

## Lo studio del proteoma e le sue applicazioni nella diagnostica di laboratorio

A. Caldini

*Laboratorio Centrale Analisi Biochimico Cliniche  
Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze*

### Introduzione

Con la conclusione del Progetto Genoma è diventato definitivamente chiaro come la conoscenza delle sequenze genomiche, seppure indispensabile, non sia di per sé sufficiente a spiegare tutti gli eventi biologici complessi e tutte le patologie rendendo così necessario lo studio dei prodotti genici, i.e. mRNA e proteine.

Con il termine proteoma (usato per la prima volta nel 1994 da Wilkins et al.) si identifica il complemento proteico del genoma, così come con il termine genoma si intende il complemento genico dei cromosomi. Sebbene lo studio del mRNA sia metodologicamente più semplice, lo studio del proteoma si rende necessario per due motivi principali: la correlazione tra quantità di mRNA e quantità di proteina intracellulari è scarsa e variabile tra le diverse proteine e, fatto ancor più rilevante, le proteine vanno incontro a cambiamenti co- e post-traduzionali molto complessi che rendono il numero di isoforme delle proteine di fatto superiore a quello prevedibile sulla sola base dell'analisi degli acidi nucleici. Inoltre le modificazioni post-traduzionali sono il risultato di più vie metaboliche intersecantesi e risentono dell'influenza dei fattori ambientali.

Di conseguenza il paradigma "un gene una proteina" va in qualche modo rivisitato in quanto da un singolo gene si ottengono in realtà più isoforme proteiche.

Dal momento che l'espressione delle diverse isoforme sembra essere un processo altamente regolato e controllato e suscettibile di cambiamenti in seguito a processi morbosi o esposizione a farmaci e tossine, la comprensione del significato della variabilità proteica "post-traduzionale" potrebbe aprire nuovi scenari in molti campi della medicina.

Il notevole sviluppo che la proteomica ha avuto negli ultimi anni è dovuto sia alla grande crescita delle conoscenze scientifiche e tecnologiche, che alla

chiara evidenza che la maggior parte delle patologie umane origina dalla perdita di controllo dei fini meccanismi di regolazione delle interazioni tra proteine. La comprensione del ruolo che il network proteico gioca nelle patologie umane creerà probabilmente in un prossimo futuro grandi opportunità cliniche, in quanto se è vero che nel DNA risiede l'archivio di tutte le informazioni, è altrettanto vero che gli effettori di queste informazioni a livello cellulare sono le proteine e che sono le proteine a determinare il fenotipo cellulare.

### Tecniche di studio del proteoma

La tecnologia più conosciuta e più utilizzata per gli studi proteomici è sicuramente l'elettroforesi bidimensionale o 2-DE (Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis), in cui le proteine vengono separate sulla base della sola carica elettrica nella prima dimensione (Isoelectrofocusing) e quindi nella seconda sulla base della sola massa molecolare (Elettroforesi su gel di poliacrilamide/SDS). Con questo tipo di tecnica separativa, partendo da miscele complesse di proteine quali liquidi biologici o lisati cellulari, si ottiene la separazione su un singolo gel di parecchie centinaia di proteine. Con sistemi computerizzati di analisi di immagine si possono quindi, confrontando ad esempio campioni di tessuto sano e frammenti biopatici di tumore, individuare le proteine che presentano un diverso grado di espressione. L'identificazione delle proteine così individuate viene effettuata con notevole velocità e accuratezza tramite spettrometria di massa e con l'ausilio di banche dati internazionali. Inoltre usando tecniche di immuno-blotting le isoforme di una particolare proteina possono essere evidenziate e analizzate, tramite l'uso di anticorpi specifici. Le tecniche basate sulla 2D-E, a causa della loro complessità, scar-

sa riproducibilità e resa, sono difficilmente proponibili per applicazioni cliniche che prevedano studi multicentrici su un adeguato numero di campioni e sono di fatto scarsamente utilizzabili per campioni biologici quali il plasma in cui proteine come l'albumina e le immunoglobuline, presenti in elevate concentrazioni, mascherano le proteine di origine tissutale potenzialmente interessanti per la caratterizzazione delle condizioni patologiche.

Più recentemente sulla scia di metodologie nate per lo studio degli acidi nucleici e nel tentativo di superare i limiti della 2D-E, si sta assistendo allo sviluppo di tecnologie dedicate alla proteomica e basate sull'utilizzo di componenti microfabbricati (protein chip e protein array). Mentre i protein arrays sono costruiti secondo la filosofia degli arrays utilizzati per la genomica, i protein chip uniscono la tecnologia dei chip per la separazione di sottopopolazioni proteiche sulla base delle loro caratteristiche biofisiche alla spettrometria di massa come sistema di rivelazione e misura delle masse molecolari delle singole proteine. Un altro tipo di tecnologia che potrebbe portare in tempi brevi alla disponibilità di strumentazione automatizzata ad alta resa è quella della cromatografia bi o tridimensionale, in cui il campione viene sottoposto a separazioni cromatografiche sequenziali. E' altresì evidente che le informazioni generate da questo tipo di analisi sono di tale complessità da richiedere l'ausilio di strumenti informatici potenti in grado di individuare, da un enorme numero di combinazioni possibili di patterns proteici, quello che in modo ottimale è in grado di segregare la popolazione di interesse.

### Applicazioni cliniche

Nella letteratura internazionale si sta registrando un crescente interesse in questo settore come è dimostrato dall'impressionante incremento dei lavori pubblicati negli ultimi anni e, cosa ancor più interessante, dalla comparsa dei primi lavori con un risultato clinico molto promettenti.

Uno dei settori in cui lo studio del proteoma potrebbe avere un interesse clinico rilevante è certamente l'oncologia, come è testimoniato dal continuo aumento del numero di pubblicazioni sull'argomento. L'interesse del clinico è rivolto all'identificazione di potenziali markers specifici che siano in grado di fornire informazioni diagnostiche, prognostiche e sull'efficacia del trattamento e in tutte queste situazioni l'approccio proteomico potrebbe offrire infor-

mazioni interessanti. Particolarmente interessanti sotto per la ricaduta che potrebbero avere sono alcuni lavori recentemente pubblicati che, utilizzando la tecnologia dei protein chip, riportano valori di sensibilità e specificità che, se confermati in studi multicentrici controllati, potrebbero aprire nuovi orizzonti per quanto riguarda la diagnosi precoce delle patologie oncologiche.

### Bibliografia

1. Lawrie LC, Fothergill JE, Murray GI. Spot the differences: proteomics in cancer research. *Lancet Oncol* 2001; 2:270-7.
2. Charrier JP, Tournel C, Michel S, Comby S, Jolivet-Reynaud C, Passagot J et al. Differential diagnosis of prostate cancer and benign prostate hyperplasia using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 2001; 22: 1861-6.
3. Le Naour F, Misek DE, Krause MC, Deneux L, Giordano TJ, Scholl S, et al. Proteomic-based identification of RS/JD-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7:3328-35.
4. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1:845-67.
5. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002 ; 359:572-7.
6. Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH 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.
7. Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 2002 ; 48:1296-304.
8. Qu Y, Adam BL, Yasui Y, Ward MD, Cazares LH, Schellhammer PF et al. Boosted decision tree analysis of SELDI mass spectral serum profiles discriminates prostate cancer from noncancer patients. *Clin Chem* 2002; 48:1835-43.
9. Lubman DM, Kachman MT, Wang H, Gong S, Yan F, Hamler RL et al. Two-dimensional liquid separation-mass mapping of proteins from human cancer cell lysates. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 782:183-96.
10. Cutler P. Protein arrays: the current state-of-the-art. *Proteomics* 2003 ; 3:3-18.
11. Miller JC, Zhou H, Kwekel J, Cavallo R, Burke J, Butler EB et al. Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomica* 2003; 3:56-63.