

AGNIESZKA KISIEL, ANNA SKĄPSKA, WOJCIECH T. MARKIEWICZ
i MAREK FIGLEROWICZ

*Instytut Chemii Bioorganicznej PAN,
Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
e-mail: akisiel@ibch.poznan.pl*

skapska@ibch.poznan.pl

markiewicz@ibch.poznan.pl

marekf@ibch.poznan.pl

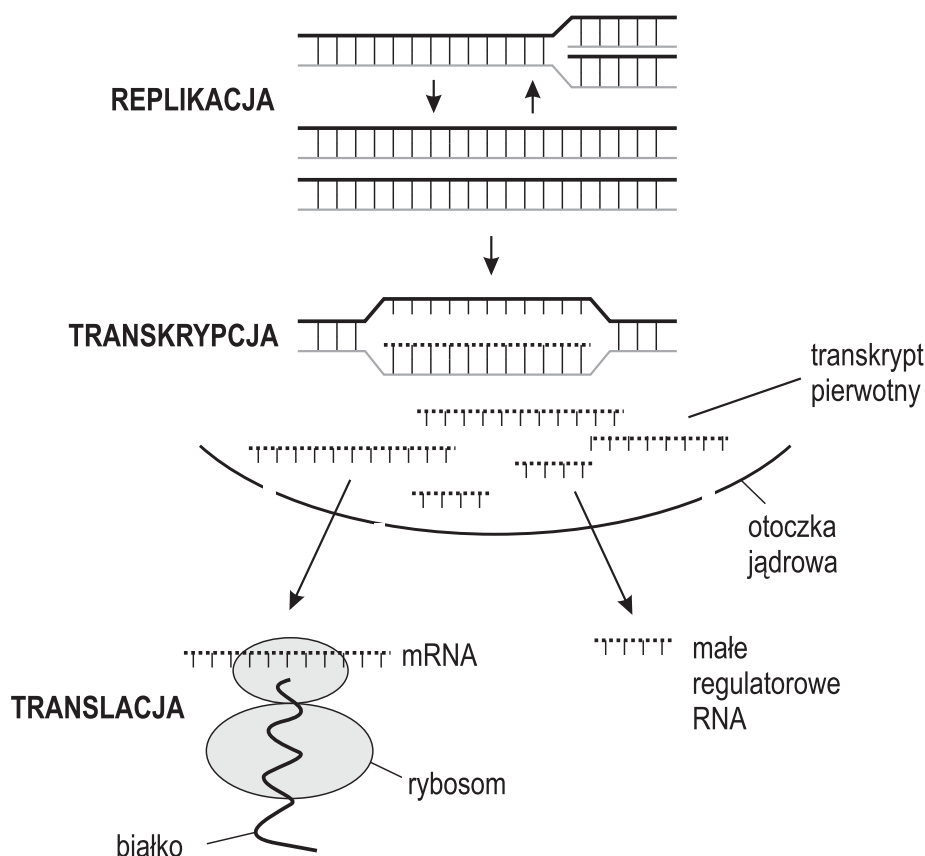
MIKROMACIERZE DNA

WSTĘP

Jednym z najbardziej spektakularnych osiągnięć biologii molekularnej przełomu XX i XXI w. było poznanie pełnej sekwencji nukleotydowej genomu ludzkiego oraz genomów modelowych organizmów zwierzęcych (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*) i roślinnych (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*). Dzięki tym odkryciom dowiedzieliśmy się, iż pojedyncza komórka eukariotyczna zawiera od kilku do kilkudziesięciu tysięcy genów (około 30 tysięcy u *Homo sapiens*, 20 tysięcy u *C. elegans*, 25 tysięcy u *A. thaliana*). Czasoprzestrzenne zróżnicowanie ich aktywności sprawia, że organizmy żywe są niezwykle dynamicznymi i złożonymi strukturami. Aktywacja genu lub grupy genów może przejawiać się na wiele różnych sposobów. Najłatwiej dostrzec ją analizując produkty pośrednie (mRNA) lub końcowe (białka) procesu ekspresji informacji genetycznej (Ryc. 1). Zdecydowanie trudniejszym zadaniem jest poznanie mechanizmów decydujących jaka część zawartej w genomie informacji oraz w jakiej kolejności zostaje uwolniona. Najnowsze badania wskazują, iż jednym z głównych czynników regulujących proces ekspresji genów, zarówno na poziomie transkrypcji jak i translacji, są niewielkie cząsteczki RNA. Podobnie jak mRNA, są one syntetyzowane w oparciu o genomowy

DNA. Można więc przypuszczać, iż obok genów kodujących białka występują również geny kodujące regulatorowe RNA. Dodatkowo, istnieje szereg dowodów wskazujących, że zapisana w genomie informacja może być tłumaczona w wieloraki sposób. Innymi słowy, jeden gen może kodować nie tylko kilka różnych białek, ale i RNA pełniące funkcje regulatorowe. Jest zatem oczywiste, że dogłębne poznanie procesów biologicznych wymaga stworzenia całkowicie nowych, bardziej kompleksowych metod pozwalających badać nie pojedyncze geny, ale całe genomy.

Pierwszy etap uwalniania zawartej w genomie informacji polega na jej przepisaniu z DNA na RNA (Ryc. 1). Proces ten zwany jest transkrypcją, a jego produkty transkryptami pierwotnymi. Stosowana z powodzeniem od kilkudziesięciu lat metoda analizy transkryptów Northern wykorzystuje zdolność jednoniciowych kwasów nukleinowych (DNA i RNA) do hybrydyzacji, czyli rozpoznawania cząsteczek o komplementarnej sekwencji i tworzenia z nimi struktur dwuniciowych poprzez wiązania wodorowe. Metodą Northern bada się oddziaływanie sondy (znakowanego radioaktywnie fragmentu RNA lub DNA) z pulą całkowitego RNA wyizolowanego z konkretnej tkanki czy organu i unieruchomionego na nośniku ta-



Ryc. 1. Przepływ informacji genetycznej.

Obecny w jądrze komórkowym DNA genomowy jest powielany przez replikację oraz służy jako matryca do syntezy RNA w procesie transkrypcji. Po modyfikacjach RNA może być wykorzystany jako matryca do syntezy białek (translacji) lub pełni funkcje regulatorowe.

kim, jak na przykład nylonowa membrana. W ten sposób poprzez stwierdzenie, iż doszło do hybrydyzacji można ustalić czy interesujący nas gen ulega aktywacji. Jest to prosta i czuła metoda, jednak jej wykorzystanie do analizy ekspresji więcej niż kilku lub kilkunastu genów jest niezwykle pracochłonne. Dodatkowo, nawet bardzo dokładny opis działania pojedynczego genu nie wystarcza do zrozumienia jak zawarta w nim informacja przekłada się na rozwój i funkcjonowanie całego organizmu. Jego fenotyp, czyli obserwowany efekt ekspresji informacji genetycznej jest wypadkową olbrzymiej liczby zdarzeń. Zależy on między innymi od czasu i miejsca ekspresji poszczególnych genów, ich wzajemnej pozytywnej i negatywnej regulacji, czy wpływu czynników zewnętrznych. Jednym z głównych zadań stojących przed współczesną nauką jest zatem poznanie i zrozumienie tych złożonych oddziaływań. Wyzwanie to stało się bodźcem do rozwoju nowej dziedziny wiedzy zwanej genomiką. W odróż-

nieniu od genetyki, podstawowym obiektem jej zainteresowań jest nie gen, lecz genom. W ten sposób genomika otwiera przed badaczami możliwość analizowania procesów biologicznych w szerszym kontekście – wzajemnych oddziaływań i powiązań pomiędzy genami na poziomie komórek, organów, a nawet całych organizmów.

Jednym z działów genomiki jest genomika funkcjonalna. Jej podstawowym celem jest poznanie reguł, zgodnie z którymi funkcjonuje cały genom. Już pierwsze badania pokazały, iż osiągnięcie tego celu wymaga opracowania nowych, bardziej wydajnych sposobów pozyskiwania i analizy danych. Kluczem do rozwiązania tego problemu wydaje się być umiejętne połączenie informatyki i nowoczesnych mikroczy nanotechnologii z klasycznymi metodami biologii molekularnej (HUNT i LIVESEY 2000). W wyniku takiego właśnie myślenia powstały mikromacierze DNA (BROWN i BOTSTEIN 1999).

CO TO SĄ MIKROMACIERZE DNA?

Idea działania mikromacierzy jest prosta i wywodzi się bezpośrednio z tradycyjnych technik analizy ekspresji genów, z tą różnicą, że w przypadku mikromacierzy „role” zostały odwrócone; na stałym podłożu – najczęściej szklanej płytce – umieszczane są sondy DNA reprezentujące interesujące nas geny. Znakiwana jest z kolei próba pochodząca z badanego materiału biologicznego. W ten sposób można w jednym eksperymencie przeanalizować ekspresję tylu genów, ile reprezentujących je sond naniesiono na podłoże, czyli nawet kilkudziesięciu tysięcy! Stało się to możliwe dzięki miniaturyzacji oraz zastosowaniu barwników fluorescencyjnych, które dają bardziej „zwarty” sygnał niż stosowane dotychczas radioaktywne izotopy.

W zależności od rodzaju i pochodzenia cząsteczek umieszczonych na szklanym podłożu rozróżniamy dwa rodzaje mikromacierzy: mikromacierze cDNA oraz mikromacierze oligonukleotydowe, zwane też „chipami DNA” (HARRINGTON i współaut. 2000). W pierwszym przypadku rolę sond pełnią fragmenty cDNA (zwykle około kilkusetnukleotydowe), w drugim – krótkie oligonukleotydy otrzymane na drodze syntezy chemicznej. Z uwagi na skomplikowany sposób projektowania i produkcji, najczęściej korzysta się z gotowych chipów DNA, znajdujących się w ofercie szeregu firm biotechnologicznych. Łatwiejsze do przygotowania mikromacierze cDNA zwykle konstruowane są samodzielnie na potrzeby indywidualnych eksperymentów.

PRZEBIEG EKSPERYMENTU MIKROMACIERZOWEGO

Pierwszą decyzją, którą należy podjąć przed przystąpieniem do właściwego eksperymentu jest wybór mikromacierzy. Jej rodzaj jest ściśle uzależniony od celu i obiektu badań. Aby przygotować chip DNA, niezbędna jest dokładna znajomość sekwencji analizowanych genów. Stąd obecnie produkuje się chipy DNA wyłącznie dla wybranych gatunków o dobrze scharakteryzowanym genomie. Mikromacierze cDNA nie wymagają takiej wiedzy, dlatego można je wykorzystać do analizy ekspresji genów o nieznanej lub częściowo znanej sekwencji, np. do przeszukiwań różnicowych bibliotek cDNA.

Typowy eksperyment wykorzystujący mikromacierze obejmuje:

- a) otrzymanie sond DNA oraz ich umieszczenie na podłożu;
- b) izolację i wyznakowanie próby z materiału biologicznego, który ma zostać scharakteryzowany;
- c) hybrydyzację próby (prób) do sond DNA znajdujących się na mikromacierzy;
- d) zebranie i analizę wyników hybrydyzacji.

KONSTRUKCJA MIKROMACIERZY

Konstrukcja mikromacierzy cDNA i oligonukleotydowych przebiega w zdecydowanie odmienny sposób (DUGGAN i współaut. 1999,

JORDAN 2001, AHARONI i VORST 2002). Pierwszy etap to przygotowanie sond. Sondy cDNA otrzymuje się przez amplifikację metodą RT-PCR. Wykonanie macierzy cDNA nie stwarza więc wielkich trudności. Wystarczy dobrze zaprojektować startery do selektywnej i wydajnej amplifikacji wybranych części genów, bez konieczności poznania całej sekwencji takiej sondy. Niestety, otrzymanie każdej sondy wymaga przeprowadzenia oddzielnej reakcji. Po amplifikacji i oczyszczeniu, sondy nanoszone są na podłoże przy pomocy specjalnych urządzeń, w sposób kontaktowy – przy pomocy igieł lub niekontaktowy, np. piezoelektrycznie, z wykorzystaniem techniki znanej z drukarek atramentowych.

Ważną cechą sond, a przez to i macierzy cDNA, jest brak lub bardzo niska specyficzność wobec genów homologicznych. Jeżeli sonda składa się z kilkuset nukleotydów, wówczas mogą do niej hybrydyzować nie tylko w pełni komplementarne sekwencje DNA. Ten problem można ominąć stosując sondy oligonukleotydowe, jednak ich projektowanie jest o wiele bardziej skomplikowane. Z teoretycznych obliczeń wynika, że 17-nukleotydowa sekwencja powinna pojawić się tylko raz w DNA o długości odpowiadającej całemu genomowi człowieka. Jednak naturalne sekwencje DNA dalekie są od rozkładu statystycznego. Przygotowanie oligonukleotydów wchodzących w skład mikromacierzy DNA wymaga zatem poznania w zasa-

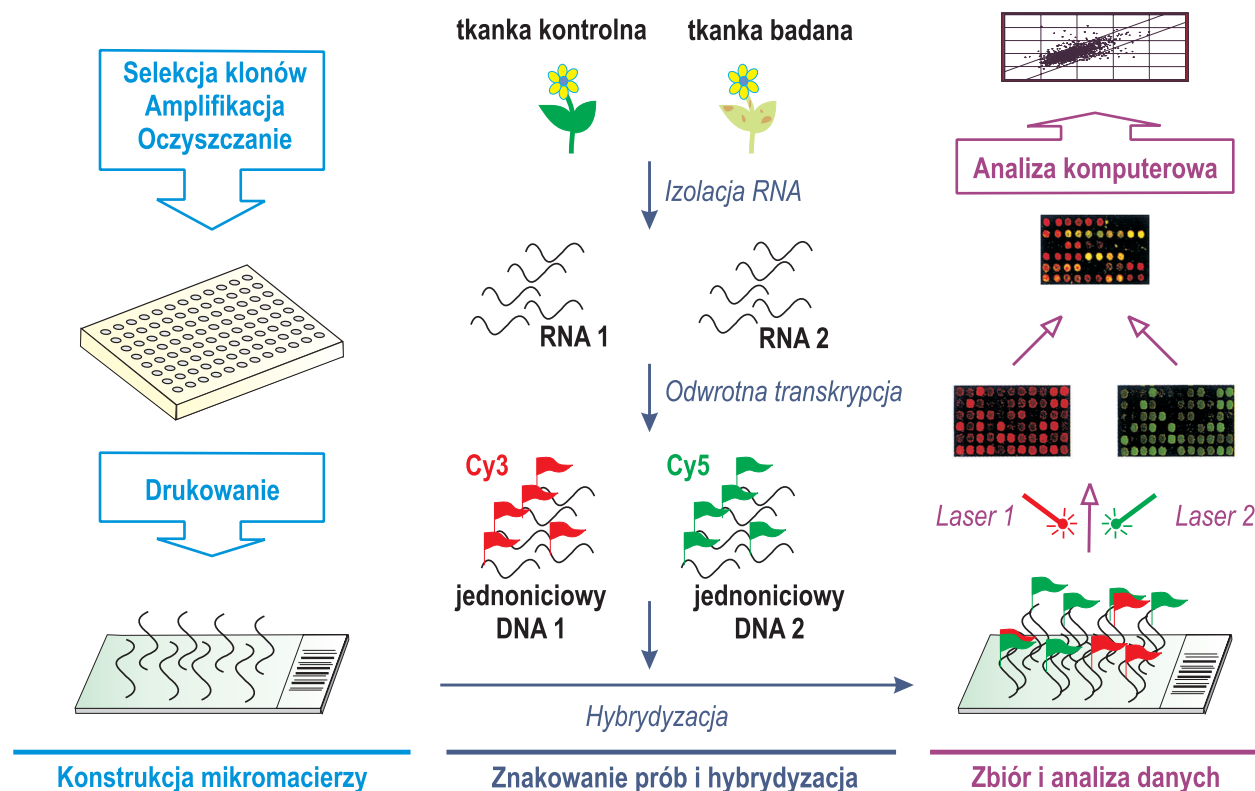
dzie całej sekwencji genomu. Oligonukleotydy muszą zostać tak zaprojektowane, by były w pełni komplementarne do odcinka wybranego genu, a równocześnie maksymalnie różne od pozostałych genów. Aby zapewnić odpowiednio wysoką specyficzność, projektuje się od kilku do kilkunastu sond, pokrywających łącznie kilkusetnukleotydowy odcinek danego genu. Dodatkowo projektowany jest drugi zestaw sond, z których każda różni się od sondy w pełni komplementarnej tylko jednym nukleotydem. W ten sposób jeden gen jest reprezentowany na chipie przez kilkanaście par oligonukleotydów.

Z kolei samo otrzymanie sond w przypadku chipów DNA wydaje się być zadaniem stosunkowo prostym. Dzięki pełnej automatyzacji, syntetyzery DNA są obecnie w stanie wyprodukować nawet około 1000 oligonukleotydów w ciągu jednego etapu trwającego zwykle około 2 godzin. Innym sposobem otrzymania krótkich sond jest ich bezpośrednia synteza na mikromacierzy. W tym celu najczęściej wykorzystywane są metody fotolitograficzne działające w oparciu o fotoczułe grupy ochronne lub fo-

toindukowane odczynniki syntetyczne. W metodzie tej poszczególne reakcje chemiczne z cyklu syntezy oligonukleotydu indukowane są za pomocą światła. Zasięg reakcji jest więc ograniczony do miejsca, na które pada światło, zwykle światło ultrafioletowe. W ten sposób techniki fotolitograficzne zapewniają szczególnie wysoki poziom integracji syntetyzowanych mikromacierzy DNA sięgający nawet kilkuset tysięcy różnych oligonukleotydów na powierzchni kilku cm^2 . W przypadku macierzy o niższej gęstości, zawierających kilka czy kilkanaście tysięcy sond, oligonukleotydy mogą być naniesione na płytkę szklaną podobnie jak sondy cDNA.

PRZYGOTOWANIE PRÓBY

Sposób przygotowania i znakowania próby zależy od rodzaju użytej mikromacierzy. Jednak w każdym przypadku pierwszym krokiem jest izolacja RNA z badanego materiału biologicznego (Ryc. 2, 3). Jeśli stosowane są mikromacierze cDNA, to RNA jest po izolacji przepi-



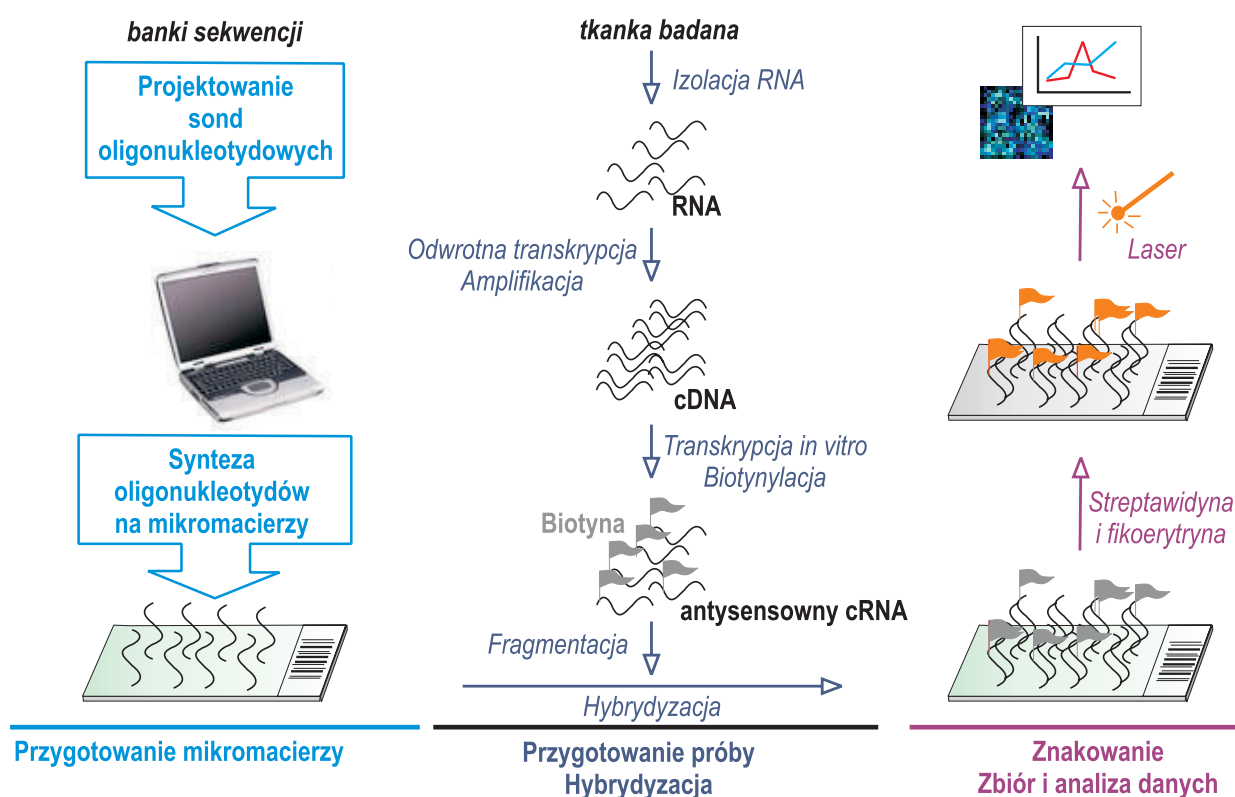
Ryc. 2. Schematyczny przebieg eksperymentu z wykorzystaniem mikromacierzy cDNA.

sywany na komplementarny jednoniciowy DNA, przy pomocy enzymu zwanego odwrotną transkryptazą. W czasie odwrotnej transkrypcji do powstających cząsteczek DNA włączane są znakowane nukleotydy – posiadające dołączony barwnik fluorescencyjny, co umożliwia późniejsze obrazowanie i oszacowanie ilości cząsteczek (Ryc. 2).

Jedną z istotnych zalet mikromacierzy cDNA jest to, że znakując dwie próby różnymi barwnikami fluorescencyjnymi możemy w pojedynczym eksperymencie zbadać i porównać ekspresję genów w próbce eksperymentalnej i w próbce kontrolnej (na przykład w zmienionej chorobowo i w zdrowej tkance). Najczęściej używana do znakowania para fluoroforów to Cyanine-3 (Cy3) i Cyanine-5 (Cy5). Widma emisji tych barwników pokrywają się w bardzo niewielkim stopniu, co pozwala na wybiórcze zliczenie intensywności sygnału emitowanego przez każdą z hybrydizowanych prób. Ważne jest również to, iż nukleotydy znakowane Cy3 i Cy5 charakteryzują się dobrą wydajno-

ścią wbudowywania do cDNA, mimo że fluorofory stanowią sporą zawadę przestrzenną.

W przypadku chipów znakowany jest nie cDNA, a tak zwany antysensowny RNA (Ryc. 3, cRNA). Ma on sekwencję komplementarną do sond oligonukleotydowych umieszczonych na chipie, co jest warunkiem hybrydyzacji. W celu jego otrzymania, wyizolowany RNA zostaje przepisany na cDNA, równocześnie liczba analizowanych cząstek ulega zwielokrotnieniu. Należy jednak pamiętać, że amplifikacja musi mieć charakter liniowy, bowiem tylko przy zachowaniu wyjściowych proporcji różnych cząsteczek w puli można określić, jaki był ich względny poziom w badanych komórkach czy tkankach. Utworzony cDNA służy jako matryca do tranaskrypcji *in vitro*, w czasie której do powstającego cRNA dołączana jest biotyna. Następnie, już po hybrydyzacji, biotynylowany cRNA znakuje się przy pomocy kompleksu streptawidyny z barwnikiem fluorescencyjnym, fikoerytryną. Wreszcie, inaczej niż przy mikromacierzach cDNA, w pojedynczym eks-



Ryc. 3. Schematyczny przebieg eksperymentu z wykorzystaniem chipów DNA.

perymencie można hybrydyzować do chipa tylko jedną próbę.

Hybrydyzacja obu typów mikromacierzy zachodzi podczas kilkunastogodzinnej inkubacji w komorze hybrydyzacyjnej, w warunkach zapewniających równomierny dostęp próby do całej powierzchni mikromacierzy. Po hybrydyzacji i odmyciu niezwiązanej próby, mikromacierz jest gotowa do analizy.

ZBIERANIE I ANALIZA WYNIKÓW

Dane zbierane są przez czytnik konfokalny, po wzbudzeniu znaczników fluorescencyjnych światłem lasera o odpowiedniej długości. Zmierzona intensywność fluorescencji, pomniejszona o wartość tła, obrazuje ilość cząsteczek, które hybrydyzowały do danego elementu mikromacierzy. Analiza chipów obejmuje: (i) porównanie intensywności fluorescencji w obrębie każdej pary sond (specyficzny RNA obecny w próbce będzie silniej hybrydyzował z całkowicie komplementarną sondą niż z sondą różniącą się jednym nukleotydem) oraz (ii) zestawienie wyników uzyskanych dla wszystkich sond reprezentujących dany gen. Na tej podstawie można wnioskować o obecności lub braku ekspresji genu oraz porównywać ze sobą poziomy ekspresji wielu genów.

W przypadku mikromacierzy cDNA, gdzie hybrydyzowane są z reguły dwie próby jednocześnie, sygnały pochodzące od barwników fluorescencyjnych zbierane są oddzielnymi kanałami i tworzone są dwa obrazy: eksperymentalny i kontrolny. Obrazy te można na siebie nakładać i porównywać intensywności sygnału dla poszczególnych genów.

Zanim jednak przejdziemy do dalszych analiz i interpretacji, należy przede wszystkim znormalizować takie „surowe” dane. Normalizacja jest niezbędna z uwagi na możliwość popełnienia szeregu błędów, często trudnych do zdiagnozowania na wcześniejszych etapach, a mogących mieć znaczny wpływ na wyniki pomiarów. Należą do nich: (i) różnice w ilości wyjściowego RNA lub wydajności znakowania prób odmiennymi fluoroforami; (ii) różnice w ilości sond naniesionych na mikromacierz, spowodowane np. nieprawidłowym działaniem urządzenia do produkcji mikromacierzy; (iii) nierównomierna hybrydyzacja, wynikająca ze złej dystrybucji roztworu hybrydyzacyjnego oraz (iv) różnice w intensywności tła, spowodowane np. zanieczyszczeniami.

Opracowano szereg algorytmów wykorzystywanych przy normalizacji danych uzyskanych z mikromacierzy. Zazwyczaj wchodzi one w skład pakietów oprogramowania czytnika. Wskazane jest również umieszczenie na mikromacierzy kontroli negatywnych, czyli sond dla genów, które nie powinny hybrydyzować z analizowaną próbą, np. genów zwierzęcych na mikromacierzach przeznaczonych dla roślin. Można również przed znakowaniem dołączyć do obu pul RNA znaną ilość RNA obcego pochodzenia (ang. spiking controls), który po hybrydyzacji z odpowiednią sondą na mikromacierzy może być wykorzystany do normalizacji obu kanałów fluorescencji. Inna strategia normalizacji polega na analizie sygnałów pochodzących od genów o konstytutywnej ekspresji w każdym typie komórek i w każdych warunkach (ang. housekeeping genes).

Podstawowym celem eksperymentu mikromacierzowego jest zbadanie poziomu ekspresji genów w próbce badanej względem próby kontrolnej i wyróżnienie genów o zmienionej ekspresji. Dla mikromacierzy cDNA dane te otrzymuje się w pojedynczym eksperymencie, dla chipów oligonukleotydowych trzeba porównać wyniki zebrane z niezależnych hybrydyzacji. Do eksperymentatora należy ustalenie jaką różnicę w ekspresji genów należy uznać za znaczącą statystycznie. Z reguły za znaczące przyjmuje się różnice wyższe niż dwu – czterokrotne.

W wielu przypadkach takie „proste” porównanie poziomów ekspresji genów między dwiema próbami stanowi dopiero początek badań. Szczególnie poznanie zmian zachodzących podczas długotrwałych procesów, np. wzrostu organów, rozwoju choroby czy reakcji na długotrwałe działanie czynników zewnętrznych, wymaga zestawienia wyników uzyskanych w kilku czy kilkunastu eksperymentach. Istnieje szereg metod umożliwiających takie porównania (QUACKENBUSH 2001). Należy do nich metoda grupowania hierarchicznego (ang. hierarchical clustering) (EISEN i współaut. 1998). Polega ona na grupowaniu podobnie zachowujących się genów, a następnie łączeniu powstałych w ten sposób grup w kolejne, jeszcze większe. Proces ten powtarzany jest tak długo, aż wszystkie geny zostaną połączone w pojedyncze drzewo hierarchiczne. Analiza takich grup genów o podobnej ekspresji pozwala kompleksowo spojrzeć na procesy biologiczne – umożliwia między innymi przyporządkowanie funkcji genom na podsta-

wie podobieństwa profilu ich ekspresji do profilu innych genów z grupy. Jest również bardzo prawdopodobne, że geny o podobnym profilu ekspresji podlegają podobnej regulacji. Przy takim założeniu analiza ekspresji może stanowić punkt wyjścia dla badania mechanizmów kon-

trolujących procesy biologiczne, np. poszukiwania wspólnych elementów regulatorowych w sekwencjach genów.

MIKROMACIERZE W DIAGNOSTYCE I TERAPII CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

Prowadzone w ostatnich kilku latach badania ukazały jak liczne i różnorodne korzyści przynieść może zastosowanie mikromacierzy DNA. Szczególnie duże nadzieje wiązane są z ich praktycznym wykorzystaniem w medycynie (AITMAN 2001). Uważa się, iż chipy DNA umożliwią szybszą i precyzyjniejszą diagnostykę wielu chorób, lepsze poznanie ich etiologii i mechanizmu molekularnego oraz trafniejszy dobór optymalnej terapii. W jaki sposób oczekiwania te są obecnie realizowane najłatwiej dostrzec na przykładzie nowoczesnej onkologii.

Chociaż istnieją nowotwory powstające w wyniku mutacji pojedynczego genu, to jednak większość z nich rozwija się na skutek nieprawidłowego działania wielu genów, z których żaden samodzielnie nie doprowadziłby do transformacji. Efektywna walka z nowotworami wymaga zatem wielokierunkowych działań. Najważniejsze z nich to:

- identyfikacja zarówno czynników powodujących powstawanie i rozwój nowotworów, jak i mechanizmów obronnych organizmu;
- postawienie odpowiednio wczesnej i prawidłowej diagnozy;
- właściwy dobór terapii;
- poznanie czynników wpływających na skuteczność terapii.

Choć może się to wydawać wręcz nieprawdopodobne – mikromacierze DNA okazują się przydatnym narzędziem na każdym z wymienionych etapów.

ROZPOZNANIE PRZYCZYN

Identyfikacja przyczyn choroby to pierwszy krok do jej zapobiegania. Wiele chorób nowotworowych związanych jest z czynnikami środowiskowymi. Podstawowym zadaniem badacza jest więc ich identyfikacja. Do takich analiz konstruowane są macierze złożone z genów odpowiedzialnych za naprawę DNA, metabolizm obcych dla organizmu substancji, cykl ko-

mórkowy, stres oksydacyjny i programowaną śmierć komórki. Dzięki możliwości jednoczesnej analizy aktywności praktycznie wszystkich genów uzyskujemy pełny obraz działania testowanego czynnika na organizm. W ten sposób można identyfikować nowe potencjalne karcynogeny, wyjaśniać mechanizmy ich działania, określić standardy bezpiecznego ich stosowania (VRANA i współaut. 2003).

DIAGNOZA

Poznanie różnic we wzorze ekspresji setek genów może służyć jako narzędzie ułatwiające klasyfikację histologicznie nierozróżnialnych nowotworów, wykazujących jednak różnice w zachowaniu klinicznym. Tą drogą można prawidłowo zdiagnozować choroby w bardzo wczesnym stadium rozwoju i dobrać indywidualną, optymalną dla danego pacjenta terapię (MACGREGOR i SQUIRE 2002).

Klasyczne metody diagnostyczne są często niewystarczające dla właściwego rozróżnienia nowotworów. Z sytuacją taką możemy się spotkać próbując odróżnić ostrą białaczkę szpikową (AML) od ostrej białaczki limfatycznej (ALL). Tymczasem obie jednostki chorobowe wymagają zupełnie innego leczenia, a dodatkowo stwarzają całkowicie inne zagrożenie dla zdrowia pacjenta. Dzięki zastosowaniu technologii mikromacierzy znaleziono jednoznaczne markery genetyczne obu chorób. W tym celu do macierzy zawierającej 6800 genów hybrydowano próby pochodzące z krwi chorych cierpiących na oba typy białaczek. W rezultacie zidentyfikowano 50 genów ulegających zdecydowanie różnej ekspresji u chorych cierpiących na AML i ALL (GOLUB i współaut 1999).

DOBÓR TERAPII – ROKOWANIE

W ciągu ostatniej dekady repertuar leków przeciwnowotworowych uległ znacznemu po-

większeniu. Niestety ich stosowanie często odbywało się metodą prób i błędów. Analiza profilu ekspresji genów pozwoliła znacząco poprawić ten stan rzeczy przez znalezienie związków pomiędzy rodzajem nowotworu a jego wrażliwością na dany rodzaj terapii czy nawet na konkretny lek. Zademonstrowano również kliniczną użyteczność mikromacierzy DNA w procesie przewidywania skutków choroby nowotworowej u pacjentów poddanych określonej terapii.

Poniższy przykład obrazuje wykorzystanie mikromacierzy w opracowywaniu skutecznych dróg diagnostyki, terapii i prognozowania u pacjentek z nowotworami piersi. Kliniczny przebieg choroby po usunięciu zmiany nowotworowej może być bardzo zróżnicowany – od przypadków szybkiego nawrotu ze skutkiem śmiertelnym, aż do przeżycia ponad 10 lat po operacji bez najdrobniejszych objawów choroby. W zależności od charakteru zmiany nowotworowej pacjentkom po operacji proponuje się odmienne terapie. Do niedawna stawiane prognozy pooperacyjne obarczone były dużym ryzykiem błędu, gdyż opierały się tylko na zewnętrznych przesłankach, takich jak np. rozmiar guza. Dzięki mikromacierzom można poznać także profil genetyczny zmiany, co podwyższa wiarygodność uzyskanej prognozy.

O skuteczności metod diagnostycznych opartych o mikromacierze świadczyć mogą badania pacjentek z niewrażliwym na hormony nowotworem piersi. W ich pierwszym etapie wykorzystano macierz zawierającą sondy cDNA dla ponad 25 tysięcy ludzkich genów. Zastosowano cDNA o długości od 200 do 1100 par zasad, wśród nich między innymi sondy

specyficzne dla 32 genów o znanym, stałym poziomie ekspresji, by przy ich pomocy znormalizować intensywność uzyskanych sygnałów. Z macierzą hybrydyzowano jednocześnie próby pobrane ze zdrowej tkanki i próby z 20 zróżnicowanych nowotworów. Dziesięć próbek guzów pochodziło od pacjentek, które przeżyły bez nawrotu choroby przez ponad 5 lat (5y-S), dziesięć zaś od pacjentek, które zmarły w przeciągu 5 lat po operacji (5y-D). W ten sposób zidentyfikowano 257 genów o podwyższonej i 378 genów o obniżonej ekspresji w tkance zdrowej w porównaniu z tkanką zmienioną nowotworowo. Przeanalizowano także różnice w ekspresji genów pomiędzy grupami 5y-S i 5y-D. Ustalono, że próby tkanki nowotworowej pobrane od pacjentek o odmiennym przebiegu choroby znacząco się różniły – znaleziono 71 genów o zdecydowanie wyższej ekspresji w grupie 5y-D oraz 15 genów o wyższej ekspresji w grupie 5y-S. Jak nietrudno się domyślić, u pacjentek ze śmiertelnym przebiegiem choroby podwyższonej ekspresji ulegały geny zaangażowane we wzrost i tworzenie przerzutów, obniżała się natomiast ekspresja genów związanych z naprawą materiału genetycznego i przekazywaniem sygnału w komórce. Dla sprawdzenia wiarygodności wyników dodatkowo porównano poziomy ekspresji wybranych 18 genów innymi metodami stosowanymi w biologii molekularnej. Po uzyskaniu zgodnych rezultatów zidentyfikowane geny potraktowano jako markery pozwalające skonstruować macierz diagnostyczną. Jej zastosowanie dla losowej próby pacjentek podniosło trafność rokowań do 90% (NAGAHATA i współaut. 2004).

PODSUMOWANIE

Zaprezentowane powyżej przykłady skutecznego wykorzystania mikromacierzy DNA nie ograniczają się jedynie do chorób nowotworowych. Podobną strategię postępowania można zastosować również w wielu innych schorzeniach, na przykład w alergiach – odpowiednio skonstruowana mikromacierz mogłaby być pomocna przy jednoczesnej analizie szerokiej gamy alergenów. Zanim jednak mikromacierze zostaną wprowadzone do rutynowego stosowania w diagnostyce, trzeba pokonać szereg trudności. Podstawową kwestią, którą należy dopracować jest standaryzacja metody. Nie ustalono jeszcze jak przekształcić

obserwacje poczynione za pomocą mikromacierzy w proste, powtarzalne testy. Będące w użyciu mikromacierze różnią się zestawem i długością zastosowanych sond, metodą hybrydyzacji lub detekcji sygnału. W tej sytuacji uzyskane efekty mogą być zależne od wielu trudno mierzalnych czynników.

Można stwierdzić, że wszystkie zalety i wady mikromacierzy DNA wypływają z tej samej ich właściwości – są one źródłem olbrzymiej ilości bardzo złożonych danych, których analiza może dostarczyć wiele informacji, jest ona jednak niezwykle skomplikowana.

DNA MICROARRAYS

Summary

The breakthrough in DNA sequencing technology and completion of sequencing of first eucaryotic genomes raised the need for high-throughput methods of gene function analysis. To solve this problem the DNA microarray technology has been developed. It is based on traditional transcript profiling methods which use the hybridization ability of DNA and RNA to monitor gene expression. Due to miniaturisation and the use of fluorescent dyes DNA microarrays allow for simultaneous monitoring of the expression of tens of thousands genes. There are two main types of DNA microarrays: cDNA microarrays and oligonucleotide microarrays, also called DNA chips. In the former, several-hundred-nucleotide long cDNA probes are printed on a glass plate and hybridized to a fluorescently labeled target cDNA obtained from the tissue of interest. In the latter, type of microarrays, each gene is represented by several short

oligonucleotides (about 30 nt), perfectly matching the target gene, and several oligomers with a single mismatch. Oligonucleotides are usually synthesised on a glass slide using the photolithographic technique and the slide is hybridized to fluorescently labeled target RNA. Analysis of microarray data includes the comparison of gene expression in the experimental and control probes or the comparison of gene expression profiles obtained in several experiments, by different clustering methods.

Medicine is one of the fields where DNA microarrays have already found practical application. At present they are especially useful in cancer research. DNA microarray analysis of tumor tissues allows to differentiate among various cancer types, to prognose the illness progress and plan the therapy. DNA microarrays are also an irreplaceable tool in a search for new drugs.

LITERATURA

- AHARONI A., VORST O., 2002. *DNA microarrays for functional plant genomics*. Plant Mol. Biol. 48, 99–118.
- AITMAN T. J., 2001. *DNA microarrays in medical practice*. BMJ 323, 611–615.
- BROWN P. O., BOTSTEIN D., 1999. *Exploring the new world of the genome with DNA microarrays*. Nat. Genet. Suppl. 21, 33–37.
- DUGGAN D. J., BITTNER M., CHEN Y., MELTZER P., TRENT J. M., 1999. *Expression profiling using cDNA microarrays*. Nat. Genet. Suppl. 21, 10–14.
- EISEN M. B., SPELLMAN P. T., BROWN P. O., BOTSTEIN D., 1998. *Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14863–14868.
- GOLUB T. R., SLONIM D. K., TAMAYO P., HUARD C., GAASENBEEK M., MESIROV J. P., *et al.*, 1999. *Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring*. Science 286, 531–537.
- HARRINGTON CH. A., ROSENOW C., RETIEF J., 2000. *Monitoring gene expression using DNA microarrays*. Curr. Opin. Microbiol. 3, 285–291.
- HUNT S. P., LIVESSEY F. J. (red.), 2000. *Functional Genomics*. Oxford University Press, Avon.
- JORDAN B. R. (red.), 2001. *DNA Microarray: Gene Expression Applications*. Springer, Heidelberg.
- MACGREGOR P. F., SQUIRE J. A., 2002. *Application of Microarrays to the Analysis of Gene Expression in Cancer*. Clin. Chem. 48, 1170–1177.
- NAGAHATA T., ONDA M., EMI M., NAGAI H., TSUMAGARI K., FUJIMOTO T., HIRANO A., SATO T., NISHIKAWA K., AKIYAMA F., SAKAMOTO G., KASUMI F., MIKI Y., TANAKA T., TSUNODA T. 2004. *Expression profiling to predict postoperative prognosis for estrogen receptor-negative breast cancers by analysis of 25,344 genes on a cDNA microarray*. Cancer Sci. 95, 218–225.
- QUACKENBUSH J., 2001. *Computational analysis of microarray data*. Nat. Rev. Genet. 2, 418–427.
- VRANA K. E., FREEMAN W. M., ASCHNER M., 2003. *Use of Microarray Technologies in Toxicology Research*. Neuro Toxicol. 24, 321–332.