

Využitie proteomiky pri diagnostike a monitoringu ochorení

Veronika Lukáčová

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.

V súčasnosti sú imunodetekčné techniky zavedeným štandardom na identifikáciu a kvantifikáciu bielkovín vo vzorkách v klinickej diagnostike. Napriek tomu však majú svoje obmedzenia, ako je detekcia viacerých analytov súčasne. Moderné proteomické prístupy založené na hmotnostnej spektrometrii sú v porovnaní s imunodetekčnými technikami citlivejšie, dokážu tiež pracovať s malými objemami vzoriek a rýchlo podať potrebnú informáciu o ich proteínovom zložení. Z uvedených dôvodov je hmotnostná spektrometria veľmi vhodnou metódou na identifikáciu známych, ale aj nových biomarkerov v klinických vzorkách. Tie sú významnými ukazovateľmi aktuálneho stavu pacienta. Práve preto zavedenie hmotnostnej spektrometrie do proteomickej analýzy v klinickom laboratóriu vedie ku skvalitneniu diagnostických metód.

Kľúčové slová: hmotnostná spektrometria, proteomika, biomarkery, diagnostika

Proteomics in the diagnostics and monitoring of diseases

Immunodetection techniques are established standards for the identification and quantification of proteins in samples in clinical diagnostics. However, they have limitations, such as the detection of multiple analytes at the same time. Modern proteomic approaches based on mass spectrometry are more sensitive than immunodetection techniques. They can also work with small sample volumes and quickly provide the necessary information about their protein composition. For the above reasons, mass spectrometry is a very suitable method for identifying both known and novel biomarkers in clinical specimens. These are essential indicators of the patient's current condition. It is the reason why the introduction of mass spectrometry into proteomic analysis in a clinical laboratory leads to improved diagnostic methods.

Keywords: mass spectrometry, proteomics, biomarkers, diagnostics

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 20 – 23

V klinickej praxi sa neustále zvyšuje význam laboratórneho vyšetrenia na zistenie aktuálneho stavu pacienta. Jedným z nich je identifikácia proteínov v klinických vzorkách, ktorá vedie k diagnostike chorého pacienta. Moderné proteomické prístupy založené na hmotnostnej spektrometrii pomáhajú zisťovať zmeny bielkovinového zloženia biologických vzoriek alebo monitorovať proces liečby po podaní účinných látok. V neposlednom rade dávajú možnosť identifikovať biomarkery nádorových aj nenádorových ochorení v jednoducho dostupnom klinickom materiáli. Čoraz častejšie sa kladie dôraz na ich zavedenie do klinického laboratória, pretože sú citlivejšie v porovnaní so zaužívanými diagnostickými technikami.

Proteomika a hmotnostná spektrometria

Proteomika, vychádzajúca z proteínovej chémie, je od svojho vzniku v 90. rokoch 20. storočia veľmi rýchlo sa rozvíjajúcou vednou disciplínou, ktorá sa venuje štúdiu proteómu. Pod pojmom proteóm chápeme súbor všetkých proteínov v organizme, na rozdiel od genómu je však proteóm dynamický a jeho zloženie sa v bunke mení v závislosti od času, miesta alebo fyziologického stavu. Pojem proteóm prvýkrát použil Marc Wilkins v roku 1994 pri charakterizácii bielkovín patogénnej baktérie, pričom pod týmto pojmom rozumel proteínový komplement genómu⁽¹⁾.

Hmotnostná spektrometria je analytickou technikou, ktorá využíva separáciu nabitých častíc v elektrickom alebo magnetickom poli podľa pomeru ich hmotnosti a náboja (m/z). Táto citlivá technika sa v spojení s chromatografickými

prístrojmi využíva v klinickej praxi na identifikáciu a kvantifikáciu malých molekúl, ako sú liečivá, metabolity, drogy, pesticídy alebo toxíny. V posledných rokoch sa však hmotnostná spektrometria využíva aj na analýzu väčších molekúl, peptidov a proteínov. Umožnilo to najmä zavedenie tzv. mäkkých ionizačných techník, napr. MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) a ESI (*Electrospray Ionization*). Ako prvá sa do zdravotníckej praxe etablovala technika MALDI-MS, ktorá sa využíva v klinickej mikrobiológii na rýchlu identifikáciu baktérií⁽²⁾. Pre jednotlivé bakteriálne kolónie sú vytvorené hmotnostné spektrá dominantných bielkovín a iných biomolekúl, ktoré predstavujú akýsi unikátny „odtlačok prsta“ skúmaného organizmu. Jeho softvérovým porovnaním s databázou referenčných spektier môžeme následne rýchlo získať jeho mikrobiologickú identitu.

Proteomika, ktorá za posledných 30 rokov prešla vývojom ohľadne citlivosti, presnosti, výkonu a dynamického rozsahu, predstavuje v súčasnosti perspektívne riešenie pre mnohé klinické otázky⁽³⁾. Spoločne s hmotnostnou spektrometriou umožňuje meranie absolútneho alebo relatívneho zastúpenia tisícov proteínov v jednej vzorke. Tie sú, ako už bolo spomenuté, v organizme variabilné a ich množstvo je dynamické. Preto niektoré z detegovaných proteínov, tzv. biomarkery, môžu slúžiť ako indikátory konverzie biologických procesov na patogénne alebo farmakologické odpovede na terapeutický zásah. V súčasnosti sa hmotnostná spektrometria okrem proteomiky využíva aj v toxikológii, testovaní liečiv alebo v operačných sálach, kde je chirurgický nôž pripojený

k hmotnostnému spektrometru, pričom je schopný rozlišovať medzi zdravým a rakovinovým tkanivom⁽⁴⁾. Hmotnostná spektrometria aplikovaná v toxikológii je schopná identifikovať vyššie percento vzoriek pozitívnych na omamné látky v porovnaní s imunodetekciou⁽⁵⁾.

Spracovanie vzorky

Cieľom proteomickej analýzy je popis čo najväčšieho množstva proteínov vo vzorke. Tie musia byť najprv enzymaticky rozštiepené na peptidy, pričom si zachovávajú vnútornú aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je potrebná na identifikáciu bielkoviny. Zmes peptidov môže byť následne separovaná na kvapalinovom chromatografe s priamou analýzou na tandemovom hmotnostnom spektrometri (LC-MS/MS). Získané hmotnostné spektrá predstavujú veľké objemy dát, na ktorých spracovanie sa využíva bioinformatika. Pomocou nej sú zo spektier odvodené aminokyselinové sekvencie proteínov, ktoré vzorka pôvodne obsahovala (**obrázok 1**). Použitím tohto prístupu možno identifikovať napr. v HeLa bunkách okolo 4 800 rôznych proteínov počas jednej LC-MS/MS analýzy trvajúcej 140 minút⁽⁷⁾.

V klinických laboratóriách sa na diagnostiku mnohých ochorení bežne používajú vzorky krvnej plazmy, tkaniva alebo moču. Napríklad, bielkovina fetuín-A v moči slúži ako biomarker na stanovenie rizika tvorby obličkových kameňov. Štúdia vedcov z Iránu ukázala, že hodnoty fetuínu-A v moči a pravdepodobnosť vzniku obličkových kameňov medzi sebou inverzne korelujú⁽⁸⁾.

Vyšetrenie sa dá robiť aj zo slín alebo iných biologických tekutín. V prípade vzoriek slín bolo objavených päť predpokladaných biomarkerov (MMP1, PADI1, TNC, CSTA a MMP3), ktoré mali výrazne zmenené hladiny proteínov pri porovnaní zdravých jedincov a pacientov s rakovinou ústnej dutiny. Vo vzorkách krvnej plazmy v tomto prípade neboli pozorované zmeny v hladinách proteínov⁽⁹⁾.

Veľmi dôležitým aspektom, ktorý treba brať do úvahy, je dynamický rozsah koncentrácie jednotlivých bielkovín. Bohato zastúpené proteíny sťažujú identifikáciu ďalších proteínov v tej istej vzorke, ktoré sú oproti nim vo veľmi malom množstve. Príkladom najkomplexnejšieho proteómu v ľudskom tele je krvná plazma. Pri jej proteomickej analýze bolo identifikovaných viac ako 5 000 proteínov⁽¹⁰⁾. Práve jej bohaté zloženie však robí jej analýzu náročnou v klinickom laboratóriu, keď sa dôraz kladie nielen na presnosť, ale aj na rýchlosť

analýzy. Najviac zastúpeným proteínom v krvnej plazme je sérový albumín (koncentrácia 35 – 50 mg/ml), naopak, najmenej zastúpeným je interleukín-6 (koncentrácia 0 – 5 pg/ml), pričom rozdiel v ich koncentráciách je až 10 rádo⁽¹¹⁾. Väčšinu, až 99 % plazmy, tvorí 22 najzastúpenejších proteínov⁽¹²⁾. K zvyšnému 1 % patria aj sekretované proteíny pochádzajúce z viacerých orgánov ľudského tela. Práve preto je krvná plazma veľmi dobrým modelom na identifikáciu biomarkerov. Pri proteomickej analýze krvnej plazmy použil Geyer a kol. objem 1 µl, pričom boli schopní identifikovať viac než 300 proteínov počas extrémne krátkeho času merania (20 min.). Cieľá analýza od odobratia vzorky až po vyhodnotenie výsledkov trvala okolo troch hodín. Z identifikovaných proteínov až 49 patrilo medzi biomarkery schválené Americkým úradom pre kontrolu potravín a liečiv⁽¹³⁾.

Hmotnostná spektrometria vs imunodetekcia

Hmotnostná spektrometria poskytuje veľmi dobré výsledky v porovnaní s tradičnými imunodetekčnými technikami. Napriek tomu, že ELISA testy sú v klinickej praxi zavedeným štandardom pre kvantifikáciu proteínov, majú obmedzenie v detekcii viacerých analytov súčasne a nie sú špecifické pre proteínové izoformy. V prípade použitia sekundárnych protilátok môže tiež dochádzať k nešpecifickému signálu.

Príkladom lepších výsledkov hmotnostnej spektrometrie v porovnaní s imunodetekciou môže byť sledovanie hladiny tyreoglobulínu v krvi⁽¹⁴⁾. Tyreoglobulín je proteín využívaný ako biomarker na hodnotenie účinnosti liečby pri rakovine štítnej žľazy a tiež na zisťovanie, či nedochádza k jej recidíve. Približne 25 % pacientov trpiacich týmto ochorením je však pozitívnych na prítomnosť antityreoglobulínových protilátok, čo môže spôsobovať falošnú negativitu vyšetrenia v prípade použitia imunodetekcie. Hmotnostná spektrometria tiež odstraňuje falošnú pozitivitu výsledku, ktorú môžu spôsobovať heterofilné protilátky⁽¹⁵⁾. Ďalším príkladom, keď sa môže získať nesprávny výsledok z dôvodu prítomnosti heterofilných protilátok, je stanovenie hladiny troponínu I, ktorý je dôležitý pri diagnostike akútneho infarktu myokardu⁽¹⁶⁾. Čas potrebný na inkubáciu protilátok so vzorkou pri využití techniky ELISA je porovnateľný s časom analýzy vzorky na hmotnostnom spektrometri⁽¹⁷⁾. V prípade Western blot analýzy, ktorá sa tiež používa v klinickom laboratóriu, je problémom kvantifikácia identifikovaného proteínu⁽¹⁸⁾.

Obrázok 1. Schéma pracovného postupu proteomickej analýzy. Klinické vzorky od pacientov sú po odobratí spracované podľa ich typu. Proteíny v nich sú enzymaticky rozštiepené na peptidy a analyzované LC-MS/MS. Zaznamenané dáta sú bioinformaticky spracované, pričom poskytujú informáciu o stave pacienta⁽⁶⁾.



Využitie proteomiky v diagnostike závažných ochorení

Biomarkery sú neoceniteľnými nástrojmi na detekciu, diagnostiku a prognózu ochorenia a v neposlednom rade tiež výber adekvátnej liečby pre pacienta. Práve hmotnostná spektrometria je veľmi vhodnou platformou na rýchlu identifikáciu známych biomarkerov a taktiež identifikáciu nových. Jej hlavnou výhodou je v tomto prípade možnosť identifikácie veľkého množstva proteínov v jednom experimente.

Príkladom biomarkera, ktorého hladina sa dá veľmi dobre sledovať pomocou hmotnostnej spektrometrie, je proteín lipokalín asociovaný so želatínázou neutrofilov (NGAL)⁽¹⁹⁾. Ten je včasným indikátorom akútneho poškodenia obličiek, pretože je jeden z prvých proteínov, ktorého koncentrácie v moči sa rýchlo zvyšujú po ischemických alebo nefrotoxických podnetoch. Na porovnanie, hladina kreatinínu sa zvyšuje až 72 hodín od poškodenia, keď už môže dochádzať k funkčnému zlyhaniu obličiek. Stanovenie množstva bielkoviny NGAL má veľký význam u pacientov po závažných chirurgických zákrokoch alebo u pacientov, ktorí prídu v kritickom stave na pohotovosť a u ktorých je podozrenie, že mohlo dôjsť k poškodeniu obličiek.

Rakovina je druhou najčastejšou príčinou úmrtí na celom svete. V roku 2018 bola zodpovedná za 9,6 milióna úmrtí, teda približne za každé šieste úmrtie⁽²⁰⁾. Je študovaná hlavne na genomickej úrovni, proteomika sa však javí ako veľmi sľubná komplementárna technológia, pretože umožňuje náhľad na proteínovej úrovni. Napríklad pri rakovine vaječníkov bolo zistené, že proteín CT45 je markerom pri pozitívnej odpovedi na chemoterapiu⁽²¹⁾. Jedným z najzávažnejších ochorení je rakovina žalúdka, pri ktorej je miera prežitia len niečo vyše 30 %⁽²²⁾. Preto je skorá diagnostika mimoriadne dôležitá. V skorom štádiu je jej priebeh takmer bezpríznakový a do dnešného dňa nebol objavený vhodný biomarker pre počiatočné štádium tohto ochorenia. Nedávna štúdia krvnej plaz-

my však odhalila 11 proteínov, ktoré by v budúcnosti pomohli odlišiť pacientov s ochorením rakoviny žalúdka od zdravých jedincov⁽²³⁾. Hmotnostná spektrometria predstavuje nádej aj pre pacientov, u ktorých nebola účinná chemoterapia. Tím vedcov z Nemecka odobral vzorky tkaniva z pľúcnych metastáz pacienta s urachálnym karcinómom. Pri porovnaní so zdravým pľúcny tkanivom boli odhalené viaceré proteíny s výrazne zvýšeným zastúpením v metastázovom tkanive. Jedným z nich bola histónová demetyláza LSD1, ktorá už bola identifikovaná pri iných druhoch rakoviny. Pred podaním vhodnej liečby v podobe inhibítora proteínu LSD1 boli objavené metastázy aj v pečeni pacienta a už sa ho nepodarilo zachrániť. Napriek tomu, táto štúdia poskytla rýchlu a reprodukovateľnú možnosť aplikácie hmotnostnej spektrometrie do klinického laboratória. Môže byť vhodná aj pre pacientov, u ktorých nezabrali iné druhy liečby. Celková analýza, od spracovania vzorky až po vyslovenie záverov, trvala len dva dni⁽²⁴⁾.

Záver

Práve vďaka aplikácii hmotnostnej spektrometrie a proteomiky bol v posledných desaťročiach zaznamenaný značný pokrok v diagnostike a prognóze mnohých ochorení. Hmotnostná spektrometria dokáže pracovať s malými objemami vzoriek a rýchlo podať potrebnú informáciu o ich proteínovom zložení. V spojení s bioinformatikou je schopná identifikovať rozdiely v hladinách proteínov vo vzorkách pacientov a určiť tak nasledujúci postup liečby. Hmotnostná spektrometria má všetky predpoklady na to, aby sa úspešne etablovala do klinického laboratória a skvalitnila prístupy v diagnostických metódach.

Podakovanie: Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Centrum výskumu závažných ochorení a ich komplikácií, ITMS 26240120038, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995; 16: 1090-1094.
2. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1614-1619.
3. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 2016; 537: 347-355.
4. Balog J, Szaniszló T, Schaefer KC, et al. Identification of biological tissues by rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2010; 82: 7343-7350.
5. Kahl KW, Seither JZ, Reidy LJ. LC-MS-MS vs ELISA: Validation of a Comprehensive Urine Toxicology Screen by LC-MS-MS and a Comparison of 100 Forensic Specimens. *J Anal Toxicol* 2019; 43: 734-745.
6. Doll S, Gnad F, Mann M. The Case for Proteomics and Phospho-Proteomics in Personalized Cancer Medicine. *Proteomics Clin Appl* 2019; 13: e1800113.
7. Beck S, Michalski A, Raether O, et al. The Impact II, a Very High-Resolution Quadrupole Time-of-Flight Instrument (QTOF) for Deep Shotgun Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14: 2014-2029.
8. Mehraei A, Guitynavard F, Nikoobakht MR, et al. The relationship between serum and urinary Fetuin-A levels and kidney stone formation among kidney stone patients. *Cent European J Urol* 2017; 70: 394-399.

9. Chi LM, Hsiao YC, Chien KY, et al. Assessment of candidate biomarkers in paired saliva and plasma samples from oral cancer patients by targeted mass spectrometry. *J Proteomics* 2020; 211: 103571.
10. Keshishian H, Burgess MW, Gillette MA, et al. Multiplexed, quantitative workflow for sensitive biomarker discovery in plasma yields novel candidates for early myocardial injury. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14: 2375-2393.
11. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 845-867.
12. Pietrowska M, Wlosowicz A, Gawin M, et al. MS-Based Proteomic Analysis of Serum and Plasma: Problem of High Abundant Components and Lights and Shadows of Albumin Removal. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1073: 57-76.
13. Geyer PE, Kulak NA, Pichler G, et al. Plasma proteome profiling to assess human health and disease. *Cell Systems* 2016; 2: 185-195.
14. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, et al. Measurement of thyroglobulin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in serum and plasma in the presence of antithyroglobulin autoantibodies. *Clin Chem* 2013; 59: 982-990.
15. Netzel BC, Grebe SK, Algeciras-Schimmich A. Usefulness of a thyroglobulin liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for evaluation of suspected heterophile interference. *Clin Chem* 2014; 60: 1016-1018.

16. Nørlund H, Bovin A. False positive troponin I due to heterophile antibodies. *Ugeskr Laeger* 2017; 179: V05170412.
17. <https://www.thermofisher.com/sk/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>
18. Aebersold R, Burlingame AL, Bradshaw RA. Western blots versus selected reaction monitoring assays: time to turn the tables? *Mol Cell Proteomics*. 2013; 12: 2381-2382.
19. Ji H, Xu L, Su J, et al. Absolute quantification of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin by UHPLC/MS/MS and the diagnostic efficacy of AKI. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2019; 34: e8637.
20. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
21. Coscia F, Lengyel E, Duraiswamy J, et al. Multi-level Proteomics Identifies CT45 as a Chemosensitivity Mediator and Immunotherapy Target in Ovarian Cancer. *Cell*. 2018; 175: 159-170.
22. <https://www.cancer.net/cancer-types/stomach-cancer/statistics>
23. Zhou B, Zhou Z, Chen Y, et al. Plasma proteomics-based identification of novel biomarkers in early gastric cancer. *Clin Biochem* 2020; 76: 5-10.
24. Doll S, Kriegmair MC, Santos A, et al. Rapid proteomic analysis for solid tumors reveals LSD1 as a drug target in an end-stage cancer patient. *Mol Oncol* 2018; 12: 1296-1307.



Mgr. Veronika Lukáčová

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.

Jána Bottu 2, 917 01 Trnava

e-mail: lukacova.veronika21@gmail.com