



Preliminary approach towards construction of peptide libraries as potential tools for diagnosis of malignant thyroid tumors

Waldemar Balcerzak¹, Wiktor Bednarz¹, Paweł Domoślawski¹, Robert Olewiński¹, Justyna Kolesińska², Zbigniew Kamiński², Katarzyna Dziarkowska³, Piotr Wieczorek³

¹1st Department of General, Gastroenterological and Endocrinological Surgery, Medical University, Wrocław

²Department of Organic Chemistry, Technical University, Łódź

³Department of Chemistry, University, Opole

Abstract

Introduction: Cancer of thyroid gland is the most common malignancy of the endocrine system. The treatment improvement could be achieved by early diagnosis. The aim of the study was to identify cancer specific antigens with use of peptide libraries.

Material and methods: The material from 6 patients with thyroid cancer (4 with papillary cancer, 1 with follicular cancer and 1 with oxyphilic tumor) were analyzed. It was performed with use of lipophilic peptide libraries by direct comparison of staining of specimens prepared from normal and malignant tissue.

Results: Preliminary results confirm practical value of peptide libraries in early diagnostics of thyroid cancer.

Conclusions: It is important to optimize construction of peptide libraries by using different staining agents hydrolyzed by proteases.

(*Pol J Endocrinol* 2006; 4 (57): 307–313)

Key words: thyroid gland, papillary thyroid cancer, medullary thyroid cancer, neoplasma folliculare, diagnostic tool



Waldemar Balcerzak, M.D.

1st Department of General, Gastroenterological and Endocrinological Surgery, Medical University in Wrocław
Poniatowskiego 2, 50-326 Wrocław
phone: 071 321 51 70, fax: 071 322 26 71 w. 347
e-mail: wbalcerzak@wp.pl



Wstępne próby konstrukcji bibliotek peptydowych jako narzędzia w diagnostyce nowotworów złośliwych tarczycy

Waldemar Balcerzak¹, Wiktor Bednarz¹, Paweł Domosławski¹, Robert Olewiński¹, Justyna Kolesińska², Zbigniew Kamiński², Katarzyna Dziarkowska³, Piotr Wieczorek³

¹I Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej AM, Wrocław

²Instytut Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej, Łódź

³Instytut Chemii Uniwersytetu Opolskiego, Opole

Streszczenie

Wstęp: Nowotwory złośliwe tarczycy należą do najczęstszych nowotworów złośliwych układu endokrynnego. Poprawa wyników leczenia wiąże się z postępowaniem wczesnej diagnostyki raka. Celem niniejszych badań jest poszukiwanie wskaźników nowotworowych za pomocą bibliotek peptydowych umieszczonych na podłożu z bibuły.

Materiał i metody: Analizie poddano tkanki pobrane od 6 pacjentów: 4 z rakiem brodawkowatym tarczycy, 1 z nowotworem pęcherzykowym oraz 1 pacjenta z rakiem oksyfilnym. Badania wykonywano z wykorzystaniem bibliotek peptydowych lipofilowych, porównując tkankę zdrową i chorą oraz oceniając zmianę zabarwienia w poszczególnych bibliotekach.

Wyniki: Wstępne wyniki wskazują, że biblioteki peptydowe można zastosować w diagnostyce nowotworów tarczycy.

Wnioski: Niezbędna jest optymalizacja budowy bibliotek peptydowych, gdzie konieczne jest zastosowanie innego barwnika hydrolizowanego przez proteazy.

(*Endokrynol Pol* 2006; 4 (57): 307–313)

Słowa kluczowe: tarczycza, rak brodawkowaty, rak rdzeniasty, gruczolak pęcherzykowy, system diagnostyczny

□ Dr med. Waldemar Balcerzak
I Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej,
Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej AM, Wrocław
ul. Poniatowskiego 2, 50-326 Wrocław
tel.: 071 321 51 70, faks: 071 322 26 71 w. 347
e-mail: wbalcerzak@wp.pl

Wstęp

Nowotwory złośliwe tarczycy należą do najczęstszych nowotworów układu endokrynnego. W statystykach onkologicznych zajmują odległe miejsce i stanowią 1–2% wszystkich nowotworów złośliwych. Występują 3 razy częściej u kobiet niż u mężczyzn [1]. Polska należy do krajów o niskim statystycznie wskaźniku zachorowalności na raka tarczycy. W 1989 roku wskaźnik zachorowalności dla mężczyzn wynosił 0,6/100 tys., a dla kobiet — 1,6/100 tys. [2]. Począwszy od 1990 roku, obserwuje się wzrost zapadalności na raka wysokozróżnicowanego — brodawkowatego i pęcherzykowego. Zmiany te są odnotowane zarówno w centralnym rejestrze onkologicznym w Instytucie Onkologii w Warszawie, jak i w rejestrach regionalnych. W Gliwicach w 1990 roku wskaźnik zapadalności wynosił 1,7, a w 1999 roku wzrósł do 6,87. Podobne dane odnotowano w Olsztynie i Krakowie [3]. Z drugiej strony rozwój badań diagnostycznych, a zwłaszcza zwiększona dostępność do USG i biopsji cienkoigłowych, doprowadził do częstszego i wcześniejszego rozpoznania raka. Poprawa wyników leczenia raka zależy od wczesnej diagnosti-

ki. Mimo szerokiego wachlarza badań diagnostycznych, żaden pojedynczy test nie jest wystarczający do postawienia wiarygodnej diagnozy. Dla istotnej oceny klinicznej pacjentów z rakiem tarczycy niezbędne są: dokładny wywiad, badanie przedmiotowe, USG szyi, biopsja aspiracyjna cienkoigłowa (BAC) tarczycy, badanie hormonu tyreotropowego (TSH, *thyroid stimulating hormone*), RTG klatki piersiowej w ujęciu A-P i bocznym, badanie laryngologiczne w celu oceny funkcji strun głosowych oraz oznaczenie stężenia wapnia zjonizowanego w surowicy. Obecnie najskuteczniejszą metodą pozwalającą na różnicowanie łagodnych i złośliwych guzków tarczycy jest biopsja cienkoigłowa. Czulość tego badania wynosi 90–95%, a swoistość — 60–80% [4]. W badaniu cytologicznym nie ma możliwości różnicowania gruczolaka pęcherzykowego i raka pęcherzykowego. Wyniki budzące wątpliwość w badaniu cytologicznym przez cytologów są określane jako nowotwór pęcherzykowy (NF, *neoplasma folliculare*). Częstość rozpoznania raka pęcherzykowego w badaniu histopatologicznym po leczeniu operacyjnym z powodu podejrzanego wyniku BAC wynosi 20–30% [5]. Z tego powodu poszukuje się dalszych metod diagnostycznych,

które mogłyby precyzyjniej diagnozować dane schorzenie. Zwiększenie możliwości diagnostycznych wiąże się z badaniami nad molekularnymi wskaźnikami raka tarczycy. Są nimi: peroksydaza tarczycowa (TPO, *thyroid peroxidase*) [6, 7], galektyna-3 [8] i telomeraza [9].

Brak precyzyjnych metod diagnostycznych był inspiracją do wykorzystania nowej dziedziny chemii, tak zwanej chemii kombinatoryjnej, to jest wykorzystania bibliotek peptydowych, w diagnostyce nowotworów tarczycy. Chemia kombinatoryjna polega na syntezie bardzo dużej liczby substancji chemicznych (tak zwanej biblioteki), wykorzystując pewną liczbę małych związków wyjściowych we wszystkich kombinacjach. Biblioteki te zwykle wiążą się ze stałym podłożem, takim jak celuloza, szkło lub polimerowa matryca. Biblioteki skonstruowane na szkło mogą mieścić nawet 1024 różne peptydy na 1,6 cm² powierzchni [10].

Ponieważ enzymy i inne białka często wykazują aktywność wobec peptydów, a ponadto peptydy można traktować jako model reprezentujący określony fragment białka, stosowanie bibliotek peptydowych daje wyjątkową szansę badania aktywności enzymatycznej białek, identyfikacji ich miejsc wiążących oraz poszukiwania nowych inhibitorów [11–21].

Celem niniejszej pracy było wstępne zbadanie użyteczności kombinatoryjnych bibliotek peptydowych w celu poszukiwania wskaźników nowotworów złośliwych tarczycy.

Materiały i metody

Przygotowanie próbek tkanek

Badane tkanki pobierano od chorych operowanych w I Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej AM we Wrocławiu. Użytkano zgodę Komisji Etycznej na przeprowadzenie badań. Fragmenty tkanek tarczycy pobierano z guza nowotworowego i fragmentu z mięszu makroskopowo niezmiennego drugiego płata (tkanka zdrowa). Badano tkanki tarczycy chorych, u których rozpoznano: raka brodawkowatego (*carcinoma papillare*) (4 chorych), *neoplasma folliculare* w biopsji cienkoigłowej (2 chorych), gdzie w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym rozpoznano przerost pęcherzykowy (*adenoma folliculare*) i raka oksyfilnego (*carcinoma oxyphilicum*) (1 chory). Pobrany materiał transportowano w ciekłym azocie i przechowywano w stanie głębokiego zamrożenia. Skrawki tarczycy o masie 100 mg homogenizowano w 1 ml 0,05 M buforu fosforanowego o pH 6,8. Proces homogenizacji, jak też inne etapy przygotowania próbek do analizy, przeprowadzano w temperaturze 0°C. Otrzymane homogenaty odwirowano (10 min, temperatura 3°C, siła — 7840 g), a następnie 400 µl supernatantu przeniesiono do urządzenia filtrującego Microcon YM-3 (Millipore, Bedford, MA, USA). Ultrafiltrację

przewodzą przez 95 minut, w temperaturze 3°C i przy sile odśrodkowej 13 400 g. Proces ten powtórzono dla drugiej porcji supernatantu. Otrzymane frakcje niskociągęsteczkowe zamrożono w ciekłym azocie i zliofilizowano. W tej formie próbki przechowywano w zamrażarce. Przed analizą liofilizaty rozpuszczono w 700 µl (frakcje niskociągęsteczkowe) lub 1000 µl wody (frakcje wysokociągęsteczkowe).

Biblioteki peptydowe

Biblioteki peptydowe wykorzystane w doświadczeniach zsyntetyzowano w Instytucie Chemii Politechniki Łódzkiej [22]. Biblioteki miały format krążków o średnicy 6 mm. Wykorzystano 2 rodzaje bibliotek (A i B):

Biblioteka A

Biblioteka ta na każdym krążku zawierała inny peptyd N-acylowany kwasem tłuszczowym, immobilizowany do podłoża celulozowego od końca C, za pośrednictwem łącznika triazynowego [22].

Biblioteka B

Biblioteka B zawierała na każdym krążku inny peptyd N-acylowany dabcylem (kwasem 4-dimetylamino-fenylazobenzoowym), który został zimmobilizowany do podłoża celulozowego od końca C, za pośrednictwem łącznika triazynowego [22].

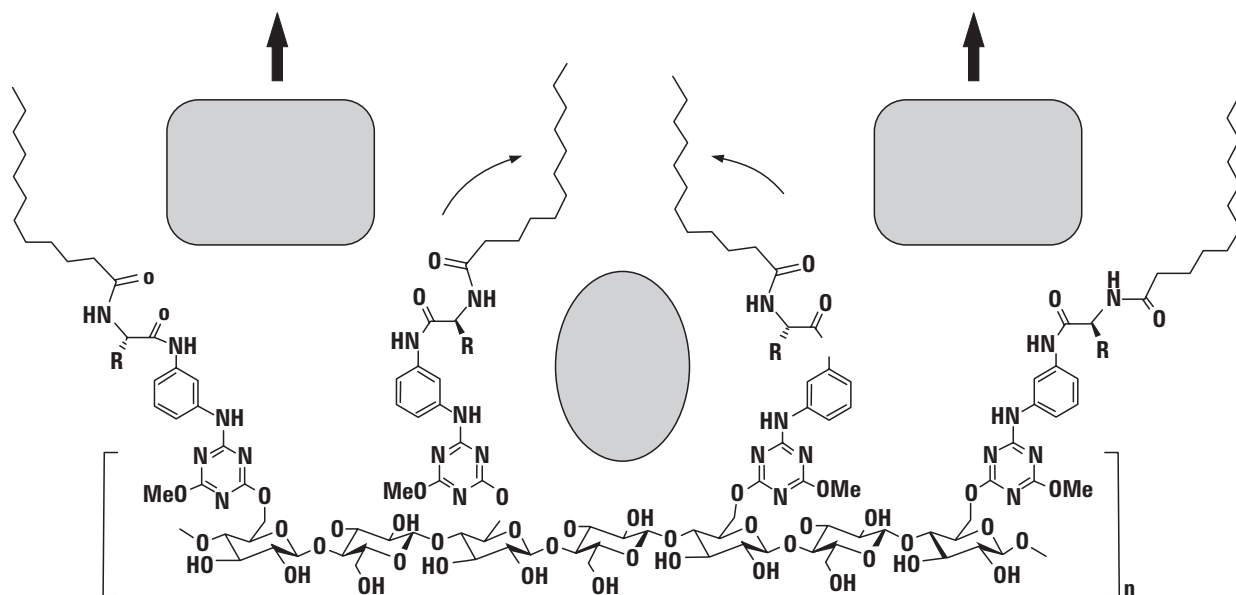
Analiza składu tkanek za pomocą bibliotek

Na każdy celulozowy krążek (pole biblioteki) naniesiono niewielką ilość (5 µl) roztworu frakcji niskociągęsteczkowej (dla bibliotek A) i frakcji wysokociągęsteczkowej (dla bibliotek B) ekstraktów uzyskanych z tkanek tarczycy. Krążki biblioteki B umieszczono na 24 godziny między dwoma płytkami szklanymi, w celu ochrony przed utratą wilgoci. Po tym czasie biblioteki wypłukano wodą i zeskanowano. Dzięki programom Adobe PhotoShop 4.0 i Image Quant 5.0 zmierzono intensywność ich zabarwienia. Natomiast biblioteki B moczono w roztworze żółci brylantowej, po czym nadmiar barwnika usunięto i wykorzystując wyżej opisaną metodę, odczytano intensywność ich barwy.

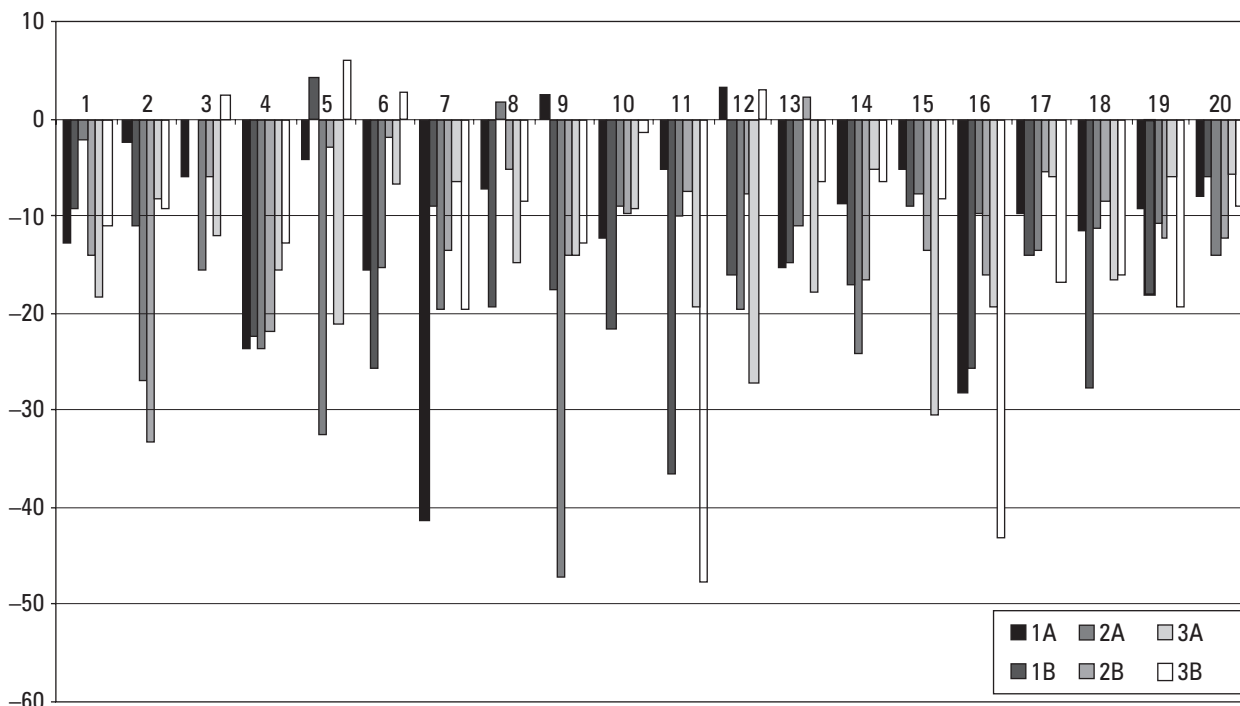
Wyniki i dyskusja

Biblioteki A

Biblioteki te zawierały lipopeptydy immobilizowane na celulozowych bibułkach. Zasadą działania tych bibliotek są siły przyciągania między niskociągęsteczkowymi, hydrofobowymi składnikami ekstraktów (ryc. 1 — prostokąt) a hydrofobowymi krążkami bibliotek (ryc. 1). Po wysuszeniu są one nasączone roztworem barwnika (na rycinie — owal), który wypiera lub nie jest zdolny wypierać związanej substancji, co powoduje różne zabarwienie biblioteki. Jeżeli badana tkanka nie zawiera hydrofobowych substancji lub zawarte w niej substancje



Rycina 1. Zasada funkcjonowania biblioteki peptydowej (opis w tekście); prostokąt — hydrofobowe składniki ekstraktów; owal — barwnik
Figure 1. Scheme of peptidyl library (description in the test); Square hydrophobic components of extracts; Oval dye

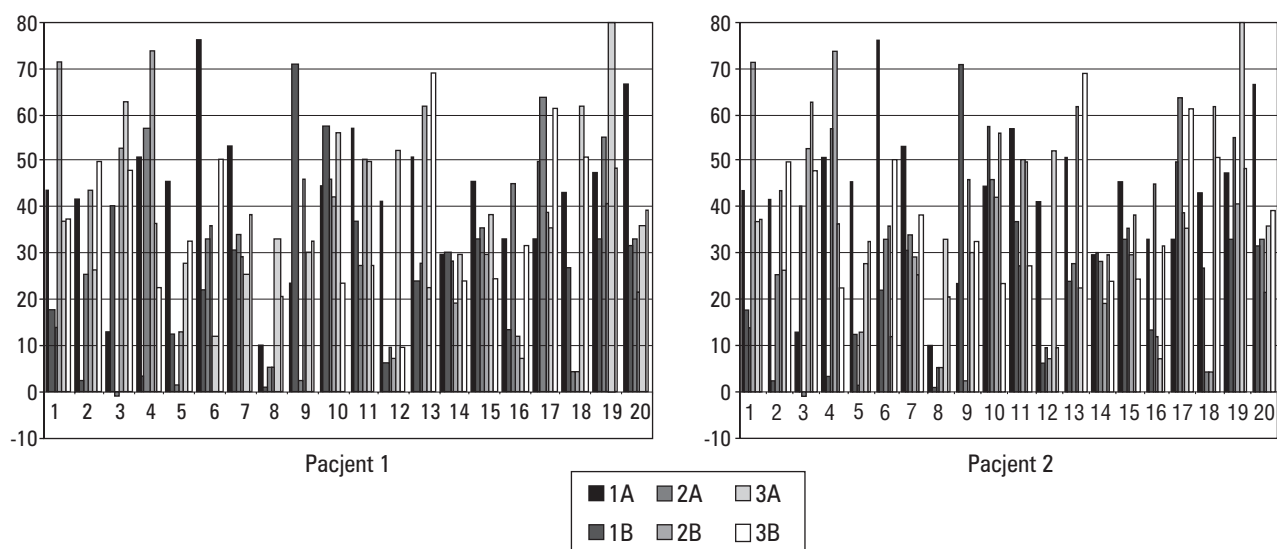


Rycina 2. Porównanie zabarwień bibliotek po badaniu neoplasma folliculare — tkanka zdrowa
Figure 2. Comparison of libraries, study of neoplasma folliculare compared to healthy thyroid tissue

dają się łatwo wyprzeć przez cząsteczki barwnika, to krążek biblioteki będzie intensywnie zabarwiony. Natomiast, jeżeli substancje obecne w tkankach są silnie hydrofobowe, to nie zostaną wyparte lub zostaną w niewielkim stopniu wyparte przez barwnik.

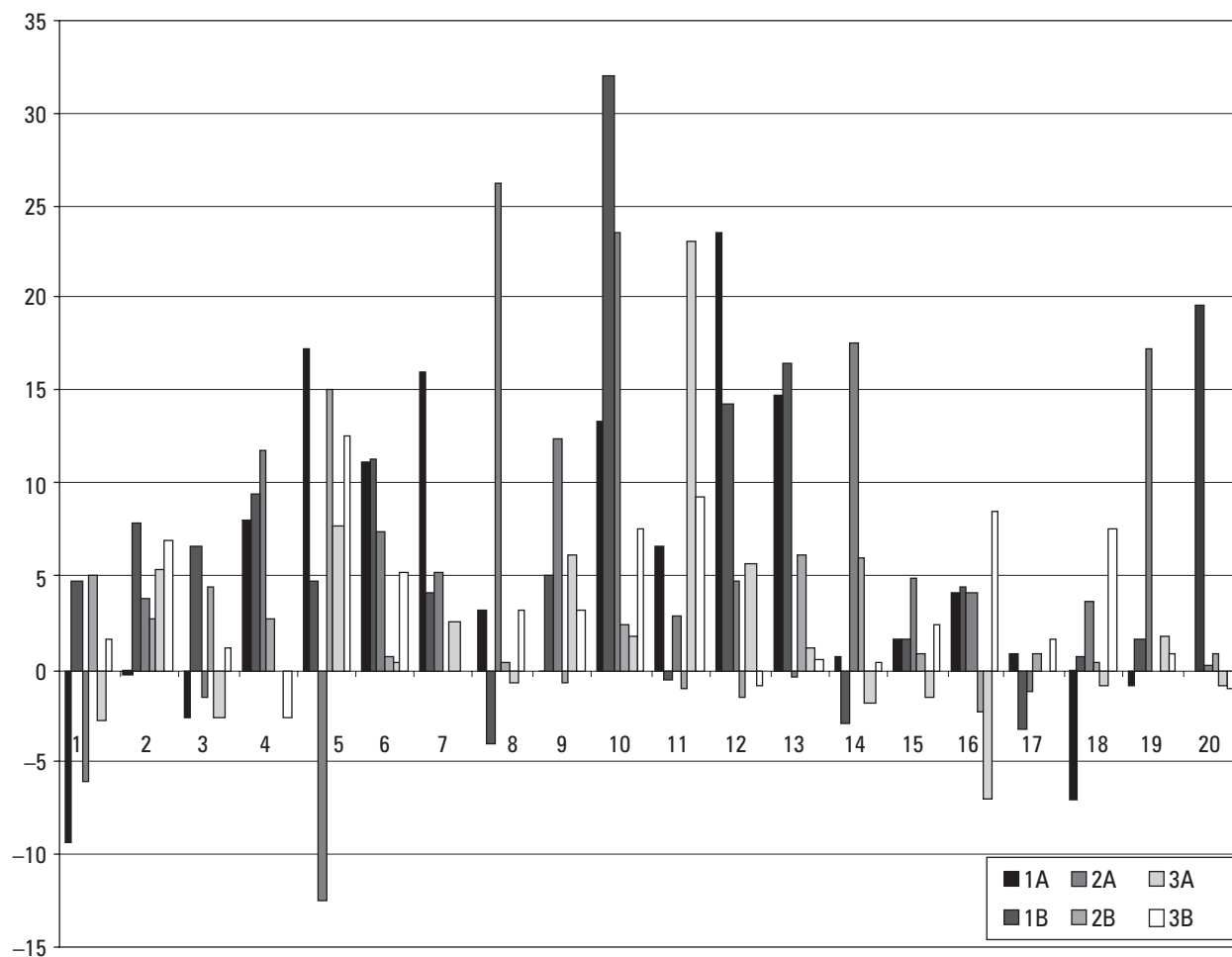
Biblioteka, na którą nie naniesiono żadnego ekstraktu z tkanek, była dużo intensywniej zabarwiona od bibliotek

potraktowanych ekstraktami tkanek nowotworowych. Wyniki badań przedstawiono w formie wykresów różnicowych, gdzie dla każdej biblioteki od intensywności zabarwienia tkanki zdrowej odejmuje się zabarwienie tkanki chorej tego samego pacjenta. Zatem słupki skierowane pod linię zerową wykresu oznaczają silne odbarwienie biblioteki (ryc. 2–4).



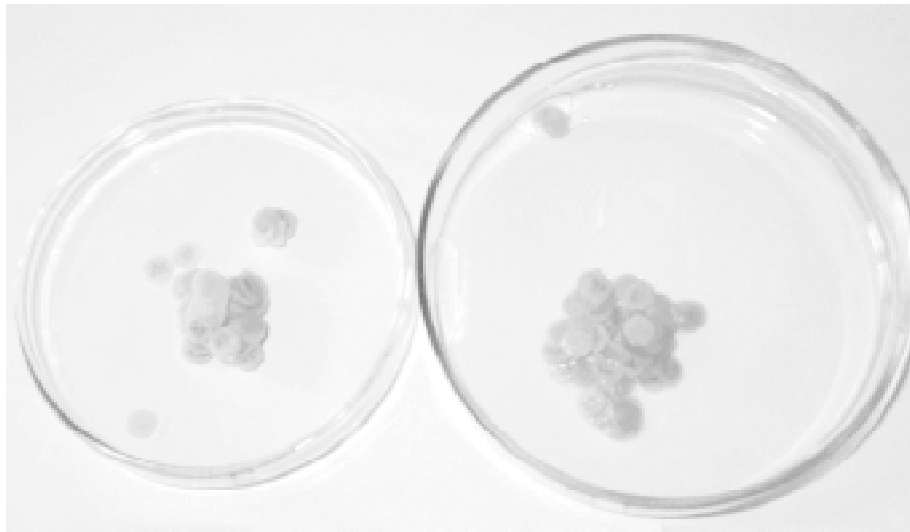
Rycina 3. Porównanie zabarwień bibliotek po badaniu carcinoma papillare u dwóch pacjentów — tkanka zdrowa

Figure 3. Comparison of libraries, study of two patients, carcinoma papillare compared to healthy thyroid tissue



Rycina 4. Porównanie zabarwień bibliotek po badaniu nowotworu Huerthla — tkanka zdrowa

Figure 4. Comparison of libraries, study of oxophilic carcinoma compared to healthy thyroid tissue



Rycina 5. Różnica w zabarwieniu krążków biblioteki potraktowanej enzymami z próbki tarczycy zdrowej (lewa) i rakowej — rak brodawkowaty (prawa)

Figure 5. Differences in colour of libraries treated with enzymes from healthy thyroid (left hand side) and papillary thyroid cancer (right hand side)

Mimo ograniczonej liczby przypadków uzyskane wyniki są obiecujące i wskazują na możliwość różnicowania nowotworów złośliwych (ryc. 3 i 4) od łagodnych (ryc. 2 — w obu badanych przypadkach wykres ten był bardzo podobny). Wykazują one również duże zróżnicowanie międzysobnicze (ryc. 3) — to jedna z istotnych przeszkód napotykanych w trakcie badań biologicznych i medycznych.

Biblioteki B

Zasadą działania tych bibliotek jest hydroliza peptydów znakowanych barwnikiem (dabcyl) przez specyficzne proteazy zawarte w ekstraktach z tkanek (ryc. 5). Zhydrolizowane peptydy są odpłukiwane i zabarwienie pola biblioteki zmienia się. Zatem intensywność zabarwienia poszczególnych pól biblioteki świadczy o aktywności enzymatycznej badanych tkanek. Wstępne wyniki wskazują na możliwość zastosowania tej metody. Jednak różnice w zabarwieniu poszczególnych bibliotek są niewielkie i dlatego są one mało diagnostyczne. Wskazuje to na potrzebę dobrania innej barwnej substancji różnicującej.

Wstępne wyniki uzyskane z badań z użyciem bibliotek znakowanych dabcylem sugerują, iż aktywność enzymów proteolitycznych z tkanek rakowych jest większa niż aktywność enzymów z tkanek zdrowych. Jednak dabcyl okazał się bardzo niedokładnym znacznikiem peptydów, gdyż jego barwa jest zależna od pH, co znacznie utrudniało badania.

Wnioski

Lipopeptydowe i peptydowe biblioteki mogą stanowić interesującą alternatywę w rozpoznawaniu nowotworów tarczycy. Jednak prezentowane badania mają charakter wstępny i niezbędna jest optymalizacja budowy tych bibliotek.

Piśmiennictwo

1. Parker SL, Davis KJ, Wingo PA i wsp. Cancer statistics by 6 race ethnicity. *CA Cancer J Clin* 1998; 48: 31–48.
2. Zatoński AW. Nowotwory złośliwe w Polsce. Centrum Onkologii, Warszawa 1993; 133.
3. Szybiński Z, Huszno B, Rachtan J i wsp. Epidemiologia raka tarczycy w Polsce. *Wiad Lek* 2001; 54 (supl.): 106–115.
4. Ravetto C, Colombo L, Dottorini ME. Usefulness of fine-needle aspiration in the diagnosis of thyroid carcinoma; a retrospective study in 37895 patients. *Cancer* 2000; 90: 357–363.
5. Haugen BR, Woodmansee WW, McDermot MT. Towards improving the utility of fine needle aspiration biopsy for the diagnosis of thyroid tumours. *Clin Endocrinol [Oxf]* 2002; 56: 281–290.
6. Faroux MJ, Theobald S, Plout M i wsp. Evaluation of the monoclonal antibody antithyroperoxidase MoAb47 in the diagnostic decision of cold thyroid nodules by fine needle aspiration. *Pathol Res Pract* 1997; 193: 705–712.
7. Christensen L, Blichter-Toft M, Brand M i wsp. Tyreoperoxidase TPO immunostaining of the solitary cold thyroid nodule. *Clin Endocrinol [Oxf]* 2000; 53: 161–169.
8. Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 1995; 147: 815–822.
9. Siddiqui MT, Greene KL, Clark DP i wsp. Human telomerase reverse transcriptase expression in Diff-Quik-stained FNA samples from thyroid nodules. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10: 123–129.

10. Fodor SP i wsp. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 1991; 251: 767–773.
11. Czarnik A, Keene JD. Combinatorial chemistry. *Curr Biol* 1998; 8: R705–R707.
12. Min DH, Mrksich M. Peptide arrays: towards routine implementation. *Curr Opin Chem Biol* 2004; 8: 554–558.
13. Panicker RC, Huang X, Yao SQ. Recent advances in peptide-based microarray technologies. *Comb Chem & High Throughput Screen* 2004; 7: 547–556.
14. Reimer U, Reineke U, Schneider-Mergener J. Peptide arrays: from macro to micro. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13: 315–320.
15. Reineke U, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J. Application of peptide arrays by the SPOT-technology. *Curr Opin Biotechnol* 2001; 12: 59–64.
16. Hang HC, Ploegh H. Catching proteases in action with microarrays. *Chem & Biol* 2004; 11: 1328–1330.
17. Liu R, Enstrom AM, Lam KS. Combinatorial peptide library methods for immunobiology research. *Exp Hematol* 2003; 31: 11–30.
18. Salisbury CM, Maly DJ, Ellman JA. Peptide microarrays for the determination of protease substrate specificity. *J Am Chem Soc* 2002; 124: 14868–14870.
19. Turk BE, Cantley LC. Peptide libraries: at the crossroads of proteomics and bioinformatics. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7: 84–90.
20. Turk BE, Cantley LC. Using peptide libraries to identify optimal cleavage motifs for proteolytic enzymes. *Methods* 2004; 32: 398–405.
21. Whittaker M. Discovery of protease inhibitors using targeted libraries. *Curr Opin in Chem Biol* 1998; 2: 386–396.
22. Kamiński ZJ, Kolesińska J, Kolesińska B. Synthesis of library of lipopeptides and lipoamides of aminoacids immobilized on the cellulose membrane. *Acta Pol Pharm* 2004; 48–51.