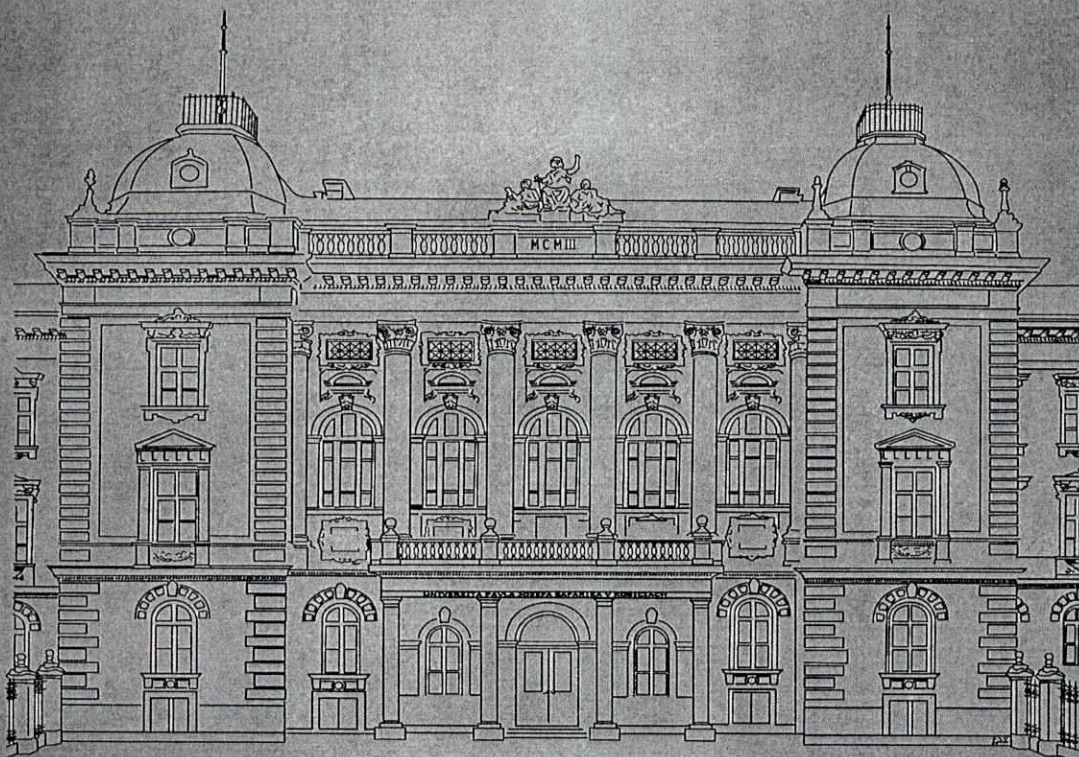


BIOBAG.

ISSN 1337-7817



FOLIA MEDICA CASSOVIENSIA



UNIVERSITAS ŠAFARIKIANA

Tomus 67, No. 1, 2012



FOLIA MEDICA CASSOVIENSIA

Časopis FOLIA MEDICA CASSOVIENSIA publikuje pôvodné vedecké práce, prehľadné referáty, kazuistiky, výskumné správy z oblasti základného, aplikovaného a klinického výskumu v odboroch humánnej medicíny a príbuzných vied. Uverejňuje tiež abstrakty z vedeckých a odborných podujatí spoluorganizovaných UPJŠ LF.

Pokyny pre autorov: <http://www.lf.upjs.sk/foliamedica>

Predseda redakčnej rady	Doc. MUDr. Roman BEŇAČKA, CSc., mim. prof.
Vedecký redaktor	Doc. MUDr. Jozef FIRMENT, CSc.
Redakčná rada	Prof. MUDr. Andrej BÖÖR, CSc. Prof. MUDr. Zuzana GDOVINOVÁ, CSc. Prof. MUDr. Juraj GUZY, CSc. Prof. MUDr. Ján JAKUŠ, DrSc. Prof. MUDr. Pavol JARČUŠKA, CSc. Prof. MUDr. Ján MOŽIŠ, DrSc. Doc. RNDr. Ján SABO, CSc., mim. prof. Dr.h.c. prof. MUDr. Leonard SIEGFRIED, CSc.

FOLIA MEDICA CASSOVIENSIA

Odborný časopis pre lekárske, farmaceutické a biologické vedy

Ročník 67 Číslo 1/2012
ISSN 1337-7817

Vydáva Univerzita Pavla Jozefa Šafárika,
Lekárska fakulta,
Tr. SNP 1, 040 11 Košice
e-mail: tajomnik@lf.upjs.sk
<http://www.medic.upjs.sk>

Vychádza 2x ročne.
Časopis je registrovaný na MK SR pod č.:
EV 3564/09.

Rukopisy a objednávky na adrese:
Redakcia Folia Medica Cassoviensia
UPJŠ LF, Tr. SNP 1, 040 11 Košice
e-mail: foliamedica@lf.upjs.sk
<http://www.lf.upjs.sk/foliamedica>

Tlač: Equilibria, s.r.o., Poštová 13,
040 01 Košice

Cena: 3 € /ks (plus poštovné)

Grafický návrh obálky:
Doc. MUDr. Roman BEŇAČKA, CSc., mim. prof.

Technická a grafická úprava:
Martina Trochanová

Obsah

Krátke vedecké články

Distribúcia nitrergických neurónov v prefrontálnej mozgovej kôre

Natália Hvizdošová, Lenka Tomášová, Adriana Boleková, Dalibor Kolesár, Tatiana Špakovská, Darina Kluchová 5

Prenatálna aplikácia kyseliny retinovej ovplyvňuje embryonálny vývin potkana

Tatiana Špakovská, Adriana Boleková, Květuše Lovásová, Lenka Tomášová, Natália Hvizdošová, Darina Kluchová 8

Proteomická analýza bunkovej línie MCF-7 2D elektroforézou pred a po aplikácii cytostatík v programe PDQuest Advanced

Marianna Trebuňová, Galina Laputková, Ján Sabo, Kamila Lacjaková 12

Difúzne axonálne poranenie mozgu a jeho diagnostika imunohistochemickými metódami

Silvia Farkašová Iannaccone, Daniel Farkaš, Alžbeta Ginelliová, František Longauer 16

Krátke prehľadné články

Fyziológia a inervácia Meibomových žliaz

Adriana Boleková, Lenka Tomášová, Natália Hvizdošová, Darina Kluchová 20

Morfologické vlastnosti amygdalového komplexu

Lenka Tomášová, Adriana Boleková, Dalibor Kolesár, Tatiana Špakovská, Natália Hvizdošová, Darina Kluchová 25

Proteomická analýza bunkovej línie MCF-7 2D elektroforézou pred a po aplikácii cytostatík v programe PDQuest Advanced

Marianna Trebuňová¹, Galina Laputková¹, Ján Sabo¹, Kamila Lacjaková²

¹Ústav lekárskej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, ²III. Interná klinika, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

Pretože proteomický prístup vyžaduje obvyčajne analýzu veľkého počtu súborov gélov, 2DE nevyhnutne vyžaduje výkonnú a užívateľsky prístupnú analýzu dát pomocou počítačových algoritmov. V tejto štúdii sme sa zamerali na analýzu 2D elektroforetických proteínových máp programom PDQuest Advanced. Softvérovým vyhodnotením sme zostavili proteínový profil jadrovej frakcie MCF-7 a jadrovej frakcie MCF-7 vystavených vplyvu doxorubicínu (2 µg/ml) a docetaxelu (2 µg/ml) počas 135 min, ich porovnaním sme zaznamenali úbytok aj prírastok počtu špecifických proteínových spotov po aplikácii cytostatík

Kľúčové slová: proteomika, 2D elektroforéza, bunková línia MCF-7, doxorubicín, docetaxel

Key words: proteomics, 2D electrophoresis, MCF-7 cell line, doxorubicin, docetaxel

Úvod

Dvojrozmerná elektroforéza (2DE) patrí v súčasnosti ku kľúčovým spôsobom štúdia rozdielov v úrovni exprese proteínov a ich post-translačných modifikácií v rozličných biologických vzorkách. Sila 2DE spočíva v možnosti súčasne separovať tisíce proteínov s následnou identifikáciou a kvantitatívnou analýzou. Pretože proteomický prístup vyžaduje obvyčajne kvantitatívnu analýzu veľkého počtu súborov gélov, 2DE nevyhnutne vyžaduje výkonnú a užívateľsky prístupnú analýzu dát pomocou počítačových algoritmov. Štandardná analýza 2DE gélov musí pozostávať najmenej z troch nasledovných krokov: 1. detekcia spotov, 2. kvantifikácia spotov a 3. spáročovanie replikátov gélov.

Doxorubicín (DOX) je považovaný za najúčinnější prostriedok v liečbe pokročilého karcinómu prsníka [1]. Rovnako ako DOX aj docetaxel (DOC) je efektívny liek používaný pri liečbe nádorov prsníka [8]. Pochopenie bunkového mechanizmu pri pôsobení DOX a DOC je kľúčovým krokom, ktorý vedie ku tvorbe nových stratégií pri liečbe rakoviny prsníka. Predchádzajúce štúdie naznačujú, že účinok DOX na nádorové bunky bol sprostredkovaný cez viacero mechanizmov [4]. Patrí medzi ne aj interkalácia medzi bázy DNA [7], interferencie s odvíjajúcou sa DNA topoizomerázou II [6] a zmena membránovej štruktúry [12]. DOX a DOC tiež môžu spôsobiť také zmeny, ako zastavenie rastu, diferenciácie a apoptózy v rôznych nádorových bunkových líniách [5,8]. Hoci bol urobený skrínig z DOX-indukujúcej géovej exprese s použitím technológie DNA čipu [9,13] a bola urobená proteínová mapa MCF-7 po expozícii DOX ($c=0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$) počas dvoch dní [2], expresia proteínov v nádorových bunkách ovplyvnených cytostatikami separovaných 2DE vyžaduje ďalšiu analýzu aj s pomocou vhodného softvéru. Za účelom riešenia tohto problému bola vykonaná proteomická analýza jadrových proteínov bunkovej línie MCF-7 po súčasnej expozícii DOX a DOC.

Je dostupných viacero súborov programov, ktoré boli vyvinuté pre rýchlu, presnú a objektívnu analýzu 2DE gélov: Delta 2D, GELLAB II+, Melanie, Image Master 2D Elite, Progenesis alebo PDQuest Advanced. V tejto štúdii prezentujeme 2DE proteomickú mapu bunkovej línie MCF-7, ktorú sme vyhodnotili v programe PDQuestTM Advanced bez toho, aby nasledovala identifikácia jednotlivých proteínových spotov pomocou hmotnostnej spektrometrie.

Metódy

Bunková línia: Bunky MCF-7 boli kultivované v DMEM doplnenom o 10 % fetálne bovinné sérum (FBS), penicilín (100 U/ml) a streptomycín (100 mg/ml). Bunky boli inkubované pri 37 °C, v atmosfére s 5 % CO₂ a trypsinizované podľa metodiky Chena a Wonga [3]. Kontrolnú skupinu tvorili neliečené vypestované bunkové kultúry MCF-7 a pokusnú skupinu tvorili vypestované bunkové kultúry MCF-7 liečené doxorubicínom (2 µg/ml 10 % DMEM) a docetaxelom (2 µg/ml 10 % DMEM) počas 135-tich minút.

Príprava lyzátov: Z vypestovaných kultúr sme odstránili DMEM 10 % a bunky sme premyli studeným sterilným PBS, čím sme ich zbavili zvyškov média. Kvantitatívne sme ich preniesli do skúmaviek a centrifugovali (5 min, 4 °C, 1300 otáčok). Zo sedimentu sme vyizolovali proteíny pomocou Extrakčného kitu (BIO-RAD, produkt č. 163-2089). Koncentráciu proteínov sme určili pomocou RC DC Protein Assay (BIO-RAD, produkt č. 500-0112).

2D elektroforéza: Všetky chemikálie použité pri 2D elektroforéze boli od firmy BIO-RAD. *Prvá dimenzia:* IPG stripy 7 cm, pH 4-7 boli 12 hod pasívne rehydrované pomocou 125 µl vzorky s koncentráciou 0,5 µg/µl. 2D elektroforéza bola uskutočnená v Protean IEF Cell systéme. Elektrofokusácia prebehla za nasledovných podmienok: 250V-15 min, 500V-2 hod, 8000 V-3 hod, 4000 V pri celkovom dokončení 65 000 Vh na 1 gél. Stripy boli ekvilibrované 10 min v ekvilibračnom roz-

toku I (6 mol/l urea, 2 % SDS, 0,375 mol/l Tris-HCL pH 8,8, 20 % glycerol, 130 mmol/l DTT) a 10 min. v ekvilibračnom roztoku II (6 mol/l urea, 2 % SDS, 0,375 mol/l Tris-HCL pH 8,8, 20 % glycerol, 135 mmol/l jodoacetamid). *Druhá dimenzia*, vertikálna elektroforéza: Stripy boli umiestnené v agare s vrstvou 4 % polyakrylamidového gélu a 10 % polyakrylamidového gélu. Separácia proteínov prebiehala 45 min pri 200 V.

Farbenie gélov: Premývanie v deionizovanej vode 3x5min, farbenie gélov Coomassie blue 50 ml/gél 60 min, premývanie v deionizovanej vode 3x15 min

Analýza spotov: gély boli zdokumentované pomocou denzitometra GS-800 (BIO-RAD) a vyhodnotené v programe PDQuest 2D gel Analysis Software (BIO-RAD).

Výsledky a diskusia

Analýza proteínového zloženia bunkovej línie MCF-7 2D elektroforézou.

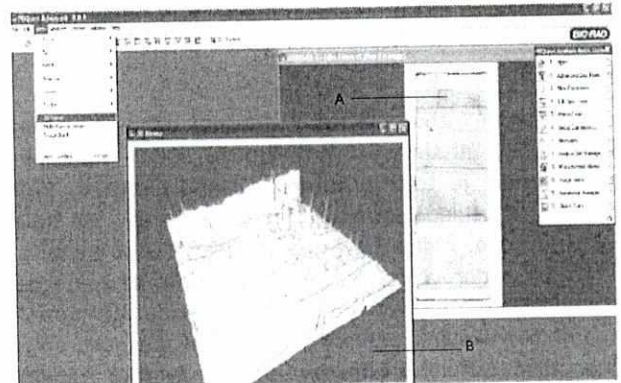
Kontrolná vzorka jadrových proteínov z buniek karcinómu prsníka, dostatočne reprezentatívna na vyhodnocovanie dvojdimensionálnou polyakrylamidovou gélovou elektroforézou, a skúmaná vzorka jadrových proteínov z buniek MCF-7 ovplyvnených kombináciou cytostatik doxorubicínu a docetaxelu bola získaná izoláciou z buniek pomocou ReadyPrep 2D Protein Extraction kitu. Bolo uskutočnených 55 sérií elektroforéz, z toho 35 sérií elektroforéz bolo urobených zo vzoriek neliečených MCF-7 a 25 sérií bolo urobených zo vzoriek liečených MCF-7. V každej z nich boli vyhodnocované 4 replikáty gélov (obr. 1). pH prúžkov rehydrovaných vzorkou bolo v rozmedzí 4-7. Izoelektrická fokusácia i SDS-PAGE bola vždy vykonaná pri rovnakých podmienkach. Na obr. 2 je znázornená 2D mapa so spotmi proteínov kontrolnej vzorky vizualizované Coomassie blue. 2D mapy gélov naskenovaných pomocou kalibrovaného denzitometra pri 200 dpi boli vyhodnocované pomocou softvéru na analýzu gélov tak, že v prvom rade boli z každého gélu vyrezané rovnaké klastre spotov. Štyri reprezentatívne gély boli zvolené na vytvorenie súboru zodpovedajúcich spotov. Nasledovala aplikácia algoritmu na odstránenie a vyhladenie pozadia. Softvér umožňuje päť volieb *median*, *weighted mean*, *power mean*, *contra mean* alebo *adaptive*, ktoré sa uplatňujú v závislosti od typu prevládajúceho šumu na vyhodnocovaných géloch. Nasledovala automatická detekcia spotov s dopĺňujúcimi nastaveniami, ktoré boli vo všetkých prípadoch rovnaké (*sensitivity* = 10, *size* = 3, *min peak* = 50, *speckle filter* zapnutý, *streak filtering* zapnuté). Softvér využíva na modelovanie povrchu spotu a jeho kvantifikáciu Gaussovú jednodávnú funkciu. Softvér dovoľuje zvýšiť konsenzus medzi replikátmi gélov pomocou editovacieho nástroja *Group Consensus*. Spoty zodpovedajúce špecifickému proteínu sa vyskytujú súčasne na všetkých replikátoch v skupine iba v ideálnom prípade, tento nástroj však dovoľuje editovať vzájomne si zodpovedajúce spoty s cieľom dosiahnuť konsenzus v údajoch. Párovanie spotov

na jednotlivých géloch v skupine nie je triviálny proces, pretože i pri porovnaní dvoch gélov sú pozorovateľné významné distorzie, ktoré proces párovania identických spotov významne sťažujú. Nasledovalo manuálne editovanie automaticky spárovaných spotov s cieľom eliminácie akýchkoľvek spotov, ktoré boli softvérom vyhodnotené nesprávne. Boli využité iba také semiautomatické editačné nástroje, ktoré poskytuje softvér (*delete*, *add*, *autosplit* a *auto-merge spots*) a ktoré minimalizujú subjektivitu vyhodnotenia počtu spotov. Softvér súčasne generuje zoznam všetkých spotov s uvedením unikátneho SSP čísla. Nerovnaké vyfarbenie gélov, ktoré bráni kvantifikácii jednotlivých spotov je softvérovou ošetrovanou aplikáciou vhodného spôsobu normalizácie. V priebehu analýzy bola využitá metóda lokálnej regresie LOESS.

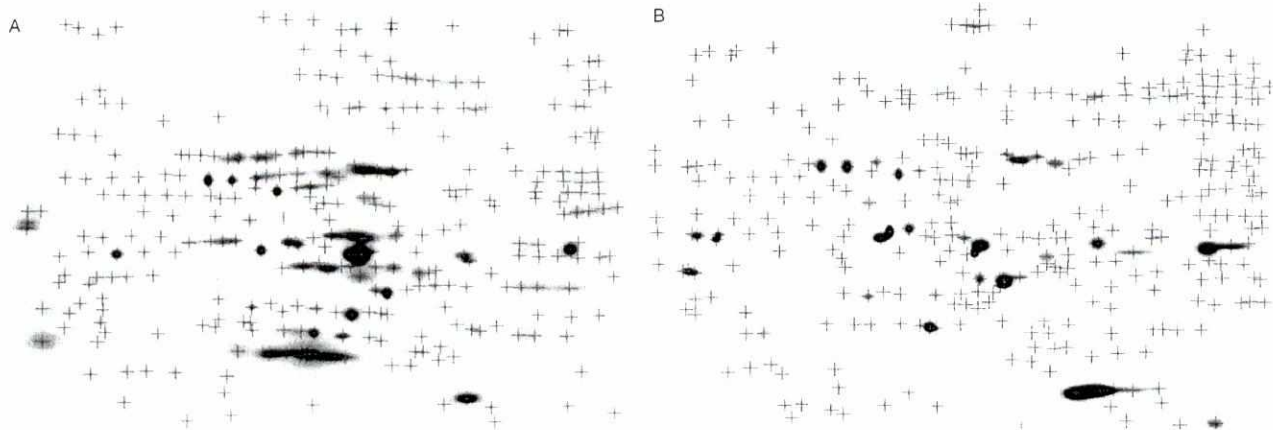
V programe PDQuest je možné porovnať gély pochádzajúce z viacerých pokusov (napr. kontrola versus liečená vzorka), spoty na nich je možné označiť a porovnať ich lokalizáciu. Nie je teda nevyhnutne nutné použiť na odhalenie zmien prebiehajúcich vo vzorke extrahovanej z liečených buniek také metódy ako je napr. DIGE. Pri analýze proteínových máp bolo cieľom zaznamenať zmeny v proteóme MCF-7 buniek ovplyvnených cytostatikami. Softvérová analýza aj v tomto prípade prebiehala tak, ako je to uvedené pre kontrolnú vzorku (obr. 2). Softvérovým porovnaním „master“ gélov pre vzorky proteínov extrahovaných z kontrolných MCF-7 buniek a buniek ovplyvnených cytostatikami bola pozorovaná významná zmena v proteóme; došlo nielen k vymiznutiu niektorých spotov, ale na 2D mape MCF-7 buniek ovplyvnených cytostatikami sa objavili dodatočné spoty. Zhodu a rozdiely v lokalizácii spotov na géloch získané pomocou vzájomného počítačového prekrytia dvoch gélov sú znázornené na obr. 3.

V programe PDQuest je možné 3D zobrazenie proteínových spotov, ktoré pomáha najmä pri odlíšení prekrývajúcich sa spotov, ktoré neboli v priebehu 2DE dostatočne separované. Výška spotu koreluje s intenzitou spotu (obr. 1). Kvantitatívna analýza, ktorú softvér umožňuje, však pri tejto analýze uskutočnená nebola.

Obr. 1. Spracovanie spotov pomocou 3D Viewer v programe PDQuest. Na obrázku v pravom hornom rohu sú 4 PAGE gély. Na prvom géle sú v červenom štvorci (A) označené proteínové spoty, ktoré sú v nasledujúcom okne (B) zobrazené ako 3D obrázok.

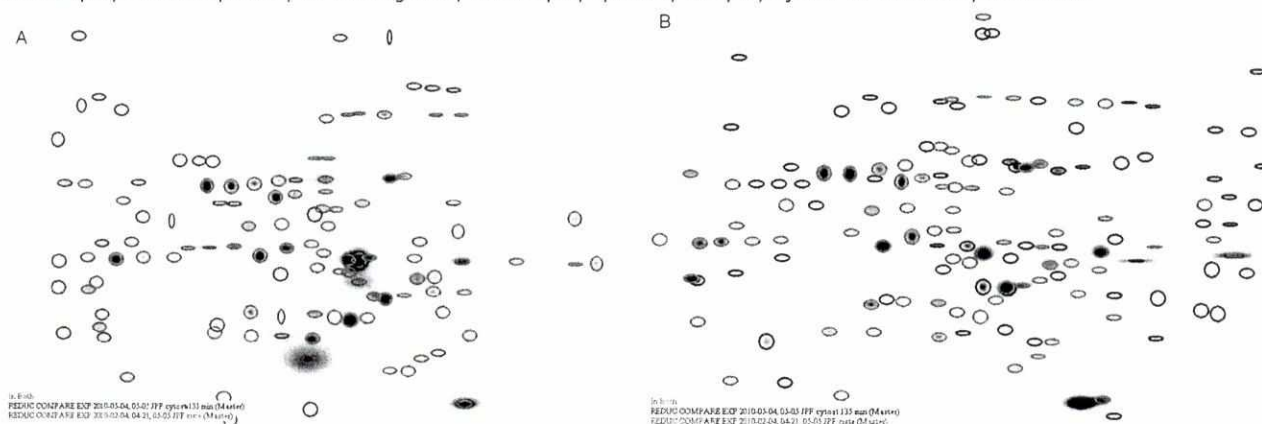


Obr. 2. Master gel Gaussian Image MCF7 JPF 308 spots, Master gel Gaussian Image MCF7 JPF cytostatics exposition: 135 min. 336 spots. Na obrázku A je jadrová proteínová frakcia MCF-7 - kontrolná vzorka, na obrázku B je jadrová proteínová frakcia MCF-7 po aplikácii cytostatík (doba expozície - 135 min).



Obr. 3. Porovnanie 2D máp JPF MCF 7 - kontrola a JPF MCF 7 - s cytostatikami v programe PDQuest Advanced.

Obrázok A: zelené spoty - totožné proteíny na oboch géloch, červené spoty- proteíny sa vyskytujú len v kontrolnej vzorke. Obrázok B: zelené spoty - totožné proteíny na oboch géloch, modré spoty- proteíny sa vyskytujú len vo vzorke s cytostatikami.



V programe PDQuest je možné 3D zobrazenie proteínových spotov, ktoré pomáha najmä pri odlišení prekrývajúcich sa spotov, ktoré neboli v priebehu 2DE dostatočne separované. Výška spotu koreluje s intenzitou spotu (obr. 1). Kvantitatívna analýza, ktorú softvér umožňuje, však pri tejto analýze uskutočnená nebola.

V tejto štúdií sme sa snažili porovnať proteínové mapy bunkovej línie MCF-7 pred a po aplikácii cytostatík. Na základe softvérového porovnania môžeme konštatovať, že pod vplyvom doxorubicínu a docetaxelu dochádza k zmene proteínovej mapy MCF-7 buniek.

Diskusia

Nádorové ochorenia, aj v dnešnej dobe modernej diagnostiky, predstavujú problémovú oblasť medicíny. Čím neskôr je totiž ochorenie diagnostikované, tým menšia je účinnosť terapie. Z tohoto dôvodu sa stále hľadajú nové, rýchlejšie a lepšie diagnostické metódy, ktoré by nádorové ochorenie odhalili skôr, to znamená v období bez klinických prejavov ochorenia. Aj napriek tomu, že rakovina prsníka je heterogénne ochorenie, jednotlivé druhy tumorov nesú typické znaky

vyplývajúce z biologických, transkripčných a proteínových abnormalít [10].

Táto štúdia tiež potvrdzuje, že proteomické analýzy sú mocný nástroj pre potvrdzujúce expresie proteínov v súvislosti s účinkom protinádorových liekov ako napr. DOX a DOC na rast nádorov a tento prístup otvára cestu definovania terapeutických cieľov pre liečbu rakoviny prsníka. Hoci je dostupných veľa rôznych softvérových balíkov na analýzu máp 2DE gélov, PDQuest v porovnaní s nimi poskytuje najspoľahlivejšie výsledky pri porovnaní manuálne a automaticky detekovaného počtu spotov, reprodukovateľnosti detekovaných spotov pri použití všetkých algoritmov na filtrovanie pozadia, ktoré softvér umožňuje [11]. Umožňuje použitie na odhalenie zmien prebiehajúcich vo vzorke softvérové porovnanie proteómov dvoch odlišných vzoriek a dovoľuje vyhnúť sa použitiu takých metód ako je napr. DIGE, ktorá vyžaduje nepomerne väčšie náklady na samotné farbenie gélov a dodatočné zariadenie na ich zosnímanie. Výhodou PDQuestu je i široká paleta nástrojov, ktorá dovoľuje plnohodnotnú štatistickú analýzu dát. V neposlednej miere je výhodou softvéru i to, že je integrovaný so zariadením na automatické vrezávanie spotov ExQuest™ Spot Cutter

Summary

Proteomic analysis of MCF-7 cell line treated and untreated with cytostatics with 2D electrophoresis evaluated by PDQuest Advanced

As proteomic approach generally requires an analysis of a great number of gel collections, 2DE inevitably necessitates in a powerful and user-friendly data analysis with the aid of software algorithms. In this study we focused on the analysis of 2D electrophoretic protein maps with the aid of PDQuest Advanced. By software evaluation the protein profile of nucleus fraction of MCF-7 and nucleus fraction of MCF-7 treated with doxorubicin (2 µg/ml) and docetaxel (2 µg/ml) for 135 min was made. The comparison of which demonstrated the drop as well as the gain in number of specific protein spots after the treatment with cytostatics.

Práca bola finančne podporená grantmi ITMS: 26220120039 (50 %), ITMS: 26220220143 (50 %)

Literatúra

- Bonadonna, G.: Evolving concepts in the systemic adjuvant treatment of breast cancer. *Cancer Res.*, 52 (15), 1992, s. 2127-37.
- Chen, S. T., Pan, T. L., Tsai, Y. C., Huang, C. M.: Proteomics reveals protein profile changes in doxorubicin - treated MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett.*, 181 (13), 2002, s. 95-107.
- Chen, W. F., Wong, M. S.: Genistein enhances insulin-like growth factor signaling pathway in human breast cancer (MCF-7) cells. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 89 (5), 2004, s. 2351-2359.
- Cummings, J., Anderson, L., Willmot, N., Smyth, J. F.: The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur. J. Cancer*, 27 (5), 1991, s. 532-535.
- Frank, G. R., Brar, A. K., Cedars, M. I., Handwerger, S.: Prostaglandin E2 enhances human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology*, 134 (1), 1994, s. 258-263.
- Fornari, F. A., Jarvis, W. D., Grant, S., Orr, M. S., Randolph, J. K. White, F. K. et al.: Induction of differentiation and growth arrest associated with nascent (non-oligosomal) DNA fragmentation and reduced c-myc expression in MCF-7 human breast tumor cells after continuous exposure to a sublethal concentration of doxorubicin. *Cell Growth Differ.*, 5 (7), 1994, s. 723-733.
- Goldenberg, G. J., Wang, H., Blair, G. W.: Resistance to adriamycin: Relationship of cytotoxicity to drug uptake and DNA single- and double-strand breakage in cloned cell lines of adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia. *Cancer Res.*, 46 (6), 1986, s. 2978-2983.
- Kastl, L., Brown, I., Schofield, A. C.: Altered DNA methylation is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 36 (5), 2010, s. 1235-41.
- Kudoh, K., Ramanna, M., Ravatn, R., Elkahloun, A. G. Bittner M. L., Meltzer P. S. et al.: Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin-resistant cancer cells by cDNA microarray. *Cancer Res.*, 60 (18), 2000, s. 4161-4166.
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J. Baehner F. L., Fevr T. et al.: A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10 (6), 2006, s. 515-527.
- Rosengren, A. T., Salmi, J. M. Aittokallio, T., Westerholm, J., Lahesmaa, R., Nyman, T. A. et al.: Comparison of PDQuest and Progenesis software packages in the analysis of two-dimensional electrophoresis gels. *Proteomics*, 3, 2003, s. 1936-1946, DOI 10.1002/pmic.200300544
- Siegfried, J. A., Kennedy, K. A., Sartorelli, A. C., Tritton T. R.: The role of membranes in the mechanism of action of the antineoplastic agent adriamycin. Spin-labeling studies with chronically hypoxic and drug resistant tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 258 (1), 1983, s. 339-343.
- Turton, N. J., Judah, D. J., Riley, J., Davies, R., Lipson, D., Styles, J. A. et al.: Gene expression and amplification in breast carcinoma cells with intrinsic and acquire doxorubicin resistance. *Oncogene*, 20 (11), 2001, s. 1300-1306.