

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Praha 2014

Mgr. Jana Pospíšilová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

studijní program: Biomedicína

studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



Mgr. Jana Pospíšilová

Proteomika jako nástroj studia molekulárních mechanismů závažných onemocnění

Proteomics as a tool for understanding molecular mechanisms of human diseases

Dizertační práce

Školitel: Doc. RNDr. Jiří Petrák, Ph.D.

Laboratoř klinické proteomiky a hmotnostní spektrometrie

Ústav patologické fyziologie, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracovala samostatně, a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že tato 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, 13. března 2014

Mgr. Jana Pospíšilová

Identifikační záznam

POSPÍŠILOVÁ, Jana. *Proteomika jako nástroj studia molekulárních mechanismů závažných onemocnění* [PROTEOMICS AS A TOOL FOR UNDERSTANDING MOLECULAR MECHANISMS OF HUMAN DISEASES]. Praha, 2014, 134 stran, 4 přílohy, Dizertační práce (Ph.D.), Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie. Školitel Doc. RNDr. Jiří Petrák, Ph.D.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
SOUHRN.....	11
ABSTRACT	12
1 ÚVOD.....	13
1.1 Genom, proteom a proteomika	13
1.2 Separční metody využívané v proteomice	16
1.2.1 Elektroforetická separace	16
1.2.2 Chromatografická separace	17
1.3 Proteomické strategie	19
1.3.1 „Klasická“ strategie (2-DE).....	19
1.3.2 Strategie „shotgun“.....	20
1.4 Hmotnostní spektrometrie	23
1.4.1 Peptidový fingerprinting.....	24
1.4.2 Sekvenování peptidů	24
1.5 Kvantifikace v proteomice	26
1.5.1 Kvantifikace při 2-DE uspořádání.....	26
1.5.2 Kvantifikace v „shotgun“ experimentech.....	26
Značení proteinů/peptidů stabilními izotopy	27
Shrnutí metod kvantifikace pomocí stabilních izotopů	31
Label-free kvantifikace pomocí MS	31
2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	32
2.1 Identifikace potenciálních molekulárních cílů pro selektivní likvidaci buněk lymfomů z plášťové zóny rezistentních na protinádorovou molekulu TRAIL	33
2.1.1 Lymfom buněk z plášťové zóny.....	33
2.1.2 Odvození rezistentního subklonu	35
2.1.3 Proteomická analýza buněčných linií metodou 2-DE	36
2.1.4 Diskuze k důležitým cílům.....	41
2.2 Popis molekulárních mechanismů srdečního selhání s využitím potkaního modelu objemového přetížení	46
2.2.1 Chronické srdeční selhání.....	46
2.2.2 Potkaní model CHSS	47
2.2.3 Vývoj srdečního selhání	48

2.2.4	Proteomická analýza potkaního myokardu	49
2.2.5	Diskuze k dílčímu cíli.....	54
2.3	Hledání diagnostických biomarkerů karcinomu ovaria.....	59
2.3.1	Biomarkery	59
2.3.2	Karcinom ovaria	60
2.3.3	Zpracování sér	61
2.3.4	Proteomická analýza sér	64
2.3.5	Diskuze k dílčímu cíli.....	69
3	DISKUZE.....	72
4	ZÁVĚR.....	80
5	POUŽITÁ LITERATURA.....	81
6	SEZNAM PUBLIKACÍ	96
7	PŘÍLOHA – PUBLIKACE	97
7.1	Příloha I – Resistance to TRAIL in mantle cell lymphoma cells is associated with the decreased expression of purine metabolism enzymes	97
7.2	Příloha II – Proteomic and transcriptomic analysis of heart failure due to volume overload in a rat aorto-caval fistula model provides support for new potential therapeutic targets - monoamine oxidase A and transglutaminase 2.....	105
7.3	Příloha III – Myocardial morphological characteristics and proarrhythmic substrate in the rat model of heart failure due to chronic volume overload.....	118
7.4	Příloha IV – Decreased concentrations of retinol-binding protein 4 in sera of epithelial ovarian cancer patients: a potential biomarker identified by proteomics	129

SEZNAM ZKRATEK

2-DE	dvourozměrná elektroforéza, two-dimensional electrophoresis
AMP	adenozin-5'-monofosfát
APRT	adeninfosforibosyltransferáza
ATP	adenosintrifosfát
AVP	aorto-venózní píštěl
CA125	marker karcinomu vaječníku, cancer agent 125, nebo také MUC16
DcR1	„decoy“ receptor TRAILu
DcR2	„decoy“ receptor TRAILu
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DR4	„death“ receptor TRAILu
DR5	„death“ receptor TRAILu
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	ionizace elektrosprejem, electrospray ionization
ESI-MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie s ionizací ESI
GMP	guanozin-5'-monofosfát
GSH	glutathion, redukovaná forma
GSS	glutathion, oxidovaná forma
GTP, dGTP	guanozin-5'-trifosfát, deoxyguanozin-5'-trifosfát
H ₂ O	voda, čistota – deionizovaná
HADHA	α -podjednotka mitochondriálního trifunkčního proteinu
HBL-2	buněčná linie, zavedený laboratorní model lymfomu buněk z plášťové zóny
HBL-2/R	subklon odvozený od HBL-2 rezistentní na protinádorovou látku TRAIL
HE4	marker karcinomu ovaria
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie, high pressure/performance liquid chromatography
CHSS	chronické srdeční selhání
IC ₅₀	inhibiční koncentrace, half maximal inhibitory concentration
IEF	izoelektrická fokusace, isoelectric focusing
IEF-IPG	izoelektrická fokusace v imobilizovaném gradientu pH, isoelectric focusing - immobilized pH gradient

IMP	inozin-5'-monofosfát
IMPDH2	inozin-5'-monofosfátdehydrogenáza 2
IPG	imobilizovaný gradient pH, immobilized pH gradient
IPTL	značení pomocí stabilních izotopů, isobaric peptide termini labeling
iTRAQ	značení pomocí stabilních izotopů, isobaric tags for relative and absolute quantitation
kDa	kilodalton, 1 dalton = 1 Da = $1,661 \times 10^{-27}$ kilogramu
KEGG	genová databáze, Kyoto encyclopedia of genes and genomes
KO	karcinom ovaria
LC	kapalinová chromatografie, liquid chromatography
MALDI	ionizace laserem v přítomnosti matrice, matrix-assisted laser desorption/ionization
MALDI-MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie s ionizací MALDI
MAO-A	monoaminoxidáza A
MARS	imunodepleční kolonka, multiple affinity removal system spin cartridge, Agilent Technologies
MCL	lymfom buněk z plášťové zóny, mantle cell lymphoma, laboratorní modely MCL jsou buněčné linie JEKO-1, MINO, REC-1, GRANTA-519, HBL-2
MDa	megadalton
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie, fragmentace peptidů
Mr	relativní molekulová hmotnost
mRNA	messengerová (mediátorová) ribonukleová kyselina
MUC16	marker karcinomu vaječníku, cancer agent 125, nebo také CA125
m/z	poměr hmotnosti iontu a jeho náboje, mass-to-charge ratio
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát, redukovaná forma
NID	NADP-dependentní izocitrát dehydrogenáza
NTT	nikotinamidnukleotid transhydrogenáza
pI	izoelektrický bod
PMF	peptidový fingerprinting, peptide mass fingerprinting, peptidové mapování
PNP	purinnukleosidfosforyláza
PRPP	5-fosforibozyl-1-pyrofosfát
RBP4	retinol binding protein 4
RNA	ribonukleová kyselina

ROS	reaktivní formy kyslíku, reactive oxygen species
RP-HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie s reverzní fází, reversed-phase high pressure/performance liquid chromatography
RP-LC	kapalinová chromatografie s reverzní fází, reversed-phase liquid chromatography
SDS	dodecylsulfát sodný, sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti detergentu dodecylsulfátu sodného, sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis
SERCA 2	sarco/endoplasmatic reticulum Ca ²⁺ ATPase
SILAC	značení pomocí stabilních izotopů, stable isotope labeling by amino acids in cell culture
TGM2	transglutamináza 2
TMP	transmembránové proteiny
TMT	značení pomocí stabilních izotopů, tandem mass tagging
TOF	hmotnostní analyzátor doby letu, time of flight
TRAIL	proapoptotický cytokin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TTR	transthyretin

SOUHRN

Proteomika je soubor analytických metod umožňující kvalitativní a kvantitativní popis proteomu. Expresní proteomika kvantitativně porovnává proteomy buněk, tkání, tělních tekutin a dalších biologických materiálů za různých podmínek s cílem nalézt rozdíly v expresi proteinů a na základě těchto rozdílů popsat biologické procesy probíhající ve zkoumaných organizmech.

Výchozím materiálem expresních proteomických studií jsou složité směsi obsahující tisíce proteinů, které jsou analyzovány kombinací separačních (hlavně elektroforetických a chromatografických) metod a identifikovány, případně kvantifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Cílem této dizertační práce je demonstrovat využití nástrojů expresní proteomiky k řešení několika biomedicínských problémů. Různé proteomické přístupy a nástroje jsme využili ke studiu molekulárních mechanismů závažných onemocnění jak na biologických vzorcích pacientů, tak na modelovém organismu a buněčné kultuře. Konkrétně jsme řešili tři projekty, a to hledání potenciálních molekulárních cílů pro selektivní likvidaci buněk lymfomů z plášťové zóny rezistentních na protinádorovou molekulu TRAIL, studium molekulárních mechanismů srdečního selhání s využitím potkaního modelu objemového přetížení a hledání diagnosticky využitelných biomarkerů karcinomu ovaria. Výsledkem těchto projektů je nalezení molekulární „slabiny“ buněk rezistentních na protinádorovou terapii potenciálně využitelné k selektivní eliminaci rezistentních buněk, dále navržení dvou možných terapeutických zásahů v léčbě chronického srdečního selhání a identifikace potenciálního biomarkeru karcinomu ovarii.

Ukázali jsme, že při vhodném uspořádání experimentu a kritickém vyhodnocení získaných informací proteomika poskytuje velmi cenný vhled do fyziologických i patologických molekulárních procesů a má potenciál v oblasti základního i aplikovaného biomedicínského výzkumu.

klíčová slova: expresní proteomika, hmotnostní spektrometrie, dvourozměrná elektroforéza, lymfom buněk z plášťové zóny, TRAIL, rezistence, srdeční selhání, karcinom ovaria, biomarker

ABSTRACT

Proteomics is a set of analytical methods which enable qualitative and quantitative characterization of the proteome. Expression proteomics quantitatively compares proteomes of cells, tissues, body fluids or other biological materials to find differences in protein expression and, based on these differences, to describe the biological processes occurring in investigated organisms.

An initial material for expression proteomic studies are complex mixtures containing thousands of proteins, which are analyzed using separation (electrophoretic and chromatographic) methods, and identified, possibly quantified using mass spectrometry.

The aim of this Thesis is to demonstrate the application of the tools of expression proteomics in solving diverse challenges in biomedicine. We employed various proteomic approaches and tools for studying molecular mechanisms of human diseases using patient biological samples, or a model organism and a cell culture. We were conducting three different research projects, namely: A quest for potential molecular targets for selective elimination of TRAIL-resistant mantle cell lymphoma cells; Investigation of molecular mechanisms of heart failure using a rat model of the disease induced by volume overload; and Searching for diagnostically usable serum biomarkers of ovarian cancer. Results of our three projects are discovery of molecular „weakness“ of resistant cells which has a potential as a therapeutic target for the selective elimination of such cells, suggestion of two highly potential therapeutic targets for treatment of heart failure and identification of a new potential biomarker of ovarian cancer.

We demonstrated that with a suitable experimental design and pointed evaluation of gained results proteomics provides significant insight into the physiological and also pathological molecular processes and carries a huge potential in the fields of basic and applied biomedical research.

key words: expression proteomics, mass spectrometry, two-dimensional electrophoresis, mantle cell lymphoma, TRAIL, drug resistance, heart failure, ovarian cancer, biomarker

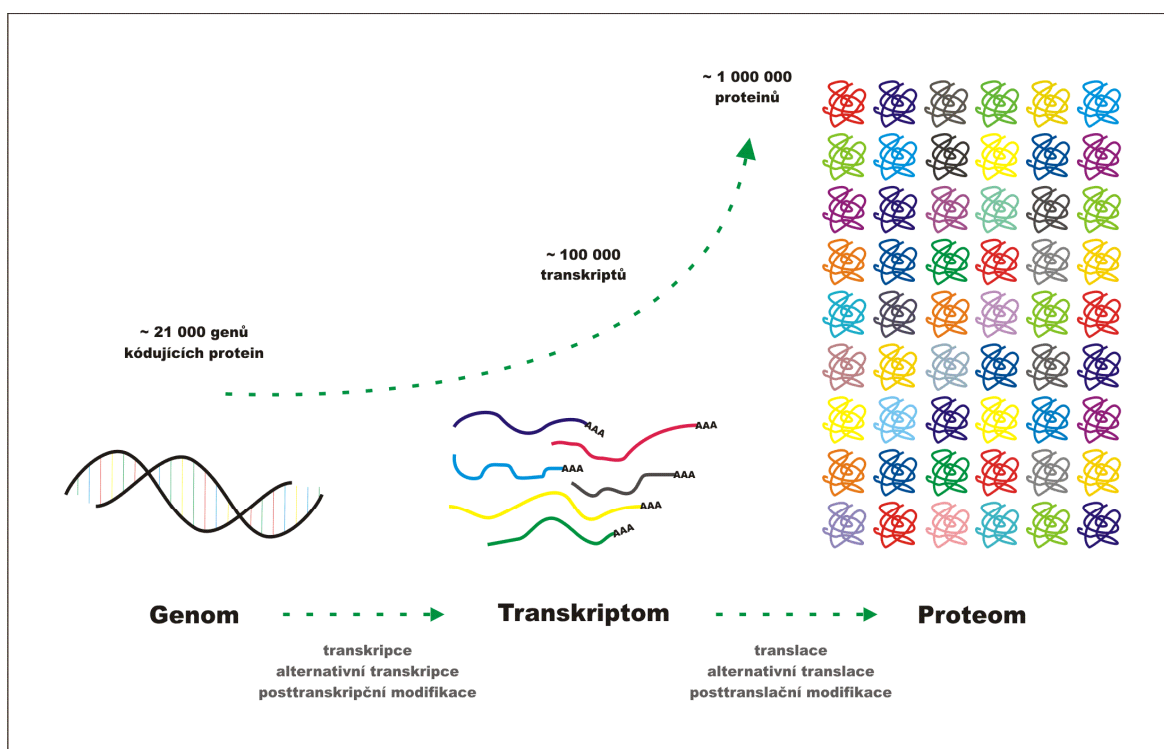
1 ÚVOD

1.1 Genom, proteom a proteomika

Protein je produkt genové exprese. Exprese genu je vysoce regulovaný proces, který je tvořen několika základními kroky, a to transkripcí DNA, při které je syntetizován primární transkript RNA; posttranskripčními modifikacemi (ty zahrnují syntézu poly(A) konce a 7-methylguanozinové čepičky, splicing, alternativní splicing, trans-splicing, či editaci primárního transkriptu), kdy vzniká mRNA; degradací mRNA; translací mRNA, při které je syntetizován aminokyselinový řetězec proteinu; posttranslačními modifikacemi proteinu (dosud je známých 300 různých typů posttranslačních modifikací); transportem a degradací proteinu. Termín **proteom**, poprvé použitý roku 1994 M. Wilkinsem [1], vyjadřuje proteinový komplement genomu, tedy soubor všech proteinů nacházejících se v určitý čas v organismu, tkáni, buňce či organele. Kolika proteiny je ale lidský proteom tvořen? Lidský genom obsahuje přibližně 21 000 genů kódujících protein [2]. Předpokládáme-li, že produkty vzniklé z jednoho genu jsou pouze varianty téhož genu a tedy jeden protein, je lidský proteom tvořen cca 21 000 proteiny. Ze složitosti genové exprese ale vyplývá, že z jednoho protein-kódujícího genu může vznikat různými kombinacemi alternativní transkripce, posttranskripčních modifikací, alternativní translace, posttranslačních modifikací a cílené degradace několik finálních produktů s odlišnou strukturou a často také funkcí. Takových proteinových variant – **proteoforem** – vzniklých z téměř 21 000 genů [3] mohou existovat až milióny (Obrázek 1).

Proteom je díky složitosti a variabilitě v expresi genu mnohem komplexnější než genom či transkriptom (Obrázek 1). V závislosti na čase a subcelulární lokalizaci zahrnuje proteom všechny proteinové varianty (proteofomy), metabolický obrat proteinů, interakce mezi jednotlivými proteiny i proteinové komplexy. Proteom má dynamickou povahu – hladina proteinů se v buňce stále mění v závislosti na aktuálních potřebách organismu, na rozdíl od genové výbavy buňky, která se takto dynamicky nemění. Transkriptomické analýzy zabývající se expresí mRNA k popisu realizace genetické informace nejsou dostatečné, protože nukleové kyseliny obecně pouze reprezentují plány dané buňky. Z hladiny transkriptu nelze spolehlivě odvodit hladinu proteinu, neboť míra transkripce mRNA koreluje s výsledným množstvím proteinu jen částečně [4]. Biologické procesy

zkoumaných organizmů je proto nutné studovat na úrovni fenotypu a finálními tvůrci fenotypu jsou právě proteiny.



Obrázek 1: Schematické znázornění komplexity proteomu v porovnání s genomem a transkriptomem. Lidský genom obsahuje přibližně 21 000 genů kódujících protein. Předpokládá se, že tyto geny produkují průměrně 5 až 6 různých mRNA variant. Každá z těchto mRNA je translatována do aminokyselinového řetězce, který je dále modifikován a vzniká tak průměrně 8 až 10 odlišných proteoforem [5]. Finálních produktů genové exprese může existovat až 1 milion ($21\,000 \times 6 \times 10 = 1\,260\,000$).

Ke komplexitě a dynamičnosti proteomu, kromě variability v expresi proteinů, přispívá i fakt, že počty kopií proteinů se v rámci jediné buňky mohou lišit od desítek kopií až po desítky milionů kopií. Řádově jsou rozdíly koncentrací proteinů v tkáních až 10^7 [6]. V biologických tekutinách může být dynamický rozsah koncentrací proteinů ještě větší, například v séru je řádový rozdíl až 10^{10} [7].

O popis proteomu/ů usiluje **proteomika**. Proteomika je vědní obor, či spíše soubor analytických metod, umožňující kvalitativní a kvantitativní hodnocení proteomu, včetně studia struktury, funkce, lokalizace a interakce mezi proteiny. Hlavní náplní této dizertační

práce je tzv. **expresní proteomika** studující rozdíly v expresi či koncentraci proteinů mezi dvěma a více vzorky. Kvantitativně porovnává proteomy tělních tekutin, tkání a buněčných liniích za různých podmínek s cílem charakterizovat molekulární mechanismy probíhající ve studovaném organismu. Výchozím materiálem expresních proteomických studií jsou složité směsi obsahující tisíce proteinů, které jsou analyzovány kombinací separačních (hlavně elektroforetických a chromatografických) metod a identifikovány, případně kvantifikovány, pomocí hmotnostní spektrometrie.

Právě proteomické přístupy a nástroje jsme využili ke studiu molekulárních mechanismů závažných onemocnění jak na biologických vzorcích pacientů, tak na modelovém organismu a buněčné kultuře a jsou těžištěm této dizertační práce.

Technické možnosti současných analytických metod a především hmotnostních spektrometrů nedosahují takového dynamického rozsahu, aby byly schopné pokrýt tak vysoký rozsah koncentrací proteinů, který v biologických vzorcích existuje. Komplexní směsi proteinů je proto nutné podrobit frakcionaci pomocí vhodné separační metody, nebo kombinací několika separačních metod s ohledem na typ vzorku a cíl experimentu. Separací metody jsou popsány v následující kapitole.

1.2 Separáční metody využívané v proteomice

Nejvyužívanějšími metodami k dělení komplexních proteinových vzorků jsou elektroforetické a chromatografické separáční techniky, které společně s hmotnostní spektrometrií tvoří základní nástroje proteomiky.

1.2.1 Elektroforetick separace

Elektroforéza je jednou ze základních a nejstarších separáčnch metod dělení proteinů. Založen je na rozdíln pohyblivosti iontů ve stejnosměrném elektrickém poli a pro proteomiku má zásadn význam.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti detergentu

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti detergentu dodecylsulfátu sodného (sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) je založen na objevech S. Raymonda [8], který první použil polyakrylamidový gel jako médium pro elektroforézu a A. L. Shapiroa s R. Pitt-Riversovou, kteří odhalili skutečnost, že množství detergentu SDS vázaného na protein je funkcí molekulové hmotnosti proteinu [9, 10].

SDS-PAGE dělí proteiny na základě jejich odlišn molekulové hmotnosti. SDS je anionick detergent, který zajišťuje denaturaci proteinů a uděluje jim záporn náboj. Většina proteinů váže SDS ve stejném poměru, asi 1,4 g SDS na gram proteinu. Vazbou na protein SDS stn náboj proteinu a ten v elektrickém poli migruje pouze na základě negativního náboje SDS a rychlost migrace proteinů je funkcí hmotnosti proteinů.

Izoelektrická fokusace

Další elektroforetickou metodou klíčovou pro proteomiku je izoelektrická fokusace (isoelectric focusing, IEF). Při IEF protein/peptid vlivem elektrického proudu migruje v gelu v gradientu pH do okamžiku, kdy se dostane do oblasti pH shodného s jeho izoelektrickým bodem (pI) a tam vlivem vyrovnání dílčích kladných a záporných nábojů migrovat přestane, je zaostřen. Možnost separace amfoterních molekul v gradientu pH jako první publikoval H. Svensson v roce 1961 [11]. K praktickému využití otevřel dveře v roce

1982 B. Bjellqvist, který derivatizoval akrylamid karboxy- a aminoskupinami a tím umožnil vytvoření stabilního gradientu pH a zvýšil tak reprodukovatelnost a rozlišovací schopnost IEF (izoelektrická fokusace v imobilizovaném gradientu pH, immobilized pH gradient – isoelectric focusing, IPG-IEF) [12].

Obě metody (SDS-PAGE a IPG-IEF) se kombinují do dvourozměrné separace (více v kapitole 1.3 Proteomické strategie, str. 19).

1.2.2 Chromatografická separace

Kromě elektroforetických metod využívá proteomika také metody chromatografické, především chromatografii kapalinovou. Chromatografické separační metody jsou založeny na rozdílné distribuci analytu mezi mobilní a stacionární fází. U kapalinové chromatografie (liquid chromatography, LC) tvoří mobilní fázi kapalina. Ta unáší proteiny/peptidy vrstvou stacionární fáze, se kterou proteiny/peptidy podle svých fyzikálně-chemických vlastností (velikosti, náboje, hydrofobicity) v různé míře interagují a jsou na základě těchto interakcí stacionární fází zadržovány. Dochází tak k jejich separaci. Míra interakce analytu se stacionární fází je samozřejmě závislá také na vlastnostech mobilní fáze.

Dělení aminokyselin a peptidů kapalinovou chromatografií bylo možné již po roce 1940 [13]. Postupný vývoj stacionárních fází vedl k vysokému rozlišení chromatografie, především zavedením malých sférických částic stacionární fáze s možností modifikovat jejich povrch. Použití malých částic stacionární fáze je však nutně spojeno se separací za vysokých tlaků, byla tak vyvinuta vysokotlaká kapalinová chromatografie (high pressure/performance liquid chromatography, HPLC) [14].

Separační LC techniky jsou založeny na různých vlastnostech proteinů/peptidů. Separovat lze proteiny například podle jejich velikosti gelovou filtrací (size-exclusion chromatography), podle jejich náboje (iontoměničová chromatografie), na základě specifických interakcí (afinitní chromatografie), nebo podle hydrofobicity proteinů/peptidů (chromatografie s reverzní fází, reverse phase-HPLC) [15].

Dnes je k separaci proteinů a především peptidů v proteomických analýzách nejčastěji používána LC s mikro- a nanolitrovými průtoky v uspořádání RP-HPLC, často v režimu s gradientovou elucí, a to díky vysoké rozlišovací schopnosti a kompatibilitě

s hmotnostní spektrometrií. Stacionární fázi zde tvoří nepolární uhlovodíkové řetězce (o délce C₄-C₁₈) chemicky vázané na nosič. Mobilní fázi tvoří směs vody s organickými rozpouštědly, zejména acetonitrilem a methanolem. Režim gradientové eluce znamená, že je během analýzy snižována polarita mobilní fáze (zvyšujícím se podílem organického rozpouštědla), což umožňuje postupnou eluci proteinů či peptidů z chromatografické kolony podle jejich relativní hydrofobicity. Vzhledem k typu mobilní fáze je možné přímo (on-line) spojit výstup kolony s iontovým zdrojem hmotnostního spektrometru, nebo eluované peptidy sbírat a provádět hmotnostní analýzu následně (off-line) [16].

Separční techniky na principu LC lze, podobně jako elektroforetické separace, uspořádat do vícerozměrných separací, kdy je v každém rozměru využita jiná vlastnost proteinů/peptidů. Pro rozdělení komplexních peptidových směsí ve dvou rozměrech je v proteomice nejčastěji kombinována chromatografie na iontoměničích se separací s reverzní fází [17]. RP-LC je téměř vždy posledním krokem separace právě díky kompatibilitě s hmotnostní spektrometrií.

1.3 Proteomické strategie

Pro separaci, identifikaci a kvantifikaci proteinů/peptidů využívá expresní proteomika dvě základní strategie:

- 1) tzv. „klasickou“ strategii využívající separace intaktních proteinů, typickým příkladem je dvourozměrná elektroforéza (2-DE)
- 2) strategii „shotgun“ (neboli brokovnice) založenou na jedno- nebo vícerozměrné separaci peptidů, které vznikly naštěpením analyzovaného proteinového vzorku specifickou endoproteázou

1.3.1 „Klasická“ strategie (2-DE)

„Klasické“ uspořádání proteomické analýzy provádí separaci komplexních vzorků na úrovni intaktních proteinů. Nejběžnější design „klasického“ uspořádání představuje dvourozměrná elektroforéza (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (Obrázek 2).

Separace pomocí 2-DE je v obou rozměrech založena na odlišných vlastnostech proteinů – v prvním rozměru je směs proteinů separována izoelektrickou fokusací na prouzcích gelu v imobilizovaném gradientu pH (IPG-IEF) podle náboje proteinu, ve druhém rozměru jsou „zaostřené“ proteiny dále (kolmo na směr původní separace) děleny v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti detergentu SDS (SDS-PAGE) podle jejich molekulové hmotnosti (M_r).

Výsledkem 2-DE je polyakrylamidový gel, na kterém je možné vizualizovat stovky proteinových spotů (skvrn). Vizualizace na 2-DE gelu se provádí kolorimetricky barvením viditelnými pigmenty (Coomassie Brilliant Blue, dusičnan stříbrný), nebo fluorescenčně (pomocí fluoroforů, např. Sypro, cyaninové barvy), případně radioaktivně (s využitím metabolické inkorporace radioaktivních izotopů do proteinů). Z proteinového spotu může být protein identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie.

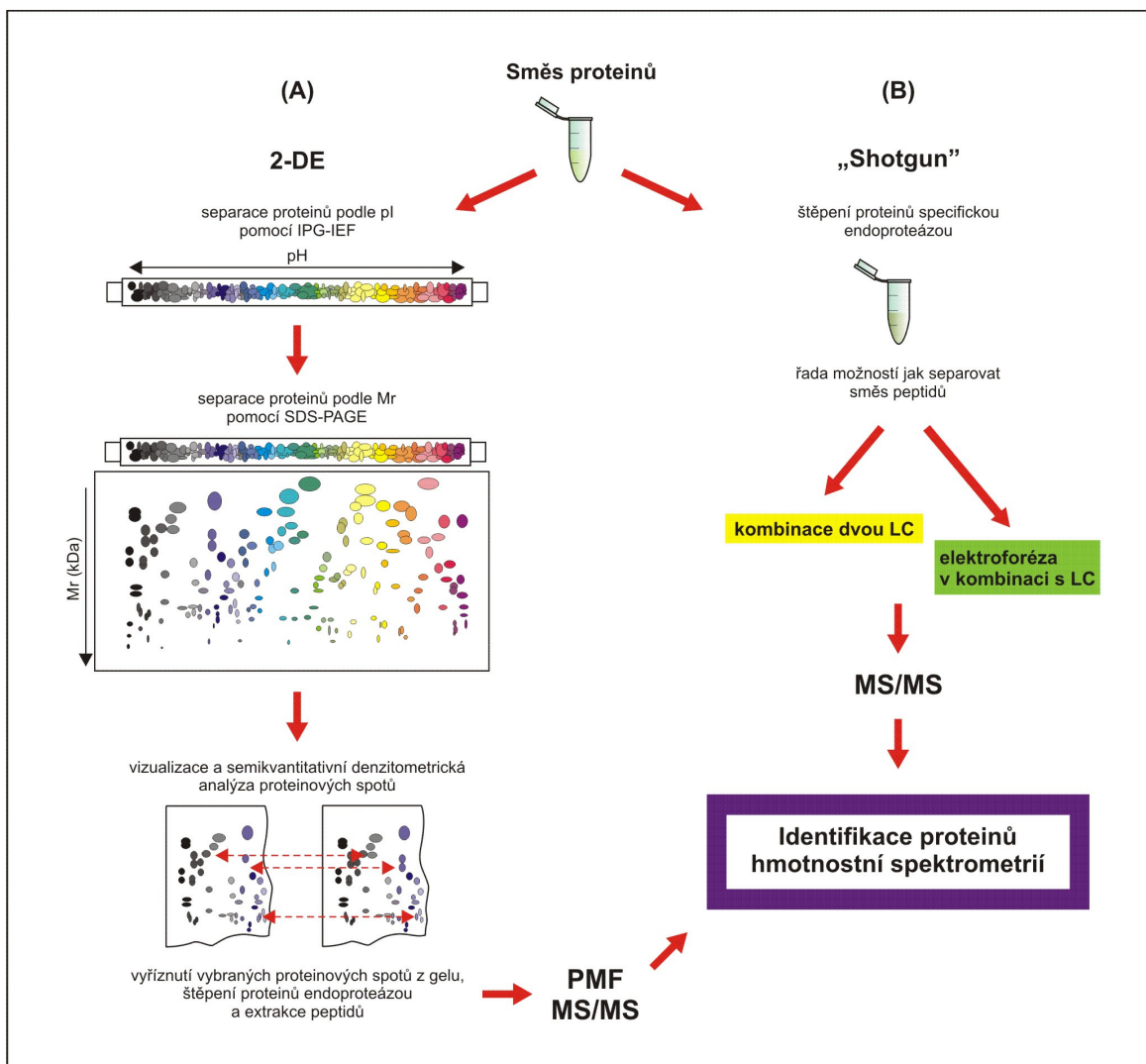
Poprvé úspěšně zkombinoval IEF s SDS-PAGE P. O'Farrell v roce 1975 [18]. Na jediném 2-DE gelu rozdělil 1 100 proteinových spotů lyzátu *E. coli*. Široce se začala 2-DE používat v 90. letech 20. století, kdy byly vyvinuty algoritmy a programy pro analýzu obrazů proteinových spotů na 2-DE gelech a především techniky k identifikaci proteinů

z minimálního množství, které je ze spotu možné extrahovat, pomocí hmotnostní spektrometrie. Hmotnostní spektrometrie je rychlejší a citlivější než Edmanovo sekvenování, které bylo pro identifikaci proteinů používáno hlavně v období 1950 – 1990 [19] a poskytuje více informací. Po obrazové analýze gelů je vybraný proteinový spot z gelu vyříznut a proteiny v gelu jsou specifickou endoproteázou (nejčastěji trypsinem) štěpeny na peptidy. Ty je možné z gelu extrahovat organickým činidlem a protein, ze kterého peptidy pocházejí, identifikovat pomocí MS (více v kapitole 1.4 Hmotnostní spektrometrie, str. 23).

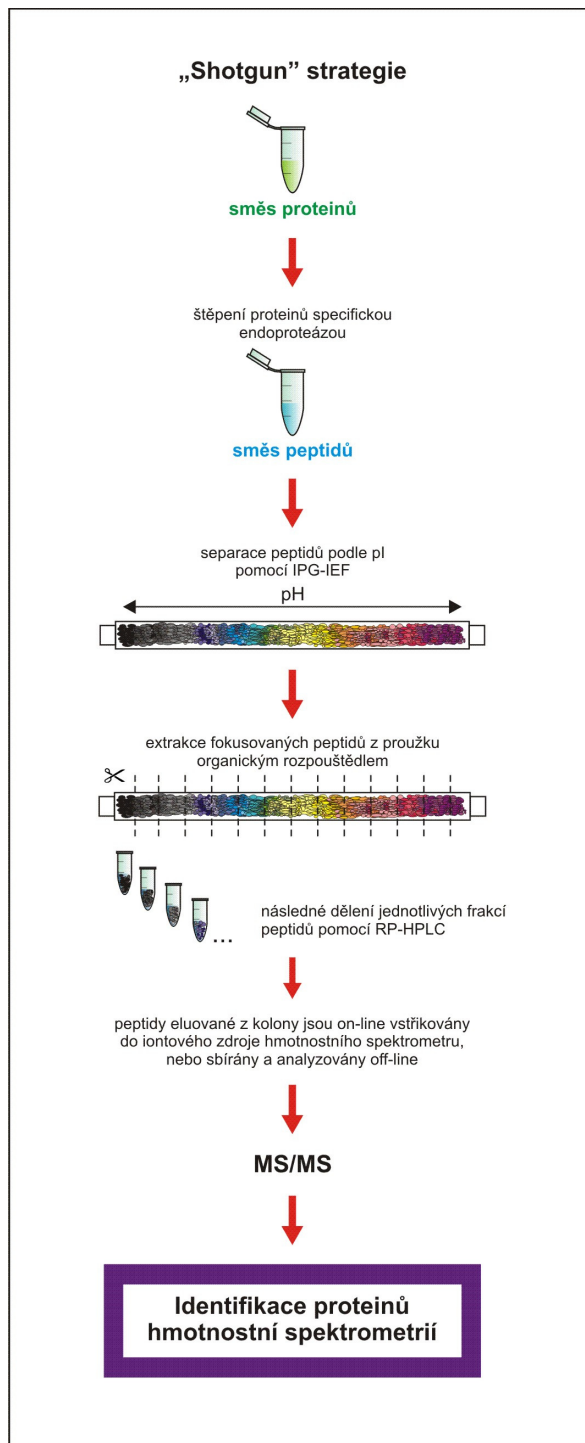
1.3.2 Strategie „shotgun“

Podstatou „shotgun“ přístupu je dělení proteinových vzorků na úrovni peptidů, které vznikají štěpením proteinů specifickou endoproteázou, před samotným začátkem separace. Peptidy mají lepší separační vlastnosti pro LC než intaktní proteiny (peptidy jsou menší a kratší – jejich separace není ztížena interakcemi v rámci jedné molekuly tolik, jako u proteinů). Nejpoužívanější endoproteázou je trypsin, který specificky štěpí proteinový řetězec za každým argininem a lyzinem v aminokyselinové sekvenci proteinu (pokud nenásleduje prolin). Štěpením proteinových vzorků trypsinem vzniká složitá peptidová směs o průměrné velikosti peptidů 10 až 20 aminokyselin (z jednoho proteinu vzniká průměrně 30 až 40 peptidů). Celý vzorek se tak stává komplexnějším a je nutné použít několikastupňovou separaci až stovek tisíc různých peptidů. Kombinovat lze různé separační metody, nejčastěji dvě LC (iontoměničovou chromatografii s RP-LC) (Obrázek 2). Při řešení dvou projektů komentovaných v kapitolách 2.2 a 2.3 jsme použili méně častou dvourozměrnou separaci směsi peptidů kombinující IEF peptidů s následnou RP-LC extrahovaných peptidů (Obrázek 3).

Posledním krokem v separaci peptidů je vždy RP-LC, kdy jsou peptidy děleny podle jejich hydrofobicity, protože peptidy eluované organickým rozpouštědlem mohou být 1) přímo z kolony přiváděny do iontového zdroje hmotnostního spektrometru (ESI-MS/MS), nebo 2) roboticky sbírány na MALDI terčik a následně identifikovány pomocí MALDI-MS/MS (více v kapitole 1.4 Hmotnostní spektrometrie, str. 23).



Obrázek 2: Schéma strategie 2-DE (A) a strategie „Shotgun“ (B). (A) komplexní směs proteinů je separována pomocí IPG-IEF podle pI, následně jsou proteiny separovány podle jejich Mr pomocí SDS-PAGE. Po ukončení elektroforézy jsou gely promývány a separované proteiny na gelu barveny. Po naskenování gelů a denzitometrické analýze proteinových spotů jsou vybrané spoty z gelu vyříznuty, proteiny v nich štěpeny endoproteázou (nejčastěji trypsinem) na peptidy a vzniklé peptidy jsou extrahovány a identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. (B) komplexní směs proteinů je před separačními kroky štěpena endoproteázou na peptidy. Pro následnou separaci směsi peptidů je možné kombinovat řadu technik, nejběžněji jde o dvě LC, kdy každá je založena na jiném principu, nebo o kombinaci IEF s následnou LC. Separované peptidy jsou následně analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie (metodami PMF nebo MS/MS viz Hmotnostní spektrometrie, str. 24).



Obrázek 3: Schéma proteomické strategie „shotgun“ využívající k dělení směsi peptidů méně obvyklou kombinaci IPG-IEF peptidů s následným dělením fokusovaných peptidů (extrahovaných z IPG proužku) na koloně RP-HPLC. Eluované peptidy mohou být přímo vstříkovány do iontového zdroje hmotnostního spektrometru a identifikovány on-line (ESI-MS/MS), nebo jsou spotovány na MALDI terčích a analyzovány off-line (MALDI-MS/MS, viz Hmotnostní spektrometrie, str. 24)

1.4 Hmotnostní spektrometrie

Ať už si zvolíme 2-DE, nebo strategii „shotgun“, po zjednodušení směsi separačními technikami získáme peptidy (pocházející z jednoho proteinu v případě 2-DE, nebo ze směsi proteinů v případě „shotgun“), které identifikujeme hmotnostní spektrometrií. Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda měřící přesnou (molekulovou) hmotnost chemických látek. Analýzu proteinů a peptidů pomocí MS umožnil vývoj měkkých ionizačních technik, jako je ionizace elektrosprejem (electrospray ionization, ESI) [20, 21] a ionizace laserem v přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) [22], při kterých nedochází k rozpadu iontů makromolekul, protože energie použitá na vznik iontů je nízká. Hmotnostní spektrometr v iontovém zdroji generuje ze vzorku peptidů ionty v plynné fázi, které jsou rozděleny v hmotnostním analyzátoru podle poměru hmoty iontu a náboje (m/z , mass-to-charge ratio). Hmotnostní analyzátoři jsou další důležitou součástí spektrometrů, mezi nejpoužívanější patří analyzátor doby letu (time of flight, TOF), kvadrupólová iontová past, iontová cyklotronová rezonance, hybridní přístroje kombinující kvadrupólové analyzátoři s TOF, nebo orbitrap [23-25]. Po rozdělení v analyzátoru podle hodnot m/z ionty následně dopadají na detektor, který jejich signály zaznamenává. Výstupem je pak hmotnostní spektrum, což je grafické znázornění četnosti iontů (intenzita) v závislosti na hodnotě m/z .

Jednotlivé peptidy jsou definovány svou aminokyselinovou sekvencí, která zároveň určuje hmotnost peptidu a rovněž hmotnost jeho fragmentů. Na základě porovnání hmotnosti peptidu (nebo jeho fragmentů, hodnoty m/z , viz níže podkapitola Peptidový fingerprinting a Sekvenování peptidů, str. 24) změřené spektrem s teoretickou hmotností vypočítanou z jeho aminokyselinové sekvence lze peptid identifikovat. Teoretické hodnoty m/z peptidů a jejich fragmentů jsou odvozovány *in silico* z genových a proteinových databází. Přiřazení odpovídající sekvence aminokyselin naměřené hodnotě m/z peptidu, nebo jeho fragmentu, je provedeno softwarem (za předpokladu, že je sekvence původního proteinu, nebo kódujícího genu, v databázích přítomna). Pokud je spektrum identifikováno, tedy přiřazeno určitému peptidu, je následně odvozen i protein, který daný peptid obsahuje. Míra korelace mezi experimentálními a databázovými hodnotami m/z se označuje jako skóre a výsledek s nejvyšším skóre je považován za správný. Pokud skóre nedosáhne určité hodnoty, identifikaci nelze považovat za spolehlivou.

Identifikace proteinů pomocí MS na základě porovnání naměřených dat s teoretickými hmotnostmi peptidů a jejich fragmentů vypočtených na základě známých sekvencí kódujících genů byla demonstrována poprvé v roce 1993 [26-29].

Existují dvě základní metody identifikace proteinu pomocí MS, a to tzv. peptidový fingerprinting a sekvenování peptidu.

1.4.1 Peptidový fingerprinting

Metoda peptidového fingerprintingu (peptide mass fingerprinting, PMF, peptidové mapování) je založena na porovnání změřených přesných hmotností (hodnot m/z) peptidů vzniklých z proteinu po štěpení určitou endoproteázou (typicky trypsinem) s teoretickými hodnotami m/z peptidů v genových a proteinových databázích [30].

Postup identifikace proteinů pomocí PMF z 2-DE gelu je následující: protein je v gelu štěpen trypsinem na peptidy, vzniklé peptidy jsou z gelu extrahovány organickými rozpouštědly a po další úpravě (objemu a pH vzorku) jsou peptidy ionizovány v hmotnostním spektrometru (metodou MALDI, ESI). Po ionizaci vzorku prolétají ionty peptidů analyzátozem a dopadají na detektor, který měří jejich přesnou hodnotu m/z a vzniká tak MS spektrum. Hodnoty m/z peptidů (píků) z MS spektra jsou vyhledávacím algoritmem porovnány s hodnotami m/z všech teoretických tryptických peptidů v databázích a pokud dojde ke shodě s určitou hodnotou skóre, dojde k identifikaci proteinu, ze kterého peptidy vznikly.

PMF se využívá v případě, kdy vzorek určený k identifikaci obsahuje peptidy pouze několika proteinů, nejlépe jen jednoho. Proto se PMF používá hlavně v kombinaci s 2-DE. Při „shotgun“ experimentech PMF využít nelze, protože při této strategii se v jednom MS spektru nachází píky peptidů vzniklých z velkého množství proteinů a k identifikaci nedojde.

1.4.2 Sekvenování peptidů

Sekvenování peptidů (tandemová MS, MS/MS, fragmentace peptidů) je založené na tzv. proteinové inferenci [31], kdy je fragmentací peptidů v hmotnostním spektrometru

získána částečná nebo úplná aminokyselinová sekvence peptidů, ze které je odvozen původní protein. Tuto metodu je nutné použít při „shotgun“ přístupu, kdy jsou peptidy vzniklé štěpením velkého množství proteinů kontinuálně (nezávisle na tom, z jakého proteinu vznikly) eluovány z kolony LC a ionizovány pomocí měkké ionizační techniky. V jednom MS spektru se tak nachází píky peptidů pocházejících z mnoha různých proteinů a z takových spekter k identifikaci proteinů nedojde. Proto jsou některé peptidy z MS spektra vybrány jako prekurzory pro další, následnou ionizaci (proto tandemová MS nebo MS/MS). K té dochází v kolizní cele nebo iontovém zdroji spektrometru a vybrané prekurzorové peptidy jsou dále fragmentovány (srážkami s molekulami inertního plynu nebo zvýšením disociační energie). Fragmentací se peptid rozpadá především v peptidické vazbě a vznikají tak různě velké fragmenty, které jsou následně děleny podle m/z v hmotnostním analyzátoru a dopadají na detektor. Vznikají tak MS/MS spektra fragmentů peptidu a změřené přesné hmoty peptidu a jeho fragmentů jsou vyhledávacím algoritmem porovnány s databázemi, dojde ke stanovení aminokyselinové sekvence analyzovaného peptidu a tím i k identifikaci původního proteinu.

Moderní hmotnostní spektrometry jsou schopné identifikovat v jednom experimentu až několik tisíc proteinů [6, 32] a dosahují relativně vysokého dynamického rozsahu a rozlišení. Nejvyšších hodnot rozlišení, což je schopnost spektrometru odlišit dva různé píky v hmotnostním spektru s téměř shodnou hodnotou m/z , dosahuje iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier transform ion cyclotron resonance, FT-ICR) [33].

1.5 Kvantifikace v proteomice

Jak již bylo zmíněno dříve, expresní proteomika hledá rozdíly mezi různými stavy proteomu a na jejich základě usiluje o popis molekulárních mechanismů. Hledá ty proteiny, které jsou ve dvou či více vzorcích buněčných linií či tkání diferencially exprimované, nebo se mezi dvěma či více vzorky nacházejí v rozdílných koncentracích (tělní tekutiny). Taková (semi-) kvantitativní analýza je tedy nutně závislá na spolehlivém stanovení relativního množství individuálních proteinů v porovnávaných vzorcích. Kvantitativní informaci o proteinu lze získat dvěma způsoby, a to buď denzitometrií spotů při 2-DE, nebo kvantifikací signálů pomocí hmotnostní spektrometrie v případě „shotgun“ experimentů.

1.5.1 Kvantifikace při 2-DE uspořádání

Dvourozměrná elektroforéza umožňuje semikvantitativní porovnání množství proteinů mezi gely. Po separaci proteinů jsou proteinové spoty na gelu vizualizovány, gely jsou skenovány a skeny analyzovány pomocí softwaru, který vyhodnocuje optickou denzitu shodných spotů. Porovnáním (obrazovou analýzou) skenů získáme informaci o relativním poměru intenzit shodných proteinových spotů mezi jednotlivými gely. Až po této semikvantitativní analýze extrahujeme z vybraných spotů s odlišnou denzitou peptidy a identifikujeme je pomocí hmotnostní spektrometrie (pomocí PMF či MS/MS).

1.5.2 Kvantifikace v „shotgun“ experimentech

Zatímco výsledkem 2-DE je gel s vizualizovanými proteinovými spoty, které je možné analyzovat denzitometricky a kvantifikovat, při „shotgun“ přístupu je potřeba využít ke kvantifikaci hmotnostní spektrometrii. MS však není sama o sobě kvantitativní metodou. Intenzita signálu iontu (výška, plocha píku) ve spektru nevypovídá přímo o množství peptidu ve vzorku, protože je ovlivněná řadou faktorů – například schopností peptidu být ionizován, množstvím ionizovaného peptidu dopadlého na detektor a dalšími složkami vzorku, které ionizaci ovlivňují. Prostým porovnáním dvou MS či MS/MS

spekter, pocházejících ze dvou různých vzorků, spolehlivě kvantifikovat nelze. Lze však porovnávat signál dvou identických, ale odlišitelných peptidů v rámci jednoho spektra. Toho lze docílit vnesením stabilních izotopů do struktury peptidu. Metody kvantifikace pomocí MS jsou proto založeny především na využití značení stabilními izotopy. V posledních letech však sílí i snahy o získání kvantitativní informace přímo z hmotnostních spekter bez značení stabilními izotopy využitím tzv. label-free metod.

Značení proteinů/peptidů stabilními izotopy

Kvantifikační metody využívající stabilních izotopů jsou založeny na schopnosti MS rozlišit izotopové složení peptidů chemicky identických látek v jednom hmotnostním spektru. Informaci o relativním množství peptidu lze získat porovnáním intenzity signálu dvou identických peptidů v jediném hmotnostním spektru. Aby je však bylo možné od sebe odlišit, musí se tyto peptidy lišit svou hmotností, a to vlivem různého zastoupení stabilních izotopů (především ^{13}C , ^{15}N a ^{18}O) v jejich molekulách. Vzorky proteinů/peptidů označených různými kombinacemi stabilních izotopů lze smíchat a analyzovat jako jediný vzorek, k jejich odlišení a relativní kvantifikaci pak dochází na úrovni MS spektra nebo MS/MS spektra.

Kvantifikace proteinů využívající inkorporace stabilních izotopů se stala centrální technologií v moderním proteomickém výzkumu. Vnést stabilní izotop do aminokyselinové sekvence proteinu/peptidu můžeme několika způsoby: metabolicky (metoda SILAC), enzymaticky (značení ^{18}O), nebo chemicky (značení iTRAQ). Jednotlivé způsoby inkorporace stabilních izotopů jsou vysvětleny v následujících odstavcích.

SILAC

Metoda SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) [34] je založena na metabolickém značení proteinů v buněčné kultuře pomocí inkorporace esenciálních aminokyselin nesoucích stabilní izotopy uhlíku a/nebo dusíku (^{13}C , ^{15}N). Při porovnání dvou buněčných linií je jedna pěstována v přítomnosti běžných „lehkých“ aminokyselin a druhá linie v médiu, kde je jedna (nebo více) esenciálních aminokyselin (typicky arginin a/nebo lyzin) nahrazena „těžkými“ aminokyselinami (argininem a/nebo lyzinem obsahujícím stabilní izotopy ^{13}C a/nebo ^{15}N). Po několika buněčných děleních, během kterých jsou aminokyseliny inkorporovány do nově syntetizovaných proteinů,

obsahují proteiny první buněčné linie „lehké“ aminokyseliny zatímco buňky druhé linie nesou v proteinech „těžké“ aminokyseliny. Buňky obou linií jsou sklizeny a smíchány v poměru 1:1. V hmotnostním spektru jsou pak chemicky identické peptidy dvou buněčných linií rozlišitelné díky hmotnostnímu rozdílu vnesenému stabilním izotopem – rozdíl mezi „lehkým“ a „těžkým“ peptidem je řádově v jednotkách Daltonů v závislosti na použitých izotopech. Kvantifikace proteinů je provedena na úrovni PMF nalezením odpovídajícího páru „lehký“-„těžký“ peptid a porovnáním intenzity jejich signálu. Identifikace proteinu je provedena sekvenováním peptidů (MS/MS).

SILAC je široce využívaná metoda pro vysokou účinnost značení, vysokou přesnost a možnost značené vzorky kombinovat (smíchat) před dalším zpracováním, takže kvantifikace není ovlivněná rozdílnou přípravou vzorků. U buněk značených stabilními izotopy metodou SILAC nebyly pozorovány žádné patologické změny v porovnání s buněčnou kulturou rostoucí v prostředí neznačených aminokyselin [34]. Kromě buněčných linií již existují i složitější modelové organizmy značené touto metodou, např. některá prokaryota (*E. coli*), rostliny (*A. thaliana*), houby (*S. cerevisiae*), bezobratlí (*C. elegans*), ryba (pstruh duhový), pták (kur bankivský) a savci (myš, potkan) [35].

Enzymatické značení

Další kvantifikační metodou je enzymatické značení stabilním izotopem ^{18}O . Tato metoda využívá trypsinové štěpení proteinů ve vodném prostředí, a to štěpení jednoho vzorku proteinů v běžné H_2O a druhého vzorku proteinů v izotopicky značené H_2^{18}O . Trypsin štěpí peptidický řetězec za argininem a lyzinem vnesením $-\text{OH}$ do aminokyseliny na C-konci peptidu a $-\text{H}$ do aminokyseliny na jeho N-konci. Do peptidů vznikajících štěpením jednoho vzorku proteinů je tak inkorporován ^{16}OH a do peptidů vznikajících štěpením druhého vzorku proteinů zase ^{18}OH [36]. Vzniklé „lehké a těžké peptidy“ jsou poté smíchány v poměru 1:1 a po frakcionaci analyzovány pomocí MS. V jednom spektru je pak možné podle intenzit píků peptidu ^{16}OH a ^{18}OH určit relativní množství peptidů v původních vzorcích – kvantifikace proteinu probíhá na úrovni MS spektra a identifikace na úrovni MS/MS spektra.

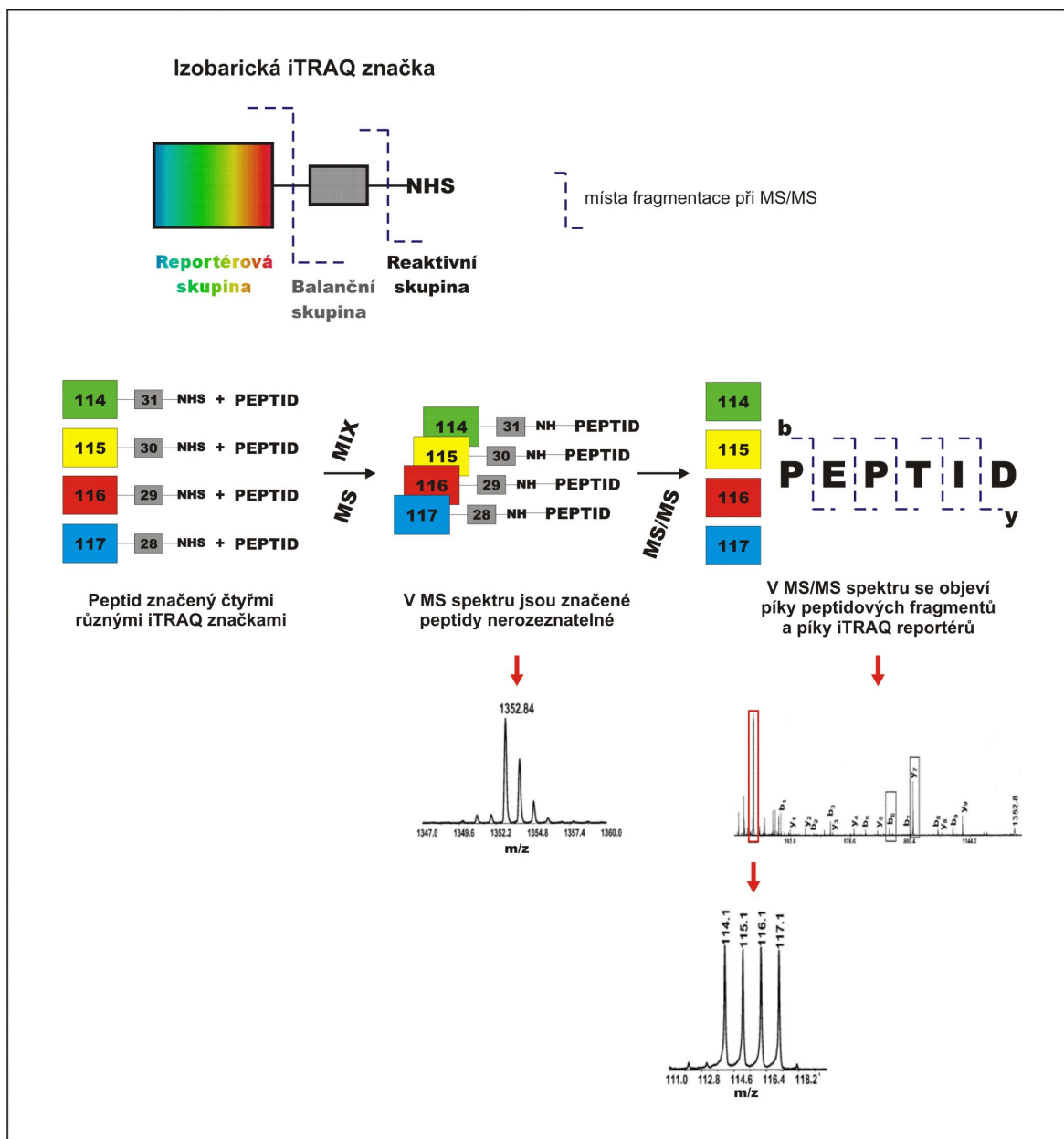
Touto metodou je možné kvantifikovat směsi proteinů maximálně ve dvou vzorcích.

iTRAQ

Třetí kvantifikační metodou využívající stabilní izotopy je metoda iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) založená na chemickém značení tryptických peptidů syntetickými izobarickými značkami [37]. iTRAQ značky se skládají vždy ze tří částí (Obrázek 4). První část značky tvoří reaktivní skupina, která se kovalentně váže na aminy peptidů vzniklých štěpením proteinů trypsinem, a to na jejich N-konec nebo na ϵ -aminoskupinu lyzinu. Druhou část tvoří reportérová skupina, která má v každé iTRAQ značce jinou hmotnost, a která je při fragmentaci peptidu odštěpena a ionizována a objeví se v MS/MS spektru. Třetí část tvoří neutrální balanční skupina, která má také v každé iTRAQ značce jinou hmotnost a tím zajišťuje, aby všechny značky měly stejnou výslednou hmotnost (byly tedy izobarické). Značky po vazbě na peptidy zachovávají jejich chemickou identitu, protože se liší pouze izotopovým složením. Neliší se ani hmotnost stejných peptidů označených různými iTRAQ značkami. iTRAQ značky jsou dostupné v několika kombinacích (reportérová část o hmotnosti 114-117 pro analýzu čtyř vzorků, nebo o hmotnosti 113-121 pro analýzu až osmi vzorků).

Ke každému vzorku je přidána jiná značka, poté jsou označené peptidy smíchány v poměru 1:1, výsledná směs separována a analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie. Signály identických (izobarických) peptidů jsou v MS spektru nerozlišitelné, jejich píky se překrývají. Stejně tak se překrývají signály fragmentů identických peptidů v MS/MS spektru. Na úrovni MS/MS spekter je provedena identifikace peptidů a také kvantifikace, protože při fragmentaci jsou rozštěpeny i iTRAQ značky a reportérové ionty se v MS/MS spektru objeví v oblasti m/z 114-117 (resp. 113-121). Intenzita signálů reportérových iontů v MS/MS spektru vypovídá o relativním množství peptidu v jednotlivých vzorcích – v jednom MS/MS spektru je kvantitativní informace o množství peptidu ve všech čtyřech (resp. až osmi) vzorcích.

Metoda iTRAQ je vhodná ke kvantifikaci tam, kde nelze použít metodu SILAC, tedy ke kvantifikaci proteinů v již odebraných tkáních, tělních tekutinách apod. Pomocí iTRAQ značek můžeme najednou analyzovat až osm různých vzorků v jednom experimentu. Existují i konkurenční značky na podobném principu, například TMT (tandem mass tagging) [38] a IPTL (isobaric peptide termini labeling) [39].



Obrázek 4: Schéma značek iTRAQ a jejich použití (převzato z Applied Biosystems). Ke každému ze čtyř vzorků je přidána jiná iTRAQ značka (114, 115, 116 nebo 117). Reaktivní skupinou se značky kovalentně váží na peptidy ve vzorku, v jednom vzorku tak všechny peptidy nesou jednu značku. Poté jsou označené peptidy smíchány v poměru 1:1:1:1, výsledný MIX je separován a analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie. Signály identických (izobarických) peptidů ze všech čtyř vzorků jsou v MS spektru nerozlišitelné, jejich píky se překrývají. Stejně tak se překrývají signály fragmentů identických peptidů v MS/MS spektru. Ty jsou použity k identifikaci peptidu a tím proteinu. Na úrovni MS/MS spekter je také provedena kvantifikace, protože fragmentací peptidu dojde i k odštěpení reportérových iontů iTRAQ značek z peptidu. Reportérové ionty se objeví v MS/MS spektru v oblasti m/z 114-117 a intenzita jejich signálů vypovídá o relativním množství peptidu v jednotlivých vzorcích – v jednom MS/MS spektru je relativní kvantitativní informace o množství peptidu ve všech čtyřech vzorcích.

Shrnutí metod kvantifikace pomocí stabilních izotopů

Izotopicky se dají značit proteiny v buněčné kultuře i vyšších organizmech (metabolicky), nebo v proteinových/peptidových vzorcích (enzymaticky a chemicky). Jsou to metody přesné a citlivé, ale vyžadují poměrně nákladné izotopické značky, speciální chemikálie, specifické programy na vyhodnocení a náročnou analýzu dat. Manipulací se vzorky při značení můžeme do experimentu vnést chyby a snížit tak reprodukovatelnost metod. Na druhou stranu výhodou těchto kvantifikačních metod je paralelní zpracování vzorků – po označení stabilními izotopy probíhá jejich analýza společně, což naopak reprodukovatelnost metod zvyšuje.

Vzhledem k finanční náročnosti izotopického značení ale existují snahy o odvozování kvantitativní informace přímo z hmotnostního spektra, tzv. label-free [40]. O těchto metodách se zmiňuji pouze okrajově, protože nebyly v dizertační práci využity a navíc jsou dosud spíše ve stádiu vývoje a ověřování.

Label-free kvantifikace pomocí MS

Relativní kvantifikace proteinů pomocí intenzity chromatografických píků

Tato metoda kvantifikace proteinů/peptidů je založena na porovnávání plochy píků peptidů při on-line spojení s ESI-MS/MS s množstvím proteinu/peptidu ve vzorku. Plochy píků identifikovaných peptidů rostou v závislosti na množství peptidů ve vzorku a tak i s množstvím proteinu v původním vzorku, dokonce i ve složité směsi různých proteinů.

Label-free kvantifikace pomocí počítání MS/MS spekter

Tato metoda (spectral counting) je založena na porovnávání počtu MS/MS spekter peptidů pocházejících z jednoho proteinu mezi dvěma či více vzorky. Peptidy pocházející z jednoho proteinu poskytují MS/MS spektra, jejichž množství je úměrné množství proteinu ve vzorku. Je-li proteinu v jednom vzorku více, zvýší se počet detekovaných peptidů a tím počet MS/MS spekter.

Label-free metody jsou alternativou k metodám využívajícím značení stabilními izotopy a nabývají na významu, protože nevyžadují drahé chemikálie na značení a kroky navíc jako metody využívající stabilní izotopy. Jsou ovšem náročné na statistické zpracování dat a vyžadují dodržení naprosto reprodukovatelné LC separace [40].

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Expresní proteomika usiluje o kvantitativní porovnání proteomu za dvou (či více) různých stavů s cílem popsat fyziologické i patologické procesy na molekulární úrovni. Proteomické nástroje se hodí zejména tam, kde chybí počáteční (*a priori*) hypotéza. Proteomika porovnává například různé stavy téže tkáně, nádorové buňky se zdravými buňkami či buňky rezistentní na určité léčivo s buňkami senzitivními atd. Výchozím materiálem proteomických studií jsou složité směsi (tělní tekutiny, homogenáty buněčných linií a tkání) obsahující tisíce proteinů. Proteomika kombinuje citlivé separační (hlavně elektroforetické a chromatografické metody) a kvantifikační metody spojené s hmotnostní spektrometrií a bioinformatikou.

Tato dizertační práce si klade za cíl demonstrovat využití různých proteomických nástrojů a dvou základních proteomických strategií (2-DE a „shotgun“) k řešení několika biomedicínských problémů. Expresní proteomika zde byla využita ke studiu molekulárních mechanismů závažných onemocnění, a to jak na biologických vzorcích pacientů, tak na buněčných kulturách a modelovém organismu.

Dílčí cíle práce:

- 1. Identifikovat potenciální molekulární cíle pro selektivní likvidaci buněk lymfomů z plášťové zóny rezistentních na protinádorovou molekulu TRAIL**
- 2. Popsat molekulární mechanismy srdečního selhání s využitím potkaního modelu objemového přetížení (a nalézt nové potenciální terapeutické možnosti)**
- 3. Nalézt diagnosticky využitelné biomarkery karcinomu ovaria**

Na následujících stránkách jsou jednotlivé dílčí cíle podrobně komentovány.

2.1 Identifikace potenciálních molekulárních cílů pro selektivní likvidaci buněk lymfomů z pláštěvé zóny rezistentních na protinádorovou molekulu TRAIL

Proteomická analýza TRAIL-rezistentních buněk lymfomu z pláštěvé zóny pomocí 2-DE

2.1.1 Lymfom buněk z pláštěvé zóny

Lymfom buněk z pláštěvé zóny (mantle cell lymphoma, MCL) patří mezi nehodgkinské lymfomy. MCL vzniká maligní transformací různých diferenciačních stádií B lymfocytů, a to z periferních B lymfocytů naivních, ale i z těch, které se již setkaly s antigenem. Jde o velmi agresivní, i když vzácný typ lymfomu s incidencí v Evropě průměrně 0,45/100 000 [41, 42]. MCL buňky nesou translokaci mezi chromozomy 11 a 14, t(11;14)(q13;q32), kde jsou umístěny geny kódující těžký imunoglobulinový řetězec a cyklin D1. Translokace způsobuje nadměrnou expresi cyklinu D1, což vede k nekontrolované proliferaci těchto buněk [43, 44].

Standardní léčba nově diagnostikovaných pacientů kombinuje různé režimy založené na rituximabu (imunochemoterapeutikum, monoklonální protilátka proti CD20 antigenu), cyklofosfamidu (alkylační činidlo), vinkristinu (inhibitor mitózy) a cytarabinu (analog pyrimidinových nukleosidů). Odezva pacientů na první fázi léčby je ale krátkodobá, u většiny pacientů dojde do 1,5 až 3 let k opětovnému propuknutí nemoci. Pro takové pacienty neexistuje standardní doporučená terapie [45], ve většině případů zahrnuje další fáze léčby různé režimy založené na kombinaci vysokých dávek fludarabinu (analog purinových nukleosidů), gemcitabinu (analog pyrimidinových nukleosidů), lenalidomidu (imunomodulační látka), bendamustinu (alkylační činidlo), bortezomibu (inhibitor proteazomu) nebo temsirolimu (inhibitor mTOR). I přes veškeré pokroky v terapii pacientů – během dvaceti let se jejich přežívání prodloužilo na 5 až 7 let od počáteční diagnózy [42] – zůstává MCL nevyléčitelným onemocněním, a proto je nutné hledat nové léky a terapeutické možnosti pro léčbu pacientů a zlepšení kvality jejich života.

Jednou z nových experimentálních molekul se silným protinádorovým účinkem a terapeutickým potenciálem k léčbě nádorových onemocnění včetně MCL je

proapoptotický cytokin TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand). TRAIL patří mezi transmembránové glykoproteiny [46, 47] schopné indukovat apoptózu přes vnější aktivační dráhu. Na svém povrchu ho exprimují buňky imunitního systému (NK buňky, cytotoxické T-buňky, makrofágy a dendritické buňky) [48, 49], ale jeho přesná molekulární úloha ve fyziologii není dosud jasná. TRAIL pravděpodobně tvoří součást imunitního systému schopnou rozeznat přítomnost transformované, abnormální buňky v těle a zareagovat na ni [50].

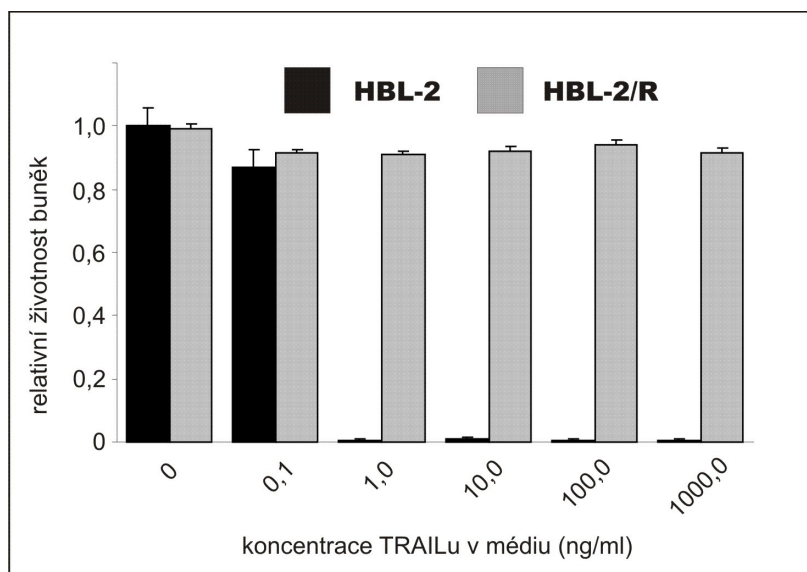
Lidský TRAIL je schopen vazby na čtyři různé receptory běžně exprimované na povrchu buněčných membrán, a to receptory DcR1, DcR2, DR4 a DR5 [51]. Pokud dojde k interakci mezi TRAILovým extracelulárním úsekem na jeho C-konci s tzv. „death doménou“ receptoru DR4 či DR5, dojde v cílové buňce ke strukturním změnám vedoucím k homotrimerizaci receptoru a formaci komplexu DISC (death-inducing signaling complex). DISCem jsou aktivovány iniciační a následně efektorové kaspázy, což vede k apoptóze cílové buňky [52]. Vnější dráhu aktivace apoptózy indukuje TRAIL pouze vazbou na receptory DR4 a DR5. Receptory DcR1 a DcR2 jsou tzv. „decoy“ receptory a postrádají funkční „death doménu“. TRAIL se na ně může i tak vázat, čímž „decoy“ receptory inhibují apoptózu kompeticí o TRAIL s „death“ receptory DR4 a DR5. „Decoy“ receptory také mohou interagovat s „death“ receptory a tím je inaktivovat [53-55].

Rekombinantní solubilní forma TRAILu má cytostatický nebo cytotoxický efekt na řadu nádorových buněčných linií, včetně leukemických a lymfomových buněk *in vitro*, ale netransformované buňky jsou na TRAIL rezistentní [46, 47]. Při experimentech s lidskými nádory transplantovanými imunodeficientním myším dochází po terapii TRAIlem k zastavení růstu nádorů, či jejich zmenšení [56]. Z výše uvedených důvodů byl TRAIL a protilátky cílené na jeho receptory zařazeny do několika klinických studií (www.clinicaltrials.gov) a je považován za látku se značným terapeutickým potenciálem.

Obecným problémem léčby nádorových onemocnění je vývoj rezistence nádorových buněk na terapii. Rezistence je často zodpovědná za selhání léčby, za progresi onemocnění a/nebo za relaps nemoci, a protože TRAIL není výjimkou [57], může být i jeho terapeutický potenciál vývojem rezistence omezen. Cílem této proteomické studie bylo identifikovat změny v expresi proteinů spojené s rezistencí lymfomových buněk na protinádorovou molekulu TRAIL a mezi identifikovanými proteiny vybrat takové molekuly, které by mohly tvořit „slabiny“ rezistentních buněk vhodné jako terapeutická zásahová místa. Dále bylo cílem na základě těchto „slabin“ navrhnout vhodné způsoby selektivní eliminace rezistentních buněk.

2.1.2 Odvození rezistentního subklonu

Buněčné linie odvozené od MCL (HBL-2, JEKO-1, REC-1, MINO, GRANTA-519) jsou senzitivní na indukci apoptózy TRAILem, nicméně při dlouhodobé expozici subletálními dávkami mohou buňky vyvinout rezistenci na TRAIL a/nebo dojde k vyselektování rezistentní buněčné subpopulace. Proteomickou studií jsme se rozhodli provést na buněčné linii HBL-2, což je zavedený laboratorní model MCL onemocnění. Z buněčné linie HBL-2, která je senzitivní na TRAIL (IC_{50} 1 ng/ml po 48 hodinách), jsme odvodili rezistentní subklon (HBL-2/R) tak, že jsme buňky vystavili zvyšujícím se koncentracím TRAILu v médiu, ve kterém buňky rostly. Po pěti týdnech jsme získali buňky rezistentní na TRAIL (proliferovaly v 1 000 ng/ml TRAILu v médiu) (Obrázek 5). Po získání rezistentního subklonu jsme provedli expresní proteomickou analýzu porovnávající původní senzitivní buněčnou linii HBL-2 s rezistentním subklonem HBL-2/R pomocí 2-DE.

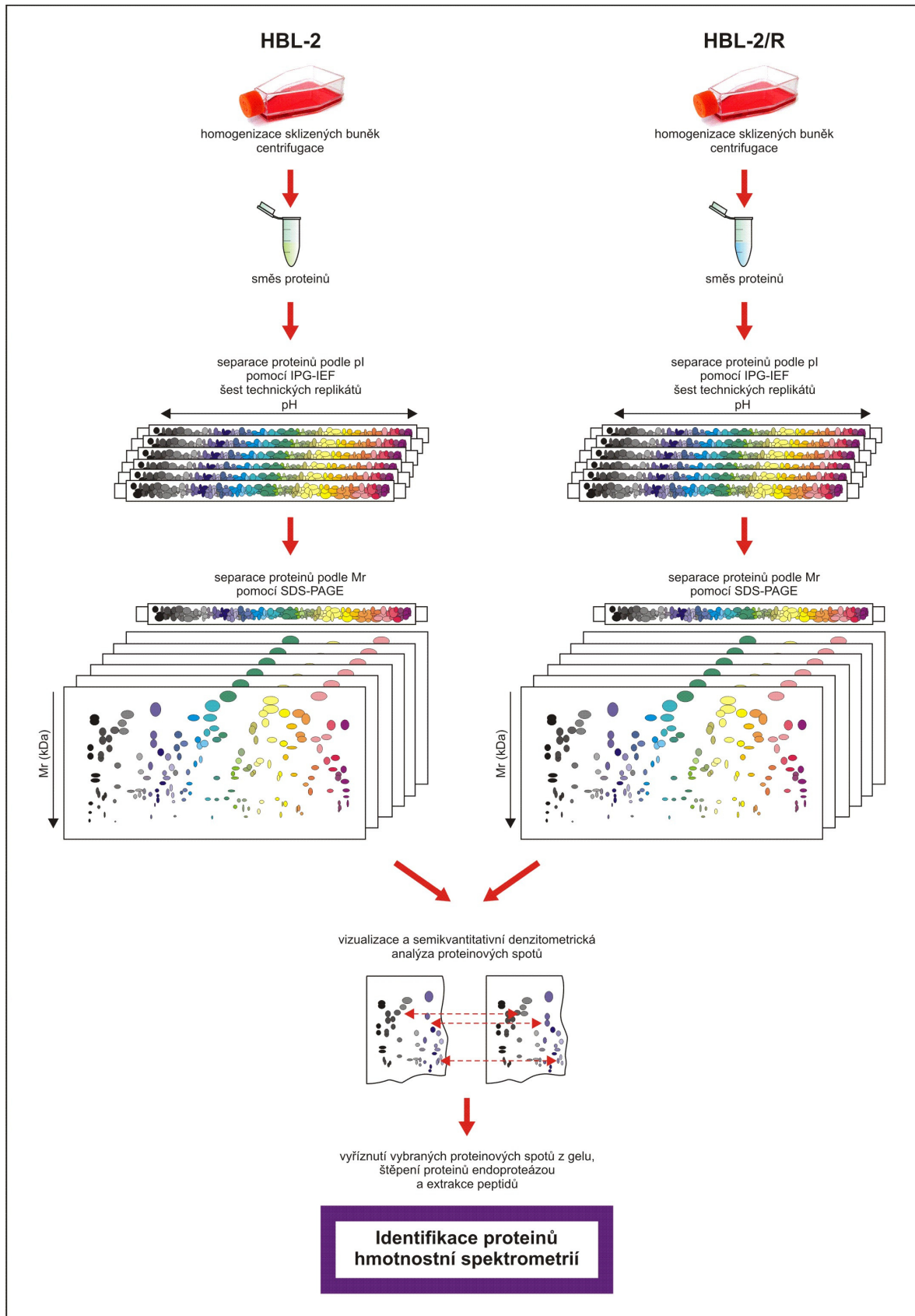


Obrázek 5: Relativní cytotoxicita TRAILu. Přežívání buněk HBL-2 a HBL-2/R po 78 hodinách v přítomnosti TRAILu analyzované WTS-kolorimetrickou esejí. Subklon HBL-2/R rezistentní na TRAIL jsme odvodili od buněk HBL-2 senzitivních na TRAIL. Absorbance HBL-2 buněk rostoucích v médiu bez TRAILu byla stanovena jako 1.

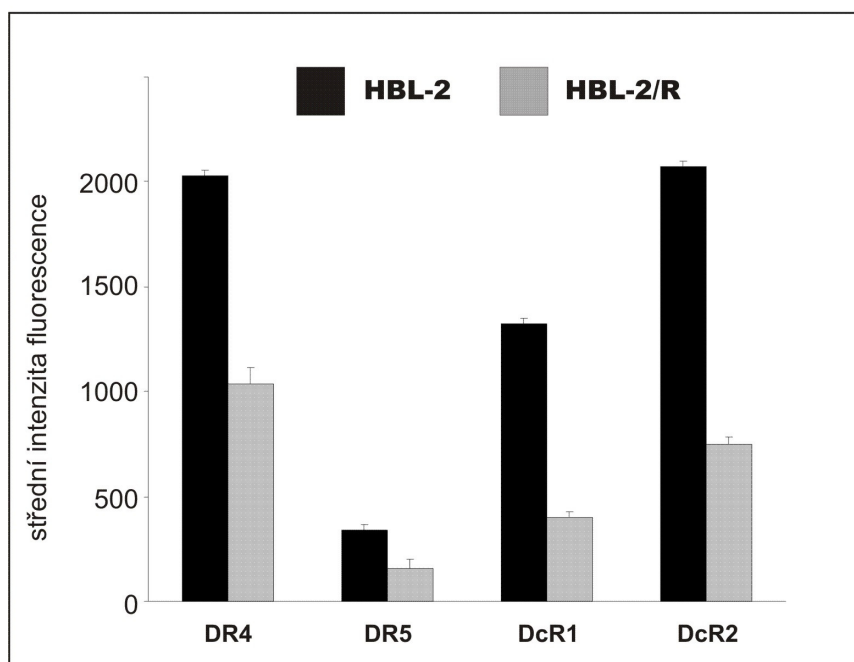
2.1.3 Proteomická analýza buněčných linií metodou 2-DE

Intaktní proteiny v celobuněčných lyzátech (6 replikátů HBL-2 a 6 replikátů HBL-2/R) byly nejdříve zaostřeny pomocí IPG-IEF a poté v druhém rozměru separovány na polyakrylamidovém gelu SDS-PAGE (Obrázek 6). Po analýze proteinových skvrn vizualizovaných pomocí koloidní Coomassie G-250 byly proteiny, jejichž exprese byla mezi senzitivními a rezistentními buňkami signifikantně změněna, štěpeny v gelu trypsinem a vzniklé peptidy byly extrahovány a identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-MS/MS).

Jednou ze známých příčin rezistence nádorových buněčných linií na TRAIL je změna v expresi receptorů TRAILu na povrchu těchto buněk. Proto jsme provedli analýzu exprese receptorů DR4, DR5, DcR1 i DcR2 průtokovou cytometrií. Na buněčném povrchu HBL-2/R byla exprese všech čtyř receptorů výrazně snížena oproti expresi receptorů na povrchu buněk HBL-2 (Obrázek 7).



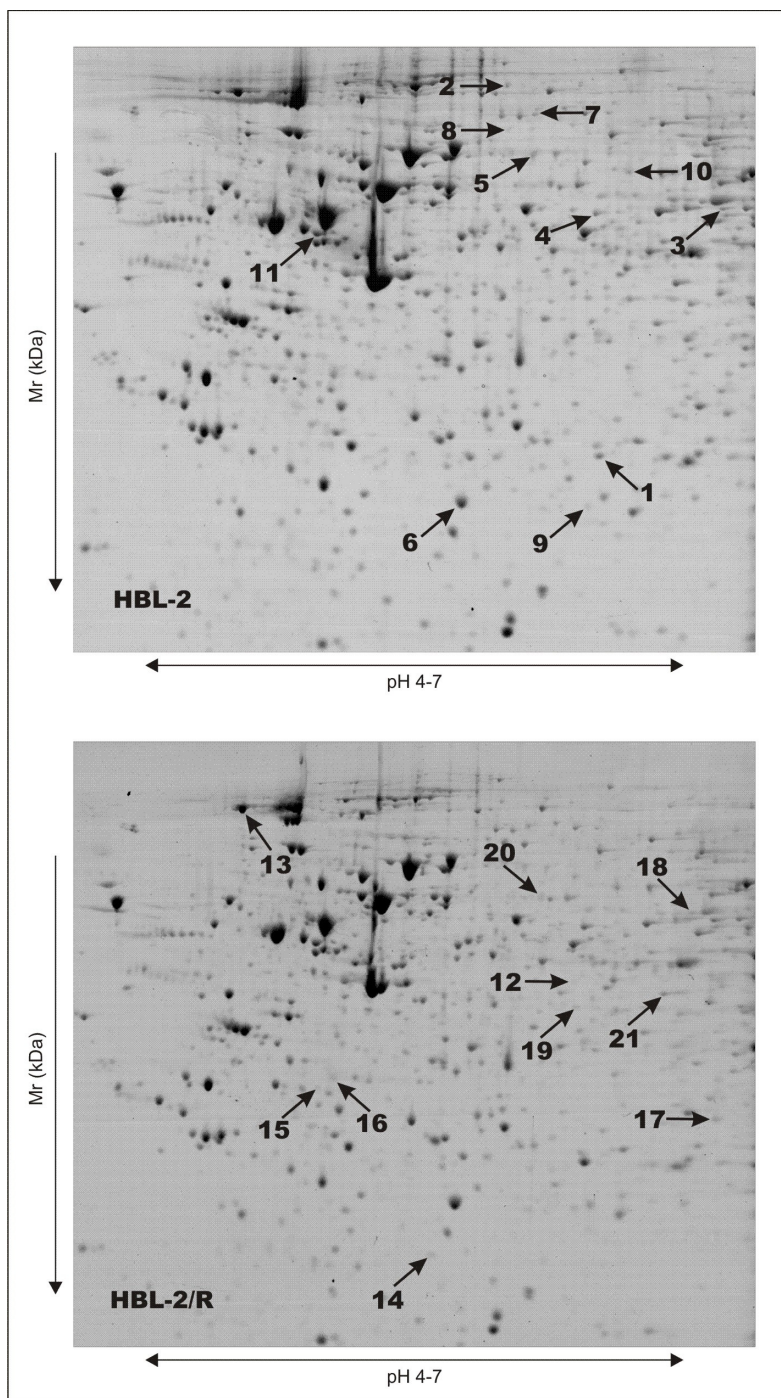
Obrázek 6: Postup experimentu. Intaktní proteiny v celobuněčných lyzátech byly separovány IPG-IEF a SDS-PAGE, vždy v šesti replikátech pro HBL-2 a HBL-2/R buňky. Po vizualizaci proteinových spotů byly gely naskenovány a analyzovány denzitometricky. Vybrané proteiny byly identifikovány MS.



Obrázek 7: Analýza exprese receptorů TRAILu na povrchu buněk HBL-2 a HBL-2/R průtokovou cytometrií. Buňky byly značeny protilátkami (konjugovanými fykoerytrinem) proti povrchovým receptorům TRAILu DR4, DR5, DcR1 a DcR2. Exprese všech čtyř receptorů byla u HBL-2/R buněk oproti HBL-2 buňkám výrazně snížena. Jako blank byly použity buňky bez značení a izotypové kontroly.

Proteomickou analýzou jsme detekovali 820 proteinových spotů vizualizovaných Coomassie G-250. Z toho bylo 21 spotů významně kvantitativně změněných v HBL-2/R buňkách oproti HBL-2 (Obrázek 8). Tyto spoty byly vyříznuty, proteiny štěpeny trypsinem a vzniklé peptidy extrahovány a identifikovány pomocí MALDI-MS/MS (Tabulka I).

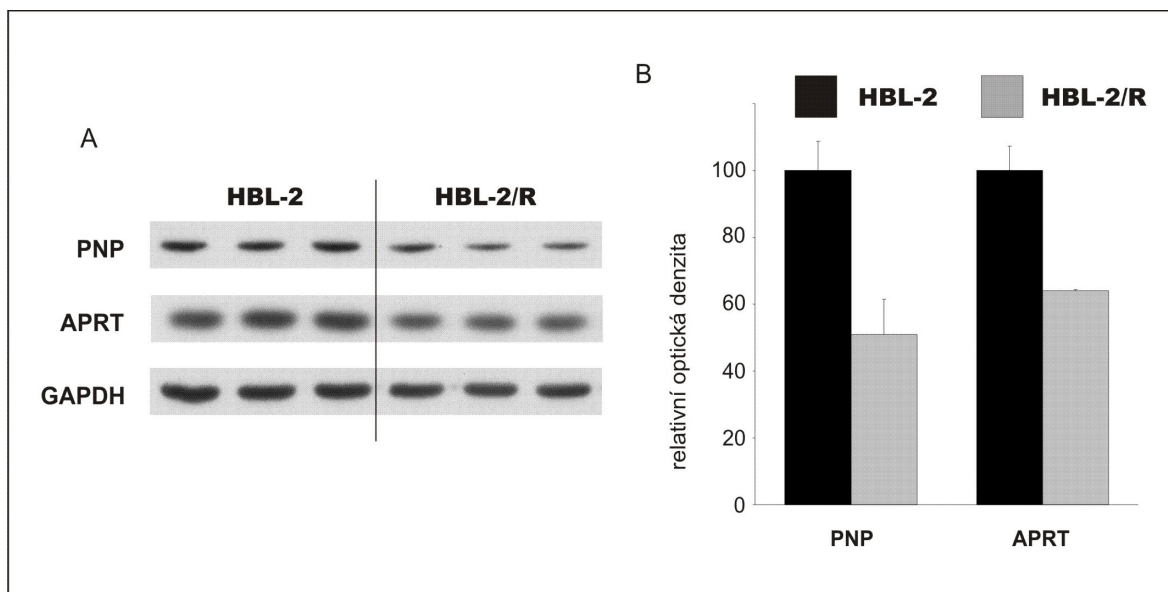
Využitím databáze KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) jsme identifikované proteiny rozdělili do funkčních skupin. Nejvýznamněji byla mezi proteiny zastoupena skupina enzymů metabolismu purinů, a to třemi proteiny, jejichž exprese byla v HBL-2/R buňkách významně snížena oproti expresi v HBL-2 buňkách. Šlo o **purinnukleosidfosforylázu (PNP, 1,6x snížena exprese u HBL-2/R)**, **adeninfosforibosyltransferázu (APRT, 2,2x snížena)** a **inozin-5'-monofosfátdehydrogenázu 2 (IMPDH2, 1,6x snížena)**. Pro ověření výsledků z 2-DE byla provedena analýza metodou western blot pomocí specifických protilátek proti PNP a APRT s HBL-2 i HBL-2/R celobuněčnými lyzáty (Obrázek 9).



Obrázek 8: 2-DE buněk HBL-2 a HBL-2/R (IPG stripy 24 cm, pH 4-7, 10% SDS-PAGE). Po vizualizaci pomocí Coomassie G-250 byly spoty analyzovány denzitometricky. Šipkou jsou označeny spoty, které se mezi HBL-2 a HBL-2/R gely lišily optickou denzitou (spoty 1-11 mají sníženou denzitu na HBL-2/R gelu, spoty 12-21 zvýšenou denzitu na gelech HBL-2/R). Ve vybraných spotech 1-21 byly identifikovány proteiny pomocí MS (Tabulka I).

Tabulka I: Seznam proteinů diferenciálně exprimovaných v buňkách HBL-2/R (změna min 1,5x se statistickou významností $p < 0,05$).

číslo spotu	anotace (Swiss-Prot)	NÁZEV PROTEINU	změna v expresi proteinu
<i>Proteiny se zvýšenou expresí v HBL-2/R</i>			
1	P04792	Heat shock protein beta-1	3,9
2	P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitoch.	2,6
3	O75351	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	2,6
4	P23381	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	2,4
5	P20591	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	2,2
6	P09211	Glutathione S-transferase P	1,9
7	P06396	Gelsolin	1,9
8	P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	1,7
9	Q9HAV7	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	1,6
10	O43776	Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	1,5
11	Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	1,5
<i>Proteiny se sníženou expresí v HBL-2/R</i>			
12	P08559	Pyruvate dehydrog. E1 component subunit alpha	3,2
13	P19338	Nucleolin	2,4
14	P07741	Adenine phosphoribosyltransferase (APRT)	2,2
15	O75792	Ribonuclease H2 subunit A	1,7
16	Q07955	Serine/arginine-rich splicing factor 1	1,7
17	P00491	Purine nucleoside phosphorylase (PNP)	1,6
18	P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (IMPDH2)	1,6
19	P40121	Macrophage-capping protein	1,6
20	P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	1,5
21	Q15019	Septin-2	1,5



Obrázek 9: Relativní exprese PNP a APRT analyzovaná v buněčných lyzátech HBL-2 a HBL-2/R metodou western blot. (A) Triplikáty buněčných lyzátů byly děleny na minigelech 12% SDS-PAGE. Poté byly proteiny přeneseny na membránu PVDF, blokovány a vyvolány s protilátkami proti PNP a APRT. GAPDH bylo využito jako kontrola proteinové nanášky. (B) Statistické vyhodnocení western blotů PNP a APRT, optická densita PNP a APRT v HBL-2 lyzátech byla stanovena jako 100.

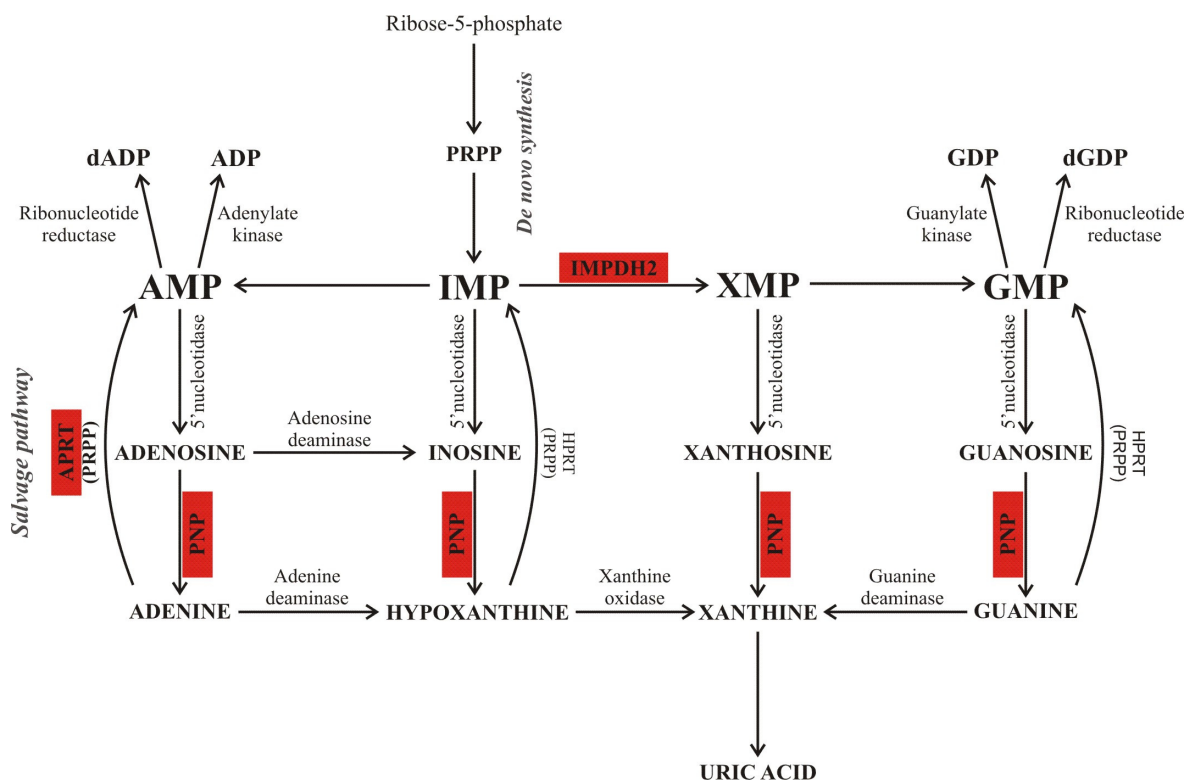
2.1.4 Diskuze k dílčímu cíli

Expresní proteomickou analýzou lze popsat rozdíly ve fenotypu buněk způsobené adaptací původně senzitivních buněk na chemoterapii a identifikovat tak molekulární mechanismy bezprostředně s rezistencí spojené, ale i sekundární změny ve fyziologii rezistentních buněk. Proteomická analýza tak může přinášet cenné informace o molekulárních odlišnostech mezi senzitivní a rezistentní buňkou a tedy i o potenciálních místech, na která lze cílit terapii.

Snížená exprese TRAILových „death“ receptorů DR4 a DR5 byla již dříve popisována jako možná příčina rezistence buněk na TRAIEm indukovanou apoptózu [58]. V našem případě měly buňky HBL-2/R oproti HBL-2 výrazně sníženou expresi všech čtyř povrchových receptorů TRAILu. Snížená exprese DR4 a DR5 vysvětluje rezistenci HBL-2/R na TRAIL. Snížená exprese „decoy“ receptorů DcR1 a DcR2 pravděpodobně indikuje další, komplexnější fenotypové změny v HBL-2/R buňkách.

Diferenciálně exprimované proteiny identifikované proteomickou analýzou byly pomocí databáze KEGG rozděleny do několika funkčních skupin. Mezi proteiny byly molekuly zapojené např. do regulace cytoskeletu, syntézy a maturace ribozomů, metabolismu RNA, translokace chromozomu, replikace a opravy DNA a skládání proteinu. Nejvýznamněji však byla zastoupena skupina enzymů metabolismu purinů, a to PNP, APRT a IMPDH2. Snížená exprese těchto tří klíčových enzymů purinového metabolismu má pravděpodobně silný dopad na nukleotidovou homeostázu v TRAIL-rezistentních lymfomových buňkách. Purinové nukleotidy jsou stavební kameny syntézy DNA, RNA a enzymových kofaktorů. Získávají jsou dvěma odlišnými metabolickými drahami, a to *de novo* syntézou z nízkomolekulárních prekurzorů a/nebo recyklací volných nukleových bází tzv. *salvage* dráhou (Obrázek 10). *De novo* syntéza i *salvage* dráha jsou schopné dodávat nukleotidy (nukleosid-5'-fosfáty) pro buněčnou potřebu nezávisle, ale míra využití těchto metabolických drah buňkou je tkáňově specifická a může se lišit i v závislosti na fyziologických podmínkách. U leukemických a lymfomových buněk je za hlavní zdroj purinových nukleotidů považována *salvage* dráha [59, 60].

De novo syntéza purinových nukleotidů vyžaduje 5-fosforibozyl-1-pyrofosfát (PRPP), ATP, glutamin, glycin, CO₂, folát a aspartát. Z těchto nízkomolekulárních látek vzniká první nukleotid inozin-5'-monofosfát (IMP). IMP je dále konvertován na guanozin-5'-monofosfát (GMP) enzymem IMPDH2 nebo (jiným enzymem) na adenosin-5'-monofosfát (AMP) (Obrázek 10). Katabolizmem purinových nukleotidů dochází k uvolnění purinových bází pomocí enzymu PNP. V *salvage* dráze jsou tyto volné purinové báze konvertovány zpět na nukleosid-5'-monofosfát v reakci aktivované cukrem PRPP a katalyzované enzymem APRT (Obrázek 10). Ribonukleotidy jsou konvertovány ribonukleotidreduktázou na odpovídající deoxyribonukleotidy.



Obrázek 10: Zjednodušené schéma purinového metabolismu, ukazující roli IMPDH2, APRT a PNP v syntéze purinových nukleotidů (převzato z [61]). Při *de novo* syntéze purinových nukleotidů vzniká v několika krocích z PRPP (5-fosforibozyl-1-pyrofosfátem) první nukleotid IMP. IMP je pomocí enzymu IMPDH2 konvertován na GMP. Enzym PNP katalyzuje reverzní štěpení purinových nukleosidů, čímž se uvolňují purinové nukleové báze (adenin, hypoxanthin, xanthin a guanin). V *salvage* dráze jsou volné nukleové báze konvertovány zpět na nukleosid-5'-monofosfáty enzymem APRT. V *de novo* syntéze purinových nukleotidů i *salvage* dráze hrají enzymy APRT, PNP a IMPDH2 důležitou roli a jejich nízká exprese v buňkách HBL-2/R pravděpodobně představuje „slabinu“ využitelnou pro eliminaci těchto buněk.

Rovnováha enzymové aktivity a koncentrace produktů a intermediátů jsou zásadní pro všechny metabolické dráhy a tedy i pro purinovou homeostázu. Narušení purinového metabolismu obecně vede ke hromadění či nedostatku ribonukleotidů a deoxyribonukleotidů, nebo metabolických intermediátů, což může být pro buňku toxické. Je známo, že inhibice enzymu PNP vede ke kumulaci jeho substrátu, 2'-deoxyguanozinu, který je dále fosforylován na deoxyguanozintrifosfát (dGTP). Vysoká intracelulární koncentrace dGTP inhibuje buněčnou proliferaci a indukuje apoptózu [62]. Pokud je inhibován enzym APRT, dojde k oxidaci nahromaděného adeninu na nerozpustný 2,8-dihydroxyadenin. Vyšší koncentrace tohoto produktu vede k buněčné smrti [63]. Inhibice enzymu IMPDH2 vede k depleci guanozinového nukleotidu, který blokuje syntézu DNA a buněčné dělení [64].

Snížená exprese tří enzymů nukleotidového metabolismu PNP, APRT a IMPDH2 ovlivňuje pravděpodobně jak *de novo* syntézu, tak *salvage* dráhu purinů a narušuje tak zřejmě homeostázu purinů v HBL-2/R buňkách.

Nerovnováha metabolismu purinů může představovat selektivní nevýhodu (slabinu) pro HBL-2/R buňky, i když nemusí být při běžných podmínkách patrná. Proliferační rychlost HBL-2/R a HBL-2 buněk byla srovnatelná, zjištěná nerovnováha v metabolismu purinových nukleotidů v TRAIL-rezistentních buňkách není za normálních podmínek kritická. Pokud ale dojde k dalšímu zásahu do purinového metabolismu, může být pro přežití buněk taková „slabina“ zásadní, protože nebude docházet k dostatečné tvorbě stavebních kamenů pro syntézu DNA a RNA.

Obě metabolické cesty (*de novo* i *salvage* dráha) jsou u HBL-2/R buněk pravděpodobně narušeny, a proto předpokládáme, že na ně bude mít další zásah do purinového metabolismu (například inhibicí některých dalších zúčastněných enzymů) fatální vliv. **Předpokládáme, že látky schopné inhibice enzymů purinového metabolismu, by měly být pro TRAIL-rezistentní HBL-2/R buňky vysoce toxické, ve srovnání s TRAIL-senzitivními buňkami a měly by tedy být velmi efektivní při selektivní (potenciálně terapeutické) likvidaci TRAIL-rezistentních MCL buněk.** Několik takových inhibitorů již existuje a pro klinické využití jsou schválené – např. methotrexát (inhibuje purinovou *de novo* syntézu tím, že blokuje dihydrofolátreduktázu) [65], ribavirin a mykofenolová kyselina (inhibují enzym IMPDH2) [66, 67], nebo forodezin (nový inhibitor enzymu PNP) [68].

Konstitutivní nebo získaná rezistence k terapii představují hlavní komplikaci v léčbě nádorových onemocnění. Důsledkem rezistence může být selhání léčby, progresse onemocnění a/nebo relaps nemoci. Vývoj rezistence nádorových buněk na cytotoxická a cytostatická léčiva může být spojená se sekundárními adaptivními změnami buněčného fenotypu, které bezprostředně nesouvisí s mechanismem rezistence. Některé molekulární změny mohou představovat potenciální „slabiny“ buněk v podobě možného terapeutického cíle. Pokud jsou takové „slabiny“ identifikovány, mohou být využity pro selektivní eliminaci takových buněk a informace o těchto specifických molekulárních „slabinách“ rezistentních buněk může mít farmakologické a klinické využití.

Proteomickou analýzou změn asociovaných s rezistencí MCL buněčné linie HBL-2 na TRAIL jsme prokázali významné snížení exprese všech TRAILových receptorů

exprimovaných na buněčném povrchu a identifikovali řadu proteinů se změněnou expresí, z toho 3 enzymy purinového metabolismu. Tato metabolická dráha představuje potenciální „slabinu“ TRAIL-rezistentních buněk HBL-2/R a tím také možný terapeutický cíl pro selektivní eliminaci těchto buněk.

Výsledky této práce byly publikovány v článku:

Resistance to TRAIL in mantle cell lymphoma cells is associated with the decreased expression of purine metabolism enzymes. Pospisilova Jana, Vit Ondrej, Lorkova Lucie, Klanova Magdalena, Zivny Jan, Klener Pavel, Petrak Jiri. *International Journal of Molecular Medicine* 2013; 31(5):1273 (IF 1,96).

Tento projekt byl podporován Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (GA UK 251180 111210 a 253284 70012), Grantovou agenturou České republiky (305/09/1390), Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (PRVOUK P24/LF1/3 a SVV 2012-264507), UNCE 204021 a Ministerstvem zdravotnictví ČR (IGA MZ NT12248-5, IGA-MZ NT13201-4).

Tento projekt byl řešen v rámci grantu GA UK na téma Identifikace molekulárních cílů pro selektivní likvidaci TRAIL-rezistentních buněk nehodgkinských lymfomů (Identification of molecular targets for selective elimination of TRAIL-resistant non-Hodgkin's lymphoma cells), hlavní řešitelkou projektu byla Mgr. Jana Pospíšilová.

2.2 Popis molekulárních mechanismů srdečního selhání s využitím potkaního modelu objemového přetížení

Proteomická analýza potkaního myokardu při srdečním selhání pomocí značení iTRAQ, IEF peptidů, nano-RP-HPLC a MALDI-MS/MS

2.2.1 Chronické srdeční selhání

Chronické srdeční selhání je závažné kardiovaskulární onemocnění, kterým v ČR ročně onemocní 40 000 osob hlavně důchodového věku (<http://www.kardio-cz.cz/>). Chronické srdeční selhání (CHSS) je stav, kdy srdce není schopné pokrýt metabolické potřeby tkání (přívod kyslíku a živin, odstraňování metabolických zplodin). Přes dostatečné plnění srdečních komor klesá minutový srdeční výdej. CHSS je charakteristické patologickou remodelací levé srdeční komory (hypertrofií, případně dilatací kardiomyocytů) a mezi příznaky onemocnění patří mělké dýchání, dušnost v důsledku městnání krve v plicích při dysfunkci levé komory, periferní otoky rukou a nohou (způsobené městnáním krve ve venózním řečišti při dysfunkci pravé komory) a dále únava a nevykonnost (jejichž příčinou je neadekvátní dodávka kyslíku a živin do tkání a metabolické změny v tkáních), zmatenost a ztráta koncentrace. V důsledku hypertrofie se srdeční tkáň stává elektricky nehomogenní a CHSS je tak navíc komplikováno arytmiemi, které mohou vést k náhlé srdeční zástavě [69, 70].

CHSS je způsobeno především ischemickou chorobou srdeční ve spojení s hypertenzí, dále prodělaným infarktem, vrozenou kardiomyopatií, či vlivem infekce nebo toxických látek včetně alkoholu [71, 72]. CHSS je komplexní klinický syndrom, který může být pro každého pacienta unikátní díky rozmanitosti průvodních problémů a komorbiditě (současně se vyskytujícím onemocněním) spojené s vysokým průměrným věkem pacientů (např. diabetes, hypertenze, nemoci ledvin a jater).

Onemocnění má špatnou prognózu – do čtyř let od počáteční diagnózy umírá 50 % pacientů [73].

Léčba CHSS zahrnuje řadu režimových nefarmakologických opatření, farmakoterapii a v indikovaných případech nejrůznější chirurgické zákroky (zavedení

kardiostimulátorů či podpůrných levokomorových pump, revaskularizační výkony a transplantace srdce).

Diagnostika i léčba CHSS představují stále se zvyšující ekonomickou zátěž. Výsledky epidemiologických studií v řadě evropských zemí ukazují prudký nárůst prevalence i incidence srdečního selhání. Je to důsledek několika faktorů, především všeobecného stárnutí populace a zlepšení léčby akutních stavů (např. akutního infarktu myokardu), které mají za následek, že více nemocných dospěje do chronického stádia srdečního selhání. Vysoké náklady na léčení CHSS jsou z největší části podmíněny rychle narůstajícím počtem hospitalizací z důvodu srdečního selhání, který se za posledních 20 let zvýšil takřka čtyřnásobně [74].

Molekulární mechanismy zodpovědné za rozvoj CHSS nejsou uspokojivě popsány. Dosud publikované studie spojují fenotyp srdečního selhání se změnou expresí řady proteinů zapojených v energetickém metabolismu, excitaci membrán, excitaci a kontrakci řízené vápníkem, přenosu signálu (force transduction) a myofilamentární kontrakci a excitaci [71]. Další studie změn exprese proteinů v postižené srdeční tkáni by mohly vést k hlubšímu pochopení patologických procesů spojených s vývojem a progresí onemocnění, a tím ke zlepšení terapie.

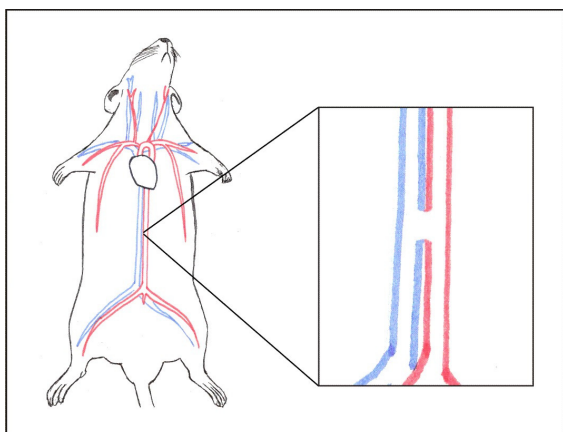
S tímto cílem jsme provedli:

- 1) expresní proteomickou a transkriptomickou analýzu selhávajícího myokardu potkaního modelu CHSS a
- 2) cílenou studii exprese proteinů souvisejících s arytmií v hypertrofickém srdečním svalu potkaního modelu.

2.2.2 Potkaní model CHSS

Základní výzkum a popis molekulárních změn v selhávajícím myokardu je ztížen komplexností tohoto onemocnění, mimo jiné jde o multifaktoriální onemocnění, a také není možné získat vzorky srdeční tkáně od pacientů či odpovídajících zdravých kontrol. V úvahu proto přichází zvířecí modely. V našem případě jsme použili dobře popsany a definovaný potkaní model CHSS vytvořený objemovým přetížením srdce v důsledku tzv. aorto-venózní píštěle (AVP, Obrázek 11) [75, 76]. Toto chirurgické propojení aorty s dolní dutou žílou vede ke zvýšení srdečního výdeje téměř o 200 %, ale většina srdečního výdeje

je díky píštěli odvedena do dolní duté žíly a efektivní srdeční výdej je tak snížený. Srdeční tkáň se s tímto stresem vyrovnává kompenzačními mechanismy, mezi které patří remodelace myokardu (prodlužování a zvětšování kardiomyocytů). To vede k excentrické hypertrofii obou srdečních komor. Srdeční hypertrofie je do 8 až 10 týdnů po zákroku asymptomatická. Nízký efektivní srdeční výdej má za následek renální hypoperfuzi, která vede k dalším kompenzačním mechanismům, jako je redistribuce srdečního výdeje, neurohumorální aktivace a zadržování vody a sodných iontů [75, 77]. Zvyšující se plnicí srdeční tlak dále zhoršuje srdeční přetížení [78-80], kompenzační mechanismy se stávají neadekvátními a postupně se asymptomatická hypertrofie vyvíjí v symptomatické srdeční selhání [77].



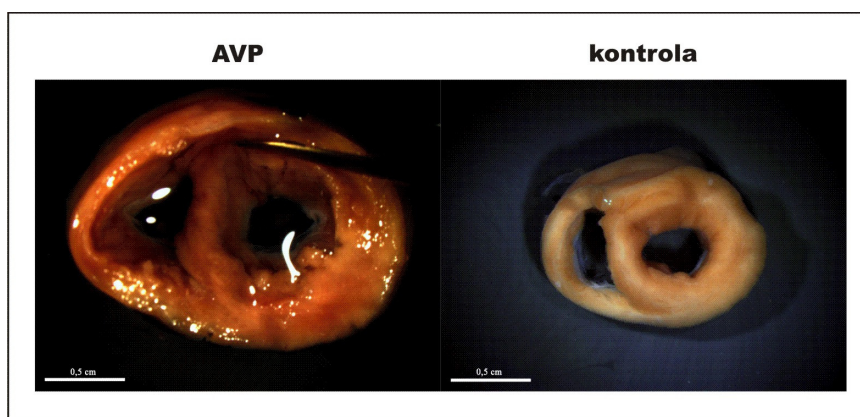
Obrázek 11: Schéma operativního zákroku při tvorbě AVP. Píštěl byla provedena u desetitýdenních potkaních samců kmene Wistar

2.2.3 Vývoj srdečního selhání

V experimentální skupině bylo šest samců potkanů kmene Wistar s AVP a šest kontrolních potkanů, kteří byli operováni bez tvorby píštěle (sham). U většiny potkanů s AVP se po několika týdnech vyvinula asymptomatická hypertrofie a cca 150 dní po operaci potkani vykazovali klinické příznaky srdečního selhání, jako ztížené dýchání, piloerecti a letargii. Zvířatům byla před usmrcením provedena v celkové anestezii kontrola píštěle laparotomicky spolu s echokardiografickým a hemodynamickým vyšetřením. Po usmrcení byla provedena morfologická vyšetření. Potkani s AVP se nelišili tělesnou váhou ani velikostí od kontrolních (sham) potkanů. Ve srovnání s kontrolními zvířaty měla AVP zvířata výrazně těžší a větší srdce ($5,29 \pm 0,18$ vs. $2,80 \pm 0,12$ g/100g tělesné váhy, $p < 0,05$) a plíce ($4,23 \pm 0,19$ vs. $3,30 \pm 0,16$ g/100g tělesné váhy potkanů) (Obrázek 12).

Echokardiografická vyšetření potvrdila zvětšení obou srdečních komor a frakční zkrácení levé komory. Hemodynamická vyšetření ukázala zvýšený tlak na konci diastoly levé komory. Imunohistochemická analýza nepotvrdila přítomnost fibrózy v srdeční tkáni AVP potkanů (viz článek v Příloze II, str. 105).

Funkční a morfologická vyšetření potvrdila kontraktilní dysfunkci srdce AVP zvířat, což je ve shodě s již publikovanými výsledky [81]: zvětšené plíce indikující plicní kongesci (překrvení plic) a hromadění vody, zvětšení obou srdečních komor a frakční zkrácení levé komory ukazuje na počínající kontraktilní dysfunkci AVP potkanů a zvýšený tlak na konci diastoly levé komory AVP potkanů ukazuje na dekompenzované srdeční selhání.



Obrázek 12: Transverzální řez srdcem potkana s AVP a kontrolního potkana. Potkani s AVP se nelišili tělesnou váhou ani velikostí od kontrolních potkanů, ale ve srovnání s kontrolními zvířaty měla AVP zvířata výrazně těžší a větší srdce.

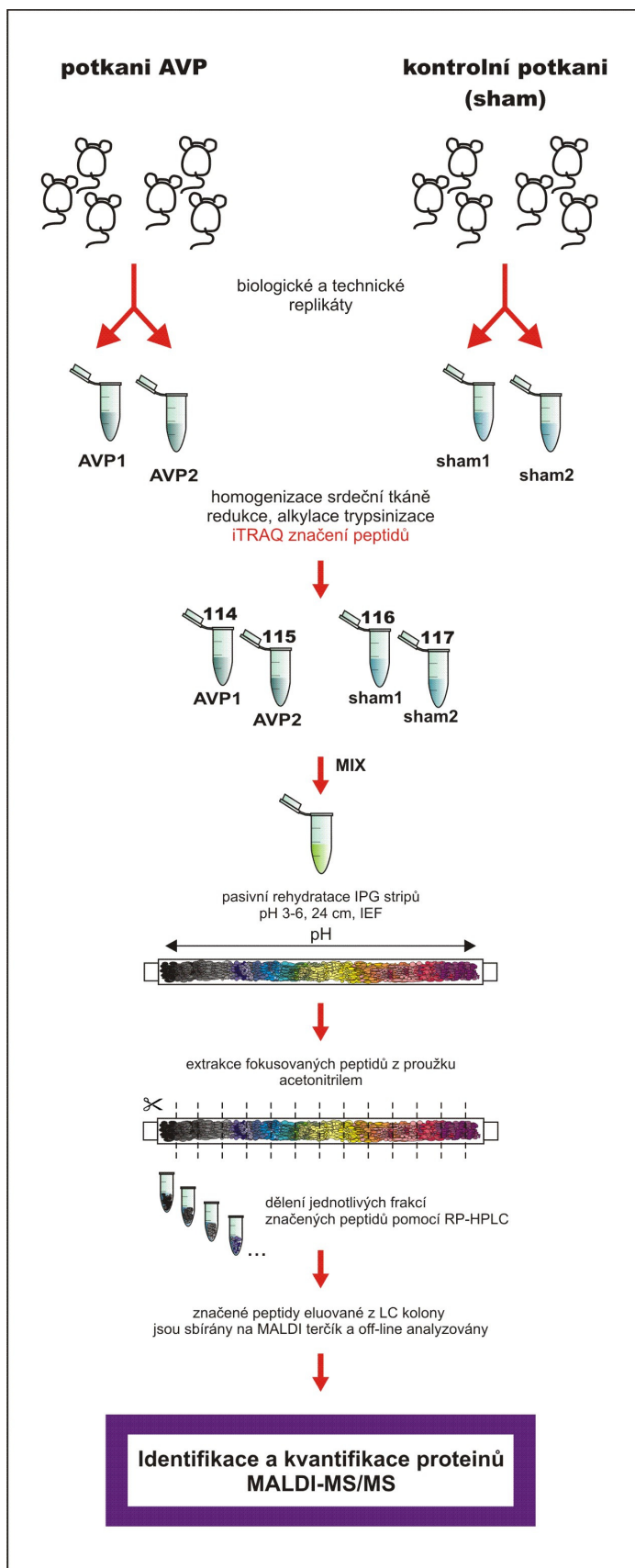
2.2.4 Proteomická analýza potkaního myokardu

Expresní proteomickou analýzou jsme porovnali vzorky myokardu potkaního modelu AVP s kontrolními vzorky s cílem popsat molekulární mechanismy a změny v selhávajícím srdci a navrhnout nové potenciální terapeutické cíle k léčbě CHSS.

Pro potřeby proteomické analýzy byla potkanům kontrolním i s AVP odebrána část stěny levé srdeční komory. Pro semikvantitativní porovnání proteomů částí levých srdečních komor jsme zvolili přístup „shotgun“ v kombinaci s izobarickým značením peptidů metodou iTRAQ.

Srdeční tkáň byla zhomogenizována mechanicky a pomocí detergentů. Proteiny byly v roztoku štěpeny trypsinem a vzniklé peptidy značeny metodou iTRAQ – pro dva směsné vzorky (jeden směsný vzorek byl tvořen vždy třemi původními potkaními vzorky) AVP byly použity iTRAQ značky 114 a 115, pro dva směsné kontrolní vzorky (sham) byly použity značky 116 a 117. Poté byly značené vzorky 114-117 kombinovány v poměru 1:1:1:1, vytvořeny byly tři replikáty. Kombinované vzorky značených peptidů byly separovány pomocí IPG-IEF. Po IPG-IEF značených peptidů byly proužky IPG gelů rozděleny na 32 frakcí, ze kterých byly peptidy extrahovány roztokem acetonitrilu. Dále byly peptidy v jednotlivých extrahovaných frakcích děleny pomocí kapalinové chromatografie (RP-HPLC) a roboticky sbírány na MALDI terčích. Identifikace a kvantifikace byla provedena pomocí MALDI-MS/MS (Obrázek 13).

Finálně bylo identifikováno a kvantifikováno 2 030 proteinů, z toho 66 proteinů bylo signifikantně diferenciatně exprimováno (poměr iTRAQ signálu >1,5, $p < 0,05$) (Tabulka II a III). Mezi proteiny s největší změnou v expresi byly **monoaminoxidáza A (MAO-A)**, exprese proteinu byla zvýšená ve vzorcích AVP 4x oproti kontrolním vzorkům), **transglutamináza 2 (TGM2)**, exprese zvýšená 3x v AVP) a **α -podjednotka mitochondriálního trifunkčního proteinu (HADHA)**, exprese snižená 3,3x v AVP). Metodou western blot jsme pomocí specifických protilátek potvrdili výsledky proteomické analýzy na srdečních vzorcích pro tyto tři proteiny (Obrázek 14). Současně byla se vzorky srdečních tkání provedena analýza hladin exprese mRNA na Illumina RatRef-12v1 čípech. Testováno bylo 16 206 transkriptů, z nichž diferenciatně exprimovaných bylo 851 transkriptů ($q < 0,05$). Z výsledných 66 diferenciatně exprimovaných proteinů korespondovalo s odpovídajícím proteinem v trendu exprese 29 transkriptů, 18 transkriptů mělo úroveň exprese menší a 16 mRNA nemělo změněnou expresi. Tři proteiny nebyly na čipu zastoupeny odpovídající sondou (Tabulka II a III).



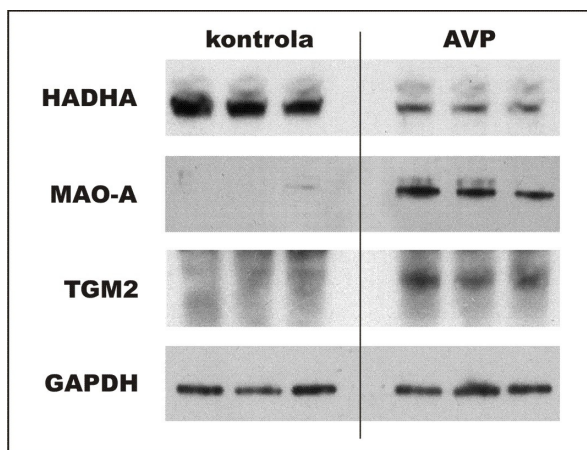
Obrázek 13: Schéma experimentu. Po homogenizaci srdeční tkáně potkanů byly připraveny směsné vzorky vždy ze tří zvířat. Proteiny byly štěpeny trypsinem a vzniklé peptidy značeny metodou iTRAQ. AVP1 a AVP2 jsou dva směsné vzorky AVP (značka 114 a 115), sham1 a sham2 jsou dva směsné kontrolní vzorky (značka 116 a 117). Po smíchání značených peptidů v poměru 1:1:1:1 byly vytvořeny tři technické replikáty a kombinované vzorky značených peptidů separovány pomocí IPG-IEF. Po IPG-IEF byly peptidy extrahovány a děleny pomocí kapalinové chromatografie (RP-HPLC) a roboticky sbírány na MALDI terčích. Identifikace a kvantifikace byla provedena off-line pomocí MALDI-MS/MS.

Tabulka II: Proteiny se zvýšenou expresí v myokardu AVP potkanů a změny jejich korespondujících mRNA. (N.A. – odpovídající mRNA nebyla přítomna čipu).

anotace (NCBI)	NÁZEV PROTEINU	změna v expresi proteinu	změna v expresi mRNA
	<i>Energetický a substrátový metabolismus</i>		
gil56388799	creatine kinase, brain (Ckb protein)	2,9	2,5
gil68837285	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	2,4	1,0
gil974168	aldehyde dehydrogenase	2,4	3,6
gil7533042	guanine deaminase	2,4	4,0
gil109468300	enolase 1	2,2	1,0
gil6981022	hexokinase 1	2,2	N.A.
	<i>Struktura a kontrakce</i>		
gil55249666	cadherin 13	3,4	4,4
gil535069	muscle LIM protein	3,0	2,5
gil438878	tropomyosin	3,0	2,5
gil462569	microtubule-associated protein 1A	2,6	2,5
gil149018456	microtubule-associated protein 4	2,2	2,4
gil149063941	myosin 7	2,2	1,0
gil158186676	calumenin isoform a	2,2	0,9
gil157819677	sarcolemma associated protein	1,8	1,0
gil62646949	filamin-C (Gamma-filamin)	1,9	1,2
gil55855	calreticulin	1,9	1,2
	<i>Annexiny</i>		
gil6978501	annexin A1	3,0	4,7
gil157830232	annexin A5	2,6	3,3
gil9845234	annexin A2	2,2	2,4
	<i>Heat shock proteiny</i>		
gil94400790	heat shock protein 1	3,0	2,6
gil54673763	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	2,1	2,4
gil744592	alpha-B crystallin	2,6	1,0
	<i>Jiné</i>		
gil48425083	monoamine oxidase A (MAO-A)	4,1	4,3
gil5326787	tissue-type transglutaminase 2 (TGM2)	3,1	3,8
gil6981324	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	2,9	2,4
gil149048530	ceruloplasmin, isoform CRA_a	2,8	2,0
gil57241	sulfated glycoprotein 2	2,4	2,5
gil158706096	hematopoietic PBX-interacting protein	2,4	1,2
gil53237076	EH-domain containing 4	2,2	1,1
gil1051270	14-3-3 zeta isoform	2,0	2,3

Tabulka III: Proteiny se sníženou expresí v myokardu AVP potkanů a změny jejich korespondujících mRNA. (N.A. – odpovídající mRNA nebyla přítomna čipu).

anotace (NCBI)	NÁZEV PROTEINU	změna v expresi proteinu	změna v expresi mRNA
	<i>Oxidace mastných kyselin</i>		
gil259435950	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	4,3	N.A.
gil59797483	carnitine O-acetyltransferase;	4,1	2,0
gil57333	3-2trans-enoyl-CoA isomerase	3,7	1,8
gil60688124	trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial (HADHA)	3,3	2,7
gil510110	trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	3,0	1,8
gil56541110	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	3,0	1,7
gil77993368	acyl-CoA synthetase family member 2 precursor	2,6	N.A.
gil7387725	short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	2,3	2,7
gil6166586	acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	2,3	1,8
gil51260066	propionyl coenzyme A carboxylase, beta polypeptide	2,3	1,2
gil149050263	propionyl coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide	2,3	1,2
gil57527204	electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide precursor	2,2	1,5
gil6978431	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	2,0	1,2
gil48734846	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	1,9	1,7
gil149027156	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2	1,8	1,7
gil6978705	carnitine O-palmitoyltransferase precursor	1,6	1,7
	<i>Energetický a substrátový metabolismus</i>		
gil189083744	mitochondrial creatine kinase precursor	4,2	1,0
gil54035288	enolase 3, beta, muscle	3,8	4,2
gil66910891	glutamic-pyruvate transaminase (alanine aminotransferase)	3,0	2,6
gil62079055	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial (NID)	2,5	1,6
gil6978661	muscle creatine kinase	2,5	1,5
gil83300587	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2,5	1,4
gil62825891	phosphofructokinase, muscle	2,2	2,0
gil56929	pyruvate kinase muscle isozyme	2,2	1,6
gil61557127	nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT)	2,1	1,5
gil92090591	glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	2,1	1,2
gil81883712	Alpha-ketoglutarate dehydrogenase	1,9	1,5
	<i>Příjem a uvolňování vápenatých iontů</i>		
gil31077132	histidine rich calcium binding protein	3,2	1,7
gil57303	sarcoplasmic reticulum 2+-Ca-ATPase	2,8	-1,0
gil149042663	sarcalumenin (predicted), isoform CRA_a	2,7	1,1
gil6978543	Na+/K+ -ATPase alpha 1 subunit precursor	2,2	-1,0
gil189181710	ryanodine receptor 2, cardiac	1,7	1,3
	<i>Jiné</i>		
gil1906812	inducible carbonyl reductase	3,1	2,2
gil149062241	LRP16 protein	2,1	2,6
gil6981396	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I, alpha	2,1	-1,0
gil81871846	leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	1,6	1,2



Obrázek 14: Potvrzení výsledků proteomické analýzy metodou western blot se specifickými protilátkami proti HADHA, MAO-A a TGM2. GAPDH byla využita pro kontrolu proteinové nanášky.

2.2.5 Diskuze k dílčímu cíli

I přesto, že kontraktilní funkce srdce zůstávala relativně zachovaná i 22 týdnů po tvorbě AVP, proteomická analýza potvrdila charakteristické molekulární znaky srdečního selhání, které byly publikovány již dříve. Takovým znakem byla např. významně snížená exprese většiny enzymů zapojených v β -oxidaci mastných kyselin. U pacientů s pokročilým CHSS i u zvířecích modelů CHSS dochází ke změně energetického substrátu z mastných kyselin na jiný, dosud neidentifikovaný, zdroj [82, 83]. Některé studie uvádějí, že selhávající srdce preferuje utilizaci glukózy [82]. Naše proteomická analýza nepotvrdila zvýšenou expresi proteinů účastnících se glykolytické dráhy, dva klíčové regulační enzymy – fosfofruktokináza a pyruvátkináza – měly naopak sníženou expresi v AVP vzorcích. Největší část diferenciálně exprimovaných proteinů naší analýzy tvořily právě proteiny spojené s energetickým metabolismem srdce.

Proteomická analýza dále potvrdila sníženou hladinu sarkomerické mitochondriální kreatinkinázy a svalové kreatinkinázy spolu se zvýšenou hladinou izoformy kreatinkinázy mozkové, což jsou změny typické pro potkaní i lidské srdeční selhání [84]. Expese odpovídajících tří mRNA potvrdila trend změny hladiny enzymů. Kreatinkinázy tvoří součást enzymatické sítě účastnících se rychlého transportu fosfátů (ATP) z mitochondrie do kontraktilního aparátu svalu [85, 86]. Snížená expese enzymů kreatinkinázy tudíž pravděpodobně přispívá k narušení toku ATP, které bylo u CHSS již dříve popsáno [86], a tím přispívá k omezení srdeční funkce.

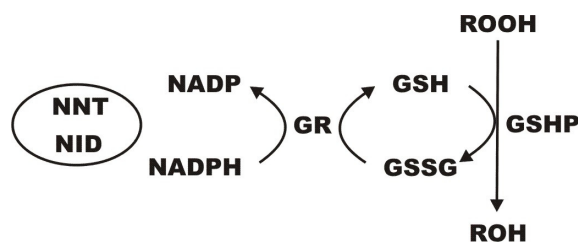
Další, již publikovanou, změnu v metabolismu selhávajícího srdce představuje zvýšená hladina těžkého řetězce myozinu beta (β -myozin heavy chain, myozin 7).

V dospělosti převládající α -izoforma myozinu 7 je při srdečním selhání nahrazena fetální β -izoformou, což ovlivňuje funkci kontraktálního aparátu v selhávajícím myokardu [71].

Srdeční selhání je také charakterizováno sníženou expresí proteinů odpovídajících za příjem a uvolňování vápenatých iontů sarkoplazmatickým retikulem [87]. Ve shodě s již dříve publikovanými fakty jsme objevili sníženou expresi proteinu SERCA 2 (sarco/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} ATPase) a ryanodinového receptoru 2. Tyto změny jsou zřejmě odpovědné za omezené kontraktální schopnosti myokardu závislé na přesunech vápenatých iontů [88, 89].

Další nalezené změny v expresi se týkaly tří členů annexinové rodiny: annexinů A5, A2 a A1. U všech tří proteinů byla exprese v AVP vzorcích zvýšená na proteinové úrovni i na úrovni mRNA. Annexiny jsou asociované s vnitřní cytoplazmatickou membránou, vážou fosfolipidy a účastní se řady procesů na membráně jako např. apoptózy, koagulace a zánětu [90]. Úloha annexinů ve fyziologii srdce není dosud jasná. Změny exprese annexinu A5 byly již v souvislosti se srdečními poruchami (hypertrofie, selhávající srdce) popsány a tento annexin byl navržen na biomarker hypertenze a srdečního selhání [90, 91].

Jako vedlejší produkt okysličování a látkové výměny v tkáních vznikají velmi reaktivní volné radikály kyslíku (ROS – reactive oxygen species). Oxidativní stres způsobený ROS v kardiomyocytech může způsobit nevratné poškození buňky a indukovat její smrt. Oxidativní stres je jednou z možných příčin srdečního selhání [92]. ROS jsou v buňkách redukovány enzymem glutathionperoxidázou (GSHP), který k reakci využívá jako substrát redukovanou formu glutathionu (GSH). Ten je oxidován a vzniká tak GSSG. Oxidovaná forma glutathionu GSSG je redukována zpět enzymem glutathionreduktázou (GR). Antioxidační potenciál buňky je dán poměrem mezi redukovanou a oxidovanou formou glutathionu: GSH vs. GSSG (Obrázek 15). V kardiomyocytech je vysoký poměr GSH:GSSG zajišťován glutathionreduktázou závislou na NADPH. NADPH je v srdci produkován nikotinamidnukleotid transhydrogenázou (NNT) a izocitrát dehydrogenázou (ID). V AVP zvířatech měl enzym NNT, který produkuje 45 % celkové hladiny NADPH [93], významně nižší expresi v porovnání s kontrolními potkany. Sníženou expresi měla i NADP-dependentní ID (NID). Pokles exprese těchto dvou enzymů tak vede k nižší hladině dostupného NADPH a tedy ke snížení aktivity glutathionreduktázy. To může mít za následek zmenšenou schopnost buňky vypořádat se s oxidativním stresem. Měřením obsahu GSSG a GSH u AVP zvířat byla tato hypotéza potvrzena spoluautory v navazujícím experimentu [94].



Obrázek 15: Schéma cyklu glutathionu. Organické hydroperoxy (ROOH) jsou enzymem glutathionperoxidázou (GSHP) redukovány na méně reaktivní organické hydroxy (ROH). Touto reakcí vzniká z redukované formy glutathionu (GSH) forma oxidovaná (GSSG). Antioxidační potenciál buňky je dán poměrem mezi GSH a GSSG. V kardiomyocytech je vysoký poměr GSH:GSSG zajišťován glutathionreduktázou (GR) závislou na NADPH a ten je produkován nikotinamidnukleotid transhydrogenázou (NNT) a NADP-dependentní izocitrát dehydrogenázou (NID). Proteomická analýza prokázala významně sníženou expresi enzymů NNT a NID.

Mezi proteiny s největším rozdílem v expresi mezi kontrolními vzorky a AVP vzorky patřily transglutamináza 2 (TGM2) a monoaminoxidáza A (MAO-A). Hladina TGM2 byla zvýšená 3x v AVP vzorcích (potvrzeno western blotem, Obrázek 14). TGM2 je multifunkční protein nacházející se převážně v cytosolu a na buněčném povrchu. Transglutaminázová aktivita tohoto proteinu je odpovědná za stabilní cross-linking mezi lizinem a glutaminem v extracelulární matrix, čímž vzniká vysokomolekulární proteinová síť [95, 96]. Svou G-proteinovou aktivitou se TGM2 podílí na intracelulární signalizaci přes α 1-adrenergní a tromboxanové receptory [95] a je schopná indukovat apoptózu potkaních kardiomyocytů během oxidativního stresu [97]. Dvě nezávislé skupiny demonstrovaly vztah mezi zvýšenou expresí TGM2 a hemodynamickými a strukturními změnami srdeční tkáně, apoptózou kardiomyocytů, hypertrofií a fibrózou [98, 99]. Výsledky naší proteomické analýzy prokázaly zvýšenou hladinu TGM2, což je další důkaz toho, že se zvýšená exprese TGM2 podílí na poškození kardiomyocytů souvisejícím se srdeční hypertrofií a selháním. TGM2 je inhibovatelná nízkomolekulárními látkami (např. cystaminem a monodansylkadaverinem). Použití těchto inhibitorů vede ke snížení apoptózy indukované TGM2 v buňkách hladkého svalstva aorty [100] a částečné represi srdeční hypertrofie indukované hypoxií u potkanů [101]. TGM2 by proto mohla být novým zajímavým terapeutickým cílem v léčbě srdečního selhání.

Expresie MAO-A byla ve vzorcích AVP 4x zvýšená. Je to enzym zodpovědný za oxidativní deaminaci monoaminů epinefrinu, norepinefrinu a serotoninu. Touto reakcí vzniká peroxid vodíku a toxické aldehydové metabolity, které jsou dále metabolizované

aldehyd-dehydrogenázami [102]. Aldehyd-dehydrogenáza 1A1 měla také zvýšenou expresi ve vzorcích AVP. Peroxid vodíku produkovaný srdeční MAO-A přispívá k apoptóze kardiomyocytů [103] a zvýšená míra katabolizmu norepinefrinu díky zvýšené hladině MAO-A vede ke škodlivé remodelaci kardiomyocytů u potkaního modelu srdečního selhání indukovaného tlakovým přetížením [104]. MAO-A je pravděpodobně (i podle našich výsledků, viz článek v Příloze II, str. 105) jednou z příčin srdeční hypertrofie a selhání [105]. Nízkomolekulární inhibitory tohoto enzymu jsou již známé, například moklobemid je využíván při terapii deprese [106]. MAO-A je tak dalším potenciálním terapeutickým cílem při léčbě srdečního selhání.

Na proteomickou a transkriptomickou analýzu potkaní srdeční tkáně jsme dále navázali studií proarytmogenních znaků ve spolupráci se skupinou prof. Sedmery [81]. Arytmie srdečních komor je často pozorována u pacientů s CHSS a byla pozorována u 10 % potkanů s AVP zahrnutých v experimentu. Srdeční arytmie je velmi závažná porucha doprovázející CHSS [70]. Její vývoj je spojován se zvýšenou elektrickou heterogenitou srdeční tkáně a zpomaleným vedením elektrického impulzu v důsledku srdeční fibrózy, změn v buněčné a tkáňové architektuře, změn v excitaci buněčných membrán a/nebo změn v těsném spojení buněk (tzv. gap-junction) [107]. Toto těsné spojení membrán sousedících kardiomyocytů je velmi důležité pro správné šíření elektrického impulzu a pro synchronní kontrakce ve zdravém srdci. Hlavním proteinem tvořícím gap-junction potkaních kardiomyocytů je connexin 43 a jeho fosforylovaná forma (P-connexin 43) [108]. Ve studii navazující na proteomickou analýzu byla zjišťována přítomnost fibrózy v srdeční tkáni AVP potkanů a dále byly sledovány změny v expresi a distribuci connexinu 43 a P-connexinu 43 mezi kontrolními potkany a potkany s AVP. Tkáň AVP zvířat nevykazovala známky fibrózy, ale hladina connexinu 43 i jeho fosforylované formy byla u AVP vzorků v porovnání s kontrolními významně snížena (o 60 %) [81]. Množství, lokalizace connexinu 43 a úroveň jeho fosforylace ovlivňuje tvorbu a vodivost gap-junctions [109-113]. Nízká exprese connexinu 43 i P-connexinu 43 pozorovaná u AVP potkanů tak pravděpodobně zhoršuje kontraktální schopnost srdeční tkáně a přispívá ke zvýšenému riziku arytmie u AVP potkanů. Potenciální farmakologické ovlivnění exprese a fosforylace connexinu 43 [114] by mohlo omezit vznik srdeční arytmie u pacientů s CHSS a zlepšit tak jejich přežití a kvalitu života.

Naše „shotgun“ proteomická studie kombinující IPG-IEF peptidů s RP-HPLC a MALDI-MS/MS je dosud nejrozsáhlejší semikvantitativní proteomickou a

transkriptomickou analýzou změn souvisejících se srdečním selháním. Identifikovali a kvantifikovali jsme více než 2 000 proteinů. **Výsledkem této analýzy je navržení annexinů 2 a 5 na potenciální biomarkery srdečního selhání a navržení dvou potenciálních terapeutických cílů pro farmakologické zásahy (MAO-A a TGM2).** Dále jsme odhalili další, s CHSS dosud nespojované, proteiny a mechanismy, které s vývojem a zhoršením onemocnění pravděpodobně souvisí a jejichž identifikace otevírá prostor pro další hypotézy a cílené experimenty směřující k detailnímu pochopení CHSS nezbytnému pro jeho účinnou léčbu.

Výsledky naší práce jsme shrnuli ve dvou publikacích:

Proteomic and transcriptomic analysis of heart failure due to volume overload in a rat aorto-caval fistula model provides support for new potential therapeutic targets - monoamine oxidase A and transglutaminase 2. Petrak Jiri, Pospisilova Jana, Sedinova Miroslava, Jedelsky Petr, Lorkova Lucie, Vit Ondrej, Kolar Michal, Strnad Hynek, Benes Jan, Sedmera David, Cervenka Ludek, Melenovsky Vojtech. *Proteome Science* 2011;11,9(1):69 (viz Příloha II), IF 2,42.

Myocardial morphological characteristics and proarrhythmic substrate in the rat model of heart failure due to chronic volume overload. Benes Jiri Jr, Melenovsky Vojtech, Skaroupkova Petra, Pospisilova Jana, Petrak Jiri, Cervenka Ludek, Sedmera David. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 2011;294(1):102 (viz Příloha III), IF 1,34.

Tento projekt byl podporován Grantovou agenturou České republiky (305/09/1390), projektem CEVKOON (CZ.2.16/3.1.00/22126), Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (MSMT-IMO510, VZ 0021620806, 0021620858, LC06044 a SVV 2012-264507), projektem AV0Z50110509 a Ministerstvem zdravotnictví ČR (MZO-00023001, 00023736, IGA MZ NT12248-5, IGA-MZ NS10300-3, NS10497-3/2009).

2.3 Hledání diagnostických biomarkerů karcinomu ovaria

Proteomická analýza sér pacientek s karcinomem ovaria pomocí dvou různých proteomických strategií

2.3.1 Biomarkery

Biomarker je jakákoli měřitelná či stanovitelná biologická molekula fungující jako indikátor fyziologických nebo patologických procesů. Z medicínského hlediska je biomarker molekula, která se kvalitativně nebo kvantitativně mění v závislosti na vývoji či progresi onemocnění, a může tak napomáhat ke stanovení diagnózy nebo monitorování průběhu onemocnění.

Ideální klinicky využitelný diagnostický biomarker by měl rozpoznat onemocnění v raném stádiu, měl by být měřitelný jednoduše a levně, nejlépe ve snadno dostupných biologických materiálech (např. sérum/plazma, moč) bez nutnosti invazivního zásahu, a musí být pro dané onemocnění dostatečně senzitivní a specifický. Senzitivita biomarkeru vypovídá o jeho schopnosti identifikovat onemocnění u pacientů, kteří onemocněním trpí (poměr mezi počtem pacientů s pravdivě pozitivním testem a celkovým počtem testovaných pacientů s nemocí). Jde tedy o schopnost biomarkeru zachytit hledaný jev. Specifická biomarkeru je poměr mezi počtem pacientů s pravdivě negativním výsledkem a celkovým počtem testovaných lidí bez onemocnění. Vyjadřuje tak schopnost biomarkeru přesně odlišit testovaného pacienta, který onemocněním netrpí.

Proteomická analýza biologického materiálu může zachytit změny v expresi nebo koncentraci proteinu (v tkáních, nebo tělních tekutinách) – identifikovat ho, kvantifikovat, či detekovat jeho modifikace. Proto je vhodnou metodou pro hledání biomarkerů různých onemocnění. Přesto je nalezení biomarkeru velmi složitý proces. Šance na odhalení kandidátního proteinu, jeho identifikaci a kvantifikaci jsou ovlivněny výběrem vzorku (sérum, plazma, tkáň atd.), způsobem jeho odběru i dobou odběru, skladováním vzorku a manipulací s ním (oxidace na vzduchu, rozklad biologického materiálu, působení proteáz, fosfatáz a jiných enzymů atd.). Hladina proteinů v tělních tekutinách je ovlivněna fyziologickými ději probíhajícími v těle, věkem, životním stylem, genetickými faktory, vnějším prostředím atd. Hladina biomarkeru by měla být ovlivněna pouze samotným

onemocněním. Kontrolní skupina musí být bez studovaného onemocnění a musí být vhodně vybrána vzhledem k experimentální skupině pacientů. V mnoha případech je kritickým bodem statistická robustnost a reprodukovatelnost použitých detekčních metod.

2.3.2 Karcinom ovaria

Karcinom vaječníků (karcinom ovarii, KO) je závažné nádorové onemocnění postihující především ženy po menopauze. Nejčastěji se jedná o karcinom vzniklý z epitelových buněk na povrchu ovarii [115]. Další typy nádorů ovaria vznikají ze zárodečných buněk, ze kterých vznikají oocyty, nebo z pojivových tkání (stromálních buněk) v okolí vaječníků [116].

Mechanismy vedoucí ke vzniku nádoru vaječniku nejsou dosud zcela jasné. Riziko vzniku onemocnění roste s vyšším věkem žen (nejvíce jsou ohroženy ženy nad 50 let), pozitivní rodinnou anamnézou karcinomů ovarii, prsou, dělohy či střev spojených s mutacemi genů *BRCA1*, *BRCA2*, genů pro opravu mismatch chyb nebo genu *TP53*. Riziko rovněž roste s vyšším počtem ovulačních cyklů a snižuje se počtem porodů. Ke vzniku onemocnění přispívají i předchozí gynekologické problémy (cysty, endometrióza) a podílí se na něm i některé aspekty životního stylu (obezita, kouření a sedavý způsob života) [117]. Přibližně 15 % všech případů KO je familiárního původu a zbylých 85 % představují případy sporadické [118].

Léčba KO závisí na stádiu onemocnění a posuzována je velikost nádoru, jeho umístění, stupeň rozšíření a fyzický stav pacientky. Pokud je KO odhalen včas, ve stádiu I. a II. (nádor se nerozšířil do lymfatických uzlin ani dalších částí těla), pacientky mají 95 % pravděpodobnost přežití. Bohužel u téměř 70 % žen s nádorem vaječniku je onemocnění odhaleno až ve III. a IV. stádiu onemocnění s metastázemi (nádor již zasáhl jeden nebo oba vaječníky a je prokazatelně rozšířený ve vnitřní stěně dutiny břišní mimo pánevní oblast). Léčba je v takovém případě omezena na chirurgický zákrok (cytoredukce) a následnou chemoterapii (cytostatiky na bázi platiny a taxanu). Ve většině případů však u pacientek s pozdě odhaleným nádorem dochází do 15 měsíců od diagnózy k návratu onemocnění a do pěti let od diagnózy umírá 45 % těchto pacientek [119, 120].

Důvodem pozdní diagnózy KO je u velké části pacientek především absence specifických symptomů onemocnění v jeho počátcích. Nprovází ho bolesti a ani

preventivní gynekologickou prohlídkou není zpravidla objeven. Při podezření na KO je pacientkám provedena série testů: vyšetření ultrazvukem, magnetickou rezonancí nebo počítačovou tomografií a vyšetření krve na zjištění hladiny markeru CA-125. Někdy se pro potvrzení diagnózy a stanovení pokročilosti onemocnění (staging) provádí explorativní operace břišní dutiny (laparotomicky, laparoskopicky).

Nejběžněji používaný sérový marker karcinomu ovaria je protein mucin CA125 (cancer agent 125, nebo také MUC16, glykozylovaný transmembránový mucin o velikosti 1 MDa). CA125 sice vykazuje reprodukovatelné rozdíly v koncentraci mezi séry pacientek a zdravých kontrol, je detekován ve zvýšeném množství u 80 % případů KO, ale nedokáže spolehlivě rozlišit mezi maligním a benigním nádorem ovaria, neodhalí rané stádium onemocnění a jeho specifita a senzitivita jsou nízké (sérová koncentrace CA125 roste přibližně u poloviny pacientek v raném stádiu onemocnění, ale i u pacientek s jinými benigními gynekologickými onemocněními, s endometriózou, cirhózou a srdečními onemocněními) [115]. Nový biomarker HE4, uvedený do klinické praxe před několika lety s faktem, že jeho exprese může být zvýšená u pacientek s karcinomem ovaria, které nemají zvýšenou hladinu CA 125, rovněž zcela nenaplnil očekávání [116]. I přesto, že CA125 není dostatečně specifický a senzitivní marker KO a nedokáže odhalit raná stadia onemocnění, je to dosud nejspolehlivější marker tohoto onemocnění, který je k dispozici.

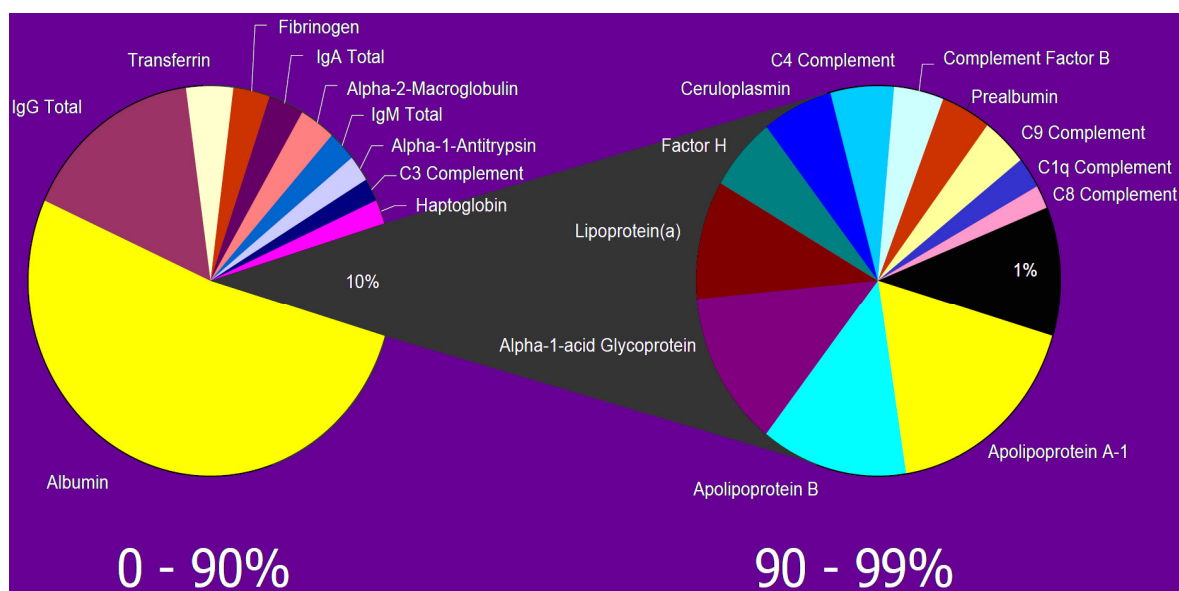
Celosvětově představuje karcinom vaječníků osmý nejčastější typ nádoru a sedmou nejčastější příčinu úmrtí žen na nádorová onemocnění [119, 120]. V rámci všech gynekologických nádorových onemocnění KO vykazuje nejvyšší úmrtnost. Proto je nutné usilovně pátrat po dalších, specifitějších a senzitivnějších diagnostických markerech karcinomu ovarii. Proto jsme se rozhodli hledat kandidátní bílkoviny pomocí diferenční proteomické analýzy sér pacientek s KO a zdravých kontrol.

2.3.3 Zpracování sér

Jako výchozí biologický materiál jsme pro tuto studii vybrali sérum, protože je to jednoduše dostupný zdroj cirkulujících informací o stavu organismu. Krev prochází orgánovými soustavami a „sbírá stopy“ všech probíhajících fyziologických i patologických dějů v podobě metabolitů, proteinů a peptidů uvolněných tkáněmi. Plazma je kapalná složka krve získaná centrifugací krve v přítomnosti antikoagulantu (odstraněny jsou krevní buňky a destičky). Sérum je kapalná složka krve získaná centrifugací přesrážené krve

(odstraněn je krevní koláč a krevní buňky), narozdíl od plazmy tak sérum neobsahuje fibrinogen a srážecí faktory. Plazma a sérum se tak svým složením liší minimálně.

Plazma a sérum jsou považovány za vhodný biologický materiál pro hledání markerů závažných onemocnění. Dosud bylo v séru/plazmě spolehlivě identifikováno kolem 3 000 proteinů [121], to ale pravděpodobně představuje pouze zlomek lidského sérového/plazmového proteomu. Současně je analýza krevního sérového či plazmového proteomu velmi obtížná, protože rozsah koncentrací jednotlivých proteinů v séru/plazmě je extrémní: od desítek mg/ml (albumin) až po pg/ml (interleukin 6), což odpovídá rozdílu řádově 10^{10} [7]. Devadesát procent proteinové hmoty plazmy tvoří jen 10 proteinů: albumin, transthyretin, IgG, IgA, α 2-makroglobulin, haptoglobin, ceruloplasmin, apolipoprotein, antitrypsin a transferin. Dvacet dva majoritních proteinů představuje více jak 99 % všech plazmových bílkovin (www.plasmaproteome.org) (Obrázek 16). Zbývající 1 % plazmového proteomu tak tvoří možný zdroj tisíců proteinů. Přítomnost proteinů o vysoké koncentraci ve vzorku komplikuje identifikaci proteinů, které jsou ve vzorku přítomné v nižších koncentracích. Proto je nutné před vlastní proteomickou analýzou séra či plazmy dynamický rozsah koncentrací proteinů snížit.



Obrázek 16: Procentuální zastoupení 22 lidských plazmových proteinů, které tvoří 99 % celkové proteinové hmoty plazmy, převzato z www.plasmaproteome.org. Levý diagram znázorňuje 10 nejhojnějších proteinů lidské plazmy tvořících 90 % proteinové hmoty. Zbýlých 10 % je znázorněno na pravém digramu. Pouhé 1 % z celkového množství lidských plazmových proteinů tvoří možný zdroj tisíců dalších proteinů.

Snížení dynamického rozsahu koncentrací proteinů v séru/plazmě je možné provést dvěma způsoby:

1) odstraněním nejhojnějších bílkovin pomocí protilátek (imunodeplece)

K imunodepleci se používají zpravidla imunoafinitní kolony schopné odstranit 6 až 20 nejhojnějších proteinů. V našem případě jsme použili tzv. MARS kolonku Human 14 (multiple affinity removal system spin cartridge, Agilent Technologies), která specificky odstraňuje 14 majoritních proteinů ze vzorků tělních tekutin (sérum, plazma a mozkomíšní mok), a to proteiny albumin, IgG, antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobin, fibrinogen, α 2-makroglobulin, α 1-glykoprotein, IgM, apolipoprotein AI, apolipoprotein AII, komplement C3 a transthyretin. Díky selektivní imunodepleci pomocí protilátek imobilizovaných v kolonce je většina celkové proteinové hmoty ze vzorku odstraněna a frakce minoritních proteinů, která není kolonou zachycena, je následně zakoncentrována pro proteomickou analýzu [122].

2) snížením koncentrace nejhojnějších proteinů pomocí tzv. hexapeptidové knihovny

Technologie hexapeptidové knihovny (v našem případě jsme použili ProteoMiner protein enrichment kit, Bio-rad) umožňuje „ekvalizaci“ (snížení rozdílů, vyrovnání) koncentrací proteinů v komplexních biologických vzorcích, jako jsou sérum a plazma. Principem této metody je interakce proteinů ve vzorku s rozsáhlou knihovnou hexapeptidů tvořících chromatografickou stacionární fázi. Tuto hexapeptidovou knihovnu tvoří syntetizované hexapeptidy kombinatoricky tvořené osmi různými aminokyselinami. V jedné kolonce je tak vázáno 6^8 různých typů těchto hexapeptidů [123].

Proteiny z původního vzorku (např. séra) se při průtoku kolonkou se zakotvenými hexapeptidy specificky vážou na různé hexapeptidy s různou afinitou, dokud nejsou všechny hexapeptidy obsazené. Poté je kolonka promyta a po uvolnění navázaných proteinů získáme eluát, ve kterém jsou rozdíly koncentrací proteinů sníženy, protože proteiny z původního vzorku se navázaly na určitý počet hexapeptidů a zbývající nenavázané proteiny byly vymyty. Ve výsledku tak tato metoda sníží koncentraci nejhojnějších proteinů ve vzorku.

2.3.4 Proteomická analýza sér

Do experimentu byly zapojeny pacientky, kterým byl odhalen epiteliální karcinom ovaria, sérum bylo odebráno před zahájením terapie. Kontrolní skupina zdravých žen odpovídala věkem pacientkám, průměrný věk pacientek byl $53,6 \pm 5,3$ let a kontrol $51,4 \pm 5,8$ let.

Proteomická analýza sér byla provedena dvěma paralelními přístupy využívajícími dva odlišné způsoby snížení dynamického rozsahu koncentrací proteinů v séru a dvě různé proteomické strategie (Obrázek 17):

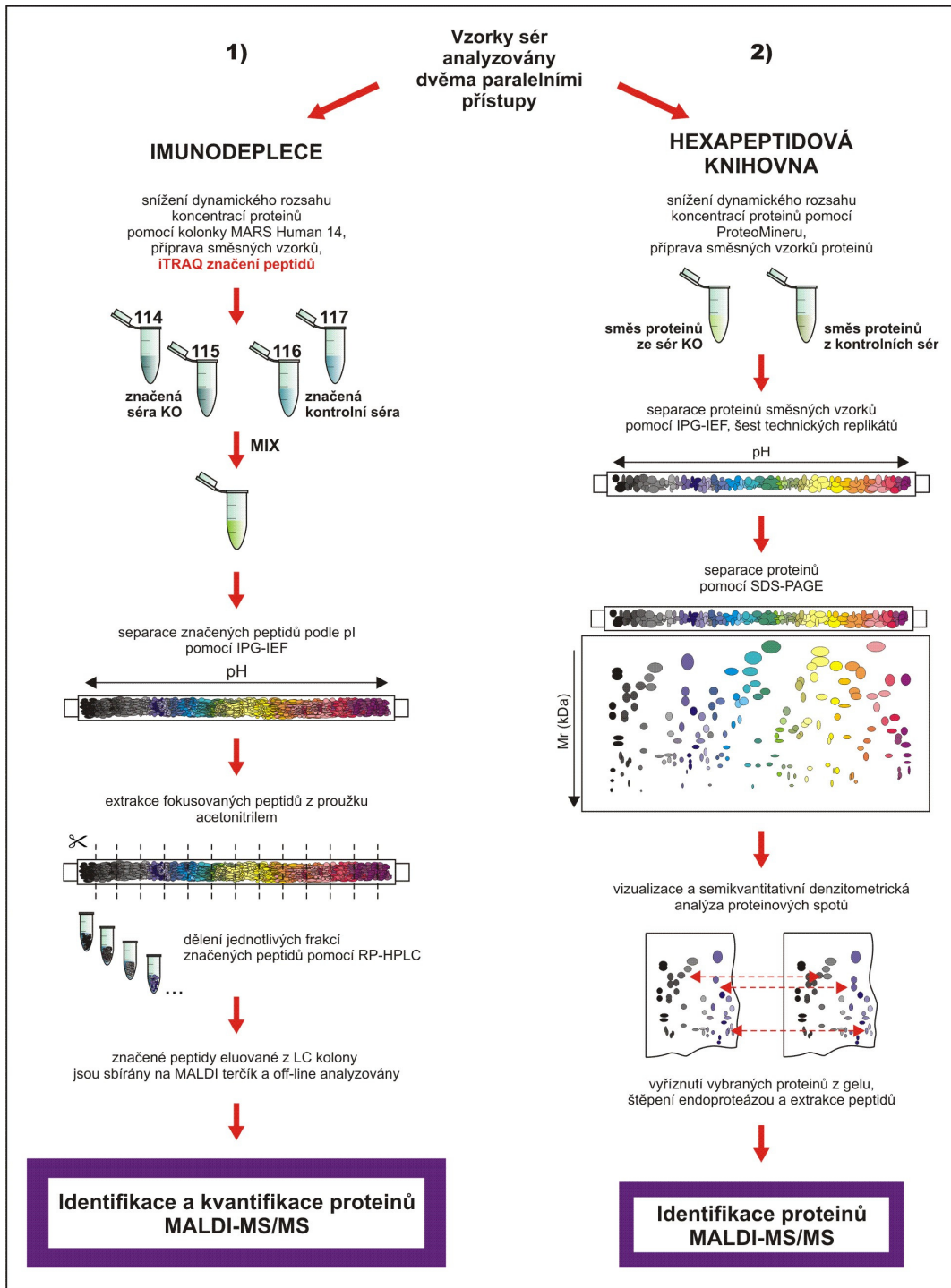
- 1) přístup kombinující imunodepleci séra s „shotgun“ strategií
- 2) přístup kombinující použití hexapeptidové knihovny s 2-DE

Kombinace imunodeplece s „shotgun“ strategií

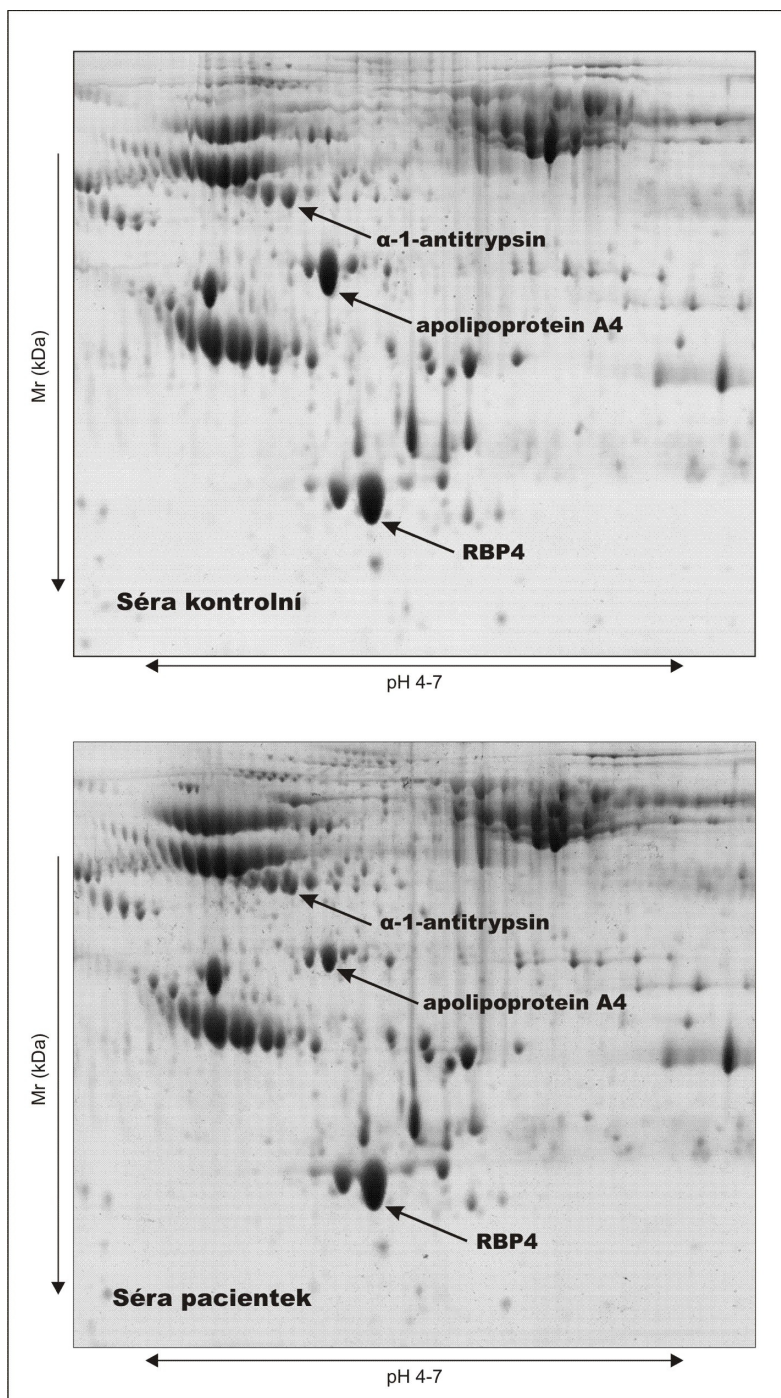
Po úpravě jednotlivých sér pomocí imunodeplece (MARS Human 14) byly eluáty spojeny do směšného reprezentativního vzorku, aby byly eliminovány potenciální rozdíly v rámci jedné skupiny. Jeden směšný vzorek tvořilo 10 sér pacientek a druhý směšný vzorek 10 sér kontrolních. Proteiny ze směšných vzorků byly vysráženy acetonem, štěpeny trypsinem a vzniklé peptidy byly značeny metodou iTRAQ. Poté byly značené peptidy separovány metodou IPG-IEF, IPG proužky byly rozděleny na několik frakcí a z nich extrahované peptidy byly dále děleny chromatograficky metodou RP-LC následovanou sběrem eluovaných peptidů na MALDI terčik a identifikací a kvantifikací pomocí MALDI-MS/MS.

Kombinace hexapeptidové knihovny s 2-DE

Ve druhém, paralelním přístupu, byly po úpravě jednotlivých sér pacientek i kontrol pomocí hexapeptidové knihovny (ProteoMiner) vytvořeny směšné vzorky analogicky s předchozím přístupem. Dále pak byly analyzovány pomocí 2-DE. Po vizualizaci proteinových spotů na gelech pomocí koloidní Coomassie G-250 byla provedena denzitometrická analýza obrazu naskenovaných gelů. Pomocí ekvalizace sér hexapeptidovou knihovnou jsme zvýšili počet spotů detekovatelných na 2-DE gelech 1,5x oproti 2-DE neupravených sér v pilotním experimentu. Po statistickém vyhodnocení intenzit proteinových spotů v šesti technických replikátech byly diferenciólně exprimované proteiny vyříznuty z gelu (Obrázek 18) a identifikovány hmotnostní spektrometrií MALDI-MS/MS.

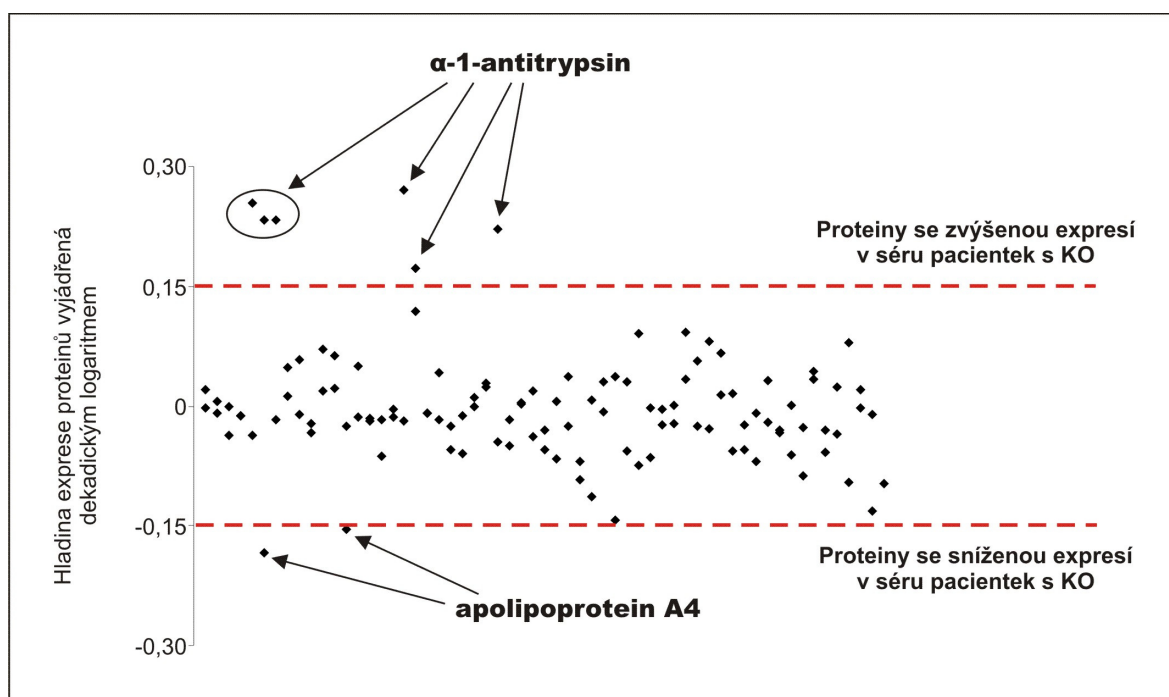


Obrázek 17: Dva paralelní způsoby zpracování vzorků sér pacientek s KO a kontrolních sér. 1) přístup kombinující imunodepleci sér s „shotgun“ strategií a 2) přístup kombinující ekvalizaci sér pomocí hexapeptidové knihovny s 2-DE. V obou případech jsou proteiny identifikovány hmotnostní spektrometrií.

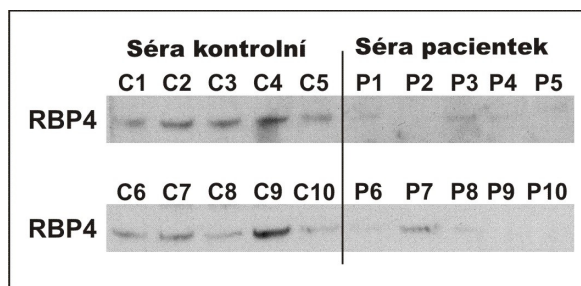


Obrázek 18: 2-DE analýza směsných vzorků sér pacientek s KO a kontrol po ekvalizaci pomocí hexapeptidové knihovny. Po vizualizaci proteinových spotů pomocí Coomassie G-250 bylo analyzováno 12 gelů. Po porovnání optické denzity byly vybrány tři spoty, proteiny byly identifikovány pomocí MALDI-MS.

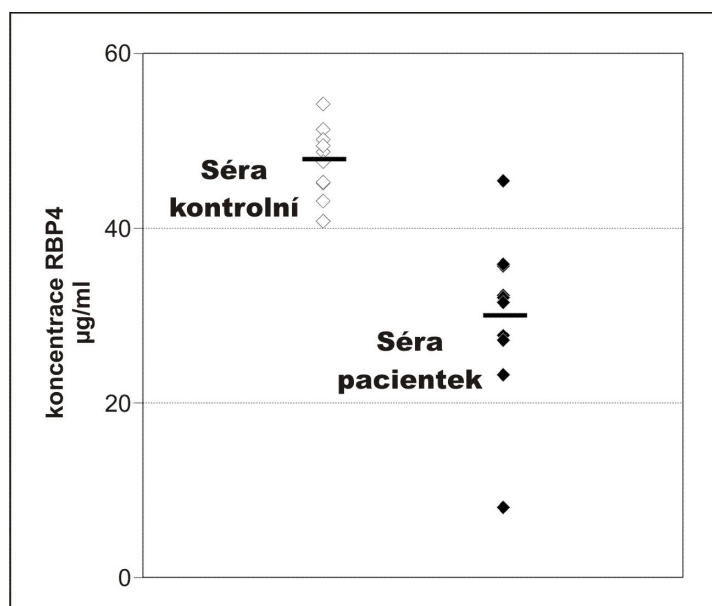
Pomocí 2-DE byly identifikovány 3 proteiny s rozdílnou koncentrací v sérech pacientek s KO ve srovnání s kontrolními séry. **Byla odhalena zvýšená koncentrace α -1-antitrypsinu (2x vyšší hladina v séru pacientek s KO) a snížená koncentrace dvou proteinů, apolipoproteinu A4 (2,3x nižší koncentrace) a retinol binding proteinu 4 (RBP4, 2,2x nižší koncentrace).** Strategie „shotgun“ v kombinaci se značením iTRAQ potvrdila diferenciální expresi α -1-antitrypsinu a apolipoproteinu A4, žádný další protein se změnou expresí jsme tímto přístupem neidentifikovali (Obrázek 19). Proto není tato část experimentálních dat dále diskutována, ani zahrnuta v publikaci. Změny v koncentraci proteinů byly ověřeny v individuálních neupravených sérech 10 pacientek s KO a 10 zdravých kontrol metodou western blot (Obrázek 20) a absolutní koncentrace RBP4 byly určeny metodou ELISA (Obrázek 21).



Obrázek 19: Hladiny exprese proteinů identifikovaných ve směsném vzorku upravených sér pacientek s KO a kontrolních sér. Séra byla upravena imunodeplecí, proteiny byly separovány a identifikovány strategií „shotgun“. Kvantitativní informace byla získána metodou iTRAQ. Měřeny byly dva technické replikáty. Červená čárkovaná linka odděluje proteiny se změnou expresí, se zvýšenou expresí v séru pacientek s KO (α -1-antitrypsin) a se sníženou expresí v séru pacientek s KO (apolipoprotein A4).



Obrázek 20: Analýza western blotem pro potvrzení změněné exprese RBP4 v původních neupravených vzorcích sér kontrol a pacientek s KO.



Obrázek 21: Stanovení absolutní koncentrace RBP4 v původních neupravených vzorcích sér kontrol a pacientek s KO metodou ELISA. Každý vzorek byl měřen v triplicátu.

Změny hladiny α -1-antitrypsinu a apolipoproteinu A4 byly v sérech pacientek s KO nalezeny a publikovány již dříve [124, 125], proto jsme se zaměřili na protein RBP4, který byl v této souvislosti identifikován poprvé. Průměrná koncentrace RBP4 stanovená metodou ELISA v jednotlivých neupravených sérech pacientek s KO byla 29,9 µg/ml a v sérech kontrolních 47,7 µg/ml. Koncentrace RBP4 se mezi pacientkami a kontrolami významně lišila a hranice 38-40 µg/ml odlišovala pacientky od kontrol (Obrázek 21). Koncentrace RBP4 v séru pacientek KO negativně korelovala s hladinou markeru ovariálního karcinomu CA125 ($r=-0,715$, $p=0,015$).

Sérový protein RBP4 je 21 kDa velký, sekretovaný hlavně játry, adipocyty, makrofágy a některými epitely včetně ovaria. RBP4 je specifický přenašeč retinolu (vitaminu A) z jater do periferních tkání a jeho produkce je regulována množstvím dostupného vitamínu. Pokud není vitamínu A dostatek, RBP4 zůstává v játrech [126, 127]. Komplex RBP4-retinol se v krvi váže na transthyretin, což zabraňuje ztrátám RBP4 i retinolu glomerulární filtrací v ledvinách [126]. Snížená hladina RBP4 v sérech pacientek s KO by tak mohla teoreticky souviset se sníženou hladinou retinolu a/nebo se změněnou hladinou transthyretinu. Proto jsme porovnali koncentraci vitamínu A v sérech pacientek a kontrol. Hladina retinolu však byla u obou skupin sér stejná, proto předpokládáme, že nízká koncentrace RBP4 v sérech pacientek nesouvisí se změnami v hladinách retinolu, ale s jinými změnami způsobenými přítomností nádoru.

Snížená koncentrace transthyretinu (TTR) v krvi pacientek s KO byla již dříve popsána a TTR byl označen za potenciální biomarker tohoto onemocnění [128-130]. I my jsme v jednotlivých sérech pacientek s KO a zdravých kontrol ověřili hladinu TTR. Statisticky významnou korelaci mezi hladinou TTR a RBP4 jsme ale neprokázali.

Dále nás zaujala souvislost mezi RBP4 a inzulínovou rezistencí u myších modelů tohoto onemocnění [131] a změny v hladině sérového RBP4 u pacientů s poruchou glukózové tolerance a diabetem 2. typu [132, 133]. Zvýšená koncentrace RBP4 v krvi byla také odhalena u obézních pacientek trpících syndromem polycystických ovaríí (onemocnění spojené s inzulínovou rezistencí) [133, 134]. Abychom vyloučili potenciální vliv těchto onemocnění, která s KO nesouvisí, na hladinu RBP4 v séru, zpětně jsme ověřili anamnézu žen zahrnutých do experimentu. Ani pacientky s KO, ani kontrolní ženy netrpěly diabetem a rozdíly při porovnání body mass indexu (BMI) pacientek s KO a kontrolních žen v našem experimentu nebyly statisticky významné.

2.3.5 Diskuze k dílčímu cíli

Provedli jsme expresní proteomickou analýzu sér pacientek s epiteliálním karcinomem ovaria a sér kontrolních zdravých žen dvěma paralelními přístupy s odlišným způsobem snížení dynamického rozsahu koncentrací proteinů v séru a dvěma různými proteomickými strategiemi: imunodeplecí séra v kombinaci s „shotgun“ strategií a ekvalizací séra pomocí hexapeptidové knihovny v kombinaci s 2-DE.

Vyloučili jsme několik faktorů, které by mohly teoreticky ovlivňovat hladinu RBP4 v séru, a to vliv koncentrace vitamínu A v séru, koncentrace transthyretinu v séru, možný vliv anamnézy inzulinové rezistence, diabetu 2. typu a polycystického syndromu ovarií.

Dále jsme ověřovali možný vliv změn tělesné váhy pacientek na hladinu sérového RBP4. Souvislost mezi změnou hladiny RBP4 a obezitou byla publikována, ale výsledná korelace mezi RBP4 a BMI (body mass indexem) je diskutabilní – některé práce potvrdily nižší hladinu RBP4 u žen s nízkou hodnotou BMI v porovnání s obézními ženami [132], jiné korelaci nepotvrdily [135]. U skupiny pacientů s patologickou obezitou bylo po gastrické bandáži prokázáno snížení koncentrace sérového RBP4 [134], testovali jsme proto vztah mezi poklesem koncentrace RBP4 v séru pacientek a kachexií způsobenou nádorem. V našem případě nebyly rozdíly v BMI pacientek s KO a kontrolních žen statisticky významné.

Tento výsledek tedy nepodpořil hypotézu, že snížená hladina RBP4 v krvi pacientek souvisí s poklesem jejich BMI v důsledku nádorové kachexie. Podstatou nádorové kachexie jsou metabolické změny podmíněné reakcí imunitního systému na rostoucí nádor. Snížená koncentrace RBP4 v séru pacientek s KO by tak mohla být ukazatelem nutričních změn, ke kterým dochází v důsledku přítomnosti karcinomu, a to ještě před patrnou ztrátou hmotnosti pacientek. Pro ověření této hypotézy je nutné provést další testování na větší skupině žen s karcinomem ovaria a zdravých žen, která bude dobře stratifikovaná z hlediska stádia karcinomu, věku žen a jejich celkového zdravotního stavu z důvodu možných souvisejících onemocnění.

Výsledky tohoto projektu byly shrnuty v publikaci:

Decreased concentrations of retinol-binding protein 4 in sera of epithelial ovarian cancer patients: a potential biomarker identified by proteomics. Lorkova Lucie, Pospisilova Jana, Lacheta Jan, Leahomschi Sergiu, Zivny Jaroslav, Cibula David, Zivny Jan, Petrak Jiri. *Oncology Reports* 2012;27(2):318 (viz Příloha IV), IF 2,30.

Projekt byl podporován Ministerstvem zdravotnictví ČR (IGA MZCR NT12248-5, NS10300-3); Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (VZ 0021620806, LC06044, SVV-2011-262507), Grantovou agenturou České republiky (305/09/1390) a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (GAUK 251180 111210).

3 DISKUZE

Cílem této dizertační práce bylo demonstrovat využití proteomických přístupů a nástrojů k řešení různých biomedicínských problémů. Dvě základní proteomické strategie a kvantifikační metody spolu s hmotnostní spektrometrií jsme využili ke studiu molekulárních mechanismů závažných onemocnění, a to na vzorcích pacientů, na buněčných kulturách a jednom modelovém organismu. Tři popsané projekty poskytly řadu cenných dat, která byla publikována ve čtyřech impaktovaných časopisech. Ukázali jsme, že expresní proteomika je velmi vhodný nástroj k odhalování rozdílů v expresi proteinů ve složitých biologických vzorcích. Má tak velký potenciál zejména ve studiích bez počáteční hypotézy a umožňuje komplexní vhled do molekulárních procesů, fyziologických i patologických.

I přes dosažené úspěchy naší práce jsme si vědomi omezení, která souvisí s provedením experimentů a s technickými limity proteomických metod a hmotnostní spektrometrie.

Limity a omezení jednotlivých projektů

V prvním projektu (kapitola 2.1 Identifikace potenciálních molekulárních cílů pro selektivní likvidaci buněk lymfomů z plášťové zóny rezistentních na protinádorovou molekulu TRAIL, str. 33) jsme odvozením rezistentního buněčného subklonu simulovali možnost vzniku rezistence nádorových buněk na TRAIL. Využili jsme k tomu buněčnou linii HBL-2 odvozenou z nádorových buněk pacienta trpícího lymfomem buněk z plášťové zóny. Experimenty s buněčnými kulturami jsou v základním a aplikovaném výzkumu často používané i přes řadu omezení, se kterými je nutné počítat. Kultivované buňky rostou za nefyziologických podmínek – pěstovány jsou v umělém kultivačním médiu a v atmosféře s mnohonásobně vyšším tlakem kyslíku, než odpovídá situaci ve tkáních. Kultivované buňky také postrádají obvyklý tkáňový kontext, tj. přítomnost jiných buněčných typů, s nimiž by *in vivo* komunikovaly. V důsledku toho se fenotyp kultivovaných buněk často mění a jejich vlastnosti nemusí přesně odpovídat situaci v organismu. Proto je nutné počítat s omezenou možností aplikace získaných výsledků přímo na pacienta. Reálně může v těle pacienta v průběhu léčby TRAIlem (či obecně jakoukoli protinádorovou terapií) vznikat řada buněčných klonů s odlišným fenotypem.

Tento projekt si však kladl za cíl na *in vitro* modelu 1) demonstrovat potenciál proteomické analýzy k odhalení molekulárních změn asociovaných s vývojem rezistence nádorových buněk a 2) dokumentovat využití odhalených změn k navržení způsobu eliminace rezistentních buněk. V budoucnosti bychom rádi analogickou proteomickou analýzu provedli přímo na patientských vzorcích a demonstrovali tak její skutečný potenciál pro translační výzkum.

Cílem našeho druhého projektu (kapitola 2.2 Popis molekulárních mechanismů srdečního selhání s využitím potkaního modelu objemového přetížení, str. 46) bylo identifikovat změny v expresi proteinů a mRNA v průběhu srdečního selhání na potkaním modelu chronického srdečního selhání (CHSS). Motivem této expresní proteomické a transkriptomické analýzy byla nutnost hlubšího pochopení onemocnění nezbytná ke zlepšení terapie CHSS. Identifikované změny přispěly k dalšímu popisu CHSS na molekulární úrovni a odhalené změny v expresi dvou enzymů MAO-A a TGM2 nás vedly k navržení dvou různých potenciálních terapeutických zásahů.

Patologické procesy spojené s vývojem a progresí CHSS dosud nebyly detailně popsány. Souvisí to nejen s komplexností tohoto klinického syndromu, ale také s tím, že studium tohoto závažného onemocnění na vzorcích myokardu pacientů není možné, protože by se neobešlo bez zbytečné zátěže pacientů a zdravých kontrol. Proto jsme se rozhodli provést proteomickou studii na dobře definovaném potkaním modelu, kde CHSS nastává v důsledku objemového přetížení srdce po operativním zákroku [75, 76]. Zvířecí modely různých lidských onemocnění jsou podobně jako experimenty s buněčnými kulturami pro základní biomedicínský výzkum velkým přínosem. Je však nutné počítat s omezenou možností aplikace výsledků přímo na pacienta z důvodů mezidruhových rozdílů.

Možná omezení vyplývající z využití potkaního modelu však nejsou jediná, která je na tomto místě nutné diskutovat. Proteomickou a transkriptomickou analýzu jsme neprováděli na izolovaných kardiomyocytech, ale na části srdeční tkáně, myokardu. Taková tkáň neobsahuje pouze kardiomyocyty a nalezené expresní změny nemusí odrážet úroveň exprese v kardiomyocytech, ale mohou být odrazem změněné exprese v jiných typech buněk, například v endotelu nebo makrofázích infiltrujících myokard vlivem odpovědi organismu na zánětlivé procesy probíhající v poškozeném srdci. Další omezení našeho experimentu spočívá v tom, že jsme porovnávali kontrolní (zdravé) potkany se zvířaty se srdečním selháním (AVP) v jediném časovém intervalu, cca 22 týdnů

po vytvoření píštěle. Rozsáhlejší analýza zahrnující více časových bodů by nám pravděpodobně umožnila rozlišit, zda získané výsledky odráží metabolické a strukturní změny způsobené srdečním selháním, nebo jestli tyto změny souvisí pouze s hypertrofií srdce, která srdečnímu selhání předchází. Takovou analýzu plánujeme provést v brzké budoucnosti.

Cílem třetího projektu (kapitola 2.3 Hledání diagnostických biomarkerů karcinomu ovaria, str. 59) bylo identifikovat proteiny v sérech pacientek s karcinomem ovaria (KO), které by mohly sloužit jako biomarkery tohoto onemocnění. KO je nádorové onemocnění s velmi špatnou prognózou, u kterého je léčba komplikována především pozdní diagnózou. Pacientky většinou netrpí specifickými příznaky, které by odhalily karcinom v rané fázi. Proto je nutné pátrat po jiných diagnostických možnostech, mezi které patří právě senzitivní a specifické markery.

Sérum teoreticky obsahuje stopy všech probíhajících fyziologických i patologických dějů v podobě metabolitů, proteinů a peptidů uvolněných tkáněmi, a proto je vhodným zdrojem pro hledání biomarkerů. Biomarkerem karcinomu ovaria může být molekula pocházející přímo z nádorové buňky, nebo z okolních tkání reagujících na přítomnost nádoru, anebo to může být molekula související s imunitní odpovědí organismu. Stejně tak to může být molekula související s jakoukoli jinou odpovědí organismu na změny probíhající v nádorové či okolní tkáni. Dá se předpokládat, že potenciální biomarker bude v séru přítomný ve velmi nízké koncentraci v porovnání s dalšími jeho složkami. Dnešní analytické metody nejsou schopné bez předchozí úpravy minoritní neznámou složku séra odhalit, protože jejich dynamický rozsah je řádově $10^4 - 10^5$ [33, 136]. Proto je nutné dynamický rozsah koncentrací jednotlivých proteinů séra snížit. V našem projektu jsem k tomu použili dva odlišné přístupy, a to imunoafinitní depleci nejhojnějších proteinů a ekvalizaci koncentrací proteinů pomocí hexapeptidové knihovny. Komplikací takové úpravy je skutečnost, že odstraněním abundantních proteinů ze séra dochází také ke ztrátám dalších proteinů a peptidů. Už odstranění albuminu ze séra může znamenat ztráty proteinů, které s albuminem interagují. Mezi takovými proteiny může teoreticky být i potenciální biomarker.

Porovnáním vzorků sér pacientek a kontrol se nám podařilo odhalit změny v koncentraci proteinu RBP4. Koncentrace RBP4 byla významně nižší v sérech pacientek s KO a při ověření metodou ELISA odlišovala pacientky od kontrol hranice 38-40 $\mu\text{g/ml}$. Vztah RBP4 ke KO je však zcela nejasný. Vyloučili jsme vliv několika možných faktorů,

o kterých je známo, že mohou hladinu RBP4 ovlivňovat, a tím je koncentrace vitamínu A v krvi, diabetes 2. typu (inzulinová rezistence), polycystický syndrom ovaríí a obezita.

Snížená hladina RBP4 v séru pacientek s KO je pravděpodobně spojena buď se změnami v metabolismu retinoidů u pacientek, sníženou produkcí RBP4 v epitelu ovaríí, nebo odráží obecnější procesy související s energetickým metabolismem a dalšími systémovými změnami v organismu. V každém případě je nezbytné, aby tyto hypotézy byly v budoucnosti testovány na větší skupině pacientek a zdravých žen, která bude dobře stratifikovaná z hlediska stádia onemocnění, věku a celkového zdravotního stavu.

Technické limity a omezení proteomických metod

Řadu let byla proteomika založená přednostně na separaci proteinů dvourozměrnou elektroforézou (2-DE). 2-DE separuje intaktní proteiny na základě odlišných migračních vlastností. Díky tomu je možné na 2-DE gelu odlišit i různé varianty jednotlivých proteinů (proteoformy), což je hlavní výhodou této metody. Odlišnosti ve struktuře proteoforem (způsobené alternativním splicingem, posttranskripčními a posttranslačními modifikacemi) jsou během separace zachovány a pokud mění pI a/nebo Mr proteinu do té míry, že proteoformy migrují odlišně, budou mít na 2-DE gelu jinou pozici a lze je rozlišit.

2-DE má však svá omezení. Je například nevhodná k separaci proteinů s vysokou i nízkou molekulovou hmotností, protože proteiny o velikosti nad 150 kDa neproniknou do IPG stripu prvního rozměru a u proteinů pod cca 15 kDa k separaci nedochází (ve druhém rozměru migrují společně v čele) [137]. 2-DE je také nevhodná pro proteiny s extrémními hodnotami pI [137, 138]. Především je ale 2-DE nevhodná pro analýzu transmembránových proteinů [139], protože tyto amfipatické molekuly mohou být ztraceny již během přípravy vzorku (jsou málo solubilní), anebo precipitují během fokusace.

Určitá část proteinů je tak ze vzorku během procedury 2-DE ztracena, ať už kvůli velikosti, hodnotám pI, hydrofobicitě, či množství proteinu ve vzorku. 2-DE je metoda s malým dynamickým rozsahem a nízkou citlivostí detekce [140] vhodná pouze pro solubilní hojně středně velké hydrofilní proteiny. Přesto je 2-DE metodou stále používanou hlavně díky možnosti rozlišit jednotlivé proteoformy.

Spolehlivost kvantifikace je ale dalším problémem 2-DE. Proteoformy jednoho genu mohou migrovat různě a být zastoupeny v několika (ve dvaceti i více) spotech [141].

Stejně tak mohou různé proteiny migrovat shodně (komigrovat) a překrývat se v jednom spotu na gelu (až 23 proteinů v jednom spotu). To komplikuje jejich kvantifikaci, která je založená na porovnání optické hustoty proteinových spotů. B. Thiede uvádí, že jen 17 % zkoumaných spotů je tvořeno pouze jediným proteinem. Kvantifikace pomocí 2-DE tak může být u zbývajících 83 % vizualizovaných spotů nepřesná [141].

Další komplikaci při 2-DE analýzách naznačila meta-analýza řady publikovaných proteomických dat celkově ve 169 článcích (cca 4 700 proteinů identifikovaných v celobuněčných lyzátech lidské, myši a potkaní tkáně). Ta ukázala, že některé proteiny jsou pomocí 2-DE identifikovány jako diferencially exprimované nápadně často (např. enoláza 1 v jedné studii ze čtyř), bez ohledu na experiment a původ biologického vzorku [142]. Dosud není zcela jasné, jedná-li se o biologický jev reprezentující odpověď buněk na stres, nebo zda-li jde o artefakt 2-DE analýzy odrážející technická omezení této metody.

Z výše uvedených důvodů je 2-DE často nahrazována „shotgun“ strategií (tedy separací a identifikací na úrovni peptidů) v kombinaci se značením proteinů/peptidů stabilními izotopy. Výhodou „shotgun“ strategie oproti 2-DE je hlavně v množství identifikovaných proteinů v jediném experimentu: u 2-DE jsou to maximálně stovky proteinů [141], kdežto „shotgun“ strategií lze v buněčném homogenátu identifikovat až 10 000 bílkovin [6, 32]. Pomocí „shotgun“ přístupu mohou být detekovány i proteiny o velikosti nad 150 kDa, i ty s extrémními hodnotami pI, protože separace probíhá na úrovni peptidů, které jsou proti proteinům mnohem menší, mají různé hodnoty pI a rozpustnosti a jsou vhodnější pro separační techniky. Další výhodou oproti 2-DE je možnost automatizace, která u 2-DE možná není.

Zásadním problémem „shotgun“ přístupu je však ztráta informace o struktuře intaktního proteinu. Dochází k ní naštěpením všech proteinů na peptidy a jejich smícháním. Dochází tedy ke ztrátě kontextu. Software neskládá ze sekvence několika peptidů celý protein, pouze identifikované peptidy přiřazuje k aminokyselinové sekvenci odvozené z genu, který protein kóduje. Nedokáže tak rozlišit a kvantifikovat různé proteoformy vzniklé z jednoho genu např. alternativním sestřihem, či posttranslačními modifikacemi. Vyhledávací algoritmus také není schopen rozlišit, které kombinace posttranslačních modifikací se nacházejí v jednotlivých proteoformách jednoho proteinu. Metodou „shotgun“ tak nejsme schopni identifikovat a kvantifikovat různé proteoformy pocházející z jednoho genu, ale zpravidla pouze kódující gen, což je hlavní nevýhoda této metody.

Kvantifikace v „shotgun“ experimentech pomocí stabilních izotopů je založena na vnesení hmotnostního rozdílu do molekuly proteinu/peptidu pozorovatelného v MS nebo MS/MS spektru. Výhodou těchto přístupů, oproti 2-DE analýze, je zpracování značených vzorků dohromady, což snižuje pravděpodobnost vnesení chyby do experimentu a zvyšuje reprodukcibilitu analýzy. Nevýhodou izotopického značení je hlavně cena a vysoký počet experimentálních kroků od značení až po analýzu vzorku.

Značný metodický pokrok umožnil proteomické analýzy, které identifikují několik tisíc bílkovin v jediném vzorku, jedna skupina proteinů však zůstává z velké části opomíjena. Společnou nevýhodou obou proteomických strategií je velmi omezená schopnost identifikovat transmembránové proteiny. Analýza transmembránových proteinů (TMP) tak představuje zvláštní a dosud neuspokojivě metodicky vyřešenou kapitolu proteomiky.

Problém analýzy TMP je jejich nízká exprese a hlavně jejich amfipatická povaha – skládají se jak z hydrofilních úseků, které jsou mimo lipidovou membránu, tak z hydrofóbních úseků (α -helixů), které jsou zanořené v membráně. Jednou z možností proteomické analýzy TMP je nabohacení membránových frakcí [143] následované použitím detergentů a organických látek pro solubilizaci a/nebo extrakci intaktních TMP z lipidových membrán, proteolytickým štěpením a identifikací pomocí MS. Nevýhod tohoto postupu je ale několik. Nabohacením membrán sice zvýšíme podíl TMP ve vzorku, ale stejně tak i periferních membránových a cytoskeletálních proteinů. Prakticky nevyhnutelné použití detergentu může navíc komplikovat digesci proteinů, separaci při LC a především identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie.

Další možností jak provádět proteomickou analýzu TMP je izolace hydrofilních povrchových domén TMP na základě značení proteinů plazmatické membrány intaktních buněk s následnou afinitní chromatografií. Tímto postupem (tzv. cell surface capturing, CSC) se podařilo identifikovat až 500 různých TMP pocházejících z plazmatické membrány leukemických buněk [144]. Metoda CSC není univerzálně použitelná na všechny TMP, ale pouze na TMP plazmatické membrány, které lze povrchově značit (pokud vnější úsek proteinu neobsahuje lyzin nebo není glykosylovaný nelze ho značit metodou CSC), a které mají extramembránové úseky přístupné trypsinu. Proto byl vyvinut jiný způsob proteomické analýzy TMP, cílený na membránou chráněné α -helixy [145]. Membrány z nabohacené frakce jsou vystaveny proteináze K a hydrofilní extramembránové úseky spolu s kontaminujícími proteiny jsou odštěpeny. Hydrofóbní

transmembránové α -helixy zanořené v membránách jsou solubilizovány organickou kyselinou a chemicky doštěpeny bromkyanem na kratší fragmenty vhodné pro MS/MS analýzu. Tímto postupem lze dosáhnout nejefektivnějšího nabohacení TMP (mezi všemi identifikovanými proteiny tvořily TMP až 82 %) [146].

TMP tvoří spojení mezi intracelulární částí buňky a okolním prostředím. Kódovány jsou podle predikce ze sekvence lidského genomu až 30 % genů [146] a hrají zcela zásadní roli v mnoha buněčných procesech a tvoří důležité cíle farmaceutik – až dvě třetiny léčiv míří právě na TMP. Nejčastěji se jedná o TMP exprimované na plazmatické membráně, ale také na TMP lokalizované v membránách endoplazmatického retikula, mitochondrií a dalších organel. Kolem jedné třetiny všech genů kódujících protein nebylo na proteinové úrovni dosud potvrzeno. Geny kódující TMP mezi ně patří hlavně z toho důvodu, že v běžné proteomické studii k identifikaci TMP nedochází. Proto je nutné zdokonalovat či vyvíjet proteomické metody cílené právě na TMP.

Proteomické strategie zítřka

Strategie „shotgun“ sice umožňuje identifikovat tisíce proteinů v jediném experimentu, ale je počet identifikací to nejpodstatnější hledisko proteomických studií? Proteomické studie přispívají k popisu fyziologických i patologických molekulárních mechanismů, a protože i malá změna ve struktuře proteinu může měnit jeho funkci, směřuje studium proteomu právě k analýze umožňující identifikovat jednotlivé proteoformy. Identifikace intaktních proteinů pomocí MS je možná cestou tzv. „top-down“ přístupů.

Příkladem takového přístupu je práce N.L. Kellehera a spol. [147], kteří separovali komplexní směs intaktních proteinů modifikovanou 2-DE ve spojení s LC. Intaktní proteiny nejdříve separovali podle pI (IEF v roztoku), poté podle jejich Mr (SDS-PAGE) a dále pomocí RP-LC/MS. Problém s extrakcí intaktních proteinů z SDS-PAGE vyřešili tak, že proteiny nechali z gelu vymigrovat do roztoku. Postupně pak sbírali frakce proteinů s rozdílnou Mr – tzv. GELFREE (gel elution liquid-based fractionation entrapment electrophoresis). Po následném chromatografickém dělení intaktních proteinů spojeném online s hmotnostním spektrometrem identifikovali 3 000 proteoform, které prezentovaly 1 043 genů. Detekované proteoformy vznikly posttranslační modifikací, odlišným RNA splicingem, nebo například proteolýzou.

Další krok do budoucna představuje spojení nejnovějších proteomických strategií s metodami, které umožňují absolutní kvantifikaci exprese proteinů.

4 ZÁVĚR

Potenciál expresní proteomiky v oblasti biomedicíny jsme demonstrovali využitím proteomických nástrojů na třech různých projektech, které se lišily jak koncepcí, tak kombinací separačních a kvantifikačních metod. Podařilo se nám odhalit některé změny související s rezistencí lymfomové buněčné linie na protinádorovou molekulu TRAIL a navrhnout možné terapeutické cíle pro selektivní likvidaci těchto rezistentních buněk. Dále jsme přispěli k popisu dosud nejasných mechanismů patologických změn v selhávajícím myokardu studiem potkaního modelu chronického srdečního selhání a navrhli dva možné terapeutické zásahy vhodné k léčbě tohoto onemocnění. V neposlední řadě jsme porovnáním sér pacientek s karcinomem ovaria se séry kontrolními identifikovali potenciální diagnostický biomarker karcinomu.

Proteomika je dynamický metodický a koncepční přístup ke studiu organismů, který se stal součástí základního i aplikovaného výzkumu, protože při vhodném uspořádání experimentu a kritickém vyhodnocení získaných informací poskytuje cenný vhled do fyziologických i patologických molekulárních procesů.

5 POUŽITÁ LITERATURA

1. Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., and Humphery-Smith, I., *Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis, 1995. **16**(7): p. 1090-4.
2. Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J.M., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, F., Aken, B.L., Barrell, D., Zadissa, A., Searle, S., Barnes, I., Bignell, A., Boychenko, V., Hunt, T., Kay, M., Mukherjee, G., Rajan, J., Despacio-Reyes, G., Saunders, G., Steward, C., Harte, R., Lin, M., Howald, C., Tanzer, A., Derrien, T., Chrast, J., Walters, N., Balasubramanian, S., Pei, B., Tress, M., Rodriguez, J.M., Ezkurdia, I., van Baren, J., Brent, M., Haussler, D., Kellis, M., Valencia, A., Reymond, A., Gerstein, M., Guigo, R., and Hubbard, T.J., *GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project*. Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1760-74.
3. Kelleher, N.L., *A cell-based approach to the human proteome project*. J Am Soc Mass Spectrom, 2012. **23**(10): p. 1617-24.
4. Schwanhausser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M., *Global quantification of mammalian gene expression control*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 337-42.
5. Jensen, O.N., *Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry*. Curr Opin Chem Biol, 2004. **8**(1): p. 33-41.
6. Beck, M., Schmidt, A., Malmstroem, J., Claassen, M., Ori, A., Szymborska, A., Herzog, F., Rinner, O., Ellenberg, J., and Aebersold, R., *The quantitative proteome of a human cell line*. Mol Syst Biol, 2011. **7**: p. 549.
7. Anderson, N.L., *The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects*. Molecular & Cellular Proteomics, 2002. **1**(11): p. 845-867.
8. Raymond, S., Nakamichi, M., and Aurell, B., *Acrylamide gel as an electrophoresis medium*. Nature, 1962. **195**: p. 697-8.
9. Shapiro, A.L., Vinuela, E., and Maizel, J.V., Jr., *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. Biochem Biophys Res Commun, 1967. **28**(5): p. 815-20.

10. Pitt-Rivers, R. and Impiombato, F.S., *The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins*. Biochem J, 1968. **109**(5): p. 825-30.
11. Vesterberg, O. and Svensson, H., *Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins*. Acta Chem Scand, 1966. **20**(3): p. 820-34.
12. Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R., and Postel, W., *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications*. J Biochem Biophys Methods, 1982. **6**(4): p. 317-39.
13. Martin, A.J. and Synge, R.L., *A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins*. Biochem J, 1941. **35**(12): p. 1358-68.
14. Horvath, C.G., Preiss, B.A., and Lipsky, S.R., *Fast liquid chromatography: an investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers*. Anal Chem, 1967. **39**(12): p. 1422-8.
15. Howard, G.A. and Martin, A.J., *The separation of the C12-C18 fatty acids by reversed-phase partition chromatography*. Biochem J, 1950. **46**(5): p. 532-8.
16. Sandra, K., Moshir, M., D'Hondt, F., Verleysen, K., Kas, K., and Sandra, P., *Highly efficient peptide separations in proteomics Part 1. Unidimensional high performance liquid chromatography*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **866**(1-2): p. 48-63.
17. Sandra, K., Moshir, M., D'Hondt, F., Tuytten, R., Verleysen, K., Kas, K., Francois, I., and Sandra, P., *Highly efficient peptide separations in proteomics. Part 2: bi- and multidimensional liquid-based separation techniques*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(11-12): p. 1019-39.
18. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
19. Edman, P., *A method for the determination of amino acid sequence in peptides*. Arch Biochem, 1949. **22**(3): p. 475.
20. Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, M., and Fenn, J.B., *Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers*. Anal Chem, 1985. **57**(3): p. 675-9.

21. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
22. Karas, M. and Hillenkamp, F., *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 1988. **60**(20): p. 2299-301.
23. Wollnik, H., *Time-of-Flight Mass Analyzers*. Mass Spectrometry Reviews, 1993. **12**(2): p. 89-114.
24. March, R.E., *Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century*. International Journal of Mass Spectrometry, 2000. **200**(1-3): p. 285-312.
25. Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., and Graham Cooks, R., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(4): p. 430-43.
26. Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., and Watanabe, C., *Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5011-5.
27. Mann, M., Hojrup, P., and Roepstorff, P., *Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases*. Biol Mass Spectrom, 1993. **22**(6): p. 338-45.
28. Yates, J.R., 3rd, Speicher, S., Griffin, P.R., and Hunkapiller, T., *Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification*. Anal Biochem, 1993. **214**(2): p. 397-408.
29. James, P., Quadroni, M., Carafoli, E., and Gonnet, G., *Protein identification by mass profile fingerprinting*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **195**(1): p. 58-64.
30. Thiede, B., Hohenwarter, W., Krah, A., Mattow, J., Schmid, M., Schmidt, F., and Jungblut, P.R., *Peptide mass fingerprinting*. Methods, 2005. **35**(3): p. 237-47.
31. Huang, T., Wang, J., Yu, W., and He, Z., *Protein inference: a review*. Brief Bioinform, 2012. **13**(5): p. 586-614.
32. Nagaraj, N., Wisniewski, J.R., Geiger, T., Cox, J., Kircher, M., Kelso, J., Paabo, S., and Mann, M., *Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line*. Mol Syst Biol, 2011. **7**: p. 548.

33. Marshall, A.G., Hendrickson, C.L., and Jackson, G.S., *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer*. Mass Spectrom Rev, 1998. **17**(1): p. 1-35.
34. Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-86.
35. Gouw, J.W., Krijgsveld, J., and Heck, A.J., *Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(1): p. 11-24.
36. Mirgorodskaya, O.A., Kozmin, Y.P., Titov, M.I., Korner, R., Sonksen, C.P., and Roepstorff, P., *Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using (18)O-labeled internal standards*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2000. **14**(14): p. 1226-32.
37. Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A., and Pappin, D.J., *Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(12): p. 1154-69.
38. Thompson, A., Schafer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Johnstone, R., Mohammed, A.K., and Hamon, C., *Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS*. Anal Chem, 2003. **75**(8): p. 1895-904.
39. Koehler, C.J., Strozynski, M., Kozielski, F., Treumann, A., and Thiede, B., *Isobaric peptide termini labeling for MS/MS-based quantitative proteomics*. J Proteome Res, 2009. **8**(9): p. 4333-41.
40. Neilson, K.A., Ali, N.A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Lee, A., van Sluyter, S.C., and Haynes, P.A., *Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry*. Proteomics, 2011. **11**(4): p. 535-53.
41. Sant, M., Allemani, C., Tereanu, C., De Angelis, R., Capocaccia, R., Visser, O., Marcos-Gragera, R., Maynadie, M., Simonetti, A., Lutz, J.M., Berrino, F., and Group, H.W., *Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3724-34.

42. Perez-Galan, P., Dreyling, M., and Wiestner, A., *Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era*. Blood, 2011. **117**(1): p. 26-38.
43. Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M., *Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation*. Science, 1984. **224**(4656): p. 1403-6.
44. Williams, M.E., Swerdlow, S.H., Rosenberg, C.L., and Arnold, A., *Characterization of chromosome 11 translocation breakpoints at the bcl-1 and PRAD1 loci in centrocytic lymphoma*. Cancer Res, 1992. **52**(19 Suppl): p. 5541s-5544s.
45. Ferrero, S. and Dreyling, M., *The current therapeutic scenario for relapsed mantle cell lymphoma*. Curr Opin Oncol, 2013. **25**(5): p. 452-62.
46. Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A., and et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
47. Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., and Ashkenazi, A., *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12687-90.
48. Kaplan, M.J., Ray, D., Mo, R.R., Yung, R.L., and Richardson, B.C., *TRAIL (Apo2 ligand) and TWEAK (Apo3 ligand) mediate CD4+ T cell killing of antigen-presenting macrophages*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 2897-904.
49. Wallin, R.P., Screpanti, V., Michaelsson, J., Grandien, A., and Ljunggren, H.G., *Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity*. Eur J Immunol, 2003. **33**(10): p. 2727-35.
50. Di Pietro, R. and Zauli, G., *Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L*. J Cell Physiol, 2004. **201**(3): p. 331-40.
51. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 420-30.
52. Peter, M.E. and Krammer, P.H., *The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 26-35.

53. Lee, H.W., Lee, S.H., Lee, H.W., Ryu, Y.W., Kwon, M.H., and Kim, Y.S., *Homomeric and heteromeric interactions of the extracellular domains of death receptors and death decoy receptors*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **330**(4): p. 1205-12.
54. Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M.J., and Chan, F.K., *Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(50): p. 18099-104.
55. Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., and Micheau, O., *Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(19): p. 7046-55.
56. Castro Alves, C., Terziyska, N., Grunert, M., Gundisch, S., Graubner, U., Quintanilla-Martinez, L., and Jeremias, I., *Leukemia-initiating cells of patient-derived acute lymphoblastic leukemia xenografts are sensitive toward TRAIL*. *Blood*, 2012. **119**(18): p. 4224-7.
57. Petrak, J., Toman, O., Simonova, T., Halada, P., Cmejla, R., Klener, P., and 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**(22): p. 5006-15.
58. Cheng, J., Hylander, B.L., Baer, M.R., Chen, X., and Repasky, E.A., *Multiple mechanisms underlie resistance of leukemia cells to Apo2 Ligand/TRAIL*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(7): p. 1844-53.
59. Scavennec, J., Maraninchi, D., Gastaut, J.A., Carcassonne, Y., and Cailla, H.L., *Purine and pyrimidine ribonucleoside monophosphate patterns of peripheral blood and bone marrow cells in human acute leukemias*. *Cancer Res*, 1982. **42**(4): p. 1326-30.
60. Natsumeda, Y., Prajda, N., Donohue, J.P., Glover, J.L., and Weber, G., *Enzymic capacities of purine de Novo and salvage pathways for nucleotide synthesis in normal and neoplastic tissues*. *Cancer Res*, 1984. **44**(6): p. 2475-9.
61. Galmarini, C.M., Popowycz, F., and Joseph, B., *Cytotoxic nucleoside analogues: different strategies to improve their clinical efficacy*. *Curr Med Chem*, 2008. **15**(11): p. 1072-82.

62. Bantia, S., Montgomery, J.A., Johnson, H.G., and Walsh, G.M., *In vivo and in vitro pharmacologic activity of the purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-34: the role of GTP and dGTP*. Immunopharmacology, 1996. **35**(1): p. 53-63.
63. Bollee, G., Harambat, J., Bensman, A., Knebelmann, B., Daudon, M., and Ceballos-Picot, I., *Adenine phosphoribosyltransferase deficiency*. Clin J Am Soc Nephrol, 2012. **7**(9): p. 1521-7.
64. Allison, A.C. and Eugui, E.M., *Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action*. Immunopharmacology, 2000. **47**(2-3): p. 85-118.
65. Fairbanks, L.D., Ruckemann, K., Qiu, Y., Hawrylowicz, C.M., Richards, D.F., Swaminathan, R., Kirschbaum, B., and Simmonds, H.A., *Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes: a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis?* Biochem J, 1999. **342** (Pt 1): p. 143-52.
66. Allison, A.C. and Eugui, E.M., *The design and development of an immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil*. Springer Semin Immunopathol, 1993. **14**(4): p. 353-80.
67. Zhou, S., Liu, R., Baroudy, B.M., Malcolm, B.A., and Reyes, G.R., *The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA*. Virology, 2003. **310**(2): p. 333-42.
68. Miles, R.W., Tyler, P.C., Furneaux, R.H., Bagdassarian, C.K., and Schramm, V.L., *One-third-the-sites transition-state inhibitors for purine nucleoside phosphorylase*. Biochemistry, 1998. **37**(24): p. 8615-21.
69. Haider, A.W., Larson, M.G., Benjamin, E.J., and Levy, D., *Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(5): p. 1454-9.
70. Artham, S.M., Lavie, C.J., Milani, R.V., Patel, D.A., Verma, A., and Ventura, H.O., *Clinical impact of left ventricular hypertrophy and implications for regression*. Prog Cardiovasc Dis, 2009. **52**(2): p. 153-67.
71. Mudd, J.O. and Kass, D.A., *Tackling heart failure in the twenty-first century*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 919-28.
72. Sears, S.F., Woodrow, L., Cutitta, K., Ford, J., Shea, J.B., and Cahill, J., *A patient's guide to living confidently with chronic heart failure*. Circulation, 2013. **127**(13): p. e525-8.

73. Rosolova, H., Cech, J., Simon, J., Spinar, J., Jandova, R., Widimsky sen, J., Holubec, L., and Topolcan, O., *Short to long term mortality of patients hospitalised with heart failure in the Czech Republic--a report from the EuroHeart Failure Survey*. Eur J Heart Fail, 2005. **7**(5): p. 780-3.
74. Haldeman, G.A., Croft, J.B., Giles, W.H., and Rashidee, A., *Hospitalization of patients with heart failure: National Hospital Discharge Survey, 1985 to 1995*. Am Heart J, 1999. **137**(2): p. 352-60.
75. Flaim, S.F., Minter, W.J., Nellis, S.H., and Clark, D.P., *Chronic arteriovenous shunt: evaluation of a model for heart failure in rat*. Am J Physiol, 1979. **236**(5): p. H698-704.
76. Garcia, R. and Diebold, S., *Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat*. Cardiovasc Res, 1990. **24**(5): p. 430-2.
77. Brower, G.L. and Janicki, J.S., *Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(2): p. H674-83.
78. Ruzicka, M., Yuan, B., and Leenen, F.H., *Effects of enalapril versus losartan on regression of volume overload- induced cardiac hypertrophy in rats*. Circulation, 1994. **90**(1): p. 484-491.
79. Brower, G.L., Henegar, J.R., and Janicki, J.S., *Temporal evaluation of left ventricular remodeling and function in rats with chronic volume overload*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 2): p. H2071-8.
80. Ryan, T.D., Rothstein, E.C., Aban, I., Tallaj, J.A., Husain, A., Lucchesi, P.A., and Dell'Italia, L.J., *Left ventricular eccentric remodeling and matrix loss are mediated by bradykinin and precede cardiomyocyte elongation in rats with volume overload*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(7): p. 811-21.
81. Benes, J., Jr., Melenovsky, V., Skaroupkova, P., Pospisilova, J., Petrak, J., Cervenka, L., and Sedmera, D., *Myocardial morphological characteristics and proarrhythmic substrate in the rat model of heart failure due to chronic volume overload*. Anat Rec (Hoboken), 2011. **294**(1): p. 102-11.
82. Stanley, W.C., Recchia, F.A., and Lopaschuk, G.D., *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 1093-129.
83. Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D., Jaswal, J.S., and Stanley, W.C., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. Physiol Rev, 2010. **90**(1): p. 207-58.

84. Ingwall, J.S. and Weiss, R.G., *Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function.* Circ Res, 2004. **95**(2): p. 135-45.
85. Dzeja, P.P., *Phosphotransfer networks and cellular energetics.* Journal of Experimental Biology, 2003. **206**(12): p. 2039-2047.
86. Smith, C.S., Bottomley, P.A., Schulman, S.P., Gerstenblith, G., and Weiss, R.G., *Altered creatine kinase adenosine triphosphate kinetics in failing hypertrophied human myocardium.* Circulation, 2006. **114**(11): p. 1151-8.
87. Bers, D.M., *Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure.* Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 380-7.
88. Ding, Y.F., Brower, G.L., Zhong, Q., Murray, D., Holland, M., Janicki, J.S., and Zhong, J., *Defective intracellular Ca²⁺ homeostasis contributes to myocyte dysfunction during ventricular remodelling induced by chronic volume overload in rats.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008. **35**(7): p. 827-35.
89. Takewa, Y., Chemaly, E.R., Takaki, M., Liang, L.F., Jin, H., Karakikes, I., Morel, C., Taenaka, Y., Tatsumi, E., and Hajjar, R.J., *Mechanical work and energetic analysis of eccentric cardiac remodeling in a volume overload heart failure in rats.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(4): p. H1117-24.
90. Camors, E., Monceau, V., and Charlemagne, D., *Annexins and Ca²⁺ handling in the heart.* Cardiovasc Res, 2005. **65**(4): p. 793-802.
91. Ravassa, S., Gonzalez, A., Lopez, B., Beaumont, J., Querejeta, R., Larman, M., and Diez, J., *Upregulation of myocardial Annexin A5 in hypertensive heart disease: association with systolic dysfunction.* Eur Heart J, 2007. **28**(22): p. 2785-91.
92. Giordano, F.J., *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure.* Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(3): p. 500-508.
93. Sheeran, F.L., Rydstrom, J., Shakhparonov, M.I., Pestov, N.B., and Pepe, S., *Diminished NADPH transhydrogenase activity and mitochondrial redox regulation in human failing myocardium.* Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(6-7): p. 1138-48.
94. Melenovsky, V., Benes, J., Skaroupkova, P., Sedmera, D., Strnad, H., Kolar, M., Vlcek, C., Petrak, J., Benes, J., Jr., Papousek, F., Oliyarnyk, O., Kazdova, L., and Cervenka, L., *Metabolic characterization of volume overload heart failure due to aorto-caval fistula in rats.* Mol Cell Biochem, 2011. **354**(1-2): p. 83-96.
95. Mehta, K., Fok, J.Y., and Mangala, L.S., *Tissue transglutaminase: from biological glue to cell survival cues.* Front Biosci, 2006. **11**: p. 173-85.

96. Park, D., Choi, S.S., and Ha, K.S., *Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments*. Amino Acids, 2010. **39**(3): p. 619-31.
97. Song, H., Kim, B.K., Chang, W., Lim, S., Song, B.W., Cha, M.J., Jang, Y., and Hwang, K.C., *Tissue transglutaminase 2 promotes apoptosis of rat neonatal cardiomyocytes under oxidative stress*. J Recept Signal Transduct Res, 2011. **31**(1): p. 66-74.
98. Small, K., *Cardiac Specific Overexpression of Transglutaminase II (Gh) Results in a Unique Hypertrophy Phenotype Independent of Phospholipase C Activation*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(30): p. 21291-21296.
99. Zhang, Z., Vezza, R., Plappert, T., McNamara, P., Lawson, J.A., Austin, S., Pratico, D., Sutton, M.S., and FitzGerald, G.A., *COX-2-dependent cardiac failure in Gh/tTG transgenic mice*. Circ Res, 2003. **92**(10): p. 1153-61.
100. Ou, H., Haendeler, J., Aebly, M.R., Kelly, L.A., Cholewa, B.C., Koike, G., Kwitek-Black, A., Jacob, H.J., Berk, B.C., and Miano, J.M., *Retinoic Acid-Induced Tissue Transglutaminase and Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells*. Circulation Research, 2000. **87**(10): p. 881-887.
101. Li, X., Wei, X.L., Meng, L.L., Chi, M.G., Yan, J.Q., Ma, X.Y., Jia, Y.S., Liang, L., Yan, H.T., and Zheng, J.Q., *Involvement of tissue transglutaminase in endothelin 1-induced hypertrophy in cultured neonatal rat cardiomyocytes*. Hypertension, 2009. **54**(4): p. 839-44.
102. Eisenhofer, G., Kopin, I.J., and Goldstein, D.S., *Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(3): p. 331-49.
103. Bianchi, P., Kunduzova, O., Masini, E., Cambon, C., Bani, D., Raimondi, L., Seguelas, M.H., Nistri, S., Colucci, W., Leducq, N., and Parini, A., *Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury*. Circulation, 2005. **112**(21): p. 3297-305.
104. Kaludercic, N., Takimoto, E., Nagayama, T., Feng, N., Lai, E.W., Bedja, D., Chen, K., Gabrielson, K.L., Blakely, R.D., Shih, J.C., Pacak, K., Kass, D.A., Di Lisa, F., and Paolocci, N., *Monoamine oxidase A-mediated enhanced catabolism of norepinephrine contributes to adverse remodeling and pump failure in hearts with pressure overload*. Circ Res, 2010. **106**(1): p. 193-202.

105. Kaludercic, N., Carpi, A., Menabo, R., Di Lisa, F., and Paolocci, N., *Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(7): p. 1323-32.
106. Riederer, P., Lachenmayer, L., and Laux, G., *Clinical applications of MAO-inhibitors*. *Curr Med Chem*, 2004. **11**(15): p. 2033-43.
107. Shah, M., Akar, F.G., and Tomaselli, G.F., *Molecular basis of arrhythmias*. *Circulation*, 2005. **112**(16): p. 2517-29.
108. Sohl, G. and Willecke, K., *Gap junctions and the connexin protein family*. *Cardiovasc Res*, 2004. **62**(2): p. 228-32.
109. Dupont, E., Matsushita, T., Kaba, R.A., Vozzi, C., Coppen, S.R., Khan, N., Kaprielian, R., Yacoub, M.H., and Severs, N.J., *Altered connexin expression in human congestive heart failure*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(2): p. 359-71.
110. Gutstein, D.E., Morley, G.E., Tamaddon, H., Vaidya, D., Schneider, M.D., Chen, J., Chien, K.R., Stuhlmann, H., and Fishman, G.I., *Conduction Slowing and Sudden Arrhythmic Death in Mice With Cardiac-Restricted Inactivation of Connexin43*. *Circulation Research*, 2001. **88**(3): p. 333-339.
111. Severs, N.J., Coppen, S.R., Dupont, E., Yeh, H.I., Ko, Y.S., and Matsushita, T., *Gap junction alterations in human cardiac disease*. *Cardiovasc Res*, 2004. **62**(2): p. 368-77.
112. Lampe, P.D. and Lau, A.F., *The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004. **36**(7): p. 1171-1186.
113. Burstein, B., Comtois, P., Michael, G., Nishida, K., Villeneuve, L., Yeh, Y.H., and Nattel, S., *Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure*. *Circ Res*, 2009. **105**(12): p. 1213-22.
114. Haugan, K., Marcussen, N., Kjolbye, A.L., Nielsen, M.S., Hennan, J.K., and Petersen, J.S., *Treatment with the gap junction modifier rotigaptide (ZP123) reduces infarct size in rats with chronic myocardial infarction*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. **47**(2): p. 236-42.
115. Moore, R.G., MacLaughlan, S., and Bast, R.C., Jr., *Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2010. **116**(2): p. 240-5.
116. Karlsen, M.A., Sandhu, N., Hogdall, C., Christensen, I.J., Nedergaard, L., Lundvall, L., Engelholm, S.A., Pedersen, A.T., Hartwell, D., Lydolph, M., Laursen,

- I.A., and Hogdall, E.V., *Evaluation of HE4, CA125, risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) and risk of malignancy index (RMI) as diagnostic tools of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass*. *Gynecol Oncol*, 2012. **127**(2): p. 379-83.
117. Cho, K.R. and Shih Ie, M., *Ovarian cancer*. *Annu Rev Pathol*, 2009. **4**: p. 287-313.
118. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D., *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*, 2011. **61**(2): p. 69-90.
119. Roett, M.A. and Evans, P., *Ovarian cancer: an overview*. *Am Fam Physician*, 2009. **80**(6): p. 609-16.
120. Marcus, C.S., Maxwell, G.L., Darcy, K.M., Hamilton, C.A., and McGuire, W.P., *Current Approaches and Challenges in Managing and Monitoring Treatment Response in Ovarian Cancer*. *J Cancer*, 2014. **5**(1): p. 25-30.
121. States, D.J., Omenn, G.S., Blackwell, T.W., Fermin, D., Eng, J., Speicher, D.W., and Hanash, S.M., *Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study*. *Nat Biotechnol*, 2006. **24**(3): p. 333-8.
122. Tu, C., Rudnick, P.A., Martinez, M.Y., Cheek, K.L., Stein, S.E., Slebos, R.J., and Liebler, D.C., *Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(10): p. 4982-91.
123. Boschetti, E. and Righetti, P.G., *The ProteoMiner in the proteomic arena: a non-depleting tool for discovering low-abundance species*. *J Proteomics*, 2008. **71**(3): p. 255-64.
124. Chen, Y., Lim, B.K., Peh, S.C., Abdul-Rahman, P.S., and Hashim, O.H., *Profiling of serum and tissue high abundance acute-phase proteins of patients with epithelial and germ line ovarian carcinoma*. *Proteome Sci*, 2008. **6**: p. 20.
125. Dieplinger, H., Ankerst, D.P., Burges, A., Lenhard, M., Lingenhel, A., Fineder, L., Buchner, H., and Stieber, P., *Afamin and apolipoprotein A-IV: novel protein markers for ovarian cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. **18**(4): p. 1127-33.
126. Muto, Y., Smith, J.E., Milch, P.O., and Goodman, D.S., *Regulation of retinol-binding protein metabolism by vitamin A status in the rat*. *J Biol Chem*, 1972. **247**(8): p. 2542-50.
127. Peterson, P.A., Rask, L., Ostberg, L., Andersson, L., Kamwendo, F., and 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.* J Biol Chem, 1973. **248**(11): p. 4009-22.
128. Mahlck, C.G. and Grankvist, K., *Plasma prealbumin in women with epithelial ovarian carcinoma.* Gynecol Obstet Invest, 1994. **37**(2): p. 135-40.
129. Zhang, Z., Bast, R.C., Jr., Yu, Y., Li, J., Sokoll, L.J., Rai, A.J., Rosenzweig, J.M., Cameron, B., Wang, Y.Y., Meng, X.Y., Berchuck, A., Van Haaften-Day, C., Hacker, N.F., de Bruijn, H.W., van der Zee, A.G., Jacobs, I.J., Fung, E.T., and Chan, D.W., *Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer.* Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5882-90.
130. Kozak, K.R., Su, F., Whitelegge, J.P., Faull, K., Reddy, S., and Farias-Eisner, R., *Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer.* Proteomics, 2005. **5**(17): p. 4589-96.
131. Yang, Q., Graham, T.E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O.D., Zabolotny, J.M., Kotani, K., Quadro, L., and Kahn, B.B., *Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes.* Nature, 2005. **436**(7049): p. 356-62.
132. Graham, T.E., Yang, Q., Bluher, M., Hammarstedt, A., Ciaraldi, T.P., Henry, R.R., Wason, C.J., Oberbach, A., Jansson, P.A., Smith, U., and Kahn, B.B., *Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects.* N Engl J Med, 2006. **354**(24): p. 2552-63.
133. Tan, B.K., Chen, J., Lehnert, H., Kennedy, R., and Randeve, H.S., *Raised serum, adipocyte, and adipose tissue retinol-binding protein 4 in overweight women with polycystic ovary syndrome: effects of gonadal and adrenal steroids.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(7): p. 2764-72.
134. Haider, D.G., Schindler, K., Prager, G., Bohdjalian, A., Luger, A., Wolzt, M., and Ludvik, B., *Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 1168-71.
135. Kowalska, I., Straczkowski, M., Adamska, A., Nikolajuk, A., Karczewska-Kupczewska, M., Otziomek, E., and Gorska, M., *Serum retinol binding protein 4 is related to insulin resistance and nonoxidative glucose metabolism in lean and obese women with normal glucose tolerance.* J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(7): p. 2786-9.
136. Rabilloud, T., *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains.* Proteomics, 2002. **2**(1): p. 3-10.

137. Zhou, S., Bailey, M.J., Dunn, M.J., Preedy, V.R., and Emery, P.W., *A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure*. Proteomics, 2005. **5**(11): p. 2739-47.
138. Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Williams, K.L., and Hochstrasser, D.F., *Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects*. Electrophoresis, 1996. **17**(5): p. 830-8.
139. Santoni, V., Molloy, M., and Rabilloud, T., *Membrane proteins and proteomics: un amour impossible?* Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1054-70.
140. Gygi, S.P., Corthals, G.L., Zhang, Y., Rochon, Y., and Aebersold, R., *Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): p. 9390-5.
141. Thiede, B., Koehler, C.J., Strozynski, M., Treumann, A., Stein, R., Zimny-Arndt, U., Schmid, M., and Jungblut, P.R., *High resolution quantitative proteomics of HeLa cells protein species using stable isotope labeling with amino acids in cell culture(SILAC), two-dimensional gel electrophoresis(2DE) and nano-liquid chromatography coupled to an LTQ-OrbitrapMass spectrometer*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(2): p. 529-38.
142. Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J., and Vulpe, C.D., *Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins*. Proteomics, 2008. **8**(9): p. 1744-9.
143. Speers, A.E. and Wu, C.C., *Proteomics of integral membrane proteins--theory and application*. Chem Rev, 2007. **107**(8): p. 3687-714.
144. Hofmann, A., Gerrits, B., Schmidt, A., Bock, T., Bausch-Fluck, D., Aebersold, R., and Wollscheid, B., *Proteomic cell surface phenotyping of differentiating acute myeloid leukemia cells*. Blood, 2010. **116**(13): p. e26-34.
145. Blackler, A.R., Speers, A.E., Ladinsky, M.S., and Wu, C.C., *A shotgun proteomic method for the identification of membrane-embedded proteins and peptides*. J Proteome Res, 2008. **7**(7): p. 3028-34.
146. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L., *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes*. J Mol Biol, 2001. **305**(3): p. 567-80.
147. Tran, J.C., Zamdborg, L., Ahlf, D.R., Lee, J.E., Catherman, A.D., Durbin, K.R., Tipton, J.D., Vellaichamy, A., Kellie, J.F., Li, M., Wu, C., Sweet, S.M., Early, B.P., Siuti, N., LeDuc, R.D., Compton, P.D., Thomas, P.M., and Kelleher, N.L.,

Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics.
Nature, 2011. **480**(7376): p. 254-8.

6 SEZNAM PUBLIKACÍ

Resistance to TRAIL in mantle cell lymphoma cells is associated with the decreased expression of purine metabolism enzymes. Pospisilova Jana, Vit Ondrej, Lorkova Lucie, Klanova Magdalena, Zivny Jan, Klener Pavel, Petrak Jiri. Int J Mol Med 2013; 31(5):1273 (viz Příloha I), IF 1,96.

Proteomic and transcriptomic analysis of heart failure due to volume overload in a rat aorto-caval fistula model provides support for new potential therapeutic targets - monoamine oxidase A and transglutaminase 2. Petrak Jiri, Pospisilova Jana, Sedinova Miroslava, Jedelsky Petr, Lorkova Lucie, Vit Ondrej, Kolar Michal, Strnad Hynek, Benes Jan, Sedmera David, Cervenka Ludek, Melenovsky Vojtech. Proteome Science 2011;11,9(1):69 (viz Příloha II), IF 2,42.

Myocardial morphological characteristics and proarrhythmic substrate in the rat model of heart failure due to chronic volume overload. Benes Jiri Jr, Melenovsky Vojtech, Skaroupkova Petra, Pospisilova Jana, Petrak Jiri, Cervenka Ludek, Sedmera David. Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology 2011;294(1):102 (viz Příloha III), IF 1,34.

Decreased concentrations of retinol-binding protein 4 in sera of epithelial ovarian cancer patients: a potential biomarker identified by proteomics. Lorkova Lucie, Pospisilova Jana, Lacheta Jan, Leahomschi Sergiu, Zivny Jaroslav, Cibula David, Zivny Jan, Petrak Jiri. Oncology Reports 2012;27(2):318 (viz Příloha IV), IF 2,30.

7 PŘÍLOHA - PUBLIKACE

7.1 Příloha I

Resistance to TRAIL in mantle cell lymphoma cells is associated with the decreased expression of purine metabolism enzymes. Pospisilova Jana, Vit Ondrej, Lorkova Lucie, Klanova Magdalena, Zivny Jaroslav, Klener Pavel, Petrak Jiri. Int J Mol Med 2013; 31(5):1273, IF 1,96.

Resistance to TRAIL in mantle cell lymphoma cells is associated with the decreased expression of purine metabolism enzymes

JANA POSPISILOVA¹, ONDREJ VIT¹, LUCIE LORKOVA¹, MAGDALENA KLANOVA¹,
JAN ZIVNY¹, PAVEL KLENER¹ and JIRI PETRAK^{1,2}

¹Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, 128 53 Prague;

²Institute of Hematology and Blood Transfusion, 128 20 Prague, Czech Republic

Received January 25, 2013; Accepted March 1, 2013

DOI: 10.3892/ijmm.2013.1302

Abstract. Mantle cell lymphoma (MCL) is a rare aggressive type of B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Response to chemotherapy tends to be short and virtually all patients sooner or later relapse. The prognosis of relapsed patients is extremely poor. The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is considered one of the novel experimental molecules with strong antitumor effects. TRAIL triggers extrinsic apoptosis in tumor cells by binding to TRAIL 'death receptors' on the cell surface. Recombinant TRAIL has shown promising pro-apoptotic effects in a variety of malignancies including lymphoma. However, as with other drugs, lymphoma cells can develop resistance to TRAIL. Therefore, the aim of this study was to identify the molecular mechanisms responsible for, and associated with TRAIL resistance in MCL cells. If identified, these features may be used as molecular targets for the effective elimination of TRAIL-resistant lymphoma cells. From an established TRAIL-sensitive mantle cell lymphoma cell line (HBL-2) we derived a TRAIL-resistant HBL-2/R subclone. By TRAIL receptor analysis and differential proteomic analysis of HBL-2 and HBL-2/R cells we revealed a marked downregulation of all TRAIL receptors and, among others, the decreased expression of 3 key enzymes of purine nucleotide metabolism, namely purine nucleoside phosphorylase, adenine phosphoribosyltransferase and inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2, in the resistant HBL-2/R cells. The downregulation of the 3 key enzymes of purine metabolism can have profound effects on nucleotide homeostasis in TRAIL-resistant lymphoma cells and can render such cells vulnerable to any further disruption of purine nucleotide metabolism. This pathway represents a 'weakness' of the TRAIL-resistant MCL cells and has potential as a therapeutic target for the selective elimination of such cells.

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a rare aggressive type of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with an estimated annual incidence in Europe of 0.45/100,000 individuals (1). MCL is a biologically and clinically heterogeneous disease; the immunophenotype of neoplastic cells reflects the phenotype of cells similar to lymphocytes in the mantle zone of normal germinal follicles (2). The genetic hallmark of MCL cells is a translocation between chromosomes 11 and 14, t(11;14)(q13;q32), juxtaposing the gene for immunoglobulin heavy chain and the gene encoding cyclin D1. This results in cyclin D1 overexpression (3,4).

The standard of care for newly diagnosed MCL patients is combined immunochemotherapy alternating rituximab-CHOP (R-CHOP; cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin and prednisone) and R-HDAC (high-dose cytarabine). The addition of rituximab and HDAC to CHOP has improved the survival of MCL patients in the last 2 decades from 3 to 5 years. However, the response to therapy tends to be short and virtually all patients sooner or later relapse. There is no standard of care for relapsed or refractory MCL patients. Salvage therapy usually comprises diverse regimens based on fludarabine, gemcitabine, cisplatin, bendamustine, bortezomib (inhibitor of 26S proteasome) or temsirolimus (inhibitor of mTOR). Recently, several new experimental molecules have shown promise in the therapy of relapsed or resistant MCL, including lenalidomide (immunomodulatory agent), ibrutinib (PCI-32765, inhibitor of Bruton's tyrosine-kinase), new monoclonal antibodies (e.g., anti-CD20 ofatumumab), as well as other agents (5). Combination therapies are currently being evaluated in clinical trials; however, novel drugs are required.

The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is considered one of the novel experimental molecules with strong antitumor effects. TRAIL is a type II transmembrane protein from the tumor necrosis factor superfamily (6,7) expressed mostly by cells of the immune system (natural killer cells, cytotoxic T-cells, macrophages and dendritic cells). The main function of this molecule is thought to be in tumor immunosurveillance, but its actual molecular role remains to be elucidated.

TRAIL can trigger extrinsic apoptosis in target cells by binding to TRAIL death receptors located on the cell surface (8). This interaction is performed by a long extracellular C-terminal

Correspondence to: Ms. Jana Pospisilova, Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, U Nemocnice 5, 128 53 Prague, Czech Republic
E-mail: jana.pospisilova@lf1.cuni.cz

Key words: mantle cell lymphoma, TRAIL, drug resistance, purine nucleotide metabolism, proteomics

region of the TRAIL molecule. There are 4 distinct cell surface TRAIL receptors in humans (DcR1, DcR2, DR4 and DR5) encoded by separate genes (9,10). However, only DR4 and DR5 contain a functional death domain (structurally conserved protein interaction domain) and are capable of signaling apoptosis. Two decoy receptors (DcR1 and DcR2) lack a functional death domain and inhibit TRAIL signaling by competing with death receptors for TRAIL (9,10). The binding of TRAIL to DR4 or DR5 leads to receptor homotrimerization and formation of the death-inducing signaling complex (DISC) (11). Through the DISC a caspase machinery is activated, which results in apoptosis (12). TRAIL death receptors DR4 and DR5 are ubiquitously expressed, indicating that most tissues and cell types are potential targets of TRAIL signaling (13). Nevertheless, TRAIL seems to induce apoptosis only in tumor cells but not in healthy tissues. Due to its selective pro-apoptotic effect, TRAIL has attracted much attention for its possible use in cancer therapy. *In vitro*, a recombinant soluble TRAIL molecule has shown cytostatic or cytotoxic effects in a wide variety of tumor cell lines, including leukemia and lymphoma cells, but not in normal cells (6,7,10,11,14-19). The administration of a recombinant soluble TRAIL molecule has been shown to induce the regression or complete remission of tumors in tumor xenograft models (11,20-26). The efficacy of recombinant TRAIL and agonistic antibodies recognizing either receptor DR4 or DR5 has been investigated in numerous clinical trials, as recently reviewed (27).

TRAIL has also shown promising pro-apoptotic effects in a variety of lymphoma cell lines including MCL (15). However, as with other drugs, cancer cells can develop resistance to TRAIL following prolonged exposure to sublethal doses of TRAIL (14,28). Resistance to TRAIL-mediated apoptosis can arise due to changes at the cell membrane level (typically by loss of expression or mutation of functional DR4 and/or DR5 at the cell surface) or on the intracellular level (such as incorrect formation of DISC and aberrant expression of caspases) (29). The successful therapy of malignancies in general, and particularly those with very poor prognosis, such as MCL, depends on the effective management of drug resistance. An in-depth understanding of the processes involved in the development of drug resistance and a detailed description of secondary molecular changes associated with resistance are essential for successful cancer therapy. Specific molecular changes which occur in drug-resistant cells can confer a potential selective disadvantage to such cells and may be used as targets for the effective elimination of drug-resistant lymphoma cells.

The aim of this study was to elucidate the molecular mechanisms responsible for TRAIL resistance in MCL cells, as well as the secondary molecular alterations associated with this process. We also aimed to identify the phenotypic features specific for TRAIL-resistant MCL cells. If identified, these molecular features can be, at least theoretically, used as molecular targets for the effective elimination of TRAIL-resistant lymphoma cells in experimental therapies.

Materials and methods

Cell growth and cellular toxicity assay. HBL-2 cells were grown in Iscove's modified Dulbecco's medium in the presence of 10% foetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin solution

in a 37°C humidified atmosphere with 5% CO₂. TRAIL-resistant HBL-2/R cells were derived by selective pressure of increasing concentrations of human recombinant TRAIL (Apronex Biotechnologies, Czech Republic) up to 1,000 ng/ml in medium from the wild-type HBL-2 cells in 5 weeks. The toxicity of TRAIL to HBL-2 and HBL-2/R was measured using the colorimetric WST-8-based Quick Cell proliferation Assay kit II (BioVision, San Francisco, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 40,000 cells were seeded in a 96-well plate in 300 µl of medium supplemented with increased concentrations of TRAIL up to 1,000 ng/ml in medium for 1-4 days. After the addition of WST reagent, absorbance was measured on a Sunrise microplate absorbance reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) with a 450 nm reading filter and 630 nm reference filter. The absorbance of free medium was used as the background level, triplicate samples were grown and measured for each cell type and TRAIL concentration. Mean values were calculated. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless specified otherwise.

Flow cytometric analysis. HBL-2 and HBL-2/R cells (2x10⁵ cells for each assay) were washed in PBS buffer (0.5% foetal bovine serum in PBS), stained with phycoerythrin-conjugated antibodies against TRAIL receptors DR4, DR5, DcR1 and DcR2 (anti-hTRAIL R1, anti-hTRAIL R2, anti-hTRAIL R3 and anti-hTRAIL R4; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and analyzed by flow cytometry in triplicate (FASCCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Unstained cells and cells incubated with isotype controls served as the background fluorescence controls.

Sample preparation for two-dimensional electrophoresis. HBL-2 and HBL-2/R cells (6x10⁷) were harvested, washed twice with PBS and cell pellets were frozen and stored at -80°C. Samples were thawed and homogenized in lysis buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 60 mM dithiothreitol (DTT) and 1% ampholytes (Bio-Lyte 3-10 Buffer, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)] and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) for 20 min at room temperature with occasional vortexing. Samples were sedimented at 18,000 x g for 20 min at room temperature, supernatants were collected and protein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad). Protein concentrations in all samples were equalized to 3.3 mg/ml by dilution with lysis buffer.

Two-dimensional electrophoresis. IPG strips (pH 4.0-7.0, 24 cm; ReadyStrip, Bio-Rad) were rehydrated overnight in 450 µl of sample, representing 1.5 mg of protein. Isoelectric focusing was performed for 70 kVh, with maximum voltage not exceeding 5 kV, current limited to 50 µA per strip and temperature set to 20°C (Protean IEF Cell, Bio-Rad). Six replicates were run for each cell type. Focused strips were briefly rinsed in deionized water, equilibrated and reduced in equilibration buffer supplemented with DTT (6 M urea, 50 mM Tris pH 8.8, 30% glycerol, 2% SDS and 450 mg DTT per 50 ml) for 15 min and then alkylated in equilibration buffer with iodoacetamide (1.125 mg iodoacetamide per 50 ml of the buffer). Equilibrated strips were then secured on 10% SDS-PAGE and secured in place by molten agarose. SDS-PAGE electrophoresis was performed in

a Tris-glycine-SDS system using a 12-gel Protean Dodeca Cell apparatus (Bio-Rad) with buffer circulation and external cooling (20°C). Gels were run at a constant voltage of 45 V per gel for 30 min and then at a constant voltage of 200 V for 6 h. Gels were washed 3 times for 15 min in deionized water to remove redundant SDS. Gels were then stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue (SimplyBlue™ Safestain, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) overnight and briefly de-stained in deionized water.

Gel image analysis and extraction of peptides. Stained gels were scanned with GS 800 calibrated densitometer (Bio-Rad) and image analysis was performed with Progenesis™ software (Nonlinear Dynamics, Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) in semi-manual mode with 6 gel replicates for each cell type. Normalization of gel images was based on total spot density, and integrated spot density values (spot volumes) were then calculated after background subtraction. Average spot volume values (averages from the all 6 gels in the group) for each spot were compared between the groups. Protein spots were considered differentially expressed if their average normalized spot volume difference was >1.5-fold. As determined by the Student's t-test, a p-value <0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

Protein digestion and peptide extraction. Spots containing differentially expressed proteins were excised from the gels, cut into small pieces and washed 3 times with 25 mM ammonium bicarbonate in 50% acetonitrile (ACN). The gels were then dried in a SpeedVac Concentrator (Eppendorf, Hamburg, Germany). Sequencing grade modified trypsin (Promega, Madison, WI, USA) (6 ng/μl of trypsin in 25 mM ammonium bicarbonate in 5% ACN) was added. Following overnight incubation at 37°C, the resulting peptides were extracted with 50% ACN.

Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and identification of selected proteins. Peptide samples were spotted on a polished steel target plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and allowed to dry at room temperature. Matrix solution (3 mg α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 1 ml of 50% ACN containing 0.1% trifluoroacetic acid) was then added. MS was performed on an Autoflex II MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) using a solid nitrogen laser (337 nm) and FlexControl software (Bruker Daltonics) in reflectron mode with positive ion mass spectra detection. The mass spectrometer was externally calibrated with Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics). Spectra were acquired in the mass range 800-4,000 Da. The peak lists were generated using FlexAnalysis and searched against Swiss-Prot (2011 version, 524420 sequences) using Mascot software. The peptide mass tolerance was set to 50 ppm, taxonomy *Homo sapiens*, missed cleavage was set to 2, fixed modification for cysteine carbamidomethylation, and variable modifications for methionine oxidation and protein N-terminal acetylation.

Western blot analysis. Cells were lysed in NHT buffer (140 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1.5% Triton X-100, pH 7.4). Protein concentration in the collected supernatants was determined by the Bradford assay (Bio-Rad). Lysate samples (25-70 μg) were combined with SDS loading buffer containing

2-mercaptoethanol and boiled for 5 min. Triplicate samples were separated on 12% SDS-PAGE minigels in Tris-glycine buffer (Bio-Rad). Electrophoresis was performed at a constant voltage for 30 min at 45 V per gel, and then at 90 V per gel until the dye front reached the gel bottom. Proteins were transferred onto 0.45 μm PVDF membranes (Milipore, Billerica, MA, USA) in a semi-dry blotter (Hoefer, San Francisco, CA, USA) at 0.8 mA/cm² of membrane. Membranes were incubated with blocking buffer containing PBS (Invitrogen), 0.1% Tween-20 and 5% non-fat dried milk for 1 h. As primary antibodies anti-adenine phosphoribosyltransferase (APRT; 1:1,000, rabbit polyclonal antibody), anti-purine nucleoside phosphorylase (PNP; 1:1,000, mouse monoclonal antibody) and anti-GAPDH (1:10,000, rabbit polyclonal antibody) were used. After thoroughly washing in blocking buffer, a secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibody was added (1:10,000). GAPDH was used as the loading control. The signal was detected using Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) and membranes were exposed to X-ray films (Kodak, Rochester, NY, USA). All used antibodies were from Santa Cruz Biotechnology.

Results

Molecular changes associated with the generation of drug-resistant cells can confer potential selective disadvantage. Such a 'weakness' may be used as druggable target for effective elimination of drug-resistant lymphoma cells. Our aim was to elucidate the molecular changes associated with the development of TRAIL resistance in (originally TRAIL-sensitive) MCL cells in order to identify such a cellular 'weakness' of TRAIL-resistant MCL cells. To identify the specific protein expression changes in the TRAIL-resistant cells, we derived a TRAIL-resistant HBL-2 subclone (HBL-2/R) from the originally TRAIL-sensitive HBL-2 cell line, and performed differential analysis of the surface expression of TRAIL receptors and comparative proteomic analysis of the HBL-2/R and HBL-2 cells.

TRAIL-resistant cell line. The TRAIL-resistant HBL-2 subclone (HBL-2/R) was derived from the originally TRAIL-sensitive HBL-2 cell line by selective pressure of increasing TRAIL concentration in medium over 5 weeks. While the IC₅₀ for TRAIL in the originally sensitive HBL-2 cells was 1 ng/ml at 48 h (data not shown), the resulting HBL-2/R subclone proliferated in up to 1,000 ng/ml TRAIL concentration in medium and was therefore >1,000-fold more resistant to TRAIL than the HBL-2 cells (Fig. 1).

TRAIL receptors - flow cytometric analysis of cell surface expression. The attenuated expression of TRAIL death receptors DR4 and DR5 has been previously described as a cause of TRAIL resistance. We therefore determined the relative expression of TRAIL receptors in HBL-2 and HBL-2/R cells by flow cytometry (Fig. 2). The expression of DR4, DR5, DcR1 and DcR2 in the HBL-2/R cells was markedly decreased compared to the HBL-2 cells. The marked downregulation of death receptors DR4 and DR5 explains the resistance of the HBL-2/R cells to TRAIL, while the downregulation of decoy receptors DcR1 and DcR2 may indicate further, more complex phenotypic changes in the HBL-2/R cells.

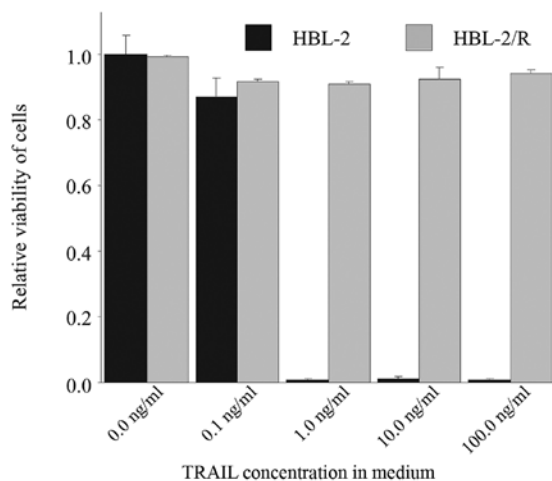


Figure 1. Relative cytotoxicity of TRAIL. Viability of TRAIL-sensitive HBL-2 cells and TRAIL-resistant HBL-2/R cells after 78 h in medium with recombinant TRAIL was determined by WTS-based colorimetric assay. Absorbance value of HBL-2 cells grown in medium without TRAIL was set to 1.

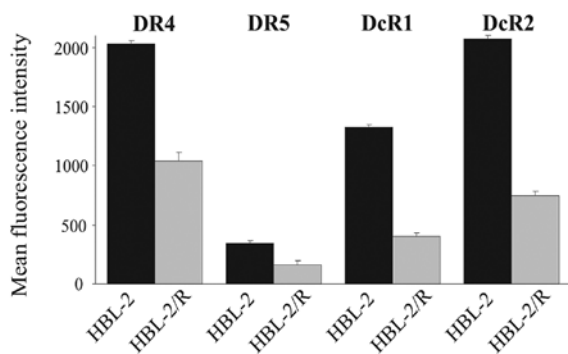


Figure 2. Cell surface expression of TRAIL receptors. HBL-2 and HBL-2/R cells were labeled with phycoerythrin-conjugated antibodies against the TRAIL cell surface receptors, DR4, DR5, DcR1 and DcR2, and the expression of the receptors was analyzed by flow cytometry. Cells without staining and isotype controls served as the blank controls.

Proteomic analysis. In order to identify specific changes in protein expression associated with TRAIL resistance in HBL-2/R cells, we performed comparative proteomic analysis of cellular homogenates of HBL-2/R and TRAIL-sensitive HBL-2 cells. Using two-dimensional electrophoresis of total cell lysates, we reproducibly detected 820 protein spots on Coomassie Brilliant Blue-stained gels. We found 21 protein spots to be significantly quantitatively changed (upregulated or downregulated, change >1.5-fold; $p < 0.05$) in HBL-2/R cells (Fig. 3). Using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry we identified all 21 proteins differentially expressed in HBL-2/R cells (Table I).

Functional annotations of the identified differentially expressed proteins were analyzed using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database. Among the 21 identified proteins we found molecules involved in diverse functions, including cytoskeleton regulation, ribosome synthesis and maturation, RNA metabolism, chromosome translocation, DNA repair and replication, as well as protein folding. However, one pathway was markedly enriched in our set (hsa00230 - purine metabolism) represented by 3 differentially expressed proteins. These 3 molecules are key enzymes of the purine

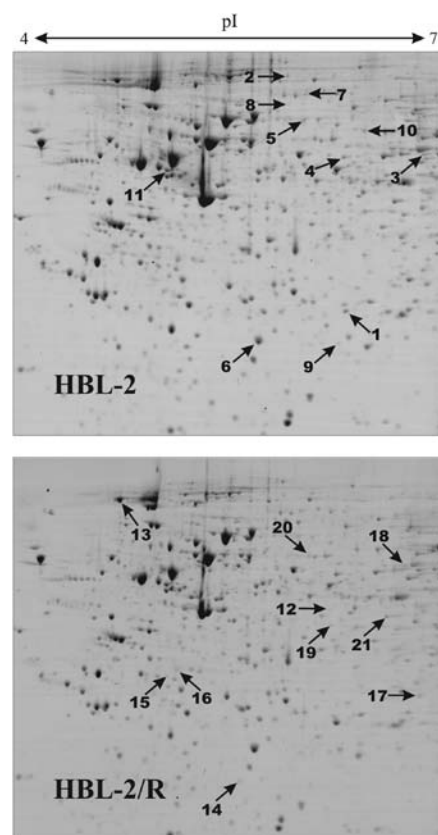


Figure 3. Two-dimensional electrophoresis of HBL-2 and HBL-2/R cells was performed on 24-cm gel strips, pH 4.0-7.0, 10% SDS-PAGE. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue. Differentially expressed proteins are indicated by numbered arrows (spots 1-11 indicate downregulated proteins in HBL-2/R cells, and spots 12-21 indicate upregulated proteins in HBL-2/R cells).

nucleotide metabolism (Fig. 5) and all 3 are downregulated in TRAIL-resistant HBL-2/R cells [PNP (downregulated 1.6-fold in HBL-2/R cells), APRT (downregulated 2.2-fold in HBL-2/R cells) and inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (IMPDH2, downregulated 1.6-fold in HBL-2/R cells)].

Verification of proteomic analysis. To confirm the results of proteomic analysis by an independent method we verified the decreased expression of the 2 proteins involved in purine metabolism, namely PNP and APRT, by western blot analysis in HBL-2 and HBL-2/R cell lysates (Fig. 4).

Discussion

The downregulation of the 3 key enzymes of purine metabolism can have a profound effect on nucleotide homeostasis in TRAIL-resistant lymphoma cells. Purine nucleotides, the building blocks for synthesis of DNA, RNA and enzyme co-factors, are recruited either from *de novo* purine synthesis from low molecular weight precursors or by recycling of free nucleobases in the so-called salvage pathway. Both pathways lead to the production of nucleoside-5'-phosphates (Fig. 5). Both pathways can supply cellular demand independently; however, their importance in different tissues is variable. In leukemic and lymphoma cells the salvage pathway is considered the major source of purine nucleotides (30,31).

Table I. List of proteins differentially expressed in HBL-2/R cells (difference at least 1.5-fold and statistical significance $p < 0.05$).

Spot no.	Swiss-Prot no. ^a	Protein name	Fold change	Mascot score ^b	Sequence cov. (%) ^c	Mr
Proteins upregulated in HBL-2/R cells						
1	P04792	Heat shock protein β -1	3.9	84	51	22826
2	P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	2.6	100	23	159003
3	O75351	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	2.6	171	32	49443
4	P23381	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	2.4	240	54	53474
5	P20591	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	2.2	176	42	75872
6	P09211	Glutathione S-transferase P	1.9	110	56	23569
7	P06396	Gelsolin	1.9	115	22	86043
8	P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	1.7	262	46	83222
9	Q9HAV7	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	1.6	99	44	24492
10	O43776	Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	1.5	250	41	63758
11	Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	1.5	76	29	48490
Proteins downregulated in HBL-2/R cells						
12	P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit α	3.2	111	32	43952
13	P19338	Nucleolin	2.4	146	29	76625
14	P07741	Adenine phosphoribosyltransferase	2.2	227	79	19766
15	O75792	Ribonuclease H2 subunit A	1.7	348	72	33716
16	Q07955	Serine/arginine-rich splicing factor 1	1.7	82	35	27842
17	P00491	Purine nucleoside phosphorylase	1.6	182	68	32325
18	P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	1.6	230	44	56226
19	P40121	Macrophage-capping protein	1.6	102	41	38760
20	P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit α -1	1.5	234	48	61296
21	Q15019	Septin-2	1.5	62	26	41689

^aSwiss-Prot no. is the code under which the identified protein is deposited in the Swiss-Prot database. ^bMascot score helps to estimate the correctness of the individual hit. It is expressed as $-10 \times \log(P)$ where P is the probability that the observed match is a random event. ^cSequence coverage is the number of amino acids spanned by the assigned peptides divided by the sequence length.

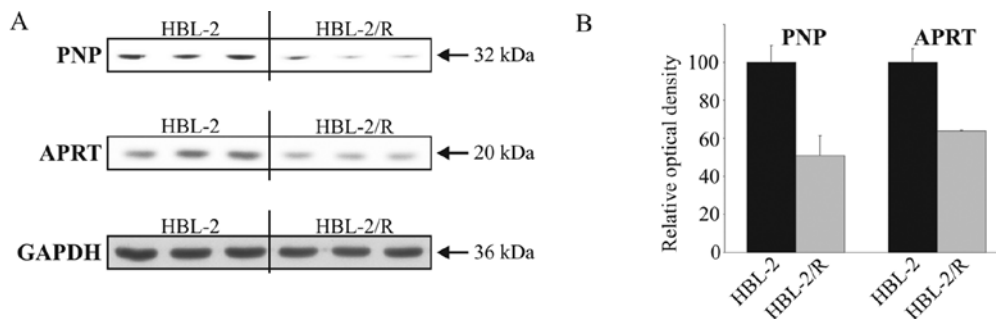


Figure 4. Relative expression of purine nucleoside phosphorylase (PNP) and adenine phosphoribosyltransferase (APRT) in HBL-2 and HBL-2/R cell lysates determined by western blot analysis. (A) Triplicate cell lysates were separated on 12% SDS-PAGE minigels. Proteins were then transferred onto PVDF membranes, blocked and probed with either anti-APRT, or anti-PNP antibody. Anti-GAPDH antibody was used as the loading control. The bands were visualized by HRP-conjugated secondary antibodies. (B) The values of integrated optical densities of PNP and APRT in HBL-2 cells were set to 100.

The *de novo* synthesis of purine nucleotides requires 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP), ATP, glutamine, glycine, CO_2 , aspartate and formate to create the first fully formed nucleotide, inosine-5'-monophosphate (IMP). IMP represents a branch point for purine biosynthesis, since it can be converted either to guanosine-5'-monophosphate (GMP) by IMPDH2 (downregulated in HBL-2/R cells) or to adenosine-5'-monophosphate (Fig. 5).

The catabolism of purine nucleotides leads to the liberation of free purine bases by PNP (downregulated in HBL-2/R cells). In the salvage pathway the free bases are reconverted back to nucleoside-5'-monophosphates in a reaction with activated sugar (PRPP) catalyzed by APRT (downregulated in HBL-2/R cells) or hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (32) (Fig. 5). Ribonucleotides are converted by ribonucleotide reductase into the corresponding deoxyribonucleotides.

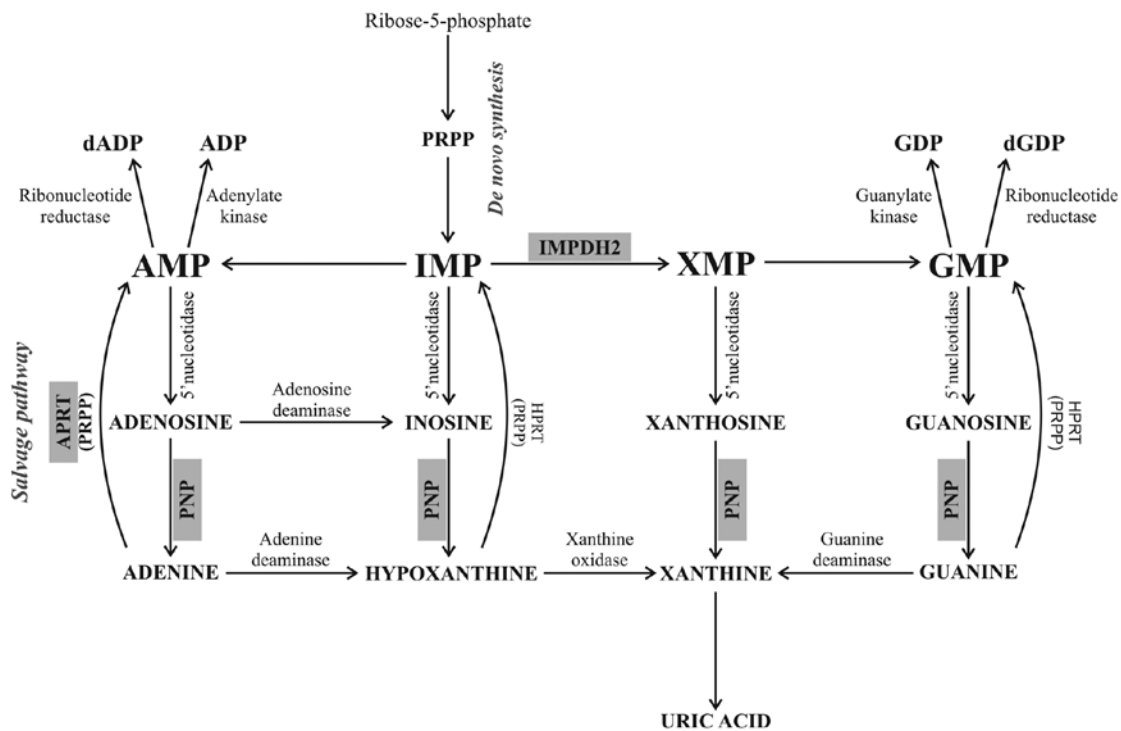


Figure 5. Scheme of the purine metabolism pathways, showing the position of IMPDH2, APRT and PNP in purine nucleotide biosynthesis, adopted from a previous study (35). The *de novo* synthesis of purine nucleotides begins with the phosphorylation of ribose-5-phosphate to form PRPP. In a number of reactions, PRPP creates the first fully formed nucleotide, IMP. IMP is converted by IMPDH2 to GMP. PNP catalyzes the reversible cleavage of purine nucleosides, releasing purine nucleobases (adenine, hypoxanthine, xanthine and guanine). In the salvage pathway the free nucleobases can be reconverted back to nucleoside-5'-monophosphates in a reaction with activated sugar (PRPP) catalyzed by APRT. IMPDH2, inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2; APRT, adenine phosphoribosyltransferase; PNP, purine nucleoside phosphorylase; PRPP, 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate; IMP, inosine-5'-monophosphate; GMP, guanosine-5'-monophosphate; dADP, deoxyadenosine diphosphate; ADP, adenosine diphosphate; GDP, guanosine diphosphate; dGDP, deoxyguanosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; XMP, xanthosine monophosphate.

The delicate balance of enzyme activities and concentrations of products and intermediates are critical for purine (nucleotide) homeostasis. The inhibition of PNP results in the accumulation of its substrate, 2'-deoxyguanosine which is further phosphorylated to deoxyguanosine triphosphate (dGTP). A high intracellular concentration of dGTP inhibits cell proliferation and induces apoptosis (33-35). If APRT is inhibited, accumulated adenine is oxidized to insoluble 2,8-dihydroxyadenine. Accumulation of this precipitate results in cell death (32). Similarly, the inhibition of IMPDH2 leads to depletion of guanosine nucleotides, which blocks DNA synthesis and cell division (36,37).

Disruption of the purine nucleotide metabolism generally results in an accumulation and/or a lack of ribonucleotides or deoxyribonucleotides or metabolic intermediates with potentially cytotoxic consequences. The observed decreased expression of the 3 purine metabolism enzymes affects both *de novo* synthesis and the salvage pathway of purine metabolism and may also affect purine nucleotide homeostasis in TRAIL-resistant HBL-2/R cells. Such an imbalance may represent a selective disadvantage for the affected cells. Such a 'weakness' may not be apparent under normal circumstances but may become critical under stress or unfavorable conditions. As the proliferation rates of HBL-2/R and HBL-2 cells are comparable, the proposed imbalance in purine nucleotide metabolism in TRAIL-resistant cells is possibly mild and/or well compensated *in vitro*. However, this 'weakness' may become apparent due to lack of building blocks for DNA and

RNA synthesis in the environment or upon further disruption of purine metabolism. Since both pathways of purine metabolism are compromised in TRAIL-resistant MCL cells, these cells should be vulnerable to further inactivation of purine nucleotide metabolism enzymes. Therefore, drugs that target (already disbalanced) purine metabolism should be highly cytotoxic to TRAIL-resistant cells (compared to non-malignant cells) and may therefore be selectively effective in the elimination of TRAIL-resistant MCL cells in experimental therapy. There are several approved inhibitors of purine metabolism, such as methotrexate (inhibits purine *de novo* synthesis via dihydrofolate reductase) (38), ribavirin and mycophenolic acid (inhibitors of IMPDH2) (39,40) or forodesine (a novel inhibitor of PNP) (41,42), available for clinical use.

The adaptation of cancer cells to cytostatic and cytotoxic drugs is associated to a certain degree with extensive changes in the cell phenotype. Some of the molecular changes, although seemingly unrelated to the mechanism of resistance, can provide a selective disadvantage to the cells and such a 'weakness' may be used as a potential therapeutic target. By the presented proteomic analysis of the changes associated with resistance to TRAIL in MCL HBL-2 cells, we demonstrated the downregulation of all types of TRAIL receptors and identified the altered expression of several proteins including 3 enzymes of the purine metabolism pathway. This downregulated pathway potentially represents a 'weakness' of the TRAIL-resistant MCL cells and has potential as a therapeutic target for the selective elimination of such cells in the future.

Acknowledgements

This study was supported by the Grant Agency of Charles University (GAUK 251180 111210 and 253284 700712), by the Grant Agency of the Czech Republic (305/09/1390), by the Ministry of Education, Youth and Sports (PRVOUK P24/LF1/3 and SVV 2012-264507), UNCE 204021 and the Ministry of Health of the Czech Republic (IGA MZ NT12248-5, IGA-MZ NT13201-4).

References

- Sant M, Allemani C, Tereanu C, *et al*: Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 116: 3724-3734, 2010.
- Perez-Galan P, Dreyling M and Wiestner A: Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 117: 26-38, 2011.
- Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC and Croce CM: Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 224: 1403-1406, 1984.
- Williams ME, Swerdlow SH, Rosenberg CL and Arnold A: Characterization of chromosome 11 translocation breakpoints at the bcl-1 and PRAD1 loci in centrocytic lymphoma. *Cancer Res* 52: 5541S-5544S, 1992.
- Humala K and Younes A: Current and emerging new treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*: Feb 19, 2013 (Epub ahead of print).
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, *et al*: Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3: 673-682, 1995.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A and Ashkenazi A: Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271: 12687-12690, 1996.
- Ashkenazi A and Dixit VM: Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308, 1998.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, *et al*: Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277: 818-821, 1997.
- Ashkenazi A: Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2: 420-430, 2002.
- Castro Alves C, Terziyska N, Grunert M, *et al*: Leukemia-initiating cells of patient-derived acute lymphoblastic leukemia xenografts are sensitive toward TRAIL. *Blood* 119: 4224-4227, 2012.
- Peter ME and Krammer PH: The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10: 26-35, 2003.
- Spierings DC: Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 52: 821-831, 2004.
- Petrak J, Toman O, Simonova T, *et al*: Identification of molecular targets for selective elimination of TRAIL-resistant leukemia cells. From spots to in vitro assays using TOP15 charts. *Proteomics* 9: 5006-5015, 2009.
- Molinsky J, Klanova M, Koc M, *et al*: Roscovitine sensitizes leukemia and lymphoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Leuk Lymphoma* 54: 372-380, 2013.
- Klener P, Leahomschi S, Molinsky J, *et al*: TRAIL-induced apoptosis of HL60 leukemia cells: two distinct phenotypes of acquired TRAIL resistance that are accompanied with resistance to TNFalpha but not to idarubicin and cytarabine. *Blood Cells Mol Dis* 42: 77-84, 2009.
- Leahomschi S, Molinsky J, Klanova M, *et al*: Multi-level disruption of the extrinsic apoptotic pathway mediates resistance of leukemia cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Neoplasma* 60: 223-231, 2013.
- Wen J, Ramadevi N, Nguyen D, Perkins C, Worthington E and Bhalla K: Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood* 96: 3900-3906, 2000.
- Plasilova M, Zivny J, Jelinek J, *et al*: TRAIL (Apo2L) suppresses growth of primary human leukemia and myelodysplasia progenitors. *Leukemia* 16: 67-73, 2002.
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, *et al*: Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104: 155-162, 1999.
- Di Pietro R and Zauli G: Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. *J Cell Physiol* 201: 331-340, 2004.
- Kelley SK, Harris LA, Xie D, *et al*: Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 31-38, 2001.
- Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, *et al*: Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 7: 383-385, 2001.
- Roth W, Isenmann S, Naumann U, *et al*: Locoregional Apo2L/TRAIL eradicates intracranial human malignant glioma xenografts in athymic mice in the absence of neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 479-483, 1999.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, *et al*: Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5: 157-163, 1999.
- Hylander BL, Pitoniak R, Penetrante RB, *et al*: The anti-tumor effect of Apo2L/TRAIL on patient pancreatic adenocarcinomas grown as xenografts in SCID mice. *J Transl Med* 3: 22, 2005.
- Dimberg LY, Anderson CK, Camidge R, Behbakht K, Thorburn A and Ford HL: On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene*: 14 May, 2012 (Epub ahead of print). doi: 10.1038/onc.2012.164, 2012.
- Zhang L and Fang B: Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 12: 228-237, 2005.
- Maksimovic-Ivanic D, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F and Mijatovic S: Resistance to TRAIL and how to surmount it. *Immunol Res* 52: 157-168, 2012.
- Scavennec J, Maraninchi D, Gastaut JA, Carcassonne Y and Cailla HL: Purine and pyrimidine ribonucleoside monophosphate patterns of peripheral blood and bone marrow cells in human acute leukemias. *Cancer Res* 42: 1326-1330, 1982.
- Natsumeda Y, Prajda N, Donohue JP, Glover JL and Weber G: Enzymic capacities of purine de novo and salvage pathways for nucleotide synthesis in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 44: 2475-2479, 1984.
- Bollee G, Harambat J, Bensman A, Knebelmann B, Daudon M and Ceballos-Picot I: Adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *Clin J Am Soc Nephrol* 7: 1521-1527, 2012.
- Bantia S, Miller PJ, Parker CD, *et al*: Purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-1777 (ImmuCellin-H) - a novel potent and orally active immunosuppressive agent. *Int Immunopharmacol* 1: 1199-1210, 2001.
- Bantia S, Montgomery JA, Johnson HG and Walsh GM: In vivo and in vitro pharmacologic activity of the purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-34: the role of GTP and dGTP. *Immunopharmacology* 35: 53-63, 1996.
- Galmarrini CM, Popowycz F and Joseph B: Cytotoxic nucleoside analogues: different strategies to improve their clinical efficacy. *Curr Med Chem* 15: 1072-1082, 2008.
- Allison AC and Eugui EM: Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47: 85-118, 2000.
- Hedstrom L: IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition. *Chem Rev* 109: 2903-2928, 2009.
- Fairbanks LD, Ruckemann K, Qiu Y, *et al*: Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes: a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis? *Biochem J* 342: 143-152, 1999.
- Allison AC and Eugui EM: The design and development of an immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil. *Springer Semin Immunopathol* 14: 353-380, 1993.
- Zhou S, Liu R, Baroudy BM, Malcolm BA and Reyes GR: The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* 310: 333-342, 2003.
- Gandhi V, Kilpatrick JM, Plunkett W, *et al*: A proof-of-principle pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical study with purine nucleoside phosphorylase inhibitor immucellin-H (BCX-1777, forodesine). *Blood* 106: 4253-4260, 2005.
- Miles RW, Tyler PC, Furneaux RH, Bagdassarian CK and Schramm VL: One-third-the-sites transition-state inhibitors for purine nucleoside phosphorylase. *Biochemistry* 37: 8615-8621, 1998.

7.2 Příloha II

Proteomic and transcriptomic analysis of heart failure due to volume overload in a rat aorto-caval fistula model provides support for new potential therapeutic targets - monoamine oxidase A and transglutaminase 2. Petrak Jiri, Pospisilova Jana, Sedinova Miroslava, Jedelsky Petr, Lorkova Lucie, Vit Ondrej, Kolar Michal, Strnad Hynek, Benes Jan, Sedmera David, Cervenka Ludek, Melenovsky Vojtech. Proteome Science 2011;11,9(1):69, IF 2,42.

RESEARCH

Open Access

Proteomic and transcriptomic analysis of heart failure due to volume overload in a rat aorto-caval fistula model provides support for new potential therapeutic targets - monoamine oxidase A and transglutaminase 2

Jiri Petrak^{1*}, Jana Pospisilova¹, Miroslava Sedinova², Petr Jedelsky², Lucie Lorkova¹, Ondrej Vit¹, Michal Kolar³, Hynek Strnad³, Jan Benes⁴, David Sedmera^{5,6}, Ludek Cervenka^{4,7} and Vojtech Melenovsky⁴

Abstract

Background: Chronic hemodynamic overloading leads to heart failure (HF) due to incompletely understood mechanisms. To gain deeper insight into the molecular pathophysiology of volume overload-induced HF and to identify potential markers and targets for novel therapies, we performed proteomic and mRNA expression analysis comparing myocardium from Wistar rats with HF induced by a chronic aorto-caval fistula (ACF) and sham-operated rats harvested at the advanced, decompensated stage of HF.

Methods: We analyzed control and failing myocardium employing iTRAQ labeling, two-dimensional peptide separation combining peptide IEF and nano-HPLC with MALDI-MS/MS. For the transcriptomic analysis we employed Illumina RatRef-12v1 Expression BeadChip.

Results: In the proteomic analysis we identified 2030 myocardial proteins, of which 66 proteins were differentially expressed. The mRNA expression analysis identified 851 differentially expressed mRNAs.

Conclusions: The differentially expressed proteins confirm a switch in the substrate preference from fatty acids to other sources in the failing heart. Failing hearts showed downregulation of the major calcium transporters SERCA2 and ryanodine receptor 2 and altered expression of creatine kinases. Decreased expression of two NADPH producing proteins suggests a decreased redox reserve. Overexpression of annexins supports their possible potential as HF biomarkers. Most importantly, among the most up-regulated proteins in ACF hearts were monoamine oxidase A and transglutaminase 2 that are both potential attractive targets of low molecular weight inhibitors in future HF therapy.

Keywords: Heart failure, hypertrophy, annexins, monoamine oxidase, transglutaminase

Background

Heart failure (HF) is a major cause of human morbidity and mortality with increasing prevalence worldwide, affecting 2-4% of the adult European population [1]. HF is a complex syndrome, resulting from an impaired ability of the diseased heart to maintain adequate effective

cardiac output [2]. Typical signs and symptoms of chronic HF are shortness of breath, cough, accumulation of fluids in the lungs and other tissues, fatigue, limitations on physical activity and arrhythmia [2]. The prognosis for affected individuals is poor and 50% of chronic HF patients die within 4 years of the initial diagnosis [1]. Despite substantial progress in deciphering individual processes involved in the initiation and gradual progression of HF [3], our understanding of the underlying molecular causes of cardiomyocyte dysfunction is

* Correspondence: jpetr@lf1.cuni.cz

¹Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article

still very limited. The molecular phenotype of heart failure has been associated with the altered expression of proteins involved in energy metabolism, membrane excitation, calcium-mediated excitation-contraction coupling, force transduction and with myofilament contraction or relaxation [3]. Studies of the molecular mechanisms of HF in humans are undermined by multi-factor etiology of cardiac dysfunction, by confounding co-morbid conditions and also by a lack of appropriate healthy controls. These obstacles can be avoided in experimental animal models. In rodents, experimental HF is most often induced by myocardial infarction (ligation of the proximal left coronary artery) or by pressure overload (banding of the proximal aorta). As recently demonstrated the molecular responses to volume and pressure overload appear to differ [4].

HF induced by chronic volume overload has been studied less, despite such overload due to valve insufficiency being relatively common among HF patients [5]. Volume overload due to a surgically created aorto-caval fistula (ACF) in rats is a well defined model of chronic HF [6-8], which mimics the gradual transition of asymptomatic cardiac hypertrophy into symptomatic HF. The creation of an ACF leads to increased cardiac output and eccentric ventricular hypertrophy that remains asymptomatic for 8-10 weeks. Because most of cardiac output is shunted into the inferior vena cava, the effective cardiac output is reduced, leading to renal hypoperfusion [7], neurohumoral activation, and sodium/water retention [8]. Elevated cardiac filling pressures further contribute to cardiac overload [9-11]. By these mechanisms, HF gradually develops [8].

To better elucidate the molecular pathophysiology of HF due to ACF, and to identify potential molecular targets for novel therapies, we performed a proteomic analysis of the left ventricle myocardium from ACF animals with signs of HF (150 days after fistula creation) and control (sham-operated) rats. We used a shot-gun approach that combines iTRAQ labeling chemistry [12] with two-dimensional separation of peptides by isoelectric focusing on immobilized pH gradients (IEF-IPG) [13] followed by nano-HPLC and MALDI mass spectrometry. The myocardial samples were also subjected to mRNA microarray expression analysis.

Materials and methods

The chronic HF model

HF due to volume overload was induced in male Wistar rats (300-350 g) by creating an aorto-caval fistula (ACF) using a 1.2 mm needle from laparotomy under general anesthesia, as described previously [6,7]. Control sham-operated animals underwent the same procedure, but without creating an ACF. The animals were kept on a 12/12-hour light/dark cycle, and fed a

normal salt/protein diet (0.45% NaCl, 19-21% protein, SEMED, CR). The investigation conformed to the NIH Guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publication No. 85-23, 1996), Animal protection laws of the Czech Republic (311/1997) and was approved by the Ethics Committee of IKEM (305/09/1390 from 25. March 2008).

Echocardiography and hemodynamics

Examinations were performed under general anesthesia (ketamine+midazolam mixture) at the study end (150 days after ACF creation) prior to harvesting of heart tissue. Echocardiography was performed with a 10 MHz probe (Vivid System 5, GE, USA). End-systolic and end-diastolic left ventricle (LV) volumes were derived by the cubic equation and stroke volume as their difference. Hemodynamics was measured with a 2F micro-manometer catheter (Millar Instruments) inserted into the aorta and LV via the carotid artery, connected to a Powerlab 8 platform for off-line analysis with LabChart software (ADInstruments, Germany). The presence of ACF was verified by laparotomy and the animals were killed by exsanguination. After removal, hearts were immediately perfused with ice-cold St. Thomas cardioplegic solution administered into the aortic root. The organs were weighted and normalized to body weight.

Morphological examination

Perfused hearts were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS). After 24 h of immersion in the same fixative, the hearts were rinsed in PBS and processed through ascending series of saccharose prior to embedding into Tissue-Tek OCT medium. The blocks were then cut on cryomicrotome at 12 micrometers thickness. Guide series were stained by hematoxylin-eosin with Alcian blue. Sister sections were then stained with Picrosirius Red. The slides were finally washed with distilled water and dehydrated in ascending ethanol series, cleared in xylene, and mounted in Depex medium. Observation and photography were performed in transmitted and polarized light on an Olympus BX51 compound microscope.

Myocardial sample preparation

Samples of mid-ventricular anterior free LV wall tissue were immediately harvested into liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Frozen samples (ACF, n = 6 and controls, n = 6) were pulverized under liquid nitrogen and the samples were sub-pooled according to the following scheme: ACF1 (ACF rats #1,3,5), ACF2 (ACF rats #2,4,6), Sham1 (sham-operated rats #1,3,5), Sham2 (sham-operated rats #2,4,6). The pooled samples (10 mg) were extracted with 1 mL of NHT buffer (140 mM NaCl, 10 mM Hepes, 1.5% Triton X-100, pH 7.4)

for 15 min on ice. Insoluble material was sedimented at $15\,000 \times g$ for 15 min and the protein concentration of the cleared supernatant was determined by the Bradford assay (Bio-Rad, CA). A 100 μ g aliquot from each sample was precipitated overnight in cold acetone (-20°C). Precipitated proteins were sedimented at $15\,000 \times g$ at 4°C for 15 min.

Protein digestion and iTRAQ labeling

Extracted and acetone-precipitated myocardial samples were reduced, alkylated, digested with trypsin and labeled with 114-117 iTRAQ chemistry according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, UK). Labeling was performed as follows: "114" - ACF1, "115" - ACF2, "116" - Sham1, "117" - Sham2. Labeled samples 114-117 were then combined and the volume of the final sample was reduced to 40 μ L in a SpeedVac Concentrator (Eppendorf, CR). In total, three independent analyses A, B and C of the ACF1, ACF2, Sham1 and Sham2 samples were performed including extraction, digestion, labeling, separation and MS analysis.

IEF-IPG of peptides, extraction

Isoelectric focusing was performed on a Protean IEF cell (Bio-Rad, CA, USA) using 24 cm IPG strips (pH 4-7, Bio-Rad). Strips were rehydrated overnight in 450 μ L of iTRAQ-labeled peptide mixture diluted with rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 1% ampholytes and 0.002% bromophenol blue). IEF was carried out for 73 kVhr with maximum voltage not exceeding 6 kV, current limited to 50 μ A per strip and temperature set to 20°C . After focusing, strips were briefly washed in water, cut into 32 pieces and peptides were extracted from individual strip pieces into 150 μ L of 80% acetonitrile with 0.5% trifluoroacetic acid, for one hour at room temperature. The volume of all fractions was reduced to 5-10 μ L by evaporation in the SpeedVac Concentrator and fractions were stored at -80°C .

LC-MALDI

LC-MALDI analyses were performed on an Ultimate 3000 HPLC system (Dionex, Sunnyvale, USA) coupled to a Probot micro-fraction collector (Dionex). Extracted post-IEF fractions were loaded onto a PepMap 100 C18 RP column (3 μ m particle size, 15 cm long, 75 μ m internal diameter; Dionex) and separated by a gradient of 3% (v/v) acetonitrile, 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid to 44% (v/v) acetonitrile, 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid over a period of 113 min and from 44% to 80% ACN over the next 7 min. The flow rate was set to 300 nL/min. The eluate was mixed 1:3 with matrix solution (2 mg/mL α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 80% ACN) by the Probot micro-fraction collector prior to spotting onto a MALDI target (5 spots per minute). Spectra were

acquired on a 4800 Plus MALDI TOF/TOF analyzer (AB Sciex) equipped with a Nd:YAG laser (355 nm, firing rate 200 Hz). All spots were first measured in MS mode from m/z 800 to 4,000 and then up to 15 strongest precursors were selected for MS/MS analysis which was performed with 1 kV collision energy and a collision cell operating pressure of 10^{-6} Torr. Tandem mass spectra were processed with a 4000 Series Explorer with subtract baseline enabled (peak width 50), Gaussian smoothing enabled (filter width 5), minimum signal to noise 8, local noise window width 250 m/z , minimum peak width at full width half max 2.9 bins, cluster area signal to noise optimization enabled (threshold 15), and flag monoisotopic peaks enabled.

Proteomic data analysis

Mass spectrometry data from all three parallel analyses A, B and C were merged and processed as a single dataset. Protein identification and quantitation were performed using Protein Pilot 3.0 (AB Sciex). MS/MS spectra were searched against the *Rattus norvegicus* sequences assembly downloaded from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>, 110 358 sequences, as of 06-Jan-2010) with the following settings: Trypsin digestion (semityptic peptides allowed), methyl methanethio-sulfonate modification of cysteines, iTRAQ 4-plex labeled peptides, instrument 4800, no special factors, default iTRAQ isotope correction settings, quantification, bias correction, background correction, biological modifications and thorough ID parameters selected. Probabilities of modifications were not altered. The detected protein threshold (unused protein score and confidence of results) was set to 2.0 and 99.0% and false discovery rate analysis was enabled. Proteins sharing a set of peptides were grouped automatically with the default Pro Group™ Algorithm. Ratios of iTRAQ were calculated with default Protein Pilot setting, Protein fold change (iTRAQ ratio for an individual protein) was calculated automatically by the Protein Pilot software as a weighted average of Log iTRAQ ratios determined for individual peptides belonging to the particular protein after background subtraction.

To estimate the false discovery rate (FDR) a decoy database search was performed. For each protein ratio the Protein Pilot reported the p-value and EF (error factor). To be considered as differentially expressed, individual proteins had to fulfill the following statistical criteria: p value < 0.05, EF < 2 and average iTRAQ ratio > 1.5. In our experimental iTRAQ labeling scheme ("114" - ACF1, "115" - ACF2, "116" - Sham1, "117" - Sham2) a protein was considered differentially expressed only when the all three parameters were reached for all four ACF/Sham protein iTRAQ ratios (i.e for all ratios 116/115, 116/114, 117/115 and 117/114). The fold-

change of differentially expressed proteins was calculated as the average value from the protein iTRAQ ratios reported by Protein Pilot.

Western blotting

Myocardial protein samples (20 μ g) were separated on 10 or 12% SDS-PAGE minigels in Tris-Glycine buffer. Electrophoresis was performed at a constant voltage 90 V. Proteins were then transferred to PVDF membranes (Milipore, MA, USA) in semi-dry blotter (Hoeffer, Canada) at 0.8 mA/cm² of membrane. Membranes were incubated in blocking buffer (phosphate buffer saline (Invitrogen, CA) and 0.1% TWEEN 20 (Sigma-Aldrich)) for 2 hours. Primary antibodies raised against MAO-A (1:300), TGM2 (1:400), HADHA (1:500), from Santa Cruz Biotechnology, CA, USA and GAPDH (1: 330000) from Sigma) were used. After thorough washing in the blocking buffer, secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:10 000, Santa Cruz Biotechnology) was added to membrane for one hour. Signal was detected using Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology).

mRNA expression analysis

Samples of LV tissue (n = 6 in each group) were immediately harvested into RNA preserving solution (RNA-Later, Ambigen, USA). Total RNA was isolated (RNeasy-MicroKit, Qiagen, USA), checked for integrity, amplified, and hybridized on an Illumina RatRef-12v1 Expression BeadChip (Illumina, USA). The raw data were analyzed and processed using the beadarray package of the Bioconductor, as previously described [14]. Analysis of differential expression was performed with the Limmapackage [15] and annotated against the RatRef_12_V1_0_R3_11222119_A.bgx manifest (Illumina, USA). The cut-off level for differential regulation was set to the fold change [1.5 or $\sqrt{0.67}$ with Storey q $\sqrt{0.05}$]. The data are MIAME-compliant and are deposited in the ArrayExpress database (accession #: E-MTAB-190).

Results and Discussion

We prepared cohorts of rats with an aorto-caval fistula (ACF) and sham-operated control animals. We determined functional and morphological changes in the failing ACF myocardium and performed differential proteomic and mRNA expression analysis of control and failing ACF myocardium.

Cardiac morphometry and function

Rats with ACF had reached a similar body size as sham-operated controls and most of ACF animals showed clinical signs of HF such as piloerection, lethargy and difficult breathing 150 days after ACF creation.

Compared to controls, ACF animals had markedly increased heart size (Figure 1A) and weights (5.29 ± 0.18 vs. 2.80 ± 0.12 g/100 g of body weight, $p < 0.05$) and increased lung weights indicating pulmonary congestion (Table 1). Echocardiography confirmed the enlargement of both ventricles and reduced fractional shortening of the left ventricle. These observations are compatible with incipient contractile dysfunction in ACF. Invasive hemodynamics showed increased end-diastolic LV (left ventricle) pressure also indicative of decompensated HF (Table 1). There was no marked fibrosis observed in ACF hearts (Figure 1B, C), in agreement with a previous report [16].

Proteomic and transcriptomic analysis

Six male rats with ACF and six sham-operated animals were included into our proteomic analysis and processed in two sub-pooled samples per group. Three

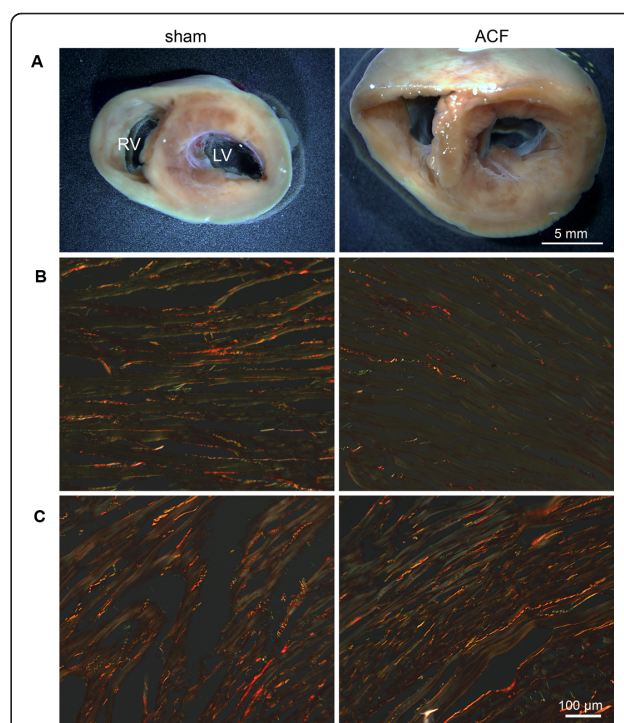


Figure 1 Morphology of sham and ACF rat hearts 150 day after ACF creation. A) Transversal section of the heart illustrates marked biventricular enlargement in the ACF animal compared to control sham-operated rats. B,C) Picosirius Red staining in transverse sections, observed in polarized light, detected sparse mature collagen fibers (in red) well aligned with the myocyte bundles in the circular layer of the left ventricle (B). The amount of collagen was consistently higher in the right ventricle (C), but no difference between sham and ACF hearts was apparent. Green staining is due to erythrocytes, contractile proteins, or immature collagen fibrils. Very little green was observed at the edges of the collagen fibers, representing physiological protein turnover rather than tissue remodeling, with no difference between sham and ACF.

Table 1 Morphometric, hemodynamic and echocardiographic characteristics of cardiac function 150 days after ACF

	Sham	ACF
Morphometry		
Body weight, g	592 ± 20.9	586 ± 23.4
Heart weight/BW, g/100 g	2.80 ± 0.12	5.29 ± 0.18 *
Lung Weight/BW, g/100 g	3.30 ± 0.16	4.23 ± 0.19 *
Hemodynamics		
Heart rate, s ⁻¹	344.9 ± 13.3	360.1 ± 10.8
Peak LV pressure, mmHg	129 ± 7.11	120 ± 3.96
End-diastolic LV pressure, mmHg	6.7 ± 0.84	12.1 ± 0.66 *
Echocardiography		
LV diastolic diameter, mm	6.08 ± 0.40	10.20 ± 0.48 *
LV systolic diameter, mm	1.95 ± 0.42	5.47 ± 0.42 *
LV Fractional shortening, %	69.2 ± 5.00	46.7 ± 2.46 *
LV anterior wall diastolic thickness, mm	2.30 ± 0.08	2.33 ± 0.09
LV posterior wall diastolic thickness, mm	2.33 ± 0.07	2.31 ± 0.09
RV diastolic diameter, mm	2.85 ± 0.18	5.07 ± 0.29 *

n = 10/group. Data are mean ± SE.

BW: Body weight, ACF: aorto-caval fistula group, LV: left ventricle, RV: right ventricle.

* significantly different (p < 0.05) than sham-operated animals.

independent labeling and separation experiments A, B and C were performed, resulting in a total 168 LC-runs, collecting over 110,000 MS/MS spectra. Mass spectrometry data from all three parallel analyses were merged and processed as a single dataset by Protein Pilot software. At high confidence (unused protein score 2.0 and confidence 99%) we identified 2030 individual proteins. For the expression analysis we considered only those proteins that were identified with at least two peptides, each peptide with at least 95% confidence. That reduced the number of identified proteins to 1446 with a false discovery rate (FDR) of only 0.48%. Based on the proteomic analysis (table 2), sixty six proteins were differentially expressed (p value < 0.05, average iTRAQ ratio > 1.5)

Transcriptomic analysis was performed using Illumina chips containing 23,401 rat genes. 16,206 transcripts were tested for differential expression, with 851 being differentially expressed (q-value < 0.05). Complete mRNA expression data are deposited in the ArrayExpress database (accession #: E-MTAB-190).

Table 2 lists the 66 differentially expressed proteins, along with their respective mRNA expression data. Twenty nine of these proteins were differentially expressed with at least a 1.5-fold change at the mRNA level. Eighteen mRNAs showed less pronounced differential expression but with a trend corresponding with the respective proteins (i.e. up- or down-regulation).

Three proteins were not represented on the array, and the expression of 16 mRNAs out of 66 was not altered.

The list of these 66 differentially expressed proteins including complete iTRAQ and mRNA statistics is available as Additional file 1, examples of 3 peptides used for their identification are as Additional file 2. All other proteins identified in our proteomic analysis are listed in Additional file 3.

We further verified our results by western-blotting analysis of three proteins with potential therapeutic relevance - monoamine-oxidase A (MAO-A), transglutaminase 2 (TGM2) and a key protein of fatty acid beta oxidation - the alpha-subunit of mitochondrial trifunctional enzyme (HADHA) (Figure 2). The results confirm the upregulation of MAO-A and TGM2 and down-regulation of HADHA identified by proteomics and transcriptomics.

Molecular changes in the failing myocardium

Although contractile function of the heart appears to remain relatively preserved at this stage of HF, our proteomic analysis confirmed characteristic molecular features of HF such as profound changes in heart energetics and metabolism - namely the switch of substrate preference from fatty acids to other substrates are the hallmark of HF [17,18]. The largest group of differentially regulated proteins in ACF, representing approximately half of the differentially expressed proteins, is associated with energetic substrate metabolism (Table 2). We note the few cases where mRNA expression did not mimic protein changes, or was not present on micro array chips.

Enzymes of fatty acid oxidation and electron transport chain

The most obvious, but not unexpected, alteration in the failing myocardium was the down-regulation of most key proteins involved in the β -oxidation of fatty acids (FA). The depressed expression or activity of individual enzymes involved in FA oxidation has been previously demonstrated in advanced HF patients and in most HF models [reviewed in [17] and [18]]. Attenuated myocardial oxidation of palmitate has recently been demonstrated in the same HF model by our group [19]. However, we note that net lipid oxidation can be increased in diabetic cardiac hypertrophy models [20]

We found *carnitine O-palmitoyltransferase 2*, responsible for the transport of FA across the inner mitochondrial membrane, to be downregulated. The key protein of beta oxidation the *mitochondrial trifunctional protein* was downregulated (both HADHA and HADHB subunits) as was *Acyl-CoA dehydrogenase (3 forms with different FA chain length specificity)*. Additionally, *3-trans-enoyl-CoA isomerase* that is responsible for the catabolism of unsaturated FA and *Acyl-CoA thioesterase*

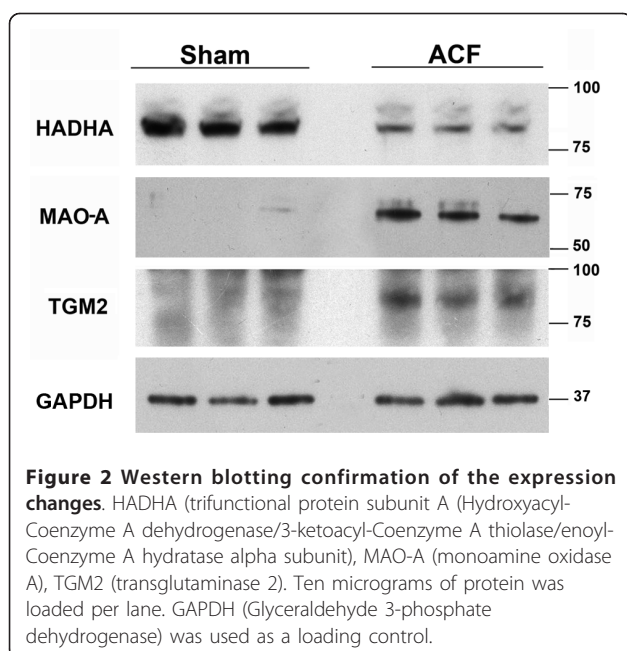
Table 2 Proteins differentially expressed in hearts of ACF rats.

Proteins downregulated in ACF					
Peptides (95% confidence)	Seq. Cov.	Accession	Protein name	Protein Fold-change (iTRAQ ratio)	mRNA fold-change
53	54	gi 259435950	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1	0.23	NA
17	25	gi 59797483	Carnitine O-acetyltransferase	0.24	0.52
124	66.1	gi 189083744	Sarcomeric mitochondrial creatine kinase	0.24	1.05
42	63	gi 54035288	Enolase 3, beta	0.26	0.23
26	52	gi 57333	3-2 trans-enoyl-CoA isomerase	0.27	0.54
40	49	gi 60688124	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial (HADHA)	0.3	0.54
24	35	gi 31077132	Histidine rich calcium binding protein	0.31	0.61
9	37	gi 1906812	Inducible carbonyl reductase	0.32	0.45
49	65	gi 56541110	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	0.33	0.59
28	45	gi 510110	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial (HADHB)	0.33	0.56
4	17	gi 66910891	Glutamic-pyruvate transaminase (alanine aminotransferase)	0.34	0.38
113	53	gi 57303	Sarcoplasmic reticulum 2+-Ca-ATPase (SERCA2)	0.35	1.0
40	56.8	gi 149042663	Sarcalumenin	0.36	0.91
20	41.1	gi 77993368	Acyl-CoA synthetase family member 2 precursor	0.39	NA
120	74.3	gi 6978661	Muscle creatine kinase	0.4	0.69
195	75.8	gi 83300587	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial;	0.4	0.71
120	71	gi 62079055	Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+)	0.41	0.62
30	50	gi 7387725	Medium and short chain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase	0.43	0.37
18	47.5	gi 51260066	Propionyl coenzyme A carboxylase, beta polypeptide	0.43	0.84
19	39	gi 6166586	Acyl-coenzyme A thioesterase 2	0.44	0.54
24	42.6	gi 149050263	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain	0.44	0.91
35	40.7	gi 6978543	Na+/K+ -ATPase alpha 1 subunit precursor	0.45	1.1
34	64	gi 56929	Pyruvate kinase M1/M2	0.46	0.6
16	37	gi 62825891	Phosphofructokinase, muscle	0.46	0.5
42	68.8	gi 57527204	Electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide	0.46	0.69
10	30	gi 149062241	LRP16 protein	0.47	0.38
35	47.9	gi 92090591	Glutamate dehydrogenase 1	0.47	0.84
13	43	gi 6981396	Protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I, alpha	0.47	1.0
68	37	gi 61557127	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase	0.48	0.67
111	69.1	gi 6978431	Long-chain acyl-CoA dehydrogenase precursor	0.49	0.84
31	49	gi 48734846	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	0.53	0.58
64	44.5	gi 81883712	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	0.53	0.69
48	67	gi 149027156	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2	0.54	0.61
45	25.9	gi 189181710	Ryanodine receptor 2, cardiac	0.58	0.79
30	37	gi 81871846	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	0.61	0.66
33	45	gi 6978705	Carnitine O-palmitoyltransferase precursor	0.61	0.58
Proteins upregulated in ACF					
Peptides (95% confidence)	Seq. Cov.	Accession	Protein name	Protein Fold-change (iTRAQ ratio)	mRNA fold-change
44	55	gi 48425083	Monoamine Oxidase A	4.06	1.93
10	18	gi 55249666	Cadherin 13	3.40	2.15
19	34	gi 5326787	Transglutaminase 2	3.07	1.93
24	61	gi 94400790	Heat shock protein 1 (HSP27)	3.05	1.41

Table 2 Proteins differentially expressed in hearts of ACF rats. (Continued)

23	72.2	gij438878	tropomyosin	3.04	1.32
10	42	gij6978501	Annexin A1	3.00	2.23
35	69.6	gij535069	Muscle LIM protein [Rattus norvegicus]	2.97	1.31
22	50	gij6981324	Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	2.91	1.27
59	73.3	gij56388799	Brain creatine kinase (Ckb protein)	2.88	1.31
16	30	gij149048530	Ceruloplasmin, isoform CRA_a	2.80	2.02
34	62.3	gij744592	Alpha-B crystallin	2.61	1.05
35	68	gij157830232	Annexin V	2.58	1.71
20	27.3	gij462569	Microtubule-associated protein 1A	2.58	1.30
10	26.9	gij158706096	Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1	2.45	1.23
8	34.4	gij68837285	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial;	2.44	1.02
10	28	gij974168	Aldehyde dehydrogenase 1A1 (retinal dehydrogenase 1)	2.43	1.84
11	28	gij7533042	Guanine deaminase	2.41	2.02
8	28.9	gij57241	Sulfated glycoprotein 2 (clusterin)	2.39	1.34
24	38.6	gij6981022	Hexokinase 1	2.23	NA
59	64.4	gij109468300	Alpha-enolase (Enolase 1)	2.23	1.00
94	50.7	gij149063941	Beta myosin heavy chain myo7	2.22	1.02
14	35.3	gij53237076	EH-domain containing 4	2.22	1.08
22	50	gij9845234	Annexin A2	2.21	2.17
11	25	gij149018456	Microtubule-associated protein 4	2.18	1.24
6	26	gij158186676	Calumenin isoform a	2.17	0.86
39	42.6	gij54673763	Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	2.14	1.27
13	60.8	gij1051270	14-3-3 zeta isoform	1.99	1.18
11	33.2	gij55855	Calreticulin	1.90	1.18
41	26.9	gij62646949	Filamin-C (Gamma-filamin) (Filamin-2)	1.87	1.21
18	39.1	gij157819677	Sarcolemma associated protein	1.81	1.02

Identification of all proteins was based on at least four peptides. (for peptide sequences see Additional data 2). NA- mRNA not represented on the chip.



(mitochondrial thioesterase, MTE-1), an enzyme responsible for the intra-mitochondrial generation of free FA anions from acyl-CoAs were both down-regulated in ACF. ACF animals in this study also showed significant downregulation of long-chain *acyl-CoA synthetase 1* and *acyl-CoA synthetase family member 2 precursor* responsible for the initial binding of fatty acids to the coenzyme A moiety, however, their mRNAs were not represented on the Illumina chip.

Glycolysis

Despite the existence of functional studies suggesting that a failing heart preferentially utilizes glucose [17], we found no convincing evidence of up-regulation of the glycolytic pathway in ACF. The key regulatory enzyme and the last enzyme of glycolysis - *phosphofructokinase* and *pyruvate kinase*, were both down-regulated in ACF. Failing hearts also showed decreased expression of muscle-specific *enolase-3* (β form) but an increased abundance of the ubiquitous *enolase-1* (no change at the mRNA level).

Creatine kinase system

We observed decreased abundance of *sarcomeric mitochondrial (sMt-CK, no change observed at the mRNA level)* and *muscle (M-CK) creatine kinase* along with up-regulation of the *B-CK isoform* (1.3-fold up-regulation of mRNA) changes typical for animal and human HF [21]. Expression of the three corresponding mRNAs is in agreement with these trends. The CK system serves as a temporal buffer of high-energy phosphates (sMt-CK), and participates in an spatial enzymatic network (M-CK) responsible for the fast transport of high-energy phosphates from mitochondria to the contractile machinery [22,23]. Decreased CK levels may contribute to the diminished ATP flux via CK observed in HF [23] and contribute to the limited cardiac functional reserve.

Sarcomeric and Calcium handling and proteins

Of the sarcomeric proteins, we observed up-regulation of the *β-myosin heavy chain* (myosin 7, (no change observed at mRNA level). The switch of the predominant myosin heavy chain from the *α-* to *β-*isoform affects the contractile phenotype, and is considered a hallmark of myocardial HF-induced remodeling [3]. The failing myocardium is also characterized by the diminished expression of proteins responsible for sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} uptake, handling and release [24]. Correspondingly, we observed marked down-regulation of *SR calcium ATPase* (SERCA2) protein (no change observed at the mRNA level) and of the main SR Ca^{2+} release channel - *Ryanodine Receptor 2* protein (RYR2) (0.79 fold down-regulation of mRNA) thus confirming the molecular HF phenotype in ACF rats. Down-regulation of both proteins in HF has been described previously and was implicated in diminished contractility, reduced SR Ca^{2+} stores and less efficient energy utilization of Ca^{2+} handling [25,26].

Redox state and stress-response related proteins

Abnormalities in the intracellular redox state have been implicated in most processes affecting cardiac function and the development of HF [27]. The antioxidant potential of the cell is determined by the content of reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG). A sufficiently high GSH/GSSG ratio is maintained by NADPH-dependent glutathione reductase. In cardiomyocytes, NADPH is produced by nicotinamide nucleotide transhydrogenase, isocitrate dehydrogenase, and the pentose-phosphate pathway. Interestingly, mitochondrial *nicotinamide nucleotide transhydrogenase* (NNT), which accounts for up to 45% of the total NADPH supply [28], was markedly down-regulated in ACF animals. In addition, *NADP-dependent isocitrate dehydrogenase* (IDH2) which may further contribute to NADPH levels, was also down-regulated. Our observations led us to hypothesize that decreased expression of the two

important NADPH producers could compromise the function of glutathione reductase, explaining the attenuated redox reserve. We recently demonstrated decreased GSH/GSSG ratio in the failing ACF myocardium [19], providing support to this idea.

Other proteins

Three members of the large annexin family: *Annexin A5, A2 and A1* were up-regulated. Annexins are ubiquitous proteins associated with the inner cytoplasmic membrane that are known to bind phospholipids in a Ca^{2+} -dependent manner and to participate in a variety of membrane-related events [29] as well as in apoptosis, inflammation and coagulation. The role of annexins in cardiac physiology remains largely unknown. Interestingly, all three annexins (A1, A2 and A5) that were up-regulated in ACF hearts in our study have been previously implicated in calcium-dependent "cell membrane resealing". Such resealing may be relevant in hemodynamically-overloaded hearts with increased mechanical stress [[30] and references within]. *Annexin A5* (expressed mostly in cardiomyocytes) and *annexin A2* (detected only in endothelial cells and the extracellular matrix) but not *annexin A1* have been previously reported to be up-regulated in hypertrophic and failing hearts [29]. Increased serum levels of *annexin A5* has been demonstrated in a large study on heart disease patients and was considered to be a potential marker for hypertension-related HF [31]. However, authors of the study however failed to detect increased annexin A5 mRNA in the hearts, raising a question about the source of the protein. Here we demonstrate up-regulation of A1, A2 and A5 transcripts, which further supports these annexin proteins as potential HF markers.

The ACF myocardium displayed up-regulation of *Cadherin 13* (T-cadherin). Until recently, its heart-related function has been unknown. This GPI-anchored, lipid-raft associated member of the cadherin superfamily recruits adiponectin to heart, and is critical for adiponectin-mediated cardioprotection [32]. Increased expression here can be explained as an adaptive compensation for altered levels of circulating adiponectin [33].

Potential therapeutic targets

Among the most markedly up-regulated proteins in our study are *transglutaminase 2* and *monoamine oxidase A*. Since both proteins carry promising therapeutic potential we discuss them in detail.

Transglutaminase 2 (TGM2) was up-regulated 3-fold in ACF hearts. TGM2 is a multifunctional protein with G-protein function, disulfide-isomerase and transglutaminase activities, found predominantly in the cytosol and at the cell surface. The transglutaminase activity of this protein is responsible for stable cross-linking of peptide chains between lysine and glutamine residues involved in extracellular matrix stabilization and wound

healing as well as during apoptosis [34,35]. Due to its G-protein properties, TGM2 participates in intracellular signaling via α 1-adrenergic and thromboxane receptors [34], and has been recently shown to promote apoptosis of rat cardiomyocytes under oxidative stress [36]. Two independent groups have demonstrated that heart-specific TGM2 over-expression results in detrimental hemodynamic changes, structural alterations, cardiomyocyte apoptosis, cardiac hypertrophy and fibrosis [37,38]. Our observation of up-regulated TGM2 in ACF hearts thus adds further evidence for the adverse effect of TGM2 up-regulation in cardiac hypertrophy and HF. Effective low molecular weight inhibitors such as cystamine and monodansylcadaverine are already known and their use inhibits TGM2-induced apoptosis in aortic smooth muscle cells [39] and partially repressed hypoxia-induced cardiac hypertrophy in rats [40]. This highlights the potential of TGM2 as a novel therapeutic target.

Monoamine oxidase A

The most up-regulated (4-fold) protein in ACF heart is mitochondrial *monoamine oxidase-A* (MAO-A), an enzyme responsible for oxidative deamination of bioactive monoamines (epinephrine, norepinephrine, serotonin), giving rise to hydrogen peroxide and toxic aldehyde metabolites that are further catabolized by aldehyde dehydrogenases [41]. In concordance with this, *aldehyde dehydrogenase 1A1* was also found to be up-regulated in ACF hearts in our study. The hydrogen peroxide produced by cardiac MAO-A has been shown to contribute to cardiomyocyte apoptosis [42]. Kaludercic et al. recently demonstrated that increased MAO-A-dependent catabolism of norepinephrine contributes to adverse remodeling in pressure-overloaded hearts. Pharmacological inhibition of MAO-A by clorgyline prevents left ventricle dilatation and dysfunction, attenuated oxidative stress and increased norepinephrine myocardial content in pressure overloaded hearts [43]. In an identical model to ours, Kristen et al. showed that ACF rats have increased circulating norepinephrine levels, but depleted cardiac norepinephrine stores [44]. In combination with the studies discussed above, our findings suggest that besides the loss of sympathetic nerve endings [44] or attenuated norepinephrine reuptake [45], myocardial norepinephrine depletion in HF may result from its increased catabolism by MAO-A. This process is common to both pressure and volume overload, and along with tissue norepinephrine depletion causes oxidative damage to cardiomyocytes. Interestingly, MAO-A has also been recently identified as a causal agent of oxidative myofibril damage in muscular dystrophy [46]. All experimental evidence summarized in a recent review [47] along with our observations strongly indicates that MAO-A expression/activity is a major contributor to

cardiac hypertrophy and HF. Low-molecular weight inhibitors of MAO-A such as moclobemide exist and are already in clinical use as antidepressants [48]. Therefore, targeted inhibition of MAO-A activity should be intensively investigated as a potential therapy for HF.

Proteins with no previous association with HF

Of the 66 differentially expressed proteins at least 6 molecules have not been previously associated with heart HF and might therefore be new players in the disease development or progression. No previous connection with HF has been made for *inducible carbonyl reductase*, *LRP16* (a component of the NF- κ B transcriptional complex) [49] or *Leucine-rich PPR motif-containing protein* (a regulator of mitochondrial transcription) [50] all down-regulated in ACF. These molecules seem to be involved in metabolic and regulatory processes, but information available on these three molecules is very limited. The up-regulated regulatory protein *Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein* alias HPIP (1.3 -fold up-regulation of mRNA) has been previously studied in the context of MAPK and AKT activation and estrogen receptor (ER α) and tubulin binding [51], but no connection with heart has been made to date. The up-regulated proteins *guanine deaminase* and *ceruloplasmin* although well known, also have yet to be connected with HF. Ceruloplasmin is a copper binding protein with ferroxidase activity, its altered expression thus may point out toward altered copper or iron homeostasis in HF. Notably copper metabolism or balance appears to be disrupted in diabetic hypertrophied hearts, and copper chelation has been shown to improve heart diabetic cardiac function [52]. The individual roles of these potential new players in the molecular puzzle of HF remain to be determined in future targeted studies.

Conclusions

To our knowledge, our shot-gun study employing peptide IEF combined with nanoLC-MALDI is the largest (over 2000 proteins) semi-quantitative analysis of proteome changes related to HF to date. We are aware that our experimental design using two sub-pooled controls and two ACF sub-pools is not typical. This design was driven by our aim to penetrate deeper into medium- and low-abundance proteome and maximize the number of reliably identified and quantified proteins. Merging of MS data from three biologically identical runs provided us with a higher number of identified proteins with higher sequence coverage, and simultaneously increased the number of observed iTRAQ reporter quartets for each protein, thus increasing the reliability of the quantitative information. Our second reason for using this approach is economic. A higher statistical power for the experiment could have been achieved with iTRAQ

quadruplex by analysis of one control pool against three individual ACF animals (or three ACF subpools). However, such a single control (sham-operated animals) pool would have to consist of many animals to eliminate the risk of a single atypical rat affecting the composition of such a representative control pool. Unfortunately, to operate and maintain large cohorts of such animals for almost half a year is economically prohibitive.

Various proteomics strategies have provided several important “snapshots” of different stages and types of heart hypertrophy and HF resulting from diverse initial insults, different underlying molecular mechanisms, and in different animal models. In this respect the results of different proteomic analyses are difficult to compare. However, the similarity of our results with the work of Grant et al. [53], who used an analogical proteomic approach to examine effect of aging on the cardiac proteome in old versus young rats, is very intriguing. Similar to our results, aged hearts showed the down-regulation of enzymes of fatty acids oxidation, SMT- and M- creatine kinase, electron-transferring flavoprotein and ATP synthase components. Also in agreement with our study, aged hearts displayed up-regulated β -myosin heavy chain, muscle LIM protein, microtubule associated proteins 1 and 4, calumenin, calreticulin, annexin 5, prolyl-4-hydroxylase beta subunit, HSP 27 and alpha-B crystallin. Based on the high concordance of proteomic alterations induced by spontaneous aging and by overload-induced HF, it is tempting, however speculative, to view the HF developed in our model as a sort of accelerated, premature aging of the organ.

We are fully aware that our study has one significant limitation. Being based on a pair-wise comparison our study lacks important temporal information and can not discriminate between processes of compensatory hypertrophy and later events of HF itself. To access such a temporal information on the development process and gradual progression of HF, more time points will have to be analyzed in the future.

In summary, we identified multiple enzymes involved in substrate metabolism in the HF myocardium. This confirms many previous observations and is in accordance with altered substrate preference in the HF [17,18]. These alterations probably reflect the activation of a pro-survival program of stressed cells, and at least some changes may be adaptive, maximizing cardiac efficiency. Our study brings a novel observation suggesting an attenuated redox reserve (down-regulation of NADPH producers) in ACF rats which possibly contributes to the myocardial remodeling in HF due to oxidative stress. Further, we propose new potential biomarkers of hypertrophy and/or HF (annexin A2 and A1) and, most importantly, suggest two highly potential therapeutic targets for the treatment of HF - monoamine oxidase A and

transglutaminase 2. Our work has also identified several proteins, new in the context of HF, as leads for specific, hypothesis-driven experiments.

Additional material

Additional file 1: Additional data 1_ statistics of differentially expressed proteins and mRNAs.pdf. Table presents statistical significance data on the differential expression of individual proteins (iTRAQ ratios) and their respective mRNA expression.

Additional file 2: Additional data 3_peptides used for protein identifications .pdf. Table shows sequences of three of the n peptides used for the identification of the 66 differentially expressed proteins.

Additional file 3: Additional data 3_ all identified proteins.pdf. Extensive table summarizes all other proteins (not differentially expressed) identified by MS including their accession numbers, sequence coverage and number of peptides observed.

Abbreviations

HF: Heart Failure; ACF: Aorto-caval fistula; LV: Left ventricle; FA: fatty acids; TGG: transglutaminase 2; MAO-A: monoamine oxidase A; HADHA: Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase alpha subunit; SERCA2: sarcoplasmic reticulum² +Ca ATPase.

Acknowledgements

This work was supported by the Grant agency of the Czech Republic 305/09/1390, by the EU Operational Program Prague - Competitiveness; project “CEVKOON” (CZ.2.16/3.1.00/22126), and by grants from the Ministry of Health CR (MZO-00023001, 00023736, IGA MZCR NS10300-3, NS10497-3/2009, NT 12248-5; from the Ministry of Education (MSMT-1MO510, VZ 0021620806, 0021620858, LC06044 and SVV-2011-262507) and also by the Academy of Sciences of the Czech Republic (AV0Z50110509). We thank to Mrs. Petra Skaroupkova for invaluable help with rat surgical techniques. Special thanks also to Mrtva Ryba.

Author details

¹Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic. ²Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic. ³Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic. ⁴Department for Experimental Medicine and Department of Cardiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine-IKEM, Prague, Czech Republic. ⁵Institute of Anatomy, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic. ⁶Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic. ⁷Department of Physiology, 2nd Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic.

Authors' contributions

JP and VM designed the study, interpreted the data and wrote the manuscript. JaP, LL and OV performed the sample preparation, peptide labeling and separation, and western blotting experiments. MS and PJ performed the LC-MS analysis. VM, JB, LC and DS prepared the ACF animals, measured the hemodynamic and echocardiographic parameters and performed the morphological analysis. MK and HS were responsible for the mRNA chip analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 22 July 2011 Accepted: 11 November 2011

Published: 11 November 2011

References

1. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A,

- Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K: **Committee for Practice Guidelines (CPG). ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology.** *Eur J Heart Fail* 2008, **10**:933-989.
2. McMurray JJ, Pfeffer MA: **Heart failure.** *Lancet* 2005, **365**:1877-1889.
 3. Mudd JO, Kass DA: **Tackling heart failure in the twenty-first century.** *Nature* 2008, **451**:919-928.
 4. Toischer K, Rokita AG, Unsold B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T, Grebe C, Preuss L, Gupta SN, Schmidt K, Lehnart SE, Krüger M, Linke WA, Backs J, Regitz-Zagrosek V, Schäfer K, Field LJ, Maier LS, Hasenfuss G: **Differential cardiac remodeling in preload versus afterload.** *Circulation* 2010, **122**:993-1003.
 5. Trichon BH, Felker GM, Shaw LK, Cabell CH, O'Connor CM: **Relation of frequency and severity of mitral regurgitation to survival among patients with left ventricular systolic dysfunction and heart failure.** *Am J Cardiol* 2003, **91**:538-543.
 6. Garcia R, Diebold S: **Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat.** *Cardiovasc Res* 1990, **24**:430-432.
 7. Flaim SF, Minter WJ, Neflis SH, Clark DP: **Chronic arteriovenous shunt: evaluation of a model for heart failure in rat.** *Am J Physiol* 1979, **236**:H698-704.
 8. Brower GL, Janicki JS: **Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, **280**:H674-683.
 9. Ruzicka M, Yuan B, Leenen FH: **Effects of enalapril versus losartan on regression of volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats.** *Circulation* 1994, **90**:484-491.
 10. Ryan TD, Rothstein EC, Aban I, Tallaj JA, Husain A, Lucchesi PA, Dell'Italia LJ: **Left ventricular eccentric remodeling and matrix loss are mediated by bradykinin and precede cardiomyocyte elongation in rats with volume overload.** *J Am Coll Cardiol* 2007, **49**:811-821.
 11. Brower GL, Henegar JR, Janicki JS: **Temporal evaluation of left ventricular remodeling and function in rats with chronic volume overload.** *Am J Physiol* 1996, **271**:H2071-2078.
 12. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R: **Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.** *Nat Biotechnol* 1999, **17**:994-999.
 13. Lengqvist J, Uhlen K, Lehtio J: **iTRAQ compatibility of peptide immobilized pH gradient isoelectric focusing.** *Proteomics* 2007, **7**:1746-1752.
 14. Strnad H, Lacina L, Kolar M, Cada Z, Vleck C, Dvorankova B, Betka J, Plzak J, Chovanec M, Sachova J, Valach J, Urbanova M, Smetana K Jr: **Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes.** *Histochem Cell Biol* 2010, **133**:201-211.
 15. Smyth GK: **Limma: linear models for microarray data.** In *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*. Edited by: Gentleman V, Careyand S, Dudoid S, Irizarry R, Huber W. New York: Springer; 2005:397-420.
 16. Benes J Jr, Melenovsky V, Skaroupkova P, Pospisilova J, Petrak J, Cervenka L, Sedmera D: **Myocardial Morphological Characteristics and Proarrhythmic Substrate in the Rat Model of Heart Failure Due to Chronic Volume Overload.** *Anat Rec (Hoboken)* 2011, **294**:102-111.
 17. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD: **Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart.** *Physiol Rev* 2005, **85**:1093-1129.
 18. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC: **Myocardial fatty acid metabolism in health and disease.** *Physiol Rev* 2010, **90**:207-258.
 19. Melenovsky V, Benes J, Skaroupkova P, Sedmera D, Strnad H, Kolar M, Vleck C, Petrak J, Benes J Jr, Papousek F, Oliyarnyk O, Kazdova L, Cervenka L: **Metabolic characterization of volume overload heart failure due to aorto-caval fistula in rats.** *Mol Cell Biochem* 2011, **354**:83-96.
 20. Jüllig M, Hickey AJ, Middleditch MJ, Crossman DJ, Lee SC, Cooper GJ: **Characterization of proteomic changes in cardiac mitochondria in streptozotocin-diabetic rats using iTRAQ™ isobaric tags.** *Proteomics Clin Appl* 2007, **1**:565-576.
 21. Ingwall JS, Weiss RG: **Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function.** *Circ Res* 2001, **95**:135-145.
 22. Dzeja PP, Terzic A: **Phosphotransfer networks and cellular energetics.** *J Exp Biol* 2003, **206**:2039-2047.
 23. Smith CS, Bottomley PA, Schulman SP, Gerstenblith G, Weiss RG: **Altered creatine kinase adenosine triphosphate kinetics in failing hypertrophied human myocardium.** *Circulation* 2006, **114**:1151-1158.
 24. Bers DM: **Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure.** *Physiology (Bethesda)* 2006, **21**:380-387.
 25. Takewa Y, Chemaly ER, Takaki M, Liang LF, Jin H, Karakikes I, Morel C, Tatsumi E, Hajjar RJ: **Mechanical work and energetic analysis of eccentric cardiac remodeling in a volume overload heart failure in rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009, **296**:H1117-H1124.
 26. Ding YF, Brower GL, Zhong Q, Murray D, Holland M, Janicki JS, Zhong J: **Defective intracellular Ca²⁺ homeostasis contributes to myocyte dysfunction during ventricular remodeling induced by chronic volume overload in rats.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008, **35**:827-835.
 27. Giordano FJ: **Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure.** *J Clin Invest* 2005, **115**:500-508.
 28. Sheeran FL, Rydstrom J, Shakhparonov MI, Pestov NB, Pepe S: **Diminished NADPH transhydrogenase activity and mitochondrial redox regulation in human failing myocardium.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1797**:1138-1148.
 29. Camors E, Monceau V, Charlemagne D: **Annexins and Ca²⁺ handling in the heart.** *Cardiovasc Res* 2005, **65**:793-802.
 30. Bouter A, Gounou C, Berat R, Tan S, Gallois B, Granier T, d'Estaintot BL, Pöschl E, Brachvogel B, Brisson AR: **Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair.** *Nat Commun* 2011, **2**:270.
 31. Ravassa S, Gonzalez A, Lopez B, Beaumont J, Querejeta R, Larman M, Díez J: **Upregulation of myocardial Annexin A5 in hypertensive heart disease: association with systolic dysfunction.** *Eur Heart J* 2007, **28**:2785-2791.
 32. Denzel MS, Scimia MC, Zumstein PM, Walsh K, Ruiz-Lozano P, Ranscht B: **T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice.** *J Clin Invest* 2010, **120**:4342-4352.
 33. Shibata R, Ouchi N, Murohara T: **Adiponectin and cardiovascular disease.** *Circ J* 2009, **73**:608-614.
 34. Mehta K, Fok JY, Mangala LS: **Tissue transglutaminase: from biological glue to cell survival cues.** *Front Biosci* 2006, **11**:173-185.
 35. Park D, Choi SS, Ha KS: **Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments.** *Amino Acids* 2010, **39**:619-631.
 36. Song H, Kim BK, Chang W, Lim S, Song BW, Cha MJ, Jang Y, Hwang KC: **Tissue transglutaminase 2 promotes apoptosis of rat neonatal cardiomyocytes under oxidative stress.** *J Recept Signal Transduct Res* 2011, **31**:66-74.
 37. Zhang Z, Vezza R, Plappert T, McNamara P, Lawson JA, Austin S, Praticò D, Sutton MS, Fitzgerald GA: **COX-2-dependent cardiac failure in Gh/tTG transgenic mice.** *Circ Res* 2003, **92**:1153-1161.
 38. Small K, Feng JF, Lorenz J, Donnelly ET, Yu A, Yu A, Im MJ, Dorn GW, Liggett SB: **Cardiac specific overexpression of transglutaminase II (G(h)) results in a unique hypertrophy phenotype independent of phospholipase C activation.** *J Biol Chem* 1999, **274**:21291-21296.
 39. Ou H, Haendeler J, Aebly MR, Kelly LA, Cholewa BC, Koike G, Kwitek-Black A, Jacob HJ, Berk BC, Miano JM: **Retinoic acid-induced tissue transglutaminase and apoptosis in vascular smooth muscle cells.** *Circ Res* 2000, **87**:881-887.
 40. Li X, Wei XL, Meng LL, Chi MG, Yan JQ, Ma XY, Jia YS, Liang L, Yan HT, Zheng JQ: **Involvement of tissue transglutaminase in endothelin 1-induced hypertrophy in cultured neonatal rat cardiomyocytes.** *Hypertension* 2009, **54**:839-844.
 41. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS: **Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine.** *Pharmacol Rev* 2004, **56**:331-349.
 42. Bianchi P, Kunduzova O, Masini E, Cambon C, Bani D, Raimondi L, Seguelas MH, Nistri S, Colucci W, Leducq N, Parini A: **Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postschismic myocardial injury.** *Circulation* 2005, **112**:3297-3305.
 43. Kaludercic N, Takimoto E, Nagayama T, Feng N, Lai EW, Bedja D, Chen K, Gabrielson KL, Blakely RD, Shih JC, Pacak K, Kass DA, Di Lisa F, Paolocci NZ: **Monoamine oxidase A-mediated enhanced catabolism of norepinephrine contributes to adverse remodeling and pump failure in hearts with pressure overload.** *Circ Res* 2010, **106**:193-202.
 44. Kristen AV, Kreusser MM, Lehmann L, Kinscherf R, Katus HA, Haass M, Backs J: **Preserved norepinephrine reuptake but reduced sympathetic**

- nerve endings in hypertrophic volume-overloaded rat hearts. *J Card Fail* 2006, **12**:577-583.
45. Eisenhofer G, Friberg P, Rundqvist B, Quyyumi AA, Lambert G, Kaye DM, Kopin IJ, Goldstein DS, Esler MD: **Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure.** *Circulation* 1996, **93**:1667-1676.
 46. Menazza S, Blaauw B, Tiepolo T, Toniolo L, Braghetta P, Spolaore B, Reggiani C, Di Lisa F, Bonaldo P, Canton M: **Oxidative stress by monoamine oxidases is causally involved in myofiber damage in muscular dystrophy.** *Hum Mol Genet* 2010, **19**:4207-4215.
 47. Kaludercic N, Carpi A, Menabo R, Di Lisa F, Paolocci N: **Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury.** *Biochim Biophys Acta* 2011, **1813**:1323-1332.
 48. Riederer P, Lachenmayer L, Laux G: **Clinical applications of MAO-inhibitors.** *Curr Med Chem* 2004, **11**:2033-2043.
 49. Wu Z, Li Y, Li X, Ti D, Zhao Y, Si Y, Mei Q, Zhao P, Fu X, Han W: **LRP16 integrates into NF- κ B transcriptional complex and is required for its functional activation.** *PLoS One* 2011, **6**:e18157.
 50. Gohil VM, Nilsson R, Belcher-Timme CA, Luo B, Root DE, Mootha VK: **Mitochondrial and nuclear genomic responses to loss of LRPPRC expression.** *J Biol Chem* 2010, **285**:13742-13747.
 51. Wang X, Yang Z, Zhang H, Ding L, Li X, Zhu C, Zheng Y, Ye Q: **The estrogen receptor-interacting protein HPIP increases estrogen-responsive gene expression through activation of MAPK and AKT.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1783**:1220-1228.
 52. Cooper GJ, Phillips AR, Choong SY, Leonard BL, Crossman DJ, Brunton DH, Saafi L, Dissanayake AM, Cowan BR, Young AA, Occlshaw CJ, Chan YK, Leahy FE, Keogh GF, Gamble GD, Allen GR, Pope AJ, Boyd PD, Poppitt SD, Borg TK, Doughty RN, Baker JR: **Regeneration of the heart in diabetes by selective copper chelation.** *Diabetes* 2004, **53**:2501-2508.
 53. Grant JE, Bradshaw AD, Schwacke JH, Baicu CF, Zile MR, Schey KL: **Quantification of protein expression changes in the aging left ventricle of *Rattus norvegicus*.** *J Proteome Res* 2009, **8**:4252-4263.

doi:10.1186/1477-5956-9-69

Cite this article as: Petrak *et al.*: Proteomic and transcriptomic analysis of heart failure due to volume overload in a rat aorto-caval fistula model provides support for new potential therapeutic targets - monoamine oxidase A and transglutaminase 2. *Proteome Science* 2011 **9**:69.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



7.3 Příloha III

Myocardial morphological characteristics and proarrhythmic substrate in the rat model of heart failure due to chronic volume overload. Benes Jiri Jr, Melenovsky Vojtech, Skaroupkova Petra, Pospisilova Jana, Petrak Jiri, Cervenka Ludek, Sedmera David. Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology 2011;294(1):102, IF 1,34.

Myocardial Morphological Characteristics and Proarrhythmic Substrate in the Rat Model of Heart Failure Due to Chronic Volume Overload

JIRI BENES JR.,^{1,2,3*} VOJTECH MELENOVSKY,^{4,5} PETRA SKAROUPKOVA,^{5,6}
JANA POSPISILOVA,⁷ JIRI PETRAK,⁷ LUDEK CERVENKA,^{5,6}
AND DAVID SEDMERA^{1,2}

¹Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Institute of Anatomy,
U nemocnice 3, 12800 Prague 2, Czech Republic

²Institute of Physiology, Department of Cardiovascular Morphogenesis, Academy of
Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic

³Department of Radiology of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital,
Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, U Nemocnice 2, Prague 2,
Czech Republic

⁴Department of Cardiology, Institute of Clinical and Experimental Medicine-IKEM,
Videnska 1958/9, 14021 Prague 4, Czech Republic

⁵Center for Cardiovascular Research, Institute of Clinical and Experimental
Medicine-IKEM, Videnska 1958/9, 14021 Prague 4, Czech Republic

⁶Center of Experimental Medicine, Institute of Clinical and Experimental Medicine-IKEM,
Videnska 1958/9, 14021 Prague 4, Czech Republic

⁷Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Institute of Pathological
Physiology, U nemocnice 5, 12800 Prague 2, Czech Republic

ABSTRACT

Chronic volume overload leads to cardiac hypertrophy and later to heart failure (HF), which are both associated with increased risk of cardiac arrhythmias. The goal of this study was to describe changes in myocardial morphology and to characterize arrhythmogenic substrate in rat model of developing HF due to volume overload. An arteriovenous fistula (AVF) was created in male Wistar rats between the inferior vena cava and abdominal aorta using needle technique. Myocardial morphology, tissue fibrosis, and connexin43 distribution, localization and phosphorylation were examined using confocal microscopy and Western blotting in the stage of compensated hypertrophy (11 weeks), and decompensated HF (21 weeks). Heart to body weight (BW) ratio was 89% and 133% higher in AVF rats at 11 and 21 weeks, respectively. At 21 weeks but not 11 weeks, AVF rats had pulmonary congestion (increased lung to BW ratio) indicating presence of decompensated HF. The myocytes in left ventricular mid-myocardium were significantly thicker (+8% and +45%) and longer (+88% and +97%). Despite extensive hypertrophy, there was no excessive fibrosis in the AVF ventricles. Distribution and localization of connexin43 were similar between groups, but its phosphorylation was significantly lower in AVF hearts at 21st week, but not 11th week, suggesting that HF,

Grant sponsor: Ministry of Education, Youth and Sports; Grant numbers: VZ 0021620806, 1M0510, 1M0538, LC06044 and 1M6798582302; Grant sponsor: Academy of Sciences of the Czech Republic; Grant number: AV0Z50110509; Grant sponsor: Grant Agency of the Czech Republic; Grant numbers: 304/08/0615 and 305/09/1390; Grant sponsor: Ministry of Health of the Czech Republic; Grant numbers: MZO-00023001 and NS10497-3/2009.

*Correspondence to: Jiri Benes Jr., Institute of Anatomy, U nemocnice 3, 12800, Prague 2, Czech Republic.
E-mail: jiri.benes2@lf1.cuni.cz

Received 15 January 2010; Accepted 9 September 2010
DOI 10.1002/ar.21280
Published online 2 November 2010 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).

rather than hypertrophy contributes to the connexin43 hypophosphorylation. In conclusion, volume overload leads to extensive eccentric hypertrophy, but not to myocardial fibrosis. Increased vulnerability to arrhythmia in this HF model is possibly related to gap junction remodeling with hypophosphorylation of connexin43. *Anat Rec*, 294:102–111, 2011. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Key words: cardiac hypertrophy; heart failure; connexin43; rat

The increase in volume loading of the heart due to valve insufficiency or arteriovenous fistula (AVF) causes dilation of cardiac chambers and cardiac hypertrophy (Ford, 1976). It is believed that this process is due to cardiomyocyte elongation and hypertrophy that compensate volume overload and normalize wall stress (Grossman et al., 1975). Despite cardiac output being often increased (such as in the case of chronic arteriovenous fistula–AVF), substantial part of stroke volume is shunted or recirculated and is not contributing to systemic perfusion. Diminished systemic perfusion leads to redistribution of cardiac output and neurohumoral activation. When compensatory mechanisms become inadequate, overt heart failure (HF) develops (Hood et al., 1968) in a way similar to other models of LV hypertrophy–HF transition (Hatt et al., 1979; Legault et al., 1990; Ruzicka et al., 1993; Ryan et al., 2007).

Regardless its etiology, cardiac hypertrophy is associated with increased incidence of potentially life-threatening ventricular arrhythmias (Artham et al., 2009) and is one of the strongest risk factors for sudden cardiac death (Haider et al., 1998). The mechanisms of arrhythmias in eccentric hypertrophy due to volume overload are known less than in cardiac hypertrophy due to pressure overload or chronic myocardial infarction. Arrhythmogenesis is often linked to increased electrical heterogeneity of myocardial tissue and slowed impulse conduction (Shah et al., 2005). The involved mechanisms consist of myocardial fibrosis, changes in cell and tissue architecture, membrane excitability, and alterations of gap-junctional coupling (Libby et al., 2008). Gap junctions are required for electrical impulse propagation and synchronous contraction in the healthy heart and their alterations might contribute to abnormal conduction and thus be a substrate for arrhythmia (von Olshausen et al., 1983; Kligfield et al., 1987; Kostin et al., 2003; Wiegerinck et al., 2008). The main protein forming gap junctions in rat ventricular myocardium is connexin43 (Sohl and Willecke, 2004). Changes in amount and in localization of connexin43 have been reported in the diseased myocardium (Severs et al., 2004). Some of the previous studies demonstrated a reduction in connexin43 levels in left ventricles of transplant patients with end-stage HF (Dupont et al., 2001). Lateralization of connexin43 from intercalated discs to lateral membrane of myocytes occurs in experimentally induced hypertrophy of right and left ventricle of the rat (Uzzaman et al., 2000; Emdad et al., 2001). Apart from alterations in connexin43 levels, the dephosphorylation of connexin43 was described during several pathological states, including myocardial ischemia (Beardslee et al., 2000; Burstein et al., 2009). Taking all this into an account, new antiar-

rhythmic drugs targeting function of gap junctions are developed, with rotigaptide, a selective gap junction modifier, as an example (Haugan et al., 2006).

In our study, HF in rats was induced by AVF. Similar volume overload HF models were created also by other groups in dogs (Legault et al., 1990) and rats (Hatt et al., 1979; Ruzicka et al., 1993; Ryan et al., 2007). However, no previous study characterized cardiac morphology at two distinct phases of HF development. The main purpose of this study was thus to provide morphological characteristics of the AVF experimental rat HF model induced by volume overload with a focus on abnormalities in myocardial tissue potentially contributing to arrhythmogenesis, such as fibrosis and connexin43 distribution.

MATERIAL AND METHODS

Animals

The rats were kept in air-conditioned animal facility on a 12-hr/12-hr light/dark cycle. Throughout the experiments the rats were fed a normal salt, normal protein diet (0.45% NaCl, 19–21% protein) produced by SEMED (Prague, Czech Republic) and had free access to tap water. The rats were weighted weekly. Studies were made according to Animal Protection Law of the Czech Republic (311/1997) and were approved by the Ethic Committee of the Institute of Clinical and Experimental Medicine (Prague, Czech Republic).

Male Wistar rats weighting 300–350 g were used for this study and the changes were evaluated in two intervals following the experimental procedure, after 11 and 21 weeks. Some of the animals died after the surgery, this early mortality (≤ 7 days) occurred mostly within the first 48 hr and was about 13%. Another 5% of animals with AVF died prior to the end of experiment. All animals that died during the course of experiment were excluded from the study. Some of the animals showed milder signs of incipient HF (lethargy, difficult breathing, cyanosis, piloerection), 65% after 11 weeks and 80% after 21 weeks of volume overload. During hemodynamic measurements of LV intraventricular pressure with 2F Millar catheter (data not shown), we observed in ACF rats frequent nonsustained polytopic ventricular ectopy. Approximately in 10% of ACF rats, these manipulations led to sustained ventricular tachycardia degenerating into ventricular fibrillation (VF). In contrast, no complex ectopy or VF was observed in control rats. For quantitative analysis we used seven AVF rats that were sacrificed 11 weeks after the surgery (plus six sham-operated controls at this time point) and seven AVF rats sacrificed

TABLE 1. Changes in weight of internal organs of AVF and Sham-operated rats

Weight (g)	Changes at the organ level							
	11 weeks				21 weeks			
	AVF (n = 7)	Sham (n = 6)	Difference	Statistics (<i>t</i> = test)	AVF (n = 7)	Sham (n = 8)	Difference	Statistic s (<i>t</i> -test)
Body	482 ± 33	465 ± 17	+ 3.5%	<i>P</i> = 0.289	500 ± 43	487 ± 42	+ 2.6%	<i>P</i> = 0.597
Heart	2.52 ± 0.32	1.29 ± 0.09	+ 95.7%	<i>P</i> = 1 × 10 ⁻⁶	2.52 ± 0.34	1.05 ± 0.08	+ 140%	<i>P</i> = 6 × 10 ⁻⁷
Ventricles	2.05 ± 0.29	1.04 ± 0.08	+ 96.2%	<i>P</i> = 6 × 10 ⁻⁶	2.02 ± 0.27	0.91 ± 0.06	+ 123%	<i>P</i> = 7 × 10 ⁻⁷
Atria	0.47 ± 0.10	0.24 ± 0.05	+ 94%	<i>P</i> = 3 × 10 ⁻⁶	0.49 ± 0.14	0.14 ± 0.02	+ 246%	<i>P</i> = 1 × 10 ⁻⁴
Lungs	2.07 ± 0.32	1.64 ± 0.19	+ 26.2%	<i>P</i> = 0.014	2.7 ± 0.56	1.68 ± 0.27	+ 61.3%	<i>P</i> = 0.002
Liver	15.30 ± 2.80	15.02 ± 1.67	+ 1.8%	<i>P</i> = 0.838	15.88 ± 2.65	14.25 ± 1.10	+ 11.4%	<i>P</i> = 0.189
Kidneys	1.34 ± 0.12	1.44 ± 0.11	-7.1%	<i>P</i> = 0.226	1.24 ± 0.10	1.27 ± 0.10	-2.25%	<i>P</i> = 0.481
HBWR	5.23 ± 0.54	2.77 ± 0.17	+ 88.9%	<i>P</i> = 4 × 10 ⁻⁷	5.02 ± 0.51	2.16 ± 0.11	+ 133%	<i>P</i> = 4 × 10 ⁻⁸

HBWR, heart to body weight ratio.

Data are presented as mean ± SD.

21 weeks after the surgery (plus eight sham-operated controls).

Aortocaval Shunt

Aortocaval fistula was created by the method described by Garcia and Diebold (1990). On the day of surgery, anesthesia was induced by intraperitoneal application of ketamine and midazolam. The abdomen was opened through a midline section, intestines moved upwards and the aorta and inferior vena cava were exposed in the retroperitoneum. Using 1.2 mm needle (Becton-Dickinson), the abdominal aorta was pierced into inferior vena cava between renal artery and bifurcation. The needle was removed after clamping the aorta above and applying acrylic tissue glue to the puncture site. After 3 min, the clamp was removed and the functionality of the shunt was verified by pulsation of the inferior vena cava. Sham-operated rats underwent the same procedure without needle puncture.

Since the fistula have spontaneously closed in some operated animals, only rats with visually-verified fistula patency at the termination and heart to body weight (BW) ratio over 4 g/kg were used for quantitative morphological evaluation.

Morphological Examination

At 11 and 21 weeks after AVF procedure, rats were anesthetized with intraperitoneal phenobarbital application, sacrificed by exsanguination and their organs were weighted. Beating heart was excised and the coronary tree was immediately orthogradely perfused with 10 mL ice-cold St. Thomas cardioplegia solution. The hearts were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS) and ran through ascending series of saccharose prior to embedding into Tissue-Tek. The blocks were cut on cryomicrotome at 12 μm thickness.

Guide series were stained by hematoxylin-eosin with alcian blue using usual techniques. Sister sections were stained by the following primary antibodies: cardiac α-actinin (monoclonal mouse antibody, Sigma, Clone EA-53, #A7811, 1:500), connexin43 (polyclonal rabbit antibody, Sigma, #C6219, 1:200), and phosphoconnexin43 (polyclonal rabbit antibody, Cell Signaling Technology, #3511, 1:100).

The staining was performed in dark humid chamber. On Day 1, the sections were blocked in normal goat serum (1:20) and in 1% bovine serum albumin in (PBS) for 20 min. Primary antibody was then applied overnight. On Day 2, the sections were washed in three changes of PBS, and species-appropriate secondary antibody conjugated with Rhodamine Red (Jackson Immuno Research) was applied for 4 hr in the dark. After washing in PBS again was applied solution of wheat germ agglutinin (WGA) conjugated with Alexa 488 (1:50, Invitrogen, #W11261) followed by three washes in PBS. WGA is a lectin, which binds to basal membranes and extracellular matrix and thus can be indirectly used also for detection of fibrosis. Finally, the nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (1:100,000 diluted in 0.1% Triton-X in distilled water, Sigma-Aldrich, #86140-5). In the end, the sections were washed with distilled water and dehydrated in ascending series of ethanol (70%–100%), cleared in xylene, and mounted in Depex medium.

Western Blotting

Left ventricle samples from AVF and sham-operated animals (pools of six hearts per group) were pulverized under liquid nitrogen and extracted in NHT buffer (140 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1.5% Triton X-100, pH 7.4) containing Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 (Sigma-Aldrich, Czech Republic). Samples (40 μg) were combined with SDS loading buffer containing DTT, boiled for 5 min and resolved by SDS-PAGE on precast 4%–15% gradient minigels (Bio-Rad, CA) in Tris-Glycine buffer. Electrophoresis was performed in quadruplicate at constant voltage for 30 min at 45 V per gel, and then at 90 V per gel until the dye front reached the gel bottom. Proteins were then transferred to 0.45 μm PVDF membranes (Millipore, MA) in semi-dry blotter (Hoeffer, Canada) at 0.8 mA/cm² of membrane for 80 min. Membranes were incubated with blocking buffer containing PBS and 0.1% TWEEN 20 for 2 hr. As primary antibodies, rabbit anti-connexin (1:6,000, Sigma-Aldrich) and anti-phospho-connexin (1:1,000, Cell Signaling Technology) antibodies were used. After thorough washing in blocking buffer, secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:16,000, Sigma-Aldrich) was applied for 1 hr. After washing, signal was detected using Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz

Biotechnology, CA) and membranes were exposed to X-ray films (Kodak, Czech Republic). Membranes were scanned on GS-800 calibrated densitometer (Bio-RAD) and the signal was quantified by the Quantity One software (Bio-Rad).

Quantitative Evaluation and Statistical Analysis

The quantitative analysis is based upon numbers of animals indicated in Tables 1 and 2. In total, 14 AVF and 14 sham hearts were analyzed.

Image acquisition was performed on Leica SPE confocal microscope (immunofluorescence) and Olympus BX51 microscope with DP70 CCD camera (transmitted light). Six optical sections per each sample spaced by one micron were projected using maximum intensity algorithm. The images were analyzed using standard imaging software (Adobe Photoshop, ImageJ).

Myocyte width in midmyocardium and subendocardium was evaluated on sections stained with anti α -actinin antibody and WGA. Cell length and differences in connexin43 levels and distribution was evaluated on anti-connexin43 staining with WGA. For evaluation of phosphorylated connexin43 changes, we used specific phosphorylated connexin43 antibody. Fibrosis was evaluated using WGA staining and confirmed by Picrosirius Red staining examined in polarized light.

The cell width and length in midmyocardium was measured by averaging 10 cell transverse diameters from each confocal image. Cell width in papillary muscle was calculated from cross sectional areas of myocytes, assuming circular geometry, using also 10 cells from each image. To avoid underestimation, only cells in which nucleus was present were measured.

The distribution and localization of connexin43 and phosphorylated connexin43 was measured by comparing red channel (representing connexin43 or phosphorylated connexin43) and green channel (representing myocyte cytoplasmic autofluorescence) of confocal images using threshold and area measurements in ImageJ. The same procedure was used for evaluation of fibrosis on WGA pictures.

All data are presented as a mean \pm SD. Differences between groups were statistically analyzed by unpaired Student's two-tailed t-test. Differences were considered statistically significant at a value of $P < 0.05$.

RESULTS

Organ Changes After AVF

We measured BW, weight of the whole heart, ventricles, and atria separately as well as weight of some other organs (lungs, liver, kidneys) on both sampling intervals. Changes in the whole animal BW were not significant (Table 1). The heart weight was considerably increased (by 96% after 11 weeks and by 140% after 21 weeks of volume overload). The contribution of individual chambers to total heart weight increase was also evaluated. In addition to heart weight increase, the changes can be better expressed by heart to BW ratio. This ratio was significantly increased at both stages, clearly demonstrating cardiac hypertrophy.

Concerning the other organs, the lungs were significantly heavier (by 26% after 11 weeks and by 61% after

TABLE 2. Quantification of cellular changes in the heart of AVF rats with heart failure

	Changes in the heart						Statistics (<i>t</i> -test)
	After 11 weeks			After 21 weeks			
	AVF (n = 7)	Sham (n = 6)	Difference	AVF (n = 7)	Sham (n = 8)	Difference	
Wall thickness (mm)	29.99 \pm 5.87	22.56 \pm 3.00	+ 33%	46.02 \pm 5.61	25.05 \pm 1.53	+ 83.7%	$P = 3 \times 10^{-6}$
Left ventricle	15.51 \pm 1.76	9.81 \pm 1.30	+ 58.1%	30.05 \pm 4.44	12.23 \pm 1.96	+ 146%	$P = 3 \times 10^{-6}$
Right ventricle	11.03 \pm 0.77	10.18 \pm 0.82	+ 8.3%	14.20 \pm 2.62	9.78 \pm 1.02	+ 45.1%	$P = 0.003$
Myocyte size (Mm)	29.65 \pm 4.57	24.96 \pm 2.42	+ 18.8%	28.87 \pm 4.41	26.15 \pm 3.52	+ 22.5%	$P = 0.249$
Width in LV midmyocardium	117.43 \pm 8.07	62.26 \pm 6.78	+ 88.6%	115.83 \pm 14.97	58.77 \pm 1.84	+ 97.0%	$P = 0.013$
Width in LV papillary muscle	14.39 \pm 0.86	10.14 \pm 0.25	+ 42.0%	13.94 \pm 1.71	10.43 \pm 0.80	+ 33.6%	$P = 0.001$
Length in LV midmyocardium	114.73 \pm 6.92	85.73 \pm 3.01	+ 33.8%	116.41 \pm 5.26	89.65 \pm 4.51	+ 29.8%	$P = 2 \times 10^{-4}$

Data are presented as mean \pm SD.

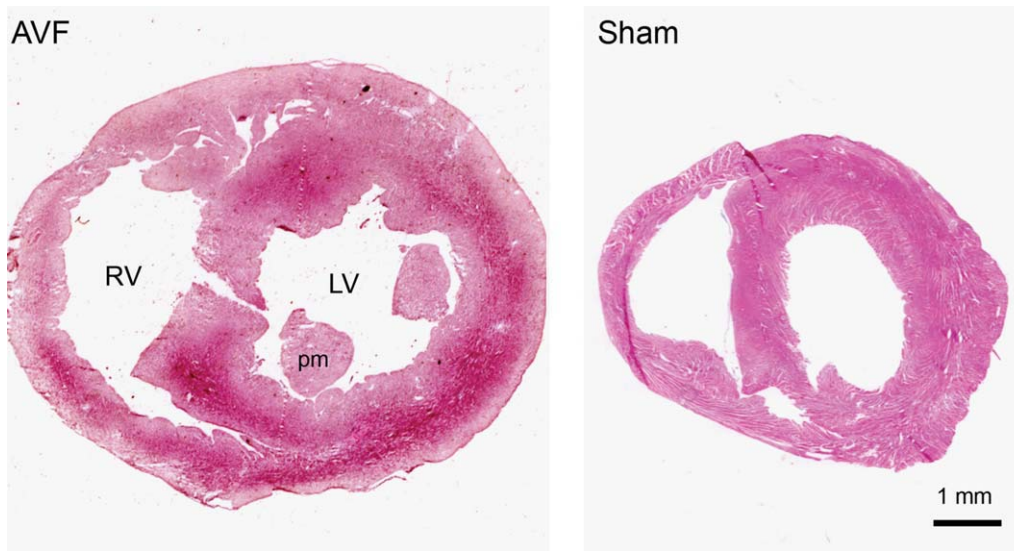


Fig. 1. Hematoxylin-eosin staining of frozen sections of AVF and sham-operated rat hearts. Note gross increase in heart size. LV, left ventricle, pm, papillary muscle, RV, right ventricle.

21 weeks of volume overload) which corresponds to development of HF and to congestion in the pulmonary circulation. Weight of liver and kidneys was not significantly changed.

Ventricular fibrosis was also evaluated from WGA confocal images and no significant changes were found. The ratio of green channel area (WGA staining, thus showing membranes and fibrotic tissues around myocytes) to area of all tissues on the section in AVF was $25.98\% \pm 6.27$; and in controls $28.62\% \pm 3.87$ ($P = 0.39$). This data was obtained from the hearts with decompensated HF (21 weeks after surgery), and confirmed by Picrosirius Red staining that showed likewise no differences between AVF and sham ventricles (data not shown).

Cellular Changes in the Ventricles

For understanding of morphological changes in the heart, we measured free wall thickness of the left and right ventricle (Fig. 1) and myocyte dimensions in the left ventricular myocardium (Table 2).

Both ventricles showed hypertrophy (Fig. 2) and its extent increased with time of volume overload, which can be clearly seen by the dynamics of wall thickness increase in both ventricles (Table 2). Right ventricle was more affected by volume overload from aortocaval shunt than the left ventricle (after 21 weeks of volume overload the left ventricle wall thickness increased by 84% vs. 146% for the right ventricle).

The thickness and the length of myocytes were measured on confocal images in midmyocardial layer of both ventricles and in the papillary muscle of the left ventricle. The hypertrophy in the midmyocardial layer was more extensive than in the subendocardium. The cells in the papillary muscles also underwent hypertrophy (Fig. 2) but the increase was smaller (by 19% after 11 weeks and by 23% after 21 weeks of volume overload, $P = NS$). The cell thickness in midmyocardial layer increased significantly (by 8% and 45%, respectively) in both ven-

tricles with developing ventricular hypertrophy. Cell length in midmyocardium increased in both stages by 90% in the left ventricle and by 30% in the right ventricle, which indicates dilation of the ventricles (Table 2).

Connexin43 Expression

Using immunofluorescence staining and confocal microscopy imaging, we have qualitatively assessed total amount of connexin43 in myocytes, evaluated the distribution of connexin within the cells as well as the differences in phosphorylated isoform of connexin43. The measurements were performed in left ventricular myocardium 21 weeks after aortocaval fistula creation.

We found no notable difference in total amount of connexin43 per cell (Fig. 3). A small decrease could be seen in connexin43 levels during volume overload. The localization of connexin43 in the cell is an important determinant of possible arrhythmogenesis. We measured percentage of connexin43 in intercalated discs from the total amount of connexin43 in the cell (which can be localized also on the sides of cells and in the cytoplasm). We found no significant difference between AVF and sham-operated rats. AVF rats had 33.7% of connexin43 fluorescence situated in intercalated discs, sham-operated rats had 35.5% of connexin43 in the discs ($P = 0.8$).

Phosphorylation of connexin43 is important for functionality of this protein in gap junctions. We thus evaluated the amount of phosphorylated connexin43 in left ventricular myocardium on both stages and found that there was no apparent decrease in phosphorylated isoform of connexin43 in AVF group in the stage of compensated cardiac hypertrophy (11 weeks after creating the fistula). At the stage of decompensated HF (21 weeks after creating the fistula), however, the decrease in expression of the phosphorylated isoform was notable (Fig. 3).

The amount of total and phosphorylated connexin43 were quantified by western blotting on pools of 6 AVF

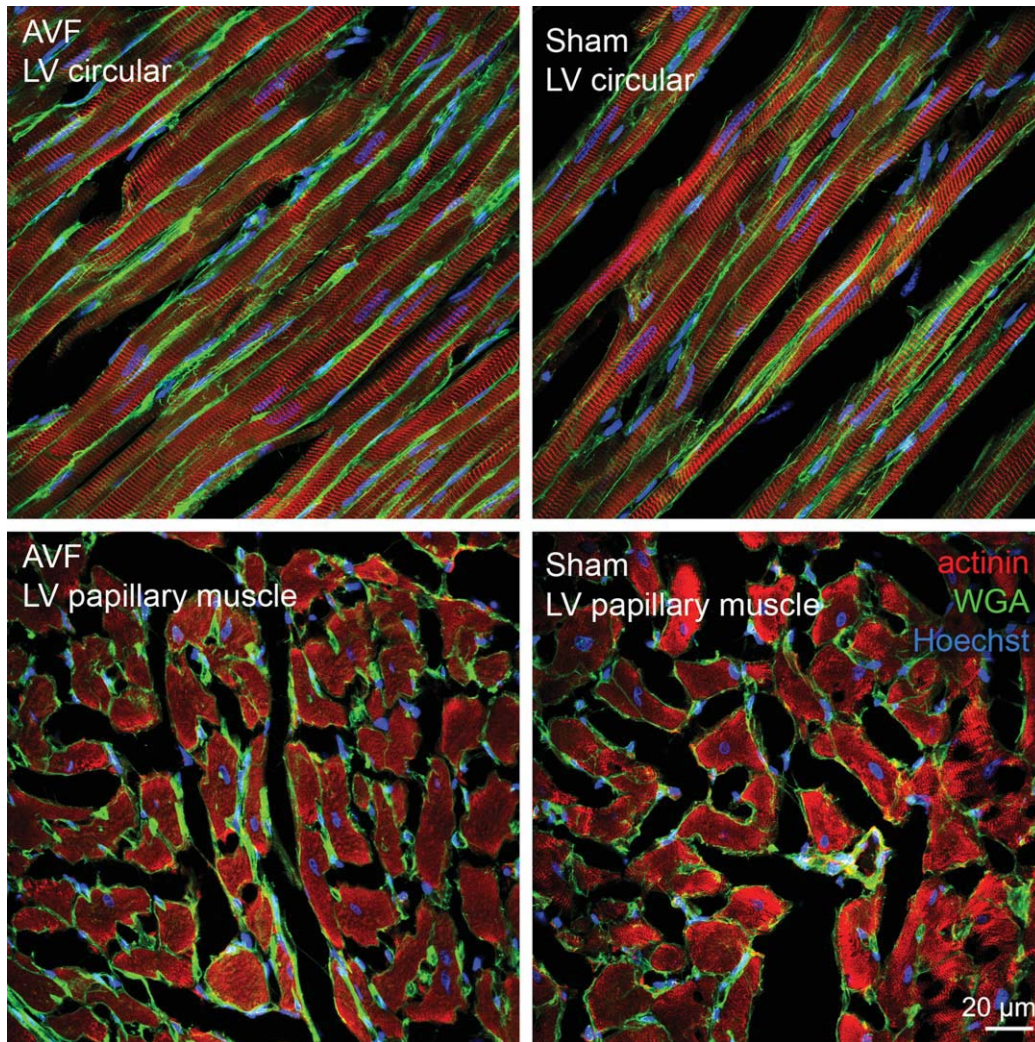


Fig. 2. Confocal micrographs of left ventricular midmyocardium (upper panels) and cross sections through papillary muscles of left ventricle (lower panels). Note increase in transverse myocyte diameter in the AVF hearts. For values of myocyte width please see Table 2. There is no increase in fibrosis (WGA, green staining).

and 6 sham samples at 21 weeks. There was over 60% decrease in both isoforms (Fig. 4).

DISCUSSION

Aortocaval fistula results in volume overload, which induces cardiac dilation and hypertrophy. Over time, this leads to HF and increased mortality. In our study, rats at 21 weeks demonstrated not only hypertrophy, but also decompensated HF phenotype with increased normalized weight of lungs and HF symptoms. In the failing rats, there was an increased heart weight, heart to BW ratio, and thickness of ventricular walls. The hypertrophy was present already after 11 weeks and the heart weight did not change with the time of volume overload, which shows that hypertrophy as a compensatory mechanism evolving early after creation of AVF. However, this compensated state became decompensated over

time, resulting in development of congestive HF, as was demonstrated by increasing lung weight. The dynamic nature of changes during development of HF was best exemplified by increased heart to BW ratio, which was increased by almost 90% at 11 weeks but by more than 130% at 21 weeks in comparison with aged-matched sham controls (Table 1). Since the total weight of the animals did not change significantly, other organs have to shrink; this indicates increased catabolic state characteristic of HF and documented in a separate functional and metabolic study (Benes et al., submitted) by decreased fat reserves. At present, we are evaluating chronic changes in animals that have been in HF for 1 year to extend the longitudinal aspect of this study and to see the combined effects of HF and ageing. Cardiac dilation and hypertrophy were confirmed by increased size of cardiomyocytes, which were enlarged in both longitudinal and transverse diameters. Cardiomyocytes in

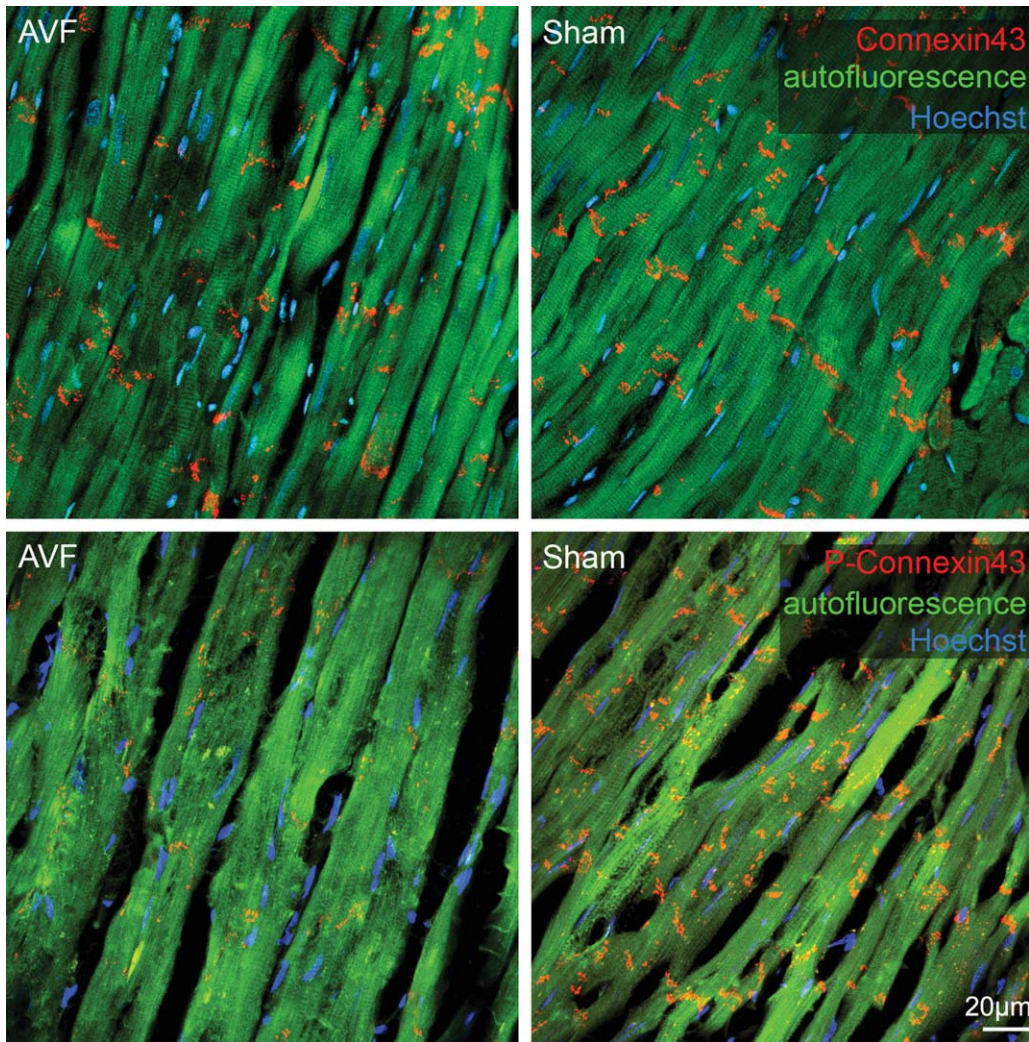


Fig. 3. Distribution and phosphorylation of connexin43 in left ventricular myocardium. Upper panels show confocal images of connexin43 distribution. Lower panels show confocal images of phosphoconnexin43 localization in left ventricular myocardium.

midmyocardium were more affected than those in papillary muscles. This is in contrast with asymmetric cellular hypertrophy in pressure overload model (Campbell et al., 1989), where most pronounced hypertrophy was found in the subendocardial layers. The interesting discrepancy between continued increase in ventricular wall thickness that could not be explained by increased myocyte dimensions, especially in the right ventricle (Table 2) suggests, in the notable absence of fibrosis, that there could be activation of myocyte (or resident stem cells) proliferation, that was recognized previously in decompensated HF in humans (Kajstura et al., 1998).

AVF model of volume overload induced HF had been described before. However, no previous study described these changes in decompensated HF stage. The principal new findings of our study include distinction between compensated (11 weeks) and decompensated (21 weeks) stage of HF, complete morphological evaluation of possible arrhythmogenic substrates (cell size and shape, connexin expression and distribution, fibrosis) and pro-

viding links between these findings and ventricular arrhythmias (Fig. 5). Our data thus provide solid morphological grounds for ongoing functional, metabolic and pharmacological studies in this model. Ruzicka et al. used this model for describing renin-angiotensin system and effects of angiotensin converting enzyme inhibitors in situation of volume overload (Ruzicka et al., 1993). Ryan et al. described remodeling process induced by bradykinin (Ryan et al., 2007). Study of Hatt et al. (1979) is closest to our morphological approach. Hatt et al. measured cells in failing hearts and our study generally corresponds with their findings. Their sampling intervals were 1 and 6 months, so it is not possible to compare exactly our findings with theirs. In their study, the hearts of rats with volume overload increased their weight by 81% after 6 month (compare to our increase by 140% after 21 weeks). They also measured cell width in midwall and in subendocardium and described greater increase in cell width in subendocardium than in midwall, which is in contrast to our data. Generally, the

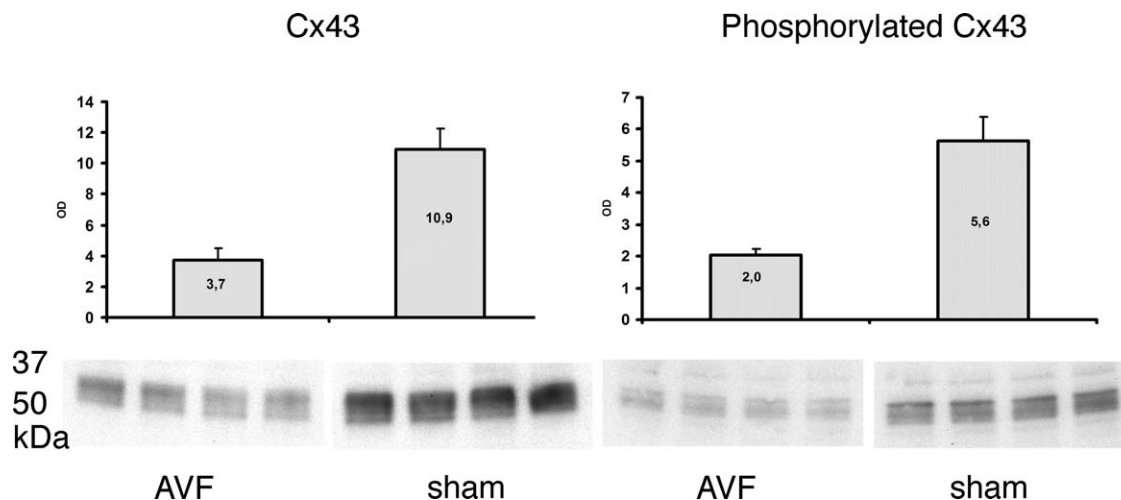


Fig. 4. Western blot on a pool of 6 + 6 samples performed in quadruplicate shows over 60% decrease in both total and phosphorylated connexin43 in the AVF hearts 21 weeks after shunt creation. Values are mean \pm SD.

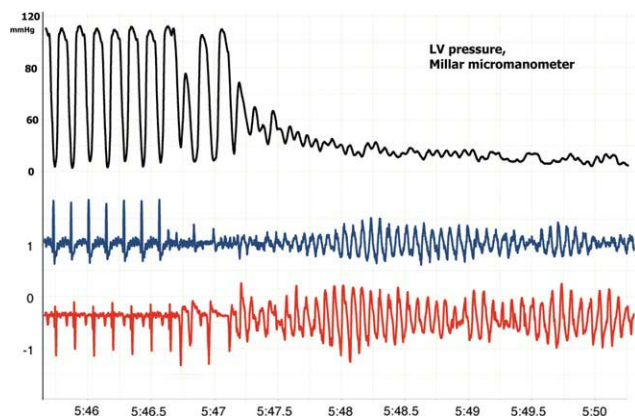


Fig. 5. ECG tracing (2 leads, bottom) and the left ventricular pressure tracing (2F Millar catheter) from a rat with AVF. Several ectopic beats degenerate into fast polymorphic ventricular tachycardia and later to ventricular fibrillation with immediate collapse of the circulation, visible in the pressure channel.

changes they described in the group of rats 6 month after performing the fistula were much milder than our findings. The possible reason for this is that they used female rats and there is known strong gender difference in cardiac response to volume overload—females are far less prone to eccentric remodeling and to the development of HF symptoms (Gardner et al., 2009). Since the methodology of fistula creation was not described in detail in that study, it is also possible that their method of fistula creation may have differed (e.g., different diameter of the needle, no exclusion of animals where AVF closed spontaneously). The reason for different findings in subendocardial myocyte width changes can be explained by the fact that we measured width in papillary muscle from transversal sections through the cells while Hatt et al. measured cells in myocardial wall in transversal sections.

Hypertrophic or failing rat or human hearts have bigger predisposition to develop severe ventricular arrhyth-

mias (von Olshausen et al., 1983; Kligfield et al., 1987). Increased risk of sudden, presumably arrhythmic death was found even in asymptomatic subjects with left ventricular volume overload due to mitral regurgitation (Grigioni et al., 1999). Similarly, we observed increased excitability of hypertrophied AVF hearts, characterized by high frequency of ventricular ectopic beats and bursts of ventricular tachycardia, particularly during intraventricular measurements of pressure using Millar catheter (our unpublished observations). In several AVF animals, this ectopy even degenerated into lethal ventricular fibrillation, which is exceedingly rare in normal rat hearts (Fig. 5). In previous study that examined long-term survival of rats with AVF, 27% of all animals died without preceding HF symptoms (Brower and Janicki 2001), suggesting that arrhythmic sudden cardiac death occurs in substantial proportion of animals with AVF-induced chronic volume overload. Since no excessive collagen accumulation was found in the ventricular myocardium, we suggest that other arrhythmogenic mechanisms than fibrosis might be involved. In our study, we focused on connexin43 changes. Changes in connexin43 can lead to slowing of conduction velocity in ventricular wall, which may create a substrate for re-entry phenomenon (Libby et al., 2008). The main changes described in previous studies were changes in expression, localization, and phosphorylation (Severs et al., 2004). This is not, however, the only possible mechanism. Other contributing factors can be changes in ion channel expression, which can also substantially contribute to arrhythmogenesis (Shah et al., 2005).

In a partial contrast with previous studies of connexin43 changes in HF (Dupont et al., 2001; Emdad et al., 2001; Uzzaman et al., 2000), we found only mild difference in total connexin43 levels by immunohistochemistry (but there was over 60% reduction by Western blot), and the changes in localization were also insignificant. Possible reason for this discrepancy can be differences in HF models or methods used. Dupont et al. described the changes in humans and used Northern blot for quantification, detecting thus mRNA levels

(Dupont et al., 2001). Emdad et al. described HF in rats induced by pressure overload from aortic banding and they used enzymatic separation of myocytes to measure connexin43 levels by immunohistochemistry (Emdad et al., 2001). Recent study of Burstein et al. described changes in dog HF atria and they found also no difference in the amount of connexin43, which corresponds to our immunohistochemistry data (Burstein et al., 2009). Study of Goldfine et al. describes connexin43 changes in volume overload HF model. They found decrease in connexin43 levels in acute state of volume overload HF but when compensatory hypertrophy developed, the amount of connexin43 seemed to normalize (Goldfine et al., 1999). In any case, the absolute levels of connexin43 have to be decreased over 50% to induce significant physiological phenotype per se, as indicated by apparent normality of connexin43 heterozygous mice as well as ventricular arrhythmias leading to sudden cardiac death observed in myocardium-restricted null animals (Gutstein et al., 2001). In this respect, the 60% decreased in total amount of connexin43 found in our Western blot seems biologically sufficiently significant to form (together with changes in cell shape) a proarrhythmogenic substrate, as ventricular arrhythmias were recorded in ~10% of our HF animals.

Phosphorylation of connexin43 can influence conductance, assembly and degradation of gap junctions (Lampe and Lau, 2004; Laird, 2005; Solan and Lampe, 2005). Recent work suggests an important role of connexin43 phosphorylation in HF (Akar et al., 2004; Ai and Pogwizd, 2005). We found greatly decreased phosphorylation of connexin43 in the stage of decompensated HF (21 weeks after operation). The phosphorylation of connexin43 at the earlier stage, when congestive HF was not yet developed (11 weeks after operation), was also slightly decreased but without statistical significance. Thus, our data suggest that the HF and not the hypertrophy itself contribute to the hypophosphorylation. Targeting the phosphorylation status of connexin43 using specific drugs in patients with HF can be a method to prevent development of fatal ventricular arrhythmias.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to express our sincere thanks to Ms. Eva Kluzakova and Ms. Marie Jindrakova for their excellent technical assistance. D. Sedmera is a recipient of the Purkinje Fellowship from the Academy of Sciences of the Czech Republic.

LITERATURE CITED

- Ai X, Pogwizd SM. 2005. Connexin 43 downregulation and dephosphorylation in nonischemic heart failure is associated with enhanced colocalized protein phosphatase type 2A. *Circ Res* 96:54–63.
- Akar FG, Spragg DD, Tunin RS, Kass DA, Tomaselli GF. 2004. Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 95:717–725.
- Artham SM, Lavie CJ, Milani RV, Patel DA, Verma A, Ventura HO. 2009. Clinical impact of left ventricular hypertrophy and implications for regression. *Prog Cardiovasc Dis* 52:153–167.
- Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, Kleber AG, Schuessler RB, Saffitz JE. 2000. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res* 87:656–662.
- Brower GL, Janicki JS. 2001. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H674–H683.
- Burstein B, Comtois P, Michael G, Nishida K, Villeneuve L, Yeh YH, Nattel S. 2009. Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure. *Circ Res* 105:1213–1222.
- Campbell SE, Rakusan K, Gerdes AM. 1989. Change in cardiac myocyte size distribution in aortic-constricted neonatal rats. *Basic Res Cardiol* 84:247–258.
- Dupont E, Matsushita T, Kaba RA, Vozzi C, Coppen SR, Khan N, Kaprielian R, Yacoub MH, Severs NJ. 2001. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33:359–371.
- Emdad L, Uzzaman M, Takagishi Y, Honjo H, Uchida T, Severs NJ, Kodama I, Murata Y. 2001. Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats: prevention by angiotensin II type 1 receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol* 33:219–231.
- Ford LE. 1976. Heart size. *Circ Res* 39:297–303.
- Garcia R, Diebold S. 1990. Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovasc Res* 24:430–432.
- Gardner JD, Murray DB, Voloshenyuk TG, Brower GL, Bradley JM, Janicki JS. 2010. Estrogen Attenuates Chronic Volume Overload Induced Structural and Functional Remodeling in Male Rat Hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298:H497–H504.
- Goldfine SM, Walcott B, Brink PR, Magid NM, Borer JS. 1999. Myocardial connexin43 expression in left ventricular hypertrophy resulting from aortic regurgitation. *Cardiovasc Pathol* 8:1–6.
- Grigioni F, Enriquez-Sarano M, Ling LH, Bailey KR, Seward JB, Tajik AJ, Frye RL. 1999. Sudden death in mitral regurgitation due to flail leaflet. *J Am Coll Cardiol* 34:2078–2085.
- Grossman W, Jones D, McLaurin LP. 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56:56–64.
- Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI. 2001. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res* 88:333–339.
- Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. 1998. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Coll Cardiol* 32:1454–1459.
- Hatt PY, Rakusan K, Gastineau P, Laplace M. 1979. Morphometry and ultrastructure of heart hypertrophy induced by chronic volume overload (aorto-caval fistula in the rat). *J Mol Cell Cardiol* 11:989–998.
- Haugan K, Miyamoto T, Takeishi Y, Kubota I, Nakayama J, Shimojo H, Hirose M. 2006. Rotigaptide (ZP123) improves atrial conduction slowing in chronic volume overload-induced dilated atria. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 99:71–79.
- Hood WP, Jr., Rackley CE, Rolett EL. 1968. Wall stress in the normal and hypertrophied human left ventricle. *Am J Cardiol* 22:550–558.
- Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. 1998. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8801–8805.
- Kligfield P, Hochreiter C, Niles N, Devereux RB, Borer JS. 1987. Relation of sudden death in pure mitral regurgitation, with and without mitral valve prolapse, to repetitive ventricular arrhythmias and right and left ventricular ejection fractions. *Am J Cardiol* 60:397–399.
- Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klovekorn WP, Bauer EP, Schaper J. 2003. Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem* 242:135–144.
- Laird DW. 2005. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochim Biophys Acta* 1711:172–182.
- Lampe PD, Lau AF. 2004. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1171–1186.

- Legault F, Rouleau JL, Juneau C, Rose C, Rakusan K. 1990. Functional and morphological characteristics of compensated and decompensated cardiac hypertrophy in dogs with chronic infrarenal aorto-caval fistulas. *Circ Res* 66:846–859.
- Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Braunwald E, editors. 2008. *Braunwald's Heart Disease*, 8th ed. Philadelphia: Elsevier.
- Ruzicka M, Yuan B, Harmsen E, Leenen FH. 1993. The renin-angiotensin system and volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitor versus angiotensin II receptor blocker. *Circulation* 87:921–930.
- Ryan TD, Rothstein EC, Aban I, Tallaj JA, Husain A, Lucchesi PA, Dell'Italia LJ. 2007. Left ventricular eccentric remodeling and matrix loss are mediated by bradykinin and precede cardiomyocyte elongation in rats with volume overload. *J Am Coll Cardiol* 49:811–821.
- Severs NJ, Coppin SR, Dupont E, Yeh HI, Ko YS, Matsushita T. 2004. Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc Res* 62:368–377.
- Shah M, Akar FG, Tomaselli GF. 2005. Molecular basis of arrhythmias. *Circulation* 112:2517–2529.
- Sohl G, Willecke K. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62:228–232.
- Solan JL, Lampe PD. 2005. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta* 1711:154–163.
- Uzzaman M, Honjo H, Takagishi Y, Emdad L, Magee AI, Severs NJ, Kodama I. 2000. Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 86:871–878.
- von Olshausen K, Schwarz F, Apfelbach J, Rohrig N, Kramer B, Kubler W. 1983. Determinants of the incidence and severity of ventricular arrhythmias in aortic valve disease. *Am J Cardiol* 51:1103–1109.
- Wiegerinck RF, van Veen TA, Belterman CN, Schumacher CA, Noorman M, de Bakker JM, Coronel R. 2008. Transmural dispersion of refractoriness and conduction velocity is associated with heterogeneously reduced connexin43 in a rabbit model of heart failure. *Heart Rhythm* 5:1178–1185.

7.4 Příloha IV

Decreased concentrations of retinol-binding protein 4 in sera of epithelial ovarian cancer patients: a potential biomarker identified by proteomics. Lorkova Lucie, Pospisilova Jana, Lacheta Jan, Leahomschi Sergiu, Zivny Jaroslav, Cibula David, Zivny Jan, Petrak Jiri. Oncology Reports 2012;27(2):318, IF 2,30.

Decreased concentrations of retinol-binding protein 4 in sera of epithelial ovarian cancer patients: A potential biomarker identified by proteomics

LUCIE LORKOVA¹, JANA POSPISILOVA¹, JAN LACHETA², SERGIU LEAHOMSCHI¹, JAROSLAV ZIVNY², DAVID CIBULA², JAN ZIVNY¹ and JIRI PETRAK^{1,3}

¹Institute of Pathological Physiology, and ²Department of Gynecology and Obstetrics, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague; ³Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

Received August 29, 2011; Accepted September 30, 2011

DOI: 10.3892/or.2011.1513

Abstract. Ovarian cancer is the fifth leading cause of cancer death in women. Absence of a reliable biomarker precludes early diagnosis of the disease. To identify new proteins with potential diagnostic or prognostic value for the therapy of ovarian cancer we performed comparative proteomic analysis of sera from ovarian cancer patients and healthy women. We analyzed serum samples from 10 patients diagnosed with epithelial ovarian cancer and 10 age-matched healthy women. To decrease the extremely wide dynamic range of protein concentrations in serum we used combinatorial hexapeptide libraries. Serum samples were then subjected to proteomic 2-DE analysis. Three proteins with differential abundance were found and identified by mass spectrometry: α -1-antitrypsin, apolipoprotein A-IV and retinol-binding protein 4. Identification of α -1-antitrypsin and apolipoprotein A-IV confirms previous studies but the identification of significantly decreased levels of RBP4 in ovarian cancer patients represents a novel observation. We verified the decrease of RBP4 levels in ovarian cancer patient sera by two independent methods and determined absolute RBP4 concentrations in patients and healthy women. We excluded possible non-cancer factors that could be responsible for the observed RBP4 decrease. We propose a connection of RBP4 with epithelial ovarian cancer and advocate the potential of RBP4 as a candidate diagnostic or prognostic biomarker.

Introduction

Epithelial ovarian cancer (EOC) is the fifth leading cause of cancer death in women. While overall 5-year survival is only 16-40%, in patients with early stage (FIGO I) ovarian cancer survival rate is 95% (1,2). Unfortunately, vast majority of the patients is diagnosed in advanced stage disease (FIGO III/IV), mostly because of absence of specific symptoms and by lack of reliable serum markers for early disease. Effective screening tests are yet to be developed.

The most widely used serum marker for ovarian cancer, mucin protein CA125, has low sensitivity, its serum concentration is increased in less than half of early stage patients. Furthermore, its specificity is also insufficient, increased levels have been reported also in patients with benign gynecological diseases, endometriosis, cirrhosis and heart disease (3). Enormous effort has therefore been developed to identify and implement new serum biomarkers with sufficient sensitivity and specificity for detection and monitoring of epithelial ovarian cancer. Several candidate molecules have been discovered (4,5). Unfortunately, none of the identified proteins or peptides proved to be of sufficient sensitivity and specificity as a clinically applicable diagnostic marker.

Comparative proteomic analyses of serum or plasma are, among other obstacles, hindered by extremely high dynamic range of individual protein concentration in serum exceeding 10 orders of magnitude (6). Effective methods to decrease the concentration range of serum proteins are based on either immunodepletion of the most abundant serum/plasma proteins or, more recently, on equalization of protein concentrations by interaction with combinatorial hexapeptide library coupled to beads (7,8). The latter method has gained attention under commercial name ProteoMiner™ and was used in our current study. Equalized samples were then subjected to 2-DE differential proteomic analysis. We identified three proteins that were present in serum of EOC patients in concentrations significantly different than in sera of age-matched healthy women. Two of the proteins have been identified in EOC patients previously. Identification of retinol binding protein 4 (decreased in sera of EOC patients) is a novel observation; therefore its altered concentrations were further tested, verified and quantified in individual serum samples.

Correspondence to: Dr Jiri Petrak, Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, U Nemocnice 5, 120 00 Prague, Czech Republic
E-mail: jpetr@lf1.cuni.cz

Abbreviations: EOC, epithelial ovarian cancer; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; IUCC, International Union against Cancer; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; BMI, body-mass index; RBP4, retinol-binding protein 4; TTR, transthyretin; PBS-T, phosphate-buffered saline with 0.1% Tween-20

Key words: ovarian carcinoma, proteomics, combinatorial hexapeptide libraries, biomarkers, retinol-binding protein, cachexia

Materials and methods

All chemicals were from Sigma-Aldrich, unless stated otherwise. The study was approved by the Ethics Committee of the Charles University in Prague, First Faculty of Medicine (IRB approval IGA MZ CR 1.LF UK 19/05).

EOC patient selection. Serum samples were collected at the Department of Gynecology and Obstetrics of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital after informed consent from both patients and healthy age-matched women after overnight fasting. Patient samples were collected at the time of preliminary diagnosis before surgery and chemotherapy. The diagnosis was confirmed histologically after the surgery and only the samples from patients with confirmed EOC were included in the study. Tumor typing and staging were performed by the Department of Pathology according to the criteria of the International Federation of Gynecologists and Obstetricians (FIGO) and the International Union against Cancer (IUC).

Serum and plasma collection. Blood was collected into BD Vacutainer tubes (BD, USA) with sodium heparin (plasma) and without additives (serum). The tubes were kept at room temperature for 5 min and centrifuged at 1500 x g for 5 min. Collected plasma was then re-centrifuged at 15000 x g for 20 min to remove remaining platelets. The serum and plasma were aliquoted into 2 ml screw cap tubes (Axygen, USA) and stored at -80°C.

Serum equalization - hexapeptide ligand library treatment. Concentration of the most abundant serum proteins was reduced using the ProteoMiner Enrichment Kit (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Pooled sera from control healthy women (controls, n=10) and EOC patients (patients, n=10) were used as a starting material (10 ml each pool). To obtain sufficient amount of equalized sera, 10 depletions were performed from each pooled sample, each depletion with a fresh ProteoMiner column and 1 ml of pooled sera. The procedure was carried out according to the manufacturer's instructions. Serum samples relatively enriched in medium- and low-abundant proteins were eluted and pooled. The combined equalized samples (2.7 ml), were precipitated by 40 ml of cold acetone at -20°C overnight.

Two-dimensional electrophoresis. Precipitated equalized serum protein pellets were dissolved each in 2.8 ml of rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 1% ampholytes (GE, USA) and 0.002% bromophenol blue). Protein concentration was determined and adjusted to 4.4 mg/ml. IPG strips (24 cm, pH 4-7, GE, USA) were rehydrated overnight in 450 µl of the sample, representing 2 mg protein per strip. Six technical replicates were run for each sample.

Isoelectric focusing was performed with a Bio-Rad Protean IEF cell for 80 kVh, with maximum voltage not exceeding 5 kV, current limited to 50 µA per strip and temperature set to 20°C. Strips were equilibrated and reduced in equilibration buffer A (6 M urea, 50 mM Tris pH 8.8, 30% glycerol, 2% SDS and 450 mg DTT per 50 ml of the buffer) for 15 min and then alkylated in equilibration buffer B (6 M urea, 50 mM Tris pH 8.8, 30% glycerol, 2% SDS and 1.125 mg iodacetamide per 50 ml). Equilibrated strips were then placed on the top of 11% SDS-PAGE and secured in place by molten agarose.

Electrophoresis was performed in a Tris-glycine-SDS system using a 12 gel Protean Plus Dodeca Cell apparatus (Bio-Rad) with buffer circulation and external cooling (20°C). Gels were run at constant voltage of 200 V for 6 h. Following electrophoresis gels were washed 3 times for 15 min in deionized water to remove SDS. Washed gels were stained in CBB (Simply Blue SafeStain, Invitrogen, Carlsbad, USA) overnight and then destained in deionized water.

Gel image analysis. Stained gels were scanned with a GS 800 calibrated densitometer (Bio-Rad). Image analysis was performed with Progenesis PG200/PG220 (Nonlinear Dynamics, UK) in semi-manual mode with six gel replicates for each group. Normalization of gel images was based on total spot density, and integrated spot density values (spot volumes) were calculated after background subtraction. Average spot volume values (averages from the all 6 gels in the group) for each spot were compared between the groups. Protein spots were considered differentially expressed if they met both of the following criteria: average normalized spot volume difference >2-fold and statistical significance (p<0.05) of the change determined by the t-test.

MALDI mass spectrometry, protein identification. Differentially expressed proteins were excised from gels, cut into small pieces and washed four times with 25 mM ammonium bicarbonate in 50% acetonitrile. The supernatant was removed and the gel was partially dried in a SpeedVac concentrator. Gel pieces were then reconstituted in a cleavage buffer containing 25 mM ammonium bicarbonate and sequencing grade trypsin (5 ng/ml; Promega, WI, USA). After overnight digestion, the resulting peptides were extracted with 50% ACN/0.1% TFA. Extracted peptide mixture (0.5 µl) was deposited on a steel MALDI target and allowed to air-dry at room temperature. After complete evaporation, 0.5 µl of the matrix solution [α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in aqueous 50% ACN/0.1% TFA (5 mg/ml)] was added. MALDI mass spectra were measured on Autoflex II instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Spectra were acquired in the mass range between ~700 and 3200 Da and calibrated internally using the monoisotopic [M+H]⁺ ions of Peptide calibration standard II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Peak lists in XML data format were created using the flexAnalysis 3.1 program with the SNAP peak detection algorithm. No smoothing was applied, and the maximal number of assigned peaks was set to 50. After peak labeling, all known contaminant signals were manually removed. The peak lists were searched using the MASCOT search engine against the SwissProt 2009_11 database subset of human proteins with the following search settings: peptide tolerance 50 ppm, 1 missed cleavage, fixed carbamidomethylation of cysteine, variable acetylation of protein N-term and oxidation of methionine. No restrictions on protein molecular weight or pI value were applied. Proteins with a Mascot score over the threshold 55 for p<0.05 calculated for the used settings were considered as identified.

Western blotting. Individual serum samples (10 µg of proteins) were combined with SDS loading buffer containing DTT, boiled 5 min and separated on 10% SDS-PAGE minigels in Tris-glycine-SDS buffer. Electrophoresis was performed using

Table I. Details on patients included in the proteomic analysis study.

Patients	Age	BMI ^a	Tumor size	Node involvement	Metastases status	Grade	Histology	Stage	CA125 (U/ml)	RBP4 (μ g/ml)
P1	44	17.2	pT3b	pNx	M0	G3	Serous	III	917	32.3
P2	46	29.7	pT3c	pNx	M0	G3	Serous	III	4100	8.1
P3	49	24.4	pT3b	N0	M0	G2	Serous	III	149	27.8
P4	54	21.5	pT1c	pNx	M0	G1	Mucinous	I	350	32.1
P5	59	25.7	pT1c	pN0	M0	G3	Serous	I	19	45.4
P6	55	21.3	pT1c	pN1	M0	G3	Clear cell	III	318	31.5
P7	56	24.0	pT3c	pN1	M0	G3	Serous	III	1685	35.7
P8	56	27.7	pT3c	pNx	M0	G3	Mixed	III	2500	27.2
P9	58	19.9	pT3c	pN1	M0	G1	Serous	III	592	35.9
P10	59	25.4	pT3c	pN1	M1	G2-3	Serous	IV	364	23.2
Mean \pm SD	53.6 \pm 5.3	23.7 \pm 3.8								

^aBMI, body mass index.

Table II. Details on healthy controls included in the proteomic analysis study.

Healthy controls	Age	BMI ^a	RBP4 (μ g/ml)
C1	44	24.8	51.3
C2	44	24.7	48.8
C3	45	21.7	50.1
C4	46	34.6	45.1
C5	50	22.7	47.7
C6	55	24.7	54.2
C7	56	25.4	40.8
C8	57	31.6	49.5
C9	58	24.7	45.5
C10	58	22.7	43.1
Mean \pm SD	51.4 \pm 5.8	25.8 \pm 4.1	

^aBMI, body mass index.

Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories) at constant voltage for 30 min at 45 V, and then at 90 V until the dye front reached the gel bottom. Proteins were then transferred to 0.45 μ m PVDF membranes (Millipore, MA) in semi-dry blotter (Hoeffer, Canada) at 0.8 mA/cm². Membranes were incubated with PBS-T (phosphate-buffered saline with 0.1% Tween-20) for 2 h. As a primary antibody, mouse anti-RBP4 (Sc-69795, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluted 1:500 in PBS-T or rabbit anti-transferrin (Sigma) diluted 1:1000 was added for 1 h. After thorough washing with PBS-T, secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibody or goat anti-rabbit IgG antibody (both Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:10,000 was added for 1 h. Membranes were thoroughly washed in PBS-T and then in PBS. Signal was developed using Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology) and membranes were exposed to X-ray film

(Kodak, CR), developed and scanned. For detection of human IgG as an internal loading control, the membrane were stripped and re-probed with a swine anti-IgG antibody (Sevapharma a.s., Czech Republic) conjugated with HRP diluted 1:10,000.

RBP4 ELISA. The quantitative determination of human retinol-binding protein 4 (RBP4), α -1-antitrypsin and apolipoprotein A4 concentrations in patient and control sera was performed in triplicates using the Quantikine Human RBP4 immunoassay (R&D Systems, MN, USA), human apolipoprotein AIV ELISA Kit (Millipore, MA, USA) and α -1-antitrypsin Clearance ELISA (Immuno Diagnostik AG, Germany) according to the manufacturer's instructions using ELISA Reader Sunrise (Tecan, Austria).

Measurement of plasma vitamin A. Vitamin A serum levels were determined by HPLC method using ClinRep Complete Kit for vitamins A and E in Plasma (Iris technologies international, Germany) on ECOM HPLC according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis. Statistical significances of normalized optical spot density, values from ELISA tests and retinol measurements by HPLC was determined by Student's t-test. Correlation between variables was determined by Correlation Pearson's coefficient using software Statistica (StatSoft Inc., USA).

Results

Patients and controls. The women enrolled in the study were patients diagnosed with EOC (histologically confirmed) and age-matched healthy women. Average age was 53.6 \pm 5.3 for patients and 51.4 \pm 5.8 for healthy controls. Details are provided in the Tables I and II.

Serum equalization and proteomics. To eliminate potential inter-individual variability, our analysis was performed with

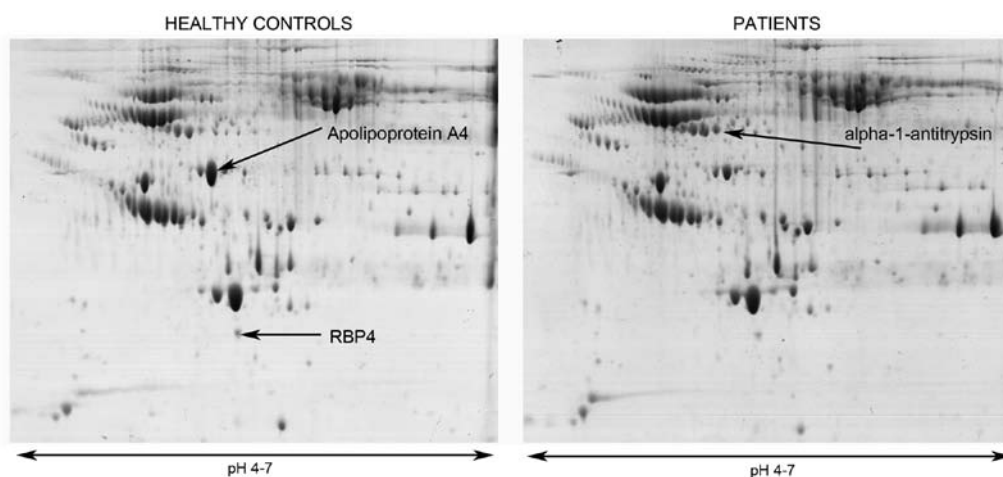


Figure 1. 2-DE analysis of sera after hexapeptide ligand library treatment. 2-DE proteomic analysis of pooled sera from healthy women and EOC patients after ProteoMiner equalization. Twelve 20.5x25-cm gels were analyzed, 6 replicates with pooled patient samples and 6 gels with pooled healthy control samples. Gels were stained, scanned and analyzed by Progenesis PG200/PG220 image analysis software. Three spots of significantly different density between the groups were found and the three proteins were identified by MALDI mass spectrometry using peptide mass fingerprinting (Table III).

Table III. Peptide mass fingerprint identification of proteins with differential concentrations (difference at least 2-fold and statistical significance ($p < 0.01$) in sera of EOC patients.

Sequence coverage ^a (%)	Matched peptides	Mascot score ^b	Swiss-Prot access no. ^c	Protein name	Fold-change
Down-regulated in EOC patients					
58	28	335	P06727	Apolipoprotein A-IV	-2.3
57	11	153	P02753	Retinol-binding protein 4	-2.2
Up-regulated in EOC patients					
42	17	115	P01009	α -1-antitrypsin	2.0

^aSequence coverage is the number of amino acids spanned by the assigned peptides divided by the sequence length. ^bMASCOT score helps to estimate correctness of the individual hit. It is expressed as $-10 \times \log(P)$ where P is the probability that the observed match is a random event.

^cSwissProt access no. is the code under which the identified protein is deposited in the SwissProt database.

pooled serum samples from 10 patients diagnosed with EOC (patients) and 10 healthy age-matched women (controls). Later verifications by Western blotting and ELISA were done with individual serum samples.

The dynamic range of individual protein concentrations in serum was reduced or equalized by interaction of serum proteins with of random hexapeptide library immobilized on beads (ProteoMiner) (8). Using the equalized pooled sera we performed classical 2-DE differential proteomic analysis. Equalization of serum samples with hexapeptide ligand library beads was effective, increasing the number of spots detected in 2-DE gels ~1.5 fold compared to untreated sera in a pilot experiment (data not shown).

Twelve 2-DE gels were analyzed (six replicates with pooled patient samples and 6 gels with pooled healthy control samples). On average we detected 410 protein spots per gel upon colloidal Coomassie staining. Quantitative analysis of normalized spot density using Progenesis PG200/PG220 software revealed statistically significant difference [normalized spot volume difference at least 2-fold and statistical significance ($p < 0.01$)] between the control and patient groups in 3 spots (Fig. 1). All three proteins present in the spots of differential density were identified by

MALDI-TOF mass spectrometry using peptide fingerprint method (Table III). The only up-regulated protein found in sera of ovarian cancer patients has been identified as α -1-antitrypsin. Two proteins with concentrations decreased in patient sera were apolipoprotein A-IV and retinol-binding protein 4 (RBP4).

Retinol binding protein 4 is decreased in EOC patients. α -1-antitrypsin and apolipoprotein A-IV belong among the 40 most abundant plasma proteins, with concentrations 18-40 $\mu\text{mol/l}$ and 3-6 $\mu\text{mol/l}$, respectively (9). We verified the altered concentrations in these two proteins by ELISA in all individual patient and control serum samples. α -1-antitrypsin was significantly ($p=0.015$) upregulated in patients while apolipoprotein A-IV was markedly downregulated ($p=0.0001$) (Fig. 2). Both proteins were identified by proteomic serum analyses as potential ovarian cancer markers previously (10,11) and we therefore focused our attention to retinol binding protein 4 (RBP4) as the novel observation and the potentially more interesting candidate biomarker (concentration in patient serum decreased 2.2-fold, $p < 0.001$).

Since our proteomic analysis was performed with pooled and equalized serum samples, it was necessary to confirm

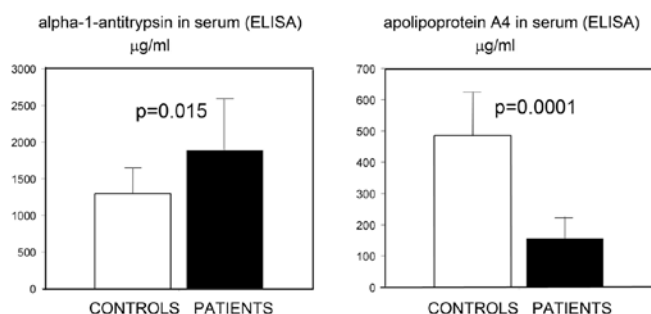


Figure 2. Verification of altered concentrations of α -1-antitrypsin and apolipoprotein A-IV in patient and healthy women sera. Serum concentrations of the proteins were determined in all 10 patient and 10 control serum samples using ELISA kits. α -1-antitrypsin was confirmed to be significantly up-regulated in patients and apolipoprotein A4 was significantly downregulated. Mean values, and statistical significances are shown.

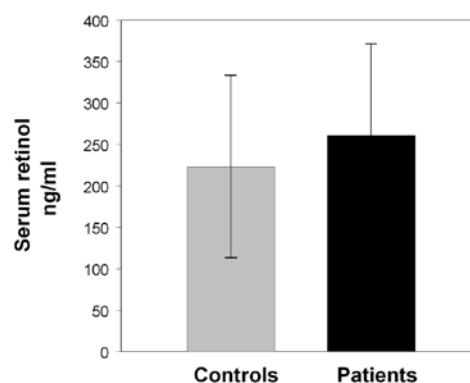


Figure 4. Serum retinol levels in EOC patients and age-matched healthy women. Levels of serum vitamin A (retinol) regulate RBP4 secretion by liver. Decreased retinol levels could affect RBP4 levels in our study. We therefore determined serum retinol levels in all 10 patients and controls by HPLC. Mean values of serum retinol concentrations are shown.

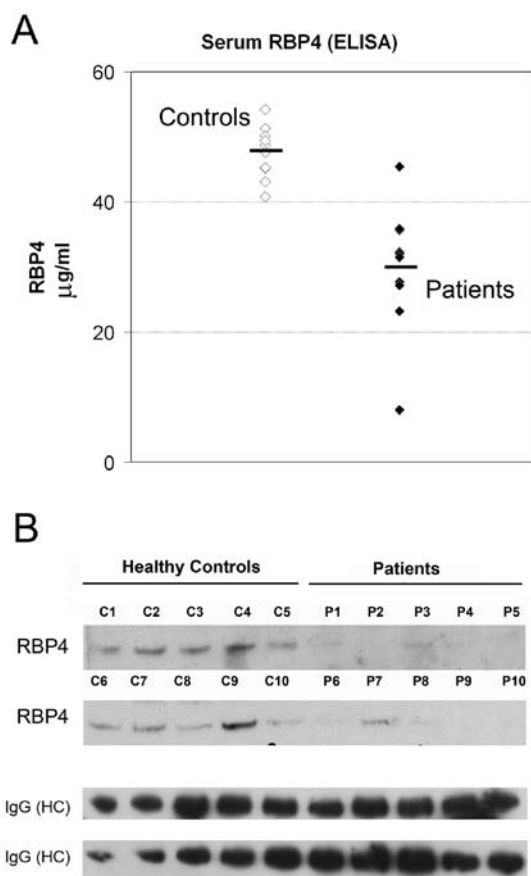


Figure 3. Verification of altered RBP4 concentration. (A) Absolute RBP4 concentrations in serum samples were determined by ELISA. Each measurement represents average value from 3 replicates. Individual serum RBP4 concentrations can be found in Tables I and II. (B) Western blot analysis of RBP4 concentration in individual serum samples was performed. To enable relative comparison between healthy controls and patients five control and five patient samples (10 μ g protein each) were run on each gel and processed simultaneously. Membranes were re-probed with anti-human IgG (HC) as an internal standard.

the altered RBP4 abundance in the individual, crude serum samples before the ProteoMiner equalization. To determine also absolute concentrations of RBP4 we used an ELISA

test to measure RBP4 in the original set of the all individual non-equalized serum samples from 10 EOC patients and 10 controls. As seen in Fig. 3A, ELISA results confirmed decreased serum concentration of RBP4 in the EOC patients. The average RBP4 concentration in patient serum samples (29.9 μ g/ml) was 1.6-fold decreased compared to the control samples (47.7 μ g/ml, $p < 0.007$). Distribution of the RBP4 concentrations suggests that a threshold exists at 38-40 μ g/ml distinguishing healthy age-matched women from most ovarian cancer patients in our cohort. For the individual RBP4 levels see Tables I and II. Serum RBP4 concentrations negatively correlate with ovarian cancer marker CA125 levels in the patient group ($r = -0.715$, $p = 0.015$).

To provide additional verification (using different antibodies, than the one used for ELISA) we performed also RBP4 immunodetection using Western blotting with non-equalized sera from all 10 individual patients in the group and the 10 healthy controls (Fig. 3B). The results also confirmed that RBP4 was significantly decreased in patient samples compared to sera from healthy women. Equal sample loading (10 μ g per lane) was ensured by careful and repeated determination of protein concentration in samples. Internal standard [total human IgG (HC)] is shown only for rough loading control. Due to high individual variability of serum protein levels, there is currently no reliable and generally accepted internal standard for serum samples (similar to β -actin, GAPDH or tubulin used for tissues).

Serum retinol-binding protein 4 is a 21-kDa lipocalin produced by liver, adipocytes, macrophages and some epithelial cells. It is the principal transport protein for retinol (vitamin A). RBP4 levels in blood are normally maintained within narrow limits with one exception. RBP4 secretion by its main producer, liver, is tightly regulated by availability of retinol levels. In vitamin A deficiency is RBP4 retained in liver, upon retinol repletion RBP4 associates with the vitamin and is secreted into blood (12,13). We therefore tested, whether the decreased concentration RBP4 identified in EOC patients could be attributed to decreased retinol levels. We measured retinol levels in individual serum samples of all 10 individual patients and the 10 healthy controls in our study. As seen in Fig. 4, average serum retinol concentration is comparable

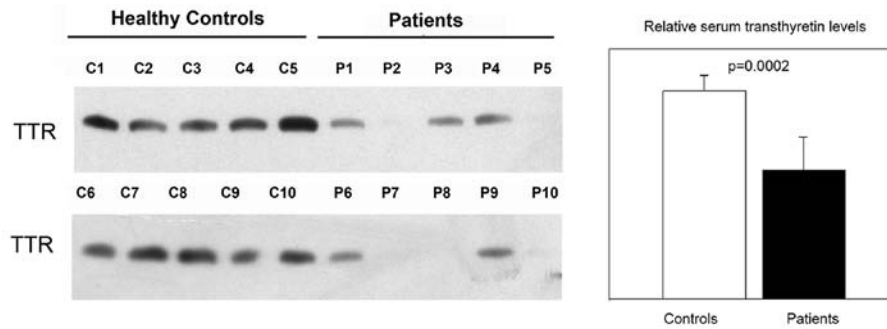


Figure 5. Relative serum transthyretin (TTR) levels in patients and controls. (A) Western blot analysis of TTR concentration in individual serum samples was performed. To enable relative comparison between healthy controls and patients, five control and five patient samples (10 μ g protein each) were run on each gel. (B) Densitometric analysis of the TTR bands from the Western blot analysis.

between the patients and healthy women. Hence, we concluded that the decrease in RBP4 concentration in EOC patients is independent on serum vitamin A levels.

RBP4 is a relatively small protein and to avoid glomerular filtration it associates with transthyretin (TTR) (12). Interestingly, transthyretin has also been identified as down-regulated in blood of ovarian cancer patients and considered as a potential biomarker (14-16). We determined relative serum transthyretin levels in our group of patients and control women and confirmed its down-regulation in our EOC patients (1.6-fold change, $p=0.002$) (Fig. 5). There was no marked correlation of TTR levels with RBP4.

Discussion

RBP4 is secreted by liver, adipose tissue and some epithelia including ovarian and serves as an important transporter of retinol. Retinoids play an important role in fundamental aspects of human physiology such as hematopoiesis, reproduction and cell proliferation. Anti-cancer effect of retinoids was reported long ago (17). Alterations of vitamin A and retinoid homeostasis are found in many tumors. Defects in expression of retinol metabolism genes, namely its crucial components cellular retinol-binding protein 1 (CRBP1) and RBP4, have been previously reported in ovarian cancer and connected with the oncogenic process in a rat model of ovarian cancer (18,19). Moreover, defective conversion of retinol to retinoic acid has been demonstrated in ovarian carcinoma cell lines (20).

The observed decrease in concentration of RBP4 in sera of EOC patients identified here may be theoretically attributed to decreased RBP4 production by ovary. Regrettably, we do not know how much RBP4 ovary contributes to the total circulating RBP4 pool. Considering the fact, that liver and adipose tissue are believed to be the main producers of the circulating RBP4, it remains to be determined whether decreased production of RBP4 in ovary may be reflected in total circulating RBP4 levels in EOC patients.

Alternative hypothesis which considers a systemic process and the liver and/or adipose tissue as a source of the altered RBP4 levels can also be proposed. We demonstrated that levels of retinol are comparable between patients and controls. Decreased levels of RBP4 in patients therefore can not be explained by different retinol availability between the groups. In addition to its role as a vitamin A transporter RBP4 attracted

wide attention as a molecule involved in insulin resistance in mice (21) and as a protein elevated in serum of patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes (insulin resistance) (22). These observations were followed by many other reports, in the wider metabolic area related to insulin and glucose and fat metabolism. RBP4 has thus been shown to be elevated in obese patients with polycystic ovary syndrome (disease associated with insulin resistance) (23) and in patients with renal dysfunction and cardiac disease in type 2 diabetes patients (24). To exclude a potential influence of such a cancer-unrelated factor we verified anamnesis of our healthy controls and patients. None of the women involved in our study had history, or evidence of type 2 diabetes.

What could then be the connection between RBP4 energy metabolism and ovarian cancer? Is it a tumor-specific response or rather a reflection of general metabolic changes taking place in cancer patients? Controversy exists, whether there is a general correlation between RBP4 levels and body-mass index in otherwise healthy women. Whereas some investigators showed lower serum RBP4 levels in healthy lean women compared to obese (22), others demonstrated that there is no such a correlation (25). However, since levels of RBP4 have been reported to decrease in morbidly obese patients after weight loss due to gastric banding surgery (26), we tested a hypothesis that the decreased levels of RBP4 observed in our patient group could be attributed to cancer-induced cachexia. However, comparison of body-mass indexes (BMI) between our patients and healthy controls showed, that there is only a marginal and statistically insignificant ($p=0.126$) BMI decrease in our group of EOC patients and there is no correlation of serum RBP4 concentration with BMI ($r=-0.001$, $p=0.99$). This observation therefore does not support the hypothesis that the reduced RBP4 level in blood of EOC patients is caused by cancer-related decrease in BMI. However, we are aware, that the decrease in serum RBP4 in EOC patients may be an early sign of cancer-triggered nutritional changes before they become apparent by weight loss. Such a marker would be of wider clinical interest because cancer-induced cachexia indeed complicates therapy and has been implicated in up to 20% of cancer-related deaths (27,28).

We identified significantly decreased RBP4 concentrations in sera of EOC patients. We excluded influence of diabetes, serum retinoid levels and BMI as potential causes of the decreased RBP4 levels and we therefore believe that the phenomenon is cancer related. We are fully aware that the low

number of patients enrolled in our proteomic discovery phase of the study must be compensated for in future verification process using large cohorts of patients and controls stratified by stage/grade and other factors.

The decreased RBP4 concentration in sera of EOC patients is either directly connected with altered retinoid metabolism and RBP4 production in ovary or it is a reflection of a more general process involving energy metabolism or other systemic changes. In both cases, the cancer-related information represented by RBP4 serum levels, is of clinical interest and should be evaluated as a potential biomarker.

So far, none of the candidate molecules identified by proteomic analyses of ovarian cancer (10, 11, 14 and many others) have been implemented into clinical practice as a single diagnostic biomarker. However, as demonstrated by recent development, combined informative power of several weak biomarkers can be valuable in clinical decision-making in assessment of ovarian tumors (29). We believe that RBP4 can increase diagnostic performance of such a multivariate biomarker panel in future.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Ministry of Health CR, (IGA MZCR NT12248-5 to J.Z. and NS10300-3 and UHKT No. 023736 to J.P.), from the Ministry of Education, Youth and Sports, CR (VZ 0021620806 to J.Z., LC06044 to J.P. and SVV-2011-262507 to L.L.), from the Grant agency of the Czech Republic (305/09/1390 to J.P.) and Grant agency of the Charles University (GAUK 251180 111210 to Jana Pospislova). Authors would like to thank Milada Kostirova for plasma vitamin A measurements and Ondrej Vit for his assistance with western blotting. Special thanks to Mrtva Ryba.

References

- Heintz APM, Odcicino F, Maisonneuve P, *et al*: Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynaecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 95: S161-S192, 2006.
- Skirnisdottir I and Sorbe B: Prognostic factor for surgical outcome and survival in 447 women treated for advanced (FIGO-stages III-IV) epithelial ovarian carcinoma. *Int J Oncol* 30: 727-734, 2007.
- Moore RG, MacLaughlan S and Bast RC Jr: Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 116: 240-245, 2010.
- Husseinzadeh N: Status of tumor markers in epithelial ovarian cancer has there been any progress? A review. *Gynecol Oncol* 120: 152-157, 2011.
- Narasimhan K, Changqing Z and Choolani M: Ovarian cancer proteomics: Many technologies one goal. *Proteomics Clin Appl* 2: 195-218, 2008.
- Anderson NL and Anderson NG: The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 1: 845-867, 2002.
- Pernemalm M, Lewensohn R and Lehtio J: Affinity pre-fractionation for MS-based plasma proteomics. *Proteomics* 9: 1420-1427, 2009.
- Boschetti E and Righetti PG: The ProteoMiner in the proteomic arena: a non-depleting tool for discovering low-abundance species. *J Proteomics* 71: 255-264, 2008.
- Hortin GL, Sviridov D and Anderson NL: High-abundance polypeptides of the human plasma proteome comprising the top 4 logs of polypeptide abundance. *Clin Chem* 54: 1608-1616, 2008.
- Chen Y, Lim BK, Peh SC, Abdul-Rahman PS and Hashim OH: Profiling of serum and tissue high abundance acute-phase proteins of patients with epithelial and germ line ovarian carcinoma. *Proteome Sci* 6: 20, 2008.
- Dieplinger H, Ankerst DP, Burges A, Lenhard M, *et al*: Afamin and apolipoprotein A-IV: novel protein markers for ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18: 1127-1133, 2009.
- Muto Y, Smith JE, Milch PO and Goodman DS: Regulation of retinol-binding protein metabolism by vitamin A status in the rat. *J Biol Chem* 247: 2542-2550, 1972.
- Peterson PA, Rask L, Ostberg L, Anderson L, Kamwendo F and 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. *J Biol Chem* 248: 4009-4022, 1973.
- Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, *et al*: Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 64: 5882-5890, 2004.
- Kozak KR, Su F, Whitelegge JP, Faull K, Reddy S and Farias-Eisner R: Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics* 5: 4589-4596, 2005.
- Mählek CG and Grankvist K: Plasma prealbumin in women with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Obstet Invest* 37: 135-140, 1994.
- Clarke N, Germain P, Altucci L and Gronemeyer H: Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med* 6: 1-23, 2004.
- Roberts D, Williams SJ, Cvetkovic D, Weinstein JK, Godwin AK, Johnson SW and Hamilton TC: Decreased expression of retinol-binding proteins is associated with malignant transformation of the ovarian surface epithelium. *DNA Cell Biol* 21: 11-19, 2002.
- Cvetković D, Williams SJ and Hamilton TC: Loss of cellular retinol-binding protein 1 gene expression in microdissected human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 9: 1013-1020, 2003.
- Williams SJ, Cvetkovic D and Hamilton TC: Vitamin A metabolism is impaired in human ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 112: 637-645, 2009.
- Yang Q, Graham TE, Mody N, *et al*: Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436: 356-362, 2005.
- Graham TE, Yang Q, Blüher M, *et al*: Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354: 2552-2563, 2006.
- Tan BK, Chen J, Lehnert H, Kennedy R and Rande HS: Raised serum, adipocyte, and adipose tissue retinol-binding protein 4 in overweight women with polycystic ovary syndrome: effects of gonadal and adrenal steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2764-2772, 2007.
- Cabré A, Lázaro I, Girona J, *et al*: Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *J Intern Med* 262: 496-503, 2007.
- Kowalska I, Straczkowski M, Adamska A, Nikolajuk A, Karczewska-Kupczewska M, Oziomek E and Gorska M: Serum retinol binding protein 4 is related to insulin resistance and nonoxidative glucose metabolism in lean and obese women with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 2786-2789, 2008.
- Haider DG, Schindler K, Prager G, Bohdjalian A, Luger A, Wolzt M and Ludvik B: Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1168-1171, 2007.
- Inui A: Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin* 52: 72-91, 2002.
- MacDonald N, Easson AM, Mazurak VC, Dunn GP and Baracos VE: Understanding and managing cancer cachexia. *J Am Coll Surg* 197: 143-161, 2003.
- Ueland FR, Desimone CP, Seamon LG, *et al*: Effectiveness of a multivariate index assay in the preoperative assessment of ovarian tumors. *Obstet Gynecol* 117: 1289-1297, 2011.