

## Πρωτεωμική: Το αύριο της Βιοδιαγνωστικής

---

**Θεόδωρος Σωτηρούδης**

*Διευθυντής Ερευνών, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών  
και Βιοτεχνολογίας (IBEB), Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών*

### Περίληψη

Η πρωτεωμική (proteomics) αποτελεί το ερευνητικό πεδίο το οποίο ασχολείται με την ανάλυση σε μεγάλη κλίμακα του πρωτεώματος, δηλαδή των πρωτεϊνών οι οποίες παράγονται από το γονιδίωμα ενός οργανισμού. Η πρωτεωμική χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό περίπλοκων και εξειδικευμένων τεχνικών, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, η φασματομετρία μάζας και η βιο-πληροφορική, με σκοπό το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών. Η εφαρμογή της πρωτεωμικής προσφέρει τεράστιες δυνατότητες για την κατανόηση των ασθενειών και την ταυτοποίηση διαγνωστικών δεικτών και θεραπευτικών στόχων. Η παρούσα ανασκόπηση έχει ως σκοπό να παρουσιάσει τις βασικές αρχές της πρωτεωμικής, να περιγράψει σε γενικές γραμμές τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται, και να κάνει αναφορά σε συγκεκριμένες εφαρμογές της πρωτεωμικής στη μελέτη ασθενειών και στην κλινική διάγνωση. Γίνεται τέλος συζήτηση και για τη μελλοντική ανάπτυξη του πεδίου.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόσφατα ανακοινώθηκε ένα κοσμοϊστορικό γεγονός, μοναδικό στην ιστορία της επιστήμης, αυτό της αποκρυπτογράφησης και του καθορισμού της αλληλουχίας (σχεδόν πλήρους) των γραμμάτων του κώδικα του ανθρώπινου γονιδιώματος. Όπως θα δούμε παρακάτω, ο κώδικας αυτός αποτελείται από τα γράμματα A,T,C και G (συμβολι-

σμοί βασικών χημικών οντοτήτων), τα οποία επαναλαμβάνονται ξανά και ξανά με διαφορετική σειρά και σε αριθμό τέτοιο που είναι ικανός να γεμίσει 200 τηλεφωνικούς καταλόγους (~3.2 τρισεκατομμύρια γράμματα)! Το πλέον συνταρακτικό όμως πρώτο συμπέρασμα αυτού του επιτεύγματος είναι η εκτίμηση ότι ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν την έκφραση πρωτεϊνών δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 31.000, τη στιγμή που η μύγα έχει 13.000, το σκουλήκι 18.000 και ένα φυτό 26.000 περίπου γονίδια. Γεννιούνται δηλαδή τα μεγάλα ερωτήματα: Τι διαφοροποιεί ένα οργανισμό από έναν άλλο; Τι είναι αυτό το οποίο είναι υπεύθυνο για την τεράστια πολυπλοκότητα του ανθρώπου, τη μεγαλύτερη που υπάρχει στους βιολογικούς οργανισμούς; Τι είναι αυτό που προσφέρει στον άνθρωπο το αξιόπεραστο ρεπερτόριο της συμπεριφοράς του, της ικανότητάς του να μαθαίνει, να θυμάται, και κυρίως να παράγει ενσυνείδητες ενέργειες; Τα ερωτήματα αυτά είναι δυνατόν να απαντηθούν με βάση το γονιδίωμα αλλά κυρίως με βάση το γεγονός ότι η μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ του ανθρώπου και των άλλων οργανισμών εδράζεται στην τεράστια πολυπλοκότητα των πρωτεϊνών του. Είναι δηλαδή οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια τα μόρια εκείνα τα οποία είναι τελικά υπεύθυνα για όλες τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα μέσα σ' ένα κύτταρο. Ενώ όμως το σύνολο των γονιδίων του ανθρώπου είναι περίπου 31.000, ο αριθμός των πρωτεϊνών που μπορεί να εκφρασθεί από τα γονίδια αυτά (οι υπεύθυνοι μηχανισμοί θα αναπτυχθούν παρακάτω), ξεπερνά σε μεγάλο βαθμό τον αριθμό των γονιδίων (μπορεί να πλησιάζει και τα 5 εκατομμύρια!). Για τους λόγους αυτούς αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια η πρωτεωμική, ένας νέος επιστημονικός κλάδος ο οποίος διαχωρίζει και χαρακτηρίζει τις πρωτεΐνες του κυττάρου σε μεγάλη κλίμακα. Έτσι, η πρωτεωμική μπορεί να προσδιορίσει τις πρωτεΐνες εκείνες που συνδέονται με μία ασθένεια. Αυτό είναι δυνατόν να επιτευχθεί αφού καθορισθούν οι μεταβολές των επιπέδων των πρωτεϊνών που εκφράζονται σ' ένα κύτταρο μεταξύ της φυσιολογικής και της νοσογόνου κατάστασής του. Οι σχετικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι αρκετά αποτελεσματικές και αξιόπιστες έτσι ώστε να λαμβάνονται πληροφο-

ρίες σχετικά με την έκφραση πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες ασθένειες. Ειδικότερα, η πρωτεωμική προσφέρει στον παθολόγο τη δυνατότητα ανίχνευσης πρωτεϊνικών δεικτών που συνδέονται με κάποια ασθένεια. Με τον τρόπο αυτό υποβοηθείται η διάγνωση ή η πρόγνωση της ασθένειας ενώ παράλληλα είναι δυνατόν να επιλεγούν πρωτεΐνες-στόχοι κατάλληλοι για φαρμακοθεραπεία.

Ο σκοπός της ανασκόπησης αυτής είναι η γενική περιγραφή των τεχνικών της πρωτεωμικής καθώς και η συζήτηση των εφαρμογών της πρωτεωμικής στη μελέτη ασθενειών και στην κλινική διάγνωση.

## **ΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ**

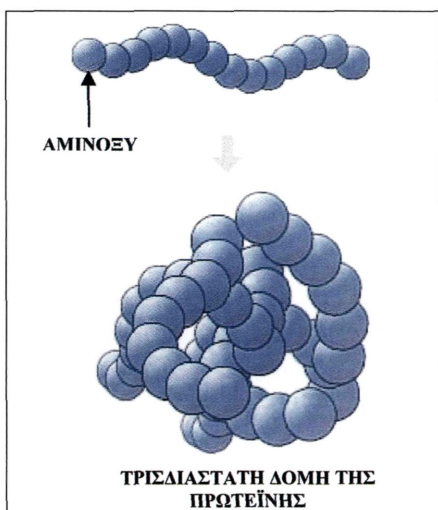
Σύμφωνα μ' έναν ορισμό της ασθένειας, ασθένεια είναι η μεταβολή της κατάστασης του σώματος ή των οργάνων του η οποία διακόπτει ή διαταράσσει την εκτέλεση ζωτικών λειτουργιών. Η μικρότερη ζωντανή λειτουργική μονάδα του σώματος είναι το κύτταρο. Σύνολα κυττάρων με ίδια λειτουργία και ομοιότητα στην κατασκευή αποτελούν τον ιστό. Άθροισμα ιστών σχηματίζει τα διάφορα όργανα, ενώ διάφορα όργανα που συνδέονται μεταξύ τους και έχουν την ίδια ή παρόμοια λειτουργία αποτελούν τα συστήματα. Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω σε μια ασθένεια θα έχουμε διακοπή ή διαταραχή της λειτουργίας συνόλων κυττάρων του σώματος σ' έναν ή περισσότερους ιστούς ή όργανα. Διακοπή ή διαταραχή της λειτουργίας ενός κυττάρου συμβαίνει όταν μία ή περισσότερες από τις εξειδικευμένες λειτουργίες του διακοπούν ή διαταραχθούν. Κάθε κύτταρο διαφέρει σε μέγεθος και μορφή ανάλογα με το είδος του οργανισμού και με το όργανο στο οποίο ανήκει. Ένα ευκαρυωτικό κύτταρο (στην κατηγορία αυτή ανήκουν μεταξύ άλλων και τα ζωικά κύτταρα και το χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ότι το γενετικό υλικό τους -DNA- περιέχεται στον πυρήνα) περιέχει ένα μεγάλο αριθμό εξειδικευμένων μοριακών συγκροτημάτων και οργανιδίων τα οποία περιβάλλονται από μεμβράνη (ολόκληρο το κύτταρο επίσης περιβάλλεται από κυτταρική μεμβράνη) οργανωμένα και εξειδικευμένα με

τρόπο που να φέρουν σε πέρας μία ορισμένη κυτταρική διεργασία (πυρήνας, μιτοχόνδρια, λυσοσώματα, συσκευή Golgi, αδρό και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, ριβοσώματα, κυτταροσκελετός κ.λπ.). Τα κύρια δομικά και λειτουργικά συστατικά των παραπάνω κυτταρικών συγκροτημάτων και οργανιδίων αποτελούν τα βιολογικά μεγαλομόρια (μεγάλου Μοριακού Βάρους) που ονομάζονται πρωτεΐνες. Είναι λοιπόν κατανοητό ότι διακοπή ή διαταραχή της λειτουργίας ενός κυττάρου θα συμβαίνει τις περισσότερες φορές όταν μία ή περισσότερες από τις πρωτεΐνες του παρουσιάσουν κάποια ποιοτική ή ποσοτική διαταραχή.

## ΑΠΟ ΤΟ DNA ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Κάθε μέρος του ανθρώπινου σώματος “κτίζεται” κατά κύριο λόγο από πρωτεΐνες. Από το μεγαλύτερο μυ ως τη μικρότερη ορμόνη και από τη νευρική ίνα ως τους κυτταρικούς υποδοχείς, οι πρωτεΐνες αποτελούν τα βασικά τους δομικά και λειτουργικά (ένζυμα) μοριακά

συστατικά. Οι πρωτεΐνες αποτελούν περίπου το 80% του ξηρού βάρους του μυός (το βάρος όλων των συστατικών του χωρίς το νερό), το 70% του ξηρού βάρους του δέρματος και το 90% του ξηρού βάρους του αίματος. Όλες οι πρωτεΐνες αποτελούνται από μικρά οργανικά μόρια, τα αμινοξέα, τα οποία συνδέονται με χημικούς δεσμούς, το ένα δίπλα στο άλλο όπως οι χάντρες σ’ ένα κομπολόι. Είκοσι διαφορετικά αμινοξέα μπορούν να συμμετέχουν στη δημιουργία μιας πρωτεϊνικής αλυσίδας, η οποία μπορεί να αποτελείται από μερικές δεκάδες

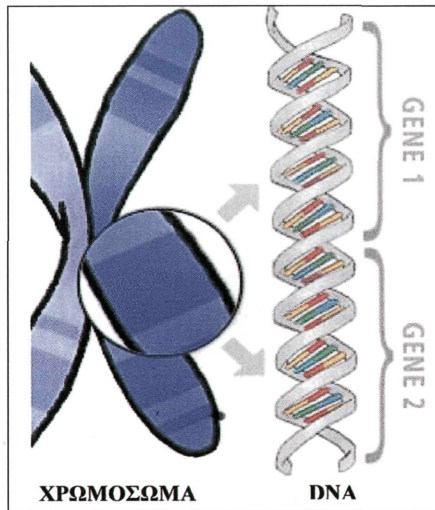


**Σχήμα 1**

Η πρωτεϊνική αλυσίδα αποτελείται από αμινοξέα και έχει συγκεκριμένη διαμόρφωση στο χώρο. (Από: [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)).

μέχρι και περισσότερα από εκατομμύριο αμινοξέα. Η δομή και λειτουργία κάθε πρωτεΐνης καθορίζεται από τη σειρά των αμινοξέων στην πρωτεϊνική αλυσίδα, η οποία με τη σειρά της καθορίζει τη διάταξη που θα λάβει η αλυσίδα αυτή στο χώρο (Σχήμα 1). Κάθε πρωτεΐνη έχει τη δική της μοναδική αλληλουχία αμινοξέων, η οποία και καθορίζεται από τα γονίδια των κυττάρων, συγκεκριμένο μοριακό μέγεθος και καθορισμένο ηλεκτρικό φορτίο. Οποιοσδήποτε παράγοντας, φυσικός ή χημικός, επηρεάζει το μέγεθος, το φορτίο ή τη στερεοδιαμόρφωση της πρωτεϊνικής αλυσίδας, μπορεί να επηρεάσει άμεσα και τη βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής.

Όλοι οι ζώντες οργανισμοί περιέχουν γονίδια. Τα γονίδια κληρονομούνται από τους γονείς και περιλαμβάνουν όλη τη βιολογική πληροφορία για τη δημιουργία ενός ανθρώπινου όντος. Τα γονίδια είναι τοποθετημένα το ένα μετά το άλλο σε μακρές αλυσίδες μεγάλων μορίων του γενετικού υλικού που καλούνται χρωμοσώματα (Σχήμα 2). Τα χρωμοσώματα έχουν την έδρα τους στον πυρήνα του κυττάρου. Κάθε άνθρωπος έχει 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων γιατί έχει παραλάβει ένα σύνολο από κάθε γονέα. Τα 46 χρωμοσώματα των κυττάρων μας αποτελούνται



**Σχήμα 2**

Τα γονίδια (*GENES*) βρίσκονται στα χρωμοσώματα και αποτελούνται από DNA. (Από: [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)).

από τον τύπο εκείνο βιολογικών μακρομορίων που λέγεται δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ ή DNA. Η δομή του DNA είναι εξαιρετικά απλή. Αποτελείται από δύο μακρές αλυσίδες, οι οποίες τυλίγονται η μία στην άλλη με τη μορφή διπλής έλικας. Τέσσερα απλά οργανικά μόρια (καλούνται βάσεις και συμβολίζονται με τα γράμματα A,T,G και C) αποτελούν τους κρίκους της κάθε αλυσίδας του DNA. Βασική ιδιότητα

της δομής του DNA αποτελεί το ζευγάρι των βάσεων A και G κάθε αλυσίδας με τις βάσεις T και C αντίστοιχα της άλλης αλυσίδας της διπλής έλικας, μια ιδιότητα που επιτρέπει τον αναδιπλασιασμό της γενετικής πληροφορίας κατά τη διαδικασία της μεταβίβασης του γενετικού υλικού από τη μία γενιά στην επόμενη (αντιγραφή του DNA).

Μία καθορισμένη αλληλουχία βάσεων στην αλυσίδα του DNA αποτελεί ένα γονίδιο και έχει ως σκοπό να κωδικοποιεί την πληροφορία για τη δημιουργία κάποιας (ή κάποιων) πρωτεϊνών. Δεν κωδικοποιεί όμως όλο το DNA των κυττάρων του σώματός μας γονιδιακή πληροφορία. Υπολογίζεται ότι περίπου μόνο το 1,1%-1,4% της συνολικής αλληλουχίας βάσεων του DNA κωδικοποιεί την πληροφορία για σχηματισμό πρωτεϊνών. Το DNA όμως δεν μεταβιβάζει την πληροφορία του απ' ευθείας στην πρωτεΐνη. Χρησιμοποιεί ως ενδιάμεσο ένα παρόμοιο με αυτό (το DNA) μεγαλομόριο που ονομάζεται αγγελιοφόρο RNA ή mRNA. Είναι δηλαδή και αυτό το μεγαλομόριο μία αλυσίδα που φτιάχνεται από τα "γράμματα" A,G,C και U αντί T. Η διαδικασία της μεταφοράς της πληροφορίας από το γονίδιο DNA στο mRNA λέγεται μεταγραφή. Με τη διαδικασία της μεταγραφής το μόριο του RNA που δημιουργείται είναι το είδωλο της αλληλουχίας των βάσεων της μίας αλυσίδας DNA, δηλαδή ένα εκμαγείο της αλληλουχίας του συγκεκριμένου γονιδίου. Όταν το εκμαγείο αυτό του mRNA είναι έτοιμο, συνδέεται με ορισμένες μεγαλομοριακές δομές του κυττάρου, τα ριβοσώματα, όπου και γίνεται η "ανάγνωση" του κώδικα των βάσεων για να επιτελεσθεί η διαδικασία της μετάφρασης, κατά την οποία η πληροφορία του mRNA μεταφράζεται σε μία αλυσίδα αμινοξέων, δηλαδή "γεννιέται" μία πρωτεΐνη. Ο κώδικας των βάσεων καθορίζει ότι ο συνδυασμός τριών βάσεων εν σειρά κωδικοποιεί ένα αμινοξύ. Επειδή υπάρχουν 64 δυνατοί συνδυασμοί των τεσσάρων γραμμάτων ανά τρία εν σειρά και μόνο 20 διαφορετικά αμινοξέα, ορισμένοι συνδυασμοί βάσεων κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ, ενώ άλλοι συνδυασμοί κωδικοποιούν το τέλος της μετάφρασης. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονίσουμε ότι κατά τη μεταγραφή του γονιδίου σε mRNA στο μόριο του RNA που προκύπτει (πρό-

δρομο mRNA) μόνο ορισμένα τμήματά του περιέχουν πληροφορία για τη δημιουργία πρωτεΐνης και ονομάζονται εξόνια. Τα τμήματα μεταξύ των εξονίων λέγονται ιντρόνια, δεν κωδικοποιούν πληροφορία για έκφραση πρωτεΐνης, και απομακρύνονται από το πρόδρομο RNA με τη διαδικασία του ματίσματος. Κατά τη διαδικασία αυτή μπορεί να απομακρυνθούν και εξόνια. Στη τελευταία περίπτωση, από το ποια εξόνια θα παραμείνουν θα εξαρτηθεί πόσες και ποιες πρωτεΐνες θα δημιουργηθούν από ένα αρχικό γονίδιο. Η διαδικασία αυτή λέγεται εναλλακτικό μάτισμα και δίνει τη δυνατότητα σ' ένα κύτταρο από ένα γονίδιο του να δημιουργήσει κατά περίπτωση μία πληθώρα πρωτεϊνών. Μετά την μετάφραση, η πρωτεΐνη που δημιουργείται μπορεί να αλλάξει χημικά και να μετατραπεί σε ένα μόριο με διαφορετικές δομικές και καταλυτικές ιδιότητες από το αρχικό με διαδικασίες που ονομάζονται μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν την καταλυτική διάσπαση της αρχικής πρωτεΐνης σε μικρότερα κομμάτια (πεπτίδια) ή την προσθήκη στην αρχική πρωτεΐνη διαφόρων χημικών ομάδων (π.χ. σάκχαρα, φωσφορικές ομάδες κ.λπ.). Ως συνέπεια των παραπάνω διαδικασιών από την πληροφορία ενός και μόνο γονιδίου είναι δυνατόν να δημιουργηθούν μέχρι και 50 διαφορετικά πρωτεϊνικά είδη. Έτσι, γίνεται κατανοητό το γιατί πολύ συχνά η γενετική πληροφορία δε μας δίνει τα στοιχεία εκείνα τα οποία είναι απαραίτητα για να ξέρουμε ποιες και πόσες πρωτεΐνες παράγονται κάθε στιγμή σ' ένα κύτταρο και ποια είναι η δομή και η λειτουργία τους.

## ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ

Ο όρος πρωτέωμα εμφανίστηκε το 1994 ως γλωσσικό ανάλογο του γονιδιώματος και χρησιμοποιείται για να περιγράψει το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζεται και τροποποιείται από το γονιδίωμα ενός κυττάρου καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του. Χρησιμοποιείται επίσης με μια στενότερη σημασία για να περιγράψει το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζεται από ένα κύτταρο σε κάθε χρονική στιγμή. Η πρωτεωμική αποτελεί σήμερα ένα νέο επιστημονικό κλάδο, στα πλαίσια της

ιατρικής διάγνωσης, ο οποίος ασχολείται με την ανίχνευση και ανάλυση πρωτεϊνών οι οποίες συνδέονται με κάποια ασθένεια. Αυτό γίνεται δυνατό με την ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών κυττάρων ή ιστών σε μεγάλη κλίμακα και τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών μεταξύ φυσιολογικής κατάστασης και της κατάστασης της συγκεκριμένης ασθένειας. Η πρωτεωμική επιτρέπει να γίνει συσχέτιση του είδους και του επιπέδου κάθε πρωτεΐνης που παράγεται από ένα κύτταρο ή ιστό και της έναρξης ή της εξέλιξης μιας νόσου. Η έρευνα στην πρωτεωμική επιτρέπει την ανακάλυψη νέων πρωτεϊνικών δεικτών για διαγνωστικούς σκοπούς καθώς και πρωτεϊνών οι οποίες θα αποτελέσουν στόχο για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Η πληροφορία η οποία παρέχεται από την πρωτεωμική είναι συμπληρωματική αυτής που δημιουργείται από τη μελέτη του γονιδιώματος και συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη του κλάδου των Βιοεπιστημών που σήμερα ονομάζουμε “λειτουργική γενωμική” (functional genomics). Με τον όρο αυτό εννοούμε τον καθορισμό της λειτουργίας κάθε γονιδίου καθώς και τη μελέτη της οργάνωσης και του ελέγχου όλων των γενετικών δρόμων οι οποίοι στο σύνολό τους αποτελούν τη φυσιολογία ενός οργανισμού. Είναι συνεπώς κατανοητό ότι ο συνδυασμός πρωτεωμικής και γενωμικής θα παίξει στο μέλλον κυρίαρχο ρόλο στη βιοϊατρική έρευνα και θα έχει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη διαγνωστικών και θεραπευτικών μεθόδων.

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗΣ

Τα βασικά στάδια των μεθόδων που χρησιμοποιούνται σήμερα στην πρωτεωμική για την ανάλυση των πρωτεϊνών σε κύτταρα ή ιστούς ασθενών είναι:

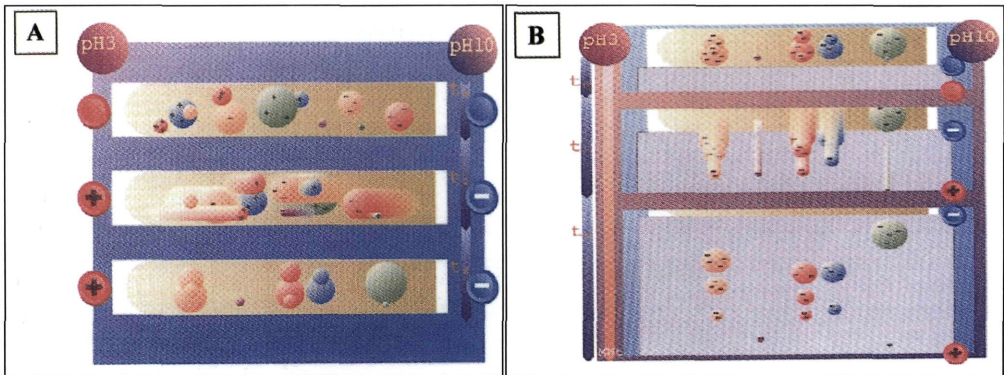
(1) Συλλογή δειγμάτων, (2) διαχωρισμός των πρωτεϊνών, (3) ταυτοποίηση των πρωτεϊνών και (4) ανάλυση των δεδομένων με τη βοήθεια της πληροφορικής.

1. Μεγάλη σημασία για την πρωτεωμική έρευνα αποτελεί η συλλογή



δειγμάτων από κύτταρα, ιστούς και σωματικά υγρά και η ανάπτυξη τράπεζας κλινικών δειγμάτων για την έρευνα ασθενειών όπως ο καρκίνος, καρδιοαγγειακές παθήσεις, νευρολογικές ασθένειες, διαβήτη κ.λπ. Ήδη μεγάλες εταιρείες που ειδικεύονται στην πρωτεωμική αναπτύσσουν παρόμοιες τράπεζες με κλινικά δείγματα που συνοδεύονται από λεπτομερές ιατρικό ιστορικό που θα επιτρέψει τη συσχέτιση των μεταβολών στο πρωτέωμα με την παθολογία της ασθένειας.

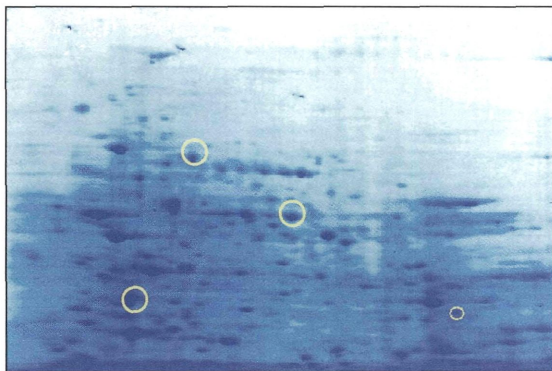
2. Η καλύτερη μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών για αναλυτικούς σκοπούς είναι αυτή της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων. Στη μέθοδο αυτή ένα μικρό δείγμα που περιέχει τις πρωτεΐνες από κύτταρα ή ιστούς (εκχύλισμα με κάποιο διαλύτη) τοποθετείται σε μία στενή ταινία από πολυμερές υλικό η οποία έχει επάνω της μία βαθμίδωση οξύτητας (pH). Όταν στην ταινία αυτή εφαρμοσθεί ηλεκτρικό πεδίο κάθε πρωτεΐνη του δείγματος προχωράει σαν μία σφαιρίδα και “εστιάζεται” στο σημείο εκείνο ακριβώς της ταινίας στο οποίο η πρωτεΐνη γίνεται ηλεκτρικά ουδέτερη. Το pH της ταινίας στο σημείο αυτό λέγεται ισοηλεκτρικό pH και συμβολίζεται ως pI (ηλεκτροφόρηση στην



**Σχήμα 3**

Σχηματικό διάγραμμα ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων. (Α) Διαχωρισμός πρωτεϊνών (παρίστανται με φορτισμένες μικρές σφαίρες διαφόρων μεγεθών) σύμφωνα με το φορτίο τους (πρώτη διάσταση, ισοηλεκτρική εστίαση). (Β) Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (δεύτερη διάσταση) σύμφωνα με το μέγεθος τους.  $t_0, t_1, t_2$ : Θέσεις των πρωτεϊνών σε διαφορετικούς χρόνους ηλεκτροφόρησης.

(Από: Amersham Pharmacia Biotech : One of the single most powerful techniques for protein analysis, 18-1124-82.)



**Σχήμα 4**

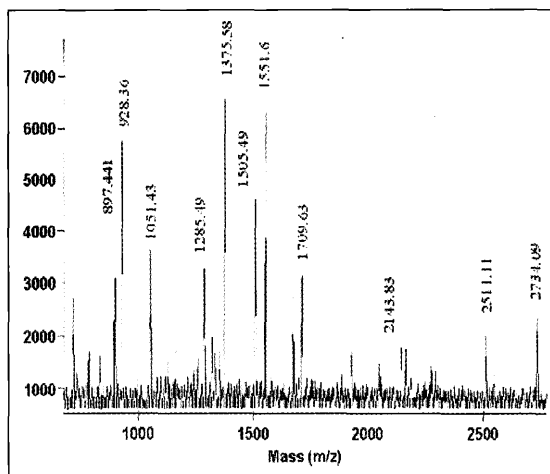
*Παράδειγμα χάρτη πρωτεϊνών ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων. Με κύκλους τονίζονται οι πρωτεΐνες που πρόκειται να παραλειφθούν για περαιτέρω ανάλυση.*

πρώτη διάσταση). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται ισοηλεκτρική εστίαση. Στη συνέχεια η ταινία τοποθετείται κατά μήκος της μίας πλευράς μίας επίπεδης οργανικής πηκτής (πηκτική πολυακρυλαμίδου) στην οποία και εφαρμόζεται εκ νέου ηλεκτρικό πεδίο (ηλεκτροφόρηση στη δεύτε-

ρη διάσταση). Καθώς οι πρωτεΐνες μετακινούνται μέσα από την πηκτική διαχωρίζονται σύμφωνα με τη μοριακή τους μάζα. Όσο μικρότερη είναι η μάζα της πρωτεΐνης τόσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα μετακίνησής της (Σχήμα 3). Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν στην πλάκα της πηκτής βάζονται τελικά με ορισμένες χρωστικές και με τον τρόπο αυτό οι κηλίδες που εμφανίζονται επάνω στην πλάκα αντιπροσωπεύουν τις διάφορες πρωτεΐνες του δείγματος (χάρτης πρωτεϊνών) (Σχήμα 4). Οι κηλίδες αυτές μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με φασματοσκοπικές τεχνικές (καταγράφεται δηλαδή η θέση και η ένταση του χρώματος κάθε κηλίδας στην πλάκα με τη βοήθεια οργάνων και λογισμικού ανάλυσης εικόνας). Επειδή ακόμα και οι καλύτερες πηκτές δύο διαστάσεων δεν μπορούν να διαχωρίσουν πάνω από 1000 πρωτεΐνες, γίνεται κατανοητό ότι μετά την ηλεκτροφόρηση θα εμφανίζονται στην πηκτική οι πρωτεΐνες που θα βρίσκονται στο δείγμα σε μεγαλύτερη ποσότητα. Επιπλέον, υδρόφοβες πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες με πολύ μεγάλη μοριακή μάζα δεν μπορούν να παραληφθούν από το βιολογικό δείγμα με τον κατάλληλο διαλύτη για περαιτέρω ηλεκτροφορητική ανάλυση. Στις περιπτώσεις αυτές θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν άλλες συμβατικές χρωματογραφικές τεχνικές για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών αυτών.

3. Μετά το διαχωρισμό, την εμφάνιση και την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών του δείγματος, ακολουθεί η διαδικασία της ταυτοποίησης των πρωτεϊνών αυτών. Κάθε κηλίδα (μία πρωτεΐνη) παραλαμβάνεται από την πλάκα και στη συνέχεια διασπάται σε μικρότερα κομμάτια με τη βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων, δηλαδή ειδικών πρωτεϊνών που έχουν τη λειτουργική ικανότητα να σπάνε άλλες πρωτεΐνες. Τα κομμάτια αυτά της πρωτεΐνης (πεπτίδια) αναλύονται στη συνέχεια με την τεχνική της φασματομετρίας μαζών, σε μία διαδικασία που ονομάζεται “αποτύπωμα πεπτιδικών μαζών” (peptide mass fingerprinting). Κατά τη διαδικασία αυτή οι πρωτεΐνες ταυτοποιούνται συγκρίνοντας τη μάζα των πεπτιδικών κομματιών με δεδομένα τα οποία προβλέπονται από την ανάλυση πληροφορίας σχετικής με γνωστές αλληλουχίες γονιδιωμάτων ή πρωτεϊνών. Η σύγκριση αυτή γίνεται με υπολογιστή και κατάλληλο λογισμικό.

Στο φασματόμετρο μαζών, τα μόρια της υπό ανάλυση ουσίας μετατρέπονται σε ιόντα στην αέριο φάση, κάτω από συνθήκες υψηλού κενού και ειδικές φυσικοχημικές τεχνικές. Τα ιόντα αυτά με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζα/ηλεκτρικό φορτίο ( $m/z$ ) που παρουσιάζει αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Με κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο  $m/z$ . Το διάγραμμα που δείχνει την ένταση του ρεύματος ως συνάρτηση του λόγου



Σχήμα 5

Χαρακτηριστικό φάσμα μαζών πεπτιδίου.

$m/z$  ονομάζεται φάσμα μαζών της ουσίας (Σχήμα 5). Η αναλυτική τεχνική με την οποία ταυτοποιούμε την αρχική ουσία από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μαζών της είναι ακριβώς η φασματομετρία μαζών (mass spectrometry, MS). Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από τα παρακάτω τμήματα: α) Σύστημα εισαγωγής του δείγματος, β) την πηγή των ιόντων όπου και δημιουργούνται τα ιόντα της υπό εξέταση ουσίας, γ) τον αναλυτή μαζών, ο οποίος διαχωρίζει τα ιόντα που παράγονται στην πηγή ιόντων στο χώρο και το χρόνο ανάλογα με το λόγο  $m/z$  και δ) τον ανιχνευτή. Τα φασματόμετρα μαζών είναι συνδεδεμένα επίσης με ηλεκτρονικό υπολογιστή τόσο για τον έλεγχο της λειτουργίας τους όσο και για την επεξεργασία των φασμάτων. Οι μέθοδοι ιονισμού του δείγματος περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων το χημικό ιονισμό (chemical ionization), ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization), βομβαρδισμό με ταχέα άτομα (fast-atom bombardment-FAB), ιονισμό με ηλεκτρικό πεδίο (field ionization), ιονισμό με λέιζερ (laser ionization), ιονισμό εκρόφησης με λέιζερ παρουσία υποβοηθητικής ουσίας (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-MALDI), θερμικό ιονισμό (thermal ionization) και δευτερογενή ιονισμό (secondary ionization). Παράλληλα, οι αναλυτές μαζών περιλαμβάνουν τους τύπους: μετασχηματισμού Fourier (Fourier-transform MS), παγίδας ιόντων (ion-trap MS), μαγνητικού τομέα (magnetic-sector MS), τετραπολικού MS (quadrupole MS) και τον αναλυτή χρόνου πτήσης (time-of-flight TOF MS). Ο πλέον συχνά χρησιμοποιούμενος τύπος φασματομέτρου μάζας για την ανάλυση πρωτεϊνών είναι ο MALDI-TOF. Με το όργανο αυτό, τα πεπτίδια της πρωτεΐνης αφού βρεθούν σε στερεή φάση ιονίζονται με ακτίνα λέιζερ. Μία πλέον πολύπλοκη μέθοδος που απαιτεί περισσότερο χρόνο είναι η “φασματομετρία μαζών εν σειρά” (Tandem Mass Spectrometry) ή MS/MS. Κάθε πεπτίδιο που αναλύεται από το φασματόμετρο μάζας υπόκειται σε περαιτέρω θραυσμάτωση και φασματομετρία μάζας με αποτέλεσμα να παίρνουμε πληροφορία για την αλληλουχία των αμινοξέων του πεπτιδίου. Η πληροφορία αυτή είναι πολύτιμη εάν δεν υπάρχουν στοιχεία από βάσεις δεδομένων για την αλληλουχία των βάσεων στο αντίστοιχο γονίδιο.

Οι παραπάνω τεχνικές προσδιορισμού των πρωτεϊνών προϋποθέτουν πρώτα το διαχωρισμό τους και μετά την ταυτοποίησή τους με MS. Ο τελικός στόχος όμως της πρωτεωμικής είναι να αποφύγει το στάδιο του διαχωρισμού. Για το σκοπό αυτό έχουν ήδη αρχίσει να αναπτύσσονται από εταιρείες πρωτεωμικής συστήματα που περιλαμβάνουν chips πρωτεϊνών, δηλαδή μικροσκοπικά πλακίδια με ακινητοποιημένες επάνω τους χιλιάδες γνωστές πρωτεΐνες (~10.000/τετραγωνικό εκατοστό), ικανές να “αιχμαλωτίσουν” κάτω από ορισμένες συνθήκες εκλεκτικά άλλες άγνωστες πρωτεΐνες του βιολογικού δείγματος. Οι άγνωστες αυτές πρωτεΐνες θα είναι δυνατόν στη συνέχεια να ταυτοποιηθούν με φασματομετρία μαζών. Όπως και με τα chips DNA, μικροδιατάξεις (microarrays) τέτοιων βιο-chips θα είναι ικανές να αναλύουν χιλιάδες δείγματα ταυτόχρονα. Η τεχνολογία αυτή έχει ήδη αρχίσει να εφαρμόζεται με την παραγωγή αυτοματοποιημένων συστημάτων chips που έχουν επάνω τους ακινητοποιημένα αντισώματα. Τα αντισώματα είναι ειδικές πρωτεΐνες -ανοσοσφαιρίνες- που παράγονται από τον οργανισμό του ανθρώπου και άλλων ζώων, όταν εισέλθουν σ’ αυτόν ξένες ουσίες (π.χ. ξένες πρωτεΐνες) και οι οποίες καλούνται αντιγόνα. Έτσι τα αντισώματα δρουν ως αντιδραστήρια απολύτως εξειδικευμένα για να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες περιοχές των αντιγόνων. Επειδή όμως η χημεία των πρωτεϊνών είναι εξαιρετικά περίπλοκη, θεωρείται πολύ δύσκολο να αναπτυχθούν σύντομα αντισώματα για κάθε μία ξεχωριστά πρωτεΐνη, τα οποία αφού προσδεθούν στα chips θα προσροφήσουν εκλεκτικά τις αντίστοιχες πρωτεΐνες οι οποίες και θα προσδιοριστούν τελικά. Για να επιτευχθεί όμως η ανάλυση του ανθρώπινου πρωτεώματος θα πρέπει να αναπτυχθεί αυτή ή μια παρόμοια τεχνολογία για το συνολικό και ταυτόχρονο προσδιορισμό των χιλιάδων πρωτεϊνών που απαρτίζουν το κυτταρικό πρωτέωμα.

4. Τα δεδομένα που παράγονται από την ανάλυση των επί μέρους πρωτεϊνών τροφοδοτούν ιδιωτικές και δημόσιες βάσεις δεδομένων, που περιλαμβάνουν στοιχεία για τις αλληλουχίες γονιδίων και γνωστών

πρωτεϊνών, όπου και επιτελείται η διαδικασία της ανάλυσης με εξειδικευμένες τεχνολογίες της βιοπληροφορικής.

## **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗΣ**

Οι πρωτεϊνικοί δείκτες, δηλαδή πρωτεΐνες οι οποίες εμφανίζονται ή εξαφανίζονται κατά την πορεία μιας ασθένειας και που ταυτοποιούνται με τις διαδικασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω έχουν ένα ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σκοπούς κλινικής διάγνωσης ή πρόγνωσης. Οι δείκτες μπορεί επίσης να βοηθήσουν στο σχεδιασμό μίας βέλτιστης θεραπευτικής αγωγής για διάφορα υποσύνολα ασθενών, καθώς επίσης και για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπευτικής τους αγωγής. Με τον τρόπο αυτό οι πρωτεϊνικοί δείκτες μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να επιταχύνουν τις κλινικές δοκιμές και να τις κάνουν πιο αποτελεσματικές. Εάν περαιτέρω βιοχημική έρευνα αποκαλύψει την αιτιακή σχέση των πρωτεϊνικών δεικτών με την παθολογία της ασθένειας, οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να χρησιμεύσουν ως μοριακοί στόχοι για θεραπευτική παρέμβαση.

Πολλές εταιρείες Βιοτεχνολογίας, τόσο στην Αμερική όσο και στην Ευρώπη όπως οι: CIPHERGEN Biosystems, CuraGen, Hybrigenics, Large Scale Biology, Oxford GlycoSciences (OGS), Myriad Genetics, Affymetrix, Proteome Sciences, έχουν επενδύσει τα τελευταία χρόνια εκατομμύρια δολάρια για τη διερεύνηση των κυτταρικών πρωτεωμάτων. Ορισμένες από τις εταιρείες αυτές έχουν αναπτύξει αυτοματοποιημένες τεχνολογίες πρωτεωμικής με μεγάλη απόδοση παραγωγής αποτελεσμάτων (high-throughput proteomics technologies) και οι οποίες μπορούν να ταυτοποιήσουν μεγάλο ποσοστό των πρωτεϊνών που εκφράζεται σ' έναν ιστό. Στα πλαίσια των ερευνών αυτών, η OGS έχει αναλύσει εκατοντάδες δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού από ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer και έχει ήδη ταυτοποιήσει πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται κατά την εξέλιξη της νόσου. Η Proteome Science αφ' ετέρου, έχει αναπτύξει πατέντες οι

οποίες αφορούν σε πρωτεϊνικούς δείκτες για τη διάγνωση καρκίνου του οισοφάγου και των πνευμόνων, για τις ασθένειες Prion και τη σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια καθώς επίσης και για τη διάγνωση βλαβών του εγκεφάλου και των περιφερικών νεύρων. Παράλληλα μεγάλα ερευνητικά κέντρα όπως το Ludwig Institute for Cancer Research (Λονδίνο, Μελβούρνη), το National Cancer Institute (ΗΠΑ) και το Samir Hanash από το University of Michigan School of Medicine τρέχουν ερευνητικά προγράμματα για την ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών στον καρκίνο του προστάτη, του ήπατος, του μαστού, των ωοθηκών και του εντέρου καθώς και σε περιπτώσεις καρδιοαγγειακών παθήσεων. Τα αποτελέσματα αυτά μαζί με αντίστοιχες γονιδιακές αναλύσεις τροφοδοτούνται σε βάση δεδομένων, η οποία συνδυάζει όλη την πληροφορία μαζί με αυτή των ηλεκτροφορήσεων δύο διαστάσεων. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι η εταιρεία Βιοτεχνολογίας των ΗΠΑ, Celera, η οποία πέτυχε πρόσφατα την ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος βρίσκεται σε επαφή με την GeneBio για τη δημιουργία εταιρείας με αποκλειστικό στόχο την ανάλυση όλου του ανθρώπινου πρωτεώματος. Ήδη η εταιρεία GeneBio σχεδιάζει την ανάπτυξη πλήρως αυτοματοποιημένου αναλυτή ο οποίος θα εκτελεί αυτόματα όλες τις διαδικασίες της πρωτεωμικής επεξεργασίας, και στη συνέχεια η πληροφορία θα τροφοδοτείται σε υπολογιστή για ανάλυση.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η πρωτεωμική παρέχει μία σειρά αναλυτικών τεχνικών με εξαιρετική ικανότητα για τη μελέτη σε μεγάλη κλίμακα της λειτουργίας των γονιδίων απ' ευθείας στο επίπεδο των πρωτεϊνών. Ιδιαίτερα η μελέτη με φασματομετρία μαζών των πρωτεϊνών που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων οδηγεί σε μία επανάσταση τη βιοχημική μελέτη της δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών. Σύντομα η πρωτεωμική θα αφήσει τη μεθοδολογία της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών και θα προχωρήσει στην ανάπτυξη μεθόδων μαζικής απομόνωσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών με την τεχνο-

λογία των chips πρωτεϊνών (όπως αυτά με ακινητοποιημένα αντισώματα), οι οποίες και θα συνδυασθούν με την τεχνική της φασματομετρίας μαζών. Η ανάπτυξη της πρωτεωμικής είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα από την πλευρά του ελέγχου παθολογικών διαδικασιών σε μοριακό επίπεδο. Όταν εφαρμοσθεί σε εξειδικευμένους πληθυσμούς κυττάρων θα δώσει σημαντικές πληροφορίες για την έκφραση των πρωτεϊνών στα κύτταρα αυτά και για το πώς η έκφραση των διαφόρων πρωτεϊνών μεταβάλλεται στις διάφορες ασθένειες έτσι ώστε να αποκτήσουμε μία πιο καθαρή εικόνα για πολλές παθολογικές καταστάσεις.

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbot, A. (1999) A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis, **Nature** 402, 715-720.
- Pandey, A. and Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes, **Nature** 405, 837-846.
- Ezzel, C. (2000) Beyond the human genome, **Sci.American** 283(1) 52-57.
- Chambers, G., Lawrie, L., Cash, P. and Murray, G.I. (2000) Proteomics: a new approach to the study of disease, **J.Pathol.** 192, 280-288.
- Baltimore, D. (2001) Our genome unveiled, **Nature** 409, 814-816.
- The science of proteomics, <http://www.proteome.co.uk/proteomics>
- Van Brunt, J. (2000) Protein chip challenges, <http://www.signalsmag.com>
- Introduction to Mass Spectrometry, <http://www.chem.vt.edu/chem-ed/ms-intro.html>
- Stryer, L. (1994) ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Χατζηωάννου, Θ.Π. και Κουμπάρη, Μ.Α. (1990) ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, Αθήνα.