

Πρωτεωμική:

Ένα Ισχυρό Όπλο για την Ανάλυση των Φυσιολογικών και των Παθολογικών Μηχανισμών σε Μοριακό Επίπεδο

Βασίλειος Ζουμπουρλής, Σύλβια Σολακίδη και Σπύρος Βλαχόπουλος

Μονάδα Βιοϊατρικών Εφαρμογών, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, email : vzub@eie.gr

Η πρωτεωμική είναι ένας σημαντικός τομέας έρευνας, που αποτελεί το νέο στόχο της βιοτεχνολογίας. Το αντικείμενο μελέτης της πρωτεωμικής είναι η καταγραφή και κατανόηση των αλληλεπιδράσεων του συνόλου των πρωτεϊνών ενός οργανισμού, προσπάθεια που αναμένεται να οδηγήσει στην παραγωγή νέων, πιο αποτελεσματικών διαγνωστικών και θεραπευτικών μέσων.

Μετά την ολοκλήρωση της αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος, ενός γιγαντιαίου εγχειρήματος που γνώρισε τεράστια δημοσιότητα, οι ερευνητές εστιάζουν την προσοχή τους στη μελέτη του ανθρώπινου «πρωτεώματος». Ο όρος αναφέρεται στο σύνολο των πρωτεϊνών που παράγονται από τα κύτταρα και τους ιστούς του ανθρώπου. Οι πρωτεΐνες είναι τα δομικά και λειτουργικά συστατικά του οργανισμού, ενώ το γονιδίωμα είναι το αρχείο πληροφοριών που ρυθμίζει τη σύσταση και την παραγωγή τους. Όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού έχουν κοινό γονιδιακό φορτίο, εντούτοις διαφοροποιούνται ανάλογα με το υποσύνολο των γονιδίων που είναι ενεργά και κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που καθορίζουν κάθε κυτταρικό τύπο. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες που παράγουν τα παθολογικά κύτταρα διαφέρουν συνήθως ποιοτικά ή/και ποσοτικά από τις αντίστοιχες των φυσιολογικών κυττάρων. Η μελέτη του πρωτεώματος συνίσταται στην καταγραφή του συνόλου των πρωτεϊνών που παράγονται από έναν οργανισμό, καθώς και στη διερεύνηση των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Ο απώτερος στόχος της «πρωτεωμικής» είναι η χρησιμοποίηση των πειραματικών πορισμάτων για την παραγωγή αποτελεσματικότερων φαρμάκων, με λιγότερες παρενέργειες. Η μελέτη του ανθρώπινου πρωτεώματος παρουσιάζει μεγαλύτερες δυσκολίες από την αποκρυπτογράφηση του γονιδιώματος. Παρά τις δυσχέρειες που υπάρχουν, τα πρώιμα αποτελέσματα των ερευνών είναι ενθαρρυντικά.

Σε αυτό τον τομέα έρευνας δραστηριοποιούνται τόσο ακαδημαϊκοί φορείς όσο και ιδιωτικές εταιρείες βιοτεχνολογίας. Η οικονομική άνθηση τέτοιων εταιρειών είναι ενδεικτική του μεγάλου ενδιαφέροντος που υπάρχει για την πρωτεωμική.

Στις σελίδες που ακολουθούν, αρχικά παρουσιάζονται οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην πρωτεωμική ανάλυση και στη συνέχεια γίνεται αναφορά σε μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές της πρωτεωμικής, στη χρησιμοποίηση αυτών των τεχνικών στη διάγνωση του καρκίνου σε πρώιμο στάδιο.

Η περιπλοκότητα του πρωτεώματος αποτελεί καιρόιο πρόβλημα της πρωτεωμικής

Ο όρος «πρωτέωμα» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Marc Wilkins και αναφέρεται στο σύνολο των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από συγκεκριμένο γονιδίωμα. Η έννοια της πρωτεωμικής περιλαμβάνει:

- την ανίχνευση και ταυτοποίηση όλων των πρωτεϊνών που δύναται να παράγει ένας συγκεκριμένος τύπος κυττάρου, ιστού ή οργανισμού
- την εξακρίβωση του τρόπου αλληλεπίδρασής τους και την περιγραφή των δικτύων μεταγωγής μηνυμάτων που απαρτίζονται από τις πρωτεΐνες
- την περιγραφή της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών

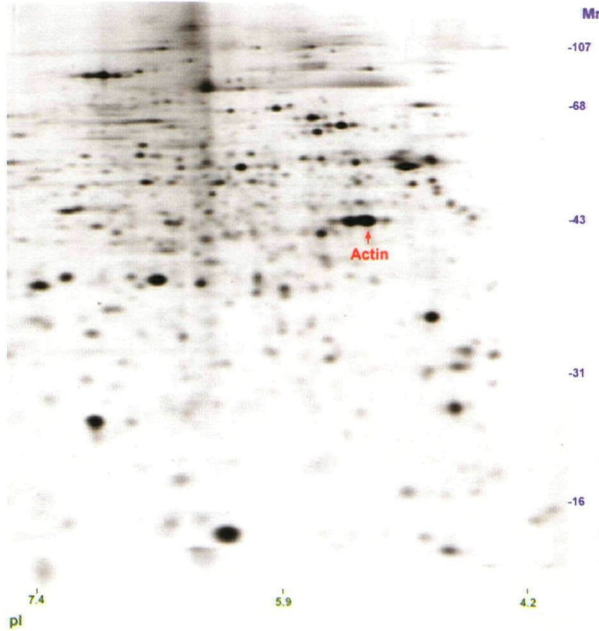
Το πρωτέωμα είναι πιο περίπλοκο, σε σχέση με το γονιδίωμα. Τα γονίδια είναι γραμμικά και αποτελούνται από DNA. Το αλφάβητο του DNA περιλαμβάνει τέσσερις αζωτούχες βάσεις, την αδενίνη, τη θυμίνη, τη γουανίνη και την κυτοσίνη, η ακολουθία των οποίων καθορίζει την αλληλουχία των αμινοξέων, δηλαδή των 20 δομικών στοιχείων που απαρτίζουν μία πρωτεΐνη. Εντούτοις, η γνώση της αμινοξικής αλληλουχίας δε συνεπάγεται γνώση της τρισδιάστατης δομής μίας πρωτεΐνης, της λειτουργίας της και των αλληλε-

πιδράσεων της με άλλες πρωτεΐνες. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες τροποποιούνται μέσα στα κύτταρα με την προσθήκη σακχάρων και λιπιδίων. Τέλος, το ανθρώπινο γονιδίωμα πιστεύεται ότι περιλαμβάνει περίπου 40.000 γονίδια, ενώ ένα τυπικό κύτταρο συνθέτει εκατοντάδες χιλιάδες διαφορετικές πρωτεΐνες. Επομένως, ένα γονίδιο μπορεί με κάποιο τρόπο να οδηγήσει στην παραγωγή πολλών πρωτεϊνών, πράγμα που σημαίνει ότι η χρήση της πληροφορίας που προέκυψε από την αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος δεν επαρκεί για τη διαλεύκανση των χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών του ανθρώπου. Σήμερα πιστεύεται ότι το 30-50% των πρωτεϊνών του ανθρώπινου οργανισμού δεν έχει ταυτοποιηθεί και επιτελούν άγνωστες λειτουργίες. Εντούτοις, η τεχνολογική πρόοδος επιτρέπει αισιοδοξία για την επιτάχυνση του ρυθμού με τον οποίο προχωράει ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών συστατικών του ανθρώπου.

Καταγραφή των πρωτεϊνών

Οι τεχνικές που συνήθως χρησιμοποιούνται στις πρωτεωμικές μελέτες είναι η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων σε πολυακρυλαμίδιο (2D-PAGE) και η φασματοσκοπία μάζας (mass spectrometry).

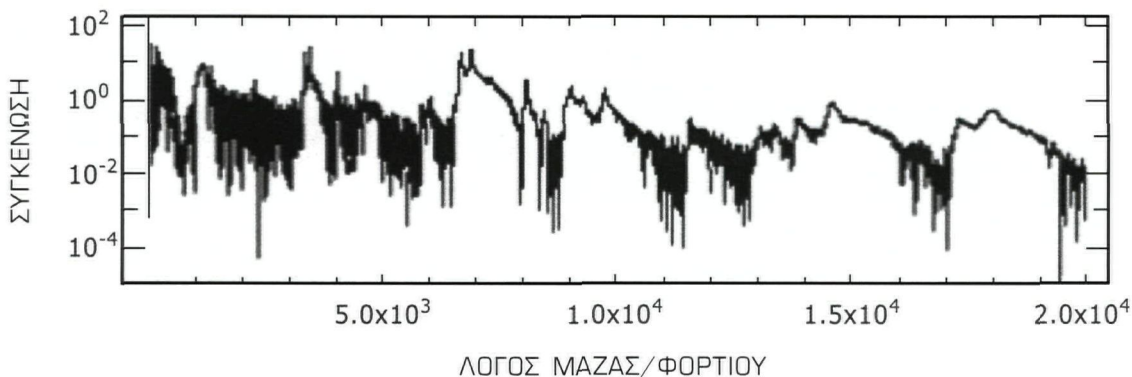
Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων επιτρέπει το διαχωρισμό μίγματος πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος κατά τη μία διάσταση και με βάση τη ηλεκτροχημικό τους φορτίο κατά την κάθετη διάσταση. Κάθε πρωτεΐνη επειδή χαρακτηρίζεται από το μέγεθος και το φορτίο της παρουσιάζεται ως διακριτή κηλίδα σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Εικόνα 1). Δείγματα πρωτεϊνών που προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς παρουσιάζουν διακριτό πρότυπο κηλίδων. Συγκριτική μελέτη των προτύπων της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων οδηγεί στον εντοπισμό πρωτεϊνών που χαρακτηρίζουν κάθε τύπο ιστού. Στη συνέχεια είναι δυνατή η αποκοπή συγκεκριμένης κηλίδας από το πήκτωμα και η περαιτέρω μελέτη της πρωτεΐνης που αντιστοιχεί σε αυτή, με τη χρήση άλλων τεχνικών.



Εικόνα 1
Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

Η φασματοσκοπία μάζας χρησιμοποιεί μαγνήτες ή ηλεκτρικά πεδία για να επιτύχει το διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση τη μάζα των ατόμων, από τα οποία αποτελούνται. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται ως κορυφές σε γράφημα (Εικόνα 2).

Οι δύο προαναφερθείσες τεχνικές, δυστυχώς, δεν αποτελούν ιδεώδη εργαλεία για τις πρωτεωμικές μελέτες. Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων παρουσιάζει σημαντικές τεχνικές δυσκολίες και αδυνατεί να διακρίνει πρωτεΐνες πολύ μεγάλου ή πολύ μικρού μεγέθους, καθώς και μεμβρανικές πρωτεΐνες. Η φασματοσκοπία μάζας συχνά αποτυγχάνει στον εντοπισμό πρωτεϊνών που απαντώνται σε μικρές ποσότητες, ενώ επιπλέον είναι μία τεχνική που απαιτεί πολύ ακριβό εργαστηριακό εξοπλισμό. Εντούτοις, η αυτοματοποίηση των δύο τεχνικών προχωρεί με γρήγορους ρυθμούς, καθώς μεγάλες ανταγωνιστικές εται-



Εικόνα 2
Παράδειγμα φασματοσκοπίας μάζας.

Εικόνα 3
Παράδειγμα κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.

ρείες βιοτεχνολογίας κατασκευάζουν μηχανήματα που θα πραγματοποιούν πρωτεωμικές αναλύσεις μεγάλης κλίμακας μειώνοντας τον απαιτούμενο χρόνο. Πρόκειται για μονάδες που βασίζονται στη ρομποτική τεχνολογία, η οποία ήδη εφαρμόζεται στην αυτοκινητοβιομηχανία. Ο απώτερος στόχος είναι η πλήρης αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου πρωτεώματος.

Τα μεγαλεπήβολα αυτά σχέδια συναντούν αντιδράσεις που στηρίζονται στο γεγονός ότι δεν υπάρχει ένα μοναδικό ανθρώπινο πρωτέωμα. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες που παράγει το πάγκρεας διαφέρουν από αυτές που απαντώνται στον εγκέφαλο, ενώ κάθε φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση και η λήψη φαρμάκων ή άλλων ουσιών είναι δυνατό να επηρεάσει ποιοτικά ή/και ποσοτικά την παραγωγή πρωτεϊνών από τον ανθρώπινο οργανισμό. Επομένως, η καταγραφή των πρωτεϊνών του ανθρώπου είναι απλώς το πρώτο στάδιο της πρωτεωμικής έρευνας. Γνώση σε βάθος θα προκύψει μόνο από το χαρακτηρισμό των διαφορετικών κυτταρικών τύπων σε επίπεδο πρωτεϊνών, και μάλιστα από το συσχετισμό των ευρημάτων με τις μεταβολές της κυτταρικής κατάστασης, καθώς και από την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών.

Μελέτη του δικτύου αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών

Το 2002 δύο ερευνητικές ομάδες⁽¹⁾ ανέφεραν τη χαρτογράφηση του συνόλου των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών του σακχαρομύκητα, ενός πρότυπου

συστήματος που χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα της κυτταρικής βιολογίας. Η τεχνική με την οποία επιτεύχθηκε η χαρτογράφηση συνίσταται στην πρόσδεση εκατοντάδων γονιδίων του σακχαρομύκητα με τμήματα DNA, τα οποία κωδικοποιούν μικρά πεπτιδία που μπορούν να προσδένονται σε μικροσκοπικά σφαιρίδια. Εκχύλισμα του σακχαρομύκητα διοχετεύεται σε στήλη με μικροσκοπικά σφαιρίδια, στα οποία συνδέονται οι πρωτεΐνες που προέρχονται από τα τροποποιημένα γονίδια και φέρουν πεπτιδία που μπορούν να προσδένονται στα σφαιρίδια. Οι τροποποιημένες αυτές πρωτεΐνες συμπιέσθηκαν και όσες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με αυτές. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση των πρωτεϊνικών συμπλόκων με φασματοσκοπία μάζας, από την οποία προέκυψε ότι πάνω από το 90% αυτών περιελάμβανε πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας, ενώ το 80% των πρωτεϊνών αλληλεπιδρούσαν τουλάχιστον με μία ακόμη πρωτεΐνη. Γίνεται λοιπόν προφανές η πολυπλοκότητα των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνει χώρα σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο. Προγραμματίζεται η χρήση αυτής της πειραματικής προσέγγισης και στη μελέτη του ανθρώπινου πρωτεώματος, καθώς για την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων στο σακχαρομύκητα χρειάστηκαν μόνο λίγες εβδομάδες.

Εργαστήρια ακαδημαϊκών φορέων εστιάζουν την προσοχή τους στην ταυτοποίηση των πρωτεϊνών του ορού του ανθρώπου, με στόχο την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών αντικαρκινικών μέσων.

Καθορισμός της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών

Η κλασική τεχνική μελέτης της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Οι πρωτεΐνες απομονώνονται, καθαρίζονται και στη συνέχεια κρυσταλλώνονται. Οι κρύσταλλοι αναλύονται με ακτίνες Χ και το κρυσταλλογράφημα που προκύπτει παρέχει δομικές πληροφορίες ανάλογα με τον τρόπο σκέδασης των ακτίνων Χ από τα άτομα που αποτελούν την πρωτεΐνη που μελετάμε (**Εικόνα 3**).

Σήμερα η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ έχει αυτοματοποιηθεί με τη χρήση επιτραπέζιων συσκευών ακτίνων Χ (που αντικατέστησαν τα συγχροτρόνια) και την εφαρμογή της ρομποτικής τεχνολογίας στη δημιουργία μονάδων βιομηχανικών προδιαγραφών, οι οποίες πραγματοποιούν κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.

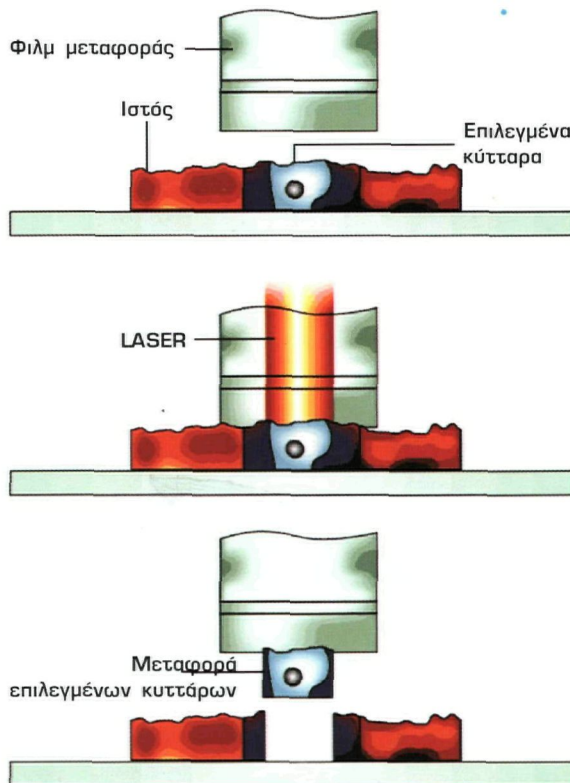
Η διαλεύκανση της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών έχει ως απώτερο στόχο τον εντοπισμό περιοχών έναντι των οποίων είναι δυνατό να σχεδιαστούν χημικά μόρια που θα ρυθμίζουν τη λειτουργία τους και θα αποτελούν υποψήφια φάρμακα έναντι ασθενειών στην εξέλιξη των οποίων έχουν καίριο ρόλο οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες.

Καθώς οι πληροφορίες που αφορούν τη δομή των πρωτεϊνών μπορεί να είναι εκμεταλλεύσιμες, ιδιωτικές εταιρείες βιοτεχνολογίας έχουν ήδη υποβάλει αιτήσεις δικαιωμάτων ευρεσιτεχνίας για το ανθρώπινο πρωτέωμα. Οι προστριβές που λαμβάνουν χώρα θυμίζουν αντίστοιχες δικαστικές διαμάχες που είχαν προκύψει από την αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Εφαρμογές των τεχνικών της πρωτεωμικής στη διάγνωση του καρκίνου σε πρώιμο στάδιο

Η αποτελεσματικότητα της θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το στάδιο της νόσου. Είναι λοιπόν σαφές η ανάγκη εύρεσης βιολογικών δεικτών, ειδικών για κάθε τύπο καρκίνου, που θα βοηθούν στην έγκαιρη διάγνωση. Οι τεχνολογικές πρόοδοι στον τομέα της γενωμικής επιτρέπουν την εντόπιση μεταβολών της γονιδιακής έκφρασης που λαμβάνουν χώρα στα καρκινικά κύτταρα και αποτελούν δυναμικούς βιολογικούς δείκτες της νόσου. Εντούτοις, αρκετές από τις μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης δεν αντικατοπτρίζονται στην πρωτεϊνική έκφραση και λειτουργία, πράγμα που δυσχεραίνει την αξιοποίησή τους στην κλινική διάγνωση, η οποία στηρίζεται κυρίως σε πρωτεϊνικές βιολογικές δοκιμασίες, όπως είναι η ενζυμική μέθοδος ανοσοπροσρόφησης, ELISA (enzyme - linked immunosorbent assay).

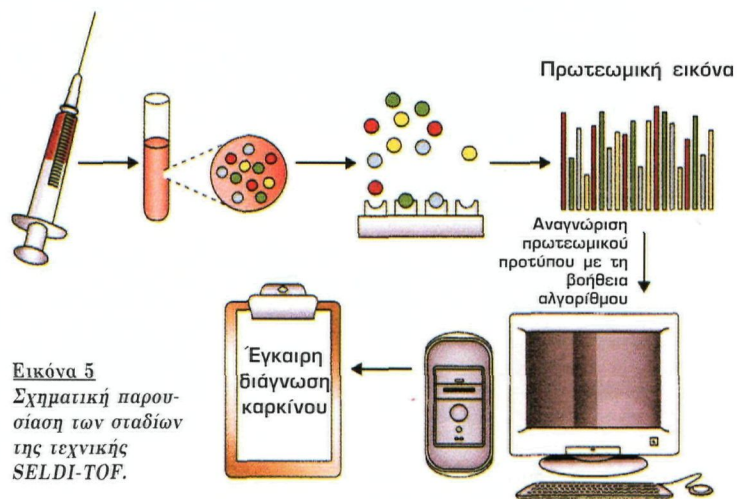
Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, η οποία συνοδεύεται από την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας, αποτελεί την πρωταρχική τεχνική που χρησιμοποιείται, εδώ και αρκετά χρόνια, στην κλασική πρωτεωμική ανάλυση, με στόχο την ανακάλυψη νέων βιολογικών δεικτών για τη διάγνωση του καρκίνου σε πρώιμο στάδιο και την παρακολούθηση της πορείας της νόσου. Εντούτοις, η χρήση αυτής της προσέγγισης παρουσιάζει δυσκολίες, λόγω των τεχνικών προβλημάτων που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο της καταγραφής των πρωτεϊνών. Επιπλέον, τα δείγματα ιστού που χαρακτηρίζονται από τους παθολογοανατόμους ως «φυσιολογικά» ή «νεοπλασματικά» είναι στην πραγματικότητα ένα ετερογενές μίγμα διαφόρων κυτταρικών τύπων, που όλοι συνεισφέρουν στη διαμόρφωση του πρωτεωμικού προτύπου ιστικών τεμαχιδίων, κατά την ανάλυση με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων. Επομένως, η αναζήτηση βιολογικών δεικτών σε δείγματα πρώιμων καρκινικών αλλοιώσεων δυσχεραίνεται καθώς οι αλλοιώσεις αυτές είναι συνήθως μικρής έκτασης, με αποτέλεσμα τα δείγματα που αναλύονται συχνά να περιέχουν προσμίξεις από τον παρακείμενο στρωματικό ιστό. Η ειδικότητα της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων βελτιώνεται σημαντικά με την εφαρμογή της τεχνικής εκτομής με LASER κατά τη διάρκεια μικροσκοπησης (LASER capture microdissection, LCM). Η τεχνική



Εικόνα 4
Σχηματική παρουσίαση της τεχνικής εκτομής με LASER κατά τη διάρκεια μικροσκοπησης (LASER capture microdissection, LCM)

αυτή επιτρέπει την εκτομή με LASER από δείγμα ιστού αμιγών νεοπλασματικών ή φυσιολογικών κυτταρικών πληθυσμών, οι οποίοι αναγνωρίζονται με παρατήρηση στο μικροσκόπιο μετά από χρώση, και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για πρωτεωμική ανάλυση (Εικόνα 4)⁽²⁻⁶⁾. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την ανεύρεση βιολογικών δεικτών σε επιθηλιακά κύτταρα που απομονώθηκαν με την τεχνική LCM και προέρχονταν από όγκους ωθηκών χαμηλής κακοήθειας⁽⁷⁾.

Μία παραλλαγή της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων είναι η διαφορική ηλεκτροφόρηση μέσα στο πήκτωμα (differential in-gel electrophoresis, DIGE), η οποία βελτιώνει την επαναληψιμότητα και την ευαισθησία της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων, καθώς και την ικανότητά της για ποσοτικές εκτιμήσεις. Η τεχνική DIGE βασίζεται στη διαφορική σήμανση κυτταρικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με φθορίζουσες χρωστικές και στην ανάλυση σε δύο διαστάσεις του μίγματος των εκχυλισμάτων σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου. Με τη βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής συγκρίνεται σε κάθε κηλίδα του πηκτώματος (η οποία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αντιστοιχεί σε μία πρωτεΐνη) η ένταση του φθορισμού για κάθε χρωστική που χρησιμοποιήθηκε. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που



Εικόνα 5
Σχηματική παρουσίαση των σταδίων της τεχνικής SELDI-TOF.

εκφράζονται διαφορεικά σε φυσιολογικό οισοφαγικό ιστό και σε πλακώδη καρκινώματα του οισοφάγου⁽⁸⁾. Άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν εφαρμόσει στον ορό καρκινοπαθών ένα συνδυασμό της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων με το ανοσοσύτρωμα κατά Western (Western Blot), χρησιμοποιώντας αυτοαντισώματα έναντι πρωτεϊνών των καρκινικών κυττάρων,, με στόχο την αναζήτηση πρωτεϊνών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί δείκτες ή στόχοι ανοσοθεραπείας⁽⁹⁻¹¹⁾.

Η χρήση συνδυασμού νέων τεχνολογιών, όπως είναι η αναπαραστατική φασματοσκοπία μάζας (imaging mass spectroscopy) και ο πολλαπλός διαδοχικός διαχωρισμός με υγρή χρωματογραφία σε άμεση σύνδεση με ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας, είναι γνωστή ως τεχνολογία πολυπαραγοντικής πρωτεϊνικής ταυτοποίησης (multidimensional protein identification technology, MudPIT) και έχει συμβάλει στην ανίχνευση πρωτεϊνών που απαντώνται σε μικρές ποσότητες στο πρωτέωμα. Ωστόσο, το βασικό μειονέκτημα αυτής της τεχνολογίας είναι ότι απαιτείται μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης για την ανάλυση, πράγμα που δυσχεραίνει την εφαρμογή της στην κλινική πρακτική, σε δείγματα από βιοψίες.

Μία σημαντική τεχνική για τη γρήγορη ταυτοποίηση βιολογικών καρκινικών δεικτών και πρωτεωμικών προτύπων στο πρωτέωμα τόσο ιστών όσο και σωματικών υγρών, είναι η τεχνολογία φασματοσκοπίας μάζας SELDI-TOF (surface-enhanced LASER desorption ionization time-of-flight), η οποία οδηγεί, μέσα σε μερικά λεπτά, σε ένα πρωτεωμικό αποτύπωμα ή «γραμμικό κώδικα» («bar code») του υλικού που αναλύεται. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες του ορού ενός ασθενούς προσδένονται σε ένα τσιπ που ακτινοβολείται με LASER, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες

να μετατρέπονται σε πρωτονιωμένα και φορτισμένα ιόντα. Ο χρόνος πτήσης (time-of-flight) κάθε ιόντος, πριν γίνει ανίχνευσή του από ηλεκτρόδιο, είναι ένα μέτρο της τιμής του λόγου μάζας/φορτίου. Τα φάσματα των ιόντων αναλύονται στη συνέχεια με εργαλεία βιοπληροφορικής (**Εικόνα 5**). Ένα τυπικό πρωτεωμικό πρότυπο που προκύπτει από τη χρήση της τεχνολογίας SELDI-TOF είναι δυνατό να περιλαμβάνει 15.000-400.000 σημεία με λόγο μάζας/φορτίου 500-12.000. Τα πλεονεκτήματα της τεχνολογίας SELDI-TOF είναι κυρίως η πολύ μικρή ποσότητα δείγματος που απαιτείται για την ανάλυση (πχ 1 μικρολίτρο ορού) και ο σύντομος χρόνος εξαγωγής συμπερασμάτων (λεπτά ή ώρες, ενώ με τις κλασσικές τεχνικές χρειάζονται μερικές ημέρες). Έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση βιολογικών δεικτών που σχετίζονται αποκλειστικά με συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Για παράδειγμα, μία τροποποιημένη ποσοτική προσέγγιση SELDI-TOF έχει οδηγήσει στη διαπίστωση ότι υπάρχει σημαντική αύξηση των επιπέδων PSA (ειδικό προστατικό αντιγόνο, prostate specific antigen) του ορού σε ασθενείς με καλοήθεις νόσους⁽¹²⁾. Εντούτοις, σημαντικά μειονεκτήματα της τεχνολογίας SELDI-TOF, καθώς και των μελετών που στηρίζονται σ'αυτή, είναι ότι απαιτείται κλασμάτωση των πρωτεϊνικών μιγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν, καθώς και εφαρμογή μεθόδων καθαρισμού των πρωτεϊνών, μετά το τέλος της ανάλυσης, ώστε να γίνει δυνατή η πλήρης ταυτοποίηση των πρωτεϊνών. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη διαγνωστική προσέγγιση δεν έχει τόση σημασία η ταυτότητα των επιμέρους στοιχείων του πρωτεωμικού προτύπου, όσο η συγκριτική μελέτη ως προς ένα φυσιολογικό πρωτεωμικό πρότυπο.

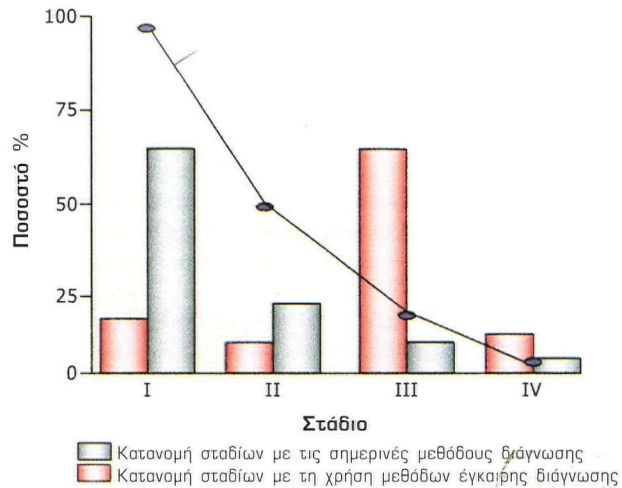
Τα σωματικά υγρά, όπως είναι ο ορός και τα ούρα, αποτελούν πλούσια πηγή βιολογικών δεικτών, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη διάγνωση του καρκίνου σε πρώιμο στάδιο. Το όργανο στο οποίο εντοπίζεται η νόσος εκκρίνει πρωτεΐνες που οδηγούν στην τροποποίηση του πρωτεώματος του αίματος. Αυτές οι μεταβολές είναι δυνατό να προέρχονται από την υπερέκφραση ή τη μη φυσιολογική έκκριση πρωτεϊνών, από την τροποποίηση πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου, από τη μη φυσιολογική ενεργοποίηση της οδού της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης, η οποία οδηγεί στην απομάκρυνση πρωτεϊνών από το πρωτέωμα του ορού, ή, τέλος, από πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις ή σχηματισμό πρωτεϊνικών συμπλόκων που σχετίζονται με τη νόσο. Επομένως, πιστεύεται ότι η χρήση ενός συνδυασμού βιολογικών δεικτών θα είναι πιο αποτελεσματική, όσον αφορά την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου.

Το 2002⁽¹³⁾ παρουσιάζεται η πρώτη μελέτη που βασίζεται στην τεχνολογία που χρησιμοποιείται στην πρωτεωμική ανάλυση και βοηθάει στη διάγνωση του

καρκίνου των ωοθηκών σε πρώιμο στάδιο. Ειδικότερα, η μέθοδος διάγνωσης καρκίνου των ωοθηκών στηρίζεται στη χρήση της φασματοσκοπικής μάζας για την αντιπαραβολή των πρωτεϊνών του ορού ασθενών με τις πρωτεΐνες περιέχονται στον ορό υγιών γυναικών. Στην τεχνική της φασματοσκοπίας μάζας κάθε πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από το ηλίκιο μάζας/φορτίου. Η συγκριτική ανάλυση συμπεριέλαβε πρωτεΐνες με ηλίκιο μάζας/φορτίου μικρότερο ή ίσο του 20.000 και ένα υπολογιστικό σύστημα χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών που παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες δυνατές ποσοτικές διαφορές μεταξύ ασθενών και υγιών. Αυτό το υποσύνολο πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τον χαρακτηρισμό δειγμάτων ορού υγιών γυναικών, καθώς και ασθενών για τις οποίες είχε ήδη τεθεί η διάγνωση καρκίνου των ωοθηκών. Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν 100%, ενώ η ειδικότητα ήταν 95.5%. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος που επινόησαν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση καρκίνου των ωοθηκών σε γυναίκες με ισχυρή προδιάθεση, αλλά όχι ως μέσο διάγνωσης στο γενικό πληθυσμό. Όπως αποτυπώνεται στο διάγραμμα (Εικόνα 6), η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών έχει σημαντικό αντίκτυπο στην επιτυχία της θεραπευτικής αντιμετώπισης της νόσου.

Την ανακοίνωση των συμπερασμάτων της προαναφερθείσας μελέτης ακολούθησε η πειραματική επιβεβαίωση της δυνατότητας χρησιμοποίησης των πρωτεωμικών προτύπων του ορού στη διάγνωση του καρκίνου του μαστού⁽¹⁴⁾ και του προστάτη⁽¹⁵⁾. Ειδικότερα, ο συνδυασμός τριών βιολογικών δεικτών επέτρεψε τη σταδιοποίηση ασθενών με καρκίνο του μαστού και τη διάκρισή τους από υγιείς γυναίκες, ενώ η συγκριτική ανάλυση συγκεκριμένων προτύπων που περιλαμβάνονται στο πρωτεωμικό αποτύπωμα του ορού οδήγησε στη διάκριση ασθενών με καρκίνο του προστάτη από ασθενείς με καλοήθεις νόσους, με στόχο να μπορέσει η μέθοδος αυτή να αντικαταστήσει στο μέλλον τη βιοψία του προστάτη, η οποία σήμερα ακολουθεί τον προσδιορισμό αυξημένων επιπέδων PSA στον ορό.

Η ανάπτυξη διαγνωστικών τεχνικών που βασίζονται στη συγκριτική ανάλυση πρωτεωμικών προτύπων είναι δυνατό να προκαλέσει επανάσταση στον τομέα της μοριακής ιατρικής, αφού οι τεχνικές αυτές δεν αποτελούν απλώς μία νέα προσέγγιση στη διάγνωση ασθενειών αλλά, επιπλέον, είναι κλινικά εφαρμόσιμες. Ωστόσο, πριν την εφαρμογή των νέων τεχνικών στην κλινική πρακτική είναι απαραίτητη η επιβεβαίωση των πρώιμων ευρημάτων με κλινικές δοκιμές μεγάλης κλίμακας, καθώς και η καθιέρωση κριτηρίων ελέγχου της ποιότητας και της επαναληψιμότητας των πρωτεωμικών προσδιορισμών. ■



Βιβλιογραφικές Παραπομπές

1. Gavin AC, et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 2002, 415:141-7.
2. Emmert-Buck MR et al. Laser capture microdissection. *Science*. 1996, 274:998-1001.
3. Banks RE, et al. The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis—preliminary findings. *Electrophoresis*. 1999, 20:689-700.
4. Ahrum M, et al. Proteomic analysis of human prostate cancer. *Mol Carcinog*. 2002, 33:9-15.
5. Liotta L, and Petricoin E. Molecular profiling of human cancer. *Nature Rev Genet*. 2002, 1:48-52.
6. Craven RA, et al. Laser capture microdissection and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: evaluation of tissue preparation and sample limitations. *Am J Pathol*. 2002, 160:815-22.
7. Paweletz CP, et al. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. *Cancer Res*. 2000, 60:6293-7.
8. Zhou G, et al. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Mol Cell Proteomics*. 2002, 1:117-24.
9. LeNaour F, et al. Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2001, 7:3328-35.
10. LeNaour F, et al. A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics*. 2002, 1:197-203.
11. Brichory F, et al. Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer. *Cancer Res*. 2001, 61:7908-12.
12. Xiao Z, et al. Quantitation of serum prostate-specific membrane antigen by a novel protein biochip immunoassay discriminates benign from malignant prostate disease. *Cancer Res*. 2001, 61:6029-33.
13. Petricoin EF, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 2002, 359:572-7.
14. Li J, et al. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem*. 2002, 48:1296-304.
15. Adam B-L, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res*. 2002, 62:3609-14.