

STANOVENÍ AUTOPROTILÁTEK PROTI PROKATHEPSINU D V SÉRECH ONKOLOGICKÝCH PACIENTŮ

IVA MACHOVÁ^{a,b}, JARMILA ZÍDKOVÁ^b,
DRAHOMÍRA SPRINGER^c, VÁCLAV
VĚTVIČKA^d a MARTIN FUSEK^b

^a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6 – Dejvice, ^b Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice, ^c Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, U Nemocnice 2 128 08 Praha 2, ^d University of Louisville, Department of Pathology, 511 S. Floyd, Louisville, KY40292, USA
iva.machova@vscht.cz

Došlo 5.10.11, přijato 23.11.11.

Klíčová slova: rakovina, prokathepsin D, autoprotilátka proti prokathepsinu D, ELISA

Úvod

Prokathepsin D (pCD) je prekurzorem lysozomální endopeptidasy kathepsinu D (CD). Prokathepsin D je syntetizován v endoplazmatickém retikulu ve formě preprokathepsinu D. Odštěpením signální sekvence z preprokathepsinu D vzniká pCD, z kterého je následně pomocí proteolytických enzymů odštěpen aktivační peptid (AP) a vzniká tak aktivní CD (cit.^{1,2}). Za fyziologických podmínek se nalézá CD v lysozomech buněk, kde se účastní degradace intracelulárních proteinů, aktivace některých proteas, prekurzorů hormonů a dalších biologicky aktivních peptidů². Za patologických podmínek dochází ke zvýšené sekreci pCD ven z buněk. Zvýšené hladiny pCD/CD byly nalezeny u mnoha typů rakovinných nádorů. Nezávislými studiemi bylo potvrzeno, že hladina pCD/CD úzce souvisí s velikostí nádorů, prognózou i s mírou chemorezistence nádorových buněk proti chemoterapeutikům. Prokathepsin D je dále zvažován jako mitogenní faktor podporující progresi rakoviny, angiogenezi a tvorbu metastáz. Jedním z navržených mechanismů mitogenního působení pCD je autokrinní a parakrinní působení struktury AP (cit.³). Přítomnost pCD sekretovaného rakovinnými buňkami v krevním řečišti vyvolává specifickou imunitní odpověď, kdy část AP je rozpoznána imunitním systémem jako cizorodý antigen, což způsobí tvorbu specifických autoprotilátek proti pCD. V současnosti se hledá vhodná metoda pro stanovení hladiny CD/pCD nebo autoprotilátek, které by tak mohly být nezávislým diagnostickým markerem.

Experimentální část

Průkaz prokathepsinu D v lidském séru

Pro detekci pCD v lidském séru byla použita jedno-rozměrná polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti SDS následovaná imunoblotem (western blot). SDS-PAGE byla provedena při laboratorní teplotě v Mini Protein Cell Bio-Rad dle modifikace Harlow a Lane⁴. Rozdělení séra probíhalo v 12% polyakrylamidovém gelu (30% akrylamidový mix, 1,5M Tris-HCl pH 8,8, 10% SDS, 10% Na₂S₂O₈, N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin – Serva, Německo) a 5% akrylamidovém zaostřovacím gelu pH 6,8. Vzorky lidských sér byly ředěny 1:270 v PBS pH 7,4 a před nanesením do aparatury byl vzorek smíchán s tzv. redukcujícím vzorkovacím pufr (0,5M Tris-HCl pH 6,8; glycerol, 10% SDS; 0,1% bromfenolová modř, 5% β-merkapt ethanol) v poměru 1:1. Směs byla 3 min vařena a aplikována do jamek v gelu⁵. Jako proteinový standard molekulových hmotností byl použit širokospektrý molekulový marker (SDS-PAGE standard, broad range, Bio-Rad, USA).

Pro přenos proteinů western blotem byla použita aparatura Mini Trans-Blot Cell Bio-Rad (Mini Protean III system, Bio-Rad, USA). Přenos na nitroceluloseovou membránu 0,45 μm (NC, Serva, Německo) byl proveden pomocí stejnosměrného elektrického proudu (elektroblot) při 90 V, po dobu 70 min, při 4 °C v prostředí Towbinova pufru⁶ (Tris-glycinový pufr, 48 mM Tris, 39 mM glycine, 10% methanol, pH 9,2). Následné sycení membrány probíhalo 2 h při laboratorní teplotě v 5% roztoku odtučněného sušeného mléka (Laktino, Promil, ČR) v PBS (fosfátový pufr s NaCl: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,24 g KH₂PO₄, 2,9 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O, pH 7,4). Poté byla membrána inkubována s polyklonálními králičími protilátkami proti pCD ředěnými 1:100 v 1,5% roztoku odtučněného sušeného mléka po dobu 90 minut. Polyklonální králičí protilátka proti pCD byly připraveny imunizací laboratorního králíka roztokem syntetického multiantigenního peptidu (VIDIA, ČR), který má strukturu části AP o aminokyselinové sekvenci GPVSKYSQAVPAVTE. Následně byla membrána třikrát promyta 0,1% PBS-Tw (phosphate buffered saline tween, PBS, 0,1% Tween 20) a inkubována s konjugátem kochických protilátek značených křenovou peroxidasou specifických proti králičím IgG (Promega, USA) ředěnými 1:2500 v 1,5% roztoku odtučněného sušeného mléka v PBS-Tw 2 h při laboratorní teplotě. Nitroceluloseová membrána byla třikrát promyta PBS-Tw. Imunokomplex byl detegován pomocí barevného produktu vzniklého reakcí křenové peroxidasy s chromogenním substrátem AEC (3-amino-9-ethylkarbazol, Sigma USA).

Testovaná séra

Testovaná séra byla získána se souhlasem pacientů. Vzorky byly získány od pacientů se zhoubnými nádory prsu, tlustého střeva a konečníku a kontrolní skupinu tvořily séra zdravých dárců.

Průkaz autoprotilátek v lidském séru

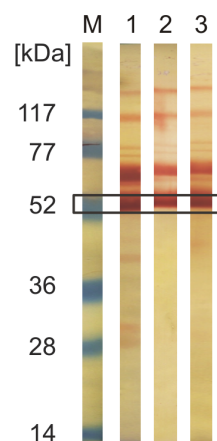
Pro stanovení autoprotilátek proti pCD přítomných v lidském séru byly použity stejné metody jako pro stanovení pCD v jiném uspořádání samotných experimentů, které jsou popsány dále. Pro stanovení autoprotilátek byl do jamek pro SDS – PAGE nanesen standard pCD. Po přenesení proteinů imunoblotem na membránu byla membrána rozřezána na proužky, které byly následně inkubovány za laboratorní teploty s lidskými séry ředěnými 1:100 v 1,5% odtučněném sušeném mléce po dobu 2 h. Proužky membrány byly třikrát promyty PBS-Tw a následně inkubovány s konjugátem kozích protilátek značených křenovou peroxidasou specifických proti králičím IgG (Sigma, USA) ředěným 1:5000 v 1,5% roztoku odtučněného sušeného mléka při laboratorní teplotě 2 hodiny. Nitroceluloso-ová membrána byla třikrát promyta PBS-Tw. Imunokomplex byl detegován na základě barevného produktu vzniklého reakcí křenové peroxidasy s chromogenním substrátem AEC – 3-amino-9-ethylkarbazol (Sigma, USA).

Stanovení hladiny autoprotilátek proti pCD metodou ELISA

Pro stanovení autoprotilátek byla použita nepřímá nekompetitivní metoda ELISA. Mikrotitrační destička (MaxiSorp™ Surface, Nunc, Dánsko) byla inkubována přes noc při 4 °C s roztokem multiantigenního peptidu (syntetický peptid se strukturou AP). Destička byla třikrát promyta 0,05% PBS-Tw a následně sycena 1 hodinu při 37 °C 1% BSA v PBS. Po saturaci byla destička třikrát promyta 0,05% PBS-Tw a inkubována 2 hodiny při 37 °C se vzorky ředěných lidských sér 1:50 (ředěno 0,5% BSA v PBS) obsahující autoprotilátky, které se specificky váží na multiantigenní peptid. Po promytí destičky (třikrát 0,05% PBS-Tw) následovala inkubace s konjugátem kozích protilátek značených křenovou peroxidasou specifických proti králičím IgG (Sigma, USA) 1 hodinu při 37 °C v ředění 1:20000 v 0,5% BSA v PBS. Nenavázaná sekundární protilátka byla odstraněna promytím destičky třikrát 0,05% PBS-Tw a inkubace s roztokem chromogenního substrátu *o*-fenyldiaminu (Sigma, USA) probíhala 10 min při 37 °C. Enzymová reakce byla zastavena 2M-H₂SO₄ a výsledný barevný produkt stanoven spektrofotometricky při 492 nm na přístroji PowerWave XS Microplate Spectrophotometer (BioTek, USA).

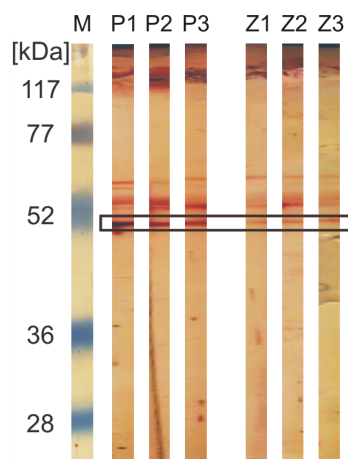
Výsledky a diskuse

V sérech pacientů s rakovinou byla prokázána přítomnost pCD (obr. 1). Séra onkologických pacientů a zdravých dárců byla dále vyšetřována na přítomnost autoprotilátek proti pCD. Metodou SDS – PAGE a western blot byla prokázána přítomnost autoprotilátek proti pCD jak u pacientů s rakovinou, tak u zdravých dárců s nižší odezvou (obr. 2). Některé studie uvádějí, že se podařilo podobnou metodikou stanovit pCD jen u pacientů, nikoliv

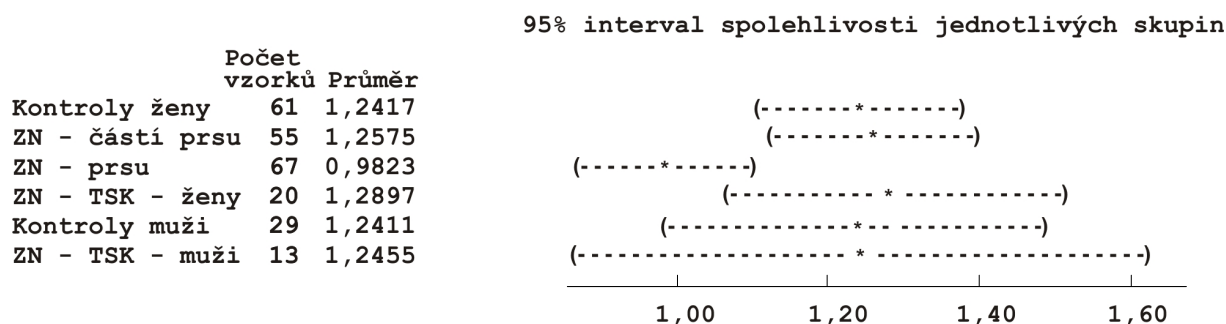


Obr. 1. Imunodetekce procathepsinu D sérech pacientů s onkologickým onemocněním; M: molekulový standard pro SDS – PAGE, 1–3: vzorky sér pacientů. Vyznačený rámeček označuje oblast 52 kDa odpovídající molekulové hmotnosti procathepsinu D

u zdravých dárců⁷. Rozdílné výsledky u zdravých kontrol mohou být dány různými pracovními postupy, především použitým vzorkem pCD rozděleného na SDS – PAGE, kdy byl v citované studii použit izolát pCD/CD ze sér pacientek. Na druhé straně byla nalezena spojitost pCD s procesem obnovy kůže⁸. Procathepsin D o velikosti 52 kDa byl izolován z lidské kůže a předpokládá se, že se nachází především ve vrstvě tzv. ostnitých buněk a po aktivaci v granulární vrstvě kůže se jako aktivní CD podílí na rohovatění kožních buněk⁸. Na základě této fyziologické vlastnosti by se dala vysvětlit přítomnost pCD i protilátek proti pCD nalezená u zdravých jedinců. Zvýšené hladiny



Obr. 2. Imunodetekce standartu procathepsinu D autoprotilátkami proti procathepsinu D přítomnými v lidském séru; M: molekulový standart pro SDS – PAGE, P1–3: séra pacientů s onkologickým onemocněním, Z1–3: séra zdravých dárců



Obr. 3. Statistické vyhodnocení naměřených dat jednofaktorovou analýzou rozptylu

ny zralého CD byly nalezeny při lupénce a nemocích souvisejících se záněty kůže, epidermální hyperproliferací a změněnou diferenciací⁹.

Po kvalitativním průkazu pCD a jeho autoprotilátek v lidském séru byla použita nekompetitivní ELISA pro stanovení autoprotilátek u 155 sér pacientů se zhoubným nádorem a 90 sér zdravých dárců pro možnost porovnání výsledků. Skupina onkologických pacientů byla rozdělena do tří statistických skupin dle diagnózy a pohlaví (tab. I). Pro porovnání vlivu věku na hladinu autoprotilátek byla séra dále rozdělena do skupin dle věku. Následná statistická analýza zahrnující statistické testování pomocí jednofaktorové analýzy ANOVA a *t*-testu. Pomocí těchto analýz byla vždy porovnávána skupina zdravých dárců s odpovídající skupinou (věk, pohlaví) onkologických pacientů. Na základě statistických analýz lze konstatovat, že nebyla nalezena korelace mezi hladinou autoprotilátek a věkem či pohlavím pacienta. K podobným závěrům dospěla i skupina M. Shaheena¹⁰, která se zabývala vlivem věku na hladiny pCD a CD u rakoviny prsu.

Porovnání jednotlivých skupin diagnóz se skupinou zdravých dárců prokázalo statistickou odlišnost skupiny zhoubného nádoru prsu. Ostatní skupiny se významně nelišily od skupiny zdravých dárců. Na základě statistické analýzy by se tedy dalo předpokládat, že skupina zhoubného nádoru prsu by mohla být vhodná pro stanovení autoprotilátek jako rakovinného markeru. Tuto hypotézu podporují výsledky řady výzkumných prací. U rakoviny prsu dochází ke zvýšené expresi pCD/CD oproti normální tkáni dva až padesátkrát¹¹. Proto byl také CD v několika klinických studiích navržen jako nezávislý prognostický parametr korelující s výskytem metastáz u rakoviny prsu^{12,13}. Výsledky našich experimentů ukazují na rozdíl hladin autoprotilátek mezi zdravou populací a pacienty s rakovinou prsu, avšak naměřené hladiny u pacientů byly překvapivě nižší než u zdravé populace. Proto zatím nejsme schopni uvedenou hypotézu potvrdit.

Závěr

V současné době se stále hledají nové rakovinné markery pro včasnější záchyt rakovinného onemocnění u lidí. Jako potenciální prognostický marker byl v několika stu-

Tabulka I

Rozdělení vzorků do skupin dle diagnózy a pohlaví

Zhoubný nádor	Pohlaví	Počet vzorků
Tlustého střeva a konečníku	muži	13
	ženy	20
Prsu	ženy	68
Částí prsu	ženy	55
Zdraví dárce	muži	29
	ženy	61

diích navržen i pCD. Pomocí elektromigračních metod jsme prokázali přítomnost jak pCD, tak autoprotilátek proti pCD v lidském séru. Semi-kvantitativní stanovení protilátek proti pCD jsme provedli pomocí nepřímé nekompetitivní metody ELISA. Ze statistických analýz by se zdála skupina zhoubného nádoru prsu jako vhodná pro použití autoprotilátek jako rakovinného markeru, ale námi naměřené hodnoty byly ve výsledku nižší než hodnoty naměřené pro zdravé dárce (obr. 3). Na základě tohoto zjištění nelze tedy považovat námi zvolenou metodu ELISA za vhodnou pro stanovení autoprotilátek proti pCD.

Autoři tímto děkují RNDr. Michaeli Marešovi, CSc. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. za poskytnutí standardu lidského pCD. Tato práce byla financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT (Rozhodnutí č. 21/2011) a IAA 600110902.

Seznam zkratk

ANOVA	analysis of variance – analýza rozptylu
AP	aktivační peptid
BSA	bovine serum albumin – kravský sérový albumin
CD	kathepsin D
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay, enzymová imunoanalýza
PBS	phosphate buffered saline – fosfátový pufr

PBS-Tw phosphate buffered saline tween – fosfátový pufr obsahující 0,1% tween 20
 pCD procathepsin D
 SDS dodecylsírán sodný
 SDS-PAGE polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíránu sodného

10. Shaheen R. M., Miseljic S., Wiehle D. R., Wittliff J. L.: *Clin. Chem.* 41, 1585 (1995).
11. Rochefort H.: *Acta Oncol.* 31, 125 (1992).
12. Rochefort H.: *Eur. J. Cancer* 28A, 1780 (1992).
13. Westley B. R., May F. E.: *Br. J. Cancer* 79, 189 (1999).

LITERATURA

1. Beneš P., Větvička V., Fusek M.: *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 68, 12 (2008).
2. Tang J., Wong R. N. S.: *J. Cell. Biochem.* 33, 53 (1987).
3. Fusek M., Větvička V.: *Biochem. J.* 303, 775 (1994).
4. Harlow E., Lane D.: *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1988.
5. Brázdová A., Zídková J., Cibulka J., Vališová M., Škop V., Ulčová–Gallová Z.: *Chem. Listy* 105, 885 (2011).
6. Towbin H., Staehelin T., Gordon J.: *PNAS USA* 76, 4350 (1979).
7. Bosscher J. R., Gercel – Taylor C., Watkins C. S., Taylor D. D.: *Gynecol. Oncol.* 81, 138 (2001).
8. Kanisek J.: *J. Invest. Dermatol.* 91, 243 (1988).
9. Kawada A., Hara K., Kominami E., Hiruma M., Akiyama M., Ishibashi A., Abe H., Ichikawa E., Nakamura Y., Watanabe S., Yamamoto T., Umeda T., Nishio-ka K.: *Br. J. Dermatol.* 137, 361 (1997).

I. Machová^{a,b}, J. Zídková^b, D. Springer^c, V. Větvička^d, and M. Fusek^b (^a*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i, Prague,* ^b*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^c*Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague,* ^d*Department of Pathology, University of Louisville, Louisville, USA*): **Determination of Anti-Cathepsin-D Antibodies in Human Blood Sera of Oncological Patients**

In this study the levels of auto-antibodies formed against the activation peptide of procathepsin D were determined by the ELISA method using a synthetic multi-antigen peptide containing the N-terminal amino acid sequence of the activation peptide of procathepsin D as a coating antigen. Based on the results auto-antibodies cannot be considered suitable cancer markers.