

# OKULÆR PROTEOMANALYSE

– Et nyt basalvidenskabeligt forskningsområde



Christos Christakopoulos  
Øjenafdeling, Ålborg Sygehus



Lars Loumann Knudsen  
Øjenafdeling, Ålborg Sygehus



Bent Honoré  
Institut for Medicinsk  
Biokemi, Århus Universitet



Henrik Vorum  
Øjenafdeling, Århus Univer-  
sitetshospital og Institut for  
Medicinsk Biokemi, Århus  
Universitet

Denne artikel har indgået som en del af Christos Christakopoulos forskningstrænings modul.

Med moderne teknologi er det i dag muligt at studere et givet vævs totale proteinsammensætning.

Dette kaldes Proteomics eller på dansk Proteomanalyse og definerer en ny disciplin indenfor den biologiske grundforskning. Studiet af det humane proteom er i en rivende udvikling med analyse af flere organers væv. Indenfor det oftalmologiske område er feltet endnu i sin opstart. Ud fra kendskabet til det normale øjes proteinsammensætning kan forskellige sygdomsrelaterede proteiner udpeges og på sigt målrettede behandlinger designes. I den følgende artikel vil vi forsøge at give en kort oversigt over principperne ved proteomanalyse og dets placering i oftalmologisk forskning.

## INTRODUKTION

Det indre miljø i en given øjencelle er et dynamisk sted hvor tusinder af proteiner til stadighed dannes og nedbrydes. Forståelsen af de enkelte proteiners strukturer, niveauer, interaktioner og funktioner i relation til udviklingen af øjensygdomme er i dag et af de vigtigste mål indenfor den sygdomsbekæmpende øjenforskning. Studiet af det okulære proteom kan potentielt afsløre patogenetiske årsager og sammenhænge og dermed kaste lys over involverede proteiner, som kan tænkes at have en skadelig virkning på cellen. Sådanne sygdomsrelaterede proteiner kan potentielt blokeres med antistoffer eller uskadiggøres på anden vis og dermed sættes ud af funktion. Dette har vi på det seneste set med introduktionen af potente antistoffer mod VEGF-vækstfaktoren i behandlingen af de eksudative former for AMD.

Både erhvervede sygdomme og arvelige anomalier kan potentielt blive fokus for proteomanalyser.

Teoretisk kan opdagelsen af proteiner, som er involveret i patogenesen af øjensygdomme, lede til udpegning af specifikke sygdomsmarkører,

såkaldte okulære biomarkører. Dette kendes allerede indenfor andre sygdomsgrupper som fx prostata cancer (PSA - prostata specifikt antigen),

ovariecancer (CA125 - serumcancerantigen 125) og coloncancer (CEA - karcinoembryonalt antigen, CA 19-9) mfl., hvor disse markører allerede bruges flittigt i den daglige klinik. Den igangværende biomarkør forskning har som hovedformål at finde markører med høj sensitivitet og høj specificitet. Biomarkørerne behøver ikke nødvendigvis at stamme fra egentlig patologisk væv, men kan udmærket være et resultat af sygdomsspecifikke og post-translationelle modifikation af bundne proteiner i forskellige vævskompartementer, hvilket gør proteomics til en nærliggende metode til identifikation af nye okulære biomarkører. Med baggrund i ovenstående kan proteomics således defineres som den disciplin der i detaljer beskriver niveauer og strukturer af alle tilstedeværende proteiner i en given celle til et givet tidspunkt. I dag er to teknikker helt centrale indenfor proteomanalyse, nemlig den to-dimensionale gelelektroforese (2D-PAGE), der i princippet

Fortsat fra side 3

er i stand til at adskille flere tusinde proteiner, kombineret med massespektroskopisk (MS) analyse til identifikation af de enkelte proteiner.

## METODER

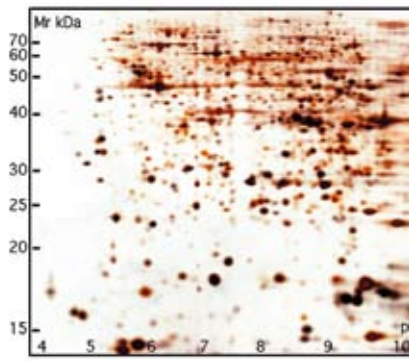
### 2D-PAGE

2D-PAGE teknikken blev introduceret for mere end 30 år siden af O'Farrell og Kloese. Denne teknik regnes i dag for en af de fineste metoder til separation af proteiner. Med denne teknik er det som anført muligt at separere op mod tusind proteiner fra en enkelt prøve. Teknikken adskiller sig væsentligt fra de ældre teknikker som f. x tyndlags kromatografi, der kun kunne identificere mindre protein fragmenter (peptider) eller aminosyrer.

Prøvematerialet kan i princippet stamme fra alle slags væv i øjet, fra yderste corneaepithel, over corpus vitreum til retina. 2D-PAGE metoden adskiller, som ordet siger, proteinerne i to forskellige dimensioner. Den første dimension separerer proteinerne efter deres ladning, en såkaldt isoelektrisk focusing. Proteinerne bringes til at vandre i et elektrisk spændingsfelt på en pH-gradient indtil deres netto-ladning bliver neutraliseret og det enkelte protein stopper dets vandring udfor proteinets såkaldte isoelektriske punkt, kaldet proteinets pI. Efter at proteinerne er adskilt på basis af deres ladning, separeres de yderligere, i den anden dimension, efter deres molekylær vægt. Dette er i princippet en traditionel gel-elektroforese, hvor proteinerne, ligeledes i et elektrisk spændingsfelt, vandrer gennem en gel-matrix, således at de mindste proteiner vandrer længst ned i gelen og de største vandrer kortest. De separerede proteiner visualiseres i gelen ved forskellige farvemethoder, på samme måde som man fremkalder et fotografi og fremstår som pletter, såkaldte protein-spots. Fig. 1 viser en sådan sølvfarvet 2D-gel af human cornea epithel.

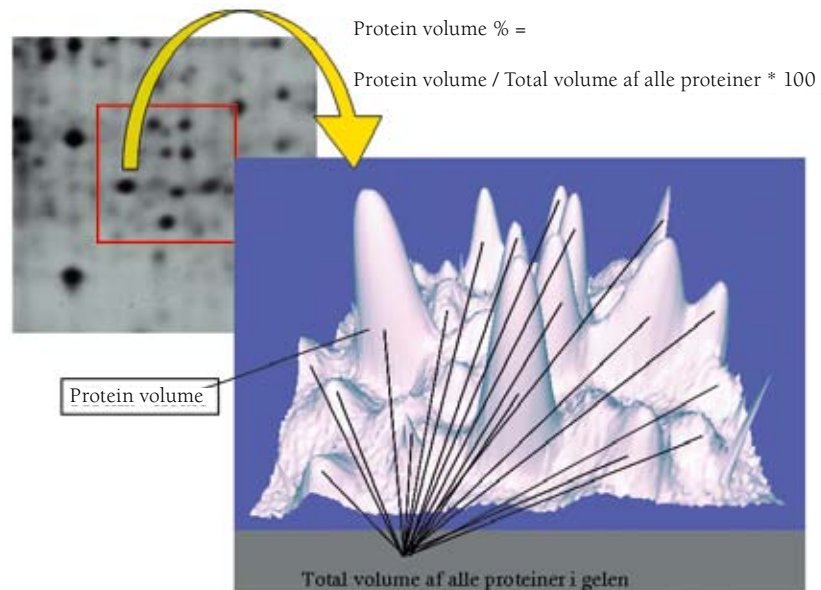
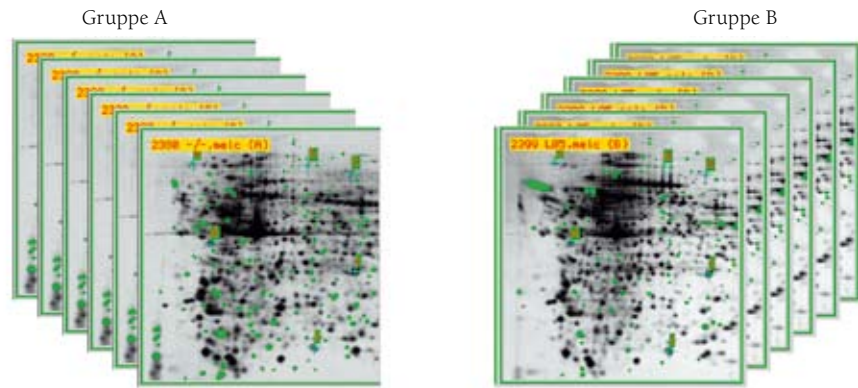
### COMPUTERANALYSER

2D-geler fra flere grupper af celler eller væv kan stilles ved siden af hin-



← Figur 1: Eksempel på sølvfarvet (2D) gel fra human cornea.

Figur 2: 2D geler af to grupper af celler (Gruppe A: normalt corneal epithel, Gruppe B: abnormt corneal epithel) opstillet ved siden af hinanden med henblik på sammenligning af deres gennemsnitlige proteinprofiler. ↓



Figur 3: Koncentration af hvert protein i gelen kan udtrykkes som en brøkdelen af den specifikke proteinmasse i relation til den samlede proteinmasse i gelen. Ved at sammenligne to proteinlandskaber er det muligt at udpege hvilke proteiner der er signifikant op- eller nedregulerede.

anden og deres gennemsnitlige proteinprofiler sammenlignes, (Fig. 2). Således er det muligt at sammenligne syge celler med raske, normale med maligne, behandlede med ubehandlede, ect. Til disse sammenlignende analyser bruges densitometriske metoder. Gelerne bliver indscannet i et optisk densitometer og efterfølgende analyseret med avanceret computer software der beregner den integrerede

lysabsorption i hver plet. Koncentration af hvert protein i gelen kan herefter udtrykkes om en brøkdelen af den specifikke proteinmasse i relation til den samlede proteinmasse i gelen, illustreret i Fig 3. Ved at sammenligne to proteinlandskaber er det på denne måde muligt at udpege hvilke proteiner der er signifikant op- eller ned-regulerede.

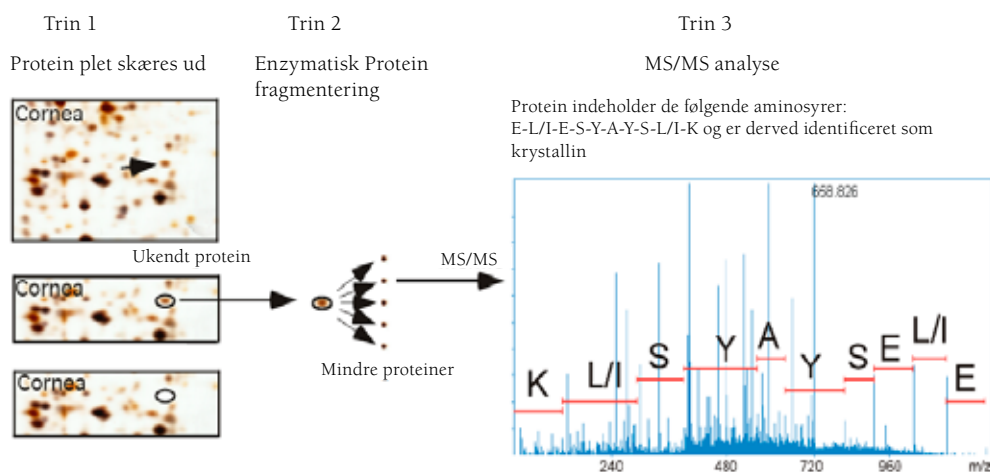
**PROTEINIDENTIFIKATION**

Når proteinerne er blevet separerede, visualiserede og kvantificerede, står tilbage identifikation af de relevante proteiner, hvilket foregår gennem 3 trin. Trin 1: pletterne skæres først ud af gellerne og trin 2: behandles med enzymet trypsin, der klipper de enkelte proteiner i stykker til mindre fragmenter. Trin 3: disse peptidfragmenter undergår herefter en massespektroskopisk analyse, Fig. 4. I massektrometeret genereres en proteinprofil, hvorved der fremkommer et såkaldt "fingeraftryk"

(Fig. 4), der er fuldstændigt specifikt for hvert enkelt protein. Dette "fingeraftryk" sammenlignes, via store web-baserede databaser, med allerede eksisterende genetiske- og proteinsekvens data, hvorved en sikker identifikation fremkommer.

I denne sammenhæng kan 2D-PAGE databaser vise sig, at være uundværlige værktøjer til hurtigt at udpege de vigtigste faktorer. Protein-ekspressions-profiler fra forskellige anatomiske strukturer kan således som tidligere beskrevet bruges som "fingeraftryk" for disse og derved danne grundlag for systematisk forskning indenfor øjensygdomme med det formål bedre at kunne diagnosticere, bestemme prognosen og foretage behandling af de enkelte øjensygdomme.

For at opnå dette mål skal man først analysere flere vævsprøver fra cornea, conjunktiva, linse, iris, corpus ciliare, corpus vitreum, retina, koroidea og sklera fra det normale øje. Således kan man etablere en protein-database, der giver den solide platform for hurtig udpegning af protein markører relateret til de enkelte øjensygdomme



Figur 4: Massespektroskopisk analyse til identifikation af protein. Den relevante protein-spot skæres ud fra 2D gelen (trin 1), hvorefter proteinmolekylet klippes i mindre fragmenter (trin 2), og analyseres ved massespektroskopi (trin 3) til identifikation af proteinet.

**FREMTIDSPERSPEKTIVER**

Med de proteomiske teknikker kan man således opdage proteinekspressions-forskelle, som er associeret med forskellige øjensygdomme eller som eksisterer, som respons på en givet udefrakommende påvirkning. Det er derfor vigtigt at indsnævre det antal af mulige patogene associationer, hvorved de fundne forandringer finder sted, således at patogenesen af den enkelte sygdom bedre kan forstås.

På lang sigt er formålet at identificere et komplet sæt af protein biomarkører som kan være nyttige indenfor klassifikation af de histopatologiske grader for forskellige øjensygdomme og som kan initiere produktionen af f.x antistoffer til brug for objektiv diagnosticering, prognose-bestemmelse og ikke mindst behandling for disse anomalier. Opdagelsen af biomarkører kan bane vejen for kommende forskning

Fortsættes side 8

i den molekylære okulære patologi. Allerede nu er der fundet en række væv fra øjet som viser modificerede protein-ekspressions-profiler ved forskellige øjensygdomme:

#### **Tårefilmen**

Hos normale mennesker er fundet mere end 60 forskellige proteiner i tårerne og 90 proteiner i de Meibomske kirtler. Der er fundet proteaser, protease inhibitorer samt anti-oxidant enzymer.

Hos personer med tørre øjne er der f.x fundet forøget mængde af en række inflammatoriske markører.

#### **Hornhinden**

Hos normale mennesker er protein sammensætningen i normale donor hornhinder fastlagt, der er fundet mere end 100 forskellige udtrykte proteiner.

Ved keratokonus f. x er der fundet ændringer i en række proteiner af patogenetisk betydning herunder cytokeratin, gelsolin, enolase, beta-actin mm.

De fleste opregulerede proteiner ved f. x karnydannelse i hornhinden er fastlagt at være blod relaterede proteiner.

#### **Nærsynethed**

Den normale emmetropisations proces har vist sig at det involverer mindst 5 forskellige proteiner.

Ligeledes er en række proteiner involveret i udviklingen af akse myopi.

#### **Trabekelværket**

Hos glaucompatienter er der ved proteom analyse fundet flere forskellige ændringer i trabekelværkets proteinsammensætningen sammenlignet med normale personer.

For eksempel synes proteinet gamma-enolase at være involveret i gangliecelle død hos personer med glaucom.

Trabekelværket og lamina cribrosa har vist sig at have en forbavsende ens proteinsammensætning, hvilket kan tænkes at medføre ens reaktion i de to væv ved åbenvinkel glaucom.

#### **Linsen**

Hos normale mennesker består linsen overvejende af proteiner kaldet krystalliner hvoraf der findes mindst 16 der er modificeret i relation til alder.

Hos personer med cataract er fundet strukturelle forandringer i specielt et af proteinerne (betaB2-krystallin) måske af mulig betydning for selve cataract udviklingen.

#### **Glaslegemet**

Hos normale mennesker er glaslegemets proteiner allerede karakteriseret. Dette gælder såvel i pseudophake som phake øjne.

#### **Nethinden**

Proteomanalyse af nervevæv er teknisk vanskelig og under fortsat udvikling, men en række resultater foreligger allerede på det nuværende tidspunkt.

Ved aldersrelateret maculopati (ARM) er 5 proteiner således fundet opreguleret hos personer med maculære druser. Oxidative proteiner synes også at have indflydelse på forekomsten af druser samt udvikling af ARM.

Hos personer med aldersrelateret macula degeneration (AMD) er der ligeledes fundet forskellige proteiner involveret i de forskellige stadier af AMD. Det kan skyldes at forskellige biokemiske processer er af betydning i de forskellige faser af denne sygdom.

Ved såvel diabetisk retinopati og diabetisk maculopati er en række specifikke proteiner på tilsvarende vis fundet opreguleret.

Okulær proteomanalyse er et ganske nyt forskningsområde som omfatter den totale analyse af proteinerne, ved brug af en kombination af de i artiklen omtalte teknikker til at bestemme, identificere, kvantificere og karakterisere øjets proteiner. Med de i dag eksisterende højteknologiske muligheder kan omfattende 2D-protein-databaser opbygges og bringes til at kommunikere sammen og dermed sammenkoble protein- og DNA-sekvens eller gen-kortlægnings (mapping) data, hvilke gør teknikken et uundværligt redskab indenfor den basalvidenskabelige øjenforskning. ■