

# Genové čipy — perspektivní nástroj biologie i moderní medicíny

Alena Čížková

Lidskému genomu je věnována značná pozornost molekulárních biologů. Přestože byl projekt sekvenování lidského genomu HUGO (The Human Genome Project) v r. 2003 úspěšně dokončen, stále je z celkového množství 25 000 genů přesná funkce známa jen u několika tisíc. Proto dnes nabývá na významu přístup označovaný jako funkční genomika, tedy přiřazování funkce definovaným genům, ať již známým nebo zatím neznámým. Při odhalování funkce lidských genů je nutná úzká spolupráce mezi genomikou a moderní medicínou, která se dnes neorientuje pouze na odstraňování příznaků chorob, ale především usiluje o objasnění a odstranění jejich příčin a o ovlivnění manifestace onemocnění. Spektrum metodických postupů, které dnes můžeme využít v primárním výzkumu a v diagnostice genetických onemocnění, je poměrně široké. Jednou z vysoce perspektivních metod jsou právě genové čipy.

## Základní charakteristika čipů

Atraktivním výzkumným pohledem současné molekulární genetiky je také studium změn aktivity genů během života nebo v důsledku onemocnění. Dosavadními metodami bylo možné sledovat pouze aktivitu několika málo jednotlivých genů. Průlom v tomto směru přinesla technologie genových čipů (microarrays), která umožňuje sledovat aktivitu tisíců genů zároveň. Toto simultánní sledování exprese (projevu) velkého množství genů je zcela klíčové a je dnes základem funkční genomiky. Poprvé se technologie genových čipů objevila v r. 1995 (Schen a kol. 1995) a od té doby se rychle rozvíjí. Genový čip využívá mechanismus vzájemné vazby (hybridizace) mezi dvěma úseky DNA, jedním nepohyblivým, jímž je vlastní sonda na čipu, a druhým pohyblivým v roztoku, který představuje zkoumaný vzorek a na povrch čipu se nanáší.

Pro konstrukci DNA čipů mohou být využity různé nosiče, jako je sklo, porcelán, mikrotitrační destička nebo membrána. Sondy se nanášejí na zvolený povrch stroje (roboticky) a mohou pocházet ze dvou různých zdrojů. Sondami mohou být buď produkty polymerázové řetězové reakce (PCR) připravené z příslušných cDNA

klonů (cDNA je komplementární DNA vzniklá reverzní transkripcí z mRNA), nebo oligonukleotidy. Použití PCR produktů je poměrně náročné, neboť přípravu klonů mohou doprovázet časté kontaminace. Pokud zvolíme komerčně syntetizované oligonukleotidy, je důležité vybrat optimální délku a jejich sekvenci.

Při výběru vhodných genů pro čip je nezbytné zařadit mezi studované geny také několik kontrolních vzorků, tedy negativní a pozitivní kontroly, vzorky obsahující pouze roztok pro tisk (blank) a kotvy (viz dále). Kontrolní geny umožní určitou standardizaci experimentu, nezbytnou pro normalizaci a zpracování dat. Negativní kontrolu představuje soubor exogenních genů, tedy genů, které se nevyskytují ve studovaném organismu. Pozitivní kontrolou jsou tzv. housekeeping geny. Jsou to ty, které jsou nutné pro zachování základních funkcí příslušného organismu a mají tedy ve sledovaných vzorcích stále stejnou expresi. Kotvy tvoří fluorescenčně značené oligonukleotidy, které fluoreskují i v případě, že na čip není hybridizována žádná DNA.

Následnou fází přípravy čipu je strojově natištění připravených sond na zvolený povrch v nám známém souřadnicovém uspořádání a jejich fixace. Sondy reprezentující části jednotlivých lidských genů mají

na skle podobu tečky o průměru 150 mikronů a nanášejí se pomocí speciálních jehel, které musí splňovat přísná kritéria — první i poslední tečka musí mít stejné rozměry, nesmí dojít k vynechání natisknutí a jehla musí nabírat vždy stejné a co nejmenší množství zásobního roztoku, aby se minimalizovaly ztráty používané sondy.

Standardně se používají dva hlavní typy DNA čipů. Prvním typem jsou DNA čipy založené na syntéze 25 nukleotidových sond přímo na povrchu čipu (*in situ*), produkované např. firmami Affymetrix a Agilent. Tento typ umožňuje studium exprese několika tisíc genů. Dnes je k dispozici celá řada těchto čipů, problémem je však jejich vysoká cena. Tyto komerční čipy často neumožňují zahrnout všechny geny, které chceme sledovat, neboť musíme pracovat s předem připraveným souborem.

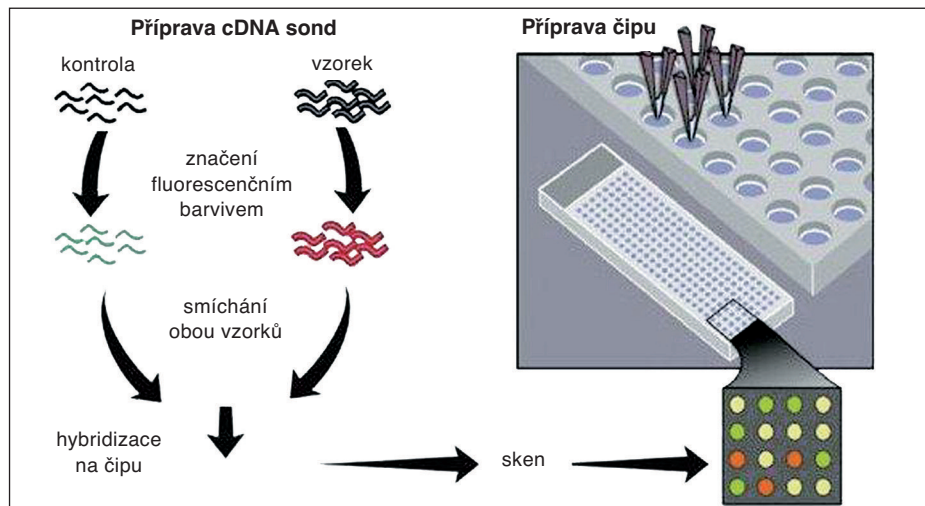
Druhý typ DNA čipů je založen na robotickém rozmístění vybraných sond syntetizovaných mimo povrch čipu na zvolený nosič. Tento typ produkuje jak komerční firmy, tak jednotlivé laboratoře. Často se objevují tzv. home made čipy, které si konstruuje výzkumná laboratoř a vybírá si pouze cílené skupiny genů.

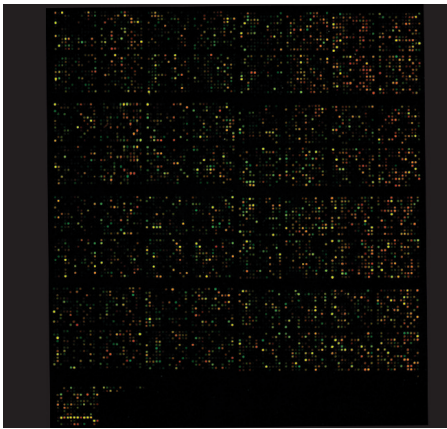
## Jak se s čipem pracuje

Pro hybridizaci na čipu potřebujeme fluorescenčně značenou cDNA. K jejímu získání jsou klíčové následující kroky: izolace neporušené RNA, její přepis reverzní transkripcí do cDNA a následné značení cDNA fluorescenčními barvami — fluorochromy (obr. 1). Pro hybridizaci k DNA čipu využíváme vždy dva vzorky, jeden kontrolní a jeden zkoumaný, který s kontrolním porovnáваме. Abychom mohli tyto dva vzorky současně sledovat, musíme pro značení jejich cDNA použít dvě taková fluorescenční barviva, jejichž emisní spektra se nepřekrývají. To nám umožní po následné aplikaci na povrch čipu odlišit cDNA těchto vzorků. Příprava obou vzorků probíhá odděleně a teprve po jejich dokončení se obě cDNA smíchají. Po přidání hybridizačního roztoku se směs nanese na povrch čipu, kde probíhá za stále teploty hybridizace k natištěným sondám. Laboratorní část představuje přibližně jen 20 % experimentu. Další a mnohem náročnější práce spočívá v analýze a vyhodnocení vzniklého hybridizačního vzoru pomocí počítačové techniky.

Vlastní hybridizační experiment je zakončen skenováním čipu a uložení získaného obrazu (scan image) ve formě počítačového souboru, který je kompatibilní s volně dostupnými nebo komerčními vyhodnocovacími programy. Technologie čipů tak poskytuje „zdrojová data“ ve formě obrazů, které je nutné následně analyzovat (obr. 2). Analyzují se vzájemné barevné kombinace fluorescenčních barviv a jejich intenzita. Aktivitu genu ve vzorku potom můžeme stanovit na základě analýzy fluorescenčního signálu v příslušném bodě. Pokud cDNA ze vzorku zdravé tkáně obarvíme např. zeleným a cDNA ze vzorku nádorové tkáně červeným fluorescenčním barvivem a analyzujeme oba vzorky na povrchu čipu současně, vidíme, že v bodě o souřadnici A1 odpovídající genu 1 je přítomen pouze zelený signál. To ukazuje,

Obr. 1 Schéma práce s DNA čipem. Orig. A. Čížková, upraveno





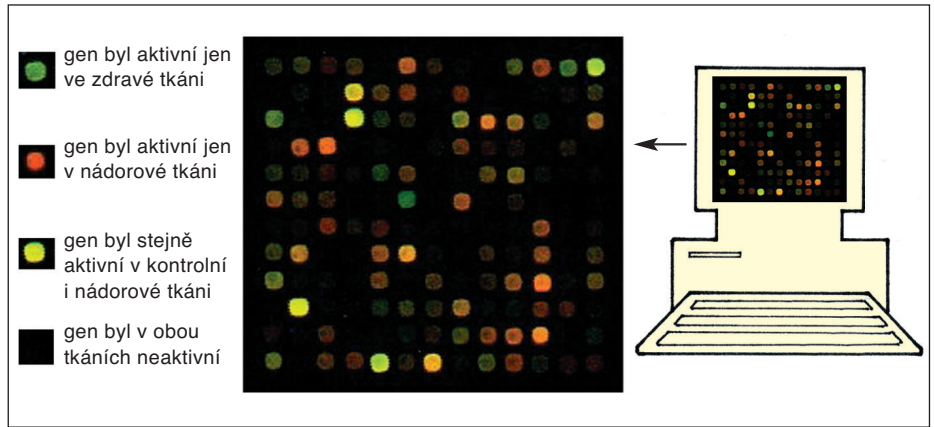
Obr. 2 Poblled na čip po hybridizaci vzorku. Tento čip nese sekvenci 10 162 lidských genů. Foto A. Čížková

že gen 1 je aktivní pouze ve zdravé tkáni. V bodě o souřadnici A2 je pouze červený signál, který znamená, že gen 2 je aktivní pouze v nádorové tkáni. Je-li v dalším bodě stejná intenzita červeného a zeleného kanálu, je příslušný gen aktivní ve zdravé i v nádorové tkáni. Takto analýza pokračuje bod po bodu, gen po genu, po celé ploše čipu (obr. 3).

Analýza získaného obrazu spočívá v převedení grafického formátu do datového souboru. Tento krok je prováděn softwarovým příložením mřížky na obraz. Následuje identifikace bodů a extrakce kvantitativních dat. Software přiřadí každému bodu jeho intenzitu a pomocí několika algoritmů se získají průměrné relativní intenzity fluorescence. Intenzity fluorescence se extrahují pro oba vzorky odděleně, tj. ve dvou spektrech, kterým říkáme kanály. Po získání intenzit jednotlivých fluorochromů následuje tzv. normalizace.

Normalizace je nepostradatelnou součástí čipových experimentů. Jejím cílem je co nejpřesněji stanovit míru exprese daného genu ve vzorku a odstranit vliv dalších faktorů na měření (Yang a kol. 2002). Intenzitu fluorescence ve vzorku totiž ovlivňují také fyzikální vlastnosti fluorescenčních barviv, jako je teplotní a světelná citlivost, doba života a efektivita jejich začlenění do cDNA. Je nutné zmínit i další faktory ovlivňující přesnost měření, jako je variabilita hybridizace, nastavení a citlivost skeneru. Po odfiltrování rušivých vlivů je výsledkem zpracování dat informace, zda k vyjádření daného genu dochází, popř. jak je jeho exprese silná.

Z předchozího výkladu je zřejmé, že čipové technologie vyžadují velké množství dat na vstupu i na výstupu. Základními vstupními daty jsou informace o sondách, způsobu přípravy jednotlivých sérií a typů čipů, dále informace o analyzovaném biologickém materiálu a jeho uchování, způsobech izolace RNA, způsobech fluorescenčního značení, podmínkách hybridizace a parametrech skenování. Výstupní data představují intenzity fluorescence v místě jednotlivých sond. Jde zhruba o 2 000 dat na jeden experiment. K vyhodnocení tak obsáhlého souboru informací je nutné propojit několik softwarových systémů, jako jsou databáze, programy pro analýzu a vizualizaci dat, veřejné databáze obsahující základní informace či odkazy na sledované geny a komerční laboratorní systém LIMS (Laboratory Information Management Sys-



Obr. 3 Princip vyhodnocení čipu na základě analýzy fluorescence v jednotlivých bodech. Orig. A. Čížková, kresba S. Holeček

tem) umožňující snadnou manipulaci a uchování veškerých informací o každém experimentu. Proto bylo vytvořeno několik operačních systémů, které všechny tyto složky propojují a umožňují snazší a přehlednější manipulaci s celým souborem dat a informací.

### Využití čipových technologií

Technologie genových čipů představuje dynamicky se rozvíjející přístup poskytující vysokou výkonnost DNA analýz. Čipová technologie se neobejde bez spolupráce mnoha různých oborů, jako je organická chemie, chemie povrchů, molekulární biologie, přesná mechanika, robotika, optika, fyzikální chemie, statistika, bioinformatika a dalších. Miniaturizace, automatizace a relativní rychlost přípravy čipu jsou výhodami technologie. To potvrzuje i nárůst počtu studií zabývajících se čipy. Zatímco v r. 1996 bylo publikováno pouze pět článků zaměřených na problematiku čipů, v r. 2003 to bylo již 3 700 publikací. Pokud dnes např. zadáme v počítačové databázi PubMed klíčové slovo microarray (čip), získáme již 9 503 odkazů.

Značného využití dosáhla čipová technologie při analýze profilů genové exprese a porovnávání normálních „standardních“ profilů s profily studovaných patologických stavů. Tento typ analýz může přinést informace o expresních profilech charakteristických pro určité typy geneticky podmíněných onemocnění nebo může sloužit k charakterizaci nádorových tkání. Čipy umožňují zjistit i reakce ostatních genů, což je rovněž žádoucí pro zevrubné poznání patologických mechanismů. Detailní molekulární charakterizace nádoru tak může být vodítkem pro specifickou léčbu připravenou na míru.

Genové čipy lze použít také k odhadu funkce genu podle podobnosti exprese (koexprese/koregulace) s již funkčně známým genem. Tím je predikována funkce neznámého proteinu a jeho účast v příslušné metabolické dráze (Mootha a kol. 2003). Toto sledování může přinést zásadní informace o skutečné funkci jednotlivých genů a o jejich významu v životních pochodech daného organismu.

### Genové čipy v ČR

Šíři diagnostických možností genových čipů lze dokumentovat na zaměření našich

pracovišť, která se těmito technologiemi zabývají. Předním pracovištěm v oblasti vyvíjení genových čipů u nás je Ústav dědičných metabolických poruch při 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Toto pracoviště se zabývá čipovou technologií se zaměřením na biogenezi a dědičné poruchy savčích mitochondrií již osm let. Pod vedením ing. Stanislava Kmocha byl za úzké spolupráce se skupinou MUDr. Josefa Houška (oddělení Bioenergetiky Fyziologického ústavu AV ČR) konstruován lidský mitochondriální čip, umožňující sledovat expresi asi 1 500 genů. Připravený čip dává možnost studovat diferenciální genovou expresi mitochondriálních a nukleárních genů kódujících mitochondriální proteiny u pacientů s poruchami oxidační fosforylace. Defekty oxidační fosforylace vyvolané mutacemi v jaderném i mitochondriálním genomu postihují nejčastěji energeticky náročné tkáně, jako je kosterní sval, myokard, centrální nervová soustava a játra. Mitochondriální onemocnění se projevují často již v raném věku širokým spektrem klinických projevů a většina z nich je neslučitelná se životem. Pro tato onemocnění zatím bohužel neexistuje příčinná terapie.

Čipovou technologií se u nás zabývají ještě další odborná pracoviště. Jedním z nich je Interní hematologická klinika Fakultní nemocnice v Brně, kde se tato technologie využívá k detekci genové exprese nádorových buněk. Dále můžeme jmenovat Institut experimentální botaniky v Českých Budějovicích. Zde se jeden z hlavních projektů zaměřil na detekci patogenních virů brambor.

Současný bouřlivý rozvoj molekulární genetiky a moderní medicíny bude vyžadovat nové a výkonné technologie, umožňující jak rychlou a přesnou diagnostiku, tak i účinnou léčbu řady chorob. Proto lze očekávat, že v blízké budoucnosti bude technologie čipů stále nabývat na významnosti především v souvislosti se studiem podstaty široké škály dědičných onemocnění. Významnost a důležitost výzkumu v této oblasti dokazuje i podpora řadou grantových projektů v zahraničí i u nás.

*Výzkum podporují projekty: Centrum aplikované genomiky IM 6837805002, Grant IGA MZ ČR (NR/8069-3) na téma Mitochip, Grant GAUK (54/203208), laboratoř Ústavu dědičných metabolických poruch 1. LF UK, Grant IGA MZ ČR (NR/7790-3) na téma Mitochondriální poruchy na podkladě dědičných poruch ATP-syntázy (oddělení bioenergetiky Fyziologického ústavu AV ČR).*