Νεώτερα δεδομένα στη Μικροβιολογία

Ανδρέας Μεντής

Παρά την έντονη ερευνητική δραστηριότητα των τελευταίων ετών παραμένουν πολλά ερωτηματικά σχετικά με τη μικροβιολογία, τον τρόπο μετάδοσης και κυρίως τον τρόπο με τον οποίο το *H. pylori* προκαλεί νόσο στον άνθρωπο. Σχετικά πρόσφατα έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται στη μελέτη ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών νέες, δυναμικές μέθοδοι που αναμένεται να επιταχύνουν την έρευνα στη Βιολογία. Η χρησιμοποίηση των μεθόδων αυτών στην έρευνα της *H. pylori* λοιμώξεως πιστεύεται ότι θα συμβάλλει σημαντικά στην αποκάλυψη των μυστικών του μικροβίου. Πράγματι, τα 2 τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται στην μελέτη της *H. pylori* λοιμώξεως η γενωμική, η πρωτεωμική που επιτρέπουν τη μελέτη πολλών γονιδίων και πολλών πρωτεϊνών ταυτοχρόνως και η βιοπληροφορική που χρησιμοποιείται για την καταχώρηση, ανάλυση και αξιολόγηση του μεγάλου όγκου των βιολογικών δεδομένων που παράγονται από τις νέες μεθόδους.

Ιατρός Βιοπαθολόγος – Κλινικός Μικροβιολόγος, Προϊστάμενος Εργαστηρίου Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur

Γενωμική

Μεγάλη ώθηση στη μελέτη της εκφράσεως γονιδίων τόσο των ευκαρυωτικών όσο και των προκαρυωτικών οργανισμών έχει δώσει η ανάπτυξη των μικροσυστοιχιών (microarrays) DNA. Οι DNA μικροσυστοιχίες είναι σειρές μεγάλου αριθμού DNA γνωστής αλληλουχίας σε στερεό υπόστρωμα σε πολύ μικρό χώρο (π.χ. σε μέρος αντικειμενοφόρου πλάκας). Ανάλογα με την τεχνική μπορεί να προσκολληθούν από δεκάδες χιλιάδες τμήματα DNA π.χ. βιβλιοθήκες κλώνων ή προϊόντων PCR έως εκατοντάδες χιλιάδες τμήματα DNA όπως στην in situ σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων με φωτολιθογραφικές τεχνικές (>280.000/πλάκα). Η μελέτη γονιδίων με την τεχνική αυτή βασίζεται στις ακόλουθες ιδιότητες: 1. ένα γονίδιο συνήθως μεταγράφεται σε mRNA μόνον όταν και όπου απαιτείται η λειτουργία του, 2. συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA υβριδίζουν μεταξύ τους, 3. ο προσδιορισμός της θέσεως και των συνθηκών κάτω από τις οποίες εκφράζεται ένα γονίδιο επιτρέπει συμπεράσματα για τη λειτουργία του.

Για τη μέτρηση του επιπέδου εκφράσεως γονιδίων σε ένα βιολογικό δείγμα ακολουθείται περιληπτικά η εξής διαδικασία: 1. απομόνωση του mRNA, σύνθεση cDNA που έχει σημανθεί με φθορίζουσα χρωστική και υβριδισμός με τα DNA της μικροσυστοιχίας. 2. υβριδισμός των ακινητοποιημένων DNA με τα συμπληρωματικά cDNAs 3. ανάγνωση με ειδικές συσκευές της έντασης του φθορισμού σε κάθε σημείο που αντανακλά την σχετική έκφραση του γονιδίου στο αρχικό δείγμα.

Χρησιμοποιώντας την "απλή" στη σύλληψή της ιδέα αυτή η έκφραση χιλιάδων γονιδίων μπορεί να μετρηθεί ταυτόχρονα και αποτελεσματικά. Έτσι μπορεί να έχουμε πληροφορίες σχετικά με το ποιά γονίδια εκφράζονται από ένα βακτήριο σε συγκεκριμένες συνθήκες (προφίλ έκφρασης γονιδίων), ή να δούμε τις διαφορές στην έκφραση γονιδίων ενός μικροβίου σε διαφορετικές συνθήκες (συγκριτική γενωμική). Επιπλέον, με τις DNA μικροσυστοιχίες μπορούμε να μελετήσουμε τη βακτηριακή απόκριση στην αλληλεπίδραση με το κύτταρο του ξενιστή, τους μηχανισμούς γενετικής ποικιλομορφίας των μικροβίων, τη συν-εξέλιξη με το ξενιστή και τέλος την απόκριση του ξενιστή στη λοίμωξη, όσον αφορά στην έκφραση διαφόρων γονιδίων.

Παραδείγματα εφαρμογής στην περίπτωση του H. pylori

Η χρησιμοποίηση της μεθόδου των μικροσυστοιχιών έγινε δυνατή μετά τον προσδιορισμό της πλήρους αλληλουχίας του γονιδιώματος των στελεχών *H. pylori* J99 και 26695, το 1997 και το 1999 αντιστοίχως. Διαπιστώθηκε ότι

το γονιδίωμα του μικροβίου περιέχει 1590 γονίδια, στα 2/3 των οποίων έχει αποδοθεί βιολογικός ρόλος. Ενδιαφέρον είναι ότι τα δύο στελέχη είχαν διαφορές στο 6% των γονιδίων τους. Έχουν αναπτυχθεί εμπορικά διαθέσιμες μικροσυστοιχίες που περιλαμβάνουν το σύνολο του γονιδιώματος του *H. pylori* και διατίθενται για ερευνητικούς σκοπούς. Παρακάτω θα αναφερθούν παραδείγματα εφαρμογής της μεθόδου μικροσυστοιχιών στην έρευνα του *H. pylori*.

Από τα πρώτα θέματα που μελετήθηκαν με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών ήταν η απόκριση του *H. pylori* σε όξινο stress, δηλαδή ποια γονίδια από τα 1590 περίπου που αποτελούν το γονιδίωμα του μικροβίου εκφράζονται σε σχέση με το pH του περιβάλλοντος. Στις σχετικές μελέτες[1-3] στελέχη *H. pylori* καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υλικά με όξινο ή ουδέτερο pH για να μελετηθεί η έκφραση των γονιδίων στα διαφορετικά pH. Χρησιμοποιήθηκαν μικροσυστοιχίες που περιείχαν DNA για 1,534 open reading frames (ORFs) από το στέλεχος 26695. Αν και από τα πειράματα διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός και η ταυτότητα των γονιδίων που διαφοροποιήθηκαν στις όξινες συνθήκες έναντι των ουδετέρων διέφεραν σημαντικά μεταξύ των μελετών (39 γονίδια στην πρώτη, 80 γονίδια στη δεύτερη και μόλις 11 στην τρίτη μελέτη αντιστοίχως), η μέθοδος ανοίγει νέους ορίζοντες για τη μελέτη αντίστοιχων ερευνών.

Σε μια άλλη ενδιαφέρουσα δημοσίευση μελετήθηκε η γενετική εξέλιξη στελέχους *H. pylori* στο στομάχι ενός ασθενούς σε διάστημα 6 ετών.[4] Όπως προαναφέρθηκε, το στέλεχος J99 ήταν το πρώτο από τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γονιδιώματος του *H. pylori*. Ο ασθενής από τον οποίο προήλθε το στέλεχος αρνήθηκε να λάβει αγωγή εκριζώσεως και έτσι έδωσε την ευκαιρία στους ερευνητές να μελετήσουν την εξέλιξη του βακτηρίου μετά νέα γαστροσκόπηση 6 χρόνια μετά την αρχική απομόνωση. Απομονώθηκαν από το στομάχι του ασθενούς πολλαπλά στελέχη από τα οποία έγινε απομόνωση DNA, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για υβριδισμό με όλα τα γονίδια από τα στελέχη J99 και 26695 σε DNA μικροσυστοιχίες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα διάφορα στελέχη από το στομάχι του ασθενούς που απομονώθηκαν ήταν στενά σχετιζόμενα αλλά όχι όμοια. Έλλειπαν γονίδια ή ομάδες γονιδίων. Είναι χαρακτηριστικό ότι το RAPD PCR προφίλ ήταν ίδιο σε όλα αυτά τα συνεχόμενα στελέχη. Οι ερευνητές συνεπέραναν ότι το *H. pylori* στο ανθρώπινο στομάχι είναι σε συνεχή κατάσταση γενετικής ανταλλαγής (flux) που πιθανόν να του επιτρέπει να προσαρμόζεται στις αλλαγές των περιβαλλοντικών αλλαγών. Στην περίπτωση αυτή βλέπουμε την υπεροχή της μεθόδου μικροσυστοιχιών έναντι παλαιοτέρων μοριακών μεθόδων στη διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας του *H. pylori*.

Πρωτεωμική

Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες και όχι το DNA (γονίδια) είναι υπεύθυνα για τους φαινότυπους των κυττάρων. Επομένως είναι αδύνατον να διαλευκανθούν μηχανισμοί ασθενειών, γήρατος και αποτελέσματα επιδράσεως του περιβάλλοντος μόνο από τη μελέτη του γονιδιώματος. Απαιτείται μελέτη των πρωτεϊνών των οργανισμών και της αλληλεπίδρασής τους. Το ότι ένα γονίδιο δίνει γένεση σε μια πρωτεΐνη αποτελεί υπεραπλούστευση. Στην πραγματικότητα, από ένα γονιδίωμα μπορεί να προκύψει ένας άπειρος αριθμός πρωτεϊνών - πρωτεωμάτων. Το πρωτέωμα ενός οργανισμού ή μικροοργανισμού αντιπροσωπεύει το σύνολο των πρωτεϊνών του. Ο όρος πρωτεωμική πρωτοχρησιμοποιήθηκε το 1995. Σταθμός για την ανάπτυξη της πρωτεωμικής ήταν η περιγραφή της 2-D ηλεκτροφορήσεως. Η μεγάλη ανάπτυξη της πρωτεωμικής βασίσθηκε στην ανάπτυξη της τεχνολογίας της φασματομετρίας μάζης με την οποία είναι δυνατή η ανάλυση των πρωτεϊνών με ευαισθησία femtomole.

Στην πρωτεωμική γίνεται μεγάλης κλίμακας χαρακτηρισμός όλου του πρωτεϊνικού περιεχομένου μιας κυτταρικής σειράς, ενός ιστού ή ενός μικροοργανισμού.

Επιπλέον, δημιουργείται ολοκληρωμένη 3-D χαρτογράφηση των θέσεων των πρωτεϊνών στο κύτταρο και των αλληλεπιδράσεών τους. Είναι αντιληπτό ότι στην ανάπτυξη της πρωτεωμικής έχουν συμβάλλει η μοριακή βιολογία, η βιοχημεία και η βιοπληροφορική.

Πρωτεωμική και Helicobacter pylori

Το *H. pylori* είναι από τα πρώτα μικρόβια στα οποία χρησιμοποιήθηκε η πρωτεωμική.[5] Στη μελέτη αυτή προσδιορίσθηκαν 1200 αλληλεπιδράσεις (interactions) μεταξύ των πρωτεϊνών του *H. pylori* που συνδέονται με το 46,6% του πρωτεώματος.

Η πρωτεωμική ανοίγει καινούργιους δρόμους στη μελέτη των λειτουργιών του *H. pylori*, όπως: 1. Απόδοση λειτουργιών σε άγνωστες πρωτεΐνες. Μόνο στα 2/3 από τις υπολογιζόμενες 1500 πρωτεΐνες του μικροβίου έχει αποδοθεί κάποια λειτουργία, 2. Καθορισμός νέων λειτουργιών ή μεταβολικών μονοπατιών, 3. Καθορισμός λειτουργικών συνδέσεων μεταξύ των πρωτεϊνών, 4. Ανάλυση ρυθμιστικών κυκλωμάτων που αντιδρούν σε διάφορα ερεθίσματα από τον ξενιστή ή το περιβάλλον. Πάντως η μελέτη του *H. pylori* με 2-DE είναι δύσκολη, διότι μια δεδομένη πρωτεΐνη δύο διαφορετικών στελεχών σπανίως παράγει κηλίδα στο ίδιο σημείο λόγω της γενετικής μικροποικιλίας του μικροβίου που προκαλεί μικρές τροποποιήσεις στην πρωτεΐνη. Επιπλέον, οι πρω-

τεΐνες του *H. pylori* υπόκεινται σε μεγάλου βαθμού μετα-μεταφραστική τροποποίηση.

Ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη του *H. pylori* αναμένεται να είναι η ανοσοπρωτεωμική,[6] που συνίσταται σε συστηματική πρωτεωμική ανάλυση (με 2-DE) ακολουθούμενη από ανοσοαποτύπωση με ορούς ασθενών. Η μέθοδος αυτή θεωρείται ιδανική για την αναγνώριση νέων ή καλύτερα χαρακτηρισμένων αντιγόνων του *H. pylori* που είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για διαγνωστικούς, θεραπευτικούς σκοπούς καθώς και για εμβολιοπαραγωγή. Η απώτερη ωφέλεια που αναμένεται από τη μέθοδο αυτή είναι διερεύνηση δυνητικών συσχετίσεων ειδικών ανοσολογικών αποκρίσεων και της κλινικής εκδήλωσης νόσου.

Συμπέρασμα

Οι ταχέως αναπτυσσόμενες μέθοδοι γενωμική και πρωτεωμική φαίνεται ότι θα συμβάλλουν σημαντικά στη διερεύνηση της *H. pylori* λοιμώξεως. Οι μεθοδολογίες αυτές θα πρέπει να χρησιμοποιούνται παράλληλα με τις συμβατικές βιολογικές μεθόδους ώστε να επιτευχθεί το καλύτερο αποτέλεσμα.[7]

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Allan E, Clayton CL, McLaren A, Wallace DM, Wren BW. Characterization of the low-pH responses of *Helicobacter pylori* using genomic DNA arrays. Microbiology 2001;147:2285-92.
2. Ang S, Lee CZ, Peck K, et al. Acid-induced gene expression in *Helicobacter pylori*: study in genomic scale by microarray. Infect Immun 2001;69:1679-86.
3. Dong Q, Hyde D, Herra C, et al. Identification of genes regulated by prolonged acid exposure in *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett 2001;196:245-9.
4. Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM, Atherton JC, Falkow S, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:14625-30.
5. Rain JC, Selig L, De Reuse H, et al. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. Nature 2001;409:211-5.
6. Haas G, Karaali G, Ebermayer K, et al. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. Proteomics 2002;2:313-24.
7. Covacci A, Rappuoli R. *Helicobacter pylori:* after the genomes, back to biology. J Exp Med 2003;197:807-11.