

Wykorzystanie mikromacierzy DNA w terapii i diagnostyce

Arkadiusz Kazula

Zakład Chorób Zwierząt Instytutu Weterynarii PAN

Adres do korespondencji: Arkadiusz Kazula, 27-600 Sandomierz ul. Portowa 18/4, e-mail: Kazula.gen@wp.pl

Poznanie mechanizmów regulujących ekspresję wielu tysięcy genów jest jednym z podstawowych kierunków genomiki. Do osiągnięcia tego celu potrzebne są specjalne techniki pozyskiwania i analizy wielu danych. Wydaje się, że kluczem do rozwiązania tych problemów może być połączenie nowoczesnych osiągnięć z dziedziny nanotechnologii, informatyki oraz klasycznych metod biologii molekularnej. Wynikiem połączenia tych dyscyplin było skonstruowanie mikromacierzy DNA [1].

Mikromacierze DNA, inaczej zwane czujnikami DNA lub chipami genowymi umożliwiają równoczesne śledzenie tysięcy reakcji molekularnych na płycie mniejszej niż szkiełko przykrywkowe. Wdrożenie tych systemów niewątpliwie zrewolucjonizuje badania mechanizmów zaburzeń genetycznych, będących przyczyną wielu schorzeń molekularnych włącznie z chorobami nowotworowymi. Za pomocą mikromacierzy DNA, w na podstawie różnic we wzorze aktywności różnych genów, będzie można opracowywać nowe, skuteczne leki. Zastosowanie mikromacierzy udoskonali diagnostykę chorób i prognozowanie ich przebiegu. Ułatwi dobór leczenia dostosowany do potrzeb indywidualnego pacjenta, czyli umożliwi dopasowanie terapii do swoistej postaci choroby i określi właściwy wybór leków, które w każdym konkretnym przypadku będą najskuteczniejsze, a jednocześnie będą powodować jak najmniej działań niepożądanych [2].

Idea jednoczesnego badania ekspresji wielu genów powstała już w latach 80. ubiegłego wieku. Po odkryciu łańcuchowej reakcji polimeryzacji (PCR), zastosowano po raz pierwszy technologię macierzy antysens DNA (cDNA). Naniesiono wówczas na paski nitrocelulozy 4000 sklonowanych sekwencji cDNA. Następnie wykonano do nich hybrydyzację ze znakowanymi radioaktywnie fragmentami cDNA otrzymanymi na matrycy informacyjnego RNA (mRNA) pochodzącego z komórek raka okrężnicy oraz prawidłowych komórek jelita. W efekcie uzyskano obraz hybrydyzacji z dziesiątkami radioaktywnych

DNA microarrays In pharmacy and medicine · 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 do differentiate among various cancer types to prognose the illness progress and plan therapy. DNA microarrays are also an irreplaceable tool in search for new drugs.

© Farm Pol, 2009, 65(3): 229-238

punktów, których liczba była proporcjonalna do liczby aktywnych genów w badanych komórkach. Metoda ta pozwoliła na określenie różnic w ekspresji genów pomiędzy różnymi typami histologicznymi raka okrężnicy [3,4].

W połowie lat 90. przypomniano sobie o tych badaniach i wiele grup badawczych oraz firm farmaceutycznych próbowało udoskonalić techniki zapoczątkowane w latach 80. Jednym z pierwszych, który tego dokonał był P. Brown i wsp. [5]. Udoskonalił on precyzję i powtarzalność wyników uzyskiwanych przy zastosowaniu mikromacierzy cDNA oraz obniżył ilość mRNA niezbędnego do otrzymania powtarzalnych wyników [5]. Z uwagi na wysokie koszty, wdrożenie tej techniki w badaniach molekularnych następowało bardzo powoli. Przełom dokonał się w 1999 r. po opublikowaniu w Science pracy poświęconej profilowi molekularnemu blastów białaczkowych [6]. Wykazano, że za pomocą mikromacierzy można odróżnić ostrą białaczkę szpikową od limfoblastycznej w oparciu o dane dotyczące ekspresji odpowiednich genów.

Ze względu na budowę, sposób otrzymywania oraz działanie wyodrębniono dwa odrębne systemy macierzy DNA. Mikromacierze oparte na oligonukleotydach zostały nazwane mikromacierzami oligonukleotydowymi o wysokiej gęstości, a z tego względu, że system ich otrzymywania nazywano Genechip, wprowadzono określenie chipy DNA [7, 8]. W mikromacierzach

Poznanie mechanizmów regulujących ekspresję wielu tysięcy genów jest jednym z podstawowych kierunków genomiki. Do osiągnięcia tego celu potrzebne są specjalne techniki pozyskiwania i analizy wielu danych.

oligonukleotydowych wykorzystuje się plastikową płytkę, na której bezpośrednio (*in situ*) przeprowadza się kontrolowaną syntezę oligonukleotydów o określonej sekwencji. Otrzymane oligonukleotydy mają zwykle długość mniejszą niż 30 bp. Najczęściej zbudowane są z 15–25 nukleotydów, a ich rozmiar nie przekracza 10 µm. Na płycie plastikowej o powierzchni 2 cm², która jest nośnikiem macierzy może zmieścić się około 300 tys. sond oligonukleotydowych [9]. Równolegle do technologii chipów DNA, rozwinęła się druga technika, w której wykorzystuje się biblioteki klonów DNA, które są automatycznie nanoszone na szkiełko macierzy. Macierze tego typu są nazywane, mikromacierzami cDNA. Są one otrzymywane na zwykłym szkiełku podstawowym preparatu mikroskopowego, na którym specjalna mikrodrukarka nanosi seryjnie odpowiednie sondy cDNA o długości 0,5–2kb. Sondy te uzyskuje się w wyniku klonowania produktów reakcji odwrotnego PCR (RT-PCR). W chwili obecnej techniczne jest możliwe naniesienie około 25 tys. fragmentów cDNA (sond DNA) na powierzchnię jednego szkiełka mikroskopowego pokrytego poli-L-lizyną, do której przyłącza się sondy cDNA [10].

Ten typ macierzy, opracowany na Uniwersytecie Stanforda w USA, ma kilka zalet [11]. Pierwszą z nich jest to, że za ich pomocą można badać ekspresję genów, nie znając ich pełnej sekwencji. Należy tylko dysponować odpowiednimi klonami DNA namnożonymi przez odwrotną transkrypcję i reakcję łańcuchowej polimerazy z mRNA (informacyjnego RNA), izolowanego z badanych komórek. Inną zaletą nie bez znaczenia jest to, że w przeciwieństwie do chipów DNA, metoda ta jest bardziej dostępna i tańsza. Wystarczy tylko zakupić odpowiedni automat nanoszący tysiące różnych sekwencji w sposób uporządkowany na nośnik (szkiełko przykrywkowe) macierzy oraz mieć własną bibliotekę klonów. W miarę rozwoju tej metody firmy biotechnologiczne obracają bibliotekami komercyjnymi zawierającymi potrzebny zestaw klonów do celów diagnostycznych i badawczych. Najważniejszą jednak zaletą mikromacierzy cDNA jest elastyczność ich działania. W miarę odkrywania ekspresji kolejnych genów w interesujących nas zmienionych chorobowo komórkach można modyfikować skład mikromacierzy cDNA i przyłączać do nich nowe sondy DNA, czego nie można robić w przypadku chipów DNA [10, 12].

Oprócz stosowania powyższych technik mikromacierzy uzyskano mniej popularne systemy, w których wykorzystuje się technologię mikrokuleczek, na których powierzchni osadzono oligonukleotydy (*luminex*), następnie hybrydyzowane ze znakowanym fluorescencyjnie RNA. Opracowano również system

hybrydyzacji *in situ*, pozwalający na jednoczesny odczyt ekspresji do 1000 cząsteczek mRNA w próbce.

Wszystkie te badania mają na celu otrzymanie techniki, która w sposób szybki, niezawodny i tani służyłaby do określenia aktywności genów w żywych komórkach [10, 13].

Mechanizm działania mikromacierzy DNA

Działanie mikromacierzy DNA opiera się na tradycyjnych technikach hybrydyzacyjnych używanych do analizy ekspresji genów w komórce. Wyznakowana próba pochodząca z badanego materiału biologicznego jest po odpowiedniej obróbce wprowadzana na płytkę zawierającą sondy DNA o znanej sekwencji nukleotydowej. W ten sposób podczas jednego eksperymentu można zanalizować ekspresję tysięcy genów, o ile na płytce znajdują się odpowiednie ilości reprezentujących je sond. W mikromacierzach cDNA rolę sond pełnią fragmenty cDNA długości około kilkuset nukleotydów. W przypadku chipów DNA, sondami są krótkie oligonukleotydy otrzymane na drodze syntezy chemicznej. Z uwagi na skomplikowany sposób projektowania i produkcji, najczęściej korzysta się z gotowych chipów DNA, oferowanych przez firmy biotechnologiczne.

Znacznie łatwiejsze do przygotowania są sondy DNA dla mikromacierzy cDNA, które zwykle konstruuje się na indywidualne potrzeby danego eksperymentu [14]. Mechanizm działania czujnika wykorzystuje zdolność hybrydyzacji jednoniciowych kwasów nukleinowych w struktury dwuniciowe, w których obie nici są połączone za pomocą wiązań wodorowych, według modelu Watsona-Cricka. W każdym łańcuchu DNA, zasada azotowa adenina (A), tworzy podwójne wiązanie wodorowe z tyminą (T) komplementarnego łańcucha, a zasada azotowa guanina (G), tworzy potrójne wiązanie wodorowe z cytozyną (C) sąsiedniego łańcucha. Jeżeli jednoniciowa sonda DNA napotka komplementarny fragment DNA, to następuje hybrydyzacja sondy z fragmentem DNA na komplementarnym odcinku. Na przykład, jeżeli cząsteczka DNA w badanej próbce za pomocą mikromacierzy łączy się z sondą o sekwencji –GGCAATT, znaczy to, że badana cząsteczka na pewnej długości posiada fragment sekwencji komplementarnej –CCGTTAA [15].

Zasady prowadzenia testu

Wybór typu mikromacierzy zależy od rodzaju badania, które zamierzamy przeprowadzić. Do przygotowania i wykorzystania chipów DNA niezbędna jest znajomość analizowanych sekwencji genów, których aktywność zamierzamy zbadać. Mikromacierze cDNA natomiast nie wymagają takiej wiedzy, dlatego można je wykorzystać do analizy ekspresji genów o nieznannej lub tylko częściowo znanej sekwencji. Test

przeprowadzony z wykorzystaniem mikromacierzy lub chipów DNA można podzielić na kilka etapów. Pierwszy etap polega na otrzymaniu odpowiednich sond DNA i umieszczeniu ich na specjalnym podłożu. Następna czynność polega na izolacji i wyznakowaniu próby pochodzącej z materiału pobranego od pacjenta. W trzecim etapie prowadzi się hybryzację DNA pochodzącego z próby (prób) do sond DNA umiejscowionych na mikromacierzach, a następnie na podstawie danych przeprowadza się komputerową analizę wyników.

Otrzymywanie sond do mikromacierzy

Sondy DNA do mikromacierzy cDNA otrzymuje się w wyniku powielania (amplifikacji) DNA za pomocą reakcji PCR. Metoda PCR jest powszechnie wykorzystywana w biotechnologii farmaceutycznej i biologii molekularnej do otrzymywania dużej ilości materiału genetycznego w wyniku jego powielenia, przy użyciu specyficznych enzymów. Przy przygotowaniu sond DNA stosuje się odwrotny PCR (tzw. RT-PCR), w którym wystarczy zaprojektować odpowiednie startery do selektywnej i wydajnej replikacji wybranych części genów, bez konieczności poznania całej sekwencji nukleotydowej sondy. Cechą tak otrzymanych sond DNA i macierzy z nich sporządzonych jest niska specyficzność wobec genów homologicznych. Wynika to z faktu, że sonda zbudowana z kilkuset nukleotydów może przyłączyć fragment danej sekwencji DNA, która jest komplementarna na krótkim odcinku sekwencji.

Problem ten można ominąć w wyniku zastosowania sond oligonukleotydowych, które stosuje się w chipach DNA. Z teoretycznych wyliczeń wynika, że sekwencja 17-nukleotydowa powinna pojawić się tylko raz w DNA o długości odpowiadającej całemu genomowi człowieka. Jednak naturalne sekwencje różnią się od rozkładu statystycznego. Przygotowanie, zatem odpowiednich sond oligonukleotydowych wymaga poznania w zasadzie całej sekwencji genu. Oligonukleotydy projektuje się w taki sposób, aby były całkowicie komplementarne do odcinka badanego genu. W celu zapewnienia dużej selektywności projektuje się kilkanaście sond DNA, które są zdolne do przyłączenia z różnymi rejonami odpowiedniego genu.

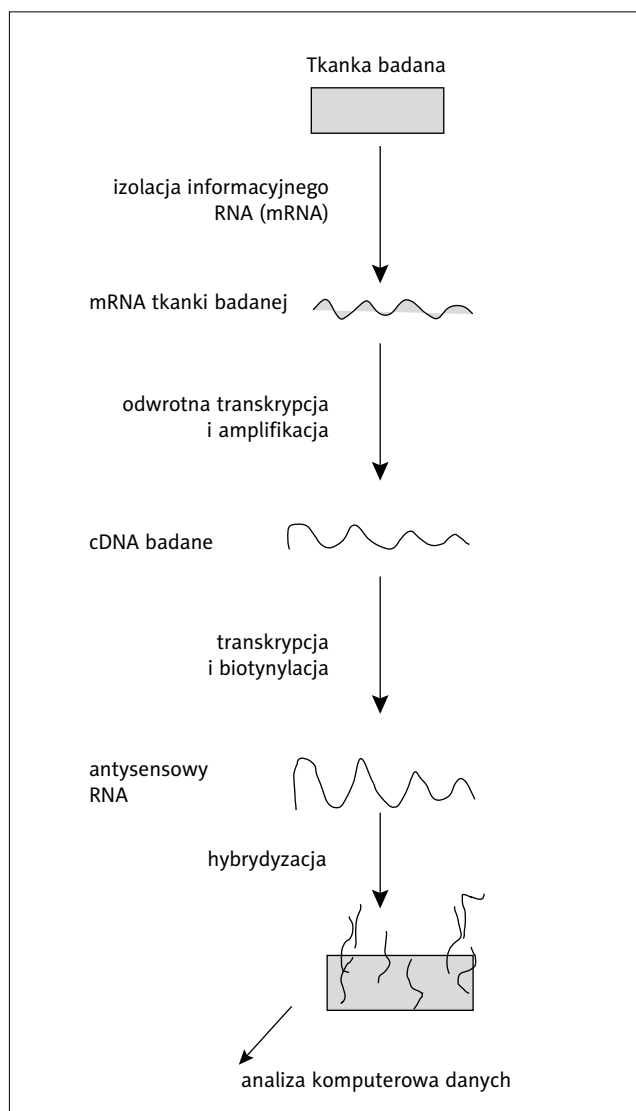
Przygotowanie próby

Materiałem wyjściowym do badania są najczęściej komórki pobrane od pacjenta, tkanki lub komórki uzyskane z hodowli komórkowych czy tkankowych oraz tkanki i narządy pobrane od zwierząt doświadczalnych. W badaniach próbuje się również zastosować materiał biologiczny pochodzący z biopsji cienkoigłowej, tkanek uzyskanych w czasie zabiegu chirurgicznego oraz wymazów z błon śluzowych [16, 17].

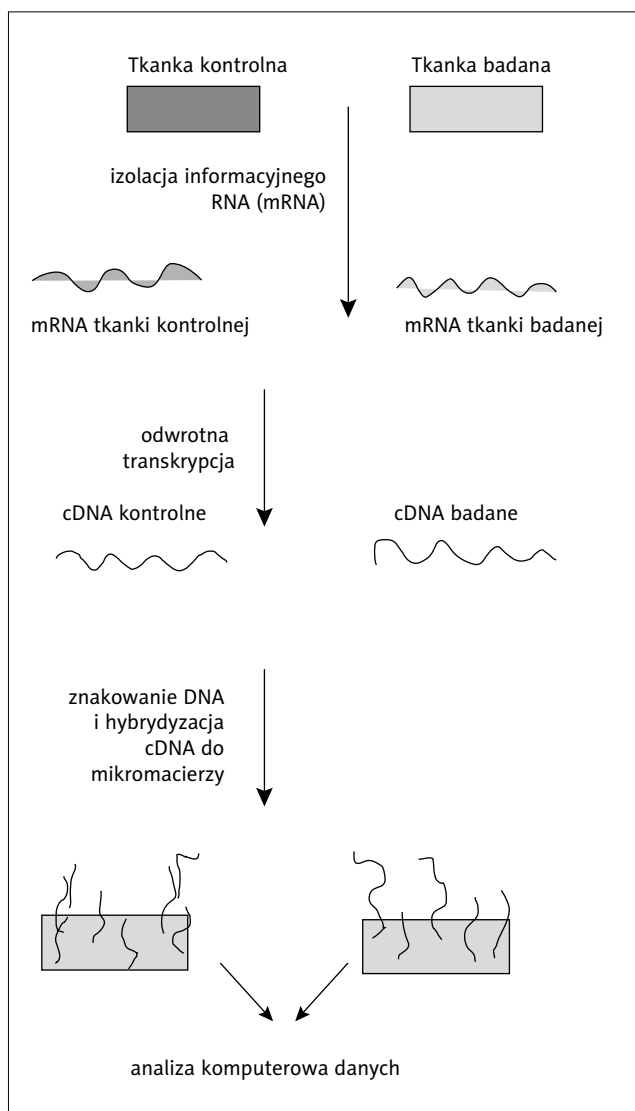
Sposób przygotowania próby pobranej od pacjenta zależy od rodzaju użytej mikromacierzy DNA. W każdym jednak przypadku pierwszym krokiem jest izolacja informacyjnego RNA (mRNA) z badanego materiału biologicznego. Stosuje się najczęściej izolację całkowitego mRNA lub izolację poli (A) RNA. Ilość mRNA potrzebna do dalszego badania powinna wynosić od 30 do 50 µg. Liczba komórek niezbędna do uzyskania takiej ilości mRNA jest różna w zależności od pobranej tkanki. W przypadku stosowania mikromacierzy cDNA należy przepisać sekwencję mRNA próby badanej, na komplementarną sekwencję jednoniciowego cDNA. Proces ten jest katalizowany przez odwrotną transkryptazę. Podczas procesu odwrotnej transkrypcji do nowopowstałego cDNA wbudowuje się znakowane nukleotydy, zawierające znacznik fluorescencyjny. Umożliwi to późniejszą analizę wyników hybrydacji materiału z próbek do sond DNA. Zaletą stosowania mikromacierzy cDNA jest fakt, że znakując dwie próby za pomocą różnych znaczników fluorescencyjnych można w jednym doświadczeniu porównać ekspresję genów np. zmutowanych czy zmienionych chorobowo z genami w zdrowej tkance.

W przypadku chipów DNA, znakowany fluorescencyjnie lub izotopowo jest nie, cDNA, ale tzw. antysensowy RNA (cRNA), który posiada potencjalną sekwencję komplementarną do sekwencji sond oligonukleotydowych, przyłączonych do płytki chipa. W celu pozyskania cRNA z tkanki lub hodowli komórkowej niezbędnych jest kilka etapów. Po otrzymaniu odpowiedniej ilości mRNA z materiału biologicznego przeprowadza się proces odwrotnej transkrypcji (RT). W czasie tej reakcji najpierw jest syntetyzowana pierwsza nić cDNA na matrycy mRNA, a następnie nić ta jest używana jako matryca do syntezy nici komplementarnej. W ten sposób otrzymujemy dwuniciowy cDNA. W następnym etapie przeprowadza się transkrypcję *in vitro*, w której wyniku otrzymuje się antysensową nić cRNA, wyznakowaną izotopem promieniotwórczym lub biotyną. Otrzymany cRNA poddaje się fragmentacji na odcinki o długości 35–200 par zasad, które mogą łączyć się z sondami oligonukleotydowymi macierzy DNA. Proces łączenia zachodzi na zasadzie hybrydacji do komplementarnego zestawu fragmentów oligonukleotydowych. Hybrydacja w obu typach mikromacierzy przebiega w zakresie temp. 45–65°C przez około 16 h, w specjalnej komorze hybrydacyjnej, w warunkach zapewniających równomierny dostęp próby do całej powierzchni mikromacierzy [10]. Po procesie hybrydacji z sondą DNA do biotynowanego RNA przyłącza się kompleks, streptawidyny

Mikromacierze oparte na oligonukleotydach, które zostały nazwane mikromacierzami oligonukleotydowymi o wysokiej gęstości, a z tego względu, że system ich otrzymywania nazywano Genechip, wprowadzono określenie chipy DNA.



Rycina 1. Schemat oznaczania ekspresji genów za pomocą chipów DNA



Rycina 2. Schemat oznaczania ekspresji genów za pomocą mikromacierzy DNA

z barwnikiem fluorescencyjnym – fikoerytryną. Po wyptukaniu niezwiązanej próby mikromacierz jest gotowa do analizy.

Analiza wyników

Celem użycia mikromacierzy jest zbadanie poziomu ekspresji genów w próbce badanej, względem próby kontrolnej i znalezienie genów o odmiennej ekspresji. Oprócz różnic w sposobie wytwarzania między dwoma typami macierzy istnieją również różnice w ich hybrydyzacji z materiałem badanym. Najważniejsza różnica wynika z porównawczego charakteru badania za pomocą mikromacierzy cDNA w stosunku do bezwzględnego pomiaru wykonywanego w przypadku chipów DNA. W przypadku mikromacierzy cDNA w jednym eksperymencie wykonujemy hybrydyzację z cDNA otrzymanym z dwóch typów komórek. Jeden materiał pobrany jest od tkanek zmienionych chorobowo, a drugi

od tkanek zdrowych traktowanych jako wzorzec. Obie pule cDNA są znakowane różnymi barwnikami i w czasie badania konkurują ze sobą o hybrydyzację do tych samych sond DNA. Jeżeli w jednym typie komórek następuje ekspresja danego genu, to z sondą wiąże się cDNA znakowane jednym barwnikiem, a plamka po hybrydyzacji będzie miała określony kolor. Gdy ekspresja badanego genu będzie zachodziła w jednakowym stopniu w obu typach komórek, to kolor będzie pośredni. Natomiast brak ekspresji badanego genu w obydwu typach komórek wykaże się brakiem zabarwienia, ponieważ żaden cDNA nie uległ hybrydyzacji. Podczas pomiaru na mikromacierzach cDNA jednemu genowi odpowiada jedna plamka hybrydyzacyjna (ang. *spot*) cDNA. Jeśli dojdzie do nierównomiernej hybrydyzacji na skutek błędów w nakładaniu prób (złego doboru barwnika), może dojść do znacznych błędów, które częściowo próbuje się niwelować poprzez prowadzenie

równoległe dwóch oznaczeń, znakując jedną tkankę raz zielonym barwnikiem, a w drugim badaniu czerwonym. Efekt hybrydyzacji można oglądać w mikroskopie przy wykorzystaniu techniki laserowej, a odczytanie danych jest możliwe dzięki użyciu odpowiedniego oprogramowania [18]

W chipach DNA na jedną płytkę nanosi się materiał biologiczny pochodzący z jednego typu komórek. Odczyt wyniku nie ma charakteru porównawczego, ale bezwzględny. Jeżeli chcemy porównać dwa typy komórek, musimy wykonać dwa oddzielne badania z użyciem dwóch próbek materiału biologicznego. Zastosowanie chipów DNA umożliwia wykonywanie wielu badań porównawczych między różnymi typami komórek. Przy ich użyciu DNA ekspresję jednego genu oceniamy na podstawie hybrydyzacji transkryptu z kilkunastoma sondami oligonukleotydowymi, homologicznymi do różnych rejonów badanego genu. Sondy te są rozmieszczone w różnych miejscach macierzy, co pozwala na zmniejszenie błędu podczas pomiaru. W sumie można stwierdzić, że pomiar na mikromacierzach wysokiej gęstości znacznie lepiej spełnia warunki pomiaru ilościowego niż pomiar na mikromacierzach cDNA. Sygnał ekspresji pojedynczego genu w chipach DNA określany jest na podstawie wielu pomiarów i hybrydyzacji jednego rodzaju transkryptu do jednej sondy DNA, a nie z dwóch próbek transkryptu dodanych jednocześnie w czasie pomiaru (mikromacierze cDNA). Użycie chipów DNA do pomiarów jest bardziej powtarzalne i łatwiejsze do zastosowania w diagnostyce chorób i badaniach medycznych.

Na płytce mikromacierzy wysokiej rozdzielczości może znajdować się około 35–50 tys. różnych sekwencji ludzkich genów, podczas gdy całkowita liczba genów człowieka wynosi około 25 tys. Różnicę tę można wyjaśnić w ten sposób, że na płytce mamy do czynienia z obecnością więcej niż jednej sondy dla danego genu. Następną ważną sprawą, którą trzeba zaznaczyć jest fakt, że określenie „gen” dla sekwencji wykrywanych, na mikromacierzach nie jest całkowitą prawdą, gdyż za pomocą macierzy ekspresyjnych nie wykrywamy samych genów, tylko ich transkrypty.

W wielu przypadkach proste porównanie poziomu ekspresji genów między dwiema próbkami jest dopiero początkiem badań, które mają na celu poznanie zmian zachodzących podczas długotrwałych procesów związanych z rozwojem choroby. Aby tego dokonać należy zestawić wyniki otrzymane z wielu doświadczeń. Pomiar dokonany za pomocą mikromacierzy wykazuje obecność transkryptów genów w badanym materiale biologicznym, co daje informację o ekspresji odpowiednich genów. W czasie pomiaru można stwierdzić, czy ekspresja danego genu przebiegała lub czy doszło do jej zahamowania.

Przy użyciu macierzy DNA można jednocześnie prowadzić badania wielu tysięcy genów, otrzymuje

Schemat funkcjonowania mikromacierzy DNA

1. Z badanej próbki uzyskuje się mRNA (informacyjny RNA), z którego otrzymuje się cząsteczki cDNA lub cRNA wyznakowane fluorescencyjnie.
2. Po naniesieniu na macierz cząsteczki cDNA lub cRNA wiążą się do komplementarnych sond DNA.
3. Znaczniki fluorescencyjne przyłączone do cDNA/cRNA pozwalają na wykrycie, które sondy posiadają sekwencje komplementarne do badanych sekwencji cDNA/cRNA, a znając sekwencje sond DNA można łatwo określić sekwencje badanej próbki.
4. Obserwacji dokonujemy za pomocą odpowiedniego czytnika sprzężonego z komputerem

się zestaw wyników dla danego pacjenta, który nazywa się profilem genetycznym [19]. Profilem ekspresji genów można nazywać zarówno pełen zestaw pomiarów ekspresji, jak i pewną wyselekcjonowaną część charakterystyczną dla danej tkanki zmienionej chorobowo [17, 20–22].

Czujniki białkowe

Oprócz czujników DNA, które służą do wykrywania aktywności i poziomu ekspresji badanych genów do celów diagnostycznych i badawczych, wprowadzono nowy typ czujnika tzw. czujnik białkowy. Czujniki tego typu są przeznaczone do bezpośredniego pomiaru ilości danego białka w tkankach badanego organizmu. Za pomocą czujników tego rodzaju można stosunkowo szybko określić stężenie określonego białka w tkankach. W przyszłości macierze białkowe mogą być ważnym narzędziem badawczym, umożliwiającym szybkie diagnozowanie wielu chorób molekularnych. W odróżnieniu od czujników DNA, nie wymagają izolacji mRNA i otrzymywania stabilnej cząsteczki antysens DNA czy antysens RNA. Do procesu oznaczania można użyć materiału białkowego pochodzącego z osocza krwi. Większość chorób występujących u pacjentów pozostawia we krwi pewne ślady w postaci specyficznych białek, których obecność czujniki białkowe są w stanie zidentyfikować. Macierze białkowe podobnie jak macierze DNA zbudowane są cienkich płytek, na których są umieszczone miliony kopii setek różnych białek, przy czym każde z nich znajduje się w odrębnym miejscu na płytce. Obecnie trwają intensywne prace, zmierzające do wprowadzenia macierzy opartych na przeciwciałach, które wykazują specyficzną aktywność wobec konkretnego białka. Wprowadzenie macierzy białkowych opartych na przeciwciałach napotyka na wiele problemów. Nie ma obecnie selektywnych metod pozwalających na masową produkcję wielu różnych

Schemat funkcjonowania czujnika białkowego

1. W czujniku białkowym na jednej płytce znajdują się odpowiednio rozmieszczone różne przeciwciała. Przeciwciała tego samego rodzaju są zgrupowane razem, wiążąc odpowiednie białka.
2. Białka obecne w umieszczonej na czujniku badanej próbce np. we krwi, przyłączają się do charakterystycznych dla siebie przeciwciał.
3. Obecność znaczników fluorescencyjnych na przeciwciałach ułatwia określenie, jakie białka zawierała badana próbka.

przeciwiał. Inną, znacznie poważniejszą przeszkodą jest fakt, że do tej pory zidentyfikowano zaledwie kilkadziesiąt białek świadczących o rozwoju różnego rodzaju chorób, co prawdopodobnie stanowi niewielki ułamek wszystkich białek uczestniczących w patomechanizmach różnych stanów chorobowych. Wydaje się jednak, że problemy te zostaną pokonane i czujniki białkowe zrewolucjonizują medyczne badania podstawowe oraz diagnozowanie wielu chorób molekularnych [23, 24].

Zastosowanie technologii macierzy DNA

Zanim opracowano systemy mikromacierzy, do badania ekspresji genów wykorzystywano technologie odwrotnego PCR (RT-PCR). Za pomocą tej techniki można zmierzyć ekspresję nie więcej niż 8–10 genów w jednej próbce. W wyniku postępu techniki syntezy oligonukleotydów, klonowania genów i opracowania wydajnych systemów komputerowych wprowadzono techniki mikromacierzy, w których jest możliwa

jednoczesna analiza wielu tysięcy genów. W pracach badawczych dotyczących mikromacierzy DNA badania ekspresji wielu genów można podzielić na kilka kierunków. Wykorzystano mianowicie macierze DNA do badania wpływu endogennych i egzogennych czynników lub leków na ekspresję genów pacjentów, próbując określić mechanizm działania leków i ich skuteczność w terapii [25, 26]. Wykorzystano je również w badaniach, które miały na celu poszukiwanie powiązań pomiędzy genami ulegającymi ekspresji

w określonych warunkach, rozmieszczeniu sekwencji wiążących czynniki transkrypcyjne oraz badaniu promotorów i miejsc rozpoczęcia transkrypcji [27]. W kolejnych badaniach wykorzystano tę technikę do identyfikacji genów kodujących ekspresję białek cytoplazmatycznych, błonowych i jądrowych. Użyto ich również w badaniach ekspresji genów w komórkach nowotworowych badając różnice w ekspresji między tkanką zdrową, stanem przedrakowym oraz zmianą nowotworową, a także w badaniach dotyczących różnic w ekspresji genów w zależności od typu histologicznego nowotworu [28–31].

Nowe leki

Zastosowanie czujnika pomiarowego do wykrywania zmian ekspresji różnych genów w genomach komórek umożliwi uzyskiwanie niezwykle dokładnych informacji o wpływie leków na aktualny stan chorego organizmu. Znajomość ogólnego wzoru aktywności genów będzie niezwykle pomocna w procesie leczenia, gdyż profil genetyczny otrzymany z macierzy

obrazuje aktualny zapis molekularny stanu komórki lub tkanki w konkretnych przypadkach np. w czasie choroby czy po podaniu określonego leku. Podczas procesu leczenia zapis taki będzie ukazywał przebieg zaburzeń na poziomie komórkowym w czasie rozwijania się i leczenia choroby. Poszczególne warianty genów warunkują również reakcje organizmu na dane leki, które przyjmujemy, co wpływa na ich skuteczność oraz nasilenie ewentualnych działań niepożądanych.

Czujniki DNA ujawniające aktywność genów wobec stosowanych leków pozwolą lekarzom dobrać każdemu pacjentowi jak najlepsze grupy leków w stosunku do danej choroby. Przy zastosowaniu mikromacierzy DNA istnieje możliwość wykrycia obecności nieznanych do tej pory białek, które mogą powodować choroby molekularne, a które mogą stać się celem działania nowych skuteczniejszych leków. Przykładem mogą być prace prowadzone przez prof. P. Linsleya z Rosetta Inpharmatics [32], który chciał zidentyfikować nowe cele dla leków potrafiących skutecznie zwalczać choroby zapalne, w których układ immunologiczny niszczy komórki własnego organizmu. Celem tej pracy było określenie, jakie geny w białych krwinkach zmniejszają lub zwiększają produkcję kodowanych przez siebie białek równoległe z genem odpowiedzialnym za wytwarzanie białka, interleukiny-2 (IL-2), silnie związanej z rozwojem tego typu schorzeń. W tym celu wykonano profile ekspresji genów białych krwinek wystawionych na działanie różnych związków chemicznych. Następnie przy użyciu odpowiedniego programu komputerowego do wykrywania genów, które zawsze włączały się lub włączały podczas aktywacji genu kodującego IL-2, wykryto gen, który uczestniczy w szlaku IL-2 i którego produkt białkowy jest dobrym celem dla leków przeciwzapalnych.

Badania ekspresji genów za pomocą chipów DNA mogą posłużyć do wykrycia i wykluczenia potencjalnych leków, które mogłyby powodować poważne działania niepożądane. Przykładem mogą być badania prowadzone nad substancjami działającymi szkodliwie na mięsień sercowy. W pierwszym etapie badań sporządzono profil ekspresji dla komórek tego narządu, poddanych nie tylko działaniu określonego związku, ale także już istniejących leków kardiologicznych i innych związków chemicznych o znanej kardiotoxyczności [32]. Porównanie uzyskanych wzorów ekspresji pozwoliło stwierdzić, czy badaną substancję można wykorzystać do stworzenia nowego, bezpiecznego leku.

Diagnostyka chorób

Mikromacierze DNA można wykorzystać do wykrywania dziedzicznych skłonności poszczególnych osób do zapadania na różne choroby. Istniejące

Równoległe do technologii chipów DNA, rozwinęła się druga technika, w której wykorzystuje się biblioteki klonów DNA, które są automatycznie nanoszone na szkiełko macierzy. Macierze tego typu są nazywane, mikromacierzami cDNA

różnice genetyczne między ludźmi są często wynikiem polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphism* – SNP), powstających na skutek mutacji. Można zbudować czujniki DNA wyposażone w warianty sond genowych związanych z różnymi chorobami, aby wykryć SNP danej osoby o podatności na chorobę Alzheimera, cukrzycę czy konkretne typy nowotworów. Za pomocą odpowiednio zaprojektowanych czujników DNA istnieje możliwość znalezienia przyczyny choroby zakaźnej u pacjenta z objawami podobnymi do objawów grypy (jak bóle, podwyższona temperatura, trudności w oddychaniu), które są zbyt mało specyficzne, by zidentyfikować wywołujący je patogen. W tym celu jako sondy DNA należałoby umieścić fragmenty DNA reprezentujące geny, które występują tylko u wybranych czynników chorobotwórczych (bakterii, wirusów), a następnie nanieść odpowiednio oznakowane cDNA uzyskane z próbki pacjenta (np. wydzielina błony śluzowej).

Mikromacierze DNA w mukowiscydozie

Mikromacierze DNA znalazły zastosowanie w badaniach molekularnych związanych z poszukiwaniem związków między określoną mutacją wywołującą chorobę molekularną a fenotypem. Za pomocą tego typu techniki można się również pokusić o zbadanie skutków terapii genowej na poziomie mRNA. Dokonano tego na przykładzie mukowiscydozy, która była jedną z pierwszych chorób genetycznych, w której zastosowano terapię genową.

Mukowiscydoza powstaje jako skutek mutacji w pozycji 508 genu CFTR (CFTR – *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* – regulator przewodnictwa błonowego, odpowiada za istnienie zależnej od cAMP regulacji kanału chlorkowego). Mutacja tego typu zaburza transport białka CFTR z siateczki cytoplazmatycznej do błony komórkowej. Uniemożliwia to prawidłową regulację elektrolitową zależną od cAMP przy użyciu kanału chlorkowego [33]. Za pomocą macierzy zbadano różnicę ekspresji genów w komórkach transfekowanych plazmidem zawierającym gen CFTR i plazmidem zawierającym zmutowaną w pozycji 508 wersję genu CFTR. Badania wykazały, że mutacja tego genu powoduje istotne zmiany w ekspresji około 26 genów, które kodowały głównie białka wiążące DNA takie jak: NF-E1 (NF-E1 – czynnik transkrypcyjny), DB1 (DB1 – *DNA binding protein 1* – białko wiążące DNA) i czynnik transkrypcyjny Arđ1 (Arđ1 – czynnik transkrypcyjny). W kolejnych badaniach inkubowano obie linie komórkowe w obecności CPX (8-cyklopentyl-1,3-dipropyl-ksantyny, antagonisty receptora adenozynowego A1), który jest potencjalnym lekiem w leczeniu mukowiscydozy, obecnie w fazie badań klinicznych. Mechanizm działania CPX polega na przyłączeniu się do zmutowanego białka 508-CFTR, które na skutek mutacji

ma zaburzoną strukturę trzeciorzędową. Przyłączenie CPX powoduje przywrócenie jego prawidłowej struktury przestrzennej i umożliwia prawidłowy transport z siateczki endoplazmatycznej do błony komórkowej [34]. Badania wykazały, że w czasie inkubacji CPX z komórkami transfekowanymi plazmidem zawierającym zmutowany w pozycji 508 gen CFTR następował znaczący wzrost ekspresji około 69 genów. Większość tych genów była już dotychczas kojarzona z mukowiscydozą, a kilka z nich takich jak gen MUC18 (MUC 18 – mucyna 18 – jedno z wielu białek wydzielanych przez gruczoły śluzowe oskrzeli), interleukina 10 (IL10), kinaza białkowa A (PKA) pełnią prawdopodobnie istotną rolę w przebiegu tej choroby [34, 35].

Badania procesu zapalnego w komórkach nabłonka

Mikromacierze DNA użyto również do badania profilu ekspresji genów po zastosowaniu glikokortykosteroidów. Związki te należą do podstawowych leków przeciwzapalnych stosowanych w chorobach alergicznych. Badania wykazały, że już stosunkowo niskie stężenie tych związków – $10^{-9}M$ powoduje istotne zmiany w ekspresji genów w komórkach nabłonka oskrzeli. Glikokortykosteroidy indukują istotnie wczesny wzrost ekspresji receptora β_2 -adrenergicznego, interleukiny IL-10 oraz późny wzrost ekspresji aneksyny II i inhibitora proteaz 1. Związki tego typu powodują również hamowanie ekspresji grupy genów takich jak: IL-12b i IL-18. Wyniki te obrazują, że już niskie stężenie glikokortykosteroidów wykazuje istotne zmiany o charakterze przeciwzapalnym w komórkach nabłonka oskrzeli [10].

Opisane przykłady skutecznego wykorzystania mikromacierzy DNA nie ograniczają się tylko do tych dwóch schorzeń. Podobne strategie postępowania stosuje się np. w alergiach – odpowiednio skonstruowane mikromacierze DNA mogą być pomocne przy jednoczesnej analizie alergenów. Trwają również badania nad opracowaniem profili ekspresji genów, które będą służyły dla pacjentów wymagających indywidualnych metod leczenia np. w przypadku cukrzycy czy w reumatoidalnym zapaleniu stawów.

Mikromacierze DNA w diagnostyce i terapii nowotworów

Duże nadzieje wiąże się z praktycznym wykorzystaniem mikromacierzy DNA w diagnostyce i terapii chorób nowotworowych. Wydaje się, że wykorzystanie tych narzędzi umożliwi szybszą i precyzyjną

Działanie mikromacierzy DNA opiera się na tradycyjnych technikach hybrydacyjnych używanych do analizy ekspresji genów w komórce. Wyznakowana próba pochodząca z badanego materiału biologicznego po odpowiedniej obróbce jest wprowadzana na płytkę zawierającą sondy DNA o znanej sekwencji nukleotydowej. W ten sposób podczas jednego eksperymentu można zanalizować ekspresję tysięcy genów, o ile na płytce znajdują się odpowiednie ilości reprezentujących je sond.

Głównym zastosowaniem czujników DNA są badania profilu ekspresji genów. Na podstawie zawartości rozmaitych cząsteczek mRNA w próbce, pochodzącej z tkanki danego pacjenta, można ocenić typy i ilość znajdujących się w niej białek. Wyniki tych badań mają istotne znaczenie diagnostyczne i poznawcze ze względu na fakt, że białka są odpowiedzialne za większość procesów chorobotwórczych przebiegających w komórkach i tkankach ludzkiego organizmu.

diagnostykę wielu nowotworów [36]. Zastosowanie analizy profilu ekspresji genów w chorobach nowotworowych pozwoli na znalezienie związków między rodzajem nowotworu a jego wrażliwością na dany rodzaj terapii, a nawet jego wrażliwość na konkretny środek leczniczy oraz umożliwi właściwy dobór optymalnej terapii dostosowanej do potrzeb każdego pacjenta. W czasie badań klinicznych udało się również udowodnić użyteczność mikromacierzy DNA w przewidywaniu skutków choroby nowotworowej u pacjentów poddanych określonej terapii. Większość nowotworów rozwija się na skutek nieprawidłowego działania wielu genów.

Odkrycie, które geny są uwikłane w proces nowotworzenia jest kluczem do właściwej terapii. Zastosowanie mikromacierzy DNA pozwoli na prawidłową identyfikację czynników powodujących powstawanie i rozwój nowotworów, a postawienie odpowiednio wczesnej i prawidłowej diagnozy umożliwi skuteczną i właściwą terapię. Wiele chorób nowotworowych wiąże się z czynnikami środowiskowymi, za pomocą mikromacierzy DNA można te czynniki zidentyfikować. Do takich badań konstruuje się macierze złożone z genów odpowiedzialnych za naprawę DNA, metabolizm obcych dla organizmu substancji, cyklu komórkowego, stresu oksydacyjnego. Dzięki analizie ekspresji tych genów można uzyskać pełen obraz działania testowanego czynnika, który podejrzany jest o działanie kancerogenne [37].

Nowotwory piersi

Pierwsze pozytywne wyniki w opracowaniu skutecznej diagnostyki przeprowadzono u pacjentów z nowotworami piersi. Kliniczny obraz tej choroby po usunięciu nowotworu jest diametralnie różny u różnych pacjentów. Istnieje mianowicie możliwość szybkiego nawrotu choroby lub całkowitego wyleczenia. W zależności od charakteru zmian, pacjentom po operacji proponuje się odmienny sposób terapii. Do tej pory prognozy pooperacyjne obciążone były dużym ryzykiem błędów [38–41].

Zastosowanie czujników DNA w diagnostyce chorób nowotworowych pozwoli na określanie, czy guzy oceniane standardowymi metodami jako łagodne, nie są bardziej złośliwe niż się wydają. Badania tego typu nad rakiem piersi przeprowadzono w Holenderskim Instytucie Rakowym w Amsterdamie. Za pomocą mikromacierzy DNA wykazano, które kobiety z rakiem piersi we wczesnym stadium powinny być poddane po zabiegu chirurgicznym chemioterapii

zapobiegającej przerzutom do węzłów chłonnych, gdyż standardowe techniki badawcze nie pozwalają na wyróżnienie wśród chorych grupy największego ryzyka. W tym celu wykonano profil ekspresji nowotworów blisko 100 kobiet w wieku poniżej 55 roku życia, których stan zdrowia był kontrolowany po zabiegu chirurgicznym. Po przeprowadzeniu badań 25 tys. ludzkich genów, okazało się, że istnieje pewien charakterystyczny wzór związany z około 70 genami jednoznacznie wskazującymi na szybkie pojawienie się przerzutów. Okazało się, że odwrotny wzór jest wskaźnikiem dobrego rokowania. Istnieją nadzieje, że w najbliższych latach badania tego typu zostaną wykorzystane do diagnostyki i terapii nie tylko tego, ale także pozostałych typów nowotworów. Wprowadzenie oznaczenia ekspresji genów metodą mikromacierzy umożliwi właściwe prognozowanie i opracowanie odpowiedniego modelu terapii dla poszczególnych pacjentów.

Przedstawione wyżej dane wskazują, że badania profilu ekspresji genów z użyciem mikromacierzy DNA stanowią interesującą drogę analizy mechanizmów transformacji i progresji nowotworów [42–44].

Białaczka

Poznanie wzorca ekspresji wielu genów przy pomocy chipów DNA może służyć jako użyteczne narzędzie ułatwiające klasyfikację histologiczną nierozróżnialnych nowotworów. Przykładem może być ostra białaczka szpikowa (AML), która jest podobna objawowo i histologicznie do ostrej białaczki limfocytnej (ALL). Właściwa diagnoza w tych przypadkach jest niezbędna, gdyż obie jednostki chorobowe wymagają zupełnie innego leczenia. Przy wykorzystaniu techniki mikromacierzy DNA udało się odkryć odrębne markery genetyczne obu nowotworów. W tym celu do macierzy zawierającej około 7000 genów hybrydowano próbki pochodzące z krwi chorych cierpiących na oba typy białaczek. W wyniku tego odkryto 50 genów ulegających różnej ekspresji w różnych typach białaczek. Przy użyciu tej techniki można zatem prawidłowo diagnozować rodzaj nowotworu i dobrać indywidualną i optymalną terapię dla danego pacjenta [45].

Profil ekspresji raka brodawkowego tarczycy

Nowotwór tego typu został pierwszy raz przebadany techniką mikromacierzy w 2001 r. W wyniku analizy wytypowano około 50 genów ulegających nadekspresji lub wyciszeniu w komórkach raka trzustki. W badaniach na mikromacierzach potwierdzono, że jednym z genów, który ulega nadekspresji w komórkach raka trzustki jest gen MET. Gen ten jest proto-onkogenem dla receptora HGF (wątrobowego czynnika wzrostu), który jest wydzielany przez fibroblasty. Nadekspresja tego genu jest charakterystyczną cechą odróżniającą ten typ guza nowotworowego

od zdrowej tkanki. Inne geny, których nadekspresję udowodniono przy zastosowaniu mikromacierzy, to gen galektyny 3, fibronektyny (FN), czy gen inhibitora tkankowego metalloproteinaz typu 1 (TIMP-1). Powyższe geny jako markery genetyczne służą do klasycznej diagnostyki raka trzustki. Jednak w wielu przypadkach badanie pojedynczego genu (markera) dawało fałszywe rezultaty. Z tego względu wykorzystanie mikromacierzy dających profil ekspresji genów guza daje przewagę nad pojedynczymi badaniami. Dodatkowo w wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, że rak brodawkowy tarczycy charakteryzuje się bardzo wysoką ekspresją wielu innych genów, które nie były dotychczas zaliczane do klasycznych markerów transformacji nowotworowej, a które uczestniczą w procesach adhezji komórkowej decydując o inwazyjności i skłonności do przerzutów [46, 47].

Analiza wpływu cytostatyków na linie komórkowe wywodzące się z nowotworów

Mikromacierzy DNA użyto do analizy wpływu cytostatyków na wzrost linii komórkowych wywodzących się z nowotworów. W czasie badań użyto grupy danych uzyskanych z 60 linii nowotworowych, takich jak komórki rakowe nerek, jajników, prostaty, płuc, jak i linii białaczkowych, chłoniaków czy czerniaków. Podczas badania wykonano analizę ekspresji genów dla ponad 7000 tys. związków chemicznych o udowodnionym lub potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. W czasie badań stwierdzono istnienie ujemnej korelacji między ekspresją genu DPYD (gen kodujący dehydrogenazę dehydropyrimidyny) a skutecznością 5-fluorouracylu (5-FU) w leczeniu nowotworów, których komórki wykazują ekspresję genu DPYD. 5-FU okazał się również lekiem skutecznym w terapii nowotworów, których komórki wykazywały niską ekspresję genu DPYD. Wysoka ekspresja genu DPYD umożliwia obniżenie ekspozycji na aktywną, ufosforylowaną formę 5-FU w czasie terapii. Wyniki te wskazują na nowe zastosowanie 5-FU w leczeniu nowotworów innych, niż rak okrężnicy czy niektóre postacie raka sutka, w których to chorobach związek ten jest obecnie stosowany [48]. Wykazano również wysoką skuteczność L-asparaginazy w stosunku do linii nowotworowych pochodzących z komórek ostrej białaczki limfatycznej oraz udowodniono również wysoką skuteczność tego leku wobec linii komórkowej pochodzącej z raka jajnika [48].

Testowanie związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym

Mikromacierze DNA są wykorzystywane przez firmy farmaceutyczne w testowaniu różnych związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym [10, 49]. Techniki te okazały się bardzo pomocne w badaniu nowotworu zwanego międzybłoniakiem płucnej, który należy do typu nowotworów o dużej oporności na

chemioterapię. Dzięki mikromacierzom próbowano określić molekularne mechanizmy tej oporności. Rihn i wsp. [50] wyodrębnili grupę genów oporności na ksenobiotyki. Wśród tych genów znalazły się 4 geny kodujące S-transferazę glutationu, 9 genów kodujących grupę cytochromu P450 oraz geny o aktywności detoksykacyjnej takie jak gen hydrolazy epoksydowej 2 i DPYD, których produkty ekspresji biorą udział w detoksykacji 5-FU. Badacze stwierdzili również zwiększoną ekspresję genów istotnych w odpowiedzi na wolne rodniki m.in. dysmutaza ponadtlenkowa Cu/Zn. W badaniach wyróżniono około 300 genów, których ekspresja była różna w komórkach tkanki zdrowej i międzybłoniaku płucnej. Wśród tych genów znalazły się te, których produkty ekspresji były odpowiedzialne za metabolizm wewnątrzkomórkowy i stabilizację DNA i mRNA. Komórki nowotworowe wykazywały zwiększoną ekspresję syntetaz aminoacylo-tRNA oraz innych białek odpowiedzialnych za transport jądrowy oraz zwiększoną ekspresję genów odpowiedzialnych za stabilizację mRNA. Wśród genów wpływających na stabilizację mRNA, wykazano zwiększoną ekspresję inhibitora rybonukleaz L oraz zmniejszoną ekspresję genów kodujących enzymy odpowiedzialne za degradację kwasów nukleinowych. Obserwowano również zwiększoną ekspresję genów kodujących enzymy metabolizujące lipidy oraz geny, których ekspresja odpowiada za procesy adhezji i komunikacji wewnątrzkomórkowej oraz geny mające bezpośredni wpływ na rozmnażanie i wzrost komórek takie jak: proto-onkogeny Ki-ras, c-myc oraz białka wiążące c-myc. Wszystkie te obserwacje w różnicach ekspresji wyjaśniają, które geny są aktywne w komórkach nowotworowych i które z nich można uważać za cel działania nowych leków przeciwnowotworowych [50–52].

Podsumowanie

Mikromacierze DNA w ciągu kilku lat stały się jedną z najczęściej używanych technik w badaniu ekspresji nie tylko pojedynczych genów, ale i całego genomu komórki. Kolejne prace powstające w tej dziedzinie przynoszą coraz więcej danych służących do pełnego zrozumienia szlaków metabolicznych, procesów nowotworzenia, odpowiedzi immunologicznej czy kontroli procesu zapalnego. Pojawiają się prace dotyczące macierzy, które badają strukturę genomu, jego polimorfizm oraz pierwsze mikromacierze badające ekspresję białek [10, 53]. Wprowadzanie nowych leków o znikomym działaniu toksycznym może być

Mikromacierze DNA znalazły zastosowanie w badaniach molekularnych związanych z poszukiwaniem związków między określoną mutacją wywołującą chorobę molekularną a fenotypem.

Duże nadzieje wiąże się z praktycznym wykorzystaniem mikromacierzy DNA w diagnostyce i terapii chorób nowotworowych. Wydaje się, że wykorzystanie tych narzędzi umożliwi szybszą i precyzyjną diagnostykę wielu nowotworów.

cennym wykorzystaniem wyników badań otrzymanych z użyciem mikromacierzy DNA. Określanie profili genetycznych chorób molekularnych pozwoli dokładnie diagnozować i wyodrębnić zbliżone jednostki chorobowe, różniące się ekspresją tylko jednego określonego białka. Ponadto lepsze metody diagnostyczne oparte na chipach DNA pomogą szybciej diagnozować choroby nowotworowe i monitorować ich terapię. Zanim jednak mikromacierze będą należały do powszechnie używanych narzędzi diagnostycznych, trzeba jeszcze rozwiązać kilka problemów, do których należy zbyt wysoki koszt ich stosowania. Ponadto techniki te, przynajmniej na początku mogą okazać się zbyt trudne do zastosowania w przeciętnych gabinetach lekarskich i laboratoriach analitycznych. Tylko nieliczni lekarze dysponują odpowiednim wyposażeniem i umiejętnościami, aby prawidłowo przygotować próbki tkanek do badania za pomocą mikromacierzy. Technika ta wymaga, odpowiedniej standaryzacji. Problemy te można pokonać, gdyż stawianie trafniejszej diagnozy, proponowanie skuteczniejszej metody leczenia z dopasowaniem do tła genetycznego oraz stanu fizjologicznego pacjenta jest skutecznym bodźcem do wprowadzenia tej metody do powszechnego użytku.

Przyjęto: 2008.11.04 · Zaakceptowano: 2009.01.25

Piśmiennictwo

- Hunt S.P., Livesey F.J.: *Functional Genomics*. Oxford University Press, 2000, 110-116.
- Lockhart D., Winzler E.: *Nature*, 2000, 405, 15, 827-836.
- Augenlicht L.H., Wahrman M.Z.: *Cancer Res.* 1987, 47, 6017-6021.
- Augenlicht L.H., Taylor J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991, 66, 3286-3289.
- Brown P.O., Botstein D.: *Nat. Genet.* 1999, Suppl. 21, 33-37.
- Golub T.R., Slonim D.K.: *Science*, 1999, 286, 531-537.
- Tillib S.V., Mirzabekov A.D.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 2004, 12, 41-47.
- Warrington J.A., Dee S.: *BioTechniques Books*, Oxford University Press 2000, 119-148.
- Jarząb B., Gubała E.: *Endokrynologia Polska*, 2005, 3 (56), 294-301.
- Pawliczak R., Kowalski M.: *Alergia Astma Immunologia* 2001, 6 (2) 77-83.
- Perou C.M., Sorlie T.: *Nature*, 2000, 406, 747-752.
- Harrington C. A., Rosenow C.: *Curr. Opin. Microbiol.* 2000, 3, 285-291.
- Kononen J., Bubendorf L.: *Nat. Med* 1999, 4, 844-847
- Kisiel A., Skąpska A.: *Kosmos*, 2004, 53, 3, 295-303.
- Turner P.C.: *Biologia Molekularna Warszawa PWN*, 1999.
- Pusztai L., Ayers M.: *Clin Cancer Res.* 2003, Jul 9, 2406-15.
- Jankowski M., Zegarski W.: *Cancer Surgery* 2005, 1 (1), 37-41.
- Charlie C., Xiang Y.: *Biotechnology Advances* 2000, 18, 35-46. 2000.
- Greenfield A.: *Mammalian Genome*, 2000, 11, 609-613.
- Maciejewski H., Konarski Ł., Drath M.: *Bio-algorithms and med-systems Journal*, 2005, 1 (2), 129-132.
- Quackenbush J.: *Nature Reviews – Genetics*, 2001.
- Shannon W., Culverhouse R., Duncan J.: *Pharmacogenomics*, Oxford University Press 2003.
- Khan J.: *Nature Genetics*, 1999, 21, 1-60.
- Winzler E.: *Nature* 2001, 485, 927-936.
- Amundson S.A., Shahab S.: *Radiat. Res.* 2005, 154, 342-346.
- Holden P.R., James N.H.: *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2003, 14, 283-290.
- Heerdt B.C., Stewart L.R.: *Cancer Res.* 1994, 54, 3912-3915
- Diehn M., Eisen M.B.: *Nat. Genet.* 2003, 25, 58-62.
- Khan J., Simon R.: *Cancer Res.* 1998, 58, 5009-5013.
- Howell S.B.: *Mol. Urol.* 1999, 3, 295-300.
- Khan J., Saal L.H.: *Electrophoresis* 1999, 20, 223-229.
- Shoemaker D.: *Nature*, 2002, 409, 922-927.
- Srivastava M., Eidelman O.: *Mol. Med.* 2003, 5, 754-767.
- Pollard H.B.: *Pediatr. Pulmonal* 1997, 14, 128-131.
- Heller R.A., Schena M.: *Proc. Natl. Acad. Sci* 1997, USA, 94, 2150-2155.
- Aitman T.J.: *BMJ*. 2001, 323, 611-615.
- Vrana K.E., Freeman W.: *Neuro Toxicol.* 2003, 24, 321-332.
- Nagahata T., Onda M.: *Cancer Sci.* 2004, 95, 418-427.
- Van der Vijer M.J., He Y.D.: *Engl. J. Med.* 2002, 25, 1999-2009.
- Carey L.A., Perou C.M.: *J. Clin. Onc.* 2005, 22, 9510.
- Sorlie T., Perou C.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 98, 10869-74.
- Brooks J.D.: *Current Opinion in Urology*, 2002, 12, 395-399.
- Lin Y.M., Furukawa Y.: *Oncogene*, 2002, 21, 4120-4128.
- Vant L.J., Dai H.: *Nature*, 2002, 415, 530-536.
- MacGregor P.F., Squire J.A.: *Clin. Chem.* 2004, 48, 1170-1177.
- MacGregor P.F., Squire J.A.: *Clin. Chem.* 2004, 48, 1170-1177.
- Finley D.J., Arora N.: *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2004, 89 (7), 3214-3223
- Finley D.J., Zhu B.: *Ann. Surg.* 2004, 240 (3), 425-436
- Scherf U., Ross D.T.: *Nat Genet*, 2000, 24, 236-244.
- Deboucq C., Goodfellow P.: *Nat. Genet.* 1999, 21, 48-50.
- Rihn B.H., Mohr S.: *FEBS Lett.* 2004, 480, 95-100.
- Cole K.A., Krizman D.B.: *Nat Genet.* 1999, 21, 38-41.
- Kennedy G.C.: 2003, 89, 1-10.
- Lueking A., Horn M.: *Anal Biochem.* 1999, 270, 103-111.