

Microarrays proteici e proteomica: nuove tecnologie per l'identificazione di marker biologici

M. Facco, M. Miorin, C. Agostini

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Padova.

La ricerca biomedica ha compiuto notevoli e rapidi progressi negli ultimi anni grazie al sequenziamento del genoma umano ed alla disponibilità di tecnologie quali i DNA array: la rappresentazione di ogni gene umano in un singolo chip, infatti, permette, almeno teoricamente, la quantificazione dell'espressione genica in ogni tessuto (1). In questo contesto, la proteomica è figlia naturale della genomica poiché, se da un lato i DNA array dipendono dalla retrotrascrizione dell'RNA messaggero, dall'altro gli array proteici permettono una misurazione diretta dei prodotti genici, con gli obiettivi dichiarati di definire la quantità, le modificazioni, l'attività, la localizzazione e le interazioni di tutte le proteine del campione in esame. Attualmente le tecnologie disponibili limitano le nostre analisi alla valutazione contemporanea di uno o due di questi parametri e soltanto in relazione ad una frazione proteica. Esistono, perciò, array che permettono una proteomica quantitativa ed altri che sviluppano invece una proteomica funzionale, volta a definire la funzione di ogni proteina di un dato organismo (2).

Proprio grazie alle sue caratteristiche ed alla sua versatilità, la tecnologia dei microarray proteici si inserisce sia nella valutazione quantitativa che funzionale del proteoma. Un microarray proteico è costituito da un supporto solido (slide) sul quale diversi reagenti (proteine purificate, peptidi, anticorpi, allergeni,...) sono depositati ("spottati", in gergo tecnico) in maniera ordinata e ad una specifica e definita densità (fino a 500 molecole/spot di 150 mm). Ognuno di questi agenti cattura la propria proteina target, isolandola così da una miscela complessa, quale può essere, per esempio, un lisato cellulare, e le proteine catturate vengono successivamente evidenziate e quantificate o valutate per quanto concerne la loro attività, le modificazioni, le interazioni proteina-proteina.

Nonostante l'esistenza di diversi microarray proteici

e di differenti approcci per la loro generazione, un comune passaggio critico nella loro produzione è legato alla distribuzione del set proteico che deve avvenire senza provocare la denaturazione delle proteine ed in modo che le quantità depositate siano sufficienti per la realizzazione del test. A questo scopo, recentemente sono comparsi array proteici costruiti su supporti di vetro, d'oro, di polistirene, al fine di minimizzare la perdita di materiale proteico (soprattutto anticorpi) durante le procedure di legame e di lavaggio. Inoltre, attraverso sofisticate tecniche di microingegneria, sono stati costruiti chips la cui superficie risulta modificata dalla presenza di micropozzetti, microcanali e microchiusure, la cui funzione è quella di ridurre l'evaporazione e la denaturazione degli agenti "spottati" sul supporto, di aumentare la capacità di binding-protein e di prevenire la cross-contaminazione tra i vari agenti depositati (proprio perché fisicamente separati) (3-5).

Cimentato il campione con il microarray e bloccata la proteina target, è necessario rivelare la sua presenza sulla slide e, possibilmente, quantificarla. Generalmente, la visualizzazione di un microarray proteico è affidata all'utilizzo di fluorocromi coniugati allo stesso target o ad un anticorpo. I fluorocromi attualmente più utilizzati sono Cy3, Cy5 ed Alexa. Cy3 e Cy5 sono gli stessi fluorocromi maggiormente utilizzati anche nei DNA microarray. La fluorescenza emessa in seguito all'eccitazione viene raccolta da un apposito apparato scanner o da un microscopio a fluorescenza o da un microscopio confocale.

L'immagine ottenuta da un array proteico è innanzitutto una conferma qualitativa dell'avvenuto legame tra l'agente sulla slide ed il suo target proteico. La quantificazione del target è un aspetto più complesso sia per l'analisi statistica necessaria per attribuire una corretta significatività al segnale ac-

quisito sia perché il segnale stesso può andare incontro a saturazione qualora la concentrazione della proteina target sia superiore a 1mg/mL. Al contrario, a basse concentrazioni esiste una correlazione lineare tra l'intensità di fluorescenza e la concentrazione proteica. Il limite di sensibilità attualmente raggiunto è di circa 150 fg/mL, paragonabile al range di quantificazione dei DNA array (6).

Data la recente introduzione dei microarray proteici e la conseguente mancanza di una standardizzazione internazionale, tutti i dati ottenuti attraverso questa tecnologia devono essere validati attraverso l'impiego di tecniche più "tradizionali", considerate come standard, quali: test ELISA, RIA, western blotting ed immunoblotting.

Nel vasto ambito dei microarray proteici, i microarray basati sull'uso di anticorpi (antibody array), i microarray basati sull'uso di antigeni (antigen array), i microarray basati sull'uso di autoantigeni (autoantigen array) e la DiscernArray technology sono le tecnologie attualmente in maggiore evoluzione.

Gli antibody array vengono realizzati impiegando supporti sulla superficie dei quali gli anticorpi vengono depositati, in maniera completamente automatizzata, e lasciati asciugare. La superficie rimanente viene bloccata con una soluzione idonea (per esempio, siero albumina bovina) prima di applicare il campione da testare. Le proteine del campione catturate dall'anticorpo immobilizzato vengono identificate o perché direttamente marcate con un fluorocromo o in seguito all'aggiunta di un anticorpo marcato che riconosce un altro epitopo della proteina target (6). Questo tipo di saggio era stato originariamente concepito come un detector multi-analitico, ma è parso subito evidente come il suo utilizzo potesse essere esteso a numerosi e svariati ambiti, tra i quali la diagnosi di malattie, la determinazione di fattori predittivi per lo sviluppo di specifiche malattie, la scoperta di nuovi farmaci e lo sviluppo, quindi, di nuove terapie.

Una delle prime e più importanti applicazioni degli antibody array è stata l'analisi proteomica delle cellule di carcinoma del colon LoVo in risposta al trattamento con radiazioni ionizzanti (7). Le proteine ottenute dai lisati delle cellule non irradiate ed irradiate sono state marcate, rispettivamente, con i fluorocromi Cy3 e Cy5. I campioni sono stati successivamente mescolati ed applicati ad un microarray costituito da 146 anticorpi diversi rivolti contro proteine coinvolte nella risposta allo stress, nella progressione del ciclo cellulare e nell'apoptosi. Oltre ad osservare l'up-regolazione di cinque proteine apoptotiche già conosciute, Sreekumar e coll. (7) hanno scoperto sei nuove proteine che venivano up-regolate ed una, il CEA, che veniva down-regolata. Questi risultati sono stati confermati mediante immunoblotting. L'importanza di questo studio risiede nel fatto che dimostra come i microarray proteici possano fornire nuove informazioni e permettere

perciò lo sviluppo di nuove ipotesi sia patogenetiche che terapeutiche.

Un'ulteriore interessante applicazione degli antibody microarray è stata effettuata da Belov e coll. (8), i quali hanno impiegato un microarray con 60 anticorpi diretti contro antigeni di cluster di differenziazione (CD) per immunofenotipizzare i leucociti ottenuti da soggetti sani e da pazienti con diversi tipi di leucemia. Dato che gli antigeni ricercati sono espressi sulla superficie delle cellule, i ricercatori hanno potuto applicare al microarray cellule intere in sospensione, successivamente evidenziate con il microscopio confocale. Dal pattern di espressione dei CD, Belov ha definito un fingerprint diagnostico per la leucemia linfatica cronica, ed attualmente sta impiegando questo microarray per stabilire fingerprint per altri tipi di leucemia.

Un'altra grande classe di microarray proteici è quella comprendente gli antigen microarray e gli autoantigen microarray. In entrambi i casi si tratta di array in grado di evidenziare nel campione, anche se con diverse finalità, la presenza contemporanea di anticorpi con diversa specificità. L'impiego di questi saggi presenta notevoli potenzialità nell'ambito della ricerca epidemiologica, nello sviluppo di nuovi vaccini, nella diagnosi di allergie, di malattie autoimmuni ed infettive.

A questo proposito, Mezzasoma e coll. (9) hanno generato un microarray proteico "spottando", in modo automatizzato, una serie di antigeni microbici per la determinazione simultanea, nel siero dei pazienti, di anticorpi rivolti contro *Toxoplasma gondii*, il virus *rubella*, il *citomegalovirus* ed i virus *herpes simplex* di tipo 1 e 2 (i cosiddetti antigeni ToRCH). Le slides di vetro così assemblate sono state incubate con i campioni e, successivamente, con anticorpi secondari coniugati con fluorocromi. Le immunoglobuline M (IgM) e le IgG umane legate agli antigeni spottati sono state evidenziate mediante microscopia confocale e quantificate attraverso curve interne di calibrazione. I risultati ottenuti, che hanno evidenziato un limite di sensibilità pari a 0,5 pg per IgM o IgG legate alla slide, sono stati validati attraverso l'impiego di test ELISA. La concordanza dei dati ottenuti attraverso le due metodiche è risultata superiore al 90%. Inoltre, l'analisi comparativa tra il microarray proteico ed i test ELISA ha indicato come i vantaggi del microarray risiedano nel numero di analiti determinati contemporaneamente su ciascuna slide, nel tempo impiegato e nei costi, rispetto ai test ELISA dove ogni analita è determinato in un saggio separato, aumentando di conseguenza tempi e costi.

Per quanto riguarda gli autoantigen microarray, il più valido e finora più esteso microarray basato sugli autoantigeni è stato costruito da Robinson e coll. (10) ed è basato sullo "spotting" dei principali autoantigeni riconosciuti dagli autoanticorpi di pazienti sofferenti di alcune tra le più note malattie autoimmuni,

tra cui il lupus eritematoso sistemico, l'artrite reumatoide, la sindrome di Sjogren, la polimiosite, la cirrosi biliare primaria, lo scleroderma diffuso e limitato. In particolare, questo microarray era costituito da un set di 1152 chips contenenti 196 diversi autoantigeni comprendenti proteine, peptidi, DNA, complessi enzimatici e complessi ribonucleoproteici. Attraverso questo approccio proteomico, Robinson e coll. hanno determinato la presenza nel siero dei pazienti degli autoanticorpi specifici per la malattia autoimmune considerata. Inoltre, hanno identificato l'isotipo anticorpale e la presenza di autoanticorpi diretti contro modificazioni proteiche post-traslazionali. La sensibilità dimostrata dal test è risultata pari a 1 ng/mL (dalle 4 alle 8 volte maggiore rispetto agli ELISA convenzionali impiegati per la validazione). Gli autoantigen microarray, quindi, non solo permettono di ricercare autoanticorpi impiegando migliaia di antigeni, ma presentano anche numerose potenziali applicazioni, quali: a) rapidi screening per la determinazione di specificità autoanticorpali associate a specifiche malattie autoimmuni, e quindi diagnosi e trattamenti precoci; b) caratterizzazione simultanea di specificità e diversità della risposta autoanticorpale; c) determinazione della sottoclasse isotopica; d) sviluppo di terapie antigene specifiche; e) identificazione di nuovi autoantigeni.

L'ultima tecnologia di seguito presentata, nell'ambito dei microarray proteici, è un vero e proprio anello di congiunzione tra la genomica e la proteomica. Infatti, il DiscernArray (11) è una tecnologia, il cui sviluppo è ancora a livello embrionale, che permette la creazione di microarray proteici direttamente dal DNA ottenuto in PCR o RT-PCR: proteine e frammenti proteici vengono direttamente sintetizzati dal DNA ed immobilizzati sul supporto dell'array. Il processo si articola in tre fasi: 1- il gene da "saggiare" viene amplificato mediante PCR o RT-PCR. Durante la reazione vengono inseriti elementi necessari per l'espressione proteica e per l'immobilizzazione della proteina al supporto (sequenza Tag); 2- attraverso un sistema cell-free che associa trascrizione e traduzione, vengono prodotte proteine-Tag che si legano ad una superficie Tag-binding; 3- il microarray proteico così sviluppato può essere impiegato per l'analisi di interazioni proteina-proteina o per saggiare diverse attività enzimatiche. Finora, questo approccio è stato impiegato per generare frammenti anticorpali, ligand-binding proteins, domini funzionali ed enzimi. Considerando infine che il DiscernArray può essere condotto anche su DNA immobilizzato, He e coll. stanno valutando la possibilità di convertire un DNA array direttamente in un array proteico (11).

Il fine della proteomica è di definire la funzione di ogni proteina nella cellula e come questa funzione cambi a seconda del microambiente, delle modifiche strutturali e conformazionali, della localizzazione cellulare e del tipo di interazioni a cui la proteina

può andare incontro. I microarray proteici costituiscono solo una parte delle tecnologie che si stanno sviluppando per analizzare e comprendere il proteoma e le sue alterazioni (12,13); risultano, tuttavia, uno degli approcci attualmente più innovativi per potenzialità di applicazioni e quantità di informazioni che possono fornire. È logico quindi prevedere che lo sviluppo di questa tecnologia determinerà un sostanziale aumento della conoscenza delle malattie e dei loro meccanismi patogenetici e, conseguentemente, permetterà diagnosi precoci ed approcci terapeutici mirati.

Bibliografia

1. Lockhart DJ, Winzler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000; 405:827-36.
2. MacBeath G. Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet* 2002; 32:526-32.
3. Zhu H, Klemic JF, Chang S, Bertone P, Casamayor A, Klemic KG, et al. Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet* 2000; 26:283-9.
4. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 2001; 293:2101-5.
5. MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 2000; 289:1760-3.
6. Lal SP, Christopherson RI, dos Remedios CG. Antibody arrays: an embryonic but rapidly growing technology. *Drug Discov Today* 2002; 7:S143-9.
7. Sreekumar A, Nyati MK, Varambally S, Barrette TR, Ghosh D, Lawrence TS, et al. Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. *Cancer Res* 2001; 61:7585-93.
8. Belov L, de la Vega O, dos Remedios CG, Mulligan SP, Christopherson RI. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer Res* 2001; 61:4483-9.
9. Mezzasoma L, Bacarese-Hamilton T, Di Cristina M, Rossi R, Bistoni F, Crisanti A. Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin Chem* 2002; 48:121-30.
10. Robinson WH, DiGennaro C, Hueber W, Haab BB, Kamachi M, Dean EJ, et al. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 2002; 8:295-301.
11. He M, Taussig MJ. DiscernArray technology: a cell-free method for the generation of protein arrays from PCR DNA. *J Immunol Methods* 2003; 274:265-70.
12. Huels C, Muellner S, Meyer HE, Cahill DJ. The impact of protein biochips and microarrays on the drug development process. *Drug Discov Today* 2002; 7:S119-24.
13. Hanash S. Disease proteomics. *Nature* 2003; 422:226-32.