

O potencial da rotulação metabólica de ^{15}N para a pesquisa de esquizofrenia

The potential of ^{15}N metabolic labeling for schizophrenia research

MICHAELA D. FILIOU¹

¹ Proteômica e Biomarcadores, Instituto Max Planck de Psiquiatria, Munique, Alemanha.

Recebido: 23/9/2012 – Aceito: 7/11/2012

Resumo

Pesquisas em psiquiatria ainda necessitam de estudos não dirigidos por hipóteses para revelar fundamentos neurobiológicos e biomarcadores moleculares para distúrbios psiquiátricos. Metodologias proteômicas disponibilizam uma série de ferramentas para esses fins. Apresentamos o princípio de rotulação metabólica utilizando ^{15}N para proteômica quantitativa e suas aplicações em modelos animais de fenótipos psiquiátricos com um foco particular em esquizofrenia. Exploramos o potencial de rotulação metabólica por ^{15}N em diferentes tipos de experimentos, bem como suas considerações metodológicas.

Filiou MD / Rev Psiq Clín. 2013;40(1):51-2

Palavras-chave: Esquizofrenia, proteômica quantitativa, rotulação metabólica de ^{15}N , biomarcadores, G72.

Abstract

Psychiatric research is in need of non-hypothesis driven approaches to unravel the neurobiological underpinnings and identify molecular biomarkers for psychiatric disorders. Proteomics methodologies constitute a state-of-the-art toolbox for biomarker discovery in psychiatric research. Here we present the principle of *in vivo* ^{15}N metabolic labeling for quantitative proteomics experiments and applications of this method in animal models of psychiatric phenotypes, with a particular focus on schizophrenia. Additionally we explore the potential of ^{15}N metabolic labeling in different experimental set-ups as well as methodological considerations of ^{15}N metabolic labeling-based quantification studies.

Filiou MD / Rev Psiq Clín. 2013;40(1):51-2

Keywords: Schizophrenia, quantitative proteomics, ^{15}N metabolic labeling, biomarker, G72.

A necessidade de análise proteômica quantitativa na pesquisa de esquizofrenia

Nos últimos anos, o desenvolvimento de abordagens holísticas como genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica deu início a aplicações de pesquisas não dirigidas por hipóteses. Nesse caso, populações de genes, proteínas ou metabólitos em dois estados (por exemplo, doença *vs.* controle) podem ser comparados para a identificação de níveis de expressão diferentes relevantes às alterações fenotípicas observadas. Como o proteoma de um organismo pode refletir mudanças fenotípicas no nível molecular, a análise proteômica se constitui numa valiosa ferramenta para investigar os mecanismos fundamentais envolvidos nas desordens psiquiátricas.

A pesquisa em esquizofrenia sofre de uma falta de correlação molecular com as alterações comportamentais e sintomas da doença observados. Biomarcadores moleculares para esquizofrenia podem auxiliar na avaliação de risco de predisposição, na subcategorização precisa de pacientes, na monitoração da progressão da doença e na descoberta de novos alvos terapêuticos. Para esse fim, a análise proteômica quantitativa tem o potencial de prover informação de biomarcadores moleculares sensíveis e, dessa forma, oferecer valiosas perspectivas no prognóstico, diagnóstico e tratamento da esquizofrenia.

Rotulação metabólica com ^{15}N

Um grande número de abordagens proteômicas quantitativas está disponível e é aplicável à pesquisa de esquizofrenia¹. Dentre as abordagens proteômicas, a rotulação metabólica ^{15}N *in vivo* assegura grande potencial para estudos em modelos animais, bem como

em grupos de pacientes. O princípio da rotulação metabólica ^{15}N é baseada na introdução do isótopo estável de nitrogênio ^{15}N em um organismo por meio de uma dieta rotulada com ^{15}N ou meio de crescimento rotulado com ^{15}N . A população proteica rotulada com ^{15}N (espécie rotulada) é, então, comparada à amostra proteica que contém somente isótopos de abundância natural (espécie não rotulada). A introdução do rótulo de isótopo ^{15}N resulta em uma diferença de massa previsível entre o peptídeo etiquetado e sua cópia não rotulada. A quantificação proteica relativa é possível por meio da comparação das intensidades de sinal dos pares peptídicos rotulados/não rotulados de uma dada proteína. Métodos de rotulação metabólica *in vivo* provêm alta precisão quando comparados a outras abordagens existentes de análise proteômica quantitativa, porque as espécies rotulada e não rotulada são combinadas anteriormente à preparação da amostra, evitando, então, tendências a erros devidos à manipulação experimental. Além da quantificação proteica, a rotulação metabólica ^{15}N permite o estudo de renovação proteica (*turnover*) mediante a avaliação dos níveis de incorporação de ^{15}N em diferentes pontos no tempo².

Aplicações da rotulação metabólica ^{15}N em modelos animais e pacientes psiquiátricos

A rotulação metabólica ^{15}N tem sido aplicada a uma abundância de organismos modelos variando de bactérias a roedores e foi recentemente utilizada para rotular modelos de doenças em camundongos³. No contexto da psiquiatria, um protocolo de rotulação metabólica ^{15}N via uma dieta baseada em proteínas de bactéria foi estabelecido e aplicado para estudar o modelo em camundongo de comportamento

relacionado a alta (HAB), normal (NAB) e baixa (LAB) ansiedade⁴. Camundongos NAB rotulados com ¹⁵N-labeled foram utilizados como padrões internos, e análises proteômicas quantitativas no córtex cingular, hipocampo e plasma foram realizadas para comparar camundongos HAB e LAB. Essas análises proteômicas revelaram um envolvimento de vias relacionadas à mitocôndria e ao sistema imune na modulação do comportamento relacionado à ansiedade^{5,6}.

A rotulação metabólica ¹⁵N também foi aplicada a um modelo em camundongo de esquizofrenia. O locus primata-específico G72/G30 é um dos achados mais reproduzidos em estudos genéticos de esquizofrenia. Entretanto, a função da proteína correspondente G72 permanece largamente desconhecida. Para investigar a função da proteína G72 *in vivo*, camundongos transgênicos que carregam uma mutação no locus gênico G72/G30 e expressam a proteína G72 foram gerados⁷. Os camundongos transgênicos G72/G30 exibiram sintomas tipo esquizofrenia, incluindo comportamento compulsivo aumentado, coordenação motora prejudicada, sensibilidade aumentada à fenilciclidina, discriminação de odores prejudicada e déficits de aprendizado^{7,8}. Para comparar os proteomas cerebelares de camundongos transgênicos G72/G30 e controles selvagens, camundongos CD1 rotulados com ¹⁵N foram utilizados como padrões internos e diversas proteínas relacionadas a vias moleculares afetadas em esquizofrenia foram encontradas como diferencialmente expressas⁹.

Além de modelos animais, a rotulação metabólica ¹⁵N pode ser empregada para examinar amostras humanas por meio da rotulação de linhagens celulares de origem humana e usando-as para comparação com material de pacientes. Linhagens celulares humanas podem ser crescidas em meio rotulado com ¹⁵N e as populações proteicas derivadas podem, então, ser utilizadas como padrões rotulados internos para comparações par a par de pacientes e grupos controle. Dessa forma, a rotulação metabólica *in vivo* no nível de todo o organismo é evitada, enquanto a análise proteômica comparativa ainda se beneficia da alta precisão de quantificação alcançada por esse método.

Considerações metodológicas

Quando aplicando a rotulação metabólica ¹⁵N à pesquisa de esquizofrenia, diversas considerações precisam ser levadas em conta. O custo da dieta rotulada com ¹⁵N é alto e longos períodos de rotulação são requeridos para organismos complexos (por exemplo, roedores) para que sejam alcançadas altas taxas de incorporação de ¹⁵N para comparações em proteômica quantitativa. Importaneamente, a introdução do ¹⁵N pode ter um efeito no fenótipo comportamental⁴ ou nos níveis de expressão proteicos¹⁰. Como consequência, controles rotulados (utilizando padrões internos rotulados ou rotulação recíproca) deveriam ser implementados no desenho experimental para evitar artefatos causados pelo isótopo ¹⁵N afetando os resultados de quantificação relativa das proteínas. Embora os custos da rotulação metabólica de organismos inteiros não seja um fator a ser negligenciado, o método eventualmente resulta em material ¹⁵N-rotulado (i.e., órgãos, sangue, tecido cerebral etc.), os quais podem ser usados por um grande número de experimentos proteômicos quantitativos. Dada a alta precisão, um menor número de replicatas biológicas comparado a outros métodos quantitativos menos sensíveis pode ser requerido para alcançar resultados de quantificação precisos. Notavelmente, empregando linhagens celulares rotuladas com ¹⁵N como padrões proteômicos internos, reduzem-se drasticamente custos e tempo de rotulação para alcançar alta incorporação de ¹⁵N, permitindo uma aplicação em rotina dessa metodologia. Deve também ser notado que os desafios computacionais a respeito da avaliação de espectros total ou parcialmente rotulados com ¹⁵N têm sido largamente tratados por meio do desenvolvimento de *softwares* apropriados e fluxogramas de processamento de dados otimizados, os quais tornaram a rápida aquisição de dados possível^{11,12}. Uma avaliação metodológica de-

talhada da rotulação de ¹⁵N em comparação a outros métodos de proteômica quantitativa é discutida em outro lugar¹³.

Conclusão

Tomados juntos, a rotulação metabólica ¹⁵N *in vivo* provê uma poderosa e versátil ferramenta para a pesquisa de esquizofrenia, que pode ser usada nos estudos de modelos animais ou naqueles baseados em pacientes. A alta precisão de quantificação alcançada por esse método pode lançar luz em novas entidades moleculares relevantes à etiologia da esquizofrenia e contribuir para a descoberta de biomarcadores proteicos. Adicionalmente, o estudo de renovação proteica por meio da rotulação metabólica ¹⁵N pode apontar mecanismos do metabolismo proteico pertinentes à fisiopatologia da esquizofrenia.

Agradecimentos

O autor agradece a todos os membros do presente e passado do Grupo de Pesquisa de Proteômica e Biomarcadores no Instituto Max Planck de Psiquiatria, pelas profundas discussões, e a Chris W. Turck e Giuseppina Maccarrone, pela leitura crítica do manuscrito.

O autor declara não haver conflito de interesses.

Referências

1. Filiou MD, Turck CW, Martins-de-Souza D. Quantitative proteomics for investigating psychiatric disorders. *Proteomics Clin Appl*. 2011;5:38-49.
2. Zhang Y, Reckow S, Webhofer C, Boehme M, Gormanns P, Egge-Jacobsen WM, et al. Proteome scale turnover analysis in live animals using stable isotope metabolic labeling. *Anal Chem*. 2011;83:1665-72.
3. Gouw JW, Krijgsveld J, Heck AJ. Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9:11-24.
4. Frank E, Kessler MS, Filiou MD, Zhang Y, Maccarrone G, Reckow S, et al. Stable isotope metabolic labeling with a novel ¹⁵N-enriched bacteria diet for improved proteomic analyses of mouse models for psychopathologies. *PLoS One*. 2009;4:e7821.
5. Filiou MD, Zhang Y, Teplytska L, Reckow S, Gormanns P, Maccarrone G, et al. Proteomics and metabolomics analysis of a trait anxiety mouse model reveals divergent mitochondrial pathways. *Biol Psychiatry*. 2011;70:1074-82.
6. Zhang Y, Filiou MD, Reckow S, Webhofer C, Gormanns P, Frank E, et al. Proteomic and metabolomic profiling of a trait anxiety mouse model implicates affected pathways. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10:M111.008110.
7. Otte DM, Bilkei-Gorzó A, Filiou MD, Turck CW, Yilmaz Ö, Holst MI, et al. Behavioral changes in G72/G30 transgenic mice. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009;19:339-48.
8. Otte DM, Sommersberg B, Kudin A, Guerrero C, Albayram Ö, Filiou MD, et al. N-acetyl cysteine treatment rescues cognitive deficits induced by mitochondrial dysfunction in G72/G30 transgenic mice. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36:2233-43.
9. Filiou MD, Teplytska L, Otte DM, Zimmer A, Turck CW. Myelination and oxidative stress alterations in the cerebellum of the G72/G30 transgenic schizophrenia mouse model. *J Psychiatr Res*. 2012;46:1359-65.
10. Filiou MD, Webhofer C, Gormanns P, Zhang Y, Reckow S, Bisle B, et al. The (15) N isotope effect as a means for correlating phenotypic alterations and affected pathways in a trait anxiety mouse model. *Proteomics*. 2012;12:2421-7.
11. Zhang Y, Webhofer C, Reckow S, Filiou MD, Maccarrone G, Turck CW. A MS data search method for improved ¹⁵N-labeled protein identification. *Proteomics*. 2009;9:4265-70.
12. Haegler K, Mueller NS, Maccarrone G, Hunyadi-Gulyas E, Webhofer C, Filiou MD, et al. QuantiSpec – Quantitative mass spectrometry data analysis of ¹⁵N-metabolically labeled proteins. *J Proteomics*. 2009;71:601-8.
13. Filiou MD, Martins-de-Souza D, Guest PC, Bahn S, Turck CW. To label or not to label: applications of quantitative proteomics in neuroscience research. *Proteomics*. 2012;12:736-47.