

Zastosowanie macierzy DNA w badaniach nad ośrodkowym układem nerwowym

Jan Rodriguez Parkitna

Zakład Neurofarmakologii Molekularnej, Instytut Farmakologii PAN, ul. Smętna 12, 31-343 Kraków
rodrig@if-pan.krakow.pl

Streszczenie

Ogłoszenie wyników sekwencjonowania genomów otworzyło nowe możliwości w badaniach nad ekspresją genów. Możliwa stała się konstrukcja macierzy, na których immobilizowane są sondy odpowiadające wszystkim znanym transkryptom danego organizmu. Dzięki wykorzystaniu macierzy DNA dokonano przełomu w klasyfikacji nowotworów, szczególnie w przypadkach gdzie analiza histopatologiczna nie pozwalała na jednoznaczną diagnozę. Pomimo trudności metodycznych, ponawiane są próby wykorzystania macierzy do badań nad funkcją i patologią ośrodkowego układu nerwowego. Trwają próby wyjaśnienia molekularnego podłoża zaburzeń takich jak schizofrenia, zaburzenia dwubiegunowe, czy uzależnienia lekowe. Jakkolwiek nie można jeszcze mówić o przełomie, badania zmian w ekspresji genów za pomocą macierzy DNA powoli odsłaniają molekularne mechanizmy leżące u podłoża tych schorzeń.

Częścią odpowiedzi komórki na sygnały zewnętrzne jest hamowanie lub nasilenie ekspresji poszczególnych genów. Owoce zmian w transkrypcji może być zarówno kaskada zmian prowadząca na przykład do różnicowania komórki, jak też adaptacja do zmienionych warunków, w przypadku długotrwałego podawania leków. Identyfikacja charakterystycznych dla danego bodźca zmian w ekspresji genów pozwala zrozumieć ich molekularne podłoże. Dlatego też, najwięcej wysiłków badaczy skupionych jest na badaniu zmian wywołanych nowotworzeniem lub innymi stanami patologicznymi. Pozwoliło to na identyfikację charakterystycznych zmian w transkrypcji pozwalając na dokładną diagnostykę, co może dać początek opracowaniu nowych terapii. Celem tego opracowania jest przybliżenie teoretycznych podstaw, na których opiera się technologia macierzy DNA i zilustrowanie ich zastosowań przykładami pokazującymi ich wykorzystanie w badaniach nad ośrodkowym układem nerwowym.

Zastosowanie macierzy DNA w badaniach nad ekspresją genów w ośrodkowym układzie nerwowym

Zastosowanie macierzy DNA przyniosło największe sukcesy w badaniach nad nowotworami. Profilowanie ekspresji za pomocą macierzy pozwala na precyzyj-

ne sklasyfikowanie rodzajów nowotworów, wybranie najbardziej charakterystycznych elementów profilu i korelowanie ich z rokowaniami. Z drugiej strony, badania ośrodkowego układu nerwowego wykorzystujące macierze DNA są znacząco utrudnione przez jego złożoność. Wraz ze wzrostem ilości różnych populacji komórek i spadkiem liczości badanych mRNA wiarygodność uzyskiwanych wyników maleje (Mirnics et al. 2001). Pomimo przeszkody jaką stanowi złożoność ośrodkowego układu nerwowego, macierze są bardzo chętnie stosowane w badaniach nad funkcją lub patologiami mózgu i rdzenia kręgowego. Ilustracją tego mogą posłużyć dwa przykłady, badania nad płodowymi nowotworami mózgu oraz nad molekularnym podłożem schizofrenii.

Nowotwory mózgu powstające w płodowych stadiach rozwoju były do niedawna trudne do klasyfikacji w oparciu o ich morfologię, nie była znana ich biologia, a wybór właściwej terapii był znacznie utrudniony. Przełom nastąpił dzięki badaniom Pomeroy'a i współpracowników (Pomeroy et al. 2002), którzy w oparciu o profilowanie ekspresji genów w próbkach pobranych od 99 pacjentów wykazali odmienność na poziomie transkrypcji pomiędzy najczęściej spotykanymi meduloblastomami a innymi rodzajami nowotworów. Badacze wskazali na grupy genów, których ekspresja odróżnia od siebie poszczególne rodzaje płodowych

nowotworów mózgu. Co więcej, rokowanie leczenia tych nowotworów ściśle koreluje z uzyskanymi profilami ekspresji. Stwierdzono również, że meduloblastomy są powodowane przez zaburzenie przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego w kaskadzie aktywującej białko Sonic Hedgehog. Jest to klasyczny przykład na to, jak użytecznym narzędziem w badaniach nad nowotworami są macierze DNA.

Molekularne podłoże rozwoju schizofrenii od wielu lat jest przedmiotem intensywnych badań. Dotychczas ukazało się kilka prac analizujących profile ekspresji genów w pobranej post mortem korze czołowej osób cierpiących na schizofrenię (Hakak et al. 2001; Mirnics et al. 2001; Vawter et al. 2002; Tkachev et al. 2003), jednak przedstawiane w nich wyniki i wnioski często się nie pokrywają, a czasami są nawet we wzajemnej sprzeczności. Prawdopodobnie źródłem tego problemu jest złożoność badanej struktury. Jak można przypuszczać charakterystyczne dla chorego mózgu zmiany dotyczą jedynie niewielkiej populacji komórek. Stąd też analizując RNA wyizolowane z całej kory, ewentualne zmiany ulegają zatarciu przez RNA pochodzące z komórek, gdzie ekspresja nie ulega zmianom. Stąd też obserwowane zmiany ekspresji są często na granicy lub nawet poniżej przyjętej czułości macierzy DNA. Pomimo tych problemów, przedstawiono dwie poparte wynikami doświadczalnymi teorie wskazujące na molekularne podłoże choroby. Zauważono, że w korze osób cierpiących na schizofrenię spada ekspresja cDNA białek odpowiedzialnych za sekrecję przekaźników oraz białek będących częścią kaskad sygnałów regulujących sekrecję (Mirnics et al. 2001). Nie stwierdzono jednolitego trendu zmian, lecz zaobserwowano w znakomitej większości badanych próbek spadek ekspresji jednego z elementów szlaku sygnałowego. Na tej podstawie autorzy postulują, że schizofrenia jest chorobą synapsy. Z drugiej strony, niedawno ukazała się praca wskazująca na podobny profil zmian ekspresji jako charakterystyczny zarówno dla schizofrenii, jak i zaburzenia dwubiegunowego (Tkachev et al. 2003). Wykazano, że w obu chorobach zmniejszona jest abundancja cDNA białek charakterystycznych dla oligodendrocytów i mieliny, takich jak białko proteolipidowe 1 (PLP1), zasadowe białko mieliny (MBP) czy asocjowany z mieliną glikoproteinoid (MAG). Na tej podstawie postawiona została hipoteza, że oba schorzenia mają podobną patofizjologię. Powyższe dwa przykłady ilustrują potencjał jaki niosą macierze DNA oraz problemy jakie napotykają badania nad profilowaniem ekspresji w mózgu.

Badania nad wpływem morfiny na ekspresję genów

Badania nad molekularnym mechanizmem działania morfiny i innych opioidów mają dwojaki cel. Z jednej strony badacze starają się zrozumieć mechanizm powodowanej przez morfinę analgezji i mechanizm powstawania tolerancji na jej przeciwbólowe działanie, z drugiej - poznać mechanizm powstawania psychicznej zależności od opioidów. Kluczowe w tych badaniach jest dokładne zbadanie wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału mediujących odpowiedź na morfinę i zrozumienie jakim zmianom ulegają one w trakcie chronicznego działania morfiny.

Morfina jest agonistą (przynajmniej częściowym) receptorów opioidowych μ , δ oraz κ . Wszystkie one należą do grupy receptorów posiadających siedem helis transbłonowych i są najczęściej sprzężone z białkami G_i/G_o (Nestler et al. 2001). Związanie morfiny z receptorem opioidowym μ powoduje przede wszystkim zahamowanie cykazy adenylanowej i kinazy białek A oraz otwarcie kanałów potasowych (Nestler 1997). Powoduje to hiperpolaryzację błony i blokuje przewodnictwo neuronu. W ten sposób, hamując neurony pobudzające działa przeciwbólowo, z drugiej zaś strony w wyniku hamowania interneuronów hamujących w polu brzusznej nakrywki zwiększa się wydzielanie dopaminy powodując euforię. Jednak chroniczne podawanie morfiny powoduje tolerancję na jej działanie i niejako odwraca przekazywany przez nią sygnał, powodując wzrost aktywności cykazy adenylanowej i kinazy białek A.

Aby zrozumieć molekularne podłoże tego zjawiska, przeprowadzono analizę globalnej ekspresji genów w rdzeniu kręgowym oraz prądkowiu szczura po jednokrotnym podaniu morfiny (Loguinov et al. 2001) oraz korze czołowej po chronicznym podawaniu narastających dawek morfiny (Ammon et al. 2003). Jak można było oczekiwać, jednokrotne podanie morfiny wpływa ogólnie hamująco na transkrypcję w komórce. Znamienne statystycznie (2-3 krotne) spadki ekspresji odnotowano dla wielu białek związanych z metabolizmem oksydacyjnym w mitochondriach (między innymi oksydazy cytochromu C podjednostki I i III, podjednostka 4 dehydrogenazy NADH), glikolizą (dehydrogenaza 3-fosfogliceraldehydu, izomeraza triofoforanów) oraz cytoszkieletem (kofilina, γ -aktyna). Wśród mRNA, których licznosc wzrosła, były między innymi odpowiadające kanałowi wapniowemu α_1a , kinazie ty-

rozyłowej c-src oraz cyklinie D1. Przedstawiony obraz zmian trudno jest bezpośrednio powiązać z obserwowanym działaniem morfiny. Zauważalne jest ogólne „zahamowanie” komórki po jednokrotnym podaniu morfiny, brak jednak zespołu genów, których zmiany ekspresji można byłoby intuicyjnie powiązać z molekularnym mechanizmem działania morfiny. Zupełnie inny obraz zmian zaobserwowano po chronicznym podawaniu morfiny. Przede wszystkim stwierdzono znaczny (nawet ponad 20-krotny) wzrost abundancji mRNA odpowiadających białkom szoku cieplnego hsp70, hsp27, hsp40, grp78 oraz α -krystraliny. Sugeruje to, iż długotrwałe działanie morfiny aktywuje odpowiedź komórkową na stres. Potwierdza to fakt, iż precypitowane naloksonem (antagonistą receptorów opioidowych) odstawienie od morfiny powodowało powrót liczności mRNA białek szoku cieplnego do poziomów kontrolnych, czyli obserwowane zmiany były ściśle zależne od receptorów opioidowych. Jakkolwiek oba opisane powyżej doniesienia poszerzyły wiedzę na temat komórkowego działania morfiny, niestety nie przyniosły pełnego wyjaśnienia molekularnego działania morfiny, ani nie wskazały na nowe szlaki przekazywania sygnału powiązane z działaniem opioidów. Można oczekiwać, że dalsze badania zapełnią tę lukę.

Metodyka badań z wykorzystaniem macierzy DNA wciąż znajduje się w fazie szybkiego rozwoju. Technologia jest wciąż ulepszana i staje się coraz czulsza. Na macierzach reprezentowanych jest coraz więcej różnych cDNA, w niektórych przypadkach nawet kilkadziesiąt tysięcy. Jakkolwiek badania ośrodkowego układu nerwowego z wykorzystaniem macierzy DNA będą utrudnione ogromną jego złożonością, można jednak przypuszczać, że najlepsze jest wciąż przed nami.

Bibliografia

- Ammon S, Mayer P, Riechert U, Tischmeyer H and Hollt V (2003) Microarray analysis of genes expressed in the frontal cortex of rats chronically treated with morphine and after naloxone precipitated withdrawal. *Brain Res Mol Brain Res* 112: 113-125.
- Hakak Y, Walker JR, Li C, Wong WH, Davis KL, Buxbaum JD, Haroutunian V and Fienberg AA (2001) Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4746-4751.
- Loguinov AV, Anderson LM, Crosby GJ and Yukhananov RY (2001) Gene expression following acute morphine administration. *Physiol Genomics* 6: 169-181.
- Mirnics K, Middleton FA, Lewis DA and Levitt P (2001) Analysis of complex brain disorders with gene expression microarrays: schizophrenia as a disease of the synapse. *Trends Neurosci* 24: 479-486.
- Nestler EJ (1997) Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Curr Opin Neurobiol* 7: 713-719.
- Nestler EJ, Hyman SE and Malenka RC (2001) *Molecular Neuropharmacology. A Foundation for Clinical Neuroscience*. McGraw-Hill, New York.
- Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, Kim JY, Goumnerova LC, Black PM, Lau C, Allen JC, Zazzag D, Olson JM, Curran T, Wetmore C, Biegel JA, Poggio T, Mukherjee S, Rifkin R, Califano A, Stolovitzky G, Louis DN, Mesirov JP, Lander ES and Golub TR (2002) Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 415: 436-442.
- Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, Wayland M, Freeman T, Jones PB, Starkey M, Webster MJ, Yolken RH and Bahn S (2003) Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet* 362: 798-805.
- Vawter MP, Crook JM, Hyde TM, Kleinman JE, Weinberger DR, Becker KG and Freed WJ (2002) Microarray analysis of gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia: a preliminary study. *Schizophr Res* 58: 11-20.