

La proteomica nella ricerca farmacologica

L. Carboni, E. Domenici

Molecular Medicine Psychiatry CEDD GlaxoSmithKline S.p.A.

Viene denominata proteomica l'analisi su larga scala delle proteine codificate da un genoma (1). L'analisi viene frequentemente effettuata mediante separazione elettroforetica su gel bidimensionali, seguita da identificazione delle proteine rivelate da un colorante, per mezzo della spettrometria di massa. Al contrario del genoma, il proteoma di un organismo o di un tessuto è dinamico e dipendente dalle condizioni in cui si sceglie di analizzarlo. La proteomica si impiega in farmacologia per indagare le modifiche al proteoma di cellule o tessuti indotte dal trattamento con agenti farmacologicamente attivi. Da questo tipo di analisi si ricavano informazioni globali sull'azione del composto stesso sui livelli di un grande numero di proteine contemporaneamente. Si possono perciò ottenere dati che consentono di ipotizzare un meccanismo di azione farmacologica di farmaci nuovi o ancora non ben caratterizzati. Oltre a questo, si possono scoprire i meccanismi di azione con cui sostanze attive provocano effetti tossici. L'analisi proteomica consente anche di chiarire quali siano le vie intracellulari di trasduzione del segnale che vengono modificate dal composto, che possono a loro volta costituire nuovi bersagli per farmaci attivi nello stesso tipo di patologia. Inoltre, si possono descrivere degli schemi di modifica del proteoma caratteristici di una classe di composti attivi o tossici allo scopo di confrontare nuovi appartenenti alla stessa classe. La ricerca proteomica potrebbe anche consentire l'identificazione di marcatori di dipendenza da sostanze psicotrope (2-5). Uno dei principali vantaggi dell'analisi proteomica rispetto ai metodi globali che studiano la trascrizione è la rilevanza biologica, dato che le proteine sono i veri effettori cellulari, al contrario degli RNA messaggeri. Un altro beneficio di questo tipo di informazione è la possibilità di rilevare la presenza di modifiche post-traduzionali indotte dal trattamento. Inoltre, eseguendo opportuni pre-frazionamenti, si

possono ottenere informazioni sulla localizzazione sub-cellulare ed eventuali traslocazioni sub-cellulari indotte dal farmaco possono essere evidenziate e caratterizzate. È anche possibile analizzare i livelli di proteine presenti in fluidi biologici. Per contro, l'analisi del proteoma non si presta ancora ad essere facilmente automatizzata, non riesce ad evidenziare variazioni nelle proteine espresse a basse concentrazioni e la struttura della proteina, in particolare la sua idrofilia, influenza la probabilità di riuscire ad individuarla su gel bidimensionali.

Di seguito riporterò alcuni esempi, tratti dalla nostra esperienza e da dati di letteratura, sulle possibili applicazioni di analisi proteomica in farmacologia.

Un obiettivo che può essere perseguito con la proteomica riguarda la possibilità di eseguire un trattamento farmacologico e di analizzare il proteoma di un tessuto bersaglio dell'azione del farmaco in modo da ottenere maggiori informazioni sul meccanismo di azione del farmaco stesso e sulle vie di trasduzione del segnale che esso attiva. In questo modo si possono ottenere suggerimenti per lo sviluppo di nuovi farmaci che abbiano come bersagli proteine diverse da quelle già note. Per ottenere questo tipo di informazioni, abbiamo eseguito una somministrazione passiva in ratti con antidepressivi appartenenti a diverse classi. Gli animali sono stati trattati con un antidepressivo impiegato in clinica appartenente alla classe degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina; con un appartenente ad una nuova classe di antagonisti del recettore 1 del neuropeptide CRF, che agisce sulla regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene; con un antagonista del recettore NK1 della sostanza P, una classe di farmaci in sperimentazione clinica come antidepressivi. Il trattamento è stato eseguito per via orale sia in acuto sia cronicamente per 21 giorni su gruppi costituiti da otto animali ciascuno. Un gruppo parallelo di animali che ricevevano il trattamento è stato impiegato

per uno studio farmacocinetico che valutasse che le concentrazioni ematiche del farmaco si mantenesse su livelli sufficienti a garantire dosaggi attivi. Il giorno seguente l'ultimo trattamento gli animali sono stati sacrificati e sono state eseguite una preparazione di siero e una dissezione di alcune aree cerebrali: l'ippocampo, la corteccia frontale, il cervelletto e il corpo striato. Sulle regioni cerebrali è stato effettuato uno studio di analisi trascrizionale. Su alcune regioni del cervello e sul siero stiamo conducendo un'analisi del proteoma mediante elettroforesi su gel bidimensionali, analisi di immagine e identificazione delle proteine regolate dal trattamento. Ciò che ci proponiamo di ricavare da questi studi è una serie di informazioni sull'esistenza di proteine e vie di trasduzione che vengano attivate da tutti gli antidepressivi da noi studiati. Inoltre, siamo anche interessati a conoscere quali siano le vie specificamente coinvolte nella risposta ad ognuna di queste classi di antidepressivi. Da questi dati speriamo di ricavare suggerimenti per bersagli per nuovi farmaci o per marcatori di risposta terapeutica.

Un altro obiettivo della ricerca farmacologica che può essere perseguito con la proteomica è la ricerca di marcatori per la dipendenza da sostanze farmacologicamente attive. Abbiamo eseguito alcuni esperimenti per ottenere queste informazioni nel caso della dipendenza da nicotina. Lo studio è diviso in due paradigmi sperimentali. Nella prima parte abbiamo impiegato un modello di somministrazione passiva di nicotina a 0.4 mg/kg oppure veicolo per 14 giorni per via sottocutanea. Ogni gruppo sperimentale comprendeva cinque ratti. Dopo l'ultimo trattamento il sangue è stato prelevato per eseguire preparazioni di siero e di leucociti, separando i mononucleati dai polimorfonucleati. Le preparazioni sono state analizzate con elettroforesi ed analisi di immagine e la spettrometria di massa ci ha permesso di identificare una serie di proteine presenti a diversi livelli dopo trattamento cronico con nicotina (36 nel siero, cinque nei mononucleati e sette nei polimorfonucleati). Nel secondo paradigma sperimentale abbiamo impiegato un modello in cui i ratti vengono addestrati ad autosomministrarsi la nicotina, un comportamento che essi acquisiscono dato che la sostanza è in grado di indurre dipendenza. Il siero è stato prelevato sui ratti (n = 6) prima che l'autosomministrazione iniziasse; in due tempi diversi durante l'autosomministrazione; in due diversi momenti dopo l'estinzione di questo comportamento, per riprodurre lo stato di astinenza; e dopo una nuova somministrazione, per modellare la ricaduta nella dipendenza. L'analisi con elettroforesi bidimensionale dei 72 gel ha prodotto l'identificazione di una serie di proteine i cui livelli si sono modificati durante gli stadi di autosomministrazione, di astinenza o di ricaduta. Queste proteine verranno ulteriormente studiate per verificare la possibilità che costituiscano marcatori di dipendenza.

Un altro obiettivo che si può perseguire con l'impiego della proteomica è l'identificazione di uno schema di modulazione dei livelli proteici che è caratteristico dell'efficacia di un farmaco o della sua tossicità. Questa informazione si può ottenere studiando i pattern di modulazione dei livelli di proteine che siano indotti da una serie di composti appartenenti alla stessa classe. Dal confronto di questi schemi si possono ricavare informazioni sull'efficacia di ulteriori farmaci appartenenti alla medesima classe (6,7).

Un altro tipo di informazione reperibile con studi proteomici è la ricerca di meccanismi di tossicità. In questo caso, il trattamento di un tessuto o di una linea cellulare con un composto tossico produce una modifica nei livelli di proteine che sono coinvolte nell'azione tossica del composto stesso. L'identificazione di queste proteine può permettere di identificare quale sia il meccanismo con cui la tossicità si esercita (8-11).

Un altro obiettivo dell'analisi delle modifiche al proteoma dopo trattamento con sostanze attive è lo studio della selettività del farmaco. Infatti, oltre ad analizzare l'azione di un farmaco sul suo bersaglio specifico, con l'approccio proteomico se ne possono misurare gli effetti sui suoi bersagli secondari (12,13).

Inoltre, l'utilizzo di un'analisi proteomica può essere impiegato per la ricerca di nuovi lead compounds. Infatti, dal confronto delle vie biochimiche che vengono attivate da composti noti con quelle che vengono modulate da nuovi composti si possono ricavare informazioni su nuovi composti di cui si sta studiando l'attività (14).

In conclusione, l'analisi delle modifiche al proteoma indotte dal trattamento con composti attivi permette al farmacologo di ricavare una serie di utili informazioni sul meccanismo di azione del farmaco stesso. E' perciò probabile che l'uso di questa tecnologia sia destinato ad ulteriormente ampliarsi in futuro.

Bibliografia

1. Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. Proteome research: new frontiers in functional genomics. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Eds.; 1997.
2. Steiner S, Anderson NL. Expression profiling in toxicology – potentials and limitations. *Toxicol Lett* 2000; 112-113: 467-71.
3. Steiner S, Witzmann FA. Proteomics: applications and opportunities in preclinical drug development. *Electrophoresis* 2000; 21: 2099-104.
4. Wilkins MR. What do we want from proteomics in the detection and avoidance of adverse drug reactions. *Toxicol Lett* 2002; 127: 245-9.
5. Hellmold H, Nilsson CB, Schuppe-Koistinen I, Kenne K, Warngard L. Identification of end points relevant to detection of potentially adverse drug reactions. *Toxicol. Lett.* 2002; 127: 239-43.

6. Eberini I, Miller I, Zancan V, Bolego C, Puglisi L, Gemeiner M, Gianazza E. Proteins of rat serum IV. Time-course of acute-phase protein expression and its modulation by indomethacine. *Electrophoresis* 1999; 20: 846-53.
7. Eberini I, Agnello D, Miller I, Villa P, Fratelli M, Ghezzi P, Gemeiner M, Chan J, Aebersold R, Gianazza E. Proteins of rat serum V: Adjuvant arthritis and its modulation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Electrophoresis* 2000; 21: 2170-9.
8. Aicher L, Wahl D, Arce A, Grenet O, Steiner S. New insights into cyclosporin A nephrotoxicity by proteome analysis. *Electrophoresis* 1998; 19: 1998-2003.
9. Möller A, Malerczyk C, Völker U, Stöppler H, Maser E. (2002). Monitoring daunorubicin-induced alterations in protein expression in pancreas carcinoma cells by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2002; 2: 697-705.
10. Krapfenbauer K, Berger M, Friedlein A, Lubec G, Fountoulakis M. Changes in the levels of low-abundance brain proteins induced by kainic acid. *Eur J Biochem* 2001; 268: 3532-7.
11. Charlwood J, Skehel JM, King N, Camilleri P, Lord P, Bugelski Atif U. Proteomic analysis of rat kidney cortex following treatment with gentamicin. *J Proteome Res* 2002; 1: 73-82.
12. Otterness IG, Daumy GO, Gollaher MG Jr, Downs JT, Zuzel TJ, Bliven ML, Merenda JM. Determining selectivity of drugs by quantitative two-dimensional gel analysis. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 917-25.
13. Steiner S, Gatlin CL, Lennon JJ, McGrath AM, Seonarain MD, Makusky AJ, Aponte AM, Esquer-Blasco R, Anderson NL. Cholesterol biosynthesis regulation and protein changes in rat liver following treatment with fluvastatin. *Toxicol Lett* 2001; 120: 369-77.
14. Myers TG, Anderson NL, Waltham M, Li G, Buolamwini JK, Scudiero DA, Paull KD, Sausville EA, Weinstein JN. A protein expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Electrophoresis* 1997; 18: 647-53.