

Monika Dmitrzak-Węglarz, Joanna Hauser

Pracownia Diagnostyki Laboratoryjnej i Genetycznej Katedry Psychiatrii Akademii Medycznej w Poznaniu

Wykorzystanie badań proteomicznych w poszukiwaniu markerów biologicznych dla chorób psychicznych

Proteomic analysis in quest for biologic markers of psychiatric diseases

Abstract

The aim of this paper is to present the concept of proteomic analysis, technologies and opportunity of utilization proteomic methods in quest for biologic markers of psychiatric diseases.

key words: proteomics, central nervous system, psychiatric diseases

Wstęp

Intensywny rozwój metod biologii molekularnej z wykorzystaniem analizy sprzężeń i badań asocjacyjnych umożliwiły określenie rejonów genomu ludzkiego i wytypowanie genów kandydujących, predysponujących do takich chorób, jak: schizofrenia, choroba afektywna dwubiegunowa (BD, *bipolar disorder*), autyzm czy depresja. Mimo ogromnego postępu i zaangażowania wielu badaczy nadal nie ma rozstrzygających dowodów pozwalających na skonkretyzowanie genów i ich polimorfizmów odpowiedzialnych za daną jednostkę chorobową. Wynika to między innymi z faktu, że choroby psychiczne należą do chorób złożonych i wieloczynnikowych. Stosowane w tym wypadku badania sprzężeń mają kilka ograniczeń. Na przykład w schizofrenii oznaczono przynajmniej 12 różnych *loci* związanych z chorobą [1, 2], co oznacza, że poszukiwanie genów odpowiedzialnych za wystąpienie choroby psychicznej nie wiąże się z odkryciem genów, które w sposób deterministyczny warunkują wystąpienie choroby u określonej osoby, i należy rozważać również wiele innych czynników wpływających na ostateczny kształt produktów białkowych badanych genów i ich związek z chorobą. W tym celu stosunkowo

niedawno powstała proteomika, czyli nowa gałąź nauki zajmująca się badaniem struktury, funkcji i zależności między białkami.

Proteomika

Termin proteomika po raz pierwszy został użyty w 1994 roku podczas konferencji w Sienie przez profesora Marca Wilkinsa [3, 4]. Nazwę utworzono przez analogię do genomiki zajmującej się badaniem genomów, natomiast termin proteom pochodzi od angielskiego określenia *PROTEin complement of the genOME*, oznaczającego zbiór wszystkich białek kodowanych przez dany genom. Wielu badaczy zwraca uwagę na fakt, że proteomika jest dziedziną znacznie szerszą i bardziej złożoną od genomiki, ponieważ białka są trudniejszym obiektem badań od DNA, ze względu na ich przestrzenną strukturę i występowanie w wielocząsteczkowych kompleksach. Ponadto identyfikacja proteomu nie polega wyłącznie na stworzeniu listy białek znajdujących się w określonej komórce czy tkance. Istotą proteomiki jest poszukiwanie różnic w profilach białkowych, którymi różnią się osoby zdrowe i chore. Różnice te mogą stanowić przyczynę i konsekwencję choroby. Oprócz tego genom ma charakter statyczny i podlega zmianom w bardzo małym stopniu, natomiast proteom jest obiektem bardzo dynamicznym. Zestaw białek obecnych w komórce zmienia się nieustannie zależnie od fazy cyklu komór-

Adres do korespondencji:
dr Monika Dmitrzak-Węglarz
ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań
tel.: (0 61) 849 13 11; faks: (0 61) 848 03 92
e-mail: mweglarz@amp.edu.pl

kowego, na skutek oddziaływań z innymi komórkami w organizmie tworzącymi różne tkanki i organy czy w końcu ze względu na interakcję z czynnikami środowiskowymi (np. zależnie od panującej temperatury, czynników stresowych, diety). Na przykład w neuronach neuropeptydy syntetyzowane w ciele komórki są następnie transportowane do zakończeń aksonalnych i dopiero stamtąd uwalniane do przestrzeni synaptycznej. Tak więc przestrzenne usytuowanie danego białka może decydować o jego interakcjach z innymi białkami, a to z kolei może wpływać na jego funkcję.

Dzięki Projektowi Poznania Genomu Ludzkiego (HUGO, *Human Genome Project*) ustalono, że genom ludzki zawiera w przybliżeniu od 30 000 do 36 000 [4, 5] genów kodujących białka, a oznaczonych białek w ludzkim proteomie jest około 500 000 [6, 7]. Oznacza to, że na jeden gen przypada około 10 różnych wariantów białek. Za taki stan rzeczy odpowiadają procesy alternatywnego *splicingu* podczas translacji i powstawania informacyjnego kwasu rybonukleinowego (mRNA, *messenger ribonucleic acid*), a także procesy modyfikacji posttranslacyjnej, takie jak fosforylacja czy glikozylacja, które wpływają na ostateczną strukturę i funkcję białka [7]. W tej sytuacji wydaje się, że badanie samego genomu w celu poznania pierwotnego podłoża wielu chorób jest niewystarczające. Dlatego poszukiwanie biologicznych markerów choroby za pomocą metod proteomicznych jest kolejnym krokiem i ogromnym wyzwaniem dla badaczy szczególnie w dziedzinie neurologii i psychiatrii.

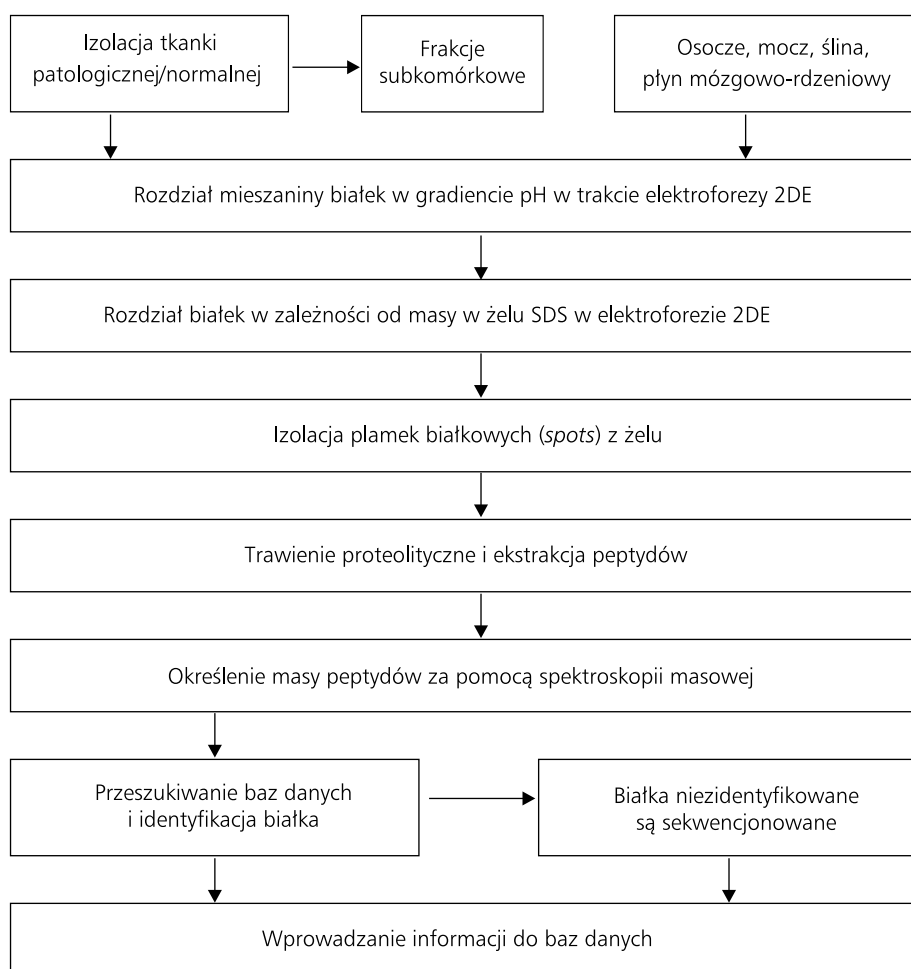
Organizacja Proteomu Ludzkiego — HUPO

Skatalogowanie wszystkich białek ludzkiego organizmu oraz przypisanie im określonych funkcji jest wielkim wyzwaniem dla nauki, dlatego w 2001 roku powołano Organizację Proteomu Ludzkiego (HUPO, *Human Proteome Organization*) [8], której celem była koordynacja badań proteomicznych w skali międzynarodowej [9, 10]. Projekt ten jest w pewnym sensie kontynuacją projektu HUGO, ale wyzwania przed nim stojące wydają się o wiele trudniejsze. Głównym założeniem projektu jest poznanie potranslacyjnych modyfikacji białek, ich skomplikowanych oddziaływań międzycząsteczkowych, lokalizacji w obrębie komórki, ekspresji w zależności od warunków otoczenia, rodzaju tkanki czy opisanie zmian ich ekspresji w czasie rozwoju i procesów patologicznych. Do osiągnięcia ostatecznego celu, czyli poznania funkcji poszczególnych białek, są wymagane nie tylko znaczne nakłady finansowe, ale również współpraca i koordynacja działań naukowców różnych specjalności. Projekt

wymaga nowego podejścia metodologicznego odchodzącego od prostej analizy poszczególnych białek, a zmierzającego ku opisaniu i zrozumieniu złożonego systemu, który te białka tworzą [11]. Największym wyzwaniem konsorcjum HUPO jest stworzenie biblioteki ludzkich przeciwciał, która pozwoliłaby na szeroką skalę oznaczać ekspresję białek za pomocą mikromacierzy białkowych. Ponadto projekt ten umożliwi standaryzację procedur, opracowanie metod statystycznych niezbędnych do analizy i interpretacji uzyskanych wyników [12].

Główne gałęzie proteomiki

Charakterystyka ekspresji białek (*expression proteomics*) polega na zidentyfikowaniu i scharakteryzowaniu wszystkich białek kodowanych przez geny aktywne w komórkach poszczególnych tkanek i organów oraz na znalezieniu różnic między białkami z tkanek osób zdrowych i chorych. Technologie opracowane w celu badania ekspresji białek wykorzystują materiał w postaci homogenatów tkankowych, surowicę, mocz oraz płyn mózgowo-rdzeniowy. Proces identyfikacji białek jest wieloetapowy (ryc. 1), a najczęściej stosowane techniki w badaniach ekspresji proteomu obejmują elektroforezę dwukierunkową (2DE), spektrometrię masową oraz inne formy spektrometrii, takie jak jonizacja laserem wspomagana matrycą (MALDI, *matrix-assisted laser desorption ionization*) czy desorpcja/ionizacja na modyfikowanych podłożach (SELDI, *surface enhanced laser desorption ionization*). Charakterystyka ekspresji białek pozwala na poszukiwanie i weryfikowanie biomarkerów chorobowych. Te z kolei można podzielić na 3 klasy: diagnostyczne, prognostyczne oraz predykcyjne. Markery diagnostyczne są wykorzystywane w klasycznej diagnostyce histopatologicznej, w szczególności w diagnostyce nowotworowej. Sprawdzone markery diagnostyczne w tej dziedzinie pozwalają na wykrycie nowotworu w bardzo wczesnym stadium, kiedy inne techniki neuroobrazowania zawodzą, co pozwala zmniejszyć koszty leczenia i uniknąć inwazyjnych metod diagnostycznych. Do markerów prognostycznych zalicza się między innymi receptory hormonów, markery angiogeniczne czy markery proliferacji. Te z kolei pozwalają na określenie stopnia złośliwości nowotworu, a tym samym na dobranie właściwego leczenia. Markery predykcyjne pozwalają na przewidywanie wystąpienia choroby i zastosowanie profilaktyki [13]. W przypadku chorób neurologicznych, psychicznych i wielu innych badania proteomiczne są dopiero w fazie eksperymentalnej, a więc dążącej do znalezienia biomarkerów białkowych, które pozwalałyby na weryfikację diagnozy



Rycina 1. Izolacja, identyfikacja i charakterystyka białek (za [7])

Figure 1. Isolation, identification and characteristics of proteins (adapted [7])

lekarskiej i zastosowanie ukierunkowanego leczenia. Z tego względu ta gałąź proteomiki związana z medycznymi zastosowaniami stwarza nadzieję na opracowanie metod pozwalających na szybszą diagnozę oraz postęp w leczeniu wielu chorób.

Proteomika funkcjonalna (*functional proteomics*) ocenia stan aktywacji oraz interakcji między białkami, co pozwala scharakteryzować drogę przekazywania sygnału w komórce. Określenie możliwych układów interakcji białko–białko może być użyteczne z kilku powodów. Jednym z nich jest określenie układów białkowych, co pozwala na identyfikację nowych białek zaangażowanych w powstanie choroby. Wiedza o nich pozwala na rozwój technik interwencji terapeutycznych i tworzenie leków ukierunkowanych na wybrane białka. W szerszym ujęciu proteomika funkcjonalna zajmuje się również opracowywaniem technik wytwarzania nowych białek i badaniem ich funkcji, możliwości opracowania technologii ich syntetyzowania

i wprowadzania do organizmu w celu uzupełnienia niedoborów lub braku danego białka w organizmie. Proteomika funkcjonalna wykorzystuje głównie technologię MALDI/SELDI oraz mikromacierze białkowe [13].

Techniki

Proteomika dysponuje wieloma technikami, które wynikają z modyfikacji i unowocześnień wdrożonych w kilku podstawowych technikach.

Dwuwymiarowa elektroforeza w żelu poliakryloamidowym (2DE)

Płyny ustrojowe i tkanki zawierają dużą ilość białek, często tworzących kompleksy, co wymaga ich rozdzielania przed dalszą analizą. Najczęściej stosowaną metodą jest dwukierunkowa elektroforeza w żelu poliakryloamidowym (2DE). Analiza ta jest dwustopniowa. W pierwszym etapie białka są rozdzielane w zależno-

ści od punktu izoelektrycznego (pI), będącego wartością pH, przy której białka posiadające grupy funkcyjne budujących je aminokwasów osiągną całkowity ładunek równy zero i ulegają unieruchomieniu. Wykorzystywany zakres pH dla rozdziału białek mieści się w granicach 3–10. W drugim etapie białka o podobnym punkcie izoelektrycznym są rozdzielane w zależności od masy w żelu zawierającym siarczan dodecylu sodu (SDS). W następnym etapie wzór białkowy jest wizualizowany poprzez wysrebrzenie lub barwienie (*Comassie blue* lub barwniki fluorescencyjne). Następnie plamki, tak zwane *spots* w żelu zawierające unieruchomione białka, podlegają identyfikacji. Rozdzielone plamki są usuwane z żelu, a białka w nich zawarte są poddawane enzymatycznej degradacji przy użyciu trypsyny [12, 14]. Na standardowym żelu (20 × 24 cm) możliwy jest rozdział od 2000 do 3000 białek [15].

Spektroskopia masowa

Rozdział białek i ich częściowa degradacja pozwalają na ich identyfikację przy zastosowaniu wysokoprępastowej metody opartej na spektrometrii masowej (MS, *mass spectrometry*), będącej uniwersalną techniką analityczną, której podstawą jest pomiar stosunku masy cząsteczki do ładunku elektrycznego jonów otrzymywanych z atomów lub związków chemicznych. Współcześnie istnieje wiele odmian tej techniki, z których każda posiada inne zastosowanie i wymaga stosowania aparatów o innej konstrukcji. Wszystkie te techniki są jednak oparte na jonizacji cząsteczek lub atomów, a następnie detekcji liczby i stosunku masy do ładunku (m/z) powstających jonów (ryc. 2). Wyniki działania spektrometru mas są przedstawiane w postaci tak zwanego widma masowego. Jedną z częściej stosowanych konfiguracji spektrometrów mas jest połączenie źródła jonów MALDI i analizatora czasu przelotu (TOF, *time of flight analyser*) (MALDI-TOF). Podstawową zaletą MALDI-TOF jest to, że technika ta umożliwia bezpośrednią detekcję składu populacji

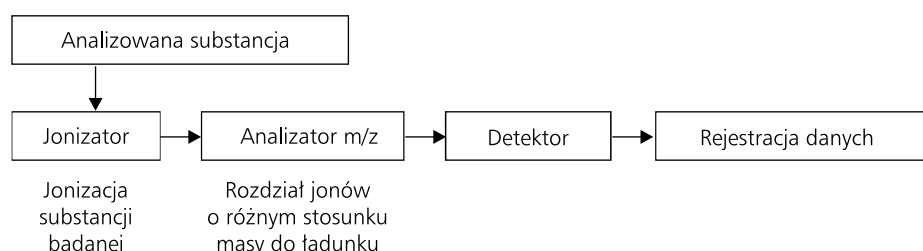
cząsteczek o dużych masach cząsteczkowych, takich jak mieszaniny białek, i dlatego spektrometry te są tak popularne przy identyfikacji białek w proteomice [16]. Naukowcy korzystają również z SELDI — spektroskopii czasu przelotu mas, która pozwala na odnalezienie jednego specyficznego białka w złożonej mieszaninie, opierając się na jego wadze [7, 15]. Spektroskopia masowa pozwala na identyfikację białek o masie cząsteczkowej poniżej 10 kDa [17].

Mikromacierze białkowe

Mikromacierze białkowe często nazywane też czujnikami białkowymi służą do dokładnego określenia typu i ilości białka w badanej tkance. Za pomocą takich przyrządów można określać, które z tysięcy istniejących w komórce białek oddziałują ze sobą. Wydają się być narzędziem, bez którego w przyszłości diagnostyka wielu chorób nie będzie możliwa, szczególnie, że materiałem wykorzystywanym jest osocze, łatwo dostępne i zawierające białka związane z innymi przebytymi chorobami. Macierze białkowe są wykonane z bardzo cienkich płytek, na których umieszcza się miliony kopii różnych przeciwciał, z których każde łączy się ściśle z określonym odcinkiem białka. Obecnie najczęściej wykorzystuje się metodę kanapkową, polegającą na wykrywaniu białka przez 2 różne przeciwciała, z których jedno wiąże cząsteczkę białka, a drugie przyłącza do niej znacznik fluorescencyjny. Tak przygotowany czujnik umieszcza się w czytniku sprzężonym z komputerem wyposażonym w odpowiednie oprogramowanie pozwalające na jakościowe i ilościowe oznaczenie białka.

Badania proteomiczne białek mózgowych

Tkanka mózgowa jest najbardziej skomplikowaną tkanką, o najwyższym stopniu organizacji, na którą składa się wiele różnych typów komórek budujących poszczególne warstwy mózgu. Tak wysoki stopień zróżnicowania komórek neuronalnych jest powodem, dla



Rycina 2. Działanie spektrometru masowego (na podstawie www.chemia.uj.edu.pl)

Figure 2. Mass spectrometry (adapted from www.chemia.uj.edu.pl)

którego przestają się one dzielić po osiągnięciu dojrzałości przez ludzki organizm, a to z kolei utrudnia izolację białek, co jest znacznym ograniczeniem i ogromnym wyzwaniem dla obecnie wykorzystywanych technik w analizie proteomicznej [16]. Projekt HUPO uruchomił międzynarodową inicjatywę stworzenia profilu białkowego wątroby (HLPP, *Human Liver Proteomics Project*), osocza (HPP, *Human Plasma Proteomics*) i mózgu (HBPP, *Human Brain Proteomics Project*). Celem projektu HBPP jest scharakteryzowanie proteomu mózgu człowieka i myszy, a następnie dokonanie porównania modelu zwierzęcego z osobami dotkniętymi chorobami neurodegeneracyjnymi. Badania obejmują zarówno tkankę mózgową, płyn mózgowo-rdzeniowy, jak i poszczególne struktury mózgu. Pierwsze doniesienia i raporty zostaną opublikowane w końcu tego roku [18]. Ponieważ celem tego artykułu jest przedstawienie przeglądu piśmiennictwa w zakresie badań proteomicznych chorób psychicznych, dalszy etap tych prac skupia się na wybranych jednostkach nozologicznych z dziedziny psychiatrii.

Osocze i surowica

Pierwsze badania proteomiczne w chorobach neurologicznych i psychicznych wykorzystywały osocze ze względu na łatwość dostępu i nieinwazyjną metodę pobierania materiału od pacjentów.

Jedno z pierwszych badań tego typu przeprowadzono w 1992 roku, a grupę badaną stanowili pacjenci z rozpoznaniem depresji oraz osoby zdrowe stanowiące grupę kontrolną. U pacjentów z depresją stwierdzono podwyższony poziom ekspresji białek należących do grupy ostrej fazy stanu zapalnego (APPs, *acute phase proteins*), wśród których wymieniono: antytrypsynę α_1 , haptoglobinę i ceruloplazminę [19]. Wyniki badań potwierdziły hipotezę o stanie zapalnym towarzyszącym depresji [19].

Podobne badanie przeprowadzono wśród 22 mężczyzn ze schizofrenią w porównaniu z grupą kontrolną obejmującą 20 osób [20]. Wyniki badań były bardzo podobne do tych uzyskanych w przypadku pacjentów z depresją. Również tu stwierdzono istotne statystycznie podwyższone stężenie białek APPs w osoczu. Łańcuch haptoglobiny Hp α -2 i β , antytrypsyny α , oraz prekursor czynnika uzupełniającego B wykazywały nadekspresję u pacjentów ze schizofrenią, podczas gdy stężenie apolipoproteiny A-I oraz transtyretyny (transtyretyna — białko transportujące tyroksyny wytwarzane głównie w wątrobie i splotach naczyńkowych mózgu [21]) było znacząco obniżone w stosunku do grupy kontrolnej [20]. Uzyskane wyniki również potwierdzają występowanie stanu zapalnego w przebiegu schi-

zofrenii zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami obejmującymi również pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową [22]. W najnowszych badaniach Wan i wsp., oprócz badań proteomicznych białek ostrej fazy stanu zapalnego, przeprowadzili badania asocjacyjne kilku polimorfizmów typu polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP, *single nucleotide polymorphism*) [23]. Badacze stwierdzili związek pomiędzy polimorfizmem A/G w intronie 2 genu kodującego łańcuch α heptaglobiny a schizofrenią. Również w badaniu proteomicznym stwierdzono podwyższone stężenie tego białka u pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną. Stwierdzona zwiększona ekspresja Hp α i zróżnicowana częstość genotypów Hp α u pacjentów potwierdzają związek tego białka ze schizofrenią. Uzyskane rezultaty z przeprowadzonych badań proteomicznych i genetycznych wskazują, że białka ostrej fazy stanu zapalnego są istotnym czynnikiem etiologicznym, a nie tylko symptomem towarzyszącym w schizofrenii.

W związku z hipotezą udziału cytokin w patomechanizmie chorób psychicznych przeprowadzono badanie stężenia interleukiny 12 (IL-12, *interleukin-12*) w osoczu u 102 pacjentów (43 ze schizofrenią, 34 z depresją, 25 z BD) i w 85-osobowej grupie kontrolnej po zastosowanym 8-tygodniowym leczeniu farmakologicznym. Stwierdzono wzrost stężenia IL-12 tylko u pacjentów z depresją. Wynik ten potwierdzał hipotezę o aktywacji procesu stanu zapalnego, jak również wskazywał na fakt, że leki przeciwdepresyjne zmniejszają stężenie IL-12 w osoczu pacjentów z depresją [24].

Prezentowane wyniki badań nie odznaczają się specyficznością ze względu na fakt, że bariera krew-mózg utrudnia oznaczenie wielu białek, których ekspresja ogranicza się do tkanki nerwowej ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Płyn mózgowo-rdzeniowy

Zmiany w koncentracji czy modyfikacje białek wchodzących w skład płynu mózgowo-rdzeniowego świadczą o patologicznym procesie toczącym się w OUN i stają się przedmiotem dla badań chorób OUN [14]. Bariera krew-mózg powoduje, że większości białek mózgowych nie udaje się oznaczyć w moczu, osoczu czy surowicy. W stanach chorobowych OUN obserwuje się wzrost stężenia białek w płynie mózgowo-rdzeniowym, które w normalnych warunkach jest niewielkie [13].

Jiang i wsp. [25] przeprowadzili analizę płynu mózgowo-rdzeniowego pacjentów ze schizofrenią, wykorzystując zarówno elektroforezę 2DE, jak i MALDI. W rozdiale 2DE uzyskano 200 plamek — miejsc zgrupo-

wania białek, tak zwanych *spots*. Zidentyfikowano produkty białkowe 54 genów — głównie białek osocza. Uzyskane wyniki wskazały na obniżoną ekspresję takich białek, jak: haptoglobina, fibrynogen czy Gc-globulina, jednak zmiany te nie osiągały istotności statystycznej. Jedynie stężenie apolipoproteiny A-IV (Apo A-IV) różniło się w istotny sposób u pacjentów ze schizofrenią w porównaniu z grupą kontrolną. Apolipoproteina A-IV jest glikoproteiną syntetyzowaną głównie w ścianie jelita cienkiego. U człowieka ApoA IV wiąże się z lipoproteinami bogatymi w triglicerydy i lipoproteinami HDL, odpowiada za transport cholesterolu z tkanek obwodowych do wątroby, gdzie cholesterol ulega eliminacji na skutek działania acylotransferazy lecytyna/cholesterol aktywowanej właśnie przez ApoA IV [26]. W osoczu tylko 25% Apo A-IV wchodzi w skład HDL, natomiast około 75% tej apolipoproteiny występuje w osoczu w postaci wolnej [27]. Niestety niewiele wiadomo na temat funkcji pełnionych przez to białko w mózgu. Ustalono, że Apo A-IV jest syntetyzowana w podwzgórzu, gdzie jako czynnik anoreksygeniczny działa synergistycznie z melankortyną, redukując przyjmowanie pokarmu [28]. Ze względu na podobieństwo budowy Apo A-IV z Apo E — czynnika ryzyka dla choroby Alzheimera (AD, *Alzheimer disease*) — przeprowadzono badania asocjacyjne dotyczące polimorfizmu w kodonie 360, którego efektem w cząsteczce białka jest substytucja glutaminy (Gln) w histydynę (His) w Apo A-IV. Badania te nie przyniosły rozstrzygających wyników, ponieważ w piśmiennictwie znajduje się jedno doniesienie pozytywne [29] i jedno doniesienie negatywne [30].

Niemieccy badacze w 2005 roku przedstawili pierwszą analizę proteomiczną płynu mózgowo-rdzeniowego u pacjentów z depresją wcześniej nieleczonych lekami antydepresyjnymi lub nieprzyjmujących leku przez co najmniej 2 tygodnie przed badaniem. Badaną grupę obejmującą 14 pacjentów podzielono na grupę pacjentów z próbą samobójczą w wywiadzie ($n = 7$) i grupę pacjentów bez prób samobójczych ($n = 7$). Rozdział białek płynu mózgowo-rdzeniowego w elektroforezie 2DE uwidoczniał różnice między pacjentami z próbami samobójczymi i bez. Stwierdzono obecność białka o przybliżonej masie 33 kD i punkcie izoelektrycznym 5.2. Niestety, ze względu na zbyt małą ilość materiału nie udało się tego białka zidentyfikować poprzez spektrometrię masową [31]. Była to pierwsza próba oceny różnic między pacjentami z depresją z wykorzystaniem metod proteomicznych, która w przyszłości pomoże w wyszukiwaniu nowych genów kandydujących niezależnie od funkcjonujących hipotez choroby.

Van Kammen i wsp. [32] przeprowadzili badania stężenia białka N-CAM (*neuronal cell adhesion molecule*)

w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów ze schizofrenią i podjęli próbę oceny wpływu leczenia, stanu klinicznego i wielkości struktur mózgowych ze stężeniem N-CAM. N-CAM jest neuronalnym białkiem adhezyjnym odpowiedzialnym za migrację komórek nerwowych, plastyczność synaptyczną i rozwój OUN. Dysfunkcja tego białka wiąże się z neurorozwojową hipotezą zaburzeń psychicznych [33–35]. Istnieje kilka izoform tego białka w ludzkim mózgu. Formy N-CAM związane z błoną mają wielkość 120, 140 i 180 kDa, natomiast dwie formy niezwiązane z błoną cN-CAM (*cleaved N-CAM*) mają wielkość odpowiednio 105 i 115 kDa [36]. Van Kammen i wsp. przeprowadzili badania u 45 pacjentów z diagnozą schizofrenii i zaburzeń schizoafektywnych oraz u 20 osób zdrowych. W przypadku pacjentów stężenie N-CAM oznaczano po osiągnięciu wyrównania stanu psychicznego w wyniku leczenia haloperidolem, a następnie po 6-tygodniowym okresie odstawienia leczenia i podawaniu placebo.

Stwierdzono istotnie wyższe stężenie N-CAM w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów ze schizofrenią w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,0005$). Stężenie N-CAM w płynie mózgowo-rdzeniowym nie korelowało z wiekiem pacjentów, początkiem zachorowania ani czasem trwania choroby. Po odstawieniu leku stwierdzono wyższe stężenie N-CAM u pacjentów z objawami negatywnymi w porównaniu z grupą kontrolną, zależności takiej nie stwierdzono u pacjentów z objawami pozytywnymi. Stwierdzono natomiast istotny wzrost stężenia N-CAM u pacjentów z rodzinną historią choroby w porównaniu z grupą kontrolną. Pacjenci przed wyłączeniem leczenia i po wyłączeniu nie różnili się istotnie statystycznie stężeniem N-CAM ani między sobą, ani w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki te wskazują, że ekspresja białka N-CAM jest niezależna od leczenia, a wyższe stężenie u pacjentów z rodzinną historią choroby wskazuje na dziedziczenie tej cechy z chorobą i związek z hipotezą neurorozwojową [32]. Niestety, białko to nie jest markerem specyficznym dla schizofrenii, ponieważ we wcześniejszych badaniach wyższe stężenie N-CAM stwierdzono również w przypadku pacjentów z zaburzeniami nastroju (*mood disorder*) [37]. W 2001 roku Vawter wykonał badania replikacyjne, rozszerzając je o wykorzystanie metody rozdziału elektroforetycznego 2DE, N-terminalne sekwencjonowanie i MALDI-TOF [36]. Dzięki temu scharakteryzowano zarówno izoformę N-CAM 180, jak i cN-CAM, a do badania wykorzystano płyn mózgowo-rdzeniowy oraz ekstrakt białek z kory potylicznej. Badanie to dowiodło, że forma cN-CAM jest fragmentem błonowej izoformy N-CAM

Tabela 1. Białka o zmienionej ekspresji u pacjentów z chorobami psychicznymi w porównaniu z grupą kontrolną (za [41])**Table 1.** Proteins with modified expression in psychiatric patients compared to healthy control subjects (adapted [41])

Nazwa białka	Symbol	Wzrost/spadek ekspresji u pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną	Choroby, w przypadku których stwierdzono zmiany	p
Białko i centrum reduktazy ubichinon-cytochrom C	UQCRC1 (P31930)	↓	Depresja	0,015
Białko DRP-2	DRP-2 (D78013)	↓	Depresja Schizofrenia BP	0,004 0,01 0,014
Aldolaza fructozo-1,6-bisfosforanu	(P09972)	↑	Schizofrenia BP Depresja	0,0023 0,0061 0,0009
Anhydraza węglowa I	(P00915)	↑	Depresja	0,0029
Glejowe zasadowe białko włókniste	GFAB (P14136)	↑	Schizofrenia BP	0,0011 0,0042

UQCRC1 (*ubiquitine cytochrome c reductase core complex protein 1*) — białko i centrum reduktazy ubichinon-cytochrom C; DRP-2 (*dihydropyrimidinase-related protein 2*) — białko DRP-2; GFAB (*glial fibrillary acidic protein*) — glejowe zasadowe białko włókniste

180 kDa, powstającym na drodze proteolizy. Wzrost stężenia cN-CAM u chorych na schizofrenię świadczy o zaburzeniach regulacji stabilności i degradacji N-CAM. Prawdopodobnie u chorych na schizofrenię wzrasta podatność N-CAM na działanie proteazy i neuroaminidazy. W związku z tym autorzy rozpatrują możliwe leczenie schizofrenii za pomocą inhibitorów proteazy i neuroaminidazy [36].

Tkanka mózgowa

W badaniach proteomicznych mózgu najlepszym materiałem do badań jest tkanka mózgowa. Jednak badania tej tkanki u człowieka są możliwe jedynie *post mortem*, co powoduje, że wiele białek szczególnie tych syntetyzowanych w bardzo małej ilości nie udaje się oznaczyć ze względu na bardzo szybko postępującą pośmiertną degradację białek i zbyt mało czułe sposoby ich wykrywania [38, 39]. Dodatkowo istotnym ograniczeniem jest brak dawców, a więc i materiału badawczego. W Stanach Zjednoczonych powstały banki tkanek mózgowych, którym pośmiertnie można zapisać na cele naukowe własny mózg. Informacje na ten temat można uzyskać na stronach internetowych poszczególnych uniwersytetów i jednostek naukowych prowadzących badania głównie nad chorobami neurodegeneracyjnymi (hasło *Brain Bank*). Zbie-

ranie tkanek mózgowych pochodzących od pacjentów z chorobami psychicznymi z diagnozą schizofrenii, choroby afektywnej dwubiegunowej czy depresji zajęła się Fundacja Stanleja, działająca przy Uniwersytecie Hopkinsa w Baltimore [40]. Na zebranych materiałach przy użyciu techniki elektroforezy 2DE i spektroskopii masowej udało się zidentyfikować 5 białek różniących się ekspresją w korze czołowej u pacjentów psychiatrycznych w porównaniu z grupą kontrolną (tab. 1). Materiał badany pochodził od pacjentów: ze schizofrenią (n = 24), z chorobą afektywną dwubiegunową (n = 23), z depresją (n = 19) oraz od 23 osób zdrowych [41]. Podobne poziomy ekspresji białek obserwowano w przypadku różnych diagnoz, co wskazuje, że wymienione (tab. 1) białka nie stanowią specyficznych biomarkerów dla poszczególnych chorób. Badacze z Nowej Zelandii porównali skład białek w tkance hipokampa pochodzącej od pacjentów ze schizofrenią, z chorobą Alzheimera i osób zdrowych. Udało się oznaczyć i porównać 549 białek. W schizofrenii stwierdzono zarówno wzrost, jak i obniżenie ekspresji w przypadku 8 różnych białek w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast w chorobie Alzheimera wzrost ekspresji stwierdzono w przypadku 35 białek a obniżenie w przypadku 73 białek. W jednym z białek wykazano obniżenie ekspresji

w przypadku obu chorób. Białko to dzięki N-terminalnemu sekwencjonowaniu scharakteryzowano jako inhibitor wiążący diazepam (DBI, *diazepam binding inhibitor*), który reguluje działanie receptora GABA-ergicznego (GABA-A) [42]. W kolejnych badaniach przeprowadzonych przez ten sam zespół określono kolejne białka o zmienionej w istotny sposób ekspresji w hipokampie osób ze schizofrenią w porównaniu z grupą kontrolną i określono ich lokalizację chromosomową: DBI — 6q12–q21, MnSOD (dysmutaza nadtlenu manganu) — 6q25.3, T-kompleks proteiny 1 — 6q25.3–q26 oraz CRMP 2 (*collapsin response mediator protein 2*) — 8p21. Trzy z wymienionych białek są kodowane przez geny zlokalizowane na długim ramieniu tego samego chromosomu, co może wskazywać na istotne znaczenie udziału chromosomu 6q w predyspozycji do zachorowania na schizofrenię [43]. Ponadto białka wykazujące zmienioną ekspresję wskazują na zaburzenia w ochronie antyoksydacyjnej w hipokampie u chorych na schizofrenię, a geny kodujące te białka mogą być potencjalnymi czynnikami ryzyka zachorowania na schizofrenię. Idąc tym tropem Prabakaran i wsp. w 2004 roku przeprowadzili analizę proteomiczną kory przedczołowej u 10 pacjentów ze schizofrenią i u 10 osób zdrowych [44]. Wśród białek istotnie różniących się poziomem ekspresji wyróżniono 19 białek mitochondrialnych, z czego 16 należało do szlaku stresu oksydacyjnego, a 3 były związane z funkcją peroksydomów. Zaburzenia procesów β -oksydacji składają się na zaburzenia wielu szlaków metabolicznych, na przykład podwyższona β -oksydacja skutkuje obniżeniem syntezy kwasów tłuszczowych i lipidów, co wiąże się z zaburzonymi procesami mielinizacji obserwowanymi w schizofrenii [45].

Najnowsze badania przeprowadzone przez zespół badaczy z Londynu potwierdzają zmiany w profilu białkowym tkanek przedniej części kory zakrętu obręczy pobranych *post mortem* od pacjentów ze schizofrenią. Stwierdzono zmienioną ekspresję 19 rodzajów białek, z których wszystkie oprócz trzech były wcześniej związane z chorobami psychicznymi. Badania te potwierdziły hipotezę o dysfunkcji białek mitochondrialnych i białek cytoszkieletu w neuropatologii chorób psychicznych [46].

Alternatywą dla badań proteomicznych ludzkiej tkanki mózgowej są modele zwierzęce [38]. W badaniach modelowych dla schizofrenii, szczurom podawano związek MK-801, a następnie po 8 i 18 dniach badano profil białkowy kory mózgowej. Stwierdzono zależność między długością trwania leczenia a ekspresją kilku białek, z których najbardziej zaskakujące były stężenia białek szoku termicznego HSP72 i HSP70

odmienne w różnych okresach leczenia [47]. W tych badaniach wykazano, że długość leczenia indukuje wyraźne zmiany w profilu białkowym mózgu. Obserwacje te mogą wpływać na identyfikację markerów choroby, jak i poszukiwanie celu dla nowych leków. Jednak i te badania mają wiele ograniczeń, jak choćby fakt domniemanej adekwatności modelu zwierzęcego dla danej choroby występującej u ludzi i różnice w ekspresji homologicznych białek człowieka i szczura [12].

Podsumowanie

Kliniczne znaczenie badań proteomicznych jest nadal dziedziną z niewykorzystanymi możliwościami. Proteomika umożliwia wczesną diagnozę z wykorzystaniem biomarkerów, których oznaczenie byłoby możliwe w surowicy lub płynach ustrojowych, a także możliwość odkrycia nowych metod terapeutycznych poprzez analizę specyficznych i nieprawidłowo działających białek w określonej chorobie. W przypadku chorób psychicznych badania proteomiczne prowadzi się od niedawna. Niewielka liczba publikacji sprawia, że prezentowane wyniki mają raczej charakter wstępny i na obecnym etapie nie mogą być wykorzystane w diagnostyce chorób psychicznych. Diagnoza stawiana przez lekarza psychiatrę, mimo wprowadzenia kryteriów diagnostycznych w postaci *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSMIV) i *International Classification of Diseases* (ICD 10), nadal ma charakter subiektywny, bez braku możliwości potwierdzenia jej przez jakiegokolwiek badania czy testy laboratoryjne. Z tego powodu badania proteomiczne otwierają szansę nie tylko na weryfikację kryteriów diagnostycznych i samej diagnozy lekarskiej, ale również na powstanie nowych wysoce selektywnych leków pozwalających na terapię dobieraną indywidualnie dla pacjenta, a w konsekwencji eliminację objawów niepożądanych. Ponadto proteomika kliniczna może być użyteczna w prognozowaniu odpowiedzi na podany lek i wybranie mniej lub bardziej agresywnej terapii. Pozwoli również na monitorowanie zmian zachodzących w organizmie pacjenta w trakcie terapii i po jej zakończeniu jako alternatywy dla badań radiologicznych, neurofizjologicznych czy serologicznych. Niemniej przed proteomiką stoi ogromne wyzwanie zarówno w sferze oznaczenia biomarkerów dla poszczególnych jednostek chorobowych i ich wykorzystania w diagnostyce i terapii, jak i opracowania technik, które staną się proste i niezbyt kosztowne dla laboratoriów, które miałyby się nimi posługiwać. Wymaga to też opracowania standardów tak, aby uzyskiwane wyniki były wiarygodne i powtarzalne.

Streszczenie

Celem artykułu jest przedstawienie założeń badań proteomicznych, stosowanych metod i możliwości wykorzystania tych badań w poszukiwaniu markerów biologicznych dla chorób psychicznych.

słowa kluczowe: proteomika, ośrodkowy układ nerwowy, choroby psychiczne

PIŚMIENNICTWO

- Baron M. Genetics of schizophrenia and the new millennium: progress and pitfalls. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 68: 299–312.
- Cowan W.M., Kopnisky K.L., Hyman S.E. The human genome project and its impact on psychiatry. *Annu. Rev. Neurosci.* 2002; 25: 1–50.
- Wilkins M.R., Sanchez J.C., Gooley A.A. i wsp. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 1996; 13: 19–50.
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B. i wsp. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860–921.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. i wsp. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304–1351.
- Stein L.D. Human genome: end of the beginning. *Nature* 2004; 431: 915–916.
- Kim S.I., Voshol H., van Oostrum J., Hastings T.G., Cascio M., Glucksman M.J. Neuroproteomics: expression profiling of the brain's proteomes in health and disease. *Neurochem. Res.* 2004; 29: 1317–1331.
- HUPO-<http://www.hupo.org>.
- Hanash S. Samir Hanash discusses how HUPO aims to globalize proteomics research (interview by Joanna Owens). *Drug Discov. Today* 2002; 7: 797–801.
- Merrick B.A. The human proteome organization (HUPO) and environmental health. *EHP Toxicogenomics* 2003; 111: 1–5.
- Bar-Yam: Dynamics of Complex Systems (Studies in Nonlinearity). Perseus Books Group 1997.
- Vercauteren F.G., Bergeron J.J., Vandesande F., Arckens L., Quirion R. Proteomic approaches in brain research and neuropharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 500: 385–398.
- Azad N.S., Rasool N., Annunziata C.M., Minasian L., Whitely G., Kohn E.C. Proteomics in clinical trials and practice: present uses and future promise. *Mol. Cell. Proteomics* 2006; 5 (10): 1819–1829.
- Yuan X., Desiderio D.M. Proteomics analysis of human cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005; 815: 179–189.
- Culter P., Gloger I.S., Debouck Ch. Meyers Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine. Wyd 2, Hardcover, 2005.
- Schmidt O., Schulenburg T., Meyer H.E., Marcus K., Hamacher M. How proteomics reveals potential biomarkers in brain diseases. *Expert. Rev. Proteomics* 2005; 2: 901–913.
- Romeo M.J., Espina V., Lowenthal M., Espina B.H., Petricoin E.F., 3rd, Liotta L.A. CSF proteome: a protein repository for potential biomarker identification. *Expert. Rev. Proteomics* 2005; 2: 57–70.
- HBPP-<http://www.hbpp.org>.
- Maes M., Scharpe S., Van Grootel L. i wsp. Higher alpha 1-antitrypsin, haptoglobin, ceruloplasmin and lower retinol binding protein plasma levels during depression: further evidence for the existence of an inflammatory response during that illness. *J. Affect. Disord.* 1992; 24: 183–192.
- Yang Y., Wan C., Li H. i wsp. Altered levels of acute phase proteins in the plasma of patients with schizophrenia. *Anal. Chem.* 2006; 78: 3571–3576.
- Wallace M.R., Dwulet F.E., Conneally P.M., Benson M.D. Biochemical and molecular genetic characterization of a new variant prealbumin associated with hereditary amyloidosis. *J. Clin. Invest.* 1986; 78: 6–12.
- Maes M., Delange J., Ranjan R. i wsp. Acute phase proteins in schizophrenia, mania and major depression: modulation by psychotropic drugs. *Psychiatry Res.* 1997; 66: 1–11.
- Wan C., La Y., Zhu H. i wsp. Abnormal changes of plasma acute phase proteins in schizophrenia and the relation between schizophrenia and haptoglobin (Hp) gene. *Amino Acids* 2006 (w druku).
- Kim Y.K., Suh I.B., Kim H. i wsp. The plasma levels of interleukin-12 in schizophrenia, major depression, and bipolar mania: effects of psychotropic drugs. *Mol. Psychiatry* 2002; 7: 1107–1114.
- Jiang L., Lindpaintner K., Li H.F. i wsp. Proteomic analysis of the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. *Amino Acids* 2003; 25: 49–57.
- Steinmetz A., Barbaras R., Ghalim N., Clavey V., Fruchart J.C., Ailhaud G. Human apolipoprotein A-IV binds to apolipoprotein A-IV/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 7859–7863.
- Steinmetz A., Utermann G. Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein A-IV. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 2258–2264.
- Gotoh K., Liu M., Benoit S.C. i wsp. Apolipoprotein A-IV interacts synergistically with melanocortins to reduce food intake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006; 290: R202–R207.
- Csaszar A., Kalman J., Szalai C., Janka Z., Romics L. Association of the apolipoprotein A-IV codon 360 mutation in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1997; 230: 151–154.
- Merched A., Xia Y., Papadopoulou A., Siest G., Visvikis S. Apolipoprotein AIV codon 360 mutation increases with human aging and is not associated with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1998; 242: 117–119.
- Brunner J., Bronisch T., Uhr M. i wsp. Proteomic analysis of the CSF in unmedicated patients with major depressive disorder reveals alterations in suicide attempters. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2005; 255: 438–440.
- van Kammen D.P., Poltorak M., Kelley M.E. i wsp. Further studies of elevated cerebrospinal fluid neuronal cell adhesion molecule in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 1998; 43: 680–686.
- Hemperly J.J., Murray B.A., Edelman G.M., Cunningham B.A. Sequence of a cDNA clone encoding the polysialic acid-rich and cytoplasmic domains of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986; 83: 3037–3041.
- McClain D.A., Edelman G.M. A neural cell adhesion molecule from human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1982; 79: 6380–6384.
- Vicente A.M., Macciardi F., Verga M. i wsp. NCAM and schizophrenia: genetic studies. *Mol. Psychiatry* 1997; 2: 65–69.
- Wawter M.P., Usen N., Thatcher L. i wsp. Characterization of human cleaved N-CAM and association with schizophrenia. *Exp. Neurol.* 2001; 172: 29–46.
- Poltorak M., Khoja I., Hemperly J.J., Williams J.R., el-Mallakh R., Freed W.J. Disturbances in cell recognition molecules (N-CAM and L1 antigen) in the CSF of patients with schizophrenia. *Exp. Neurol.* 1995; 131: 266–272.
- Voshol H., Glucksman M.J., van Oostrum J. Proteomics in the discovery of new therapeutic targets for psychiatric disease. *Curr. Mol. Med.* 2003; 3: 447–458.
- Pennington K., Cotter D., Dunn M.J. The role of proteomics in investigating psychiatric disorders. *Br. J. Psychiatry* 2005; 187: 4–6.
- Fundacja Stanleya działająca przy Uniwersytecie Hopkinsa w Baltimore www.stanleyresearch.org.

41. Johnston-Wilson N.L., Sims C.D., Hofmann J.P. i wsp. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. *Mol. Psychiatry* 2000; 5: 142–149.
42. Edgar P.F., Schonberger S.J., Dean B., Faull R.L., Kydd R., Cooper G.J. A comparative proteome analysis of hippocampal tissue from schizophrenic and Alzheimer's disease individuals. *Mol. Psychiatry* 1999; 4: 173–178.
43. Edgar P.F., Douglas J.E., Cooper G.J., Dean B., Kydd R., Faull R.L. Comparative proteome analysis of the hippocampus implicates chromosome 6q in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 2000; 5: 85–90.
44. Prabakaran S., Swatton J.E., Ryan M.M. i wsp. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol. Psychiatry* 2004; 9: 684–697, 643.
45. Hakak Y., Walker J.R., Li C. i wsp. Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98: 4746–4751.
46. Beasley C.L., Pennington K., Behan A., Wait R., Dunn M.J., Cotter D. Proteomic analysis of the anterior cingulate cortex in the major psychiatric disorders: Evidence for disease-associated changes. *Proteomics* 2006; 6: 3414–3425.
47. Paulson L., Martin P., Persson A. i wsp. Comparative genome- and proteome analysis of cerebral cortex from MK-801-treated rats. *J. Neurosci. Res.* 2003; 71: 526–533.