

# Uloga proteomike u razvoju lijekova – optimizacija uzorka za dvodimenzionalnu gel-elektroforezu

## Proteomics in drug development – optimization of sample preparation for the two-dimensional gel-electrophoresis

Mirela Sedić<sup>1</sup>, Sandra Kraljević Pavelić<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institut "Ruđer Bošković",  
Zavod za molekularnu medicinu,  
Laboratorij za sistemsku biomedicinu,  
Zagreb

<sup>2</sup>Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju

Primljeno: 15. 11. 2008.

Prihvaćeno: 29. 1. 2009.

Adresa za dopisivanje:

**Doc. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić**,  
Institut "Ruđer Bošković",  
Zavod za molekularnu medicinu,  
Laboratorij za sistemsku biomedicinu,  
Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb  
e-mail: skraljevic@irb.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

**SAŽETAK. Uvod:** Dvodimenzionalna gel-elektroforeza (2-DE) metoda je analize kompleksnih proteinskih smjesa izdvojenih iz stanica, tkiva, tjelesnih tekućina ili drugih bioloških uzoraka, koja objedinjuje dva različita elektroforetska postupka: izoelektrično fokusiranje i SDS-poliakrilamidnu gel-elektroforezu. **Metode:** U ovom radu ispitan je utjecaj četiriju različitih pufera na proteomske profile dviju staničnih linija karcinoma kolona, SW 620 i HCT 116 uzgojenih klasičnim metodama uzgoja stanica *in vitro* uz pomoć metode 2-DE, u pH rasponu 3 – 10 NL, te rasponu molekularskih težina od 14 do 100 kDa. **Rezultati:** Dobiveni rezultati pokazuju kako se pojedini puferi međusobno razlikuju po prirodni proteina koji su specifično otopljeni, što je djelomično ovisilo i o staničnoj liniji. **Diskusija:** Topljivost proteina jedan je od najvećih problema pri korištenju 2-DE, što naročito dolazi do izražaja kod hidrofobnih membranskih proteina, proteina jezgre i proteina izrazito sklonih agregaciji. Jedan od načina poboljšanja topljivosti proteina je i optimizacija pufera za izdvajanje proteina, pri čemu se u pufer dodaju zwitter-ionski amfifilni surfaktanti poput CHAPS, SB 3-10 (kaprilil sulfobetain) i ASB-14, te uporabom tiouree u kombinaciji s ureom. Gelo- vi dobiveni uz pomoć pufera koji sadrži CHAPS imali su najbolju rezoluciju i na njima je bilo moguće detektirati najveći broj jedinstvenih proteinskih vrsta obiju ispitanih staničnih linija. **Zaključak:** Postupkom optimizacije pripreme uzorka za analizu mehanizama učinka novosintetiziranog protutumorskog spoja na razini proteoma uz pomoć 2-DE pokazano je kako je pufer sastava 7M urea + 2M tiourea + 4% (w/v) CHAPS optimalan pufer za izolaciju i razdvajanje smjese proteina dobivene iz tumorskih staničnih linija kolona HCT-116 i SW 620.

**Ključne riječi:** dvodimenzionalna gel-elektroforeza, optimizacija pripreme uzorka, proteomika

**ABSTRACT. Introduction:** The two-dimensional gel-electrophoresis (2-DE) is a method of choice for complex protein mixture separation from cells, tissue, body fluids or other biological samples which comprises two diverse electrophoretic principles: the isoelectric focusing and the SDS-polyacrilamide gel electrophoresis. **Methods:** In this paper we tested the effects of four different 2-DE buffers on the protein profiles obtained by 2-DE in the pH range 3-10 NL, and the molecular weight range 14-100 kDa. The proteins were isolated from two colon cancer cell lines SW 620 i HCT 116 grown *in vitro* by using standard cell propagation procedures. **Results:** The obtained results revealed different 2-DE buffer properties for each buffer tested as the protein profiles showed a different pattern both as the consequence of the buffer type and the type of cell line. **Discussion:** One of the major problems in 2-DE is protein solubility which is particularly emphasized when dealing with hydrophobic membrane proteins, the nuclear proteins as well as with proteins prone to form aggregates. One of the possible solutions to this problem is the optimization of the 2-DE buffer by addition of zwitter-ionic amphiphilic surfactants like CHAPS, SB 3-10 (sulphobetain) and ASB-14, as well as by addition of thiourea and urea. The gels obtained with the buffer containing CHAPS showed the best resolution properties and had the best unique protein species score for both tested cell lines in comparison to all other gels. **Conclusion:** Through the 2-DE buffer optimization in the sample preparation step for proteomic analysis of newly synthesized antitumor drug mechanisms of action, it has been shown that the buffer containing 7M urea + 2M thiourea + 4% (w/v) CHAPS was the most effective for isolation and separation of proteins from HCT-116 and SW 620 tumour cell lines.

**Key words:** two-dimensional gel-electrophoresis, optimization of sample preparation, proteomics

## UVOD I CILJ ISTRAŽIVANJA

Posljednjih se godina puno pažnje posvećuje primjeni metoda proteomike u razjašnjavanju bioloških mehanizama razvoja bolesti, kao i u identifikaciji odgovarajućih proteinskih meta za terapijsku intervenciju. Otkrivanje novih proteinskih meta će, naime, uvelike olakšati ranu dijagnozu, poboljšati preciznost prognoze i liječenje oboljelih. Proteomika ima velik potencijal u procesu otkrivanja i dizajniranja novih lijekova i/ili mehanizama učinka lijeka na razini proteoma s obzirom na to da može identificirati regulatorne proteine ili potencijalne mete za djelovanje nekog lijeka, stoga je nedavno u našem laboratoriju provedeno ispitivanje biološkog učinka potpuno novog, amidino-supstituiranog derivata benzimidazo [1,2-a] kinolina na tri tumorske stanične linije debelog crijeva čovjeka u uvjetima *in vitro*. Kemijska sinteza i mehanizam biološkog djelovanja ovog heterocikličkog spoja prethodno su opisani u literaturi<sup>1</sup>. Također je, u sklopu istog istraživanja, opisan i njegov mehanizam djelovanja na razini ekspresije proteina<sup>2</sup>. Proteomsko istraživanje mehanizama djelovanja spoja provedeno je uz pomoć metode dvodimenzionalne gel-elektroforeze (2-DE) u kombinaciji s masenom spektrometrijom. Metoda 2-DE vrlo je moćna i istovremeno složena metoda za razdvajanje proteina, kod koje se kritičnim korakom smatra upravo priprema uzorka za analizu, jer se tijekom analize proteinskih modifikacija mogu uočiti brojni artefakti, počevši od proteolitičke razgradnje uzrokovane aktivacijom proteaza nakon lize stanica, pa sve do pojava karbamilacije proteina amonijevim cijanatom, razgradnim produktom uree koja se koristi za denaturaciju proteina. Osim toga, jedan od čestih problema 2-DE je i rezolucija proteina na gelu, osobito onih proteina koji su prisutni u toliko niskim koncentracijama, što značajno otežava njihovu detekciju na gelu. U ovom istraživanju provedena je stoga optimizacija pripreme uzorka proteina iz dviju tumorskih staničnih linija kolona (HCT 116 i SW 620) kako bi se utvrdio optimalan sastav pufera za razdvajanje proteina iz proteinske smjese tumorskih staničnih linija kolona u uvjetima *in vitro*, unutar raspona pH od 3 do 10 i raspona veličine molekula proteina od 14 do

100 kDaltona (kDa). U ovom su radu opisani postupci kojima je provedena optimizacija pripreme uzorka za 2-DE.

## METODE

### UZGOJ KULTURA STANICA U UVJETIMA *IN VITRO*

U istraživanju su korištene sljedeće stanične linije čovjeka tvrtke ATCC (engl. *The American Type Culture Collection*, SAD): SW620 (adenokarcinom de-

S obzirom na to da može identificirati regulatorne proteine ili potencijalne mete za djelovanje lijeka, proteomika ima velik potencijal u procesu otkrivanja i dizajniranja novih lijekova i/ili mehanizama učinka lijeka na razini proteoma. No, «uskim grlom» proteomskog istraživanja smatra se priprema uzorka, primjerice optimizacija pripreme uzorka proteina za 2-DE jer upravo o tome koraku ovisi krajnji ishod same metode.

belog crijeva; metastaza u limfnom čvoru) i HCT 116 (karcinom debelog crijeva). Stanice su uzgajane u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO Invitrogen, SAD) uz dodatak 10%-tnog seruma telećeg fetusa (FCS, engl. *fetal calf serum*, GIBCO Invitrogen), 2 mM L-glutamina (Sigma, Njemačka), 100 jedinica/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina (GIBCO Invitrogen) u inkubatoru u vlažnoj atmosferi pri 5% CO<sub>2</sub> na 37 °C. Stanice su bile uzgajane do konfluentnosti u plastičnim bocama za stanične kulture (Falcon, SAD) te održavane u kulturi presađivanjem s 0,25%-tnom otopinom tripsina (GIBCO Invitrogen). Za određivanje broja stanica i utvrđivanje njihove vijabilnosti, 20 µl suspenzije stanica pomiješano je s 80 µl 10%-tne otopine tripsanskog modrila (Sigma) koji specifično boji mrtve stanice u plavo, te su stanice prebrojene pomoću Neubauer komorice (Blau Brand, Njemačka) na svjetlosnom mikroskopu (Olympus CKX 41, SAD).

### IZOLACIJA PROTEINA IZ STANICA

Kako bismo utvrdili optimalan sastav pufera kojim bi se postigla separacija što je moguće većeg broja proteina unutar određenog raspona pI/Mr vri-

jednosti, korištena su četiri različita 2-DE pufera sljedećeg sastava:

1. 7M urea (Sigma), 2M tiourea (Sigma), 4% (w/v) CHAPS (Sigma), 0,2% (w/v) smjesa amfolita pH 3 – 10 (BIO-RAD, SAD), 1% (w/v) ditiotritol (DTT) (Sigma) i 1x koktel inhibitora proteaza (Roche, Švicarska).
2. 5M urea, 2M tiourea, 2% (w/v) CHAPS, 2% (w/v) SB 3-10 (kaprilil sulfobetain) (Sigma), 0,2% (w/v) smjesa amfolita pH 3 – 10, 1% (w/v) ditiotritol (DTT) i 1x koktel inhibitora proteaza.
3. 7M urea, 2M tiourea, 2% (w/v) ASB-14 (aminosulfobetain-14) (Sigma), 0,2% (w/v) smjesa amfolita pH 3 – 10, 1% (w/v) ditiotritol (DTT) i 1x koktel inhibitora proteaza.
4. 9M urea, 4% (w/v) CHAPS, 0,5% (v/v) Triton X-100 (Sigma), 0,2% (w/v) smjesa amfolita pH 3 – 10, 1% (w/v) ditiotritol (DTT) i 1x koktel inhibitora proteaza.

Ukratko, stanice su bile nasade na Petrijeve pločice (Falcon) u koncentraciji od  $1 \times 10^6$  po pločici. Nakon određenog vremenskog perioda, uklonjen je medij, a stanice su isprane tri puta s po 10 mL Tris-sorbitola (10 mM Tris, 25 mM sorbitol, pH 7.0) prethodno ohlađenog na +4 °C. Potom je stanica dodano 500  $\mu$ L 2-DE pufera za lizu, lizat je prebačen u 1,5 mL kivetice (Eppendorf, Njemačka) i soničiran 4 x 10 sekundi na ledu s 0,5 mm sondom pri amplitudi 60% (Labsonic, B. Braun, Biotech International, Njemačka). Nakon toga u uzorak je dodano 10  $\mu$ L smjese nukleaza (Amersham Biosciences, SAD)/1 mL lizata, 1 sat na sobnoj temperaturi uz trešnju. Potom su lizati centrifugirani (30 min, 13 200 rpm, 20 °C) te su dobiveni supernatanti alikvotirani i pohranjeni na – 80 °C do analize.

#### ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA U LIZATU

Koncentracija proteina u lizatu određena je uz pomoć komercijalno dostupnog kompleta za kvantifikaciju proteina (DC Protein Assay Kit, BIO-RAD, SAD) baziranog na reakciji proteina s lužnatom otopinom bakrenog tartarata koji onda potom reducira Folinov reagens. Ukratko, pripremljen je standard – albumin goveđeg seruma (Sigma) u pet različitih koncentracija (0,2, 0,6, 0,8, 1,2 i 1,5 mg/mL), te nekoliko različitih razrjeđenja uzorka. Otpi-

petirano je po 5  $\mu$ L standarda i uzorka u triplikatu u jažice mikrotitarske pločice, te dodano 25  $\mu$ L reagensa A i 200  $\mu$ L reagensa B. Potom su pločice inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je očitana absorbancija na 750 nm. Na temelju očitanih vrijednosti absorbancija standarda konstruirana je baždarna krivulja ovisnosti absorbancije o koncentraciji iz koje se potom ekstrapolacijom na X-osi izračunala koncentracija proteina u uzorku.

#### IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE I EKVILIBRACIJA IPG-TRAKICA

Lizati za izoelektrično fokusiranje ukoncentrirani su 100%-tnim acetonom na –20 °C preko noći. Uzorci su centrifugirani (13.200 rpm, 10 minuta, 4 °C), a aceton uklonjen. Proteinski talog je potom otopljen zagrijavanjem na 30 °C u 300 – 330  $\mu$ L u puferu za rehidraciju koji je po svom sastavu identičan upotrijebljenom 2-DE puferu za lizu stanica, ali ne sadrži smjesu nukleaza niti inhibitore proteaza. Uzorak je potom nanesen uzduž kanalića kadice za fokusiranje, a na njega je položena IPG-trakica (17 cm, pH 3 – 10 NL, BIO-RAD, SAD). Trakice su prekrivene s po 2 mL mineralnog ulja (BIO-RAD) i ostavljene na programu za aktivnu rehidraciju (PROTEAN IEF cell, BIO-RAD) pri 50 V, 20 °C i 14 sati. Potom je provedeno izoelektrično fokusiranje pri uvjetima navedenim u tablici 1.

Nakon završetka fokusiranja, provedena je ekvibracija IPG-trakica u ekvibracijskom puferu (50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6M urea, 30% w/v glicerol, 2% w/v SDS, bromofenol modnilo) kojem je dodano 1% w/v ditiotritola (Sigma) 15 minuta, te potom u ekvibracijskom puferu s 2,5% jodoacetamida (Sigma) 15 minuta (tablica 1).

#### SDS-POLIAKRILAMIDNA GEL-ELEKTROFOREZA (SDS-PAGE)

Elektroforeza je vođena pri denaturirajućim uvjetima za što je korišten tzv. Laemmlijev Tris-glicin puferski sistem<sup>3</sup>. Za analizu su korišteni 12% poliakrilamidni gelovi debljine 1 mm i dimenzija 20x20 cm. Elektroforeza je vođena u jedinici za hlađenje sustava za vertikalnu elektroforezu (PROTEAN II XL cell, BIO-RAD) i prebačena u komoru s puferom za elektroforezu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS, pH 8.3) pri sljedećim

**Tablica 1.** Uvjeti izoelektričnog fokusiranja za analitičke 2-DE gelove (100 µg proteina). Fokusiranje je vođeno približno 80.000 volt-sati.

**Table 1.** The isoelectric conditions used for preparation of analytical 2-DE gels (100 µg of proteins). The focusing was run approximately 80 000 Vh.

Faza	Porast napona	Ostvareni napon/ V	Trajanje/ sati:minute
S01	Spori	200	0:30
S02	Brzi	200	0:30
S03	Spori	500	0:30
S04	Brzi	500	0:30
S05	Spori	1000	0:30
S06	Brzi	1000	0:30
S07	Spori	10000	4:00
S08	Brzi	10000	60000 volt-sati
S09	Brzi	500	24:00

uvjetima: 16 mA/gelu 30 minuta i potom 24 mA/ gelu. Nakon završene elektroforeze, gelovi su obojani srebrom.

#### BOJANJE SREBROM

Gelovi su bojani srebrom prema modificiranoj metodi Shevchenko i sur<sup>4</sup>. Ukratko, odmah po završetku elektroforeze, gelovi su fiksirani 30 min u otopini 50% metanola/10% octene kiseline, inkubirani 15 min ili preko noći u 5%-tnoj otopini metanola, te isprani tri puta po 5 minuta u redestiliranoj vodi. Nakon toga, gelovi su ostavljeni 2 minute u 0,02%-tnoj otopini Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·x5H<sub>2</sub>O, te su potom isprani tri puta po 30 sekundi u redestiliranoj vodi. Zatim je uslijedilo bojanje s 0,2%-tnom otopinom AgNO<sub>3</sub> prethodno ohlađenom na +4 °C u trajanju od 25 minuta, nakon čega su gelovi isprani tri puta po 1 minutu u redestiliranoj vodi. Nakon toga, gelovi su inkubirani u otopini 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,04% formalina (36%-tna vodena otopina formaldehida)/0,0004% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·x5H<sub>2</sub>O uz intenzivno potresanje do željenog intenziteta obojenja (najdulje 10 minuta). Reakcija se prekida dodatkom 1,4%-tne otopine Na<sub>2</sub>EDTA te su nakon 10 minuta inkubacije gelovi isprani u redestiliranoj vodi. Tako obojani gelovi su se čuvali na +4 °C u 1%-tnoj otopini octene kiseline. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·x5H<sub>2</sub>O kupljen je od tvrtke Aldrich, Njemačka, a sve ostale kemikalije od Kemike.

#### SLIKANJE I ANALIZA GELOVA

Obojani gelovi skenirani su pomoću uređaja za slikanje (VersaDoc Imaging System, model 4000, BIO-RAD) pri vremenu ekspozicije od 0,6 sekundi. Kvalitativna analiza gelova provedena je pomoću specijalnog računalnog programa za analizu 2-DE gelova (PDQuest SW, verzija 7.0, BIO-RAD). Gelovi su normalizirani prije analize tzv. metodom ukupne gustoće na slici gela, kod koje se zbrajaju vrijednosti optičkih gustoća svih točaka unutar slike, te potom usporedba tih zbrojenih vrijednosti služi kao osnova za normalizaciju.

#### REZULTATI OPTIMIZACIJE PRIPREME UZORKA ZA 2-DE

Optimizacija pripreme uzorka za analizu 2-DE provedena je testiranjem četiri pufera koja su se međusobno razlikovala po upotrijebljenom detergentu (surfaktantu) i kaotropu: pufer #1: 7M urea + 2M tiourea, 4% (w/v) CHAPS; pufer #2: 5M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) CHAPS + 2% (w/v) SB 3-10; pufer #3: 7M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) ASB-14 i pufer #4: 9M urea, 4% (w/v) CHAPS + 0,5% (v/v) TRITON X-100. Iz tablice 2 može se zaključiti kako se najviše ukupnih proteina uspješno izolirati iz stanica SW 620 uporabom pufera #2, dok se pufer #3 pokazao najuspješnijim kod izolacije ukupnih proteina iz stanica HCT 116.

**Tablica 2.** Usporedba koncentracija ukupnih proteina dobivenih iz stanica HCT 116 i SW 620 uz pomoć četiriju različitih pufera: #1 (7M urea + 2M tiourea, 4% (w/v) CHAPS); #2 (5M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) CHAPS + 2% (w/v) SB 3-10); #3 (7M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) ASB-14) i #4 (9M urea, 4% (w/v) CHAPS + 0.5% (v/v) TRITON X-100). Prikazane su srednje vrijednosti triju neovisnih pokusa s pripadajućim standardnim devijacijama.

**Table 2.** The comparison of protein concentrations obtained from HCT 116 and SW 620 cell lines by using four different buffers: #1 (7M urea + 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS); #2 (5M urea + 2M thiourea, 2% (w/v) CHAPS + 2% (w/v) SB 3-10); #3 (7M urea + 2M thiourea, 2% (w/v) ASB-14) and #4 (9M urea, 4% (w/v) CHAPS + 0.5% (v/v) TRITON X-100). The mean values of three independent experiments  $\pm$  standard deviations are presented in the table.

mg/mL ukupnih proteina				
	pufer #1	pufer #2	pufer #3	pufer #4
<b>SW 620</b>	1,76 $\pm$ 0,4	2,01 $\pm$ 0,9	1,94 $\pm$ 0,6	1,83 $\pm$ 0,6
<b>HCT 116</b>	2,10 $\pm$ 0,7	1,92 $\pm$ 0,6	2,24 $\pm$ 0,8	2,18 $\pm$ 0,7

**Tablica 3.** Rezultat analize gelova nakon dvodimenzionalne elektroforeze proteina iz stanica HCT 116 uz pomoć računalnog programa PDQuest. Prikazana je usporedba broja proteina (engl. *protein spots*) dobivenih uporabom četiriju različitih pufera: #1 (7M urea + 2M tiourea, 4% (w/v) CHAPS); #2 (5M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) CHAPS + 2% (w/v) SB 3-10); #3 (7M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) ASB-14 i #4 (9M urea, 4% (w/v) CHAPS + 0,5% (v/v) TRITON X-100).

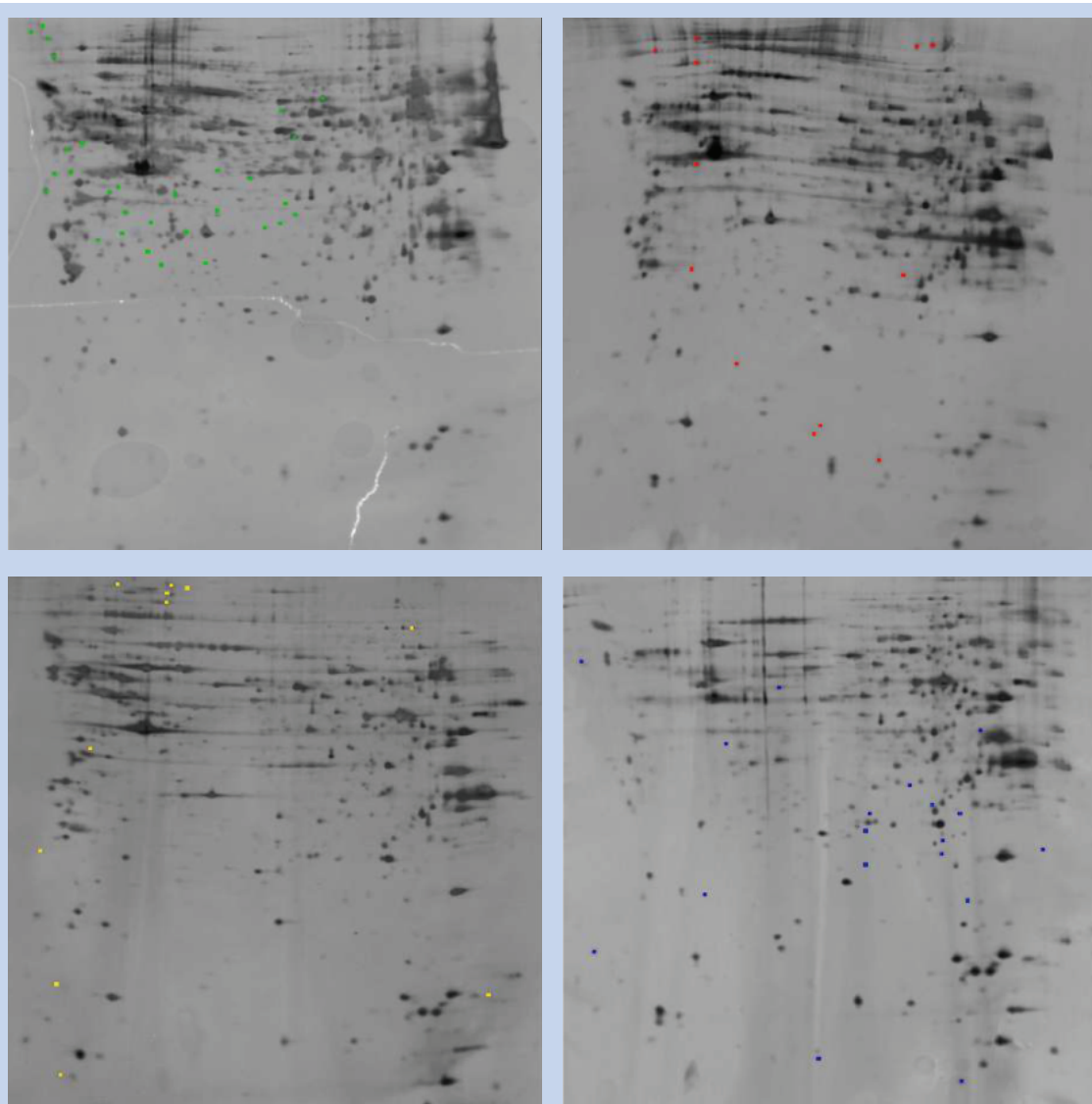
**Table 3.** The results of gel analyses upon 2-DE of proteins isolated from HCT-116 cells by using the PDQuest software. The number of proteins (*protein spots*) obtained by using four different buffers: #1 (7M urea + 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS); #2 (5M urea + 2M thiourea, 2% (w/v) CHAPS + 2% (w/v) SB 3-10); #3 (7M urea + 2M thiourea, 2% (w/v) ASB-14 i #4 (9M urea, 4% (w/v) CHAPS + 0,5% (v/v) TRITON X-100) are presented in the table.

HCT 116				
	pufer #1	pufer #2	pufer #3	pufer #4
<b>Ukupan broj točaka</b>	646	545	647	565
<b>Broj točaka jedinstvenih za pufer</b>	30	12	12	18
<b>Broj točaka zajednički za sve pufere</b>	197			

**Tablica 4.** Rezultat analize gelova nakon dvodimenzionalne elektroforeze proteina iz stanica SW 620 uz pomoć računalnog programa PDQuest. Prikazana je usporedba broja proteina (engl. *protein spots*) dobivenih uporabom četiriju različitih pufera: #1 (7M urea + 2M tiourea, 4% (w/v) CHAPS); #2 (5M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) CHAPS + 2% (w/v) SB 3-10); #3 (7M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) ASB-14 i #4 (9M urea, 4% (w/v) CHAPS + 0,5% (v/v) TRITON X-100).

**Table 4.** The results of gel analyses upon 2-DE of proteins isolated from SW 620 cells by using the PDQuest software. The number of proteins (*protein spots*) obtained by using four different buffers: #1 (7M urea + 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS); #2 (5M urea + 2M thiourea, 2% (w/v) CHAPS + 2% (w/v) SB 3-10); #3 (7M urea + 2M thiourea, 2% (w/v) ASB-14 i #4 (9M urea, 4% (w/v) CHAPS + 0,5% (v/v) TRITON X-100) are presented in the table.

SW 620				
	pufer #1	pufer #2	pufer #3	pufer #4
<b>Ukupan broj točaka</b>	513	510	508	780
<b>Broj točaka jedinstvenih za pufer</b>	20	13	19	18
<b>Broj točaka zajedničkih za sve pufere</b>	155			

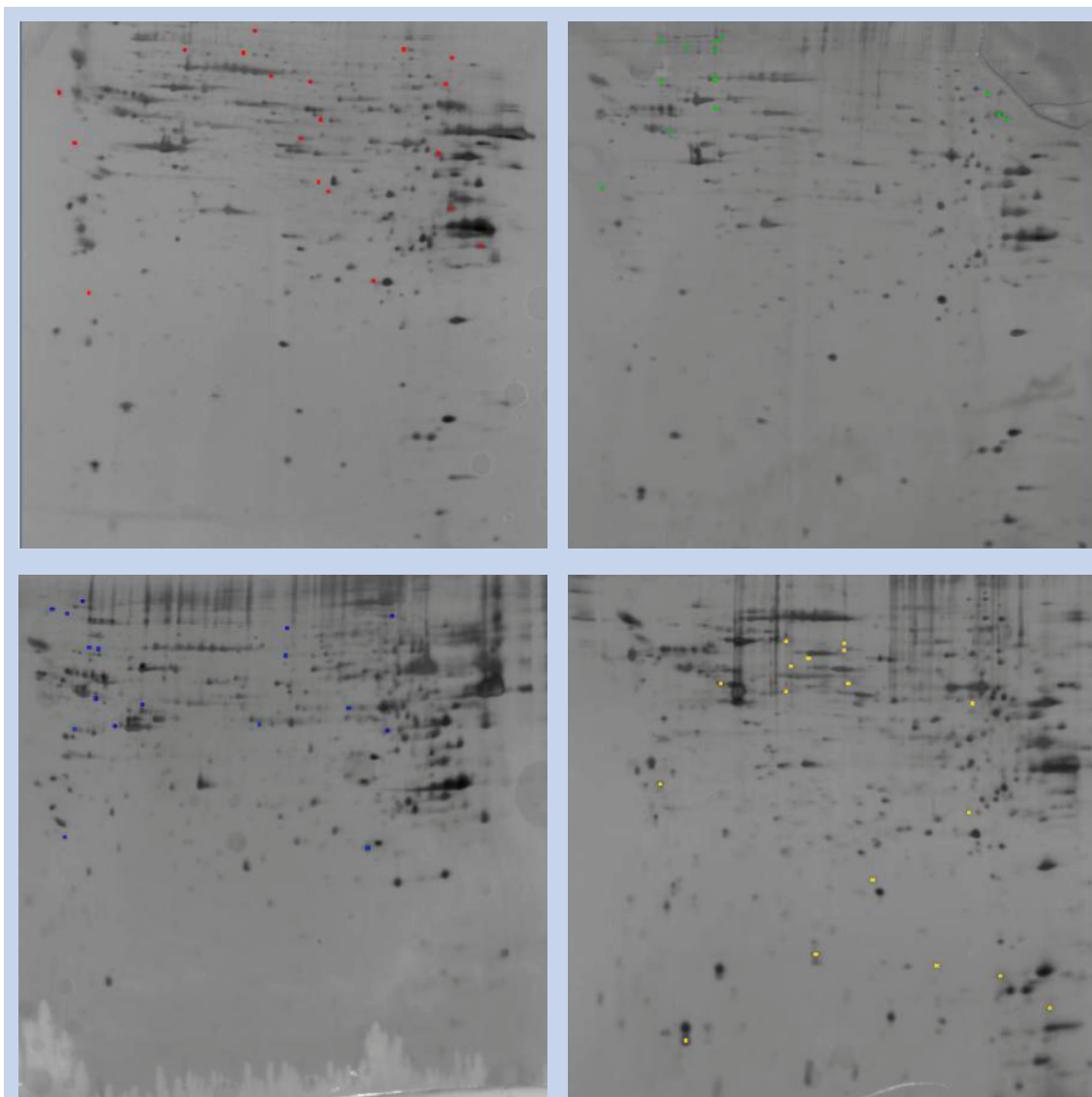


**Slika 1.** Usporedba gelova dobivenih dvodimenzionalnom elektroforezom proteina izoliranih iz stanica HCT 116 uz pomoć četiriju pufera različitih sastava: A) 7M urea + 2M tiourea, 4% (w/v) CHAPS; B) 5M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) CHAPS + 2% (w/v) SB 3-10; C) 7M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) ASB-14; D) 9M urea, 4% (w/v) CHAPS + 0,5% (v/v) TRITON X-100. Izoelektrično fokusiranje provedeno je sa 100 µg proteina na IPG trakicama pH 3 – 10 NL, a vertikalna poliakrilamidna elektroforeza na 12% gelu dimenzija 20x20 cm. Dobiveni gelovi su bojeni srebrom. Obojeni kvadratići predstavljaju proteine jedinstvene za svaki pojedini gel.

**Picture 1.** Comparison of 2-DE gels obtained with proteins isolated from HCT 116 cells by using four different buffers: A) 7M urea + 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS; B) 5M urea + 2M thiourea, 2% (w/v) CHAPS + 2% (w/v) SB 3-10; C) 7M urea + 2M thiourea, 2% (w/v) ASB-14; D) 9M urea, 4% (w/v) CHAPS + 0,5% (v/v) TRITON X-100. Isoelectric focusing has been performed with 100 µg of proteins on IPG strips pH 3-10 NL, and the vertical polyacrilamide electrophoresis has been carried out on a 12% gel of dimensions 20x20 cm. The visualization of proteins has been performed by silver staining. The coloured squares represent proteins that are unique for each gel.

Analiza dobivenih gelova pomoću računalnog programa PDQuest pokazala je kako se najveći broj detektiranih proteina iz stanica HCT 116 dobio na gelu kada se solubilizacija proteina i izoelektrično fokusiranje provelo s puferom #3 (tablica 3). Nadalje, iz iste je tablice vidljivo kako je

najveći broj jedinstvenih proteinskih vrsta karakterističnih za određenu vrstu pufera dobiven uz pomoć pufera #1. Usporedba kvalitete gelova dobivenih s ova dva pufera jasno, međutim, pokazuje kako pufer koji je sadržavao ASB-14 detergent (pufer 3) uzrokuje veće "horizontalne crte" (engl.



**Slika 2.** Usporedba gelova dobivenih dvodimenzionalnom elektroforezom proteina izoliranih iz stanica SW 620 uz pomoć četiriju pufera različitih sastava: A) 7M urea + 2M tiourea, 4% (w/v) CHAPS; B) 5M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) CHAPS + 2% (w/v) SB 3-10; C) 7M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) ASB-14; D) 9M urea, 4% (w/v) CHAPS + 0,5% (v/v) TRITON X-100. Izoelektrično fokusiranje provedeno je sa 100 µg proteina na IPG trakicama pH 3 – 10 NL, a vertikalna poliakrilamidna elektroforeza na 12% gelu dimenzija 20 x 20 cm. Dobiveni gelovi su bojani srebrom. Obojeni kvadratići predstavljaju proteinske jedinstvene za svaki pojedini gel.

**Picture 2.** Comparison of 2-DE gels obtained with proteins isolated from SW 620 cells by using four different buffers: A) 7M urea + 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS; B) 5M urea + 2M thiourea, 2% (w/v) CHAPS + 2% (w/v) SB 3-10; C) 7M urea + 2M thiourea, 2% (w/v) ASB-14; D) 9M urea, 4% (w/v) CHAPS + 0,5% (v/v) TRITON X-100. Isoelectric focusing has been performed with 100 µg of proteins on IPG strips pH 3-10 NL, and the vertical polyacrilamide electrophoresis has been carried out on a 12% gel of dimensions 20x20 cm. The visualization of proteins has been performed by silver staining. The coloured squares represent proteins that are unique for each gel.

streaking) na gelu od pufera s deterгентom CHAPS (pufer 1), te kako se s potonjim puferom dobio gel bolje rezolucije (slika 1).

Iz tablice 4 vidljivo je kako se najveći broj detektiranih proteina iz stanica SW 620 dobio na gelu kada su stanice lizirane i lizati fokusirani s puferom #4. Najveći broj jedinstvenih proteina karak-

terističnih za određenu vrstu pufera dobiven je uporabom pufera #1. Usporedbom kvalitete gelova (slika 2) dobivenih s ova dva različita pufera može se zaključiti kako se s puferom koji je sadržavao tiourea u kombinaciji s ureom dobio gel bolje rezolucije i veće kvalitete, što se može pripisati povećanoj solubilizaciji proteina zbog prisut-

nosti tiouree koja je poznata po tome što poboljšava solubilizaciju velikih membranskih proteina. Nadalje, dobiveni rezultati pokazuju kako se pojedini puferi međusobno razlikuju po vrsti i prirodi proteina koje specifično solubiliziraju, što je vidljivo iz označenih proteinskih točaka karakterističnih za svaki pufer zasebno (slike 1 i 2). Također, djelovanje pufera bilo je različito za pojedinu staničnu liniju. Tako je iz slika gelova stanica SW 620 vidljivo kako se lizom stanica u puferu koji je sadržavao ureu/tioureu/CHAPS izdvajaju specifični srednje veliki i veliki proteini iznad 30 kDa u cijelom rasponu pH koje nalazimo samo na gelovima dobivenim s ovim puferom (slika 2a). Puferima koji su sadržavali detergente SB 3-10 i ASB-14 bilo je moguće detektirati jedinstvene, velike kisele proteine iznad 50 kDa u rasponu pH od 4 do 5,5 (slike 2b i 2c). Konačno, liza stanica SW 620 s puferom koji je sadržavao najveću koncentraciju uree te CHAPS u kombinaciji s detergentom Triton X-100 rezultirala je detekcijom malih, kiselih i neutralnih proteina ispod 19 kDa i u pH rasponu od 5 do 8 specifičnih za taj pufer (slika 2d).

Na gelu s proteinima iz stanica HCT 116 liziranih uz pomoć pufera koji je sadržavao ureu/tioureu u kombinaciji s CHAPS izdvojili su se karakteristični, srednje veliki proteini (preko 30 kDa) u kiseloj i neutralnoj pH regiji gela (slika 1a). Pufer koji je sadržavao SB 3-10 producirao je specifične kisele i bazične proteine iznad 30 kDa (slika 1b). Zanimljivo je uočiti kako je pufer s detergentom ASB-14 specifično solubilizirao kisele proteine (pH 4 – 5) u cijelom rasponu molekularnih masa (slika 1c). Naposljetku, pufer s najvećom koncentracijom uree i kombinacijom CHAPS i Triton X-100 rezultirao je detekcijom karakterističnih, srednje velikih i malih proteina ispod 30 kDa u neutralnoj i bazičnoj regiji gela (pH 6.5 – 9) (slika 1d).

#### RASPRAVA

Otkriće i razvoj lijekova dugotrajan je i zahtjevan proces pri čemu se procjenjuje kako je za razvoj lijeka, počevši od identifikacije mete do lansiranja lijeka na tržište, potrebno deset do dvanaest godina<sup>5,6</sup>. Globalne metode analize, poput metoda proteomike, mogu značajno pridonijeti skraćivanju ovog procesa<sup>5</sup>. Primjerice, analiza ekspresije proteina tumorskih stanica nakon tretiranja

stanica s antitumorskim agensom može pomoći pri rasvjetljavanju molekularnih mehanizama djelovanja lijeka na tumorske stanice i njegovu toksičnost<sup>7</sup>. Osim toga, proteomskim analizama moguće je identificirati specifične mete za djelovanje antitumorskog lijeka i stanične modulatore njegovog biološkog učinka, čime se otkrivaju metabolički putevi uključeni u odgovor stanice na tretman. Također, ovim je pristupom moguće identificirati i proteine koji su povezani s neželjenim nuspojavama, što može dati važne smjernice

Topljivost proteina jedan je od najvećih problema pri korištenju 2-DE, što naročito dolazi do izražaja kod hidrofobnih membranskih proteina, proteina jezgre i proteina izrazito sklonih agregaciji. Jedan od načina poboljšanja topljivosti proteina je optimizacija pufera za izdvajanje proteina, pri čemu se u pufer dodaju zwitterionski amfifilni surfaktanti poput CHAPS, SB 3-10 i ASB-14, te uporaba tiouree u kombinaciji s ureom.

u procesu optimizacije antitumorskog lijeka. Upravo je takav globalni proteomski pristup bio primijenjen u institutu NCI (engl. *National Cancer Institute*, SAD) gdje se istražio utjecaj preko 60.000 kemijskih spojeva na proliferaciju 60 različitih humanih staničnih linija raka koje potječu iz različitih organa<sup>8</sup>. Znanstvenici s navedenog instituta objedinili su rezultate proteomskih analiza ekspresije proteina svih 60 staničnih linija dobivenih uz pomoć metode 2-DE u jedinstvenu bazu podataka kako bi korelirali specifične obrasce učinka testiranih spojeva na rast stanica s njihovim proteinskim profilima<sup>9</sup>.

Dvodimenzionalna gel-elektroforeza (2-DE) moćna je metoda za analizu kompleksnih proteinskih smjesa ekstrahiranih iz stanica, tkiva, tjelesnih tekućina ili drugih bioloških uzoraka, koja objedinjuje dvije različite elektroforetske metode: izoelektrično fokusiranje i SDS-poliakrilamidnu gel-elektroforezu<sup>10</sup>. Topljivost proteina jedan je od najvećih problema analize 2-DE, što naročito dolazi do izražaja kod hidrofobnih membranskih proteina (npr. receptor vezan na G-protein), proteina jezgre i proteina izrazito sklonih agregaciji (tubulin i keratini), stoga je cilj pripreme uzorka za 2-DE potpuna solubilizacija, disagregacija, de-



naturacija i redukcija proteina u uzorku, a uključuje nekoliko koraka: razbijanje stanica standardnim kemijskim ili mehaničkim metodama, inaktivaciju ili uklanjanje nečistoća koje interferiraju sa separacijom proteina (soli, nukleinske kiseline, proteolitički enzimi, polisaharidi, lipidi itd.), te solubilizaciju proteina u puferu koji sadrži neutralne kaotrope, neionske i/ili zwitter-ionske detergente, reducense, tzv. provodljive amfolite i inhibitore proteaza<sup>11-13</sup>. No, "uskim grlom" proteomskog istraživanja smatra se priprema uzorka, jer upravo o tom koraku ovisi krajnji ishod same metode, stoga nije nevažno koji će pufer za izolaciju proteina, s obzirom na sastav i udio surfaktanta, reducensa i kaotropa, biti upotrijebljen. U literaturi je relativno malo objavljenih radova koji bi dali komparativni prikaz broja i vrsta proteina dobivenih uporabom različitih pufera za dvodimenzionalnu gel-elektroforezu na modelu humanih tumorskih stanica. Jedan od načina poboljšanja topljivosti proteina je i optimizacija pufera za solubilizaciju proteina, što se može postići dodatkom zwitter-ionskih amfilinih surfaktanata poput CHAPS, SB 3-10 (kaprilil sulfobetaina), ASB-14 (aminosulfobetaina-14) ili C8Ø (4-oktilbenzol amidosulfobetaina)<sup>14</sup>, te uporabom tiouree u kombinaciji s ureom<sup>15</sup>.

Iz navedenih razloga u ovom je radu u svrhu optimizacije pripreme uzorka za 2-DE bio ispitan utjecaj četiriju različitih pufera na proteomske profile dviju staničnih linija karcinoma kolona, SW 620 i HCT 116 u pH rasponu od 3 do 10 NL, te rasponu molekularskih težina od 14 do 100 kDa. Upotrijebljeni su sljedeći puferi: #1: 7M urea + 2M tiourea, 4% (w/v) CHAPS; #2: 5M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) CHAPS + 2% (w/v) SB 3-10; #3: 7M urea + 2M tiourea, 2% (w/v) ASB-14 i #4: 9M urea, 4% (w/v) CHAPS + 0.5% (v/v) TRITON X-100. Dobiveni rezultati pokazuju kako se pojedini puferi međusobno razlikuju po prirodi proteina koje su specifično solubilizirali, što je djelomično ovisilo i o staničnoj liniji. Najveći broj detektiranih proteina iz stanica HCT 116 dobiven je na gelu kada se solubilizacija proteina i izoelektrično fokusiranje provelo s puferom koji je sadržavao ASB-14. Pufer ASB-14 učinkovit je u solubilizaciji integralnih membranskih proteina<sup>16,17</sup>. 2-DE analiza stanica SW 620 rezultirala je najvećim brojem proteina kada je bio korišten

pufer sastava 9M urea + CHAPS/TRITON X-100. Neionski detergent Triton X-100 izuzetno je učinkovit u solubilizaciji citosolnih proteina, te neki autori smatraju uobičajenom praksom dodati malu količinu ovog detergenta puferu koji sadrži zwitter-ionski surfaktant<sup>16</sup>. No, najveći broj jedinstvenih proteinskih vrsta karakterističnih za određenu vrstu pufera kod obje stanične linije dobiven je s puferom koji je sadržavao samo CHAPS. Zapažena slabija učinkovitost pufera SB 3-10, uočena kod obje stanične linije, mogla bi se pripisati upotrijebljenoj nižoj koncentraciji uree zbog slabe topljivosti ovog detergenta u koncentraciji uree većoj od 5M<sup>11</sup>. Naime, urea denaturira proteine i prekida nekovalentne i ionske veze između njih, čime poboljšava solubilizaciju proteina i njihov ulazak u IPG-strip<sup>18</sup>. Nadalje, iz slika dobivenih gelova vidljivo je kako pufer s CHAPS daje gelove bolje rezolucije (veće kvalitete) u odnosu na pufer s ASB-14. Ovaj je rezultat u skladu s rezultatima istraživanja provedenim na limfnim čvorovima čovjeka u kojima je testirano šest različitih pufera, pri čemu su gelovi najbolje kvalitete dobiveni upravo s puferima koji sadrže kombinaciju CHAPS/urea/tiourea, dok je pufer s ASB-14 uzrokovao pojavu horizontalnih crta na gelu (engl. *streaking*), naročito u bazičnoj regiji gela<sup>19</sup>. Za sve daljnje proteomske studije biološkog djelovanja benzimidazo [1,2-a] kinolina<sup>2</sup> stoga je korišten pufer sastava 7M urea/2M tiourea/4% (w/v) CHAPS.

## ZAKLJUČAK

Zaključno, rezultati optimizacije uzorka za analizu 2-DE uporabom četiriju različitih pufera koji su se razlikovali po upotrijebljenom surfaktantu ukazuju na to kako je pufer sastava 7M urea + 2M tiourea + 4% (w/v) CHAPS optimalan pufer za izolaciju i razdvajanje smjese proteina dobivene iz tumorskih staničnih linija kolona HCT-116 i SW 620. Gelovi dobiveni uz pomoć ovog pufera imali su najbolju rezoluciju i na njima je bilo moguće detektirati najveći broj jedinstvenih proteinskih vrsta obiju ispitanih staničnih linija.

## ZAHVALA

Ovaj rad nastao je uz financijsku potporu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa O98-0982464-2393 i projekta Fonda za zapošljavanje i razvoj RH 14V09809.

## LITERATURA

- Hranjec M, Kralj M, Piantanida I, Sedić M, Suman L, Pavelić K et al. Novel cyano- and amidino-substituted derivatives of styryl-2-benzimidazoles and benzimidazo[1,2-a]quinolines. Synthesis, photochemical synthesis, DNA binding, and antitumor evaluation, part 3. *J Med Chem* 2007;50:5696-711.
- Sedić M, Poznic M, Gehrig P, Scott M, Schlapbach R, Hranjec M et al. Differential antiproliferative mechanisms of novel derivative of benzimidazo[1,2-alpha]quinoline in colon cancer cells depending on their p53 status. *Mol Cancer Ther* 2008;7:2121-32.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68:850-8.
- Kraljević S, Stambrook PJ, Pavelić K. Accelerating drug discovery. *EMBO rep* 2004;5:837-42.
- Jain KK. Proteomic s-based anticancer drug discovery and development. *Technol Cancer Res Treat* 2002;1:231-6.
- Kraljević S, Sedić M, Scott M, Gehrig P, Schlapbach R, Pavelić K. Casting light on molecular events underlying anti-cancer drug treatment: what can be seen from the proteomics point of view?. *Cancer Treatment Rev* 2006;32:619-29.
- Weinstein J N, Myers TG, O'Connor P M, Friend SH, Fornace Jr. AJ, Kohn KW, et al. An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science* 1997;275:343-9.
- Myers TG, Anderson NL, Waltham M, Li G, Buolamwini JK, Scudiero DA et al. A protein expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Electrophoresis* 1997;18:647-53.
- Fontana S, De Leo G, Sedić M, Kraljević Pavelić S, Alessandro R. Proteomics in antitumor research. *DDT: technologies* 2006;3:441-9.
- Shaw, MM, Riederer BM. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2003;3:1408-17.
- Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2002;2:3-10.
- Herbert B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1999;20:660-3.
- Henningsen R, Gale BL, Straub KM, DeNagel DC. Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2002;2:1479-88.
- Rabilloud, T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1997;18:307-16.
- Molloy MP. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal Biochem* 2000;28:1-10.
- Kraljević Pavelić S, Sedić M, Hock K, Vucinić S, Jurisic D, Gehrig P et al. An integrated proteomics approach for studying the molecular pathogenesis of Dupuytren's disease. *J Pathol* 2008;217:524-33.
- Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004;4:3665-85.
- de Marqui AB, Vidotto A, Polachini GM, Bellato Cde M, Cabral H, Leopoldino AM et al. Solubilization of proteins from human lymph node tissue and two-dimensional gel storage. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:216-22.