

Alfa-fetoprotein

- historie a význam jeho objevu (1. část)

1. Počátky objevu α_1 -fetoproteinu (odlišnost od fetuinu)

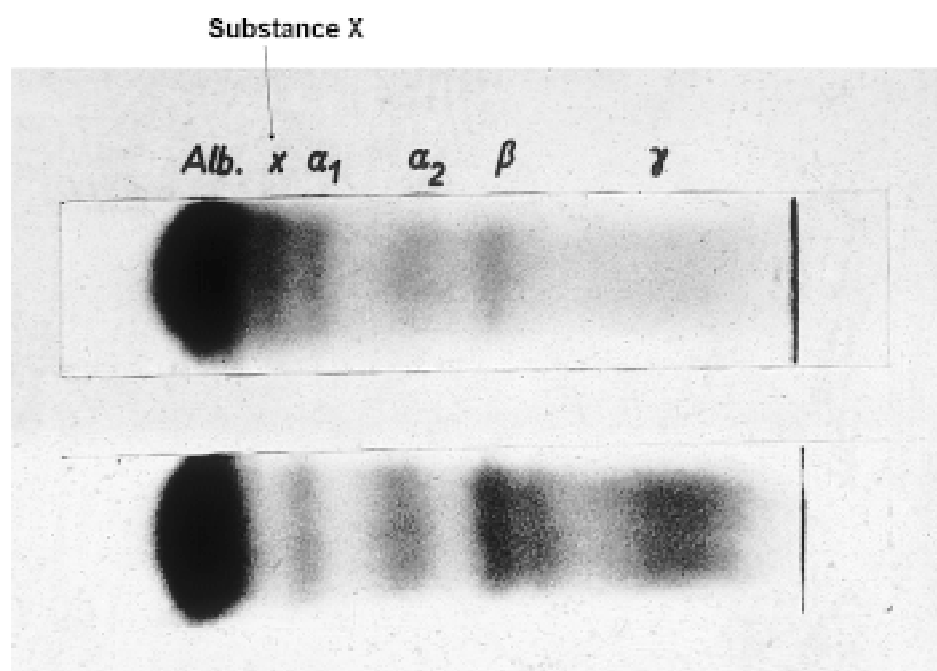
Myšlenka, že bílkoviny krevní plasmy v počátečním stádiu vývoje jedince jsou odlišné ve srovnání s pozdějším obdobím, a to jak po stránce kvantitativní tak kvalitativní, je staršího data. Průkaz existence specifického fetálního proteinu odvisel od technologických možností umožňujících jemnější frakcionaci plasmatických proteinů. Není proto divu, že první „skutečně“ specifický protein u telat (fētů) hovězího dobytka prokázal Pedersen v roce 1944 pomocí ultracentrifugační analýzy. Dal mu název *fetuin*. Později byl tento protein prokázán (citlivějšími metodami) též v séru dospělých zvířat. Ultracentrifugační analýza vyžadovala v tehdejší době mililitrová (ml) množství frakcionovaného materiálu, takže nebyla dostatečně citlivá pro mikrolitrová (μ l) množství fetálního séra mladých lidských plodů. To umožnila až technika elektroforézy na nosičích. V roce 1956 publikovali Bergstrand a Czar nálezy zvláštní frakce mezi albuminem a α_1 -globulinem na papírové elektroforéze v krevním séru lidských fētů, kterou nebylo možno prokázat touto technikou v krvi po narození; nazvali ji *substance X* (obr. 1).

Zavedení a rozvoj imunochemických metod zejména Grabarovy imuno elektroforézy založené na frakcionaci směsi proteinů elektroforézou v agarovém gelu a na detekci jednotlivých bílkovinných komponent v podobě precipitačních linií po aplikaci specifického antiséra namířené proti antigenním determinantám vyšetřované směsi proteinů, položily základ k širokému výzkumu též specifických embry-

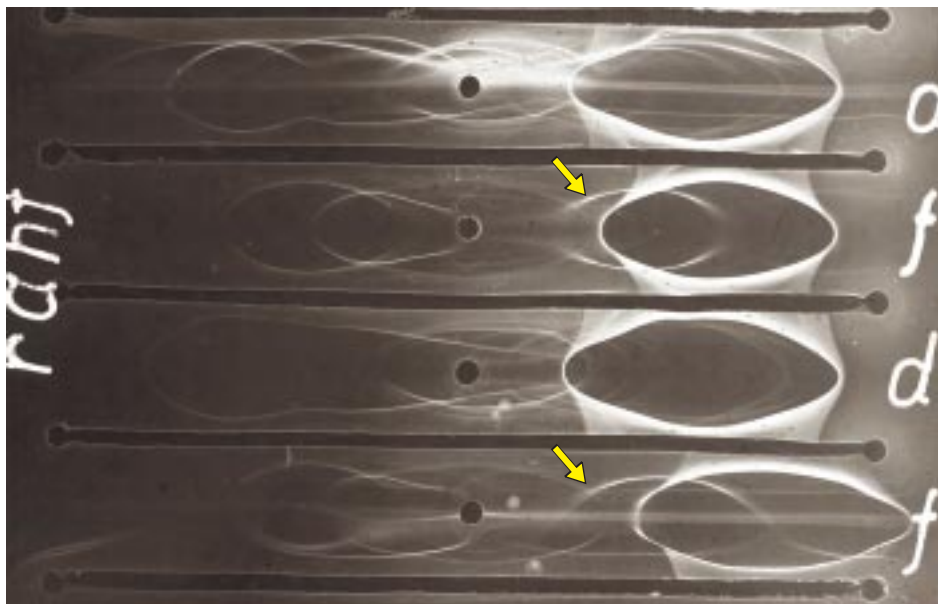
nálních a fetálních bílkovin. Výrazným podnětem k tomuto studiu byly především experimentální práce Abeleva, který prokázal, že „*embryospecifický α_1 -globulin*“ vyskytující se fyziologicky u myších embryí a který není prokazatelný v séru dospělých zdravých myší, se znovu objevuje u myší s *transplantovaným hepatocelulárním karcinomem*. O něco později byla syntéza tohoto proteinu nalezena též u experimentálního hepatomu laboratorních potkanů. Naše pracovní skupina už na počátku šedesátých let prokázala imuno elektroforetickou analýzou v agarovém gelu pomocí specifického králíčího antifetálního imunního séra (dospělí králíci imunizováni několika dávkami séra lidských fētů z legálních potrátů) v séru z pupěčnickové krve plodů po narození zvláštní precipitační linií v oblasti α -globulinů, která nebyla prokazatelná v séru jejich matek

a které jsme dali pracovní název *fetoprotein* (obr. 2).

Stejný protein obdobnou technikou prokázali u lidských fētů De Murali and Roulet; pojmenovali jej *α -foeto-proteine*. V bývalém Sovětském svazu Tatarinov referoval předběžně v roce 1964 o *embryospecifickém α -globulinu*, který podle něho nebyl totožný se *substancí X* Bergstranda a Czara. V průběhu 60. let a na samém začátku let sedmdesátých popisovalo více autorů tzv. *fetospecifické proteiny*, kterým dávali různé názvy jako *F-protein*, *Fetal Postalbumin*, *α_F -Globulin*, *Alpha₁-Fetoglobulin* nebo *ESA₁-globulin*, *ESB₂-glycoproteid*, *ESB₂-globulin*; také název *Fetuin* byl některými používán i pro lidský fetoprotein. Teprve Kithier jako první prokázal, že u hovězích fētů se vyskytuje další specifický α -globulin (odlišný od fetuinu), který je skutečnou ob-



Obr. 1: Papírová elektroforéza fetálního séra (*substance X* podle Bergstranda a Czara)

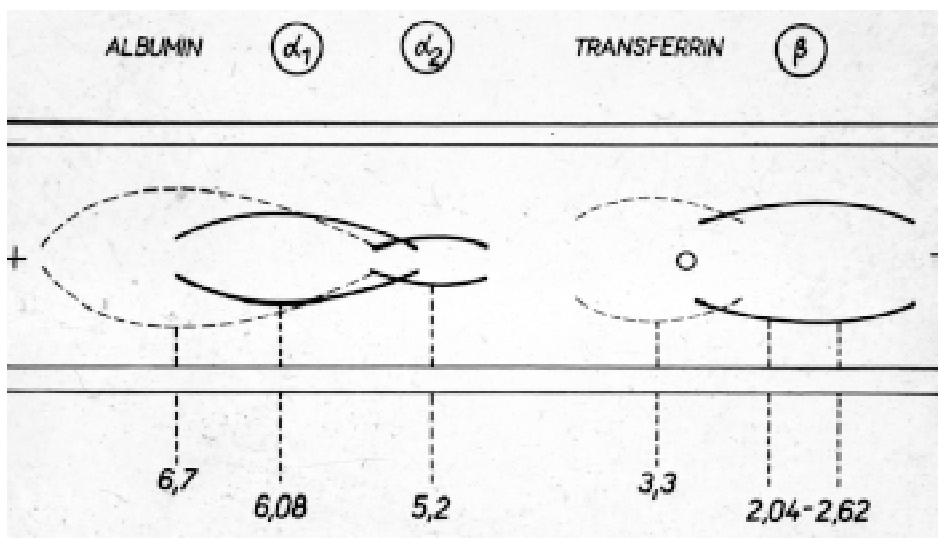


Obr. 2: Imunoelektroforéza séra lidského fétu se specifickou frakcí mezi albuminem a α₁-globulinem (fetoprotein)

dobou lidského fetoproteinu. Za použití elektroforetických technik byly nalézány další fetoproteiny (fétální bílkoviny) putující v oblasti α₂, β i γ-globulinů jako byl **α₂-fetoprotein = α₂-ferroprotein = α₂-H-globulin; β_S-fetoprotein nebo γ-fetoprotein = Basic Fetoprotein (obr. 3).**

rovým proteinem v embryonálním období, který po narození prakticky vymizí, ale který se objevuje znovu u dospělých jedinců s hepatomem.

Pro klinickou praxi bylo významné potvrzení, že AFP je diagnostickým markerem hepatocelulárního karcinomu též



Obr. 3: Další „fetoproteiny“ s elektroforetickou pohyblivostí α₂, β, γ (Uvedeny hodnoty relativní elektroforetické mobility)

Pořádek a jednotné označení α₁-fetoprotein pro typický fétální protein vyskytující se u řady živočišných druhů v embryonálním a fétálním období a jehož koncentrace po narození se výrazně snižuje, v tom udělala publikace Gitlina a Boesmana (1967). Později se vžil jednoduchý název - **alfa-fetoprotein** a nejčastěji užívaná zkratka **AFP**. Už v roce 1969 **WHO-IARC** definovala **AFP jako ontogeneticky první α-globulin, který je dominantním sé-**

v lidské patologii. První zprávou (v ruské odborné literatuře) bylo předběžné sdělení Tatarinova v r. 1964, který popisoval výskyt „*embryo-specifičeskovo alfa-adinoglobulina*“ u několika pacientů s hepatocelulárním karcinomem. Praktické využití fetoproteinu jako tumorového markeru pro diagnostiku nejen hepatocelulárního karcinomu ale též maligních embryonálních karcinomů prokázal Masopust a spolupracovníci. Tato počáteční sdělení byla

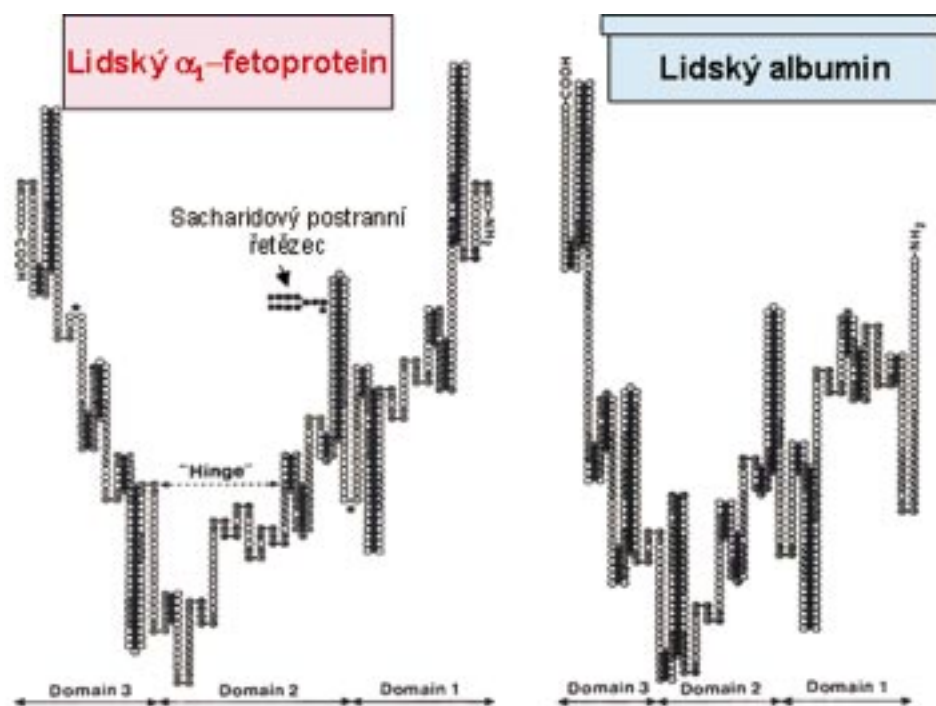
signálem k intenzivnímu studiu AFP na dalších pracovištích ve světě. O výzkum fyziologie a vývoje v ontogeneze a fylogeneze AFP se zasloužili pracovníci vedeni profesorem Gitlinem v USA, z dalších pak van Furth a Adinolfi, Seppälä a Ruoslahti. Nejvíce se však začalo rozvíjet studium patologie AFP (výskyt u nádorových onemocnění). Francouzská skupina z Kancerologického Institutu ve Villejuif publikovala první velký soubor pacientů s hepatocelulárním karcinomem. Vznikla rozsáhlá mezinárodní spolupráce a tři pracovní skupiny si vyměnily jak vzorky svých pacientů, tak testovací antiséra, aby si ověřily klinickou hodnotu diagnostického testu pro včasné rozpoznání hepatocelulárního karcinomu. Vyvrcholením bádání o AFP v té době bylo mezinárodní kolokvium „*Protides of Biological Fluids*“, na jehož 18. zasedání konaném v Brugách (Belgie) byl jeden z hlavních tematických okruhů právě AFP. Krátce nato bylo v USA (Oak Ridge, 1971) zahájeno první zasedání pracovní skupiny pojednávající o embryonálních a fétálních antigenech u rakoviny. V Japonsku (Sapporo) pak pod vedením prof. Hirai-e (Hokkaido University School of Medicine) byla založena mezinárodní výzkumná skupina pro studium a aplikaci onkofétálních proteinů, s pozdějším názvem „*The International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*“ (**ISOBM**), která pořádala a pořádá každoroční odborná setkání publikovaná v *Proceedings* (1973 - 1979; od r. 1980 vydává společnost vlastní odborný časopis (*Tumor Biology*)).

Od začátku sedmdesátých let značně stoupl počet publikací o fetoproteinu, objevily se i první souborné referáty. Výzkum fetoproteinu se rozvinul do několika směrů. V chemii AFP se podařilo získat první fyzikálně-chemické charakteristiky; dokonce byl izolován v krystalickém stavu. O citlivé a specifické stanovení (na bázi radioimunoeseje) se zasloužili kupř. Ruoslahti, E. et Seppälä, M; Purves L.R. et Purves, M., Chayvialle, J.A.P. et Ganguli, P.C. O použití enzym-imunoeseje referují Schuurs, A.H.W.M et Van Weemen, B.K. Rozpracování imunofluorescenční techniky upřesnulo lokalizaci fetoproteinu v různých tkáních. Experimentální práce na zvířatech objasnily vývoj AFP v játrech po navození nádorové proliferace.

2. Fyziologie AFP

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Alfa₁-fetoprotein je glykoprotein ve formě jednoduchého polypeptidového řetězce. Podle počátečních studií měl relativní molekulovou hmotnost (jako peptid) $M_r = 64\,600$, resp. $69\,000$ – $73\,000$ (jako glykoprotein), sedimentační konstantu $S_{20w} = 4,5$ S, isoelektrický bod $pI = 4,75$ a elektrickou pohyblivost v agarosovém gelu (barbital, pH 8,6) $-6,08 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; obsahoval 4,3 % sacharidů (hexosa-2,2 %, hexosamin - 1,2 a sialová kyselina - 0,9 %). Dle našich zkušeností částečně izolovaný AFP jevil značnou afinitu k hemoglobinu nebo k bilirubinu. V roztocích relativně snadno polymerizoval. Svými vlastnostmi vůči různým precipitačním činidlům se nejvíce podobal albuminu (obr. 4).



Obr. 4: Porovnání struktury lidského albuminu a fetoproteinu (podle Morinaga)

Fetoprotein spolu s albuminem jsou nejenom dva první plasmatické proteiny syntetizované v ontogeneze, ale též první dva proteiny, u nichž byla objasněna **primární struktura**. Oba proteiny jsou strukturálně velmi podobné. Předpokládá se, že jejich geny mají stejný ancestor (primordiální gen). Bylo zjištěno, že AFP vytváří polypeptidový řetězec z 590 aminokyselinových zbytků, o relativní molekulové hmotnosti $MW = 66\,300$ (jako glykoprotein se 4 % sacharidů má $MW = 69\,063$). Poskládání tohoto řetězce (sekundární struktura) vzniká pomocí 30 disulfidových

můstků (z celkových 32 cysteinových zbytků). Celá molekula je složena ze 3 odlišných domén (doména 1, 2, 3) vytvářejících konfiguraci v podobě písmene U (nebo V). Spojnici mezi doménami tvoří polypeptid, který má charakter „hinge segmentu“. Umožňuje doménám flexibilní pohyb a usnadňuje vazbu nebo uvolňování potenciálních ligandů.

Mikroheterogenita AFP

AFP se vyskytuje v *různých molekulových variantách* lišících se v glykosylaci prokazatelné vyšetřením afinity k různým lektinům (*sacharidové isoformy*), dále v isoelektrickém bodě (*isoformy pH-heterogenity*); tyto varianty se liší fyzikálně-chemickými vlastnostmi nikoliv ve složení aminokyselin polypeptidového řetězce. Kromě toho existují genetické varianty, odvozené

od transkriptů $mRNA_{AFP}$ s rozdílnou délkou kilobází (kupř. *transkripty 2,2, 1,7 a 1,6 kb*), dále *fetální a tumorové transkripty AFP, volné a vázané formy AFP* (tj. též intracelulární nesecernované formy).

Pomocí specifických monoklonálních protilátek bylo možno identifikovat v nativním AFP různé **antigenní epitopy**, byly klasifikovány a rozděleny do 6ti až 7mi epitopových kategorií. Další heterogenita spočívá v „mírné denuraci“ molekuly AFP navozené účinkem různého biologického prostředí, v kterém se molekula AFP nalézá. Tato alterace AFP předsavuje třetí

termodynamický stav proteinových molekul (označovaný jako **MGF = Molten Globule Form**), kdy vznikají různé transitorní formy AFP s rozdílnou konformační konfigurací (pozměněná terciární struktura) a s různým biologickým chováním.

AFP na rozdíl od albuminu je glykoprotein; obsahuje glykan navázaný na amino-skupinu v pozici asparaginu 232 v doměně 2 jeho molekuly. Sacharidové složení se však liší podle místa syntézy (původu). Glykan v AFP z hepatocelulárního karcinomu se liší od AFP z nádorů žloutkového váčku. Je to možno prokázat na základě afinity k určitým aglutininům a lektinům. Smith a Kelleher a také Ruoslahti a Adamson rozlišili pomocí afinitní chromatografie na gelu Sepharosy s konkanavalinem A (con A affinity column chromatography) 3 frakce lidského AFP: (1) nevázející AFP (non-bound conA), (2) slabě vázející (loosly-bound) a (3) silně vázející (tightly bound) a prokázali tak rozdíl mezi AFP normálních plodů a AFP pacientů s nádory žloutkového váčku, pak ještě našli rozdíl v afinitě k aglutininu z *Lens culinaris* (LCA). Tato mikroheterogenita AFP navozená různou glykosylací při tvorbě postranního řetězce byla použita i pro diferenciální diagnostiku. V současné době se stanovení *lektin-positivní afinity „jaterní“ formy AFP* označované jako **AFP-L3** užívá k odlišení pacientů s hepatocelulárním karcinomem od nemaligních hepatopatií. Dokonce techniku, která umožňuje toto vyšetření (*lectin-antibody enzyme immunoassay*) se podařilo automatizovat pomocí „paramagnetic bead handling robot“. Kombinovanou technikou tj. dvourozměrnou isoelektrickou fokusací (2D-IEF) a „erythroagglutinating phytohemagglutinin affinity electrophoresis“ (E-PHA) je možné získat ještě jemnější diferenciaci různých glykoform AFP, jejichž frekvence se liší mezi pacienty s cirhózou a HCC. Pro hepatocelulární karcinom je charakteristická isoforma **AFP-L3 a AFP-P4** (tab. 1).

* *Isoformy o různém elektrickém náboji (IpH heterogenita)*

Pomocí isoelektrické fokusace je možné vyčlenit 2 isoformy s isoelektrickým bodem pH 4,8 a 5,2; isoformu 4,8 je možno změnit na isoformu 5,2 odštěpením koncové sialové kyseliny působením neuraminidasy. Rovněž vazba mastných kyselin mů-

Pupečníkové serum Jaterní typ	AFP-C2, -L1, -P3, -A3, R1
Typ hepatocelulárního karcinomu	AFP-C2, -L3, -P4, -A3, -R2
Typ gastrointestinálního tumoru	AFP-C1/C2, L2-3, -P4/5, -A1
Typ nádoru žloutkového váčku	AFP-C1, -L2, -P5, -A1s, -R3

C: concanavalin A (C1,2); **L:** Lens culinaris agglutinin or lentil-lectin (L1,2,3)

P: erythroagglutinating phytoagglutinin (P1 - 5); **A:** ricinus communis agglutinin (A1,1s,2,2s,3); **R:** Ricinus communis lectin (R1f,1,2,3)

Tab. 1: Výskyt různých glykoform AFP u různých klinických stavů (Taketa, K., 1998)

že ovlivnit pohyblivost různých forem AFP.

* *Antigenní epitopy*

Pomocí sady (30) různých monoklonálních protilátek (reagujících na různé antigenní determinanty molekul AFP) lze prokázat až 6 velkých epitopových klastrů (A - F), které vykazují ve vzájemné reaktivitě (cross-reactivity) jednak plnou shodu, jednak částečnou shodu nebo i non-identitu. Kromě toho v nativní molekule AFP bylo možno prokázat 2 formy epitopů: *otevřenou* a *skrytou*. Skryté formy bylo možno odhalit až po mírné denaturaci nativního AFP, která byla provázena změnou v konformaci molekuly. Tyto skryté epitopy AFP vykazují specifickou biologickou aktivitu; navozují kupř. spontánní imunitní odpověď u pacientů s hepatomou, cirhózou nebo chronickou hepatitidou.

Yazova a spolupracovníci pomocí imunoafinitní elektrochromatografie hAFP na nitrocelulózové membráně rozlišili dva konformačně dependentní epitopy označené jako *cdeD* a *cde106*. Pomocí monoklonálních protilátek proti oběma epitopům za použití ELISA našli rozdíl v zastoupení *cde*-pozitivních a *cde*-negativních vzorků hAFP z různého biologického materiálu: V amniové tekutině byl obsah hAFP *cde*-pozitivní vyšší než v pupečníkové krvi nebo v sérech pacientů s AFP-pozitivními tumory.

* *Varianty způsobené změnou v konformaci molekuly AFP*

Umístění proteinů v různých kompartmentech živých buněk (vazba na různé buněč-

né struktury) navozuje určité konformační změny v porovnání s volnými molekulami secernovanými mimo buňku. Znamená to, že vysoce variabilní prostředí různých intracelulárních kompartmentů způsobuje, že proteiny existují „v mírně denaturovaném“ (nesbaleném = unfolded) stavu, kterému se říká (**Molten Globule Form = MGF**). Tyto vytvořené formy AFP se podílejí na různých fyziologických aktivitách jako je translokace proteinů, inzerce do buněčných membrán, vazba na „heat shock“ proteiny a chaperony nebo na proteiny degradované lysosomy a ubikvitin-proteasomovým mechanismem.

Rovněž vysoká koncentrace hydrofobních ligand (kupř. vícenenasycené mastné kyseliny, estrogeny) na AFP navozuje ireverzibilní změny v konformaci terciární struktury proteinové molekuly a tím i změnu jeho biologických aktivit.

* *AFP fragmenty*

Plasmatické proteiny jako albumin nebo fetoprotein mohou být také jakýmsi cirkulujícím proteinovým reservoírem biologicky aktivních peptidových fragmentů vzniklých proteolýzou *in situ*. Příkladem je forma pre-proproteinů, což bývá prekurzor aktivní peptidové molekuly řady peptidových působků. Bylo prokázáno, že v AFP jsou určité peptidové fragmenty s aminokyselinovou sekvencí, které i samy o sobě vykazují biologickou aktivitu (kupř. apoptozový nebo cytotoxický účinek). Tak byl syntetizován peptid domény 1 se sekvencí **LDSYQC**, který ovlivňuje vychytávání glukosy červenými krvinkami. Peptidová sekvence **LDSYQCT** v koncentraci

10^{-7} až 10^{-8} M má antiproliferační účinek. Klonování AFP genu a odvozené proteiny se staly základem pro přípravu rekombinantních krátkých peptidových fragmentů s různou biologickou aktivitou; takto byly připraveny peptidy s možným využitím v protinádorové terapii. Patří mezi ně 34-merní segment, **růstově inhibiční peptid (Growth inhibitory peptide = GIP)**, o molekulové hmotnosti 3573 Da, označovaný jako **P149**, který má značný (v koncentraci 10^{-12} - 10^{-10} M) růstově potlačující účinek jak na fétální, tak na rakovinné buňky, nikoliv na buňky zdravých dospělých jedinců. I když mechanismus tohoto účinku nebyl dosud kompletně vyjasněn, některé experimenty ukazují, že GIP může ovlivnit řadu buněčných funkcí, jako je endocytóza, buněčná agregace, hemaglutinace nebo tvar buňky (na podkladě změn cytoskeletonu) a dále že GIP odvozený od kompletního AFP představuje růstově inhibiční motiv, který ovlivňuje nádorovou proliferaci, progresi a tvorbu metastáz. Má účinek cytostatický (nikoliv cytotoxický), což ho řadí do pozice potenciálního protinádorového bioterapeutika (vakcína pro profylaxi i terapii). *Genová terapie* za použití retrovirálního vektoru nesoucího zabíječský gen **HSVtk** (*herpes simplex virus thymidine kinase gene*), který je regulovaný aktivitou varianty 0,3 kb lidského AFP-promotoru (LNAFW0, 3TK), byla vypracována k navození cytotoxické reakce nádorových buněk HCC produkujících AFP.

(pokračování)