

Novo doba molekularne medicine: dometi proteomike

New age of molecular medicine: what can be achieved through proteomics

Sandra Kraljević Pavelić, Krešimir Pavelić

Razvoj novih metoda i tehnologija kontinuirano se odražavao i na razvoju temeljnih, a posebno primijenjenih istraživanja. Naročito je to bilo prisutno u području znanosti o životu, poglavito u temeljnim medicinskim znanostima. Prisjetimo se samo utjecaja metoda stanične biologije, biokemije i molekularne genetike na razumijevanje fizioloških procesa i patoloških zbivanja u organizmu. Ipak, sve su te metode bile ograničene tzv. redukcionističkim pristupom, tj. ograničenim ishodom istraživanja. Usavršavanje metode sekvenciranja nukleinskih kiselina dalo je, međutim, naslutiti kvalitativni pomak od redukcionističkog k sveobuhvatnijem pristupu izučavanja određenih stanja u organizmu. Uslijedio je razvoj transkriptomike, tj. sustavne analize aktivnosti svih gena u organizmu, a potom i proteomike – sustavne analize ekspresije proteina pod specifičnim uvjetima, uključujući njihovu separaciju, identifikaciju i karakterizaciju.

Proteomika je, naime, interdisciplinarna znanost koja povezuje biologiju, kemiju i računarstvo, a njezina je važnost tim veća što se bavi proučavanjem proteina – nositelja svih bioloških funkcija organizma koji su odgovorni za stanične procese poput, primjerice, proizvodnje energije ili pak transporta tvari.

Skup svih proteina i proteinskih oblika koje organizam proizvodi tijekom života naziva se proteom, stoga zadatak proteomike nije nimalo lak, a sastoji se u praćenju statusa proteoma s obzirom na vrstu stanice ili vrstu tkiva, bolesno ili zdravo stanje ili pak tijekom različitih faza razvoja organizma. Također, proteom je podložan neprestanim promjenama kroz interakcije s genomom i vanjskim čimbenicima. Pretpostavlja se kako se čitav proteom čovjeka sastoji od više milijuna vrsta proteina, iako je približan broj gena procijenjen na oko 30.000. Tomu su razlog različite modifikacije samih transkripta RNA, ali i kemijske modifikacije već proizvedenih proteina (primjerice dodavanje kemijske grupe šećera ili fosfatne skupine). Upravo su takve poslijetranslacijske modifikacije odgovorne za promjenu statusa aktivacije proteina ili za promjenu funkcije danog proteina u stanici.

Razvojem globalnih metoda analize rađa se i nova kovanica s nastavkom *-omika*¹ koja mijenja postojeće znanstvene paradigme. Ovaj termin objedinjuje skupinu metoda za analizu i karakterizaciju svih ili većine članova pripadnika određene obitelji molekula u jednom jedinom eksperimentalnom

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

koraku. Na pomolu je stoga konceptualna promjena u molekularnoj znanosti o životu – otklon od redukcionističkog prema integriranom pogledu na život. U tom pristupu ključna riječ je kompleksnost; snaga ovakvog globalnog pristupa, naime, leži u sposobnosti dobivanja složene slike ekspresijskog profila stanice. Upravo taj novi koncept, čiji je značajan dio proteomika, treba privući pažnju medicinske javnosti, a naročito kliničara, jer pruža nesagledive mogućnosti rane dijagnostike, dizajniranja nove generacije pametnih lijekova te poimanja molekularne pozadine bolesti, stoga treba pozdraviti inicijativu glavnog urednika časopisa *Medicina* da se ovoj problematici pristupi kroz tematski broj, uključujući prikaze implementacije proteomike i masene spektrometrije u medicinska istraživanja.

U Hrvatskoj postoji snažna jezgra stručnjaka koji se bave ovim problemom, poglavito na Institutu "Ruđer Bošković" u Zagrebu, a odnedavno i na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, gdje se formira svjetski relevantna skupina za područje spektrometrije masa. Osobito je to važno s obzirom na činjenicu da su prvi opipljivi klinički rezultati primjene proteomike doista vrlo uzbudljivi i obećavajući².

Proteomika je izuzetno važna nadopuna transkriptomike, s obzirom na to da sekvence DNA/RNA same po sebi nisu dovoljne za jasnu identifikaciju jer su proteini (a ne DNA ili RNA) istinski nositelji bioloških funkcija, te, primjerice, predstavljaju empirijske mete za lijekove. Ova složena tehnologija objedinjuje niz metoda³ s ciljem razdvajanja proteinskih smjesa i otkrivanja proteomskog ekspresijskog profila (dvodimenzionalna poliakrilamidna elektroforeza, tekućinska kromatografija), potom s ciljem kvalitativne i kvantitativne analize ekspresijskog proteomskog profila (primjenom digitalnih kamera i računalnih programa posebne namjene), identifikacije i karakterizacije proteina (mikrosekvencioniranje, masena spektrometrija), pohrane podataka (baza podataka), komunikacije i međusobne veze proteina i sekvence DNA te, naposljetku, informacije o mapiranju (bioinformatika).

Moć ekspresijske genomike i transkriptomike leži u simultanoj (paralelnoj) procjeni ekspresije gena u ogromnom broju uzoraka te pri raznovrsnim

uvjetima. Njima se omogućuje dobivanje uvida u transkripcijsko/translacijsko ponašanje visokog stupnja organizacije. Ovakav je pristup ključan za dobivanje informacija o kompleksnosti sustava. Naime, čini se da su upravo sveobuhvatne informacije o ekspresijskom profilu nekog sustava značajnije od ponašanja bilo kojeg pojedinačnog genetičkog elementa.

Nadalje, velika su očekivanja od primjene pristupa *-omika* u dijagnostici. Pritom su važna tri elementa: uspoređivanje, otkrivanje i predviđanje. Kad je riječ o uspoređivanju, primjenom *-omike* želimo odgovoriti na pitanje razlikuje li se ekspresijski profil između pojedinih skupina (klasa) i koji su geni/proteini različito eksprimirani između tih klasa; primjerice, razlika u ekspresijskom profilu između histoloških podtipova tumora, ili identifikiranje proteina čija je razina poremećena izlaganjem stanica djelovanju novog eksperimentalnog lijeka. Kad je riječ o otkrivanju, želimo ustanoviti podskupinu gena/proteina u određenom uzorku s obzirom na ekspresijski obrazac. Primjer predstavlja otkriće nepoznate podvrste limfoma na temelju ekspresijskog profila pojedinih skupina gena⁴. Naposljetku, želi se predvidjeti fenotip uz korištenje informacija dobivenih analizom ekspresijskog profila: koji će se bolesnik suočiti s teškim simptomima nakon uzimanja određenog lijeka, a koji neće imati nikakvih problema; ili se pak želi saznati koja će bolesnica s tumorom dojke i "negativnim" limfnim čvorovima doživjeti relaps unutar dvije godine nakon dijagnoze, a koja neće imati problema. Prednost ovakvog pristupa je u tome što testovi više nisu ograničeni na individualne gene ili protein, već rješavaju ekspresijski profil sveukupnih gena i proteina u danim fiziološkim i patološkim uvjetima.

Odgovori na pitanja poput onih je li moguće otkriti sklonost raku (ili sklonost drugim bolestima) iz seruma ili saznati koje će osobe i kako reagirati na određeni lijek, kakav će biti ishod bolesti i liječenja itd., čine se sve bliži. Neki od ciljeva funkcionalne genomike i proteomike već se ostvaruju u kliničkoj praksi. To su, prije svega, poboljšanje znanja o molekularnoj osnovi bolesti⁵, otkrivanje znatno osjetljivijih biomarkera (biljega) za prognozu i liječenje te predviđanje osjetljivosti na lijekove⁶.

Uz spoznaju o brojnim, praktičaru teško razumljivim bazičnim istraživanjima o proteomici, istovremeno se postavlja pitanje primjenjivosti proteomike u biomedicini. U posljednjih je nekoliko godina objavljeno mnoštvo zanimljivih kliničko-znanstvenih studija o primjeni proteomike u kliničkoj praksi. Neka od tih istraživanja čine solidnu osnovu za primjenu u medicinskoj svakodnevnicu, a neka su već pridonijela implementaciji novih kliničkih dijagnostičkih testova, poput otkrivanja metaboličkih bolesti u novorođenčadi. Radi se o brzjoj i relativno jeftinoj analizi iz krvi ili urina novorođenčeta, koja predstavlja uhodanu kliničku praksu u više od 40 zemalja svijeta. Analiza omogućava prepoznavanje poremećaja metabolizma aminokiselina, poremećaja oksidacije masnih kiselina te poremećaja organskih kiselina. Nadalje, hipoteza kako bi se patološke promjene unutar organa mogle odraziti na proteomski profil seruma, a s time bi se ujedno mogao koristiti serum kao izvor materijala za analizu, tj. rano otkrivanje bolesti, potvrđena je u jednoj od prvih objavljenih studija na tumorima jajnika⁷. Autori studije pretpostavili su da bi se patološke promjene unutar jajnika mogle odražavati u proteomskom profilu seruma s ciljem razlikovanja neoplastičkih jajnika od ostalih. Autori su razvili bioinformatički sustav te načinili proteomsku analizu seruma uz pomoć masene spektrometrije. Iako iznenađujući i kontroverzni, rezultati su pokazali da je proteomski profil omogućio identifikaciju svih 50 bolesnica koje imaju rak, uključujući i 18 bolesnica kojima je dijagnosticiran stadij I. Od 66 ne-malignih uzoraka proteomski je profil "prepoznao" čak njih 63. Osjetljivost metode bila je 100%, specifičnost 95%, a pozitivna prediktivna vrijednost testa čak 94%. Ova je studija jasno pokazala kako će biti moguće primijeniti proteomske metode za otkrivanje svih stadija tumora jajnika u visokorizičnoj populaciji te u općoj populaciji stanovništva. Nakon ove studije objavljeno je mnoštvo sličnih radova na drugim tumorima. Sva ta istraživanja, međutim, čekaju svoju potvrdu velikih multicentričnih kliničkih studija, no već se sada može reći kako će primjena tandemске spektrometrije masa u doglednoj budućnosti potaći značajan iskorak u medicini, osobito u dijagnostici.

Jasno je kako razvoj i implementacija metoda *-omike* u medicinskoj praksi predstavlja velik izazov pred nas. Uvjereni smo da će nakon njihove provjere i potvrde na velikim kliničkim istraživanjima (od kojih su neka upravo u tijeku u SAD-u i Europi), metode proteomike kao i metode ostalih *-omika* (glikomika, lipidomika, metabolomika, strukturna genomika itd.) postati dio standardnog medicinskog rječnika u doglednoj budućnosti, stoga već sada treba uhvatiti korak s nadolazećim promjenama i upoznati fascinantno, iako ponekad izuzetno složeno područje proteomike te nevjerojatne mogućnosti koje ona pruža, kako u samoj medicini, tako i u razvoju lijekova.

Neosporna je činjenica da kao aktivni subjekti (objekti) medicine postgenomskog doba svjedočimo gotovo (r)evolucinarnom napretku. Željeli mi to ili ne, vrata *-omika* bit će uskoro širom otvorena, no pitanje je hoćemo li biti spremni na izazove moderne potrage za zdravljem.

Iako cjeloživotno učenje postaje jedini mogući odgovor na tehnološki i općeznanstveni izazov u medicini, ne treba zaboraviti i vrlo važnu spoznaju – čovjek nije samo skup molekula i stanica, i jedino holistički, sveobuhvatan pristup, pridonijet će da *-omike* stvarno zažive u medicinskoj praksi.

LITERATURA

1. Kraljević S, Stambrook PJ, Pavelić K. Accelerating drug discovery. *EMBO rep* 2004;5: 837-42.
2. Bošnjak H, Pavelić K, Kraljević Pavelić S. Towards preventive medicine. High-throughput methods from molecular biology are about to change daily clinical practice. *EMBO rep* 2008;9:1056-60.
3. Fontana S, De Leo G, Sedić M, Kraljević Pavelić S, Alessandro R. Proteomics in antitumor research. *DDT: technologies* 2006;3:441-9.
4. Bustin SA. 'Lymphochips' and cancer profiles. *Mol Med Today* 2000;6:218.
5. Kraljević Pavelić S, Sedić M, Hock K, Vucinić S, Jurisic D, Gehrig P et al. An integrated proteomics approach for studying the molecular pathogenesis of Dupuytren's disease. *J Pathol* 2008;217:524-33.
6. Kraljević S, Sedić M, Scott M, Gehrig P, Schlapbach R, Pavelić K. Casting light on molecular events underlying anti-cancer drug treatment: What can be seen from the proteomic point of view? *Cancer Treat Rev* 2006;32:619-29.
7. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-7.