

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nina KOČEVAR

**PREISKAVA PROTEOMA Z DVODIMENZIONALNO
GELSKO ELEKTROFOREZO PRI RAKU ŽELODCA:
OPTIMIZACIJA POSTOPKA IN PRELIMINARNI
POSKUSI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nina KOČEVAR

**PREISKAVA PROTEOMA Z DVODIMENZIONALNO GELSKO
ELEKTROFOREZO PRI RAKU ŽELODCA: OPTIMIZACIJA
POSTOPKA IN PRELIMINARNI POSKUSI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PROTEOME ANALYSIS OF GASTRIC CANCER WITH TWO-
DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS: OPTIMIZATION OF
THE PROCEDURE AND PRELIMINARY EXPERIMENTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Medicinskem centru za molekularno biologijo in Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Identifikacijo proteinov so opravili na Mednarodnem centru za gensko inženirstvo in biotehnologijo (ICGEB, angl. International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology) v Trstu.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Darja Žgur Bertok, za somentorja prof. dr. Radovana Komela in za recenzenta prof. dr. Simona Horvata.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Somentor: prof. dr. Radovan Komel

Recenzent: prof. dr. Simon Horvat

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Alojz Ihan

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Radovan Komel

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Medicinski center za molekularno biologijo

Član: prof. dr. Simon Horvat

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nina Kočevan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.2.08:547.96:612.32(043)=863
KG	proteomika/proteom/tkivo želodca/tumorsko tkivo/normalno tkivo/dvodimenzionalna elektroforeza/izoelektrično fokusiranje/SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza
AV	KOČEVAR, Nina
SA	ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica)/KOMEL, Radovan (somentor)/HORVAT, Simon (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2007
IN	PREISKAVA PROTEOMA Z DVODIMENZIONALNO GELSKO ELEKTROFOREZO PRI RAKU ŽELODCA: OPTIMIZACIJA POSTOPKA IN PRELIMINARNI POSKUSI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 62 str., 7 pregl., 38 sl., 5 pril., 34 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Želodčni karcinom je ena pogostejših oblik raka. V njegov večstopenjski nastanek so vpletene mutacije različnih genov, kar se kaže kot spremenjeno izražanje proteinov. Te lahko določamo s pomočjo dvodimenzionalne gelske elektroforeze (2-DE), kjer jih ločimo glede na izoelektrično točko (pI) in molekulsko maso (MW). V našem raziskovalnem delu smo postopke 2-DE za želodčno tkivo optimizirali z izbiro primerenega pufra za lizo celic, časa centrifugiranja, odstranjevanja nečistoč zobarjanjem in primerne količine natrijevega dodecil sulfata (SDS) v ekvilibracijski raztopini in elektroforeznem pufru. Analizirali smo 7 parov vzorcev iz 7 bolnikov: prvi par s krajšim časom centrifugiranja in brez zobarjanja z acetonom, ostale pa po optimiziranem postopku v ponovitvah. V vseh primerih smo ugotovili, da obstajajo razlike v izražanju proteinov med tumorskimi in normalnimi tkivi. Iz prvega para smo 10 diferenčno izraženih lis identificirali, in sicer kot 8 različnih proteinov. Iste lise smo poskušali poiskati še na boljših gelih ostalih parov. Tiste, ki smo jih lahko določili, so vsaj v 50 % vzorcev potrjevale izražanje iz para 1. Uporabnost optimiziranega postopka smo dokazali tudi na celični liniji AGS. Zaključujemo, da sta 2-DE in MS učinkoviti metodi proteomike, za različne vrste vzorcev pa je potrebna optimizacija vseh faz.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.2.08:547.96:612.32(043)=863
DX proteomics/proteome/gastric tissue/tumor tissue/normal tissue/two-dimensional electrophoresis/isoelectric focusing/SDS polyacrilamide gel electrophoresis
AU KOČEVAR, Nina
AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/KOMEL, Radovan (co-advisor)/HORVAT, Simon (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interepartmental Programme in Microbiology
PY 2007
TI PROTEOME ANALYSIS OF GASTRIC CANCER WITH TWO-DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS: OPTIMIZATION OF THE PROCEDURE AND PRELIMINARY EXPERIMENTS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIII, 62 p., 7 tab., 38 fig., 5 ann., 34 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Gastric cancer is one of more frequent malignancies. Mutations of different genes are involved in its multistep process of carcinogenesis, which result in changed protein expression. These changes can be assigned by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), where proteins are separated according to their isoelectric point (pI) and molecular weight (MW). We performed optimization procedures of 2-DE for gastric tissue samples by selecting an appropriate lysis buffer, time of centrifugation, removal of impurities by precipitation and adequate amounts of sodium dodecyl sulphate (SDS) in equilibration solution and electrophoresis buffer. We analyzed 7 pairs of samples from 7 patients: first pair with shorter centrifugation time and without acetone precipitation and the rest according to the optimized procedure in duplicates. We determined in all cases that there are differences in protein expression between tumor and non-tumor tissues. From the first pair we identified 10 differentially expressed spots as 8 different proteins. The same spots were searched on better gels from the rest of the pairs. Those, that could be assigned, confirmed the expression from pair 1 in at least 50 % of samples. We also confirmed the usage of the optimized procedure in AGS cell line. To conclude, 2-DE and MS are efficient methods of proteomics. Furthermore, for different types of samples all the steps have to be optimized.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 HIPOTEZI	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 RAK	2
2.1.1 Rak želodca	3
2.1.2 Celične kulture	4
2.2 PROTEOMIKA	5
2.2.1 Ločevanje proteinov z 2-DE	5
2.2.2 Identifikacija proteinov	6
2.2.3 Bioinformatika	6
2.3 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA V PRAKSI	7
2.3.1 Ustaljeni postopki 2-DE	7
2.3.2. Človeški želodec in 2-DE	8
3 MATERIAL IN METODE	18
3.1 KEMIKALIJE IN NAPRAVE	18
3.2 VZORCI	18
3.3 METODE DELA	20
3.3.1 Priprava vzorcev	21
3.3.1.1 Tkivo želodčne sluznice	21
3.3.1.2 Celična linija AGS	22
3.3.1.3 Odstranjevanje motečih snovi	22

3.3.1.4 Merjenje koncentracije proteinov	23
3.3.2 Izoelektrično fokusiranje (IEF).....	24
3.3.3 Ekvilibracija.....	27
3.3.4 Vertikalna SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza	27
3.3.4.1 Priprava gela	28
3.3.4.2 SDS-PAGE	29
3.3.5 Barvanje s srebrovim nitratom	29
3.3.6 Računalniška analiza.....	31
3.3.7 Identifikacija proteinov.....	31
4 REZULTATI.....	33
4.1 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA IN RAČUNALNIŠKA ANALIZA PARA 1 (BREZ OBARJANJA)	33
4.2 OPTIMIZACIJA METOD NA VZORCU ZDRAVEGA ŽELODCA.....	37
4.3 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA IN RAČUNALNIŠKA ANALIZA PAROV 2-7 (Z OBARJANJEM)	42
4.4 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA IN RAČUNALNIŠKA ANALIZA CELIČNE LINIJE AGS (Z OBARJANJEM)	49
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	51
5.1 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA IN RAČUNALNIŠKA ANALIZA PARA 1 (BREZ OBARJANJA)	51
5.2 NADALJNJA OPTIMIZACIJA METOD NA VZORCU ZDRAVEGA ŽELODCA.....	52
5.3 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA IN RAČUNALNIŠKA ANALIZA PAROV 2-7 (Z OBARJANJEM)	53
5.4 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA IN RAČUNALNIŠKA ANALIZA CELIČNE LINIJE AGS (Z OBARJANJEM)	54
5.5 SKLEPI.....	55
6 POVZETEK.....	56
7 VIRI	58
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam uporabljenih tumorskih vzorcev	19
Preglednica 2: Relativni volumni nekaterih lis normalnega (par 1N) in tumorskega (par 1T) vzorca para 1.....	37
Preglednica 3: Identifikacija nekaterih lis para 1 z MALDI-TOF-MS.	37
Preglednica 4: Koncentracija in absorbanca pri 560 nm za vzorec zdravega želodca, oborjenega z acetonom (Zac), trikloroocetno kislino (Ztca) ali amonijevim sulfatom (Zams) ter raztopljenega v pufru L1 iz 10 mM PBS-a, 10 mM glicerola, 10 mM EDTA in 0,01% NP 40 (A ₅₆₀ 1 in C1) ali v pufru L2 iz 9 M uree in 4% CHAPS-a (A ₅₆₀ 2 in C2)	40
Preglednica 5: Masa uporabljenih koščkov tkiv želodcev, absorbanca pri 560 nm (A _{560nm}) in koncentracija njihovega proteinskega ekstrakta po obarjanju z acetonom in raztopitvi oborine v raztopini 9 M uree in 4% CHAPS-a ter absorbanca pri 560 nm in koncentracija proteinskega ekstrakta celične linije AGS po obarjanju z acetonom in raztopitvi oborine v raztopini 9 M uree in 4% CHAPS-a.....	43
Preglednica 6: Relativni volumni dveh dodatnih lis pri parih (normalni in normalni) šestih vzorcev, analiziranih v ponovitvah.....	48
Preglednica 7: Relativni volumni nekaterih lis pri parih (normalni in normalni) šestih vzorcev.....	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Pregled 2-DE kart za želodčno tkivo (Ha in sod., 2002: 2517)	10
Slika 2: Karti topnih frakcij proteinov želodčnega tkiva (Ha in sod., 2002: 2518).....	10
Slika 3: 2-DE vzorec želodčnega tkiva (Ryu in sod., 2003: 506).	11
Slika 4: Diferencialno izražanje desmoplakina I (puščice) in prohibitina (obkrožen) v normalnih (A-C), marginalnih (D-F) in rakavih (G-I) vzorcih (Ryu in sod., 2003: 507)	11
Slika 5: 2-DE proteinska profila rakavega (A) in normalnega (B) želodčnega tkiva ter povečani prikaz diferencialnega izražanja za nekatere proteine (C) (Nishigaki in sod., 2005: 3208)	12
Slika 6: Pregled celotnega gela bolnika z gastričnim adenokarcinomom ter podrobnejši prikaz diferencialnega izražanja nekaterih proteinov v tumorskem in normalnem želodčnem tkivu (Yoshihara in sod., 2006)	14
Slika 7: 2-DE analiza zdравega (A) in rakavega (B) želodčnega tkiva ter povečava prikaza diferencialnega izražanja katepsina B (Ebert in sod., 2005:1698)	15
Slika 8: 2-DE geli proteinskega ekstrakta intestinalnega in difuznega tipa rakavega tkiva v primerjavi z normalnim (levo) ter izsek iz 6 parov gelov rakavega in normalnega tkiva za prikaz diferencialnega izražanja s puščico označenega proteina CLIC1 (desno) (Chen in sod., 2007: 160)	16
Slika 9: Fotografija celic celične linije AGS v petrijevki z dne 13. 02. 2007.....	20
Slika 10: Prikaz spremembe barve delovnega reagenta (zeleno) ob dodatku vzorca (vijolično)	24
Slika 11: Izoelektrični fokusirni sistem s keramičnimi nosilci Ettan TM IPGphor TM	25
Slika 12: Keramični nosilci v škatli za shranjevanje	25
Slika 13: Keramični nosilec z odprtim pokrovom.....	26
Slika 14: Sistem Ettan TM DALTsix s hladilnikom in usmernikom EPS 601	28
Slika 15: Steklene plošče in nosilec, ki ga vstavimo v elektroforezno kad skupaj z geli	29
Slika 16: Stresalnik s kadičko, kjer je potekalo barvanje gelov	30
Slika 17: 2-DE gel normalnega vzorca para 1	33
Slika 18: 2-DE gel tumorskega vzorca para 1	34

Slika 19: Poravnava 2-DE gelov para 1 (levo) in zaznavanje lis (desno)	35
Slika 20: Profil izražanja lise številka 3 para 1	35
Slika 21: Povečan prikaz diferencialnega izražanja lise številka 3 (debelejše obkrožena lisa) para 1.....	36
Slika 22: Preglednica z vrednostmi za relativne volumne lis in razmerja relativnih volumnov za tumorski in normalni vzorec	36
Slika 23: Primer umeritvene krivulje, pripravljene z različnimi koncentracijami BSA	38
Slika 24: Poskus 2-DE analize proteinov, izoliranih s pufrom za lizo L2 (9 M urea, 4% CHAPS)	38
Slika 25: Primer 2-DE gela pri vzorcu s podaljšanim časom centrifugiranja	39
Slika 26: Vzorec iz zdravega želodca, oborjen z acetonom	40
Slika 27: Vzorec iz zdravega želodca, oborjen s trikloroocetno kislino (TCA).....	41
Slika 28: Vzorec iz zdravega želodca, oborjen z nasičeno raztopino amonijevega sulfata	41
Slika 29: Primer 2-DE gela s t.i. kometnimi repki zaradi premalo SDS-a	42
Slika 30: 2-DE gel prve ponovitve normalnega vzorca para 5.....	44
Slika 31: 2-DE gel druge ponovitve normalnega vzorca para 5.....	44
Slika 32: 2-DE gel prve ponovitve tumorskega vzorca para 5	45
Slika 33: 2-DE gel druge ponovitve tumorskega vzorca para 5	45
Slika 34: Poravnani 2-DE geli para 5 v ponovitvah z zaznanimi lisami	46
Slika 35: Profil izražanja lise številka 3 para 5 v ponovitvah	46
Slika 36: Povečan prikaz diferencialnega izražanja lise številka 3 (debelejše obkrožena lisa) para 5 v ponovitvah.....	47
Slika 37: Preglednica z vrednostmi za relativne volumne lis in razmerja relativnih volumnov za tumorski in normalni vzorec v ponovitvah.....	47
Slika 38: 2-DE gel celične linije AGS.....	50

KAZALO PRILOG

Priloga A: 2-DE geli vzorcev želodčnega tkiva para 2 v ponovitvah.

Priloga B: 2-DE geli vzorcev želodčnega tkiva para 3 v ponovitvah.

Priloga C: 2-DE geli vzorcev želodčnega tkiva para 4 v ponovitvah.

Priloga Č: 2-DE geli vzorcev želodčnega tkiva para 2 v ponovitvah.

Priloga D: 2-DE geli vzorcev želodčnega tkiva para 6 v ponovitvah.

Priloga E: Računalniško poravnani geli parov 2 (prva slika levo), 3 (druga slika desno), 4

(tretja slika levo), 6 (četrta slika desno) in 7 (peta slika levo)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ANXA 5	aneksin 5
APOA1BP	ApoA-I vezavni protein
APS	amonijev persulfat
AST	aspartat aminotransferaza
ATP	adenozin trifosfat
BPNT1	bifosfat 3'-nukleotidaza
BSA	goveji serumski albumin
CA	karbonska anhidraza
CHAPS	3-[(3-kloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonat
CLIC1	kloridni intracelularni kanalni protein 1
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
EB1	član 1 RP/EB družine
ECACC	Evropska zbirka celičnih kultur (angl. European Collection of Cell Cultures)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ESI-MS	masna spektrometrija z elektrorazpršilno ionizacijo
FBS	plodov goveji serum (angl. fetal bovine serum)
FOV	foveolin
FTH1	težka veriga feritina
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GST	glutation S-transferaza
HMG-1	nehistonski kromosomalni protein
IAA	jodoacetamid
ICGEB	Mednarodni center za gensko inženirstvo in biotehnologijo (angl. International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology)
IEF	izoelektrično fokusiranje
IPG	imobiliziran pH-gradient
kVh	kilovoltna ura

LOH	izguba heterozigotnosti
MALDI-TOF	identifikacija proteinov z masno spektrometrijo z ionizacijo v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem na čas preleta ionov
miliQ	deionizirana voda
MnSOD	manganova superoksid dismutaza
MPI	manoza-6-fosfat izomeraza
mRNA	sporočilna ribonukleinska kislina
MSI	mikrosatelitska nestabilnost
MS	masna spektrometrija
MS/MS	tandemska masna spektrometrija
MW	molekulska masa
NNMT	nikotinamid N-metiltransferaza
NP 40	nonidet P 40
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphate buffered saline)
PGK-1	fosfoglicerat kinaza 1
pI	izoelektrična točka
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
SDS	natrijev dodecil sulfat
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom
ST	sobna temperatura
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilentiamin
TCA	trikloroocetna kislina
UV	ultravijoličen
vrt./min	vrtljajev na minuto
v/v	volumsko volumski
w/v	utežno volumski
2-DE	dvodimenzionalna gelska elektroforeza
2D-DIGE	dvodimenzionalna diferenčna gelska elektroforeza

SLOVARČEK

Dvodimenzionalna elektroforeza

tehnika za ločevanje proteinov v dveh dimenzijsah, ki jo sestavlja izoelektrično fokusiranje in poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom

Izoelektrično fokusiranje

prva dimenzija 2-DE, ki ločuje proteine glede na njihovo izoelektrično točko (pI)

Masna spektrometrija

tehnika, ki omogoča identifikacijo proteinov z določanjem molskih mas njihovih fragmentov

Normalizacijski niz

izbor lis, uporabljen za normalizacijo kvantitet lis na gelu

SDS poliakrilamidna elektroforeza

druga dimenzija 2-DE, ki ločuje proteine glede na njihovo molekulsko maso (MW)

1 UVOD

Želodčni karcinom je ena od pogostejših oblik raka (Kuramitsu in Nakamura, 2006). V njegov večstopenjski nastanek so vpletene spremembe različnih genov, kar ima za posledico spremenjeno izražanje proteinov (Zheng in sod., 2004). Te proteine poskušamo ugotoviti in jih natančno določiti. Pri tem uporabljamo metode proteomike, kamor spada tudi dvodimenzionalna elektroforeza (2-DE).

1.1 NAMEN DELA

Za zanesljivost analize proteoma je potrebno izdelati optimiziran in ponovljiv postopek 2-DE, ki je prvi in odločilni korak v analizi. To je bil tudi eden izmed namenov našega raziskovanja, saj smo žeeli optimizirati posamezne faze 2-DE za vzorce želodčne sluznice ter nato primerjati proteine med normalnimi in tumorskimi vzorci želodčne sluznice na 2-DE gelih (diferenčni elektroferogrami). Optimizirani postopek 2-DE smo žeeli preizkusiti še na proteinskih ekstraktih celične linije želodčnega karcinoma.

1.2 HIPOTEZI

Postavljeni sta bili naslednji hipotezi:

- Med normalnim in tumorskim vzorcem želodčnega tkiva obstajajo razlike v izražanju proteinov.
- Te razlike je mogoče ugotoviti z orodji proteomike: 2-DE in masno spektrometrijo (MS).

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAK

Rak je posledica nepravilnega delovanja (zloma) regulatornih mehanizmov, ki nadzorujejo obnašanje normalne celice (Cooper, 2000). To se kaže kot neprestana in nekontrolirana proliferacija celic in nastanek tumorja. Ta je lahko benigen ali malign. Benigni ostane na svoji izvirni lokaciji, ne vdira med okoliške normalne celice in se ne razširja. Ponavadi se ga da operativno odstraniti. V nasprotju z njim je maligni sposoben tako vdora kot razširjanja (metastaze), kar otežuje zdravljenje z operacijo. Zaradi teh lastnosti praviloma le takšnemu tumorju pravimo rak.

Oba tipa tumorjev lahko klasificiramo glede na celice, iz katerih nastaneta. Karcinom nastane iz epitelijskih celic (90 % vseh človeških rakov), sarkom je tumor veziva in opornih tkiv (mišice, kosti...), levkemija in limfom (8 % vseh človeških rakov) pa nastaneta iz krvotvornih celic in celic imunskega odziva. Dalje lahko tumorje klasificiramo tudi glede na tkivo izvora in tip vpletenih celic.

Ena osnovnih značilnosti raka je razvoj tumorja iz ene same celice, ki se začne abnormalno obnašati. Seveda pa to ne pomeni, da ima le-ta takoj vse lastnosti, potrebne za rakovo celico. To se zgodi z razvojem preko mnogih stopenj, ki vključujejo mutacijo in selekcijo celic s povečano kapaciteto za proliferacijo, preživetje, invazijo in metastaziranje.

Spojinam, ki inducirajo raka, pravimo karcinogene in lahko bodisi poškodujejo DNA in povzročijo onkogene mutacije, bodisi stimulirajo celično proliferacijo. K prvim uvrščamo npr. ultravijolično (UV) sevanje, tobačni dim in aflatoksine, k drugim npr. estre forbola.

Rakave celice se lahko od navadnih razlikujejo v več lastnostih:

- inhibicija delitve ni odvisna od gostote celic,
- ni kontaktne inhibicije,
- zmanjšana je potreba po ekstracelularnih rastnih faktorjih, hkrati pa lahko nekatere faktorje sintetizirajo same in tako avtostimulirajo svojo delitev,

- preko sinteze rastnih faktorjev vplivajo na nastanek novih krvnih žil (angiogeneza), s čimer si zagotovijo podporo pri rasti (kisik, hranila) ter metastaziranju (lažje vdirajo v novonastale kapilare),
- so manj adhezivne,
- lahko sintetizirajo proteaze za razgradnjo komponent iz ekstracelularnega matriksa,
- ne diferencirajo se normalno,
- niso podvržene apoptozi.

2.1.1 Rak želodca

Kljud temu, da pojavnost želodčnega raka upada, je le-ta še vedno resen zdravstveni problem, tako v Sloveniji kot drugje po svetu in pogost vzrok umrljivosti za rakiom (Parkin in sod., 2005; Jelenc, 2003). Prognoza napredovane oblike je še vedno slaba, predvsem zaradi prepozno postavljene diagnoze. Zaradi svoje heterogenosti pa predstavlja zanimiv model za študije karcinogeneze in tumorogeneze. Odkrili so mnogo molekularnih nepravilnosti, kot so mikrosatelitska nestabilnost (MSI, angl. microsatellite instability), inaktivacija tumorje zaviralnih (supresorskih) genov zaradi mutacije ali izgube heterozigotnosti (LOH, angl. loss of heterozygosity), aktivacija onkogenov, reaktivacija telomeraz (Zheng in sod., 2004). Po splošnem mnenju so ene najpogostejših genetskih sprememb locirane na tumorskem supresorskem genu p53, zato se z njim ukvarja veliko študij, npr. Juvan in sod. (2007).

Glavna oblika, ki se pojavlja, je adenokarcinom, ostali so še limfomi, sarkomi, karcinoidni tumorji (Smith in sod., 2006). Sicer pa lahko želodčne rake klasificiramo na različne načine, večinoma glede na strukturne, rastne in invazivne vzorce (Ming, 1998). Prevladuje razdelitev na dva glavna histološka tipa po Laurenu: intestinalni oz. dobro diferencirani in difuzni oz. slabo diferencirani. Prvi je rezultat zaporedja dobro definiranih omejenih prekurzorskih lezij, ki so napredovale iz kroničnega gastritisa preko atrofičnega gastritisa do intestinalne metaplazije, displazije in dalje do zgodnje oblike raka, invazivnega karcinoma in metastaz. Pri drugem teh dobro definiranih lezij ni (Lauren, 1965, cit. po Rajčevič, 2005). Obstaja še tretji mešani tip, ki je heterogen (Ming, 1998). Ming (1998) je želodčne karcinome razdelil po rasti in invazivnosti na ekspanzivne in infiltrativne. Prvi

rastejo z ekspanzijo kohezivnih tumorskih mas z dobro definirano periferijo, pri slednjem pa celice rastejo neodvisno v razpršene individualne celice ali žleze. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO, angl. World Health Organization) je adenokarcinome histološko razdelila na papilarni, tubularni, pečatnocelični in mukozni tip, dalje pa še glede na žlezno (glandularno) diferenciacijo (Ming, 1998). Klasifikacija TNM upošteva globino tumorske infiltracije (stopnje Tis, T1, T2, T3, T4), prizadetost bezgavk (stopnje N1, N2, N3) in prisotnost oddaljenih metastaz (M0 in M1). Na podlagi te razdelitve lahko določimo stopnje 0, I, II, III in IV (Jelenc, 2003).

Na nastanek želodčnega raka vplivajo različni faktorji, tako genetski kot okoljski. K slednjim spadajo prehrana (Serafini in sod., 2002), alkohol, kajenje (Sasazuki in sod., 2002; Sjödahl in sod., 2006), vlogo pa naj bi imela tudi kronična infekcija s *Helicobacter pylori*. Gre za po Gramu negativno spiralno mikraerofilno bakterijo s 4 do 6 flageli. Ti so zaščiteni z ovojem in omogočajo premikanje skozi mukozno plast. Kolonizira želodce več kot polovice svetovne populacije, v takšnem okolju pa lahko prezivi tudi zaradi encima ureaza in urea transportnega proteina. Okužbi lahko sledijo različni vzorci gastritis, nekateri s povišanim tveganjem za želodčni rak. Do razlik lahko pride zaradi variiranja med sevi, še posebej pri virulenčnih faktorjih (proteini CagA, VacA, BabA), ter predvsem zaradi okoljskih in gostiteljskih genetskih dejavnikov (polimorfizmi nekaterih genov) (Smith in sod., 2006).

2.1.2 Celične kulture

Širok spekter živalskih in rastlinskih celic lahko gojimo v celičnih kulturah. To omogoča študije celične rasti in diferenciacije, pa tudi izvajanje genskih manipulacij za ugotavljanje strukture in funkcije različnih genov. Večina živalskih celic se pritrdi na plastično posodo in tako raste. Medij za vzdrževanje je precej kompleksnejši od npr. bakterijskega gojišča, saj vsebuje soli, glukozo, aminokisline, vitamine in dostikrat še serum kot vir polipeptidnih rastnih faktorjev za stimulacijo celične delitve. Velik vpliv pri njegovem razvoju je imel Harry Eagle, ki je leta 1955 opisal prvo definirano gojišče za rast živalskih celic (Eagle, 1955, cit. po Cooper, 2000). Prva kultura iz tkiva se imenuje primarna. Raste do prekritja površine posode. Lahko jo precepimo in tako dobimo sekundarno, terciarno itd. kulturo.

Vendar pa normalnih celic ne moremo tako gojiti v neskončnost. Zato so zelo uporabne celice iz tumorjev, ki tvorijo t.i. nesmrtnе celične linije (Cooper, 2000). Ena takšnih je linija iz človeškega želodčnega adenokarcinoma (Barranco in sod., 1983).

2.2 PROTEOMIKA

Proteomika je skovanka besed protein in genomika, pomeni pa analizo celotnih proteinskih ekstraktov celic, tkiv ali organov (Wittman-Liebold in sod., 2006). Proteom je popoln niz proteinov, najdenih v danem celičnem tipu v kateremkoli danem stanju (Brusic in sod., 2007). Za razliko od genomskeh podatkov, ki popisujejo statično stanje, je proteom potreben za razumevanje dinamičnih procesov v celicah. Razlikuje se med tkivi, različnimi stanji razvoja bolezni in kaže razlike v proteinskem izražanju med zdravljenjem. Za identificiranje specifičnih proteinov s spremenjenim izražanjem v različnih dinamičnih situacijah, je potrebno preučiti vzorec proteinskega izražanja celotnega proteoma pri omenjenih razmerah. Takšni proteini namreč služijo kot novi biomarkerji (Wittman-Liebold in sod., 2006).

Za analizo proteoma se proteomika poslužuje vrste različnih tehnik, osnovne pa so:

- Ločevanje proteinov z 2-DE, ki je sestavljena iz izoelektričnega fokusiranja (IEF), kjer se proteini ločijo glede na izoelektrično točko (pI), in poliakrilamidne gelske elektroforeze z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE), kjer se ločijo glede na molekulsko maso (MW).
- Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo (MS) z ionizacijo v matriksu, desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem na čas preleta ionov (MALDI-TOF-MS, angl. matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight) ali z masno spektronomijo z elektrorazpršilno ionizacijo (ESI-MS, angl. electrospray ionisation) ter N-terminalnim Edmanovim sekvenciranjem.
- Upravljanje in interpretacija z dobljenimi podatki z orodji bioinformatike.

2.2.1 Ločevanje proteinov z 2-DE

Metodo je razvil O'Farrell (1975), skozi čas pa se je izpopolnjevala. Kot že ime pove,

proteine ločimo v dveh dimenzijah. Najprej se med IEF ločijo glede na izoelektrično točko. Proteini so lahko neto pozitivno nabiti, negativno nabiti ali nevtralni (izoelektrična točka), kar se spreminja v odvisnosti od pH okolja. Med fokusiranjem se premikajo pod vplivom električnega polja v traku s pH-gradientom in postajajo vedno manj nabiti, dokler se ne ustavijo v točki, kjer je njihov naboј 0. Druga dimenzija je SDS-PAGE, kjer ločimo proteine glede na molekulsko maso. To naredimo tako, da jih negativno nabijemo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS), zaradi česar se nato premikajo proti anodi. Pri tem morajo potovati po matriksu gela, ki nastane s polimerizacijo akrilamida in N,N-dimetil-bisakrilamida (v nadaljevanju bisakrilamid) in vsebuje pore. Večji proteini potujejo počasneje, na razpon ločenih mas pa lahko vplivamo z gostoto gela in pogoji elektroforeze (GE Healthcare, 2004).

2.2.2 Identifikacija proteinov

Masna spektrometrija je dragoceno orodje pri identifikaciji proteinov in njihovih peptidnih fragmentov. Gel, ki ga dobimo kot rezultat 2-DE, vsebuje proteine v obliki lis. Iz njega lahko želeno liso izrežemo in razgradimo s tripsinom. Dalje imamo več možnosti. Peptidne fragmente lahko zmešamo z matriksom iz nizkomolekularne organske kisline in jih nato ioniziramo z laserskim žarkom. Peptidni ioni so usmerjeni v dolgo cev, kjer se različno premikajo glede na svojo maso in naboј. Meri se njihov čas prihoda k detektorju. Tako deluje MALDI-TOF-MS. Druga možnost je ESI-MS, kjer peptidno mešanico v raztopini injiciramo in razpršimo v ionski vir instrumenta. Lahko se poslužimo tudi uporabe tandemske masne spektrometrije (MS/MS), kjer se dobljeni peptidni ioni še dalje razgradijo. Za identifikacijo proteinov lahko uporabimo tudi N-terminalno Edmanovo sekvenciranje. Degradacija se dogaja v sekvenatorju, ki avtomatično razgrajuje proteine in peptide z njihovega N-terminalnega konca s kemičnim postopkom. Produkte navadno ločimo in identificiramo z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC). Posebno vrednost ima za *de novo* sekvenciranje (Wittman-Liebold in sod., 2006).

2.2.3 Bioinformatika

Proteomika je za upravljanje in interpretacijo velikih količin podatkov, ki so rezultat

analize proteinov, odvisna od bioinformatike. Ta veda vključuje različne pristope za sekvenčno analizo, iskanje po podatkovnih bazah sekvenc, napoved proteinske strukture, brskanje po podatkih in literaturi za funkcionalne lastnosti proteinov... Obstaja že kar nekaj programskih oprem za to področje (ImageMaster2D Platinum, Msight, InsPecT, Aldente, DeNovoX, RelEx, MS-Pattern, Entrez, SPLASH), razvoj pa je še le v zgodnji fazici (Brusic in sod., 2007).

2.3 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA V PRAKSI

2.3.1 Ustaljeni postopki 2-DE

Metoda in nekatere ustaljene opcije so opisane v GE Healthcareovem priročniku za 2-DE (GE Healthcare, 2004). Za začetek je potrebna priprava vzorca: odvzem, razbitje celic, pridobitev proteinov v raztopino, odstranjevanje motečih snovi, shranjevanje. Metode, ki jih že v tem delu izberemo, so odvisne od samega vzorca in vplivajo na končen rezultat (Wittman-Liebold in sod., 2006). Najbolj ustaljen izbor za pripravo tkiva je trenje v terilnici s pestilom in tekočim dušikom, dobljenemu prahu pa dodamo pufer za lizo iz 9 M uree, 4% (w/v) 3-[(3-kloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonata (CHAPS), 40 mM ditiotreitol (DTT) in 2% (v/v) IPG pufra (GE Healthcare, 2004). Pri merjenju proteinske koncentracije pa se pojavi problem zaradi interferirajočih spojin v pufrih. To se da rešiti bodisi z izogibanjem posameznim spojinam, bodisi z drugače prilagojenim merjenjem koncentracije, kot ga je opisal npr. Ramagli (1999).

Samo fokusiranje lahko izvajamo v različnih napravah (Ettan IPGphor, Multiphor), z njim prilagojenimi postopki. Danes uporabljamo predvsem trakove s posušenim gelom, ki imajo imobiliziran pH-gradient (IPG trakovi). Razlikujejo se tako po dolžini kot po pH-območju, vsi pa morajo biti pred uporabo rehidrirani (Wittman-Liebold in sod., 2006). Ustaljena rehidracijska raztopina vsebuje enake komponente kot ustaljen pufer za lizo, a v malenkost drugačnih koncentracijah (8 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 0,5-2% (v/v) IPG pufer, 40 mM DTT, sled bromofenolmodrega). Obstajajo tudi okvirna navodila za sam protokol fokusiranja, točne čase pa je potrebno določiti empirično (GE Healthcare, 2004).

Naslednja faza je ekvilibracija, kjer s SDS-om nabijemo proteine (pri čemer se ustvarijo negativno nabiti kompleksi) in jih pripravimo na drugo dimenzijo (Wittman-Liebold in sod., 2006). Ustaljena ekvilibacijska raztopina je iz 6 M uree, 30% (v/v) glicerola, 50 mM Tris-HCl pufra s pH=8,8, 0,002% bromofenolmodrega in 2% (w/v) SDS-a, čemur je v prvi fazi dodan 1 % (w/v) DTT-ja, v drugi pa ga nadomesti 2,5 % (w/v) jodoacetamida (IAA). Vsaka faza traja vsaj 10 min (GE Healthcare, 2004).

Sama elektroforeza je lahko navpična (npr. sistemi EttanDALT) ali položna (npr. Multiphor), z različnimi pufrskimi sistemi, med njenim potekom pa kompleksi protein-SDS potujejo proti anodi. Ustaljeni pufrski sistem je tris-glicinski, in sicer iz 25 mM Trisa, 192 mM glicina ter z dodanim 0,1 % SDS-a. Izbiro imamo tudi pri gelih: lahko kupimo že narejene ali jih vlijemo sami, izbiramo lahko med različnimi koncentracijami akrilamida in bisakrilamida ter njunim razmerjem (standardno za proteine je 37,5 : 1), odločimo se lahko za različno velikost in debelino (GE Healthcare, 2004).

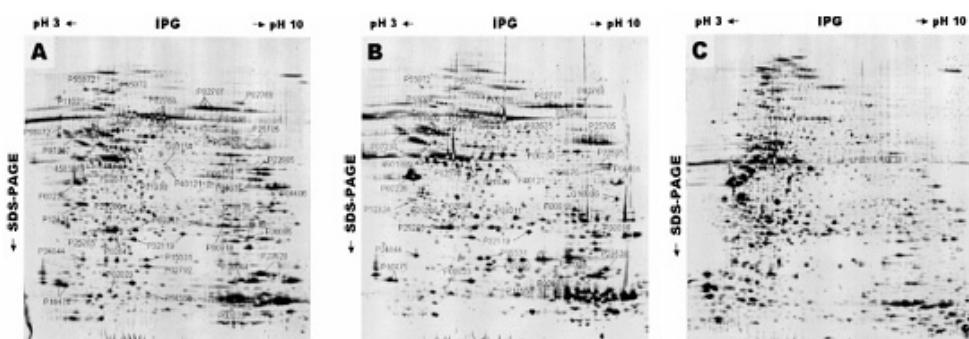
Za vizualizacijo je potrebno gele pobarvati. Uporabljamo predvsem barvanje s Coomassie brilliant blue (CBB) za preparativne gele ter bolj občutljivo barvanje s srebrom za analitske gele. Za še večjo občutljivost lahko uporabimo barvila s fluorofori (npr. barvila SPYRO). Posebna oblika je diferenčna gelska elektroforeza 2D-DIGE, kjer s fluorescentnimi barvili Cy3 in Cy5 označimo dve ali več celičnih stanj pred samo 2-DE. Celične lizate nato zmešamo in nanesemo na en gel, pri čemer se zmanjša variabilnost med geli. Alternativna možnost je prenos proteinov na membrano (Wittman-Liebold in sod., 2006). Več o pozitivnih in negativnih straneh različnih metod barvanj proteinov je napisano v preglednem članku Millerja in sod. (2006).

Po digitalizirjanju gelov z optičnim čitalcem je na vrsti računalniška analiza. Tudi tu je na voljo več programov, npr. ImageMaster2D Platinum, PDQuest, Flicker (Brusic in sod., 2007).

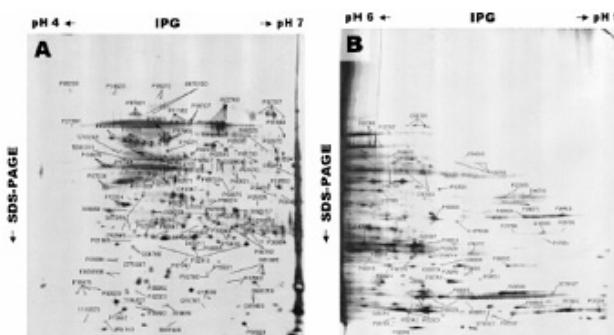
2.3.2. Človeški želodec in 2-DE

V zadnjih letih se je pojavilo že kar nekaj raziskav človeškega želodca z 2-DE, veliko jih je

predvsem s področja Azije, kjer je ta bolezen še posebno pogosta (Kuramitsu in Nakamura, 2006). Ha in sod. (2002) iz Koreje so se raziskav lotili za vzpostavitev 2-DE kart in podatkovnih baz identificiranih proteinov. 100–200 mg vzorcev so homogenizirali v 2 ml pufra s 50 mM Tris-HCl (pH=7,2) ter mešanico proteaznih inhibitorjev (iz 1 mM AEBSF-a, 0,8 µM aprotinina, 21 µM leupeptina, 36 µM bestatina, 15 µM pepstatina A in 14 µM E-64), čemur je sledilo centrifugiranje pri 1000 x g, 5 min, za odstranitev tkivnih in celičnih ostankov. Supernatant so vzeli kot celokupni homogenat. Dalje so ga frakcionirali z ultracentrifugiranjem: supernatant je služil za topno in pelet za membransko frakcijo. Prvo so precipitirali s trikloroacetno kislino (TCA) in precipitat nato z razbijanjem z ultrazvokom raztopili v raztopini 8 M uree, 4% (w/v) CHAPS-a, 40 mM Trisa, 100 mM DTT-ja in 2% (w/v) dodatka amfolitov pH 3-10, drugo pa le sprali s PBS-om in raztopili na enak način. Oboje so pustili stati 1 h pri sobni temperaturi (ST), nato odcentrifugirali (15.000 vrt./min, 10 min) in supernatant po merjenju koncentracije z Bradfordovim reagentom uporabili za 2-DE vzorce. Po 1 mg (preparativni geli) ali do 200 µg (analitski geli) proteinov so raztopili v navedeni rehidracijski raztopini in jih fokusirali v aparatih IPGphor (18 cm trakovi) ali Protean IEF Cell (17 cm trakovi), z aktivno rehidracijo, čez noč, pri 50 V in časom fokusiranja 70 kWh. Ekvilibracijo so izvedli z ustaljeno ekvilibracijsko raztopino dvakrat po 10 min. Elektroforetsko so proteine ločili v 7,5-17,5% gradientnih poliakrilamidnih gelih v tris-glicinskem pufrskem sistemu, pod naslednjimi pogoji: 5 mA/gel 1 h, nato pa 10 mA/gel, dokler ni fronta barvila pripravovala do konca gela. Preparativne gele so pobrvali s CBB G-250 in analitske s srebrom, analizirali pa so jih s programom PDQuest. Želene lise so izrezali, razgradili s tripsinom in identificirali z MALDI-TOF-MS (od 745 lis so jih identificirali le 32,6 %). Rezultati ločbe so prikazani na slikah 1 in 2: na prvi so vidni geli različnih frakcij proteinov v pH območju 3–10 (povprečno 1400 lis/gel, 100 µg proteinov), na drugi pa le topna frakcija v dveh različnih pH-območjih (900 in 600 lis/gel, 200 µg proteinov).



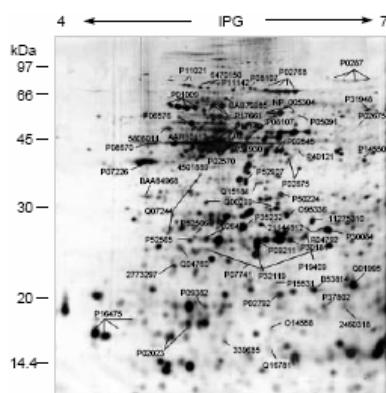
Slika 1: Pregled 2-DE kart za želodčno tkivo. A- celokupni homogenat; B- topna frakcija; C- membranska frakcija (Ha in sod., 2002: 2517).



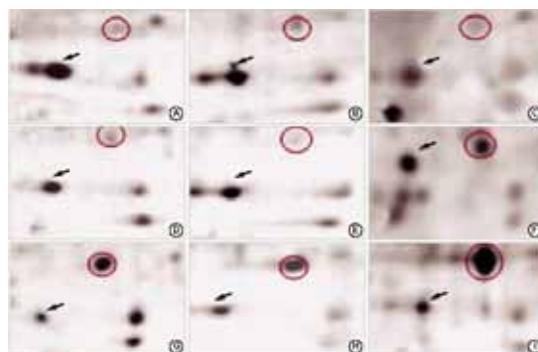
Slika 2: Karti topnih frakcij proteinov želodčnega tkiva. A- topna frakcija pri razponu pH 4-7; B- topna frakcija pri razponu pH 6-9 (Ha in sod., 2002: 2518).

Ryu in sodelavci (2003), prav tako iz Koreje, so se lotili ene stopnje višje: iskanje biomarkerjev s primerjavo tumorskih, normalnih in marginalnih (vzorci normalnega tkiva 5 cm stran od primarnega tumorja) vzorcev želodev iz 11 bolnikov. Želodčno tkivo so najprej sprali z raztopino iz 50 mM Tris-HCl (pH=7,1), 100 mM KCl, 60 mM etilendiamintetraacetne kisline (EDTA), 5,8 mM benzamidina in 0,2 mM fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF) ter ga nato liofilizirali 1 h. Po 30 mg vzorcev so nato zdrobili pod tekočim dušikom in raztopili v 100 µl pufra iz 7 M uree, 2 M tiouree, 4% CHAPS-a, 100 mM DTT-ja, 25 mM Tris-HCl, 50 mM KCl in 0,2% raztopine amfolitov pH 3-10. Dodali so tudi do 210 U DNaze in vse skupaj inkubirali 30 min pri ST. Nato so s centrifugiranjem s 13.000 vrt./min, 20 min pri 10 °C, odstranili netopen material. Koncentracijo so merili z Bradfordovim reagentom in na gel dajali po 1 mg proteinov. Za IEF so uporabili aparat Protean IEF Cell in 17 cm dolge trakove s pH-gradientom 4-7; fokusirali so do 145 kVh. Sledilo je 2 x 15 min ekvilibracije z raztopino, v katero so dodali 2 % DTT-ja. Za SDS-PAGE so uporabili 13% gele pod konstantnim tokom 30 mA. Barvali so s CBB R-250,

analizirali s programom Melanie III, identificirali pa s pomočjo baze podatkov Narodne univerze v Gyeongsangu in MALDI-TOF-MS. Rezultati so predstavljeni na slikah 3 in 4: na prvi je viden vzorec tkiva, ločen v pH-območju 4–7 (približno 1500 lis), na drugi pa diferenčno izražanje dveh proteinov v normalnih, marginalnih in rakavih vzorcih.



Slika 3: 2-DE vzorec želodčnega tkiva (Ryu in sod., 2003: 506).

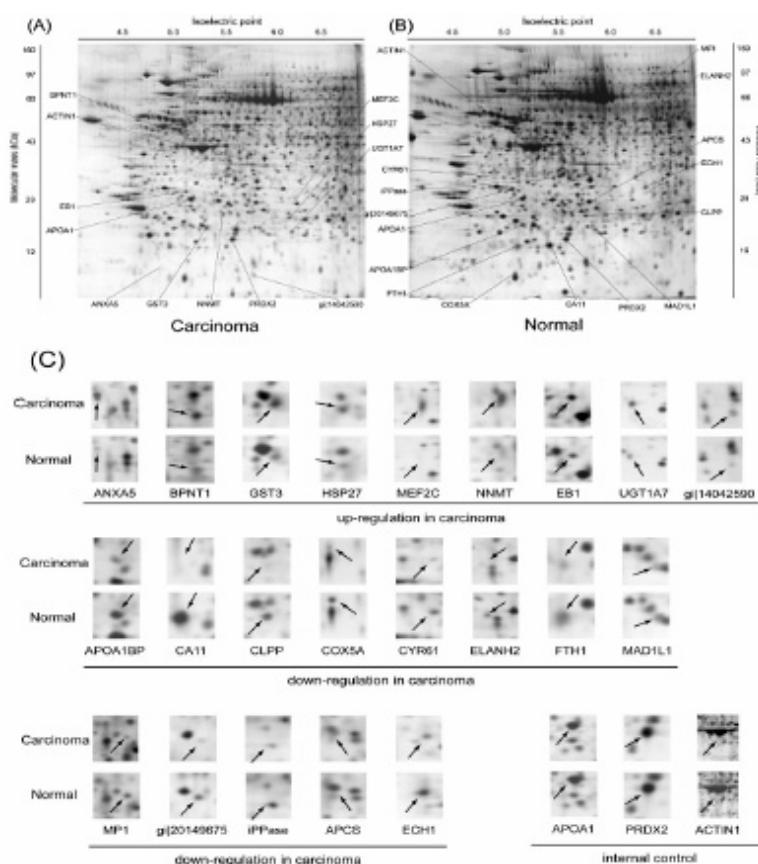


Slika 4: Diferencialno izražanje desmoplakina I (puščice) in prohibitina (obkrožen) v normalnih (A-C), marginalnih (D-F) in rakavih (G-I) vzorcih (Ryu in sod., 2003: 507).

Ob primerjavi normalnega tkiva z rakavim so odkrili, da imajo v rakavem povečano izražanje naslednji proteini: NSP3, transgelin, prohibitin, HSP 27 (angl. Heat shock 27 kDa protein) in njegove različice, protein disulfid izomeraza A3, z glukozo uravnavani protein ter neimenovani proteinski produkt. Zmanjšano izražanje v rakavem tkivu so ugotovili za naslednje proteine: apolipoprotein A-1, p20, nukleozid difosfat izomeraza A, alfa-1-antitripsin, dezmin, serumski albumin in serotransferin.

Nishigaki in sodelavci (2005) so diferencialno primerjali želodce japonskih bolnikov. Imeli so 14 tumorskih in njim ustreznih normalnih vzorcev. Po 10 mg tkiva so homogenizirali v

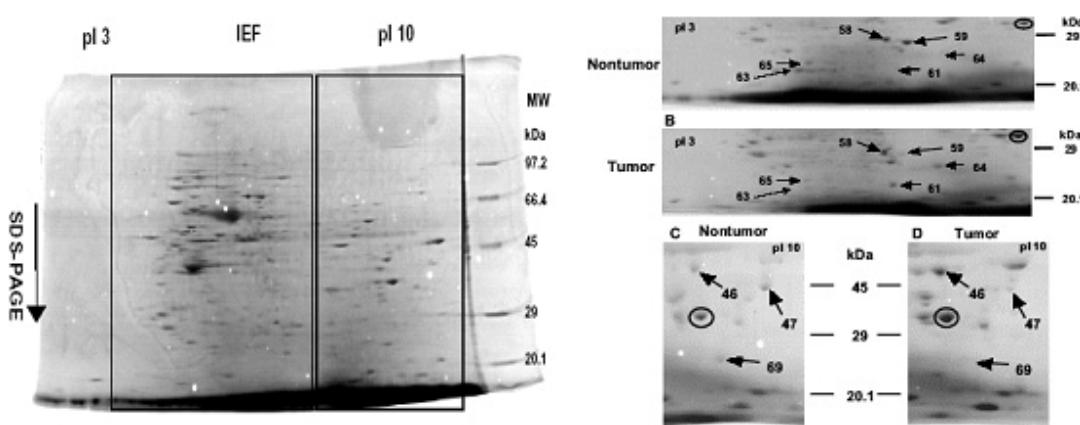
tekočem dušiku, v 40 µl pufra iz 7 M uree, 2 M tiouree, 2% CHAPS-a, 1,5% Triton-a X-100, 1% raztopine amfolitov pH 3-10, 1% DTT-ja, 5 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina in 1 mM PMSF-a. Vse skupaj so razbijali z ultrazvokom in 5 min centrifugirali pri 3000 x g. Supernatant je služil kot proteinski ekstrakt: za analizo so ga jemali po 10 µl. IEF so izvedli v sistemu Protean IEF Cell z 18 cm dolgimi trakovi, SDS-PAGE pa na 12% gelih, barvali so s srebrom in barvilom SPYRO Ruby, računalniško analizo pa izvedli s programom PDQuest. Za identifikacijo so se poslužili MALDI-TOF-MS. Kot interne standarde so uporabili 3 proteine. Vsak vzorec so analizirali v treh izvodih in za signifikantno spremembo upoštevali več kot dvakratno spremembo v intenziteti lise med več kot 30 % tumorskih vzorcev. Rezultati so predstavljeni na sliki 5: zgoraj sta vidna celotna gela proteinskih profilov normalnega in tumorskega tkiva, ločenih na pH-območju 4–7 (povprečno 1200-1300 lis/gel), spodaj pa so posamezni izseki za diferencialno primerjavo izražanja.



Slika 5: 2-DE proteinska profila rakavega (A) in normalnega (B) želodčnega tkiva ter povečani prikaz diferencialnega izražanja za nekatere proteine (C) (Nishigaki in sod., 2005: 3208).

Ob primerjavi so v rakavem tkivu ugotovili, da imajo v več kot 50 % tumorjev signifikantno povišano izražanje naslednji proteini: aneksin 5 (ANXA5), bifosfat 3'-nukleotidaza (BPNT1), z mikrotubuli povezan protein, član 1 RP/EB družine (EB1), glutation S-transferaza GST3, HSP27, MEF2C (angl. MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C), nikotinamid N-metiltransferaza (NNMT) ter neimenovani proteinski produkt. Zmanjšano izražanje pa so imeli ApoA-I vezavni protein (APOA1BP), CA11, od ATP odvisna proteolitska podenota homologa *Escherichie. coli* (CLPP), COX5A, CYR61, serinski proteazni inhibitor ELANH2, težka veriga feritina (FTH1), MAD1L1 (angl. Mitotic checkpoint protein isoform MAD1a) ter manoza-6-fosfat izomeraza (MPI).

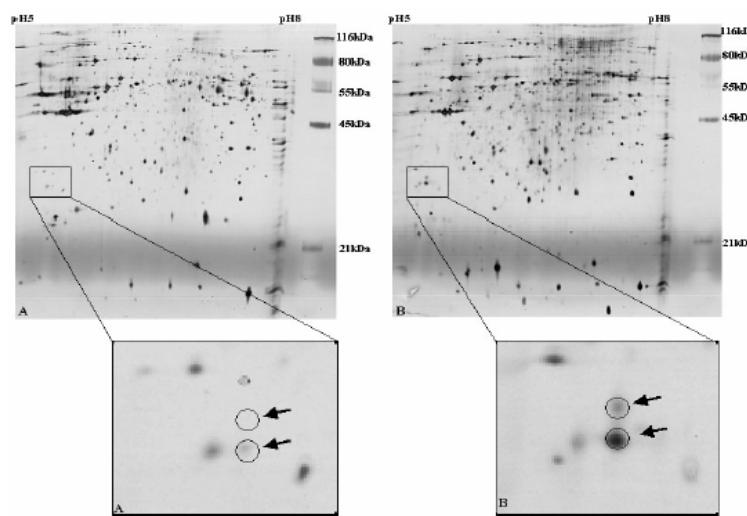
Še ene differenčne primerjave želodcev japonskih bolnikov so se lotili tudi Yoshihara in sodelavci (2006). Po 20–30 mg vzorcev, zmrznjenih v suhi metanolovi kopeli in shranjenih pri -80 °C, so homogenizirali s steklenimi kroglicami v dializnem pufru iz 5 M uree, 1 M tiouree, 10 mM NaPPi, 1,67 µl/ml 2-merkaptoetanola, 0,005% DNaze I, 0,05 mg/ml RNaze A, 20 µM leupeptina, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF-a, in 20 µM pepstatina A. Mešanico so 30 min centrifugirali pri 50.000 vrt./min in 4 °C, v supernatantu pa so določili koncentracijo proteinov z Bradfordovim reagentom; analizirali so jih po 500 µg. IEF je 18 h potekalo z naraščanjem napetosti do 700 V, in sicer pri 4 °C v 1% agaroznem gelu z dolžino 18 cm, SDS-PAGE pa 3 h na 5–15% gradientnem akrilamidnem gelu, pri 15 mA, in 2 h pri 70 mA in ST. Barvali so s CBB R-250 in dobljene gele analizirali s programsko opremo ImageMaster. Za referenco za oceno spremembe izražanja proteinov med normalnim in tumorskim tkivom so uporabili gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo (GAPDH), ker se njena raven med preiskovanimi tumorskimi in ustreznimi netumorskimi tkivi bolnikov ni razlikovala. Prav tako se ni razlikovala raven njene sporočilne ribonukleinske kisline (mRNA), kar so ugotovili z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-PCR). Rezultati so prikazani na sliki 6: na prvi je viden celoten gel rakavega vzorca, na drugem pa detajlni izseki za prikaz diferencialnega izražanja.



Slika 6: Pregled celotnega gela bolnika z gastričnim adenokarcinomom ter podrobnejši prikaz diferencialnega izražanja nekaterih proteinov v tumorskem in normalnem želodčnem tkivu (Yoshihara in sod., 2006).

Pokazali so, da se je v povprečju v tumorskem tkivu povišala raven manganove superoksid dismutaze (MnSOD), nehistonskega kromosomalnega proteina (HMG-1) in fosfoglicerat kinaze 1 (PGK-1) ter znižala raven prekurzorja foveolina (FOV), glutation S-transferaze (GST), prekurzorja aspartat aminotransferaze 2 (AST) in karbonske anhidraze I in II (CAI, CAII).

V Nemčiji so se Ebert in sod. (2005) lotili 2-DE analize vzorcev 10 bolnikov. Posebnost njihove metode je bila, da so želodčno tkivo po spiranju (50 mL RNAlater, 50 ml PBS-a, 800 ml benzamidina, 800 µl EDTA, leupeptin in Pefabloc SC), homogenizaciji, centrifugiraju in resuspendiraju v začetnem pufru, z magnetnimi zrnci s protitelesom, usmerjenim proti površinskemu antigenu epitelijskih celic, obogatili epitelijske celice oz. jih ločili od ostalih. Suspenzijo so nato centrifugirali in celične pelete lizirali s pufrom iz 7 M uree, 2 M tiouree, 4% (w/v) CHAPS-a, 100 mM DTT-ja in 2% raztopine amfolitov, z vmesnim vorteksiranjem in razbijanjem z ultrazvokom 3 x 10 s na ledu. Koncentracijo proteinov so določili z Bradfordovo metodo. Po 100 µg proteinov so fokusirali na 17 cm dolgih trakovih s pH-območji 3–6 in 5–8 ter elektroforetsko ločili na 12,5% gelih v sistemu Ettan Dalt II, kjer so uporabili tudi markersko lestvico. Pobarvali so jih s srebrom po verziji, kompatibilni z masno spektrometrijo. Analizo gelov so izvedli s programom Melanie 3.0 in z MALDI-TOF-MS analizirali lise z vsaj dvakratno razliko v izražanju in pogostostjo, višjo od 20 %. Rezultate njihove ločbe (približno 100 lis/gel) prikazuje slika 7.

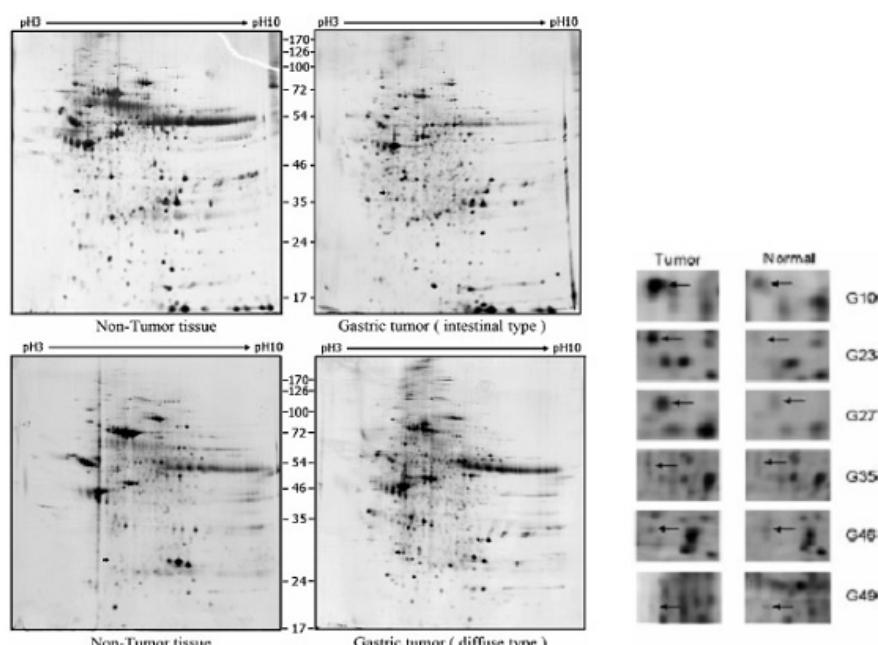


Slika 7: 2-DE analiza zdravega (A) in rakavega (B) želodčnega tkiva ter povečava prikaza diferencialnega izražanja katepsina B (Ebert in sod., 2005:1698).

V pH-območju 3–6 so v tumorskih celicah ugotovili povišano izražanje za 32 proteinov, med njimi tranzicijske ER ATPaze in miozinske lahke verige ter znižano za 48 proteinov, med njimi prekurzorja gastriksina, prekurzorja katepsina E, verige D ATP-sintaze in komponente komplementa 1 (Q subkomponente-vezavni protein). V območju 5–8 so ugotovili povišano izražanje tumorskih celic za 34 proteinov, med katerimi so podenota beta proteasomskega aktivatorja hPA28, ojačevalec osnovnega homologa in PDZ in LIM domeni proteina 1, ter znižano za 77 proteinov, kamor spadajo tudi CA11, peroksiredoksin 2, dihidrolipoamid dehidrogenaza (mitohondrijski prekurzor), elektronskotransforni-flavoprotein-ubikinon oksidoreduktaza, mitohondrijski prekurzor fumarat hidrataze, 42 kDa podenota NADH-ubikinon oksidoreduktaze, sukcinat dehidrogenazni flavoprotein in 150 kDa proteinski prekurzor, uravnavan s kisikom. Povišano izražanje v rakavih vzorcih je pri 60 % bolnikov pokazal tudi katepsin B, katerega so še dalje analizirali (imunohistokemijsko, prenos Western), ker je že bil povezan s progresijo in invazijo različnih tipov raka.

Želodčni rak je pogost vzrok smrti tudi na Tajvanu. Chen in sod. (2007) so v svoje raziskave vključili 56 bolnikov. Poleg 2-DE so rezultate potrdili s kvantitativno reakcijo RT-PCR, prenosom Western in imunohistokemijsko analizo. Vzorce tkiva so v terilnici zdrobili in z enominutnim razbijanjem z ultrazvokom solubilizirali v pufru iz 7 M uree, 2 M tiouree, 4% NP 40, 1% DTT-ja in 0,002% bromofenolmodrega. Netopni material so

odstranili s 30-min centrifugiranjem pri 12.000 x g in 4 °C. Proteinsko koncentracijo so določili z Bradfordovo metodo in za analizo jemali po 150 µg proteinov. IEF je potekalo na 13 cm dolgih trakovih v IPGphorju, SDS-PAGE pa 5 h na 10% gelih v sistemu Hoefer SE600. Barvali so s srebrom, dobljene gele analizirali s programom ImageMaster 2D Elite in želene lise identificirali z MALDI-TOF-MS. Rezultati so prikazani na sliki 8, kjer so geli ločeni glede na histološki tip po Laurenu, zraven pa so še izseki prikaza diferencialnega izražanja kloridnega intracelularnega kanalnega proteina 1 (CLIC1).



Slika 8: 2-DE geli proteinskega ekstrakta intestinalnega in difuznega tipa rakavega tkiva v primerjavi z normalnim (levo) ter izsek iz 6 parov gelov rakavega in normalnega tkiva za prikaz diferencialnega izražanja s puščico označenega proteina CLIC1 (desno) (Chen in sod., 2007: 160).

Identificirali so 271 proteinov iz 418 izbranih lis, 50 od teh se jih je diferenčno izražalo: 29 jih je imelo povišano izražanje v tumorskem tkivu (npr. aldehidna dehidrogenaza 1A1, GST P, GDP-disociacijski faktor 2, Hsp 27), 21 pa znižano (npr. aspartatna transaminaza, citosolna malatna dehidrogenaza, hemopeksin, transferin, haptoglobin). Kreatin kinaze veriga B, fosfoglicerat mutaza A in srčne L-laktat dehidrogenaze veriga H so bile povišane le pri difuznem tipu raka, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, izocitrat dehidrogenaza 1, tioredoksin peroksidaza B, uracil DNA glikozilaza, tirozin 3/triptofan 5-monooksigenazni aktivacijski protein, WDR1 in Cypa veriga A pa le v intestinalnem. Dalje so analizirali v

rakavem tkivu povišan CLIC1, in sicer s kvantitativno reakcijo RT-PCR, prenosom Western in imunohistokemijsko analizo. Ugotovili so povezavo povišanega izražanja tega proteina z metastaziranjem v limfne vozle, limfatično invazijo, perineuralno invazijo in slabšim preživetjem.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 KEMIKALIJE IN NAPRAVE

GE Healthcare (prej: Amersham Biosciences): ImmobilineTM DryStrip (pH 4–7, 24 cm), IPG buffer pH 4–7, mineralno olje, sistem EttanTM IPGphorTM II IEF, elektroforezna enota EttanTM DALTsix, usmernik Electrophoresis Power Supply EPS 601, optični čitalec ImageScanner, enota za kroženje vode MultiTemp.

Eppendorf: centrifugi 5810R in 5417C.

Fermentas: 20 x DTT.

Kemika: srebrov nitrat (AgNO_3), urea.

Merck: amonijev persulfat (APS), etanol, metanol, natrijev karbonat (Na_2CO_3), ocetna kislina.

Pierce: komplet BCATM Protein Assay Kit.

Roth: CHAPS, DTT, glicin, mešanica akrilamida in bisakrilamida Rothiphorese[®] Gel 30 (37,5 : 1).

Sigma: bromofenolmodro, EDTA, FBS, IAA, medij za celično linijo Nutrient Mixture F-12 Ham, NP 40, PBS tablete, raztopina penicilin-streptomicin, raztopina tripsin-EDTA, SDS, telečji serum FBS, TEMED, Trizma[®] baza, mešanica proteaznih inhibitorjev.

3.2 VZORCI

Za optimizacijo smo uporabili vzorec zdravega želodčnega tkiva osebe, mlajše od 35 let, ki smo ga dobili z Inštituta za sodno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Tam so želodec najprej sprali z vodo, ga vpeli in nato s postrganjem s parenhimskim nožem odvzeli epitelijsko plast celotne luminalne površine. Vzorec so dali v plastično posodo, ga označili in shranili pri -80 °C.

Za preliminarne raziskave smo uporabili tumorske vzorce želodčnega tkiva (preglednica 1) in od tumorja primerno oddaljene normalne vzorce želodčnega tkiva. Osebe so bile stare od 47 do 80 let. Vzorce smo dobili z Oddelka za patologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani, kjer so bili odvzeti po njihovem protokolu in shranjeni v plastičnih posodicah pri -80 °C.

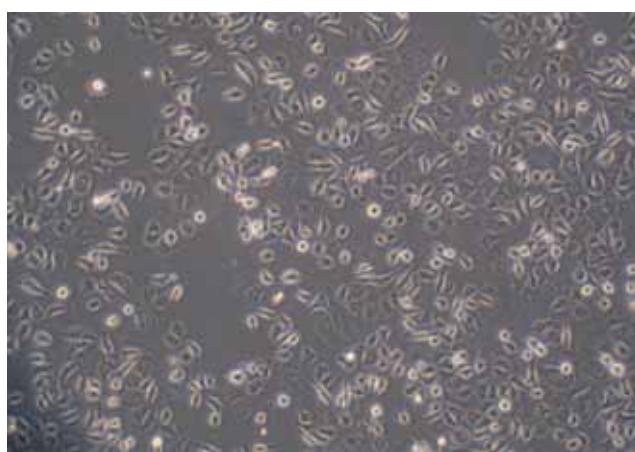
Vsi vzorci so bili anonimni, brez osebnih podatkov oz. podatkov o njihovem izvoru.

Preglednica 1: Seznam uporabljenih tumorskih vzorcev (B - bolnik) z diagnozo (Ca - carcinoma, Aca - adenocarcinoma), starostjo bolnika, velikostjo tumorja, stopnjo diferenciacije po WHO, tipom tumorja po Laurenu (i - intestinalni, d - difuzni) in Mingu (eks - ekspanzivni, inf - infiltrativni), globino tumorske infiltracije (T), prizadetostjo bezgavk (N) in prisotnostjo metastaz (M).

Biopsija	B 1	B 2	B 3	B 4	B 5	B 6	B 7
Diagnoza	Ca	Aca	Ca	Ca	Aca	Aca	Mucinous Aca
Starost (leta)	72	72	47	57	68	80	69
Velikost (cm)	10,5	3	11	4	10	5	8
WHO	zmerno	zmerno	slabo	slabo	zmerno	zmerno	zmerno
Lauren	i	i	d	d	i	i	i
Ming	eks	eks	inf	inf	eks	eks	eks
T	1	2	3	2	2	2	2
N	0	1	3	1	3	1	1
M	X	X	1	X	X	X	X

Uporabili smo tudi hiperdiploidno (večje število kromosomov kot je diploidno število) celično linijo AGS iz gastričnega adenokarcinoma 54-letne kavkazijke, ki pred resekcijo ni dobivala zdravil (slika 9). Dobavitelj je bila Evropska zbirka celičnih kultur (ECACC,

angl. European Collection of Cell Cultures).



Slika 9: Fotografija celic celične linije AGS v petrijevki z dne 13. 02. 2007.

3.3 METODE DELA

Po nekaj testnih poskusih smo pripravili proteinski ekstrakt vzorca želodca (tumorskega in normalnega) enega bolnika (par 1). Preizkusili smo pufer za lizo iz PBS-a, EDTA, glicerola in NP 40 (L1; opis sestave na strani 21), uporabili krajši čas centrifugiranja in za analizo uporabili enake volumne (10 µl) ekstraktov. Proteine smo ločili v prvi dimenziji na 24 cm dolgem traku s pH-območjem 4–7, v drugi pa z 10% poliakrilamidnim gelom. Za vizualizacijo smo uporabili barvanje s srebrovim nitratom. Nato smo uspešna gela računalniško analizirali, da smo ugotovili ali so proteini enaki in ali se kakšni diferencialno izražajo. Dalje smo nekaj lis izrezali in poslali na identifikacijo z MALDI-TOF-MS. Ker pa se ta prvotno uporabljeni postopek 2-DE kasneje pri mnogih analizah ni izkazal za dovolj ponovljivega, smo ga optimizirali na vzorcu zdravega želodca. Najprej smo poskusili z novim pufrom za lizo iz uree in CHAPS-a (L2), podaljšali čas centrifugiranja (1 h) in nato eksperimentirali z različnimi obarjanji. Ko smo bili s pripravo vzorca zadovoljni, smo povečali še koncentracijo akrilamida v gelu (12% geli) ter SDS-a v elektroforeznem pufru (0,2% SDS) in ekvilibracijski raztopini (4% SDS). Nato smo opravili 2-DE analizo 6 parov vzorcev v dveh ponovitvah in celične linije AGS. Pri celotnem delu je bilo pomembno, da se ničesar nismo dotikali brez rokavic, saj bi lahko vzorce kontaminirali z našimi keratini, ter da smo tkivne vzorce in proteinske ekstrakte vedno imeli na hladnjem

(na ledu med analizo in pri -70 °C med shranjevanjem).

3.3.1 Priprava vzorcev

3.3.1.1 Tkivo želodčne sluznice

Koščke tkiva želodčne sluznice, ki smo jih dobili z Oddelka za patologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani, smo do uporabe hrаниli v skrinji pri -70 °C. Enako smo storili z vzorcem zdravega želodca z Inštituta za sodno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Za analizo smo jih najprej stehtali in nato zdrobili v hladni terilnici s pestilom, med dolivanjem tekočega dušika. Dobljeni prah smo raztopili v enem izmed dveh (L1, L2) ohlajenih pufrov za lizo, in sicer tako, da smo dodali trikratno količino pufra v ml glede na težo koščka tkiva v mg. Dodali smo tudi mešanico proteaznih inhibitorjev, da bi preprečili proteolizo.

L1: 10 mM PBS, 10 mM EDTA, 10 mM glicerol, 0,01% NP 40

L2: 9 M urea, 4% CHAPS.

Prvi pufer za lizo (L1) je modificirana različica pufra iz nekaterih sestavin, ki jih za pripravo celokupnega proteinskega ekstrakta uporabljajo pri podjetju BioChain (BioChain Institute, 2004). Ta ne denaturira proteinov (kar omogoča njegovo uporabo še kje drugje in ne izključno za 2-DE) in vsebuje PBS za zagotavljanje primerjnega pH, EDTA za kovalentno vezavo kationov, sicer potrebnih za delovanje proteaz, glicerol za zamrzovanje in neionski detergent NP 40. Drugi pufer za lizo (L2) je klasičen pufer za lizo brez DTT-ja in amfolitov, ki bi motili merjenje koncentracije, vsebuje pa ureo, ki kot denaturant solubilizira in razvije proteine, in detergent CHAPS v obliki ionov dvojčkov, ki prav tako solubilizira vzorec in prepreči agregacijo zaradi hidrofobnih interakcij. Pri obeh pufrih je zelo pomembno, da detergent nima neto naboja, saj bi to motilo izoelektrično fokusiranje (GE Healthcare, 2004).

Po vorteksiranju je sledilo 3 x 10 s razbijanja celic z ultrazvokom z vmesnim hlajenjem in dveurna inkubacija na ledu. Za odstranitev netopnih delcev smo vzorce centrifugirali:

- 15 min pri 10.000 vrt./min in 4 °C ali
- 1 h pri 13.000 vrt./min in 4 °C.

Supernatant smo vzeli kot proteinski ekstrakt in ga ali takoj uporabili ali alikvotirali in shranili pri -70°C.

3.3.1.2 Celična linija AGS

Celično linijo AGS smo gojili v plastičnih stekleničkah ali petrijevkah pri 37 °C v mediju F-12 Ham, z dodanimi 10 % FBS-a in 1 % 100x raztopine penicilina-streptomicina. Precepljali smo jih na 2 do 3 dni oz. ko so prerasle 80-90 % dna: najprej smo odlili stran medij in celice sprali z malo 1x PBS-a. Nato smo dodali raztopino tripsina z EDTA (3 ml na posodico) in inkubirali 5 min pri 37 °C. Ko so se celice odlepile od dna, smo jim dodali gojišče (3 ml na posodico) za inhibicijo tripsina. Po 1 ml mešanice smo nato nacepili v novo posodico s 6 ml svežega medija.

Za izolacijo proteinov smo mešanico celic, tripsina in gojišča najprej centrifugirali 5 min pri 1000 vrt./min in sobni temperaturi (ST), da smo odstranili medij in tripsin. Supernatant smo odlili in usedlino sprali z 1x PBS-om ter ponovno centrifugirali pod enakimi pogoji. Supernatant smo ponovno odlili in usedlino celic lizirali s pufrom, ki je vseboval 10 mM PBS, 10 mM EDTA, 10 mM glicerol, 0,01% NP 40 (L1). Na 1 volumsko enoto celic smo dodali 3 volumske enote pufra. Za zaščito pred proteolizo smo dodali še mešanico proteaznih inhibitorjev. Celice smo v nadaljevanju razbijali z ultrazvokom 3 x 10 s, z vmesnim hlajenjem. Dobljeno mešanico smo alikvotirali in shranili pri -70 °C. Ko smo jo želeli uporabiti za analizo, smo jo najprej centrifugirali 15 min pri 10.000 vrt./min in ST in supernatant uporabili kot proteinski ekstrakt.

3.3.1.3 Odstranjevanje motečih snovi

Vzorec lahko vsebuje moteče snovi (npr. nukleinske kisline, lipide, polisaharide, soli), ki motijo nadaljnjo analizo. Odstranimo jih lahko z več metodami, vsaka ima svoje prednosti in slabosti. Ena izmed njih je obarjanje, katerega glavna slabost je morebitna izguba proteinov, bodisi ker nekateri ostanejo topni, bodisi ker se pelet težko raztopi. Temu smo

se sprva žeeli izogniti, a nam zaradi slabe ponovljivosti vzorcev lis na gelih ni preostalo drugega. Preizkusili smo 3 različice: obarjanje z acetonom, trikloroocetno kislino (TCA) ali nasičeno raztopino amonijevega sulfata.

Pri obarjanju z acetonom odstranimo organsko topne kontaminante, hkrati pa tudi takšne proteine (GE Healthcare, 2004). Izvedli smo ga tako, da smo eni volumski enoti vzorca dodali štiri volumske enote acetona, ohlajenega na -20 °C. Vse skupaj smo za 2 h inkubirali pri -20 °C in nato 10 min centrifugirali pri 14.000 vrt./min in na sobni temperaturi (ST). Pelet smo 15 min sušili na zraku in nato raztopili v raztopini 9 M uree in 4% CHAPS-a.

Obarjanje s trikloroocetno kislino (TCA) je znano predvsem po težki resolubilizaciji nastalega precipitata, možne pa so tudi degradacije ali modifikacije proteinov (GE Healthcare, 2004). Izvedli smo ga tako (Coachman in sod., 2002), da smo eni volumski enoti vzorca dodali eno volumsko enoto 20% TCA, inkubirali 30 min na ledu in 10 min centrifugirali s 14.000 vrt./min pri ST. Pelet smo sprali s približno 200 µl hladnega acetona in 5 min centrifugirali s 14.000 vrt./min pri ST. Spiranje in centrifugiranje smo ponovili, pelet sušili 15 min na zraku in ga raztopili v raztopini 9 M uree in 4% CHAPS-a.

Pri obarjanju z nasičeno raztopino amonijevega sulfata proteine obarjamo s povečevanjem koncentracije te soli. Pri tem odstranimo npr. nukleinske kisline. Slaba stran metode je, da nekateri proteini ostanejo topni tudi pri visoki koncentraciji soli in da lahko le-ta moti IEF (GE Healthcare, 2004). Izvedli smo jo tako (Wang, 1996), da smo vzorcu po kapljicah dodajali nasičeno raztopino amonijevega sulfata do tvorbe oborin in vse skupaj inkubirali 20 min. Nato smo vzorce 10 min centrifugirali s 14.000 vrt./min pri ST, pelet 15 min sušili na zraku in ga raztopili v raztopini 9 M uree in 4% CHAPS-a.

3.3.1.4 Merjenje koncentracije proteinov

Za merjenje koncentracije smo uporabili komplet BCA™ Protein Assay Kit in postopali po navodilih proizvajalca. Metoda kombinira redukcijo Cu²⁺ do Cu¹⁺ s proteinom v alkalnem mediju s kolorimetrično detekcijo Cu¹⁺ z reagentom, ki vsebuje bicinkoninsko kislino. To

se kaže kot sprememba barve delovnega reagenta iz zelene v vijoličasto, kar je prikazano tudi na sliki 10: v prvi in peti epruveti je le delovni reagent, v ostalih pa še vzorec različnih koncentracij.



Slika 10: Prikaz spremembe barve delovnega reagenta (zeleno) ob dodatku vzorca (vijolično).

V epruveti smo zmešali po 1 ml delovnega reagenta (iz 50 enot reagenta A, ki vsebuje bicinkoninsko kislino in 1 enoto reagenta B, ki vsebuje bakrov sulfat) s 5 µl vzorca, razredčenega v 45 µl deionizirane vode (miliQ). Vzorec smo redčili, ker bi sicer bila nastala barva premočna. Epruvete smo inkubirali 30 min pri 37 °C in nato zmerili absorbanco pri 560 nm (A_{560}). Za slepi vzorec smo uporabili delovni reagent s puščom za lizo brez vzorca. Pri pripravi umeritvene krivulje smo po 1 ml delovnega reagenta dodali po 50 µl govejega serumskega albumina (BSA) različnih koncentracij.

3.3.2 Izoelektrično fokusiranje (IEF)

Proteine smo ločili glede na njihovo izoelektrično točko (pI), v sistemu IPGphor™ II IEF (slika 11), ki omogoča hkratno fokusiranje 6 vzorcev. Ima dve zlati elektrodi, med katerima je ustvarjeno električno polje, ki vpliva na gibanje proteinov. Visok pH se nahaja na katodni strani, nizek pa na anodni, tako da se pozitivno nabiti proteini pomikajo h katodi in negativni k anodi. Medtem postajajo zaradi pH-gradienta vse manj nabiti, dokler ne postane njihov naboj nevtralen, in se ustavijo.



Slika 11: Izoelektrični fokusirni sistem s keramičnimi nosilci EttanTM IPGphorTM.

Za ločevanje smo uporabili 24 cm dolge trakove z imobiliziranim pH-gradientom (IPG) in razponom pH od 4 do 7, ki jih je bilo najprej potrebno rehidrirati. IPGphorTM nam ponuja možnost izvajanja rehidracije in samega fokusiranja v posebnih keramičnih nosilcih (sliki 12 in 13) brez menjave ali prelaganja IPG trakov. Vzorec lahko dodamo že sami rehidracijski raztopini, nato pa na instrumentu nastavimo, da najprej poteka rehidracija in šele nato fokusiranje.



Slika 12: Keramični nosilci v škatli za shranjevanje.



Slika 13: Keramični nosilec z odprtим pokrovom.

Rehidracijsko raztopino smo pripravili tako, da je vsebovala 8 M ureo, 0,5% (w/v) CHAPS, 0,2% DTT, 0,5% (v/v) IPG-pufer, 10% (v/v) glicerol in 0,002% bromofenolmodro (Westermeier in Naven, 2002). Sestavine so podobne kot v ustaljenem pufru za lizo, le da smo tu dodali še glicerol za preprečevanje elektroendoosmoze in barvilo za spremljanje poteka fokusiranja. Za en 24 cm dolg trak smo zmešali 100 µg proteinov in toliko rehidracijske raztopine, da je skupni volumen znašal 450 µl, in to inkubirali 15 min pri sobni temperaturi (ST). Pred nanosom smo mešanico še centrifugirali 10 min pri 14.000 vrt./min za odstranitev morebitnih netopnih nečistoč, nato pa smo jo v enakomerno debeli črti nanesli po celotni dolžini keramičnega nosilca. Nanjo smo položili IPG trak, tako, da je bil gel obrnjen navzdol in s posebno pozornostjo na orientacijo pH: pH-vrednost 4 na traku je bila nameščena na zožen del nosilca, pH-vrednost 7 pa na nezoženega. Da se gel ne bi izsušil, smo čezenj nanesli še približno 2 ml mineralnega olja. Nosilec smo pokrili s pokrovom (slika 13) in ga namestili na IPGphorTM tako, da je bil zoženi del v kontaktu z anodo in nezoženi s katodo. Program, ki smo ga na koncu izbrali kot optimalnega, je rezultat kombinacije okvirnih navodil (GE Healthcare, 2004) in lastnih preizkusov. Desetim uram pasivne rehidracije sta sledili dve uri aktivne rehidracije z napetostjo 100 V, za boljši vstop večjih proteinov in predvsem za migracijo morebitnih ostankov soli, ki bi v nadaljevanju motile fokusiranje. Fokusiranje smo začeli z 200 V 1 h, nato 500 V 1 h, sledilo je gradientno naraščanje do 1000 V 1 h, gradientno naraščanje do 8000 V 3 h in končno konstantna napetost 8000 V 6 h. Skupna vsota je bila približno 63 kVh. Vse je potekalo pri 20 °C z maksimalnim tokom 50 µA/trak.

3.3.3 Ekvilibracija

Po končanem fokusiraju smo trakove bodisi shranili v plastično mapo pri -70 °C bodisi jih sprali z deionizirano vodo (miliQ) in takoj uporabili dalje. Z ekvilibracijo smo jih pripravili na naslednjo dimenzijo in jih negativno nabili s SDS-om, da so med elektroforezo lahko potovali k anodi.

Ekvilibracijsko raztopino smo pripravili tako, da je vsebovala 6 M ureo in 30% (v/v) glicerol za zmanjševanje elektroendoosmoze (zaradi povišanja viskoznosti), 50 mM Tris-HCl pH 8,8 za zagotavljanje primernega pH-okolja, 0,01% bromofenolmodro za spremljanje poteka elektroforeze in:

- 2% SDS ali
- 4% SDS

za nabijanje proteinov. Ekvilibracija je potekala v dveh korakih. V prvem koraku smo raztopini dodali še 1 % DTT-ja za redukcijo disulfidnih mostičkov in trakove v njej inkubirali na stresalniku 15 min. Nato smo trakove sprali z miliQ in jih ponovno inkubirali 15 min v ekvilibracijski raztopini z 2,5% IAA (namesto reducenta) za preprečitev reoksidacije tiolnih skupin. Trakove smo zopet sprali z miliQ in jih nanesli na gel.

3.3.4 Vertikalna SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza

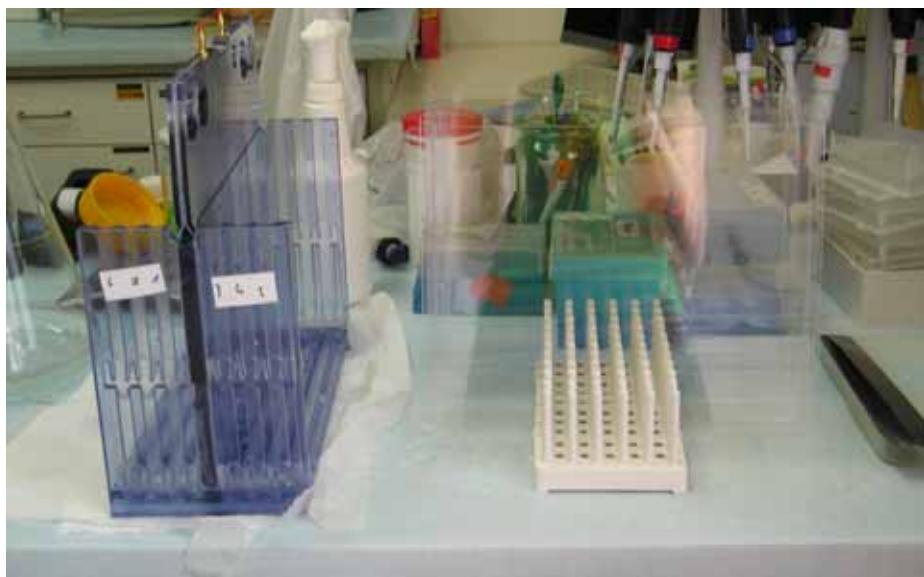
Proteine smo po ekvilibraciji ločili glede na njihovo molekulsko maso z navpično SDS-PAGE v sistemu EttanTM DALTsix (slika 14), ki omogoča hkratno elektroforezo 6 gelov. Nanj sta priključena še mešalni aparat in hladilnik, da se pufer v kadi ne segreva preveč.



Slika 14: Sistem EttanTM DALTsix s hladilnikom in usmernikom EPS 601.

3.3.4.1 Priprava gela

Preizkusili smo tako 10% kot 12% gele, ki se razlikujejo glede na razpon molekulskih mas proteinov, ki jih želimo ločiti. Za en 12% gel dimenzijs 26 cm x 20 cm x 0,1 cm smo potrebovali 50-60 ml raztopine iz 24 ml 30% mešanice akrilamid-bisakrilamid (37,5 : 1), 24 ml deionizirane vode (miliQ), 15 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 600 µl 10% raztopine SDS-a, 600 µl 10% raztopine amonijevega persulfata (APS) in 24 µl *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED). Za 10% gel enakih dimenzijs smo le zamenjali količino mešanice akrilamid-bisakrilamid in miliQ. Vse sestavine razen APS-a in TEMED-a, ki ju dodamo za začetek polimerizacije, lahko zmešamo že prej. Mešanico smo previdno premešali, da niso nastajali mehurčki, in jo vlili med dve horizontalno položeni stekleni plošči (slika 15), predhodno dobro očiščeni z etanolom. Nato smo vmes vstavili še glavniček za podolgovato jamico, kamor kasneje vstavimo IPG trak. Gele smo pustili polimerizirati čez noč, nato iz njih pobrali glavničke in jamice sprali z miliQ.



Slika 15: Steklene plošče in nosilec, ki ga vstavimo v elektroforezno kad skupaj z geli.

3.3.4.2 SDS-PAGE

Po ekvilibraciji smo stripe nanesli v jamico v gelu, s posebno pozornostjo na orientacijo. Nato smo jih zalili z 0,5% (w/v) agarozo v elektroforeznem pufru, da so ostali na mestu in pustili 5 min, da se je agarozna strdila. Enako orientirane plošče z geli in IPG trakovi smo vstavili v elektroforetsko posodo, kjer smo predhodno natočili približno 3,5 l elektroforetskega pufra iz 25 mM Trisa, 192 mM glicina in:

- 0,1% SDS-a ali
- 2. 0,2% SDS-a.

V nadaljevanju smo dotočili še približno 1 l istega pufra. Spodnjega smo uporabili večkrat, zgornji pa je bil vedno svež. Elektroforeza je potekala v dveh fazah: najprej 15 min z močjo 1 W/gel za lažji vstop proteinov, nato 16 h oz. dokler fronta barvila ni migrirala do konca gelov, z močjo 2 W/gel.

3.3.5 Barvanje s srebrovim nitratom

Po koncu elektroforeze smo gele vizualizirali z barvanjem s srebrom. Proteini so postali vidni kot lise. Uporabili smo protokol, kompatibilen z MALDI-TOF-MS (Mortz in sod., 2001), ki uporablja naslednje raztopine:

- fiksir iz 50% metanola, 12% ocetne kisline in 0,05% formalina.
- 35% etanol.
- ojačevalec (angl. sensitizing solution) iz 0,02% natrijevega tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).
- raztopina iz 0,2% srebrovega nitrata (AgNO_3) in 0,076% formalina.
- razvijalec iz 6% natrijevega karbonata (Na_2CO_3), 0,05% formalina in 0,0004% natrijevega tiosulfata.
- stop-raztopina iz 50% metanola in 12% ocetne kisline.
- 1% ocetna kislina.

Gele smo previdno odstranili iz steklenih plošč in jih za 2 h dali v fiksir. S tem smo preprečili nadaljnje premikanje proteinov in sprali odvečne ione in detergente. Nato smo jih spirali z etanolom (3 x 20 min). Sledilo je namakanje v ojačevalni raztopini za 2 min, s katero smo povečali občutljivost in kontrast barvanja. Ponovno smo gel spirali, tokrat z miliQ (3 x 5) min. Nato smo gele za 20 min dali v raztopino srebrovega nitrata, kjer so se srebrovi ioni vezali na proteine. Gele smo zopet sprali z miliQ (2 x 1 min). Sledil je razvijalec, v katerem smo gele pustili do želenega videza lis (proteinov) in raztopino nato odlili. Za zaustavitev redukcijske reakcije smo za 5 min dodali stop-raztopino. Na koncu smo gele pustili v 1% ocetni kislini do shranjevanja. Za en gel smo uporabili po 20 ml vseh raztopin, razen razvijjalca, ki smo ga dodali 400 ml. Vsi koraki so potekali v kadičkah na stresalniku (slika 16).



Slika 16: Stresalnik s kadičko, kjer je potekalo barvanje gelov.

3.3.6 Računalniška analiza

V nadaljevanju smo gele odčitali z optičnim čitalcem (poskenirali) in jih shranili med 2 plasti folije pri 4 °C. Računalniške podobe smo analizirali z demo verzijo programa Decodon Delta2D 3.4. Najprej smo preverili količino lis in njihovo razporeditev na posameznih gelih, nato pa primerjali med sabo pare tumorskih in normalnih vzorcev. Iz te primerjave smo želeli izvedeti, ali najdemo povsod enake proteine in ali se njihovo izražanje razlikuje glede na bolezen. Poskusili smo tudi primerjati gel celične linije AGS z geli nekaterih tumorskih vzorcev.

Analizo smo opravili bodisi z rezultati vseh ponovitev bodisi le z boljšimi. Naenkrat smo obravnavali po 1 par vzorcev (ali 1 par v ponovitvah). Najprej smo pare (ali ponovitve) med sabo ročno poravnali, nato združili vse gele v enega (t.i. fuzijski gel). Na tej podobi je program avtomatsko zaznal vse lise, tako da jih je obkrožil, potrebno pa je bilo tudi ročno popravljanje. Sledil je prenos zaznanih lis na vse gele ter primerjanje izražanja različnih proteinov preko virtualne barve lis, preko matematične funkcije profila izražanja, preko povečave izsekov iz gelov in preko tabele z relativnimi volumni in njihovimi razmerji. Prav relativni volumni lis so ključni rezultat programa, saj nam podajo kvantitetno izraženega proteina. Program jih po odštetju ozadja določi iz intenzitete posamezne lise (sivina slikovnih pik), ki jo primerja z intenziteto normalizacijskega niza (v našem primeru so bile za tak niz izbrane vse lise posameznega gela).

3.3.7 Identifikacija proteinov

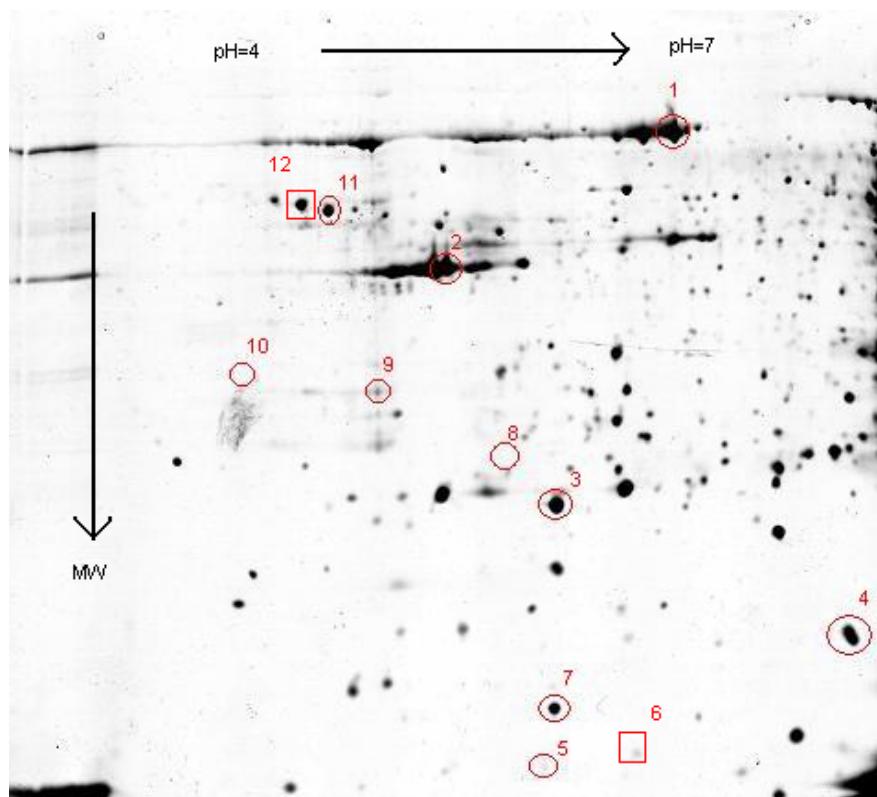
Nekatere lise, dobljene iz tumorskega in normalnega vzorca prvega para, analiziranega na neoptimiziran način, smo želeli identificirati. V ta namen smo s sterilnim skalpelom iz gelov izrezali želene lise ter košček praznega gela za upoštevanje morebitnega ozadja. Vsakič smo uporabili nov skalpel, da ne bi prišlo do medsebojne kontaminacije. Po eno liso smo dali v označene sterilne epruvete in jim dodali po 50 µl 1% ocetne kisline. Take smo jih poslali na Mednarodni center za gensko inženirstvo in biotehnologijo (ICGEB, angl. International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology) v Trstu, kjer so jih s pomočjo masne spektrometrije, z metodo MALDI-TOF-MS, identificirali. Te iste lise smo

na koncu poskušali poiskati tudi pri ostalih parih.

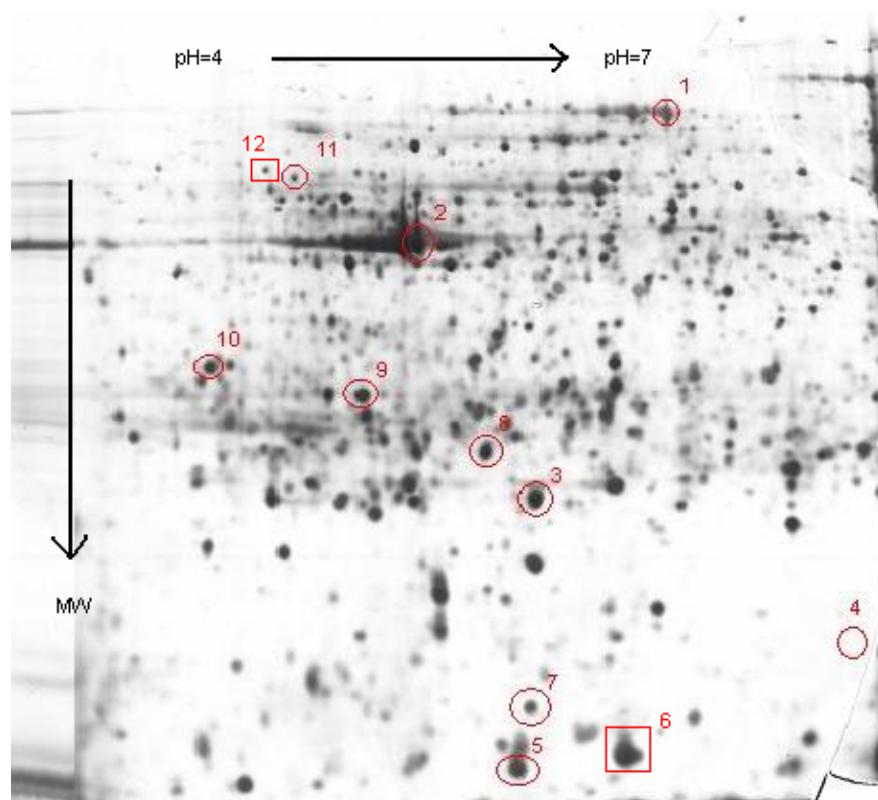
4 REZULTATI

4.1 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA IN RAČUNALNIŠKA ANALIZA PARA 1 (BREZ OBARJANJA)

Po nekaj poskusih optimizacije 2-DE na testnih vzorcih, smo vzorca tkiva želodčne sluznice para 1 (težka 270 in 250 mg) po drobljenju v tekočem dušiku lizirali s pufrom iz 10 mM PBS-a, 10 mM EDTA, 10 mM glicerola in 0,01% NP 40 (L1), dobljene celice razbijali z ultrazvokom in netopne delce odstranili s 15-minutnim centrifugiranjem. Obarjati nismo želeli, da bi se izognili morebitnim izgubam proteinov. Za 2-DE analizo smo vzeli po 10 µl vsakega izmed proteinskih ekstraktov in ju najprej ločili na 24-cm trakovih z immobiliziranim pH-gradientom (IPG) 4–7, nato ekvilibrirali in naposled ločili še na 10% poliakrilamidnih gelih. Po barvanju s srebrom, kompatibilnim z MALDI-TOF-MS, smo dobili gela z več ali manj okroglimi lisami (slike 17 in 18).



Slika 17: 2-DE gel normalnega vzorca para 1. Z rdečo so obkrožene in oštevilčene lise, ki smo jih poslali na identifikacijo z MALDI-TOF-MS.



Slika 18: 2-DE gel tumorskega vzorca para 1. Z rdečo so obkrožene in oštrevilčene lise, ki smo jih poslali na identifikacijo z MALDI-TOF-MS.

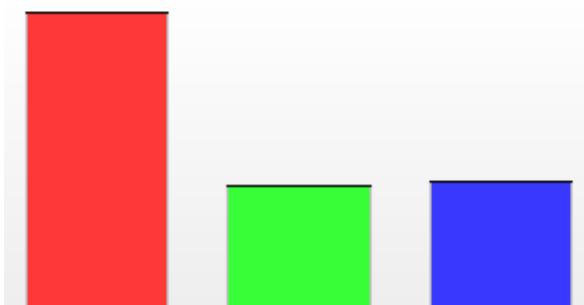
Da bi ugotovili podobnost proteinskega vzorca ter samega izražanja proteinov tumorskega in normalnega želodčnega tkiva istega bolnika, smo gela analizirali z demo verzijo računalniškega programa Decodon Delta2D 3.4. Lise gela normalnega vzorca (v nadaljevanju: normalni gel) smo virtualno označili modro in gela tumorskega vzorca (v nadaljevanju: tumorski gel) oranžno ter jih med seboj ročno prekrili (slika 19, levo), program pa je izvedel še odštevanje ozadja gela in normalizacijo. Že na tem mestu se je opazila razlika v izražanju: če je bila lisa bolj modra kot oranžna, je je bilo več v normalnem gelu in obratno (če je bila bolj oranžna, je je bilo več v tumorskem gelu). Če pa je bila skoraj črna, je je bilo v obeh gelih približno enako. Iz tega smo kasneje lahko sklepali na povečano izražanje proteina v normalnem (ali tumorskem) tkivu. Dalje smo programu ukazali združitev obeh gelov v enega (t.i. fuzijski gel), kjer je lahko zaznal lise, potrebno je bilo tudi ročno popravljanje. Ugotovljenih je bilo 1005 lis (slika 19, desno), ki smo jih prenesli na izhodiščna gela. Nato smo lahko na sliki s prekritima geloma poiskali tiste lise, ki so se nam zdele zanimive oz. so bile bodisi bolj modre bodisi bolj oranžne, saj

je to pomenilo, da ima protein povišano ali znižano izražanje v normalnem ali rakavem tkivu.



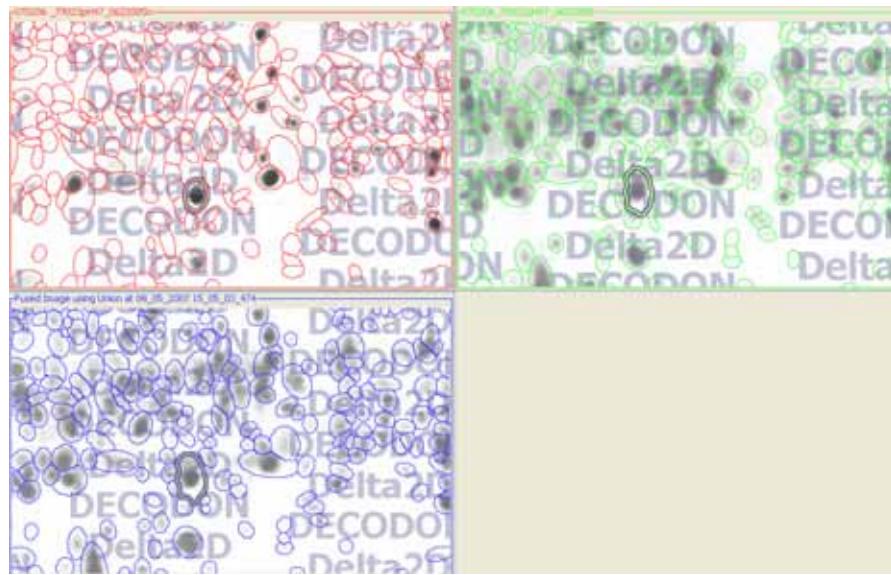
Slika 19: Poravnava 2-DE gelov para 1 (levo) in zaznavanje lis (desno). Normalni vzorec je označen z modro barvo, tumorski z oranžno, kjer je enega proteina približno enako takoj v normalnem kot v tumorskem vzorcu, pa je lisa skoraj črnejše barve.

Barva pa seveda ni bila edini kriterij iskanja zanimivih lis. Program namreč omogoča funkcijo, imenovano profil izražanja (slika 20). Ta v obliki stolpcev prikazuje relativni volumen posamezne lise v normalnem, tumorskem in fuzijskem gelu. Tako smo lise, ki so barvno izstopale, za potrditev analizirali tudi s to funkcijo.



Slika 20: Profil izražanja lise številka 3 para 1. Rdeči stolpec ponazarja izražanje v normalnem vzorcu, zeleni v tumorskem in modri v t.i. fuzijskem gelu.

Želeno liso smo si lahko ogledali tudi v povečavi, zopet v normalnem, tumorskem in fuzijskem gelu (slika 21).



Slika 21: Povečan prikaz diferencialnega izražanja lise številka 3 (debelejše obkrožena lisa) para 1. Rdeče obkrožene lise pripadajo normalnemu vzorcu, zelene tumorskemu in modre t.i. fuzijskemu gelu.

Naposled smo dejanske vrednosti relativnih volumnov izbranih lis in njihovo razmerje preverili v tabeli (slika 22). Tam so prikazana tudi povprečja vrednosti relativnih volumnov in standardni odkloni, če analiziramo vzorce v ponovitvah.

rank	ct	n₁	n₂	n₃	n₄	n₅	n₆	n₇	n₈	n₉	n₁₀	n₁₁	n₁₂	n₁₃	n₁₄	n₁₅	n₁₆	n₁₇	n₁₈	n₁₉	n₂₀	n₂₁	n₂₂	n₂₃	n₂₄	n₂₅	n₂₆	n₂₇	n₂₈	n₂₉	n₃₀	n₃₁	n₃₂	n₃₃	n₃₄	n₃₅	n₃₆	n₃₇	n₃₈	n₃₉	n₄₀	n₄₁	n₄₂	n₄₃	n₄₄	n₄₅	n₄₆	n₄₇	n₄₈	n₄₉	n₅₀	n₅₁	n₅₂	n₅₃	n₅₄	n₅₅	n₅₆	n₅₇	n₅₈	n₅₉	n₆₀	n₆₁	n₆₂	n₆₃	n₆₄	n₆₅	n₆₆	n₆₇	n₆₈	n₆₉	n₇₀	n₇₁	n₇₂	n₇₃	n₇₄	n₇₅	n₇₆	n₇₇	n₇₈	n₇₉	n₈₀	n₈₁	n₈₂	n₈₃	n₈₄	n₈₅	n₈₆	n₈₇	n₈₈	n₈₉	n₉₀	n₉₁	n₉₂	n₉₃	n₉₄	n₉₅	n₉₆	n₉₇	n₉₈	n₉₉	n₁₀₀	n₁₀₁	n₁₀₂	n₁₀₃	n₁₀₄	n₁₀₅	n₁₀₆	n₁₀₇	n₁₀₈	n₁₀₉	n₁₁₀	n₁₁₁	n₁₁₂	n₁₁₃	n₁₁₄	n₁₁₅	n₁₁₆	n₁₁₇	n₁₁₈	n₁₁₉	n₁₂₀	n₁₂₁	n₁₂₂	n₁₂₃	n₁₂₄	n₁₂₅	n₁₂₆	n₁₂₇	n₁₂₈	n₁₂₉	n₁₃₀	n₁₃₁	n₁₃₂	n₁₃₃	n₁₃₄	n₁₃₅	n₁₃₆	n₁₃₇	n₁₃₈	n₁₃₉	n₁₄₀	n₁₄₁	n₁₄₂	n₁₄₃	n₁₄₄	n₁₄₅	n₁₄₆	n₁₄₇	n₁₄₈	n₁₄₉	n₁₅₀	n₁₅₁	n₁₅₂	n₁₅₃	n₁₅₄	n₁₅₅	n₁₅₆	n₁₅₇	n₁₅₈	n₁₅₉	n₁₆₀	n₁₆₁	n₁₆₂	n₁₆₃	n₁₆₄	n₁₆₅	n₁₆₆	n₁₆₇	n₁₆₈	n₁₆₉	n₁₇₀	n₁₇₁	n₁₇₂	n₁₇₃	n₁₇₄	n₁₇₅	n₁₇₆	n₁₇₇	n₁₇₈	n₁₇₉	n₁₈₀	n₁₈₁	n₁₈₂	n₁₈₃	n₁₈₄	n₁₈₅	n₁₈₆	n₁₈₇	n₁₈₈	n₁₈₉	n₁₉₀	n₁₉₁	n₁₉₂	n₁₉₃	n₁₉₄	n₁₉₅	n₁₉₆	n₁₉₇	n₁₉₈	n₁₉₉	n₂₀₀	n₂₀₁	n₂₀₂	n₂₀₃	n₂₀₄	n₂₀₅	n₂₀₆	n₂₀₇	n₂₀₈	n₂₀₉	n₂₁₀	n₂₁₁	n₂₁₂	n₂₁₃	n₂₁₄	n₂₁₅	n₂₁₆	n₂₁₇	n₂₁₈	n₂₁₉	n₂₂₀	n₂₂₁	n₂₂₂	n₂₂₃	n₂₂₄	n₂₂₅	n₂₂₆	n₂₂₇	n₂₂₈	n₂₂₉	n₂₃₀	n₂₃₁	n₂₃₂	n₂₃₃	n₂₃₄	n₂₃₅	n₂₃₆	n₂₃₇	n₂₃₈	n₂₃₉	n₂₄₀	n₂₄₁	n₂₄₂	n₂₄₃	n₂₄₄	n₂₄₅	n₂₄₆	n₂₄₇	n₂₄₈	n₂₄₉	n₂₅₀	n₂₅₁	n₂₅₂	n₂₅₃	n₂₅₄	n₂₅₅	n₂₅₆	n₂₅₇	n₂₅₈	n₂₅₉	n₂₆₀	n₂₆₁	n₂₆₂	n₂₆₃	n₂₆₄	n₂₆₅	n₂₆₆	n₂₆₇	n₂₆₈	n₂₆₉	n₂₇₀	n₂₇₁	n₂₇₂	n₂₇₃	n₂₇₄	n₂₇₅	n₂₇₆	n₂₇₇	n₂₇₈	n₂₇₉	n₂₈₀	n₂₈₁	n₂₈₂	n₂₈₃	n₂₈₄	n₂₈₅	n₂₈₆	n₂₈₇	n₂₈₈	n₂₈₉	n₂₉₀	n₂₉₁	n₂₉₂	n₂₉₃	n₂₉₄	n₂₉₅	n₂₉₆	n₂₉₇	n₂₉₈	n₂₉₉	n₃₀₀	n₃₀₁	n₃₀₂	n₃₀₃	n₃₀₄	n₃₀₅	n₃₀₆	n₃₀₇	n₃₀₈	n₃₀₉	n₃₁₀	n₃₁₁	n₃₁₂	n₃₁₃	n₃₁₄	n₃₁₅	n₃₁₆	n₃₁₇	n₃₁₈	n₃₁₉	n₃₂₀	n₃₂₁	n₃₂₂	n₃₂₃	n₃₂₄	n₃₂₅	n₃₂₆	n₃₂₇	n₃₂₈	n₃₂₉	n₃₃₀	n₃₃₁	n₃₃₂	n₃₃₃	n₃₃₄	n₃₃₅	n₃₃₆	n₃₃₇	n₃₃₈	n₃₃₉	n₃₄₀	n₃₄₁	n₃₄₂	n₃₄₃	n₃₄₄	n₃₄₅	n₃₄₆	n₃₄₇	n₃₄₈	n₃₄₉	n₃₅₀	n₃₅₁	n₃₅₂	n₃₅₃	n₃₅₄	n₃₅₅	n₃₅₆	n₃₅₇	n₃₅₈	n₃₅₉	n₃₆₀	n₃₆₁	n₃₆₂	n₃₆₃	n₃₆₄	n₃₆₅	n₃₆₆	n₃₆₇	n₃₆₈	n₃₆₉	n₃₇₀	n₃₇₁	n₃₇₂	n₃₇₃	n₃₇₄	n₃₇₅	n₃₇₆	n₃₇₇	n₃₇₈	n₃₇₉	n₃₈₀	n₃₈₁	n₃₈₂	n₃₈₃	n₃₈₄	n₃₈₅	n₃₈₆	n₃₈₇	n₃₈₈	n₃₈₉	n₃₉₀	n₃₉₁	n₃₉₂	n₃₉₃	n₃₉₄	n₃₉₅	n₃₉₆	n₃₉₇	n₃₉₈	n₃₉₉	n₄₀₀	n₄₀₁	n₄₀₂	n₄₀₃	n₄₀₄	n₄₀₅	n₄₀₆	n₄₀₇	n₄₀₈	n₄₀₉	n₄₁₀	n₄₁₁	n₄₁₂	n₄₁₃	n₄₁₄	n₄₁₅	n₄₁₆	n₄₁₇	n₄₁₈	n₄₁₉	n₄₂₀	n₄₂₁	n₄₂₂	n₄₂₃	n₄₂₄	n₄₂₅	n₄₂₆	n₄₂₇	n₄₂₈	n₄₂₉	n₄₃₀	n₄₃₁	n₄₃₂	n₄₃₃	n₄₃₄	n₄₃₅	n₄₃₆	n₄₃₇	n₄₃₈	n₄₃₉	n₄₄₀	n₄₄₁	n₄₄₂	n₄₄₃	n₄₄₄	n₄₄₅	n₄₄₆	n₄₄₇	n₄₄₈	n₄₄₉	n₄₅₀	n₄₅₁	n₄₅₂	n₄₅₃	n₄₅₄	n₄₅₅	n₄₅₆	n₄₅₇	n₄₅₈	n₄₅₉	n₄₆₀	n₄₆₁	n₄₆₂	n₄₆₃	n₄₆₄	n₄₆₅	n₄₆₆	n₄₆₇	n₄₆₈	n₄₆₉	n₄₇₀	n₄₇₁	n₄₇₂	n₄₇₃	n₄₇₄	n₄₇₅	n₄₇₆	n₄₇₇	n₄₇₈	n₄₇₉	n₄₈₀	n₄₈₁	n₄₈₂	n₄₈₃	n₄₈₄	n₄₈₅	n₄₈₆	n₄₈₇	n₄₈₈	n₄₈₉	n₄₉₀	n₄₉₁	n₄₉₂	n₄₉₃	n₄₉₄	n₄₉₅	n₄₉₆	n₄₉₇	n₄₉₈	n₄₉₉	n₅₀₀	n₅₀₁	n₅₀₂	n₅₀₃	n₅₀₄	n₅₀₅	n₅₀₆	n₅₀₇	n₅₀₈	n₅₀₉	n₅₁₀	n₅₁₁	n₅₁₂	n₅₁₃	n₅₁₄	n₅₁₅	n₅₁₆	n₅₁₇	n₅₁₈	n₅₁₉	n₅₂₀	n₅₂₁	n₅₂₂	n₅₂₃	n₅₂₄	n₅₂₅	n₅₂₆	n₅₂₇	n₅₂₈	n₅₂₉	n₅₃₀	n₅₃₁	n₅₃₂	n₅₃₃	n₅₃₄	n₅₃₅	n₅₃₆	n₅₃₇	n₅₃₈	n₅₃₉	n₅₄₀	n₅₄₁	n₅₄₂	n₅₄₃	n₅₄₄	n₅₄₅	n₅₄₆	n₅₄₇	n₅₄₈	n₅₄₉	n₅₅₀	n₅₅₁	n₅₅₂	n₅₅₃	n₅₅₄	n₅₅₅	n₅₅₆	n₅₅₇	n₅₅₈	n₅₅₉	n₅₆₀	n₅₆₁	n₅₆₂	n₅₆₃	n₅₆₄	n₅₆₅	n₅₆₆	n₅₆₇	n₅₆₈	n₅₆₉	n₅₇₀	n₅₇₁	n₅₇₂	n₅₇₃	n₅₇₄	n₅₇₅	n₅₇₆	n₅₇₇	n₅₇₈	n₅₇₉	n₅₈₀	n₅₈₁	n₅₈₂	n₅₈₃	n₅₈₄	n₅₈₅	n₅₈₆	n₅₈₇	n₅₈₈	n₅₈₉	n₅₉₀	n₅₉₁	n₅₉₂	n₅₉₃	n₅₉₄	n₅₉₅	n₅₉₆	n₅₉₇	n₅₉₈	n₅₉₉	n₆₀₀	n₆₀₁	n₆₀₂	n₆₀₃	n₆₀₄	n₆₀₅	n₆₀₆	n₆₀₇	n₆₀₈	n₆₀₉	n₆₁₀	n₆₁₁	n₆₁₂	n₆₁₃	n₆₁₄	n₆₁₅	n₆₁₆	n₆₁₇	n₆₁₈	n₆₁₉	n₆₂₀	n₆₂₁	n₆₂₂	n₆₂₃	n₆₂₄	n₆₂₅	n₆₂₆	n₆₂₇	n₆₂₈	n₆₂₉	n₆₃₀	n₆₃₁	n₆₃₂	n₆₃₃	n₆₃₄	n₆₃₅	n₆₃₆	n₆₃₇	n₆₃₈	n₆₃₉	n₆₄₀	n₆₄₁	n₆₄₂	n₆₄₃	n₆₄₄	n₆₄₅	n₆₄₆	n₆₄₇	n₆₄₈	n₆₄₉	n₆₅₀	n₆₅₁	n₆₅₂	n₆₅₃	n₆₅₄	n₆₅₅	n₆₅₆	n₆₅₇	n₆₅₈	n₆₅₉	n₆₆₀	n₆₆₁	n₆₆₂	n₆₆₃	n₆₆₄	n₆₆₅	n₆₆₆	n₆₆₇	n₆₆₈	n₆₆₉	n₆₇₀	n₆₇₁	n₆₇₂	n₆₇₃	n₆₇₄	n₆₇₅	n₆₇₆	n₆₇₇	n₆₇₈	n₆₇₉	n₆₈₀	n₆₈₁	n₆₈₂	n₆₈₃	n₆₈₄	n₆₈₅	n₆₈₆	n₆₈₇	n₆₈₈	n₆₈₉	n₆₉₀	n₆₉₁	n₆₉₂	n₆₉₃	n₆₉₄	n₆₉₅	n₆₉₆	n₆₉₇	n₆₉₈	n₆₉₉	n₇₀₀	n₇₀₁	n₇₀₂	n₇₀₃	n₇₀₄	n₇₀₅	n₇₀₆	n₇₀₇	n₇₀₈	n₇₀₉	n₇₁₀	n₇₁₁	n₇₁₂	n₇₁₃	n₇₁₄	n₇₁₅	n₇₁₆	n₇₁₇	n₇₁₈	n₇₁₉	n₇₂₀	n₇₂₁	n₇₂₂	n₇₂₃	n₇₂₄	n₇₂₅	n₇₂₆	n₇₂₇	n₇₂₈	n₇₂₉	n₇₃₀	n₇₃₁	n₇₃₂	n₇₃₃	n₇₃₄	n₇₃₅	n₇₃₆	n₇₃₇	n₇₃₈	n₇₃₉	n₇₄₀	n₇₄₁	n₇₄₂	n₇₄₃	n₇₄₄	n₇₄₅	n₇₄₆	n₇₄₇	n₇₄₈	n₇₄₉	n₇₅₀	n₇₅₁	n₇₅₂	n₇₅₃	n₇₅₄	n₇₅₅	n₇₅₆	n₇₅₇	n₇₅₈	n₇₅₉	n₇₆₀	n₇₆₁	n₇₆₂	n₇₆₃	n₇₆₄	n₇₆₅	n₇₆₆	n₇₆₇	n₇₆₈	n₇₆₉	n₇₇₀	n₇₇₁	n₇₇₂	n₇₇₃	n₇₇₄	n₇₇₅	n₇₇₆	n₇₇₇	n₇₇₈	n₇₇₉	n₇₈₀	n₇₈₁	n₇₈₂	n₇₈₃	n₇₈₄	n₇₈₅	n₇₈₆	n₇₈₇	n₇₈₈	n₇₈₉	n₇₉₀	n₇₉₁	n₇₉₂	n₇₉₃	n₇₉₄	n₇₉₅	n₇₉₆	n₇₉₇	n₇₉₈	n₇₉₉	n₈₀₀	n₈₀₁	n₈₀₂	n₈₀₃	n₈₀₄	n₈₀₅	n₈₀₆	n₈₀₇	n₈₀₈	n₈₀₉	n₈₁₀	n₈₁₁	n₈₁₂	n₈₁₃	n₈₁

MALDI-TOF-MS in jih poslali na Mednarodni center za gensko inženirstvo in biotehnologijo (ICGEB) v Trstu. Relativni volumni desetih izbranih lis so izpisani v preglednici 2, za 2 lis (označeni s 6 in 12) pa rezultata nismo dobili, zato vanjo nista vključeni.

Preglednica 2: Relativni volumni nekaterih lis normalnega (par 1N) in tumorskega (par 1T) vzorca para 1.

Lise→	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11
Par 1N	2,684	2,554	1,898	1,073	0,046	0,774	0,141	0,261	0,121	0,230
Par 1T	0,562	0,814	0,804	0,348	0,607	0,254	0,437	0,364	0,301	0,066

Rezultate identifikacije lis so povzeti v preglednici 3.

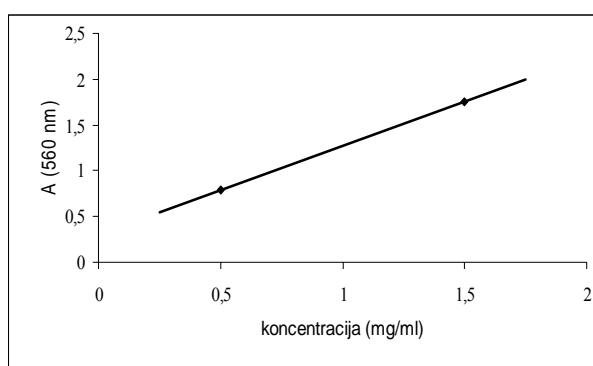
Preglednica 3: Identifikacija nekaterih lis para 1 z MALDI-TOF-MS.

Št. lise	Ime proteina
1	Prekurzor alfa-1-antitripsina (alfa-1 proteazni inhibitor, alfa-1-antiproteinaza) – Homo sapiens
2	Aktin, citoplazemski 2 (gama-aktin) – Homo sapiens
3	Glutation S-transferaza P (GST razred-pi, GSTP1-1) – Homo sapiens
4	Izoform 2 sterilnega alfa in TIR motiv-vsebujočega proteina 1
5	Protein S100-A9 (S100 kalcij-vezavni protein A9, kalgranulin-B, migracijskemu inhibitornemu faktorju soroden protein)
7	Prekurzor transtiretina (prealbumin, TBPA, TTR, ATTR) – Homo sapiens
8	Kloridni intracelularni kanalni protein 1 (jedrni kloridni ionski kanalček 27, NCC27, kloridni kanalček)
9	Aktin, citoplazemski 1 (beta-aktin) – Homo sapiens
10	Aktin, citoplazemski 2 (gama-aktin) – Homo sapiens
11	Prekurzor alfa-1-antitripsina (alfa-1 proteazni inhibitor, alfa-1-antiproteinaza) – Homo sapiens

4.2 OPTIMIZACIJA METOD NA VZORCU ZDRAVEGA ŽELODCA

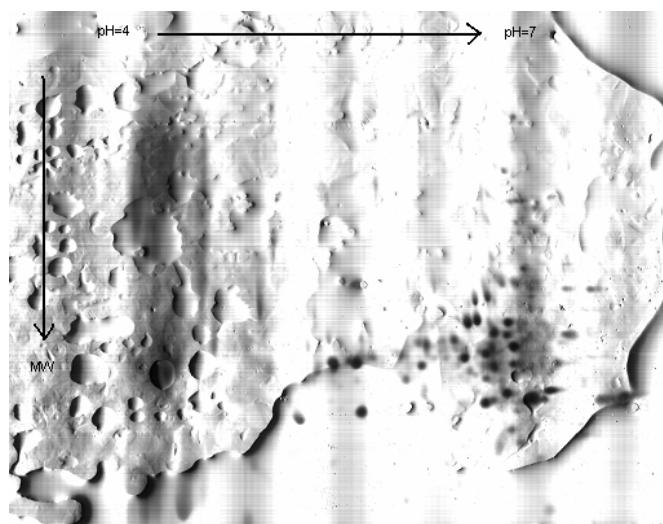
Ker se postopek, uporabljen pri paru 1, kasneje ni izkazal za dovolj ponovljivega pri nekaterih dodatnih vzorcih, smo ga že leli dalje optimizirati. Za to smo uporabili tkivo

sluznice zdravega želodca, ki smo ga dobili v večji količini. Ker je priprava vzorca ključnega pomena za 2-DE analizo (GE Healthcare, 2004), smo tam tudi začeli. Najprej smo zamenjali pufer za lizo (L1) z ustaljenim pufrom iz 9 M uree in 4% CHAPS-a (L2) in ostalo pustili nespremenjeno. Zaradi možnosti motenj pri merjenju koncentracije v pufru za lizo L2 nismo vključili DTT-ja, amfolitov ali bromofenolmodrega. Samo koncentracijo proteinov v vzorcu smo določili s kompletom BCATM Protein Assay Kit, za umeritveno krivuljo pa smo uporabili standard BSA (slika 23).



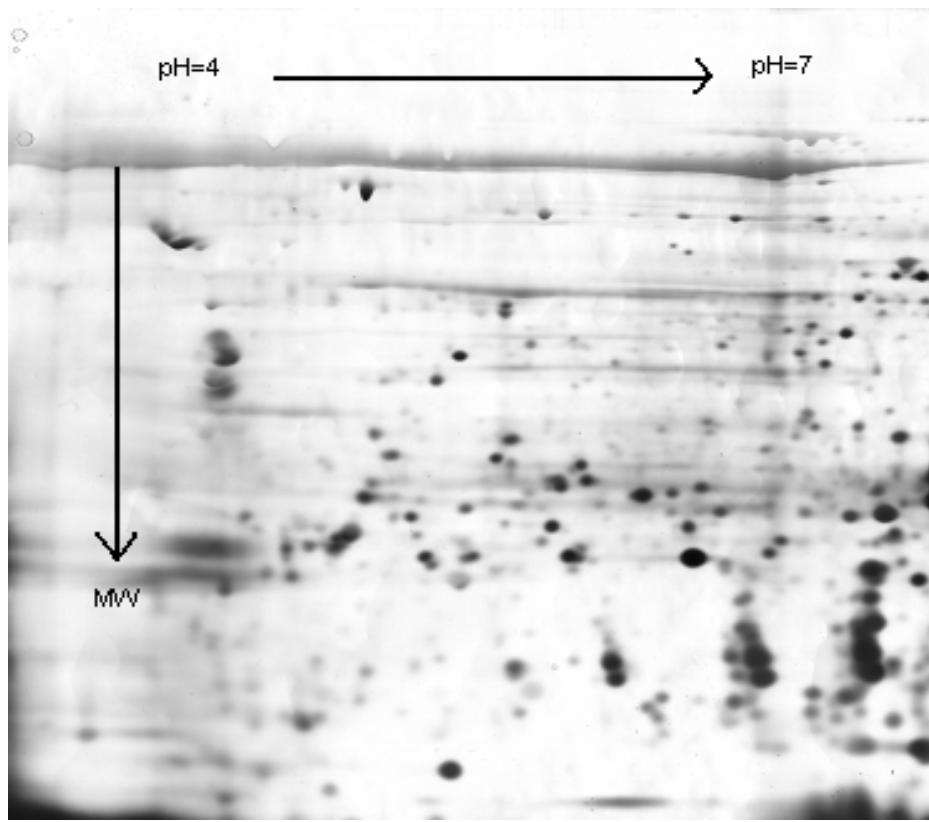
Slika 23: Primer umeritvene krivulje, pripravljene z različnimi koncentracijami BSA.

IEF je potekalo na 24-cm trakovih pH=4–7, ekvilibracija z 2% SDS-om, SDS-PAGE pa na 10% poliakrilamidnih gelih. Na koncu smo gele pobarvali s srebrom. Z dobljenimi rezultati nismo bili zadovoljni (slika 24), dobili smo celo prazne gele.



Slika 24: Poskus 2-DE analize proteinov, izoliranih s pufrom za lizo L2 (9 M urea, 4% CHAPS).

Ker smo do te točke dobili lepše rezultate s pufrom za lizo L1, smo ga uporabili v nadaljnjih poskusih. Tokrat smo vzorec po lizi z L1 in razbijanju dobljenih celic z ultrazvokom podaljšano centrifugirali, in sicer 1 h pri 13.000 vrt./min. Ostali koraki (IEF, SDS-PAGE, ekvilibracija, barvanje) so bili enaki. Dobljeni rezultati so bili boljši (slika 25), a še vedno ni bilo zadostne ponovljivosti. Zato smo se lotili odstranjevanja nečistoč z obarjanjem. Po lizi tkiva z L1, razbijanju celic z ultrazvokom in enournem centrifugiranju smo proteine oborili z acetonom, trikloroacetno kislino (TCA) ali nasičeno raztopino amonijevega sulfata. Dobljene pelete smo najprej poskušali raztopliti v izhodiščnemu pufru za lizo L1, a večinoma neuspešno. Mnogo bolje so se razapljalji v 9 M urei in 4% CHAPS-u (L2), kar je vidno tudi po koncentracijah ponovno raztopljenih peletov v preglednici 4. Vrednosti v stolpcu C1 prikazujejo proteinske koncentracije po razapljanju peletov v L1, v stolpcu C2 pa po razapljanju v L2. Slednje so v večini občutno višje.

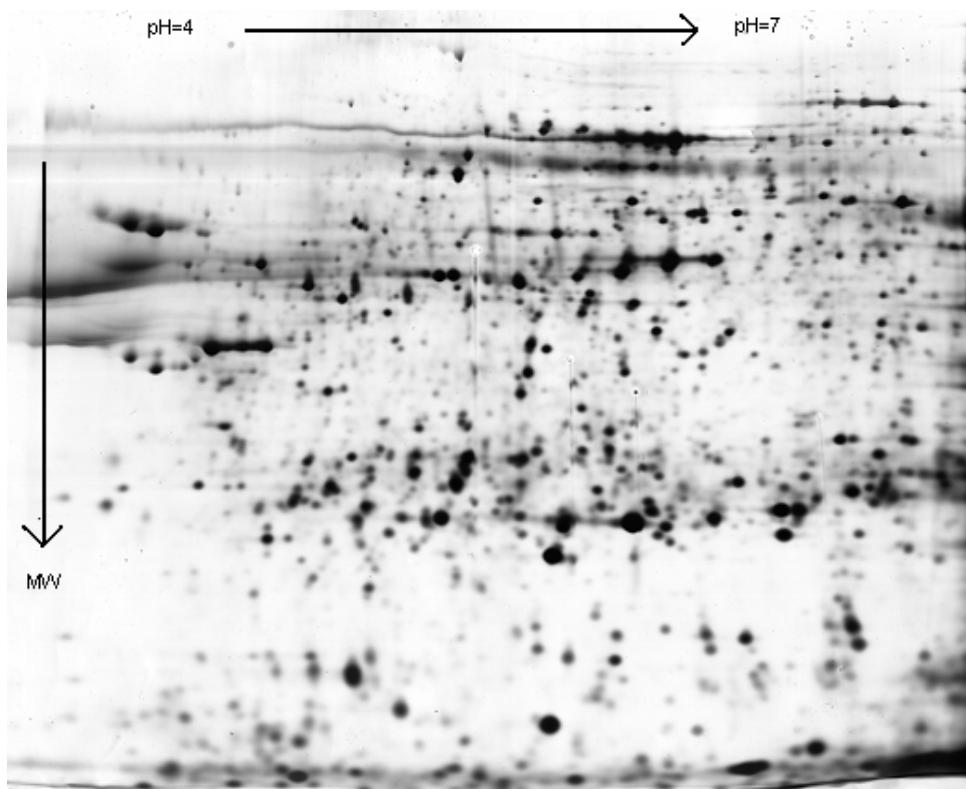


Slika 25: Primer 2-DE gela pri vzorcu s podaljšanim časom centrifugiranja.

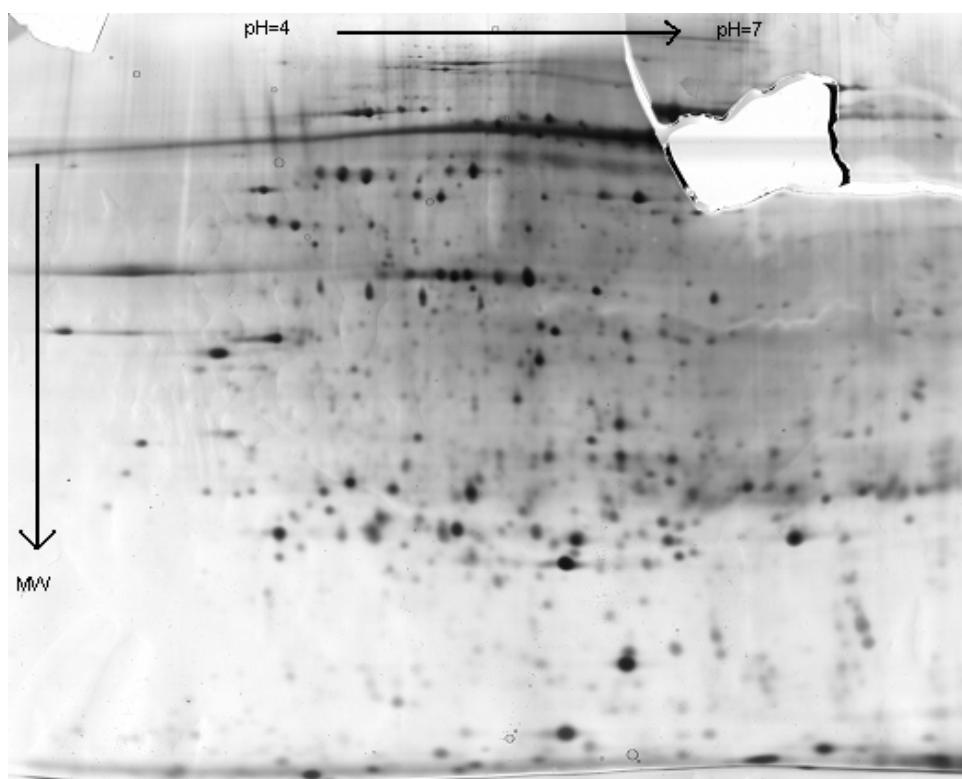
Preglednica 4: Koncentracija in absorbanca pri 560 nm za vzorec zdravega želodca, oborjenega z acetonom (Zac), trikloroocetno kislino (Ztca) ali amonijevim sulfatom (Zams) ter raztopljenega v pufru L1 iz 10 mM PBS-a, 10 mM glicerola, 10 mM EDTA in 0,01% NP 40 ($A_{560\text{nm}}^1$ in C1) ali v pufru L2 iz 9 M uree in 4% CHAPS-a ($A_{560\text{nm}}^2$ in C2).

Vzorec	$A_{560\text{nm}}^1$	C1 (mg/ml)	$A_{560\text{nm}}^2$	C2 (mg/ml)
Zac	0,676	0,4	0,748	5
Ztca	0,488	0,3	1,146	7,5
Zams	0,736	5	0,736	5

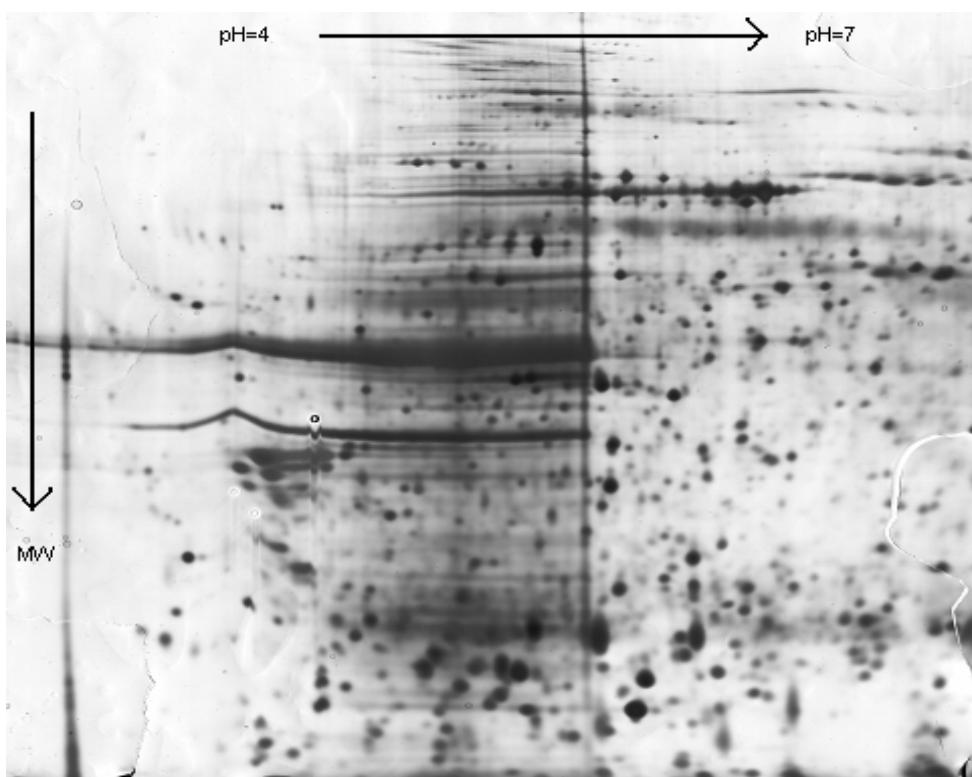
Po fokusirjanju, ekvilibraciji, elektroforezi in barvanju smo dobili gele, prikazane na slikah 26, 27 in 28. Največ lis in najmanj ozadja je bilo opaziti v primeruobarjanja z acetonom, zato smo ta postopek uporabili dalje.



Slika 26: Vzorec iz zdravega želodca, oborjen z acetonom.

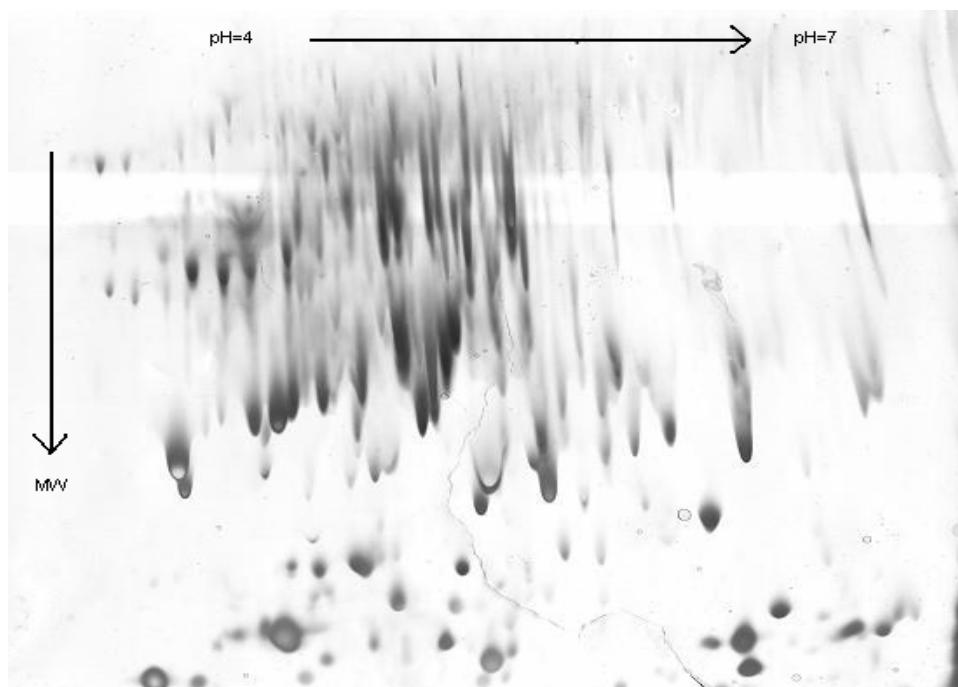


Slika 27: Vzorec iz zdravega želodca, oborjen s trikloroacetno kislino (TCA).



Slika 28: Vzorec iz zdravega želodca, oborjen z nasičeno raztopino amonijevega sulfata.

V nekaterih primerih smo se srečali še z eno težavo, in sicer s pojavom t.i. kometnih repkov na gelu (slika 29), kar naj bi bilo posledica premalo SDS-a (Ohlmeier, 2007). Zato smo povečali njegovo količino v ekvilibracijski raztopini (iz 2 na 4%) in v elektroforeznem pufru (iz 0,1 na 0,2%), kar se je izkazalo za primerno.



Slika 29: Primer 2-DE gela s t.i. kometnimi repki zaradi premalo SDS-a.

4.3 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA IN RAČUNALNIŠKA ANALIZA PAROV 2-7 (Z OBARJANJEM)

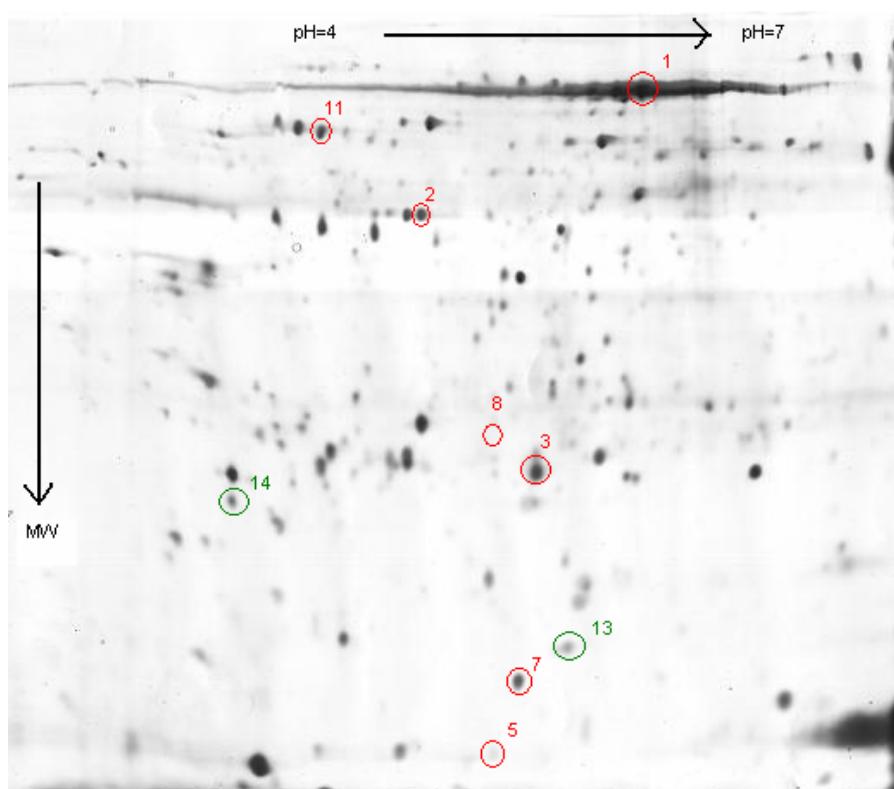
Po optimizaciji smo opravili celoten postopek 2-DE analize na šestih parih vzorcev (pari 2-7) v dveh ponovitvah. Vzorce želodčne sluznice (pari 2-7) smo zdrobili v tekočem dušiku, jih lizirali s pufrom iz 10 mM PBS-a, 10 mM EDTA, 10 mM glicerola in 0,01% NP 40 (L1), dobljene celice razbili z ultrazvokom, netopne delce odstranili z enournim centrifugiranjem, ostale nečistoče pa z obarjanjem z acetonom. Pelet smo raztopili v raztopini 9 M uree in 4% CHAPS-a in izmerili proteinsko koncentracijo s kompletom BCA™ Protein Assay Kit. Mase izhodičnih koščkov tkiv, absorbance pri 560 nm in koncentracije proteinskih ekstraktov so prikazane v preglednici 5, umeritvena krivulja pa je na sliki 23 (stran 38). Kljub temu, da je bilo razmerje masa tkiva : volumen pufra za lizo

L1 povsod enako in da so bili vsi vzorci parov 2–7 oborjeni z acetonom, so bile dobljene koncentracije različne. Segale so od 3 do 8 mg/ml (razen pri celični liniji AGS, kjer je koncentracija znašala 2,5 mg/ml).

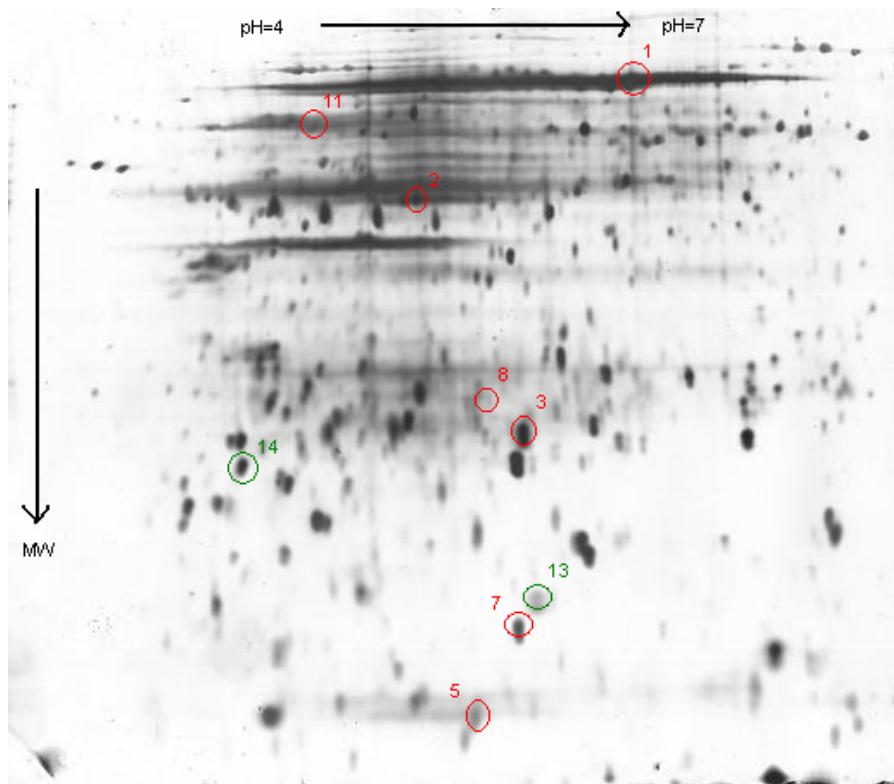
Preglednica 5: Masa uporabljenih koščkov tkiv želodcev, absorbanca pri 560 nm ($A_{560\text{nm}}$) in koncentracija njihovega proteinskega ekstrakta poobarjanju z acetonom in raztopitvi oborine v raztopini 9 M uree in 4% CHAPS-a ter absorbanca pri 560 nm in koncentracija proteinskega ekstrakta celične linije AGS poobarjanju z acetonom in raztopitvi oborine v raztopini 9 M uree in 4% CHAPS-a.

Vzorec	Masa (mg)	$A_{560\text{nm}}$	Koncentracija (mg/ml)
Par 2Nac	161	0,716	4,5
Par 2Tac	146	0,694	4,5
Par 3Nac	163	0,963	7
Par 3Tac	366	0,462	3
Par 4Nac	128	0,974	7
Par 4Tac	179	0,634	4
Par 5Nac	152	0,751	5
Par 5Tac	173	0,606	4,5
Par 6Nac	117	1,160	8
Par 6Tac	196	0,559	3,5
Par 7Nac	300	0,651	4,5
Par 7Tac	167	0,638	4,5
AGSac	/	0,433	2,5

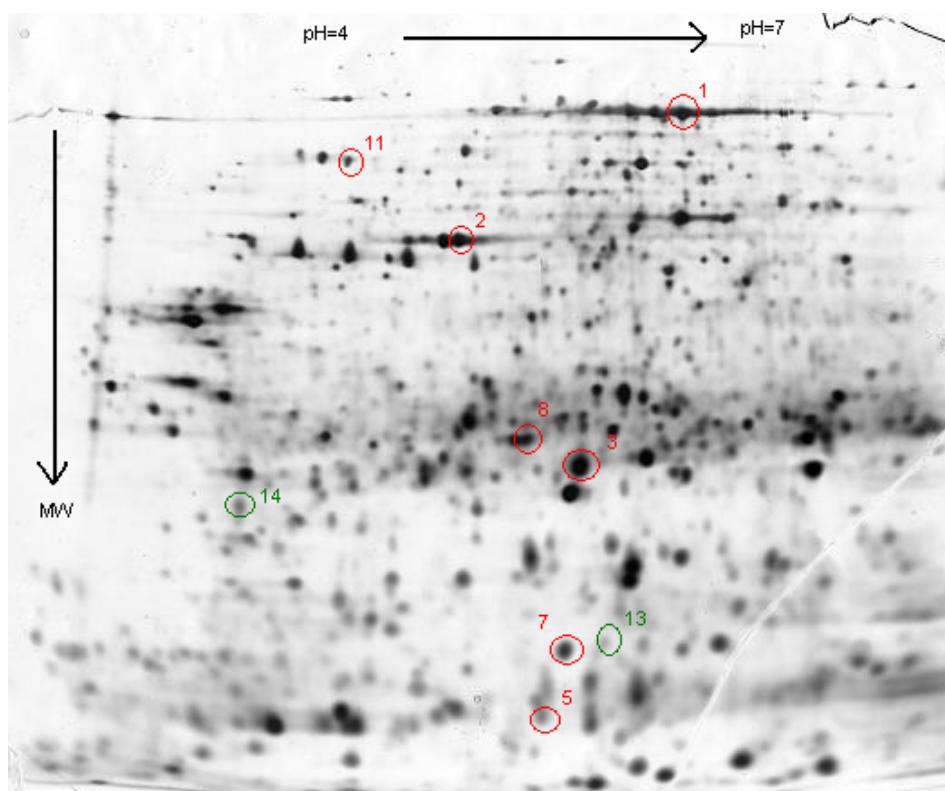
Po 100 µg proteinov smo fokusirali na 24-cm trakovih s pH-območjem 4–7, jih ekvilibrirali v raztopini s 4% SDS-om in elektroforetsko ločili na 12% gelih (za enakomernejšo razporeditev po celotnem gelu). Na koncu smo gele še pobarvali s srebrom. Primeri gelov para 5 v ponovitvah so prikazani na slikah 30–33, geli ostalih parov pa so v prilogi.



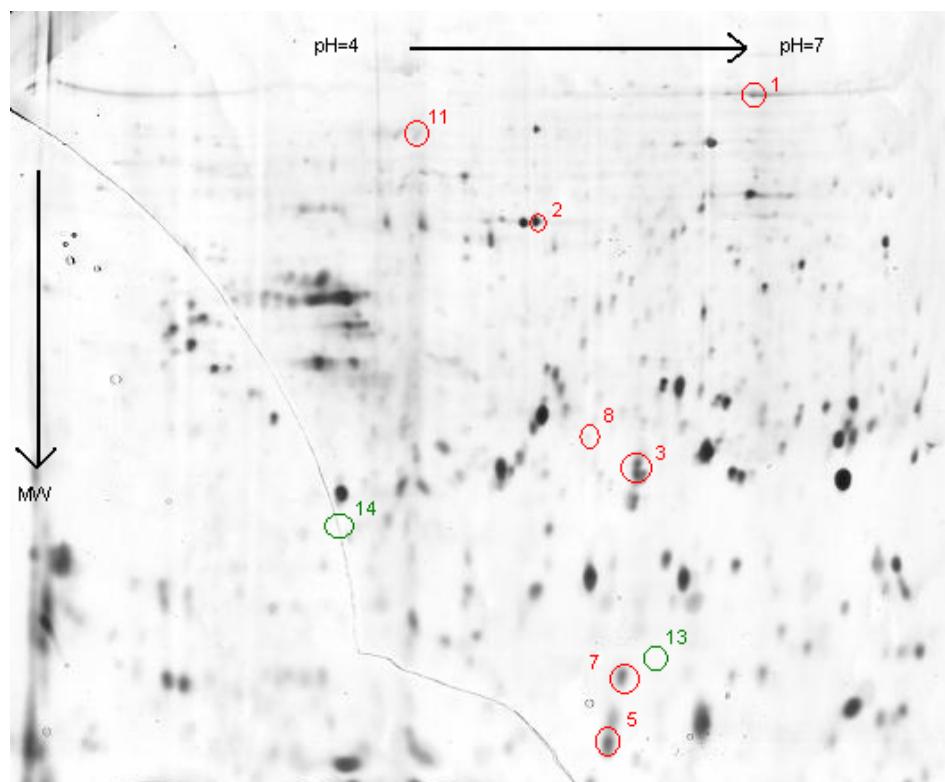
Slika 30: 2-DE gel prve ponovitve normalnega vzorca para 5.



Slika 31: 2-DE gel druge ponovitve normalnega vzorca para 5.

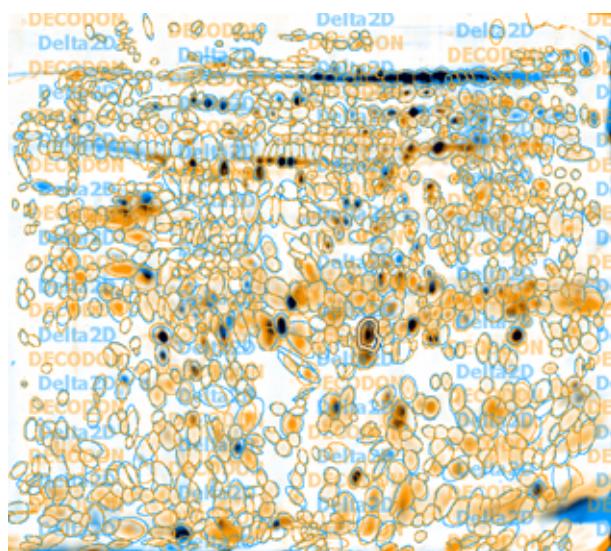


Slika 32: 2-DE gel prve ponovitve tumorskega vzorca para 5.



Slika 33: 2-DE gel druge ponovitve tumorskega vzorca para 5.

Sledila je analiza z demo verzijo programa Decodon Delta2D 3.4., na enak način kot pri paru 1. Normalne gele smo virtualno označili modro, tumorske oranžno ter jih po parih prekrili. Ukažali smo tudi odštevanje ozadja in normalizacijo. Nato smo pripravili fuzijo vseh štirih gelov, kjer je program avtomatično zaznal lise, potreben pa so bili še ročni popravki (slika 34). Zaznanih je bilo od 421 do 1395 lis.



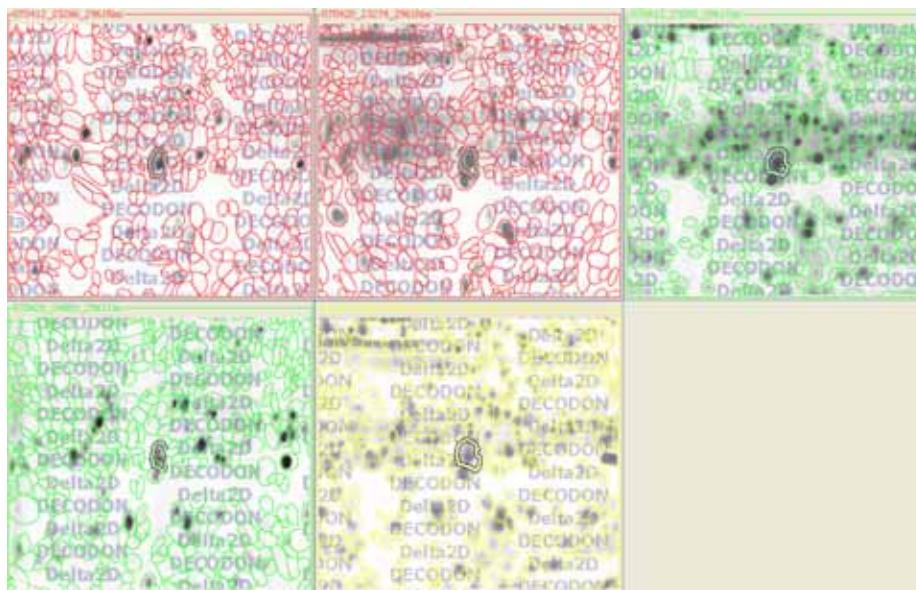
Slika 34: Poravnani 2-DE geli para 5 v ponovitvah z zaznanimi lisami. Normalni vzorec je označen z modro barvo, tumorski z oranžno, kjer je enega proteina približno enako takoj v normalnem kot v tumorskem vzorcu, pa je lisa skoraj črnejše barve.

Lise smo, poleg izbire glede na barvo, analizirali tudi z matematično funkcijo profila izražanja (slika 35). Ker je obravnavana potekala v ponovitvah, je bilo vidnih 5 stolpcev, ki so ponazarjali relativen volumen: 2 za normalna vzorca, 2 za tumorska in 1 za fuzijski gel. Če sta se stolpca ponovitev razlikovala v višini, je bila s črto prikazana tudi sredina njunih vrednosti.



Slika 35: Profil izražanja lise številka 3 para 5 v ponovitvah. Rdeči stolpec ponazarja izražanje v normalnem vzorcu, zeleni v tumorskem in rumeni v t.i. fuzijskem gelu.

Lise smo si pogledali tudi v povečavi (slika 36). Zaradi analize v ponovitvah sta vidni 2 povečavi za normalna gela, 2 za tumorska in 1 za fuzijskega.



Slika 36: Povečan prikaz diferencialnega izražanja lise številka 3 (debelejše obkrožena lisa) para 5 v ponovitvah. Rdeče obkrožene lise pripadajo normalnemu vzorcu, zelene tumorskemu in rumene t.i. fuzijskemu gelu.

Tudi pri pregledu tabele (slika 37) so vidne razlike v relativnih volumnih gelov v ponovitvah, zraven pa še njihove aritmetične sredine. Razmerje med relativnimi volumi lise iz normalnih in tumorskih gelov je bilo izračunano iz aritmetičnih sredin vrednosti dveh ponovitev.

spike	F1%	F2%	F3%	F4%	F5%	F6%	F7%	F8%	F9%	F10%	F11%	F12%	F13%	F14%	F15%	F16%	F17%	F18%	F19%	F20%	F21%	F22%	F23%	F24%	F25%	F26%	F27%	F28%	F29%	F30%	F31%	F32%	F33%	F34%	F35%	F36%	F37%	F38%	F39%	F40%	F41%	F42%	F43%	F44%	F45%	F46%	F47%	F48%	F49%	F50%	F51%	F52%	F53%	F54%	F55%	F56%	F57%	F58%	F59%	F60%	F61%	F62%	F63%	F64%	F65%	F66%	F67%	F68%	F69%	F70%	F71%	F72%	F73%	F74%	F75%	F76%	F77%	F78%	F79%	F80%	F81%	F82%	F83%	F84%	F85%	F86%	F87%	F88%	F89%	F90%	F91%	F92%	F93%	F94%	F95%	F96%	F97%	F98%	F99%	F100%	F101%	F102%	F103%	F104%	F105%	F106%	F107%	F108%	F109%	F110%	F111%	F112%	F113%	F114%	F115%	F116%	F117%	F118%	F119%	F120%	F121%	F122%	F123%	F124%	F125%	F126%	F127%	F128%	F129%	F130%	F131%	F132%	F133%	F134%	F135%	F136%	F137%	F138%	F139%	F140%	F141%	F142%	F143%	F144%	F145%	F146%	F147%	F148%	F149%	F150%	F151%	F152%	F153%	F154%	F155%	F156%	F157%	F158%	F159%	F160%	F161%	F162%	F163%	F164%	F165%	F166%	F167%	F168%	F169%	F170%	F171%	F172%	F173%	F174%	F175%	F176%	F177%	F178%	F179%	F180%	F181%	F182%	F183%	F184%	F185%	F186%	F187%	F188%	F189%	F190%	F191%	F192%	F193%	F194%	F195%	F196%	F197%	F198%	F199%	F200%	F201%	F202%	F203%	F204%	F205%	F206%	F207%	F208%	F209%	F210%	F211%	F212%	F213%	F214%	F215%	F216%	F217%	F218%	F219%	F220%	F221%	F222%	F223%	F224%	F225%	F226%	F227%	F228%	F229%	F230%	F231%	F232%	F233%	F234%	F235%	F236%	F237%	F238%	F239%	F240%	F241%	F242%	F243%	F244%	F245%	F246%	F247%	F248%	F249%	F250%	F251%	F252%	F253%	F254%	F255%	F256%	F257%	F258%	F259%	F260%	F261%	F262%	F263%	F264%	F265%	F266%	F267%	F268%	F269%	F270%	F271%	F272%	F273%	F274%	F275%	F276%	F277%	F278%	F279%	F280%	F281%	F282%	F283%	F284%	F285%	F286%	F287%	F288%	F289%	F290%	F291%	F292%	F293%	F294%	F295%	F296%	F297%	F298%	F299%	F300%	F311%	F312%	F313%	F314%	F315%	F316%	F317%	F318%	F319%	F320%	F321%	F322%	F323%	F324%	F325%	F326%	F327%	F328%	F329%	F330%	F331%	F332%	F333%	F334%	F335%	F336%	F337%	F338%	F339%	F340%	F341%	F342%	F343%	F344%	F345%	F346%	F347%	F348%	F349%	F350%	F351%	F352%	F353%	F354%	F355%	F356%	F357%	F358%	F359%	F360%	F361%	F362%	F363%	F364%	F365%	F366%	F367%	F368%	F369%	F370%	F371%	F372%	F373%	F374%	F375%	F376%	F377%	F378%	F379%	F380%	F381%	F382%	F383%	F384%	F385%	F386%	F387%	F388%	F389%	F390%	F391%	F392%	F393%	F394%	F395%	F396%	F397%	F398%	F399%	F400%	F401%	F402%	F403%	F404%	F405%	F406%	F407%	F408%	F409%	F410%	F411%	F412%	F413%	F414%	F415%	F416%	F417%	F418%	F419%	F420%	F421%	F422%	F423%	F424%	F425%	F426%	F427%	F428%	F429%	F430%	F431%	F432%	F433%	F434%	F435%	F436%	F437%	F438%	F439%	F440%	F441%	F442%	F443%	F444%	F445%	F446%	F447%	F448%	F449%	F450%	F451%	F452%	F453%	F454%	F455%	F456%	F457%	F458%	F459%	F460%	F461%	F462%	F463%	F464%	F465%	F466%	F467%	F468%	F469%	F470%	F471%	F472%	F473%	F474%	F475%	F476%	F477%	F478%	F479%	F480%	F481%	F482%	F483%	F484%	F485%	F486%	F487%	F488%	F489%	F490%	F491%	F492%	F493%	F494%	F495%	F496%	F497%	F498%	F499%	F500%	F501%	F502%	F503%	F504%	F505%	F506%	F507%	F508%	F509%	F510%	F511%	F512%	F513%	F514%	F515%	F516%	F517%	F518%	F519%	F520%	F521%	F522%	F523%	F524%	F525%	F526%	F527%	F528%	F529%	F530%	F531%	F532%	F533%	F534%	F535%	F536%	F537%	F538%	F539%	F540%	F541%	F542%	F543%	F544%	F545%	F546%	F547%	F548%	F549%	F550%	F551%	F552%	F553%	F554%	F555%	F556%	F557%	F558%	F559%	F560%	F561%	F562%	F563%	F564%	F565%	F566%	F567%	F568%	F569%	F570%	F571%	F572%	F573%	F574%	F575%	F576%	F577%	F578%	F579%	F580%	F581%	F582%	F583%	F584%	F585%	F586%	F587%	F588%	F589%	F590%	F591%	F592%	F593%	F594%	F595%	F596%	F597%	F598%	F599%	F600%	F601%	F602%	F603%	F604%	F605%	F606%	F607%	F608%	F609%	F610%	F611%	F612%	F613%	F614%	F615%	F616%	F617%	F618%	F619%	F620%	F621%	F622%	F623%	F624%	F625%	F626%	F627%	F628%	F629%	F630%	F631%	F632%	F633%	F634%	F635%	F636%	F637%	F638%	F639%	F640%	F641%	F642%	F643%	F644%	F645%	F646%	F647%	F648%	F649%	F650%	F651%	F652%	F653%	F654%	F655%	F656%	F657%	F658%	F659%	F660%	F661%	F662%	F663%	F664%	F665%	F666%	F667%	F668%	F669%	F670%	F671%	F672%	F673%	F674%	F675%	F676%	F677%	F678%	F679%	F680%	F681%	F682%	F683%	F684%	F685%	F686%	F687%	F688%	F689%	F690%	F691%	F692%	F693%	F694%	F695%	F696%	F697%	F698%	F699%	F700%	F701%	F702%	F703%	F704%	F705%	F706%	F707%	F708%	F709%	F710%	F711%	F712%	F713%	F714%	F715%	F716%	F717%	F718%	F719%	F720%	F721%	F722%	F723%	F724%	F725%	F726%	F727%	F728%	F729%	F730%	F731%	F732%	F733%	F734%	F735%	F736%	F737%	F738%	F739%	F740%	F741%	F742%	F743%	F744%	F745%	F746%	F747%	F748%	F749%	F750%	F751%	F752%	F753%	F754%	F755%	F756%	F757%	F758%	F759%	F760%	F761%	F762%	F763%	F764%	F765%	F766%	F767%	F768%	F769%	F770%	F771%	F772%	F773%	F774%	F775%	F776%	F777%	F778%	F779%	F780%	F781%	F782%	F783%	F784%	F785%	F786%	F787%	F788%	F789%	F790%	F791%	F792%	F793%	F794%	F795%	F796%	F797%	F798%	F799%	F800%	F801%	F802%	F803%	F804%	F805%	F806%	F807%	F808%	F809%	F810%	F811%	F812%	F813%	F814%	F815%	F816%	F817%	F818%	F819%	F820%	F821%	F822%	F823%	F824%	F825%	F826%	F827%	F828%	F829%	F830%	F831%	F832%	F833%	F834%	F835%	F836%	F837%	F838%	F839%	F840%	F841%	F842%	F843%	F844%	F845%	F846%	F847%	F848%	F849%	F850%	F851%	F852%	F853%	F854%	F855%	F856%	F857%	F858%	F859%	F860%	F861%	F862%	F863%	F864%	F865%	F866%	F867%	F868%	F869%	F870%	F871%	F872%	F873%	F874%	F875%	F876%	F877%	F878%	F879%	F880%	F881%	F882%	F883%	F884%	F885%	F886%	F887%	F888%	F889%	F890%	F891%	F892%	F893%	F894%	F895%	F896%	F897%	F898%	F899%	F900%	F901%	F902%	F903%	F904%	F905%	F906%	F907%	F908%	F909%	F910%	F911%	F912%	F913%	F914%	F915%	F916%	F917%	F918%	F919%	F920%	F921%	F922%	F923%	F924%	F925%	F926%	F927%	F928%	F929%	F930%	F931%	F932%	F933%	F934%	F935%	F936%	F937%	F938%	F939%	F940%	F941%	F942%	F943%	F944%	F945%	F946%	F947%	F948%	F949%	F950%	F951%	F952%	F953%	F954%	F955%	F956%	F957%	F958%	F959%	F960%	F961%	F962%	F963%	F964%	F965%	F966%	F967%	F968%	F969%	F970%	F971%	F972%	F973%	F974%	F975%	F976%	F977%	F978%	F979%	F980%	F981%	F982%	F983%	F984%	F985%	F986%	F987%	F988%	F989%	F990%	F991%	F992%	F993%	F994%	F995%	F996%	F997%	F998%	F999%	F1000%	F1001%	F1002%	F1003%	F1004%	F1005%	F1006%	F1007%	F1008%	F1009%	F1010%	F1011%	F1012%	F1013%	F1014%	F1015%	F1016%	F1017%	F1018%	F1019%	F1020%	F1021%	F1022%	F1023%	F1024%	F1025%	F1026%	F1027%	F1028%	F1029%	F1030%	F1031%	F1032%	F1033%	F1034%	F1035%	F1036%	F1037%	F1038%	F1039%	F1040%	F1041%	F1042%	F1043%	F1044%	F1045%	F1046%	F1047%	F1048%	F1049%	F1050%	F1051%	F1052%	F1053%	F1054%	F1055%	F1056%	F1057%	F1058%	F1059%	F1060%	F1061%	F1062%	F1063%	F1064%	F1065%	F1066%	F1067%	F1068%	F1069%	F1070%	F1071%	F1072%	F1073%	F1074%	F1075%	F1076%	F1077%	F1078%	F1079%	F1080%	F1081%	F1082%	F1083%	F1084%	F1085%	F1086%	F1087%	F1088%	F1089%	F1090%	F1091%	F1092%	F1093%	F1094%	F1095%	F1096%	F1097%	F1098%	F1099%	F1100%	F1101%	F1102%	F1103%	F1104%	F1105%	F1106%	F1107%	F1108%	F1109%	F1110%	F1111%	F1112%	F1113%	F1114%	F1115%	F1116%	F1117%	F1118%	F1119%	F1120%	F1121%	F1122%	F1123%	F1124%	F1125%	F1126%	F1127%	F1128%	F1129%	F1130%	F1131%	F1132%	F1133%	F1134%	F1135%	F1136%	F1137%	F1138%	F1139%	F1140%	F1141%	F1142%	F1143%	F1144%	F1145%	F1146%	F1147%	F1148%	F1149%	F1150%	F1151%	F1152%	F1153%	F1154%	F1155%	F1156%	F1157%	F1158%	F1159%	F1160%	F1161%	F1162%	F1163%	F1164%	F1165%	F1166%	F1167%	F1168%	F1169%	F1170%	F1171%	F1172%	F1173%	F1174%	F1175%	F1176%	F1177%	F1178%	F1179%	F1180%	F1181%	F1182%	F1183%	F1184%	F1185%	F1186%	F1187%	F1188%	F1189%	F1190%	F1191%	F1192%	F1193%	F1194%	F1195%	F1196%	F1197%	F1198%	F1199%	F1200%	F1201%	F1202%	F1203%	F1204%	F1205%	F1206%	F1207%	F1208%	F1209%	F1210%	F1211%	F1212%	F1213%	F1214%	F1215%	F1216%	F1217%	F1218%	F1219%	F1220%	F1221%	F1222%	F1223%	F1224%	F1225%	F1226%	F1227%	F1228%	F1229%	F1230%	F1231%	F1232%	F1233%	F1234%	F1235%	F1236%	F1237%	F1238%	F1239%	F1240%	F1241%	F1242%	F1243%	F1244%	F1245%	F1246%	F1247%	F1248%	F1249%	F1250%	F1251%	F1252%	F1253%	F1254%	F1255%	F1256%	F1257%	F1258%	F1259%	F1260%	F1261%	F1262%	F1263%	F1264%	F1265%	F1266%	F1267%	F1268%	F1269%	F1270%	F1271%	F1272%	F1273%	F1274%	F1275%	F1276%	F1277%	F1278%	F1279%	F1280%	F1281%	F1282%	F1283%	F1284%	F1285%	F1286%	F1287%	F1288%	F1289%	F1290%	F1291%	F1292%	F1293%	F1294%	F1295%	F1296%	F129

V preglednici 6 so prikazani relativni volumni dveh izbranih lis (13 in 14), ki sta bili v večini primerov bolj izraženi v normalnih gelih.

Preglednica 6: Relativni volumni dveh dodatnih lis pri parih (normalni in tumorski) šestih vzorcev, analiziranih v ponovitvah.

Vzorec	Lisa 13	Lisa 14
Par 2Nac	0,157	0,123
Par 2Nac	0,037	0,072
Par 2Tac	0,136	0,021
Par 2Tac	0,186	0,009
Par 3Nac	0,045	0,097
Par 3Nac	0,716	0,236
Par 3Tac	0,153	0,137
Par 3Tac	0,040	0
Par 4Nac	0,451	0,729
Par 4Nac	0,228	0,349
Par 4Tac	0,031	0,182
Par 4Tac	0,041	0,333
Par 5Nac	0,437	0,472
Par 5Nac	0,441	0,531
Par 5Tac	0,121	0,346
Par 5Tac	0,165	0,053
Par 6Nac	0,444	0,230
Par 6Nac	0,474	0,428
Par 6Tac	0,033	0,143
Par 6Tac	0,104	0,293
Par 7Nac	0,038	0,008
Par 7Nac	0,316	0,141
Par 7Tac	0,029	0,016
Par 7Tac	0,001	0,003

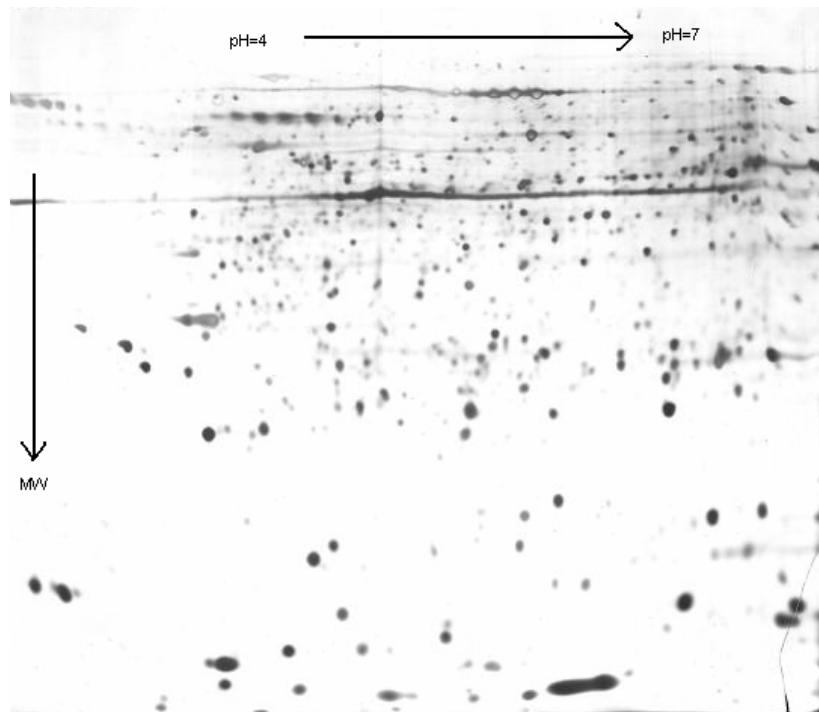
Na gelih smo poskusili poiskati tudi tiste lise, ki smo jih identificirali že pri paru 1, da bi preverili, če se raven izražanja ujema s tisto, določeno za par 1. Določili smo lahko le nekatere (obkrožene in označene so z rdečo na slikah 30-33). Njihovi relativni volumni so prikazani v preglednici 7. Za obdelavo smo iz posameznega para izbrali boljše ponovitve, pri paru 5 pa vse. V večini se ujemajo z izražanjem pri paru 1.

Preglednica 7: Relativni volumni nekaterih lis pri parih (normalni in normalni) šestih vzorcev.

Lise →	1	2	3	5	7	8	11
Par 2Nac	0,378	0,203	1,015	0,027	0,375	0,268	/
Par 2Tac	0,659	0,294	0,807	0,074	0,384	0,205	/
Par 3Nac	3,304	0,848	1,612	0	0,233	0	0,412
Par 3Tac	0,819	0,493	1,418	0,136	0,268	0,053	0,312
Par 4Nac	1,127	0,591	0,945	0,024	0,247	0,134	0,220
Par 4Tac	1,005	0,503	0,834	0,170	0,193	0,050	0,636
Par 5Nac	2,221	0,555	1,359	0,113	0,530	0,088	0,675
Par 5Nac	0,899	0,169	0,945	0,520	0,305	0,180	0,410
Par 5Tac	0,504	0,323	0,711	0,192	0,290	0,219	0,128
Par 5Tac	0,244	0,283	0,973	0,603	0,471	0,026	0,169
Par 6Nac	0,501	0,588	0,951	0,033	0,215	0,022	0,159
Par 6Tac	0,296	0,240	0,799	0,177	0,294	0,251	0,105
Par 7Nac	0,818	0,325	0,826	0,010	0,165	0,139	0,355
Par 7Tac	1,501	0,027	1,247	0,124	0,160	0,033	0,054

4.4 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA IN RAČUNALNIŠKA ANALIZA CELIČNE LINIJE AGS (Z OBARJANJEM)

Optimiziran postopek smo preizkusili tudi pri celični liniji AGS. Podatki o izmerjeni absorbanci pri 560 nm in koncentraciji so v preglednici 5, umeritvena krivulja pa na sliki 23. S postopki, ki so delovali na tumorskih in normalnih vzorcih želodčne sluznice, smo dobili zadovoljiv gel, prikazan na sliki 38. Poskusili smo ga primerjati z geli tkiv človeškega želodca, a smo lahko med seboj poravnali le redke lise.



Slika 38: 2-DE gel celične linije AGS.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA IN RAČUNALNIŠKA ANALIZA PARA 1 (BREZ OBARJANJA)

Po nekaj poskusih optimizacije dvodimenzionalne elektroforeze na testnih vzorcih smo se lotili analize vzorcev para 1. Uporabljeni postopek je potekal brez obarjanja. Med računalniško obdelavo rezultatov smo ugotovili, da sta vzorca lis (in s tem proteinov) na normalnem in tumorskem gelu dovolj podobna za medsebojno primerjavo. Glede na podatek o relativnih volumnih smo lahko določili lise (in s tem proteine), ki so bile bolj izražene v normalnem ali tumorskem gelu. Za prvi vtis, katere proteine smo dobili na gelih in katerih je npr. v normalnem tkivu več ali manj, smo jih 12 poslali na identifikacijo na ICGEB (sliki 17 in 18). Nazaj smo dobili rezultate identifikacij 10 lis, in sicer za 8 različnih proteinov (preglednica 3). Na ICGEB so jih identificirali kot prekurzor alfa-1-antitripsina (lisi 1 in 11), citoplazemski aktin 2 (lisi 2 in 10), glutation S-transferaza P (lisa 3), izoform 2 sterilnega alfa in TIR motiv-vsebujočega proteina 1 (lisa 4), protein S100-A9 (lisa 5), prekurzor transtiretina (lisa 7), kloridni intracelularni kanalni protein 1 (lisa 8) in citoplazemski aktin 1 (lisa 9). Znižano izražanje v tumorskem tkivu so, glede na naše gele, imele lise 1, 2, 3, 4, 7 in 11, kjer je bila najmanjša razlika v izražanju 2,3-kratna, in zvišano lise 5, 8, 9 in 10, kjer je bila najmanjša razlika v izražanju 1,4-kratna.

Eden izmed proteinov s 3,1-kratnim povišanim izražanjem v tumorskem tkivu želodčne sluznice v našem primeru (lisa 8), je bil kloridni intracelularni kanalni protein 1 (CLIC1). Do takšne ugotovitve so prišli tudi Chen in sod. (2007), kjer je razlika nihala med 1,2- in 11-kratno. Protein naj bi bil ionski kanalček, ki služi za vzdrževanje ionske homeostaze, kontrolo volumna celice in transepiteljski transport. Njegovo povečano izražanje so potrdili še s kvantitativno reakcijo RT-PCR, prenosom Western in imunohistokemijsko analizo. Ugotovili so tudi povezano povišanega izražanja tega proteina z metastazo v limfne vozle, limfatično invazijo, perinevralno invazijo in s slabšim preživetjem.

Znižano izražanje v tumorskem tkivu za 2,36-krat smo v našem primeru, med drugim, ugotovili tudi za glutation S-transferazo P (lisa 3). Sama glutation S-transferaza (GST) je v

preteklih raziskavah kar nekajkrat omenjena: Yoshihara in sod. (2006) so poročali o njenem znižanem izražanju v tumorskem tkivu, Nishigaki in sod. (2005) ter Chen in sod. (2007) pa o povišanem. GST katalizira konjugacijo reduciranega glutationa do velikega števila hidrofobnih elektrofilov (SIB, 2007).

Še en pogosto najdeni protein v različnih študijah je alfa-1-antitripsin. Ryu in sod. (2003) ter Chen in sod. (2007) so poročali o njegovem znižanem izražanju v tumorskem tkivu. V naših gelih smo identificirali prekurzor alfa-1-antitripsina, in sicer v 2 različnih lisah (1 in 11). Obakrat ga je bilo manj v tumorskem tkivu (3,48- in 4,78-krat). Protein deluje kot inhibitor serinskih proteaz (SIB, 2007).

Ostalih proteinov, ki so jih identificirali na ICGEB, v omenjenih člankih iz zadnjih let nismo zasledili. So pa njihove funkcije naslednje: aktini so vpletene v celično gibeljivost, izoform 2 sterilnega alfa in TIR motiv-vsebujočega proteina 1 je morda vpletena v prirojeni imunski odziv, protein S100-A9 pa izražajo makrofagi tako v akutno vnetih tkivih kot v kroničnih infekcijah, morda inhibira proteinske kinaze, najdemo pa ga tudi v epitelnih celicah (SIB, 2007).

5.2 NADALJNJA OPTIMIZACIJA METOD NA VZORCU ZDRAVEGA ŽELODCA

Ker se postopek, uporabljen pri paru 1, kasneje ni izkazal za dovolj ponovljivega pri nekaterih dodatnih vzorcih, smo ga dalje optimizirali. Končni postopek je vključeval drobljenje v tekočem dušiku in lizo s pufrom iz 10 mM PBS-a, 10 mM EDTA, 10 mM glicerola in 0,01% NP 40 (L1) ter razbijanje pridobljenih celic z ultrazvokom, enourno centrifugiranje pri 13.000 vrt./min in 4 °C,obarjanje supernatanta s hladnim acetonom, raztplavljanje dobljenega peleta v raztopini 9 M uree in 4% CHAPS-a, izoelektrično fokusiranje 63 kVh na 24-cm traku pH 4–7, ekvilibracijo z raztopino s 4% SDS-om, elektroforezo na 12% poliakrilamidnem gelu v elektroforeznem pufru z 0,2% SDS-om ter barvanje s srebrom.

S podaljšanim centrifugiranjem smo bolje odstranili netopne delce (celične ostanke), zato smo dobili lepše gele (slika 25) in boljšo ponovljivost. Z acetonom smo odstranili nekatere

polarne komponente, kot so npr. lipidi (GE Healthcare, 2004), kar je še povišalo ponovljivost. Peleti acetonskega in trikloroacetetnega obarjanja se v prvem pufru za lizo (L1) niso dobro raztopili, kar je vidno v meritvi koncentracij (preglednica 4). To potrjuje glavno težavo obarjanj: resolubilizacijo peleta in s tem izgubo proteinov (GE Healthcare, 2004). Zato moramo vedeti, ali želimo boljšo ponovljivost in tvegamo izgubo nekaterih proteinov ali želimo na gelu dobiti čim več proteinov. Čeprav se je pelet, nastal z obarjanjem z nasičeno raztopino amonijevega sulfata, najbolje raztopil, so rezultati na gelu odločili v prid acetona (slike 26–28). Imel je namreč najmanj moteče ozadje (v primeru amonijevega sulfata je le-to verjetno nastalo zaradi odvečne soli).

Kometnih repkov (slika 29) smo se znebili s povečanjem količine SDS-a tako v ekvilibracijski raztopini kot v elektroforeznem pufru. Do njih je sicer prišlo, ker še posebno večji proteini niso bili nasičeni z SDS-om in se zato v drugi dimenziji niso lepo ločili (Ohlmeier, 2007).

Pomemben korak 2-DE analize je tudi odvzem vzorca in njegovo začetno procesiranje. V našem primeru koščki tkiva razen spiranja predhodno niso bili obdelani, zaradi česar so lahko tumorski vzorci vsebovali tudi normalne celice (in obratno) ter poleg epitelijskih še celice globljih slojev. To se da rešiti npr. z obogativijo epitelijskih celic (Ebert in sod., 2005) ali lasersko mikrodisekcijo (Rajčevič, 2005).

5.3 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA IN RAČUNALNIŠKA ANALIZA PAROV 2-7 (Z OBARJANJEM)

Optimizirani postopek smo v ponovitvah preizkusili pri 6 parih vzorcev želodčne sluznice. Izkazal se je za zadovoljivega (slike 30–33). Našli smo več lis, ki so bile diferenčno izražene, med njimi dve (13 in 14), ki smo jih računalniško analizirali v ponovitvah (preglednica 6). Razvidno je, da lahko pride do precej velikih odstopanj znotraj ponovitev in da so lahko te razlike večje kot v primerjavi normalnega vzorca s tumorskim. Tudi če pogledamo razmerje relativnih volumnov ene lise (npr. 13) z drugo (npr. 14) znotraj enega gela, se ta lahko razlikuje glede na ponovitve. Zato je potrebno za zanesljivejšo analizo in rezultate napraviti več ponovitev posameznega vzorca, po nekaterih podatkih od 3 do 6

(Wittman-Liebold in sod., 2006). Dobro pa je tudi, če dobljene rezultate lahko potrdimo, kot so povišano izražanje katepsina B v tumorskem tkivu s prenosom Western potrdili Ebert in sod. (2005). V našem primeru je bila lisa 13 glede na povprečja relativnih volumnov v ponovitvah bolj izražena v normalnih tkivih želodčne sluznice, in sicer v 5 parih, lisa 14 pa v vseh 6. Vsaj ti dve bi bilo zanimivo izrezati in identificirati.

Lise, ki so jih z MALDI-TOF-MS na ICGEB identificirali pri paru 1, smo poskušali poiskati še na ostalih parih, pri čemer smo uporabili boljše gele izmed dveh ponovitev. Določili smo jih lahko le nekaj, za kar je kriva tako priprava vzorca (npr. proteine prvega para nismo obarjali z acetonom) kot tudi gel sam (za par 1 smo uporabili 10 odstotnega). Če pa bi hoteli biti popolnoma prepričani v njihovo istovetnost, bi morali identificirati tudi lise parov 2–7. V preglednici 7, kjer so povzeti relativni volumni teh določenih lis lahko vidimo, da imajo lise 1, 2, 3, 4, 7 in 11 vsaj v 50 % povečano izražanje v normalnem tkivu, lise 5, 8, 9 in 10 pa zmanjšano. To se ujema s podatki para 1 (preglednica 2). Najbolj izstopa par 2, ki se po dobljenih podatkih o starosti bolnika in različnih tipih klasifikacij (preglednica 1) nikjer izrazito ne razlikuje od ostalih vzorcev. Možni bi lahko bili še drugi vzroki za izstopanje, ki v preglednici niso našteti, npr. predhodna okužba z bakterijo *Helicobacter pylori*, predhodno zdравljenje, rasa bolnika itd.

Če pogledamo podrobnejše par 5, ki je bil analiziran v ponovitvah, vidimo, da z upoštevanjem aritmetične sredine vrednosti obeh ponovitev ne dobimo vedno enakega rezultata kot z upoštevanjem le ene. Tudi razmerja med različnimi lisami na enem gelu se znotraj ponovitev razlikujejo. To potrjuje našo prejšnjo ugotovitev, da je potrebno delo v več ponovitvah in naknadna potrditev rezultatov.

5.4 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA IN RAČUNALNIŠKA ANALIZA CELIČNE LINIJE AGS (Z OBARJANJEM)

Na koncu smo uspešnost našega optimiziranega postopka preverili še na celični liniji AGS. Dobili smo zadovoljiv gel (slika 38). Ko smo ga žeeli primerjati z geli tkiv sluznice človeškega želodca, lis med sabo nismo mogli zadovoljivo poravnati. Za nekatere lise bi lahko trdili, da so bile enake, preveč pa jih je ostalo neporavnanih. Kot so ugotovili že Ryu

in sod. (2003) imajo celične linije to pozitivno lastnost, da ni vmes primesi normalnih celic, vendar pa za ugotavljanje vloge proteinov *in vivo* niso reprezentativne.

5.5 SKLEPI

- Med normalnim in tumorskim vzorcem želodčnega tkiva obstajajo razlike v izražanju nekaterih proteinov.
- Dvodimenzionalna elektroforeza (2-DE) in masna spektrometrija (MS) sta učinkoviti orodji proteomike za ugotavljanje teh razlik in identifikacijo proteinov.
- Za posamezno vrsto vzorca je potrebna optimizacija vseh faz, od odvzema do računalniške analize. Za vzorce želodčnega tkiva so se kot optimalni izkazali naslednji postopki:
 - Liza vzorca s pufrom iz 10 mM PBS-a, 10 mM EDTA, 10 mM glicerola in 10% NP 40 ter razbijanje pridobljenih celic z ultrazvokom 3 x 10 s.
 - Odstranjevanje netopnih celičnih ostankov z enournim centrifugiranjem pri 13.000 vrt./min in 4 °C.
 - Odstranjevanje ostalih nečistoč (organskih) z obarjanjem z acetonom ter raztopljanje dobljenega peleta v raztopini 9 M uree in 4% CHAPS-a.
 - Izoelektrično fokusiranje z 10 h pasivne in 2 h aktivne rehidracije (100 V) ter skupnim časom okrog 63 kWh za 24-cm dolge trakove s pH-območjem 4–7 in 100 µg proteinov.
 - Ekvilibracija s 4% SDS-om in SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza v pufru z 0,2% SDS-om.
- Za računalniško analizo ni dovolj le avtomatizirana obdelava, marveč je potrebno tudi sprotno preverjanje in ročni popravki.
- Potrebno je delo v več ponovitvah.
- 2-DE ni standartna metoda, zato je zelo pomembno, da so vsi postopki izvedeni na popolnoma enak način.
- Izbrani optimizirani postopek 2-DE deluje tudi na proteinskih ekstraktih celične linije želodčnega karcinoma.
- Metoda brez obarjanja se je v našem primeru izkazala kot nekoliko manj uporabna, kljub temu pa smo z njo identificirali 8 različnih proteinov z diferencialnim izražanjem.

6 POVZETEK

Rak je posledica nepravilnega delovanja regulatornih mehanizmov, ki nadzorujejo obnašanje normalne celice. Ena pogostejših oblik je želodčni karcinom, ki nastaja v več stopnjah. Vanje so vpletene spremembe različnih genov, to pa se kaže kot sprememba v izražanju proteinov. Pri določanju le-teh so nam v pomoč metode proteomike, ena izmed njih je tudi dvodimenzionalna elektroforeza (2-DE). Metodo je v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja razvil O'Farrel, skozi čas pa se je izpopolnjevala. Sestavljena je iz dveh dimenzij: izoelektričnega fokusiranja (IEF), ki ločuje proteine glede na njihovo izoelektrično točko (pI), in natrijev dodecil sulfat poliakrilamidne gelske elektroforeze (SDS-PAGE), ki ločuje proteine glede na molekulsko maso (MW).

Uporaba 2-DE pri analizi želodčnega raka je do danes prinesla odkritje marsikaterega proteina, ki se različno izraža v normalnem in tumorskem tkivu. Nekaj takih, za katere je bilo objavljeno, da imajo povečano izražanje v normalnem tkivu, so: apoliprotein A-1, serotransferin, alfa-1-antitripsin, MAD1L1, COX5A, CYR61 in FOV. Povišano izražanje v tumorskem tkivo imajo glede na objave npr. HSP 27, MEF2C, MnSOD, PGK-1, katepsin B in CLIC1. Glede nekaterih proteinov (npr. glutation S-transferaza) si raziskovalci nasprotujejo.

Pri sami metodi 2-DE obstajajo nekakšna splošna navodila o pripravi vzorcev in raztopin, še vedno pa ta omogočajo prosto izbiro kar se tiče posameznih podrobnosti. Raziskovalne skupine tako lahko iste vzorce pripravljajo na nekoliko različne načine. V našem raziskovalnem delu smo po optimizaciji za lizo vzorcev želodčnega tkiva in celične linije AGS uporabili pufer iz 10 mM PBS-a, 10 mM EDTA, 10 mM glicerola in 10% NP 40 ter razbijanje pridobljenih celic z ultrazvokom 3 x 10 s. Netopne celične ostanke smo odstranili z enournim centrifugiranjem pri 13.000 vrt./min in 4 °C, ostale nečistoče (organske) pa z obarjanjem z acetonom ter raztapljanjem dobljenega peleta v raztopini 9 M uree in 4% CHAPS-a. Vzorec para 1 smo pripravili le s 15-minutnim centrifugiranjem in brez obarjanja, kar pa se je kasneje na nekaj vzorcih izkazalo za ne dovolj ponovljivo. Koncentracijo proteinskega ekstrakta smo merili s kompletom BCA™ Protein Assay Kit in za analizo vzeli ali 10 µl vzorca (par 1) ali 100 µg proteinov (pari 2–7, AGS). Najprej smo jih ločili na 24 cm dolgih trakovih z imobiliziranim pH-gradientom 4–7 z 10-urno pasivno,

2-urno aktivno rehidracijo in časom fokusiranja okoli 63 kWh. Ekvilibracijo smo izvedli v raztopini s 4% SDS-om. Nato smo jih ločili še na 10% (par 1) ali 12% (pari 2–7, AGS) poliakrilamidnih gelih v pufru z 0,2% SDS-om. Za vizualizacijo lis smo gele pobarvali s srebrovim nitratom, po protokolu, kompatibilnem z masno spektrometrijo. Računalniško smo jih obdelali z demo verzijo programa Decodon Delta2D 3.4. V vzorcih tumorskega in normalnega tkiva smo poiskali lise z diferenčnim izražanjem. Iz para 1 smo jih 12 izrezali (lise 1, 2, 3, 4, 7 in 11 so bile povišane v normalnem, lise 5, 8, 9 in 10 pa v tumorskem tkivu) in poslali na identifikacijo z MALDI-TOF-MS na Mednarodni center za gensko inženirstvo in biotehnologijo (ICGEB) v Trstu. Nazaj smo dobili rezultate za 10 lis, in sicer kot 8 različnih proteinov: prekurzor alfa-1-antitripsina (lisi 1 in 11), citoplazemski aktin 2 (lisa 2, 10), glutation S-transferaza P (lisa 3), izoform 2 sterilnega alfa- in TIR-motiv vsebujočega proteina 1 (lisa 4), protein S100-A9 (lisa 5), prekurzor transtiretina (lisa 7), kloridni intracelularni kanalni protein 1 (lisa 8) in citoplazemski aktin 1 (lisa 9). Te lise smo poskušali poiskati tudi na boljših gelih iz dveh ponovitev parov 2–7. Določili smo jih le omejeno število, za kar je lahko kriva razlika v pripravi proteinskega ekstrakta (obarjanje z acetonom). Za potrditev njihove istovetnosti bi jih bilo potrebno identificirati. Na gelih parov 2–7 smo poiskali še druge lise z diferencialnim izražanjem in našli vsaj dve, ki sta imeli povišano izražanje v normalnem tkivnem vzorcu v 83 % (lisa 13) in 100 % (lisa 14) vzorcev bolnikov. Vsaj ti dve bi bilo primerno identificirati. Optimizirani postopek smo na koncu preizkusili tudi na celični liniji AGS, kjer se je izkazal za zadovoljivega, vendar so funkcijске primerjave z želodčnim tkivom vprašljive.

Povzamemo lahko, da prihaja pri raku želodca do diferenčnega izražanja proteinov glede na primerjavo z normalnimi celicami, in da sta 2-DE in MS učinkoviti metodi proteomike za ugotavljanje teh razlik. Za različne vrste vzorcev pa je zaradi odstopanj od splošnih metodoloških pravil potrebno optimizirati v vseh fazah.

7 VIRI

Barranco S.C., Townsend Jr.C.M., Casartelli C., Macik B.G., Burger N.L., Boerwinkle W.R., Gourley W.K. 1983. Establishment and characterization of an *in vitro* model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Research*, 43, 4: 1703-1709.

BioChain Institute. 2004. Total Protein Certificate of Analysis. Hayward, BioChain Institute, Inc.

http://www.biochain.com/biochain/coa/Total_Protein_CoA.pdf (2. jul. 2007): 1 str.

Brusic V., Marina O., Wu C.J., Reinherz E.L. 2007. Proteome informatics for cancer research: from molecules to clinic. *Proteomics*, 7, 6: 976-991.

Chen C.-D., Wang C.-S., Huang Y.-H., Chien K.-Y., Liang Y., Chen W.-J., Lin K.-H. 2007. Overexpression of CLIC1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance. *Proteomics*, 7, 1: 155-167.

Coachman K., Warfield L., Hahn S. 2002. TCA protein precipitation. Seattle, Fred Hutchinson Cancer Research Center, The Hahn Laboratory. (13. mar. 2002)
http://www.fhcrc.org/science/labs/hahn/methods/biochem:meth/tca_ppt.html (23. nov. 2006): 1 str.

Cooper G.M. 2000. The Cell: a molecular approach. 2nd ed. Washington, D.C., The American Society for Microbiology: 689 str.

Eagle H. 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122, 3168: 501-504. Cit. po: Cooper G.M. 2000. The Cell: a molecular approach. 2nd ed. Washington, D.C., The American Society for Microbiology: 689 str.

Ebert M.P.A., Krüger S., Fogeron M.-L., Lamer S., Chen J., Pross M., Schulz H.-U., Lage H., Heim S., Roessner A., Malfertheiner P., Röcken C. 2005. Overexpression of

cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis. *Proteomics*, 5, 6: 1693-1704.

GE Healthcare. 2004. 2-D electrophoresis. Principles and methods. Little Chalfont, GE Healthcare UK Ltd.

http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/2d_electrophoresis_handbook (2. jul. 2007): 162 str.

Ha G.H., Lee S.U., Kang D.G., Ha N.-Y., Kim S.H., Kim J., Bae J.M., Kim J.W., Lee C.-W. 2002. Proteome analysis of human stomach tissue: separation of soluble proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and identification by mass spectrometry. *Electrophoresis*, 23, 15: 2513-2524.

Jelenc F. 2003. Rak želodca. *Zdravniški vestnik*, 72, 1: 33-36.

Juvan R., Hudler P., Gazvoda B., Repse S., Bracko M., Komel R. 2007. Significance of genetic abnormalities of p53 protein in Slovenian patients with gastric carcinoma. *Croatian Medical Journal*, 48, 2: 207-217.

Kuramitsu Y., Nakamura K. 2006. Proteomic analysis of cancer tissues: shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers. *Proteomics*, 6, 20: 5650-5611.

Lauren P. 1965. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, section A*, 64: 31-49.
Cit. po: Rajčević U. 2005. Differential analysis of transcriptome and proteome in gastric adenocarcinoma. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 158 str.

Miller I., Crawford J., Gianazza E. 2006. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics*, 6, 20: 5385-5408.

- Ming S.-C. 1998. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: A critical review. *Gastric Cancer*, 1, 1: 31-50.
- Mortz E., Krogh T.N., Vorum H., Görg A. 2001. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*, 1, 11: 1359-1363.
- Nishigaki R., Osaki M., Hiratsuka M., Toda T., Murakami K., Jeang K.-T., Ito H., Inoue T., Oshimura M. 2005. Proteomic identification of differentially-expressed genes in human gastric carcinomas. *Proteomics*, 5, 12: 3205-3213.
- O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 10: 4007-4021.
- Ohlmeier S. 2007. Protocols (troubleshooting). Oulu, Biocenter Oulu, Department of Biochemistry, Proteomics Core Facility.
<http://www.biochem.oulu.fi/proteomics/protocols.html> (23. mar. 2007): 8 str.
- Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55, 2: 74-108.
- Rajčević U. 2005. Differential analysis of transcriptome and proteome in gastric adenocarcinoma. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 158 str.
- Ramagli L.S. 1999. Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers. V: 2-D proteome analysis protocols. Link A.J. (ed.). Totowa, Humana Press Inc.: 99-103 (Methods in molecular biology; vol. 112)
- Ryu J.-W., Kim H.-J., Lee Y.-S., Myong N.-H., Hwang C.-H., Lee G.-S., Yom H.-C. 2003. The proteomics approach to find biomarkers in gastric cancer. *Journal of Korean Medical Science*, 18, 4: 505-509.

Sasazuki S., Sasaki S., Tsugane S. 2002. Cigarette smoking, alcohol consumption and subsequent gastric cancer risk by subsite and histologic type. International Journal of Cancer, 101, 6: 560-566.

Serafini M., Bellocchio R., Wolk A., Ekström A.M. 2002. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. Gastroenterology, 123, 4: 985-991.

Sjödahl K., Lu Y., Nilsen T.I.L., Ye W., Hveem K., Vatten L., Lagergren J. 2006. Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. International Journal of Cancer, 120, 1: 128-132.

SIB - Swiss Institute of Bioinformatics. 2007. ExPASy (Expert Protein Analysis System) Proteomics Server. Geneva, SIB. (26. jun. 2007).
<http://www.expasy.org> (5. jul. 2007): 57 str.

Smith M.G., Hold G.L., Tahara E., El-Omar E.M. 2006. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. World Journal of Gastroenterology, 12, 19: 2979-2990.

Wang N.S. 1996. Enzyme purification by salt (ammonium sulfate) precipitation. Maryland, Department of Chemical & Biomolecular Engineering.
<http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab6a.htm> (4. dec. 2006): 5 str.

Westermeier R., Naven T. 2002. Proteomics in practice. A laboratory manual of proteome analysis. 1st ed. Weinheim, Wiley-VCH: 318 str.

Wittmann-Liebold B., Graack H.-R., Pohl T. 2006. Two-dimensional gel electrophoresis as a tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. Proteomics, 6, 17: 4688-4703.

Yoshihara T., Kadota Y., Yoshimura Y., Tatano Y., Takeuchi N., Okitsu H., Umemoto A., Yamauchi T., Itoh K. 2006. Proteomic alteration in gastric adenocarcinomas from Japanese patients. Molecular Cancer, 5:75. doi:10.1186/1476-4598-5-75.

<http://www.biomedcentral.com/1476-4598/5/75> (1. maj 2007): 12 str.

Zheng L., Wang L., Ajani J., Xie K. 2004. Molecular basis of gastric cancer development and progression. *Gastric Cancer*, 7, 2: 61-77.

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila prof. dr. Radovanu Komelu, ki mi je omogočil izvedbo poskusov za to diplomsko delo. Hvala za nasvete in vso pomoč.

Prof. dr. Darji Žgur Bertok hvala za mentorstvo in strokovni pregled diplomskega dela.

Prof. dr. Simonu Horvatu se zahvaljujem za recenzijo diplomskega dela.

Zahvala gre tudi na Onkološki inštitut (predvsem dr. Snježani Frković-Grazio) in Inštitut za sodno medicino Medicinske fakultete v Ljubljani za vzorce ter na Mednarodni center za gensko inženirstvo in biotehnologijo (ICGEB) v Trstu za identifikacijo proteinov.

Damjani se zahvaljujem za potrežljivo vpeljevanje v svet dela s proteini in za vso spodbudo.

Alji, Dubi, Maši, Mateju, Petri, Sabini in Tomažu hvala za pomoč ter dobro delovno vzdušje v laboratoriju in izven njega. Sem spadajo tudi vsi s Centra za funkcijsko genomiko in bio-čipe, še posebej Martina, ki me je uvajala v delo s celičnimi kulturami.

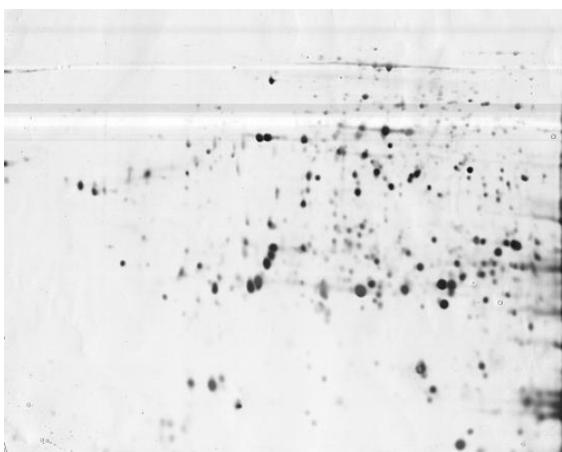
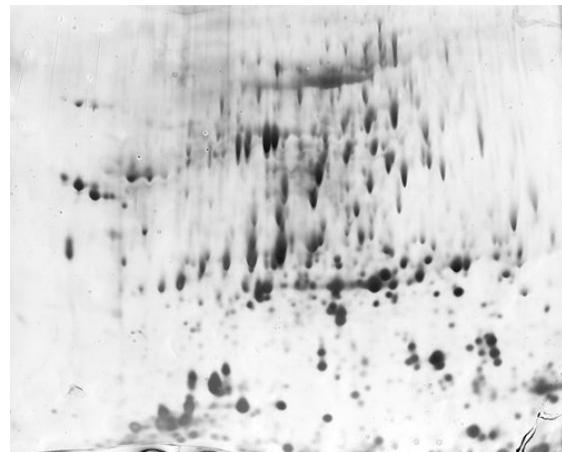
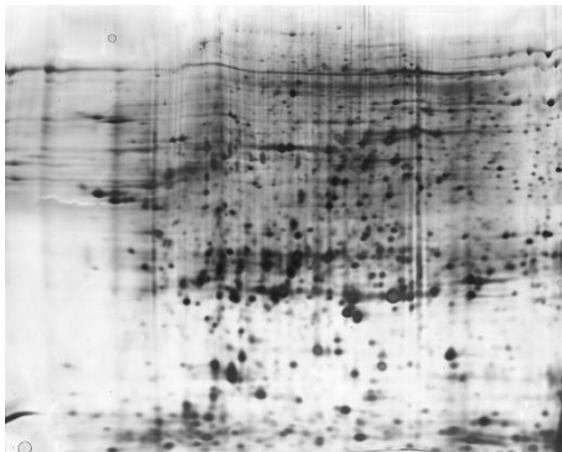
Hvala tudi Ani, Evi, Idi, Ireni, Karmen, Nejcu, Neji, Poloni, Špeli, Vidi in vsem ostalim za potrežljivo poslušanje mojih tožb ob slabih dnevih.

Največjo zahvalo pa dolgujem svoji družini, ker mi stoji ob strani in me spodbuja že celo življenje.

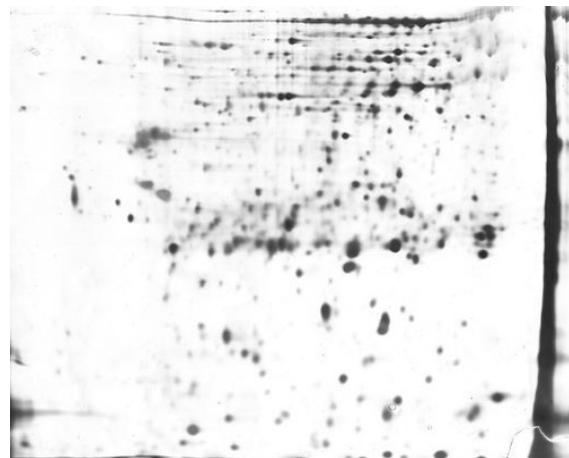
Vsem skupaj in vsakemu posebej še enkrat iskrena hvala!

PRILOGE

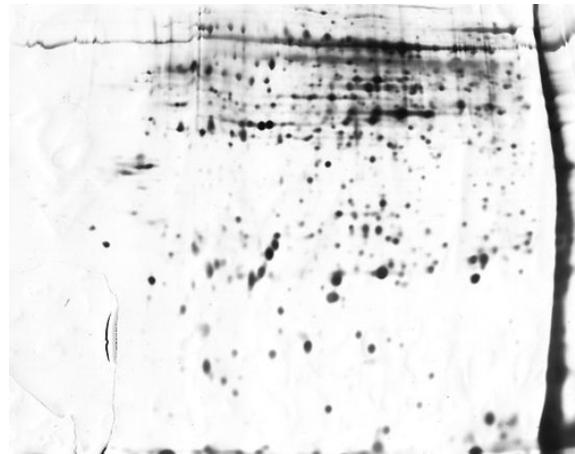
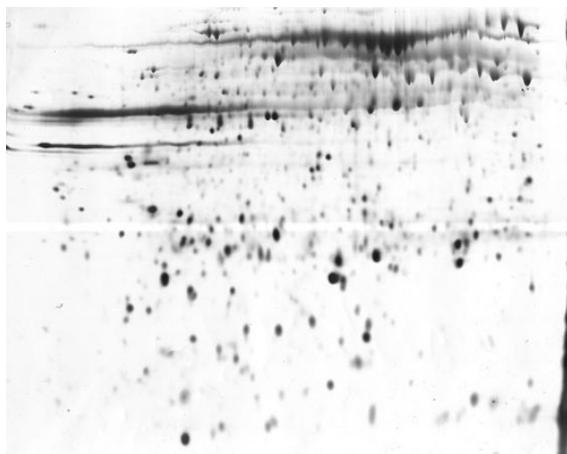
Priloga A: 2-DE geli vzorcev želodčnega tkiva para 2 v ponovitvah. Leva gela sta iz normalnega, desna pa iz tumorskega vzorca.



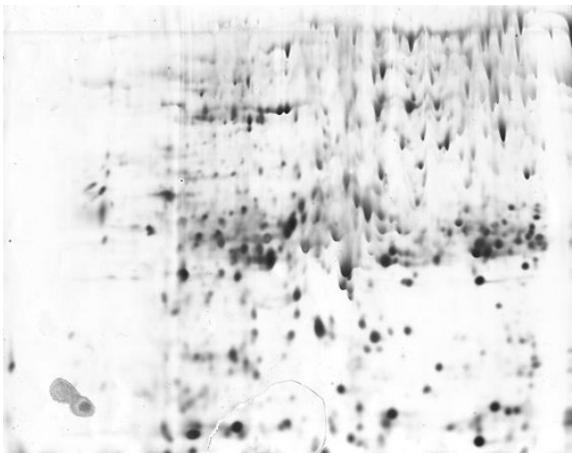
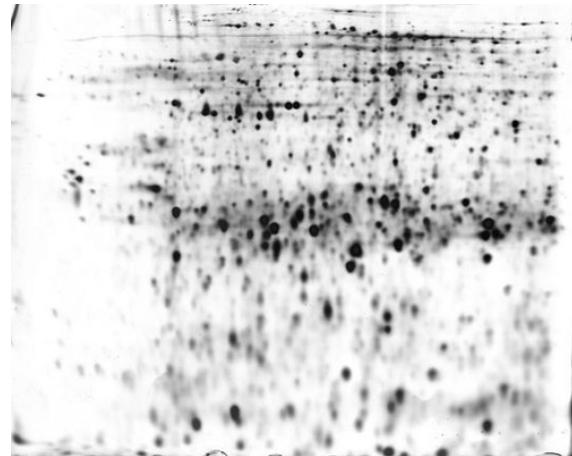
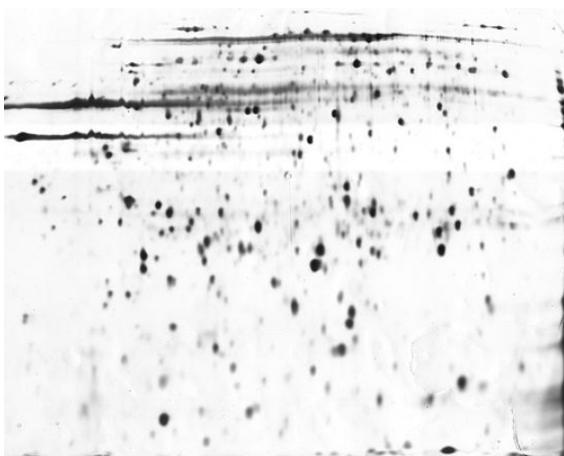
Priloga B: 2-DE geli vzorcev želodčnega tkiva para 3 v ponovitvah. Leva gela sta iz normalnega, desna pa iz tumorskega vzorca.



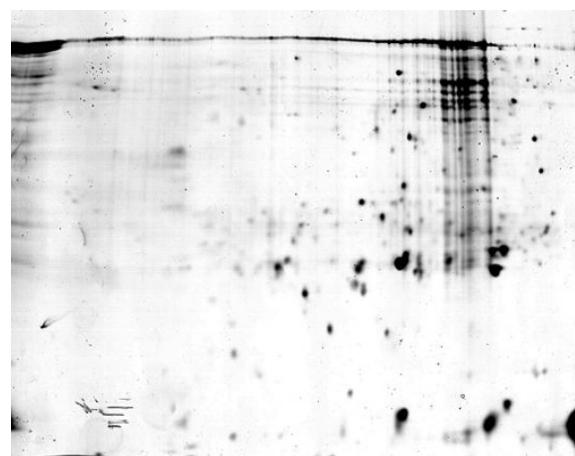
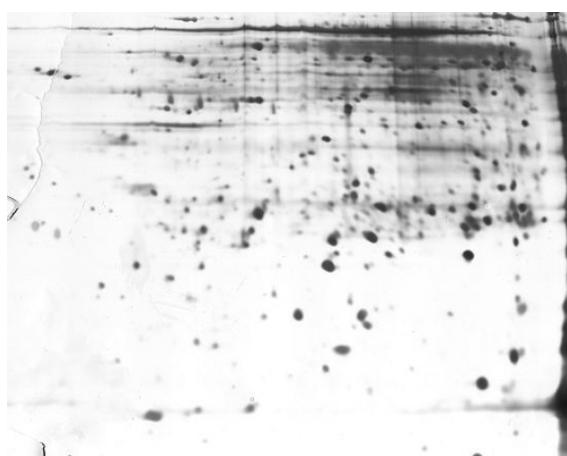
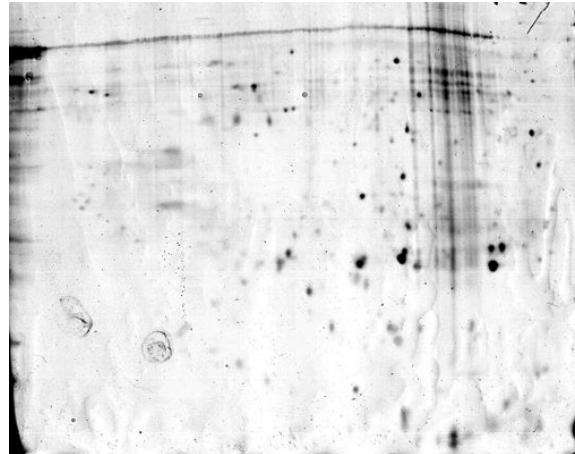
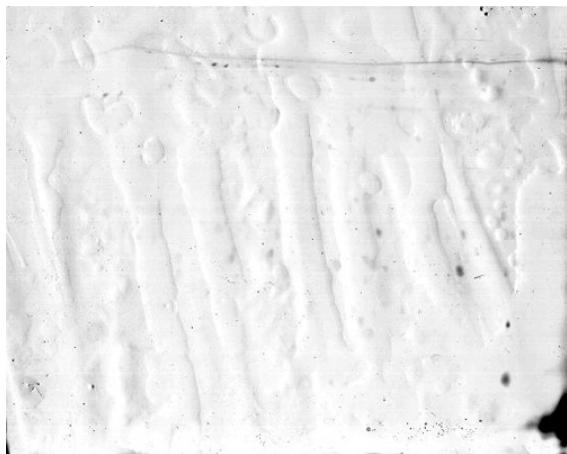
Priloga C: 2-DE geli vzorcev želodčnega tkiva para 4 v ponovitvah. Leva gela sta iz normalnega, desna pa iz tumorskega vzorca.



Priloga Č: 2-DE geli vzorcev želodčnega tkiva para 6 v ponovitvah. Leva gela sta iz normalnega, desna pa iz tumorskega vzorca.



Priloga D: 2-DE geli vzorcev želodčnega tkiva para 7 v ponovitvah. Leva gela sta iz normalnega, desna pa iz tumorskega vzorca.



Priloga E: Računalniško poravnani geli parov 2 (prva slika levo), 3 (druga slika desno), 4 (tretja slika levo), 6 (četrta slika desno) in 7 (petta slika levo).

