědná za progresi a relaps onemocnění. Stejně tak jako u jiných molekul s protinádorovým účinkem není TRAIL výjimkou a jeho terapeutický potenciál může být omezen vyvinutou rezistencí. Přizpůsobení nádorových buněk na protinádorová léčiva je spojeno s (více či méně) rozsáhlými změnami ve fenotypu buněk. Ačkoliv některé sekundární molekulární změny v rezistentních nádorových buňkách přímo nesouvisí s mechanismem rezistence, mohou být potenciálním terapeutickým cílem pro specifickou likvidaci rezistentní buněčné populace.

Cílem této práce bylo popsat a pochopit změny v expresi proteinů, ke kterým dochází v souvislosti se vznikem a rozvojem rezistentních nádorových buněk na proapoptotickou molekulu TRAIL. Nehledali jsme mechanismus rezistence (tím je zpravidla snížení exprese TRAIL receptorů (Maksimovic-Ivanic et al., 2012)), ale další změny, ke kterým v buňkách v souvislosti s rezistencí dochází. Identifikace takových specifických změn by mohla odhalit vhodná zásahová místa (druggable targets) pro selektivní likvidaci takových rezistentních buněk.

3.3.2 Odvození buněk MCL rezistentních na TRAIL

Pro proteomickou analýzu byla zvolena buněčná linie HBL-2 odvozená z MCL, která je senzitivní na účinky rekombinantního TRAILu (IC_{50} 1 ng/ml po 48 hodinách). Dlouhodobým vystavováním těchto buněk subletálními dávkami TRAILu je možné získat rezistentní subpopulaci či subklon. Buňky HBL-2 byly vystaveny selektivnímu tlaku zvyšujícími se koncentracemi TRAILu v kultivačním médiu po dobu pěti týdnů. Výsledný TRAIL-rezistentní HBL-2/R subklon proliferoval i při koncentraci TRAILu 1 000 ng/ml v kultivačním médiu (Obrázek 17). Odvozený subklon HBL-2/R byl společně s HBL-2 buňkami podroben analýze TRAIL receptorů a následně expresní proteomické analýze.

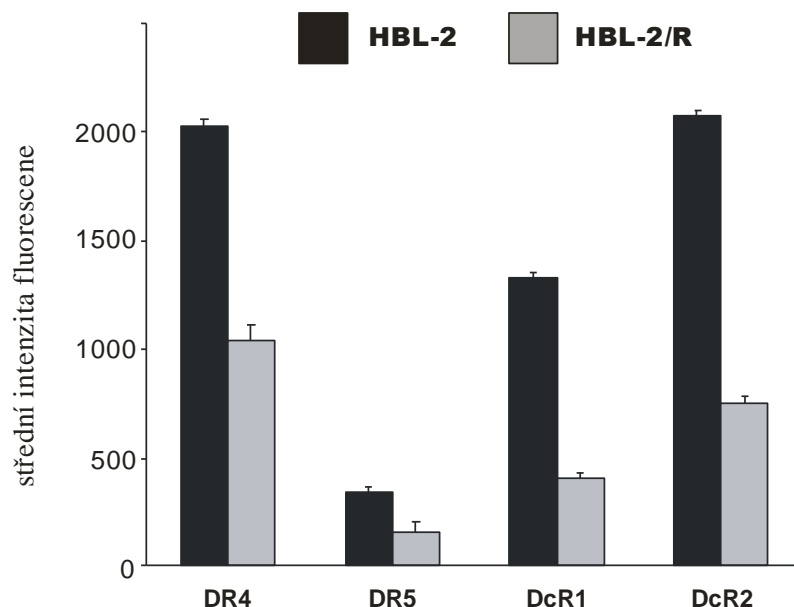


Obrázek 17: Relativní cytotoxicita TRAILu. Přežívání buněk HBL-2 a HBL-2/R po 78 hodinách v médiu v přítomnosti TRAILu analyzované WTS-kolorimetrickým měřením.

3.3.3 Analýza TRAIL receptorů průtokovou cytometrií

Změny v expresi TRAIL receptorů DR4 a DR5 jsou jednou ze známých příčin snížení citlivosti nádorových buněk k účinkům TRAILu (Maksimovic-Ivanic et al., 2012). Průtokovou cytometrií jsme stanovili relativní úroveň exprese TRAIL receptorů DR4, DR5, DcR1 a DcR2 na povrchu TRAIL-rezistentních HBL-2/R buněk a HBL-2 buněk. Exprese receptorů DR4, DR5, DcR1 a DcR2 na povrchu buněk HBL-2/R byly výrazně nižší v porovnání s jejich expresí na povrchu HBL-2 buněk (Obrázek 18). Snížená exprese DR4 a DR5 vysvětluje rezistenci HBL-2/R na TRAIL. Další dva „decoy“ receptory DcR1 a DcR2

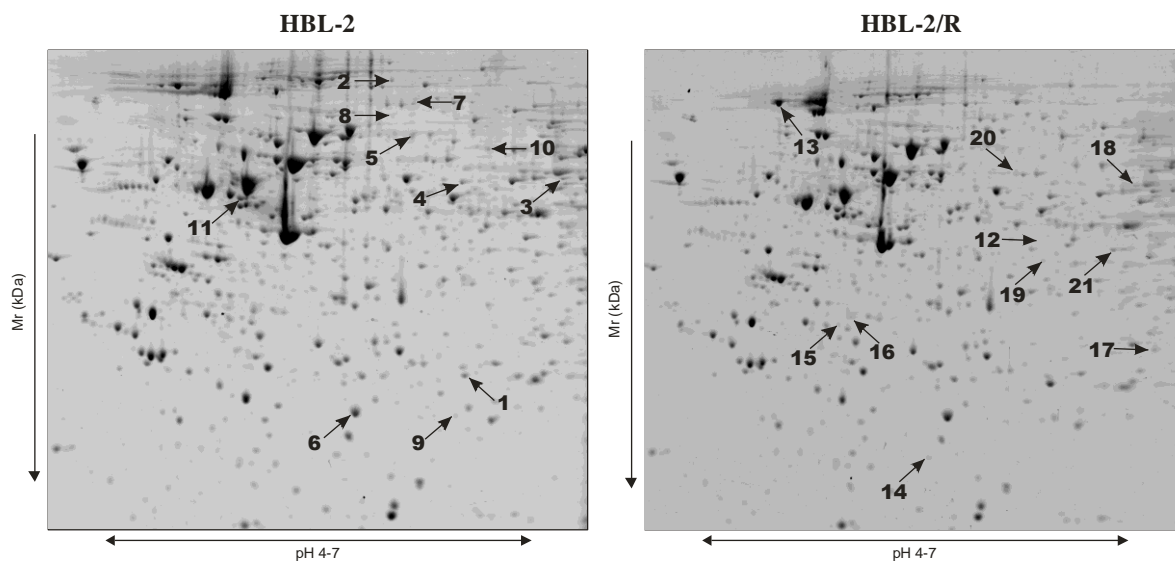
se sníženou expresí pravděpodobně vyvolávají další komplexnější změny v HBL-2/R buňkách.



Obrázek 18: Analýza exprese TRAIL receptorů na povrchu buněk HBL-2 a HBL-2/R průtokovou cytometrií. Buňky byly značeny protilátkami (konjugovanými s fykoerytinem) proti povrchovým TRAIL receptorům DR4, DR5, DcR1, DcR2. Exprese studovaných receptorů byla u HBL-2/R buněk oproti HBL-2 buňkám snižena. Jako slepý vzorek byly použity buňky bez značení a izotypové kontroly.

3.3.4 Proteomická analýza MCL buněk rezistentních na TRAIL

K popisu změny exprese proteinů, ke kterým dochází v TRAIL-rezistentních HBL-2/R buňkách, byla zvolena 2-D elektroforéza ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Lyzáty TRAIL-rezistentních HBL-2/R buněk a HBL-2 buněk byly separovány pomocí 2-D elektroforézy a proteinové skvrny byly vizualizovány koloidní Coomassie Blue G-250 (Obrázek 19). Porovnáním proteinových map senzitivních a rezistentních buněčných lyzátů softwarovou analýzou byly nalezeny proteinové skvrny s významnými změnami v optické densitě. Proteiny ve vybraných skvrnách byly po štěpení trypsinem v gelu identifikovány hmotnostní spektrometrií (MALDI TOF-TOF). Tímto „klasickým“ proteomickým přístupem bylo detekováno 820 proteinových skvrn, z nichž exprese 21 proteinů byla statisticky významně změněna. Tyto proteiny byly identifikovány MALDI-MS (Tabulka 3).

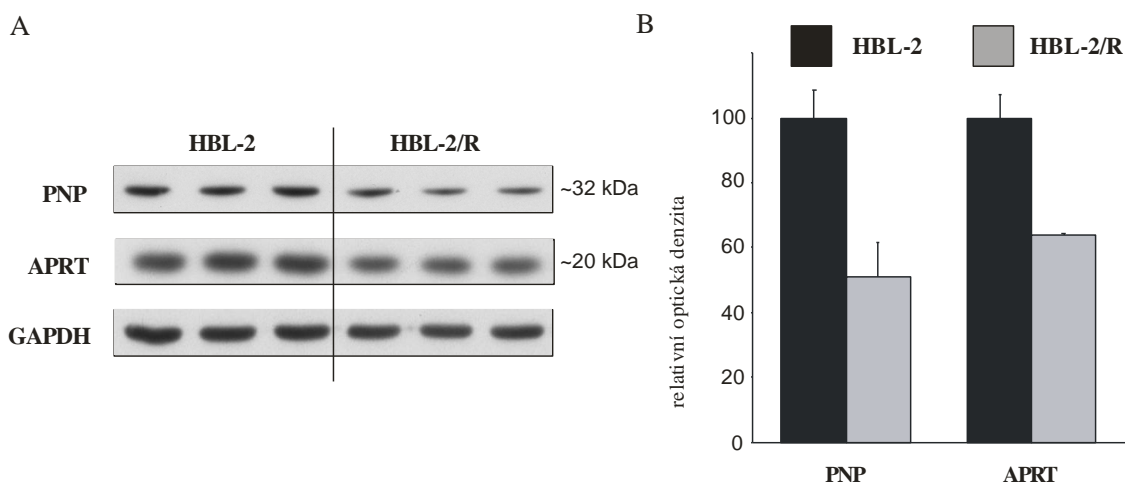


Obrázek 19: Dvojměrná elektroforéza proteinů z buněk HBL-2 a HBL-2/R. Po vizualizaci skvrn Coomassie Blue G-250 byla stanovena jejich optická denzita. Porovnáním optických denzit jednotlivých skvrn mezi gely HBL-2 a HBL-2/R byly detekované skvrny označeny 1-11 se sníženou a skvrny 12-21 se zvýšenou optickou denzitou na HBL-2/R gelu.

Za účelem pochopení biologických funkcí 21 identifikovaných proteinů, které byly odlišně exprimovány v HBL-2/R buňkách, byla provedena analýza drah pomocí databáze KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (www.genome.jp/kegg/). Nápadným výstupem bioinformatické analýzy byla identifikace dráhy metabolismu purinů. Tři z nalezených diferenciólně exprimovaných proteinů (snížená exprese v TRAIL-rezistentních HBL2/R) byly součástí této dráhy. Jednalo se o proteiny: **purin nukleosid fosforyláza (PNP)** (1,6x snížená), **adenin fosforibosyl transferáza (APRT)** (2,2x snížená) a **inosin 5-monofosfát dehydrogenáza 2 (IMPDH2)** (1,6x snížená) (Tabulka 3). K ověření výsledků z proteomické analýzy byla použita metoda western blot (Obrázek 20).

Číslo skvrny	SwissProt číslo	Název proteinu	Změna exprese proteinu	Mascot skóre	Sekvenční pokrytí %	pI	Mr
Proteiny se zvýšenou expresí v HBL-2/R							
1	P04792	Heat shock protein beta-1	3.9	84	51	5.98	22826
2	P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	2.6	100	23	5.81	159003
3	O75351	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	2.6	171	32	6.75	49443
4	P23381	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	2.4	240	54	5.83	53474
5	P20591	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	2.2	176	42	5.60	75872
6	P09211	Glutathione S-transferase P	1.9	110	56	5.43	23569
7	P06396	Gelsolin	1.9	115	22	5.90	86043
8	P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	1.7	262	46	5.55	83222
9	Q9HAV7	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	1.6	99	44	8.24	24492
10	O43776	Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	1.5	250	41	5.90	63758
11	Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	1.5	76	29	4.95	48490
Proteiny se sníženou expresí v HBL-2/R							
12	P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	3.2	111	32	8.35	43952
13	P19338	Nucleolin	2.4	146	29	4.60	76625
14	P07741	Adenine phosphoribosyltransferase	2.2	227	79	5.78	19766
15	O75792	Ribonuclease H2 subunit A	1.7	348	72	5.14	33716
16	Q07955	Serine/arginine-rich splicing factor 1	1.7	82	35	10.37	27842
17	P00491	Purine nucleoside phosphorylase	1.6	182	68	6.45	32325
18	P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	1.6	230	44	6.44	56226
19	P40121	Macrophage-capping protein	1.6	102	41	5.82	38760
20	P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	1.5	234	48	5.70	61296
21	Q15019	Septin-2	1.5	62	26	6.15	41689

Tabulka 3: Diferenciálně exprimované proteiny v buňkách HBL-2/R (minimální změna 1,5x se statistickou významností $p < 0,05$).



Obrázek 20: (A) Relativní exprese PNP a APRT analyzovaná imunochemickou metodou western blotem v buněčných lyzátech HBL-2 a HBL-2/R. Jako kontrola proteinové nanášky byl použit GAPDH. (B) denzitometrické vyhodnocení western blotů PNP a APRT, optická denzita PNP APRT v HBL-2 lyzátech byla stanovena jako 100.

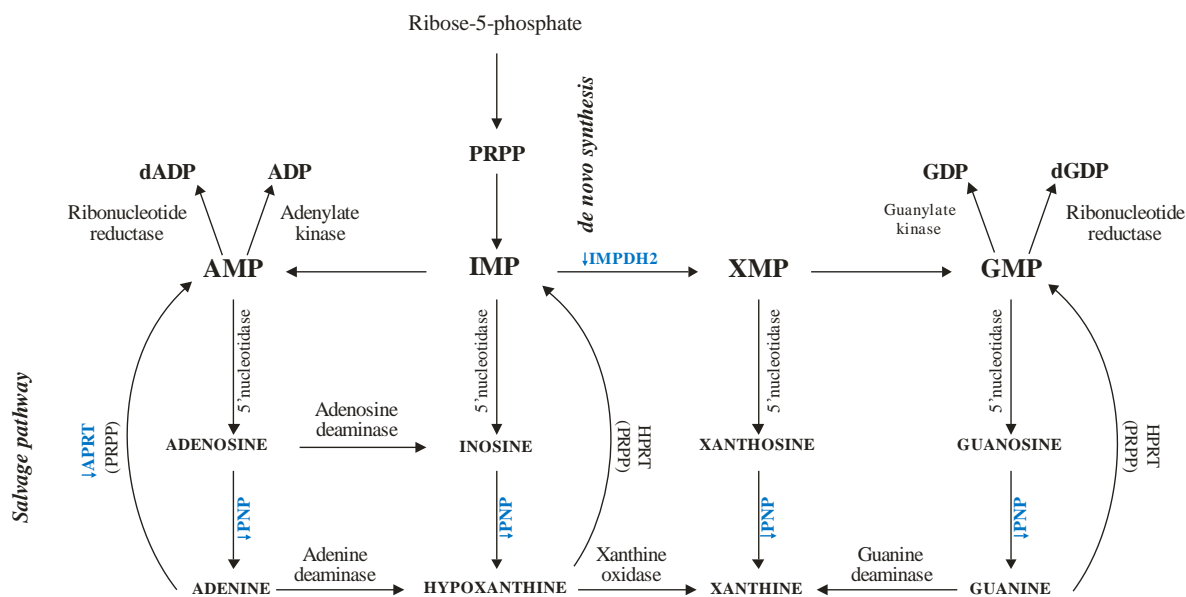
3.3.5 Diskuze

Snížená exprese **PNP**, **APRT** a **IMPDH2** – klíčových enzymů metabolismu purinů v MCL buňkách rezistentních na TRAIL, může silně ovlivňovat homeostázu nukleotidů/nukleosidů v těchto buňkách. Purinové nukleotidy jsou základními stavebními kameny pro syntézu DNA, RNA a kofaktorů. Tvoří se dvěma nezávislými mechanismy a to buď *de novo* syntézou z nízkomolekulárních prekurzorů nebo recyklací volných bází v tzv. *salvage* (záchranné) dráze. Produkty obou drah jsou nukleosid-5'-fosfáty a *de novo* a *salvage* dráhou jsou dodávány pro buněčnou potřebu nezávisle. Míra využití obou metabolických drah je tkáňově specifická a může se odvíjet od závislosti na fyziologických podmínkách. V leukemických a lymfomových buňkách představuje *salvage* dráha hlavní zdroj purinových nukleotidů (Scavennec et al., 1982, Natsumeda et al., 1984).

Nukleotidy s purinovými bázemi jsou získávány přes meziprodukt *de novo* syntézy inosin-5'-monofosfát (IMP), který je tvořen z 5-fosforibosyl-1-pyrofosfátu (PRPP), ATP, glutaminu, glycinu, CO₂, aspartátu a folátu. IMP dává dle požadavků vzniknout guanosin-5'-monofosfátu (GMP) enzymem IMPDH2 (snížená exprese v HBL-2/R buňkách) a adenosin-5'-monofosfátu. K uvolnění volných purinových bází dochází katabolismem purinových nukleotidů za přítomnosti enzymu PNP (snížená exprese v HBL-2/R buňkách). Volné báze využívá *salvage* dráha ke zpětné přeměně bází na nukleosid-5'-monofosfáty enzymem APRT (snížená exprese v HBL-2/R buňkách) nebo hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázou (HPRT) (Obrázek 21). Ribonukleotidy jsou dále přeměňovány na odpovídající deoxyribonukleotidy enzymem ribonukleotid reduktázou.

Změny v enzymové aktivitě a koncentracích meziproduktů a produktů vedou k narušení rovnováhy metabolismu purinů. Hromadění a/nebo úbytek ribonukleotidů, deoxyribonukleotidů nebo jejich meziproduktů v buňce může vést ke spuštění apoptózy. Je známo, že inhibicí enzymu PNP dochází ke hromadění substrátu 2'-deoxyguanosinu, jehož fosforylovaná forma 2'-deoxyguanosin trifosfát (dGTP) zastavuje buněčnou proliferaci a dochází k apoptóze (Bantia et al., 2001, Bantia et al., 1996, Galmarini et al., 2008). Podobně je tomu u buněk s inhibovaným enzymem APRT, jehož nahromaděný substrát adenin je oxidován na nerozpustný 2,8-dihydroxyadenin, který vyvolává buněčnou smrt (Bollée et al., 2012). Zabránit syntéze DNA a buněčnému dělení je možné také nedostatečným množstvím guanosin nukleosidu inhibicí enzymu IMPDH2 (Hedstrom, 1999, Fairbanks et al., 1999).

Proteomickou analýzou byly nalezeny tři klíčové enzymy purinového metabolismu, jejichž snížená exprese v TRAIL-rezistentních HBL-2/R buňkách pravděpodobně narušuje rovnováhu v *de novo* syntéze a *salvage* dráze. Vzhledem k tomu, že TRAIL-rezistentní HBL-2/R buňky i HBL-2 buňky proliferovaly v našich experimentálních podmínkách stejnou rychlostí, nerovnováha v metabolismu purinů rezistentních buněk je zřejmě v našich podmínkách kultivace plně kompenzována. Nerovnováha může představovat selektivní nevýhodu postižených buněk, která však nemusí být za normálních okolností zřejmá. Tato „slabina“ se může projevit až pod vlivem stresových faktorů nebo nepříznivých podmínek. **Narušený purinový metabolismus tak představuje potenciální „slabinu“ buněk MCL rezistentních na TRAIL, kterou je teoreticky možné dalším cíleným zásahem do metabolismu purinů využít k eliminaci těchto buněk. K tomu je k dispozici několik inhibičních molekul – například metotrexát (inhibitor dihydrofolát reduktázy) nebo experimentální terapeutické molekuly ribavirin, kyselina mykofenolová (inhibitory IMPDH2) a forodesin (nový inhibitor PNP).**



Obrázek 21: Schéma purinového metabolismu a úloha enzymů IMPDH2, APRT a PNP v syntéze purinových nukleotidů. *De novo* syntéza purinových nukleotidů začíná fosforylací ribosa-5'-fosfátu enzymem PRPP. Sledem reakcí dojde k vytvoření nukleotidu IMP, který je v dalším kroku za přítomnosti IMPDH2 přeměněn na GMP. PNP reverzibilně katalyzuje reakci, ve které dochází ke štěpení purinových nukleosidů za vzniku jednotlivých purinových bází (adenin, hypoxantin, xantin, guanin). V *salvage* dráze jsou volné nukleové báze zpět přeměněny na příslušné nukleosid-5'-monofosfáty za současné aktivace PRPP enzymem APRT.

IMPDH2, inosin-5'- monofosfát dehydrogenáza 2; APRT, adenin fosforibosyl transferáza; PNP, purin nukleosid fosforyláza; PRPP, 5-fosforibosyl-1-pyrofosfát; IMP, inosin-5'-monofosfát; GMP, guanosin-5'-monofosfát; dADP, deoxyadenin difosfát; ADP, adenosin difosfát; GDP, guanosin difosfát; dGDP, deoxyguanosin difosfát; AMP, adenosin-5'-monofosfát; XMP, xantosin-5'-monofosfát.

Rezistence nádorových buněk na terapii představuje komplikaci úspěšné protinádorové léčby a je často zodpovědná za selhání léčby, relaps a progresi onemocnění. Přízpusobení protinádorovým léčivům nádorových buněk je spojeno s (více či méně) rozsáhlými změnami ve fenotypu buněk. Ačkoliv některé sekundární molekulární změny v rezistentních nádorových buňkách přímo nesouvisí s mechanismem rezistence (jako například zde demonstrované snížení enzymů metabolismu purinů), mohou být potenciální „slabinou“ či novým terapeutickým cílem pro specifickou likvidaci rezistentní buněčné populace.

Proteomickou analýzou proteinových lyzáátů z TRAIL-rezistentních a TRAIL-enzitivních buněk MCL jsme identifikovali několik diferenciatně exprimovaných proteinů. Odhalili jsme snížení exprese 3 klíčových enzymů metabolismu purinů (PNP, APRT a IMPDH2) v rezistentních buňkách. Předpokládáme, že enzymy se sníženou expresí způsobují narušení homeostázy purinů v TRAIL-rezistentních HBL-2/R buňkách. Oslabená

de novo syntéza i *salvage* dráha purinů by mohly představovat nový potenciální terapeutický cíl k eliminaci TRAIL-rezistentních HBL-2 buněk MCL.

Práce byla publikována v roce 2013 v časopise *International Journal of Molecular Medicine* (Příloha III, strana 105):

Pospisilova J, Vit O, Lorkova L, Klanova M, Zivny J, Klener P, Petrak J; Resistance to TRAIL in mantle cell lymphoma cells is associated with the decreased expression of purine metabolism enzymes. *International Journal of Molecular Medicine* 2013;31:1273.

4 Shrnutí a diskuze

Proteomické techniky a přístupy je možné využít ke studiu různých biologických nebo medicínských problémů. Ve zmíněných třech pracích jsme pomocí proteomických přístupů hledali řešení některých problémů v diagnostice a léčbě onkologických onemocnění. Identifikovali jsme protein RBP4 jako potenciální biomarker ovariálního karcinomu. Odhalili jsme molekulární mechanismus rezistence buněk MCL na cytarabin a popsali jsme molekulární změny spojené s rezistencí buněk MCL na experimentální protinádorovou molekulu TRAIL.

Proteomické přístupy umožňují nový a velmi efektivní způsob k získávání informací o molekulárních a buněčných procesech fyziologických a patologických dějích. Musíme si však být vědomí jejich nedostatků, limitů a omezení. V následujících odstavcích bych ráda nejprve diskutovala různá omezení použitých proteomických metod a následně komentovala přínosy i limity tří prezentovaných prací.

4.1 Možnosti a omezení proteomických metod

Dvojrozměrná elektroforéza a její limity

Na typické proteinové „mapě“ získané pomocí 2-DE z buněčných lyzátů lze vizualizovat zhruba 700-1200 hodnotitelných proteinových skvrn. Předpokládaný počet proteinů/proteoforem exprimovaných v běžné savčí buňce je však až 100 000 (Gstaiger a Aebersold, 2009). Po separaci proteinové směsi 2-DE je tak možné vidět na výsledné mapě pouze 8% proteinů z konkrétního proteomu.

Důvodů, proč je počet vizualizovaných proteinů tak nízký, je několik. Jedním z nich jsou až 80% ztráty, ke kterým dochází v jednotlivých krocích při rozdělení proteinů (Zhou et al., 2005). Dále jsou na akrylamidovém gelu navíc zachyceny jen ty proteiny, jež se nacházejí v určitém rozmezí pH a MW (10-100 kDa, pH je omezeno volbou IPG gradientu). Na výsledné mapě rovněž chybějí hydrofóbní transmembránové proteiny, neboť rozpustnost je nutnou podmínkou k jejich separaci v IPG gelu a následně v SDS-PAGE gelu (Görg et al., 1988).

Další komplikací při 2-DE analýze je její nízké rozlišení, které se projevuje především v překryvu proteinů v jednotlivých skvrnách. K překryvu proteinů dochází přibližně v 84% skvrn a v jedné skvrně se tak většinou nacházejí 2 a více různé proteiny (Thiede et al., 2013). Kvantifikace takových proteinových skvrn je tudíž nutně velmi

nepřesná a nevypovídá o změně exprese identifikovaného proteinu. Při identifikaci a kvantifikaci proteinů z výsledné proteinové „mapy“ nastává i jiná situace, kdy se jeden protein a jeho variace nacházejí ve více skvrnách (Thiede et al., 2013). K objasnění výskytu jednoho proteinu a jeho variací ve více skvrnách je nezbytné vrátit se zpět k definici proteomů. Ta do proteomu zahrnuje všechny proteiny kódovány jedním genem a jejich formy, které vznikly alternativním sestřihem a post-translačními modifikacemi. Příkladem mohou být proteiny HSP27 s 30 proteoformami, enoláza 1 s 38 proteoformami nebo elongační faktor 1-alpha 1 s 45 proteoformami (Jungblut et al., 2008, Thiede et al., 2013). Jednotlivé formy proteinů se pak liší post-translačními modifikacemi, která ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti proteinu. Například varianty různě fosforylovaného proteinu jsou na výsledné proteinové mapě viditelné jako za sebou jdoucí skvrny, takzvané „vláčky“ (spot trains), s přibližně stejnou molekulovou hmotností, ale odlišným pH. Kvantifikace proteoform není jednoznačná a existují na ni dva odlišné pohledy. Ke kvantifikaci proteinů se může přistupovat individuálně a respektovat tak jejich biologickou funkci a to určením množství každé formy proteinů. Jinou možností, je kvantifikovat všechny na gelu viditelné proteoformy, jež jsou odvozeny z jednoho proteinu kódovaný jedním genem.

Výsledné 2-D mapy proteomů se využívají k porovnávání relativních koncentrací proteinů z různě definovaných proteomů. Podíváme-li se na proteiny se změněnou koncentrací napříč různými experimenty, zjistíme, že ve většině případů jde o jedny a tytéž proteiny (heat shock proteins, trifosfát izomeráza, annexin, enoláza, atd.) (Petra et al., 2008). Není dosud objasněno, zda je výskyt těchto proteinů napříč různými experimenty artefaktem nebo univerzální buněčnou odpovědí na stresové podmínky.

2-DE elektroforéza je přes svá omezení metodou k analýze proteomu nebo alespoň k části proteomu, představující hojně solubilní proteiny, jak jsme v našich pracích demonstrovali, přesto je však na ústupu a její vůdčí místo přebírají „shot-gun“ metody.

„Shot-gun“ přístupy

Alternativním přístupem ke studiu proteomu je „shot-gun“ přístup, jež z hlediska počtu rozlišených a identifikovaných proteinů výrazně převyšuje 2-DE. Typickým uspořádáním je jedno- nebo vícerozměrná separace peptidů v on-line spojení s výkonným hmotnostním spektrometrem. „Shot-gun“ přístupem je tak dnes možné identifikovat až 10 000 proteinů v jednom experimentu (Beck et al., 2011, Nagaraj et al., 2011).

I přestože „shot-gun“ přístup má velký potenciál dělit a identifikovat tisíce proteinů v jediném vzorku, podobně jako 2-DE, má svá omezení.

Štěpením proteinového vzorku na peptidy totiž dochází ke ztrátě informace o vztahu mezi jednotlivými peptidy a konkrétním proteinem, z kterého pocházejí. Tento nedostatek se později odráží při identifikaci proteinů hmotnostní spektrometrií (MS/MS), konkrétně při zpětném přiřazení peptidů k původnímu proteinu a biologické interpretaci dat. Určení sekvence několika peptidů je dostačující ke stanovení genu, ze kterého byly peptidy přepsány, ale zpravidla neumožňuje zpětně odlišit jednotlivé proteoformy.

Vzhledem k podstatně hlubšímu průniku do proteomu, který „shot-gun“ metody umožňují však tyto přístupy v současné proteomice dominují.

4.2 Přínosy a limity představených prací

4.2.1 Identifikace RBP4 jako biomarkeru karcinomu ovaria

Krevní sérum a plazma představují z hlediska proteomiky jeden z nejkompexnějších biologických vzorků a dosud bylo identifikováno více než 3000 plazmatických a sérových proteinů (www.peptideatlas.org). Koncentrace těchto proteinů se nachází v rozmezí 10 řádů a 22 proteinů představuje 99% celé proteinové masy v séru (Anderson a Anderson, 2002). K překonání dynamického rozsahu koncentrací jsme v této práci zvolili dva odlišné přístupy, ekvalizaci koncentrací proteinů hexapeptidovou knihovnou ligandů a imunodepleci majoritních proteinů. Tyto zásahy však mají i zjevné nedostatky, které jsou dále diskutovány.

Ekvalizace hexapeptidovou knihovnou ligandů slouží ke snížení dynamického rozsahu koncentrací proteinů a je velmi účinnou technikou, i přestože její princip byl zpochybněn. Deklarovaný princip obohacení minoritních proteinů na základě afinitních interakcí s hexapeptidovými ligandy nebyl potvrzen. Práce Keidela et al. ukázala, že po nanesení proteinového vzorku na kolonu dochází k vazbě proteinů na hydrofobní povrch kuliček, na kterém jsou navázány hexapeptidy (Keidel et al., 2010). Proteiny jsou pravděpodobně separovány spíše na principu reverzní fáze než na základě specifické vazby.

Kolonu s hexapeptidovými ligandy na kuličkách jsme použili k vyrovnání koncentrací sérových proteinů zdravých žen a žen s karcinomem ovaria. Po 2-DE analýze jsme identifikovali tři proteiny, jejichž koncentrace v séru pacientek byla statisticky významně

změněná. Byly to proteiny apolipoprotein A4 a α -1-antitrypsin, jež jsou považovány za potenciální sérové markery pro karcinom ovaria (Chen et al., 2008, Dieplinger et al., 2009). Třetím proteinem byl retinol-binding protein 4 (RBP4), jehož koncentrace v sérech žen s karcinomem ovaria byla významně snížena.

Alternativním přístupem k analýze séra jsme nejprve odstranili 14 nejhojněji zastoupených sérových proteinů imunodeplecí. Depletované sérum bylo analyzováno „shot-gun“ přístupem (kombinace izoelektrické fokusace a LC) a kvantitativní informace byla získána pomocí iTRAQ systému. Tímto přístupem jsme detekovali dva proteiny a to již výše zmíněné apolipoprotein A-4 a α -1-antitrypsin s významnou změnou koncentrace v sérech pacientek, jež jsou již v literatuře označeny jako potenciální markery ovariálního karcinomu (Chen et al., 2008, Dieplinger et al., 2009). Oba tyto proteiny patří mezi nejhojněji zastoupené proteiny v plazmě a séru a teoreticky by měly být odstraněny při imunodepleci společně s dalšími 12 abundantními proteiny. Účinnost imunodeplečních kolon je přibližně 90% (Echan et al., 2005, Björhall et al., 2005). Z toho tedy vyplývá, že se v analyzovaném vzorku po imunodepleci abundantních proteinů nacházely depletované proteiny v množství dostatečné k jejich vizualizaci.

a tak se v sérovém vzorku po imunodepleci abundantních proteinů stále nacházel depletované proteiny v dostatečném množství k jejich detekci. Snížená exprese RBP4 nebyla při této analýze odhalena. To si vysvětlujeme skutečností, že se sérový RBP4 vyskytuje v komplexu s transthyretinem (citace), který je při imunodepleci rovněž odstraňován.

Jak bylo v kapitole 3.1.5 diskutováno, souvislost snížené koncentrace RBP4 s ovariálním karcinomem je nejasná. Pokles koncentrace RBP4 v krvi pacientek s karcinomem ovaria by pravděpodobně mohla být odrazem komplexních změn (např. změn energetického metabolismu) v těle postiženém maligním nádorem většího rozsahu. Pokles RBP4 by tak mohl být předzvěstí nádorové kachexie a to ještě dříve než se u pacientek dostaví pokles tělesné hmotnosti (rozdíl v BMI pacientek a zdravých žen nebyl nalezen). Aby snížená koncentrace RBP4 v séru žen s karcinomem ovaria mohla být považována za indikátor ovariálního karcinomu, je nezbytné tuto změnu testovat na početnější skupině žen a zároveň zohlednit různá stadia ovariálního karcinomu, věk a další charakteristiky pacientek a zdravých žen. Do studií by měly být rovněž zařazeny vzorky pacientek s jinými typy nádorových onemocnění k určení jejich korelace se změnami koncentrace sérového RBP4.

4.2.2 Odhalení snížené exprese DCK jako mechanismus rezistence na cytarabin

Dosud neexistuje doporučená terapie pro pacienty s MCL, kteří se stanou rezistentní na léčebné režimy využívající cytarabin. Vhodná volba léčby samozřejmě závisí na znalosti mechanismu rezistence k předchozí terapii. Odhalením snížené exprese DCK v buněčné linii MCL a v patientských buňkách jsme poskytli zásadní informaci pro vhodnou volbu sekundární terapie rezistentních MCL. Nalezená změna exprese DCK je zodpovědná za vznik rezistence v buněčných liniích MCL a vzorcích pacientů s MCL a rovněž za křížovou rezistenci na nukleosidové antimetabolity. Pacienti s MCL rezistentní na cytarabin by tak neměli být ošetřováni nukleosidovými metabolity, jako jsou fludarabin, gemcitabin, kladribin, ale měli by být vystaveni například genotoxické cisplatině, alkylačním činidlům nebo cíleným látkám jako jsou temsirolimus, bortezomib a případně rituximabu.

Jsme si vědomi potenciálního omezení analogických studií založených výhradně na buněčných liniích odvozených od studovaných nádorů. Vzhledem k tomu, že naše výsledky získané různými metodami na buněčných liniích byly v této práci potvrzeny i na patientských vzorcích (byť jen na úrovni mRNA), považujeme výsledky za spolehlivé a aplikovatelné do klinické praxe a představují tak typickou ukázkou translačního výzkumu.

Za určitých okolností se při studiu molekulárních mechanismů můžeme spolehnout pouze na buněčné kultury a to i s vědomím, že se jedná o model zatížený mnoha artefakty. Pokud studujeme experimentální látku, která dosud není schválená ke klinickému použití, nezbyvá než provést studii na xenotransplantovaných nádorech nebo buněčných kulturách. Takovým případem byla i naše třetí studie zaměřená na rezistenci MCL k účinku experimentální protinádorové molekuly TRAIL.

4.2.3 Hledání zásahových míst v buňkách MCL rezistentních na TRAIL

V léčbě onkologických onemocnění se prosazuje využití znalostí o molekulárních mechanismech nádorových buněk k vývoji terapeutických molekul, jež jsou schopné vyvolat smrt pouze v cílené buňce. Jednou z potenciálních cílených a navíc „biologických“ terapeutických látek je molekula TRAIL.

V této studii jsme odhalili změny, které provázejí rezistenci na TRAIL, ale nejsou za ni přímo zodpovědné (rezistence na TRAIL je způsobená sníženou expresí TRAIL receptorů (Maksimovic-Ivanic et al., 2012)). Konkrétně jde o sníženou expresi tří klíčových enzymů (PNP, APRT a IMPDH2) metabolismu purinů v TRAIL-rezistentních buňkách.

Se vznikem rezistence na TRAIL v buňkách MCL zřejmě došlo k narušení *de novo* syntézy a *salvage* dráhy purinů.

Odhadli jsme tedy sekundární/adaptivní změny charakteristické pro TRAIL-rezistentní buňky. Jsou-li tyto změny charakteristickými znaky, lze některé z nich považovat za potenciální „slabiny“ těchto buněk a jako takové je lze využít k eliminaci TRAIL-rezistentních buněk. To, zda oslabený metabolismus purinů je „slabinou“ TRAIL-rezistentních buněk MCL, je potřebné ověřit. V dalším kroku by tak měly být buňky rezistentní na TRAIL vystaveny účinkům protinádorových látek, jejichž cílem je zásah do *de novo* syntézy a/nebo *salvage* dráhy purinů. V klinické praxi je několik dostupných inhibitorů purinového metabolismu, jako jsou metotrexát (inhibitor dihydrofolát reduktázy), experimentální molekula ribavirin a kyselina mykofenolová (inhibitor IMPDH2) nebo forodesin (inhibitor PNP).

Obě práce zaměřené na rezistenci využívaly k detekci změn v rezistentních buňkách 2-DE. Limity této metody jsem diskutovala na předcházejících stránkách. Pro hlubší vhled do buněčných proteomů by bylo vhodné zvolit přístup, který je schopen pojmut širší spektrum chemicko-fyzikálních vlastností proteinů. Takovým by mohl být zvolen „shot-gun“ přístup kombinovaný s technikou SILAC (viz kapitola 2.7.1) nebo iTRAQ (viz kapitola 2.7.3). Obě kvantitativní techniky jsou však z finančního hlediska méně dostupné. Teprve nedávno jsme zvolili „shot-gun“ přístup v kombinaci s technikou SILAC k získání hlubšího vhledu do proteomu buněk MCL rezistentních na fludarabin (purinový analog). Po inkorporaci izotopově značeného argininu a lyzinu byl proteinový vzorek smíchán v poměru 1:1 s proteinovým vzorkem buněk MCL senzitivních na fludarabin a směsný vzorek byl rozdělen na 1-D elektroforéze a tryptické štěpy z frakcí z SDS-PAGE gelu děleny na nano-LC a identifikovány hmotnostní spektrometrií. Takto se nám podařilo získat 200 proteinů se změněnou expresí, pomocí kterých je nám umožněno podrobněji popsat molekulární změny.

4.3 Závěr

Proteomika je dynamický obor, který se v posledních letech dostává do popředí zájmu nejen molekulárních biologů a biochemiků, ale i lékařů. Výrazný rozvoj analytické instrumentace a metodických přístupů během posledních dvou desetiletí významně rozšířil možnosti studia proteinů v živých systémech. Analýza proteomu poskytuje neustále se prohlubující vhled do biologických procesů na úrovni kvalitativních a kvantitativních změn proteinového složení v souvislosti s fyziologickými a patologickými stavy organismu. Nabízí tak možnost lepšího pochopení různých stavů organismu a stává se přínosem pro vývoj diagnostických a terapeutických přístupů. Takový přínos jsme demonstrovali na třech projektech, jež jsou těsně propojeny s klinickou praxí.

5 Literaturura

- Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular and Cellular Proteomics* 2002;1:845-867.
- Ansell SM., Tang H, Kurtin PJ, Koenig PA, Inwards DJ, Shah, K, Witzig TE. Temsirolimus and rituximab in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: A phase 2 study. *The Lancet Oncology* 2011;12:361-368.
- Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch H, Eyfjord JE, Hopper JL, Easton DF. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *American Journal of Human Genetics* 2003;72(5):1117-30.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
- Aston FW. The Mass-Spectra of Chemical Elements. *Philosophical Magazine* 1919;371:707.
- Bantia S, Miller PJ, Parker CD, Ananth SL, Horn LL, Kilpatrick JM, Sandhu JS. Purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-1777 (Immucillin-H)-a novel potent and orally active immunosuppressive agent. *International Immunopharmacology* 2001;1:1199-1210.
- Bantia S, Montgomery JA, Johnson HG, Walsh GM. *In vivo* and *in vitro* pharmacologic activity of the purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-34: The role of GTP and dGTP. *Immunopharmacology* 1996;35:53-63.
- Bast RC, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *The Journal of Clinical Investigation* 1981;68(5): 1331-7.
- Beck M, Schmidt A, Malmstroem J, Claassen M, Ori A, Szymborska A, Aebersold R. The quantitative proteome of a human cell line. *Molecular Systems Biology* 2011;7(549):549.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1982;6(4):317-339.

- Björck L, Kornvall G. Analysis of bacterial cell wall proteins and human serum proteins bound to bacterial cell surfaces. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B* 1981;89(1): 1-6.
- Björhall K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics* 2005;5(1):307-17.
- Bollée G, Harambat J, Bensman A, Knebelmann B, Daudon M, Ceballos-Picot I. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2012;7(9):1521-1527.
- Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares J, Marimón F, Plana N, Masana L. Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Journal of Internal Medicine* 2007;262(4):496-503.
- Cai J, Damaraju VL, Groulx N, Mowles D, Peng Y, Robins MJ, Gros P. Two distinct molecular mechanisms underlying cytarabine resistance in human leukemic cells. *Cancer Research* 2008;68(7):2349-57.
- Cargile BJ, Sevinsky JR, Essader AS, Stephenson JL, Bundy JL, Carolina N. Immobilized pH Gradient 2005;16(3):181-189.
- Capizzi RL. Curative chemotherapy for acute myeloid leukemia: the development of high-dose ara-C from the laboratory to bedside. *Investigational New Drugs* 1996;14(3):249-256.
- Castro Alves C, Terziyska N, Grunert M, Gündisch S, Graubner U, Quintanilla-Martinez L, Jeremias I. Leukemia-initiating cells of patient-derived acute lymphoblastic leukemia xenografts are sensitive toward TRAIL. *Blood* 2012;119(18):4224-7.
- Clarke N, Germain P, Altucci L, Gronemeyer H. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2004;6:1-23.
- Cautrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1968;61(2):636-643.
- Consden R, Gordon AH, Martin AJ. Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *Biochemical Journal* 1944;38(3):224-232.

- Cvetković D, Williams S J, Hamilton TC. Loss of cellular retinol-binding protein 1 gene expression in microdissected human ovarian cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 2003;9:1013-1020.
- Dauly C, Perlman DH, Costello CE, McComb ME. Protein separation and characterization by np-RP-HPLC followed by intact MALDI-TOF mass spectrometry and peptide mass mapping analyses. *Journal of Proteome Research* 2006;5:1688-1700.
- DeAngelis LM, Kreis W, Chan K, Dantis E, Akerman S. Pharmacokinetics of ara-C and ara-U in plasma and CSF after high-dose administration of cytosine arabinoside. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1992;29:173-177.
- Delarue R, Haioun C, Ribrag V, Brice P, Delmer A, Tilly H, Salles G, Van Hoof A, Casasnovas O, Brousse N, Lefrere F, Hermine O. Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. *Blood* 2013;121:48-53.
- Dieplinger H, Ankerst DP, Burges A, Lenhard M, Lingenhel A, Fineder L, Stieber P. Afamin and apolipoprotein A-IV: novel protein markers for ovarian cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2009;18(4):1127-33.
- Edman P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem* 1949;22(3):475.
- Echan LA, Tang HY, Ali-Khan N, Lee K, Speicher DW. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* 2005; 5(13):3292-303.
- Erikstrup C, Mortensen OH, Nielsen AR, Fischer CP, Plomgaard P, Petersen AM, Pedersen BK. RBP-to-retinol ratio, but not total RBP, is elevated in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2009;11(3):204-12.
- Ewald B, Sampath D, Plunkett W. Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* 2008;27:6522-6537.

- Fairbanks LD, Rückemann K, Qiu Y, Hawrylowicz CM., Richards DF, Swaminathan R, Simmonds HA. Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes: a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis? *The Biochemical Journal* 1999;342:143-152.
- Fathalla MF. Incessant ovulation - a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971;2:163.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246:64-71.
- Fodale V, Pierobon M, Liotta L, Petricoin E. Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance? *The Cancer Journal* 2011;17(2):89-95.
- Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund* 2001;15:875-890.
- Galmarini CM, Popowycz F, Joseph B. Cytotoxic nucleoside analogues: different strategies to improve their clinical efficacy. *Current Medicinal Chemistry* 2008;15:1072-1082.
- Garg PP, Kerlikowske K, Subak L, Grady D. Hormone replacement therapy and the risk of epithelial ovarian carcinoma: a meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology* 1998;92:427-9.
- Görg A, Postel W, Weser J, Günther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988;9(9):531-546.
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004;4(12):3665-85.
- Gouw JW, Krijgsveld J, Heck AJR. Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms. *Molecular and Cellular Proteomics* 2010;9(1):11-24.
- Gouw JW, Tops BBJ, Mortensen P, Heck AJR, Krijgsveld J. Optimizing identification and quantitation of ¹⁵N-labeled proteins in comparative proteomics. *Analytical Chemistry* 2008; 80(20):7796-803.

- Goy A, Younes A, McLaughlin P, Pro B, Romaguera JE, Hagemeister F, Fayad L, Dang NH, Samaniego F, Wang M, Broglio K, Samuels B, Gilles F, Sarris AH, Hart S, Trehu E, Schenkein D, Cabanillas F, Rodriguez AM. Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23:667-675.
- Goy A, Sinha R, Williams ME, Kalayoglu Besisik S, Drach J, Ramchandren R, Zhang L, Cicero S, Fu T, Witzig TE. Single-agent lenalidomide in patients with mantle cell lymphoma who relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study. *Journal of Clinical Oncology* 2013;31:3688-3695.
- Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *The New England Journal of Medicine* 2006;354(24):2552-63.
- Gstaiger M, Aebersold R. Applying mass spectrometry - based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nature Reviews. Genetics* 2009;10(9):617-27.
- Guss B, Eliasson M, Olsson A, Uhlén M, Frej AK, Jörnvall H, Lindberg M. Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. *The EMBO Journal* 1986;5(7),1567-5.
- Haider DG, Schindler K, Prager G, Bohdjalian A, Luger A, Wolzt M, Ludvik B. Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007;92(3):1168-71.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74.
- Hedstrom L. IMP dehydrogenase: mechanism of action and inhibition. *Current Medicinal Chemistry* 1999;6:545-560.
- Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M, Hellström KE. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Research* 2003;63(13):3695-700.
- Heintz APM, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HYS, Pecorelli S, Beller U. Carcinoma of the ovary. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2006;95(1):161-192.

- Hjerten S. Agarose as an anticonvection agent in zone electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1961;53:514-517.
- Horvath CG, Preiss BA, Lipsky SR. Fast liquid chromatography: an investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Analytical Chemistry* 1967;39(12):1422.
- Howard GA, Martin AJP. The separation of the C12-C18 fatty acids by reversed-phase partition chromatography. *The Biochemical Journal* 1950;46(5):532-8.
- Hubeek I, Stam RW, Peters GJ, Broekhuizen R, Meijerink JPP, van Wering ER, Kaspers GJL. The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates in vitro cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. *British Journal of Cancer* 2005;93:1388-1394.
- Chen Y, Lim BK, Peh SC, Abdul-Rahman PS, Hashim OH. Profiling of serum and tissue high abundance acute-phase proteins of patients with epithelial and germ line ovarian carcinoma. *Proteome Science* 2008;6:20.
- Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2002;52:72-91.
- Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation* 2012;122(10):3416-3423.
- Johnson EG, Nier AO. Angular aberrations in sector shaped electromagnetic lenses for focusing beams of charged particles. *Physical Review* 1953;91(1):10-17.
- Johnson SA. Use of fludarabine in the treatment of mantle cell lymphoma, Waldenström's macroglobulinemia and other uncommon B- and T-cell lymphoid malignancies. *The Hematology Journal* 2004;5 Suppl 1:S50-61.
- Jungblut PR, Holzhütter HG, Apweiler R, Schlüter H. The speciation of the proteome. *Chemistry Central Journal* 2008;2:16.
- Kantarjian H, Barlogie B, Plunkett W, Velasquez W, Mclaughlin P, Riggs S, Cabanillas F. High-Dose Cytosine Arabinoside in Non-Hodgkin ' s Lymphoma 1983;1(11):689- 94.
- Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry* 1985;57(14): 2935-2939.

- Keidel EM, Ribitsch D, Lottspeich F. Equalizer technology - Equal rights for disparate beads. *Proteomics* 2010;10:2089-2098.
- Kelleher NL. A cell-based approach to the human proteome project. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2012;23:1617-1624.
- Kirchoff C, Habben I, Ivell R, Krull N. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biology of Reproduction* 1991;45:350-357.
- Kinter M, Sherman NE. Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. ISBN: 0-471-32249-0, Wiley-Interscience 2000.
- Klener P, Leahomschi S, Molinsky J, Simonova T, Necas E, Gasova Z, Zivny J. TRAIL-induced apoptosis of HL60 leukemia cells: Two distinct phenotypes of acquired TRAIL resistance that are accompanied with resistance to TNF but not to idarubicin and cytarabine. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2009;42:77-84.
- Kowalska I, Strackowski M, Adamska A, Nikolajuk A, Karczewska-Kupczewska M, Oziomek E, Gorska M. Serum retinol binding protein 4 is related to insulin resistance and nonoxidative glucose metabolism in lean and obese women with normal glucose. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008;93:2786-2789.
- Krüger M, Moser M, Ussar S, Thievensen I, Luber CA, Forner F, Mann M. SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell* 2008;134(2):353-64.
- Kupryjańczyk J, Thor AD, Beauchamp R, Merritt V, Edgerton SM, Bell DA, Yandell DW. P53 Gene Mutations and Protein Accumulation in Human Ovarian Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90(11):4961-5.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-685.
- Lamba JK. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics* 2009;10:1657-1674.

- Lauber WM, Carroll JA, Dufield DR, Kiesel JR, Radabaugh MR, Malone JP. Mass spectrometry compatibility of two-dimensional gel protein stains. *Electrophoresis* 2001;22:906-18.
- Leahomschi S, Molinsky J, Klanova M, Andera L, Peterka M, Gasova Z, Zivny J. Multi-level disruption of the extrinsic apoptotic pathway mediates resistance of leukemia cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Neoplasma* 2013;60:223-31.
- Lee HW, Lee SH, Lee HW, Ryu YW, Kwon MH, Kim YS. Homomeric and heteromeric interactions of the extracellular domains of death receptors and death decoy receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;330:1205-1212.
- Lefrere F, Delmer A, Suzan F, Levy V, Belanger C, Djabbari M, Arnulf B, Damaj G, Maillard N, Ribrag V, Janvier M, Sebban C, Casasnovas RO, Bouabdallah R, Dreyfus F, Verkarre V, Delabesse E, Valensi F, MxIntyre E, Brousse N, Varet B, Hermine O. Sequential chemotherapy by CHOP and DHAP regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation induces a high rate of complete response and improves event-free survival in mantle cell lymphoma: a prospective study. *Leukemia* 2002;16:587-93.
- MacDonald N, Easson AM, Mazurak VC, Dunn GP, Baracos VE. Understanding and managing cancer cachexia. *Journal of the American College of Surgeons* 2003;197(1):143-161.
- Maksimovic-Ivanic D, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F, Mijatovic S. Resistance to TRAIL and how to surmount it. *Immunologic Research* 2012;52:157-168.
- Mallick P, Kuster B. Proteomics: a pragmatic perspective. *Nature Biotechnology* 2010;28:695-709.
- Martin AJP, Synge RLM. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochemical Journal* 1941;35(12):1358-1368.
- Merli F, Luminari S, Ilariucci F, Petrini M, Visco C, Ambrosetti A, Stelitano C, Caracciolo F, Di Renzo N, Angrilli F, Carella AM, Capodanno I, Barbolini E, Galimberti S, Federico M. Rituximab plus HyperCVAD alternating with high dose cytarabine and methotrexate for the initial treatment of patients with mantle cell lymphoma, a multicentre trial from Gruppo Italiano Studio Linfomi. *British Journal of Haematology* 2012;156:346-353.

- Mirgorodskaya OA, Kozmin YP, Titov MI, Körner R, Sönksen CP, Roepstorff P. Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using (18)O-labeled internal standards. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2000; 14(14):1226-1232.
- Mok SC, Bell DA, Knapp RC, Fishbaugh PM, Welch WR, Muto MG, Tsao S. Mutation of K- ras Protooncogene in Human Ovarian Epithelial Tumors of Borderline Malignancy. *Cancer Research* 1993;53:1489-1492.
- Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Nucleoside transporter proteins. *Current Vascular Pharmacology* 2009;7(4):426-434.
- Molinsky J, Klanova M, Koc M, Beranova L, Andera L, Ludvikova Z, Klener P. Roscovitine sensitizes leukemia and lymphoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Leukemia and Lymphoma* 2013;54:372-80.
- Moore JC. Gel permeation chromatography. I. A new method for molecular weight distribution of high polymers. *Journal of Polymer Science Part A: General Papers* 1964;2(2):835-843.
- Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, Bast RC. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecologic Oncology* 2008;108(2):402-8.
- Morschhauser F, Depil S, Jourdan E, Wetterwald M, Bouabdallah R, Marit G, Dumontet C. Phase II study of gemcitabine-dexamethasone with or without cisplatin in relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of the European Society for Medical Oncology* 2007;18:370-375.
- Mortz E, Krogh TN, Vorum H, Görg A. Communication Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption / ionization-time of flight analysis, *Proteomics* 2001;1:1359-1363.
- Muto Y, Smith JE, Milch PO, Goodman DS. Regulation of retinol-binding protein metabolism by vitamin A status in the rat. *Journal of Biological Chemistry* 1972;247:2542-2550.

- Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, Cox J, Kircher M, Kelso J, Mann M. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Molecular Systems Biology* 2011;7(548): 548.
- Natsumeda Y, Prajda N, Donohue JP, Glover JL, Weber G. Enzymic capacities of purine de novo and salvage pathways for nucleotide synthesis in normal and neoplastic tissues. *Cancer Research* 1984;44:2475-2479.
- Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, Haynes PA. Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 2011;11(4):535-553.
- Neverova I, Van Eyk JE. Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2005;815(1-2):51-63.
- Norseen J, Hosooka T, Hammarstedt A, Yore MM, Kant S, Aryal P, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase- and toll-like receptor 4-dependent and retinol-independent mechanism. *Molecular and Cellular Biology* 2012;32(10):2010-9.
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 1975;250(10):4007-4021.
- Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, Hanash SM. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 2005;5(13):3226-45.
- Ong S, Blagoev B, Kratchmarova I, Foster LJ, Andersen JS, Mann M. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture for Quantitative Proteomics. *Methods in Molecular Biology* 2007;359:34-52.
- Paul W, Steinwedel H. Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Zeitschrift für Naturforschung* 1953;8448.
- Pérez-Galán P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 2011;117(1):26-38.

- Pennisi E. ENCODE Project writes eulogy for junk DNA. *Science* 2012;337(7):1159-1161.
- Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death and Differentiation* 2003;10:26-35.
- Peterson PA, Rask L, Ostberg L, Anderson L, Kamwendo F, Pertoft H. Studies on the transport and cellular distribution of vitamin A in normal and vitamin A-deficient rats with special reference to the vitamin A-binding plasma protein. *Journal of Biological Chemistry* 1973; 248:4009-4022.
- Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, Zivny J, Vulpe CD. Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 2008;8(9):1744.
- Petrak J, Toman O, Simonova T, Halada P, Cmejla R, Klener P, Zivny J. Identification of molecular targets for selective elimination of TRAIL-resistant leukemia cells. From spots to *in vitro* assays using TOP15 charts. *Proteomics* 2009;9:5006-5015.
- Pieper R, Su Q, Gatlin CL, Huang ST, Anderson NL, Steiner S. Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: an innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome. *Proteomics* 2003;3(4):422-32.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A.. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *The Journal of Biological Chemistry* 1996;271:12687-12690.
- Plasilova M, Zivny J, Jelinek J, Neuwirtova R, Cermak J, Necas E, Stopka T. TRAIL (Apo2L) suppresses growth of primary human leukemia and myelodysplasia progenitors. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund* 2002;16:67-73.
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography a new approach to protein fractionation. *Nature* 1975;258:598-599.
- Porath J, Flodin P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature* 1959;183:1657-1659.

- Rabilloud T, Strub JM, Luche S, van Dorsselaer A, Lunardi J. A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 2001;1:699-704.
- Raymond S, Nakamichi M, Aurell B. Acrylamide gel as an electrophoresis medium. *Nature* 1962;195:697-698.
- Rebutti M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology* 2013;85(9):1219-1226.
- Reuss FF. Notice sur un nouvel effect de lélectricite galvanique. *Mémoires de la Société Impériale des Naturalistes de l'Université Imperiale de Moscou* 1809;327.
- Riman T. Risk Factors for Invasive Epithelial Ovarian Cancer: Results from a Swedish Case-Control Study. *American Journal of Epidemiology* 2002;156(4):363-373.
- Robak T, Lech-Maranda E, Janus A, Blonski J, Wierzbowska A, Gora-Tybor J. Cladribine combined with cyclophosphamide and mitoxantrone is an active salvage therapy in advanced non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia Lymphoma* 2007;48:1092-1101.
- Roberts D, Williams SJ, Cvetkovic D, Weinstein JK, Godwin AK, Johnson SW, Hamilton TC. Decreased expression of retinol-binding proteins is associated with malignant transformation of the ovarian surface epithelium. *DNA and Cell Biology* 2002;21,11-19.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Pappin DJ. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular and Cellular Proteomics* 2004;3:1154-1169.
- Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, Steward J. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: Results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010;116:3724-3734.
- Sarojini S, Tamir A, Lim H, Li S, Zhang S, Goy A, Suh KS. Early detection biomarkers for ovarian cancer. *Journal of Oncology* 2012;9(2):171-185.
- Scavenec J, Maraninchi D, Gastaut JA, Carcassonne Y, Cailla HL. Purine and pyrimidine ribonucleoside monophosphate patterns of peripheral blood and bone marrow cells in human acute leukemias. *Cancer Research* 1982;42:1326-1330.

- Scully RE. Classification of human ovarian tumors. *Environmental Health Perspectives* 1987;73:15-24.
- Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1967;28(5):815-820.
- Schildkraut JM, Bastos E, Berchuck A. Relationship between lifetime ovulatory cycles and overexpression of mutant p53 in epithelial ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1997;89:932-938.
- Schreiber MS. *75 Years of Chromatography-an Historical Dialogue*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford New York 1975;413.
- Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 2011;473(7347):337-42.
- Singer G, Iii RO, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih I. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 2003;95(6):6-8.
- Skilling JS, Sood A, Niemann T, Lager DJ, Buller RE. An abundance of p53 null mutations in ovarian carcinoma. *Oncogene* 1996;13:117-123.
- Smithies O. Zone electrophoresis in starch gel: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochemical Journal* 1955;61(4):629-641.
- Staub M, Eriksson S. The role of deoxycytidine kinase in DNA synthesis and nucleoside analog activation. *Deoxynucleoside Analogs in Cancer Therapy* 2007;29-53.
- Stephens W. Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Bulletin of the American Physical Society* 1946;21(2):22.
- Sury MD, Chen JX, Selbach M. The SILAC fly allows for accurate protein quantification *in vivo*. *Molecular and Cellular Proteomics* 2010;9(10):2173-83.
- Svensson H. Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. I. The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases. *Acta Chemica Scandinavica* 1961;15:325-341.
- Switzer RC, Merrill CR, Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 1975;98(1):231-237.

- Tanaka K, Waki H, Ido Y. Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1988;2:151-153.
- Tang J, Xie X, Zhang X, Qiao X, Jiang S, Shi W, Shao Y, Zhou X. Long term cultured HL-60 cells are intrinsically resistant to Ara-C through high CDA activity. *Frontiers in Bioscience (Landmar Ed)* 2012;17:569-574.
- Thiede B, Koehler CJ, Strozynski M, Treumann A, Stein R, Zimny-Arndt U, Schmid M, Jungblut PR. High resolution quantitative proteomics of HeLa cells protein species using isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC), two-dimensional gel electrophoresis (2DE) and nano-liquid chromatography coupled to an LTQ-OrbitrapMass spectrometer. *Molecular and Cellular Proteomics* 2013;(12)2:529-538.
- Thomson JJ. Cathode Rays. *Philosophical Magazine* 1897;44:293.
- Thulasiraman V, Lin S, Gheorghiu L, Lathrop J, Lomas L, Hammond D, Boschetti E. Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. *Electrophoresis* 2005;26:3561-3571.
- Tiselius A. The moving-boundary method of studying the electrophoresis of proteins. *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis* 1930;Ser. IV:7(4).
- Travis J, Bowen J, Tewksbury D, Johnson D, Pannell R. Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. *The Biochemical Journal* 1976;157(2):301-6.
- Tswett MS. O novoy kategorii adsorbtsionnykh yavleniy i o primeneniikh k biokhimiicheskomu analizu. *Trudy Varhavskago Obshchestva Estestvoispytatelei, Otdelenie Biologii* 1905;14(6):20-39.
- Unlü M., Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997;18:2071-7.
- Usui S, Ichimura M, Ikeda S, Okamoto M. Association between serum retinol-binding protein 4 and small dense low-density lipoprotein cholesterol levels in young adult women. *Clinica Chimica Acta* 2009;399(1-2):45-48.

- Visco C, Finotto S, Zambello R, Paolini R, Menin A, Zanotti R, Rodeghiero F. Combination of rituximab, bendamustine, and cytarabine for patients with mantle-cell non-Hodgkin lymphoma ineligible for intensive regimens or autologous transplantation. *Journal of Clinical Oncology* 2013;31(11):1442-9.
- Vesterberg O. Synthesis and isoelectric fractionation of carrier ampholytes. *Acta Chemica Scandinavica* 1969;23:2653-2666.
- von Klobusitzky D, König P. Biochemische Studien über die Gifte der Schlangengattung Bothrops. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 1939;182(3-5):577-583.
- Vose JM. Mantle cell lymphoma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *American Journal of Hematology* 2012;87:604-609.
- Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, Blum KA. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine* 2013;369:507-16.
- Ward JL. Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. ENT2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275(12):8375-8381.
- Washburn MP, Wolters D, Yates JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology* 2001;19(3), 242-7.
- Wen J, Ramadevi N, Nguyen D, Perkins C, Worthington E, Bhalla K. Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood* 2000;96:3900-3906.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Smith CA. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3(6):673-82.
- Wilkins MR. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 1996;13:19-50.

- Williams SJ, Cvetkovic D, Hamilton TC. Vitamin A metabolism is impaired in human ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2009;112(3):637-45.
- Witzig TE, Geyer SM, Ghobrial I, Inwards DJ, Fonseca R, Kurtin P, Kaufmann SH. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23:5347-5356.
- Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005; 436(7049):356-62.
- Zhou S, Bailey MJ, Dunn MJ, Preedy VR, Emery PW. A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure. *Proteomics* 2005;5:2739-2747.
- Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010;840:518.
- Zolotarjova N, Martosella J, Nicol G, Bailey J, Boyes BE, Barrett WC. Differences among techniques for high-abundant protein depletion. *Proteomics* 2005;5:3304-3313.

