



# Zastosowanie mikromacierzy DNA w genomice strukturalnej i funkcjonalnej

Agnieszka Żmieńko<sup>1</sup>, Luiza Handschuh<sup>1,2</sup>, Michał Góralski<sup>1</sup>, Marek Figlerowicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centrum Doskonałości CENAT, Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

<sup>2</sup> Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Krwi, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań

## DNA microarrays in structural and functional genomics

### Summary

DNA microarrays or DNA chips were introduced in the middle nineties and have developed as a very powerful tool for structural and functional analysis of genomes. With thousands to millions of probes deposited on each microarray, it is now possible to perform various kinds of analysis on the genome-wide scale. The basic use of microarrays is gene expression profiling. For this purpose, both one- and two-color labeling methods are used. More sophisticated DNA microarrays allow for analyzing alternative splicing, DNA-protein interactions, chromatine modifications and many more. Currently, DNA microarrays represent an indispensable tool in biology and medicine.

### Key words:

gene expression profiling, microarrays, DNA chips, array CGH, ChIP on chip, alternative splicing.

### Adres do korespondencji

Agnieszka Żmieńko,  
Instytut Chemii  
Bioorganicznej,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Noskowskiego 12/14,  
61-704 Poznań;  
e-mail:  
akisiel@ibch.poznan.pl

## 1. Wprowadzenie

Pierwsze mikromacierze DNA (tzw. chipy DNA) wyprodukowano na początku lat 90. ubiegłego wieku jako potencjalne narzędzie do sekwencjonowania DNA, detekcji mutacji i mapowania genomów (1,2). Składały się one z wielu bardzo krótkich (8-9 nt)

oligomerów syntetyzowanych *in situ* na plastikowej płytce. Ponieważ zarówno sekwencja poszczególnych oligomerów jak również ich lokalizacja na płytce była znana, mogły one pełnić rolę sond w reakcji hybrydyzacji z mieszaniną DNA (próbki biologiczną) o nieznannej strukturze pierwszorzędowej. Detekcję produktów hybrydyzacji umożliwiło fluorescencyjne znakowanie próbki i skanowanie płytki za pomocą czytnika laserowego.

Mikromacierze DNA zyskały ogromną popularność, gdy okazało się, że można je stosować także do badania profilu ekspresji genów (3-7). Fakt ten znajduje swoje odzwierciedlenie w rosnącej liczbie publikacji deponowanych rokrocznie w bazach danych. Przeszukiwanie bazy czasopism PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) wyrażeniem *microarray gene expression* daje aktualnie blisko 20 tys. trafień, podczas gdy samo słowo *microarray* pojawia się w tytule bądź streszczeniu ponad 26 tys. publikacji.

W ostatnich latach zaobserwować można szczególnie dynamiczny rozwój różnego typu technologii działających na bazie mikromacierzy DNA. Wynika on nie tylko z miniaturyzacji i automatyzacji procesu produkcji mikromacierzy, ale przede wszystkim z poszerzania zakresu ich stosowania. Rozległość tego zagadnienia sprawia, że nawet pobieżne omówienie wszystkich sposobów wykorzystania mikromacierzy DNA w jednej pracy przeglądowej jest niezwykle trudne. Celem artykułu jest zatem jedynie zapoznanie Czytelników z podstawowymi wariantami mikromacierzy DNA, które – zdaniem autorów – odgrywają szczególne znaczenie w rozwoju biologii i medycyny.

## 2. Analiza ekspresji genów kodujących białka

Do badania profilu ekspresji genów zasadniczo stosuje się trzy typy mikromacierzy, różniące się rodzajem sond, a w konsekwencji procedurą znakowania i hybrydyzacji próby oraz sposobem analizy wyników (tab.). Jako sondy stosowane są: krótkie oligonukleotydy (18-25 nt), długie oligonukleotydy (50-70 nt) lub dwuniciowe cDNA, o długości od kilkuset do kilku tysięcy par zasad (8-20).

Sondy cDNA to najczęściej produkty reakcji PCR, podczas gdy długie oligonukleotydy uzyskuje się na drodze syntezy chemicznej. Oba rodzaje sond nanosi się za pomocą drukarki do mikromacierzy na płytkę szklaną lub plastikową (zazwyczaj jest to standardowe szkiełko mikroskopowe pokryte reaktywną powłoką chemiczną, zapewniającą efektywne wiązanie DNA) (11,17,18,21,22). Na pojedynczej drukowanej mikromacierzy analizuje się jednocześnie dwie próbki – badaną i kontrolną, wyznakowane dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi (znakowanie dwukolorowe) (8). Na mikromacierzach tego typu jednemu genowi odpowiada zazwyczaj jedna sonda. W odróżnieniu od nich mikromacierze złożone z krótkich oligonukleotydów zawierają zestawy kilku/kilkunastu sond reprezentujących dany gen, a każdą z próbek znakuje się identycznym barwnikiem i hybryduje z inną macierzą

Tabela

## Porównanie mikromacierzy DNA

	Mikromacierze oligonukleotydowe (chipy) o krótkich sondach (18-25 nt)	Mikromacierze oligonukleotydowe o długich sondach (50-70 nt)	Mikromacierze cDNA (sondy o długości kilkuset – kilku tys. pz)
	1	2	3
Zalety	<ul style="list-style-type: none"> <li>– najwyższa specyficzność (wykrywanie pojedynczych niesparowań)</li> <li>– synteza sond <i>in situ</i> (ominięcie etapów oczyszczania i nanoszenia sond na podłoże)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– wysoka specyficzność</li> <li>– prosta synteza (chemiczna) sond i ich oczyszczanie</li> <li>– możliwa równoległa analiza dwóch próbek (badanej i kontrolnej) na jednej macierzy</li> <li>– prosta procedura znakowania i odmywania</li> <li>– duża elastyczność – możliwość własnoręcznego zaprojektowania i przygotowania mikromacierzy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– niekonieczna znajomość sekwencji całego genomu</li> <li>– niski koszt eksperymentu</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>– duża powtarzalność</li> <li>– jednocieniowe sondy (zbędna denaturacja, ograniczenie tworzenia struktur drugorzędowych)</li> <li>– dostępność wielu komercyjnych mikromacierzy, zwłaszcza dla znanych genomów (organizmów modelowych)</li> </ul>		
Wady	<ul style="list-style-type: none"> <li>– bardzo wysoki koszt</li> <li>– bardziej złożona procedura odmywania po hybrydyzacji</li> <li>– brak możliwości bezpośredniego porównania dwóch prób (na jednej mikromacierzy)</li> <li>– skomplikowana analiza wyników (sondy PM/MM, więcej danych)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– wysoki koszt</li> <li>– trudności w znalezieniu unikatowych sekwencji w genomie</li> <li>– duży wpływ składu nukleotydowego sond na proces hybrydyzacji</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– prawdopodobieństwo wystąpienia hybrydyzacji krzyżowej</li> <li>– niezbędna matryca biologiczna do syntezy sond</li> <li>– czasochłonne przygotowanie sond</li> <li>– więcej możliwości wprowadzenia błędów (PCR)</li> <li>– problemy z powtarzalnością</li> <li>– dwuniciowe sondy (konieczność denaturacji, kompetycja wiązania)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>– konieczna znajomość sekwencji docelowych</li> <li>– skomplikowany proces projektowania sond</li> </ul>		
Schemat detekcji	jednokolorowy: jedna próba na mikromacierzy (np. biotynylowany cRNA, znakowany po hybrydyzacji streptawidyną sprzężoną z fluoroforem)	dwukolorowy: cDNA z prób badanej i kontrolnej na jednej macierzy, ale wyznakowane innymi fluoroforami (np. Cy3 i Cy5) znakowanie próby odbywa się przed hybrydyzacją, metodą bezpośrednią (w trakcie procesu odwrotnej transkrypcji) lub pośrednią (najczęściej poprzez aminoalilonukleotydy)	
Zastosowanie	<ul style="list-style-type: none"> <li>– detekcja SNP i mutacji</li> <li>– (re)sekwencjonowanie</li> <li>– rozróżnienie pomiędzy genami homologicznymi</li> <li>– znajdowanie nowych genów</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>– wyszukiwanie większych aberracji genomowych (macierze CGH)</li> <li>– badania ekspresji genów organizmów o nieznannej sekwencji</li> <li>– hybrydyzacja międzogatunkowa (CSH)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>– analizy z zastosowaniem mikromacierzy dachówkowych (identyfikacja wariantów splicingowych, ChIP-chip, macierze CGH)</li> <li>– identyfikacja małych regulatorowych RNA</li> </ul>		

	1	2	3
Zastosowanie	– profilowanie ekspresji genów – identyfikacja mikroorganizmów patogennych – diagnostyka molekularna (patrz Handschuh i wsp., w tym zeszycie „Biotechnologii”) – farmakologia i farmakogenomika (odkrywanie i testowanie leków, monitorowanie terapii)		

(znakowanie jednokolorowe) (8). Typowym przykładem takich mikromacierzy są chipy DNA firmy Affymetrix (ang. *GeneChips*) (<http://www.affymetrix.com>) (7,11). Wykorzystywana do produkcji chipów DNA technologia syntezy oligonukleotydów *in situ* z zastosowaniem fotolitografii pozwala na gęstsze upakowanie sond niż w przypadku mikromacierzy drukowanych. Pierwsza mikromacierz wysokiej gęstości składała się z 65 tysięcy sond o długości 20 nt (300 sond na gen), umieszczonych na powierzchni zaledwie 1,6 cm<sup>2</sup> (3). Obecnie Affymetrix produkuje chipy, w których na powierzchni 1 cm<sup>2</sup> mieści się ponad sześć milionów sond (23).

Alternatywą dla mikromacierzy „statycznych”, zawierających sondy immobilizowane na szkiełku, są tzw. mikromacierze przepływowe, inaczej dynamiczne (ang. *bead arrays, microfluidic system, flow-through technology*), w przypadku których poszczególne sondy DNA zakotwiczone są na pływających swobodnie w roztworze ziarnach (najczęściej kuleczkach silikonowych lub polistyrenowych) o średnicy kilku μm (24-30). W klasycznym podejściu, prezentowanym przez firmę Luminex, w celu odróżnienia od siebie poszczególnych ziaren – nośników specyficznych sekwencji oligonukleotydowych, każde z nich wysyca się unikatową mieszaniną dwóch barwników fluorescencyjnych (np. czerwonego i pomarańczowego zestawionych w odpowiedniej proporcji). Trzeci barwnik (np. zielony), tzw. reporter, służy do znakowania badanej próbki biologicznej. Identyfikacja ziaren odbywa się w cytometrze przepływowym w oparciu na pomiarze emisji barwników klasyfikacyjnych. Równocześnie przyjmuje się, że intensywność sygnału pochodzącego od barwnika reporterowego jest proporcjonalna do ilości sekwencji docelowej związanej z sondą (<http://www.luminexcorp.com/technology/index.html>) (24,28). W rozwiązaniach proponowanych przez inne firmy, opłaszczone sondami ziarna umieszcza się w trójwymiarowych mikrokanalach czy mikrokomorach (firmy Metragenix, Febit, dawniej także Xeotron) (31) lub w tzw. wirtualnych naczyniach (ang. *virtual flasks*) – zdefiniowanej przestrzeni wokół mikroelektrod (firma CombiMatrix) (23). Do identyfikacji ziaren stosuje się również separatory magnetyczne i elektromagnetyczne (31).

Na wypukłej powierzchni ziarna można zmieścić znacznie więcej cząsteczek kwasu nukleinowego niż na płaskim szkiełku, co zwiększa efektywność hybrydyzacji. Do zalet technologii mikroprzepływowych zalicza się również minimalizację ryzyka wystąpienia hybrydyzacji krzyżowej, znacznie krótszy czas trwania i niższy koszt samego eksperymentu (ziarna są wielokrotnego użytku) (24,26). Wadą jest możliwość pojawienia się w roztworze niepożądanych interakcji pomiędzy różnymi

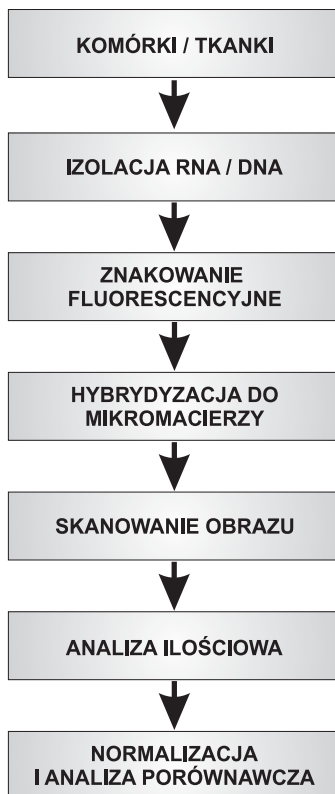
sondami. Ponadto maksymalna liczba ziaren, które można rozróżnić w cytometrze przepływowym jest ograniczona do kilkuset (ok. 500), co sprawia, że trudno jest im konkurować z klasycznymi mikromacierzami na szkiełku (<http://arrayit.blogspot.com/2007/08/microarray-versus-luminex-bioplex.html>). Jednakże obie technologie są wciąż udoskonalane (11,26,27,31) i każda z nich ma swoich zwolenników.

Rozwiązanie kompromisowe łączące zalety mikromacierzy wysokiej gęstości i korzyści płynące z zastosowania ziaren silikonowych jako nośników sond oligonukleotydowych wprowadziła firma Illumina (technologia BioArray, <http://www.illumina.com>). Sondy o długości 50 nt (ang. *capture sequence*) zakotwiczone są za pomocą krótkiego łącznika (ang. *address sequence*) w ziarnach o średnicy ok. 3  $\mu\text{m}$ . Każde ziarno, pokryte setkami tysięcy kopii jednej sondy, umieszczone jest w dołku na płytce silikonowej (tzw. *Bead Chip*) dzięki wykorzystaniu sił van der Waalsa. Odległość pomiędzy ziarnami nie przekracza 6  $\mu\text{m}$ , co sprawia, że na płytce o wymiarze szkiełka mikroskopowego mieści się sześć identycznych macierzy reprezentujących 20-50 tysięcy genów każda. Pozwala to na jednoczesne przeprowadzenie kilku eksperymentów, co znacznie redukuje ich koszt. Jedną z odmian mikromacierzy Illuminy (DASL) przeznaczoną jest do badania profilu ekspresji genów w częściowo zdegradowanych próbkach RNA, jakie wyekstrahować można z tkanek zakonserwowanych formaliną i zatopionych w parafinie.

Niezależnie od rodzaju platformy stosowanej do analizy ekspresji genów, w rezultacie otrzymujemy zestaw danych liczbowych, które po odpowiedniej obróbce (Stępiak i wsp., w tym numerze „Biotechnologii”) odzwierciedlają poziom ekspresji genów w badanej próbce biologicznej (rys. 1). Jednak specyficzne cechy poszczególnych platform mikromacierzowych, w połączeniu z różnorodnością protokołów znakowania i hybrydyzacji oraz algorytmów stosowanych do normalizacji i analizy danych, są często źródłem niezgodności pomiędzy wynikami publikowanymi w różnych laboratoriach. Faktycznie pierwsze porównania analiz mikromacierzowych wykonanych z zastosowaniem różnych platform nie były optymistyczne (9). Jednakże postęp w rozwoju samej technologii, automatyzacja eksperymentu, standaryzacja protokołów, zwiększenie liczby analizowanych prób oraz profesjonalna obróbka danych prowadzą do tego, że rezultaty analiz tych samych próbek RNA otrzymane na całkiem różnych macierzach mogą być porównywalne (32).

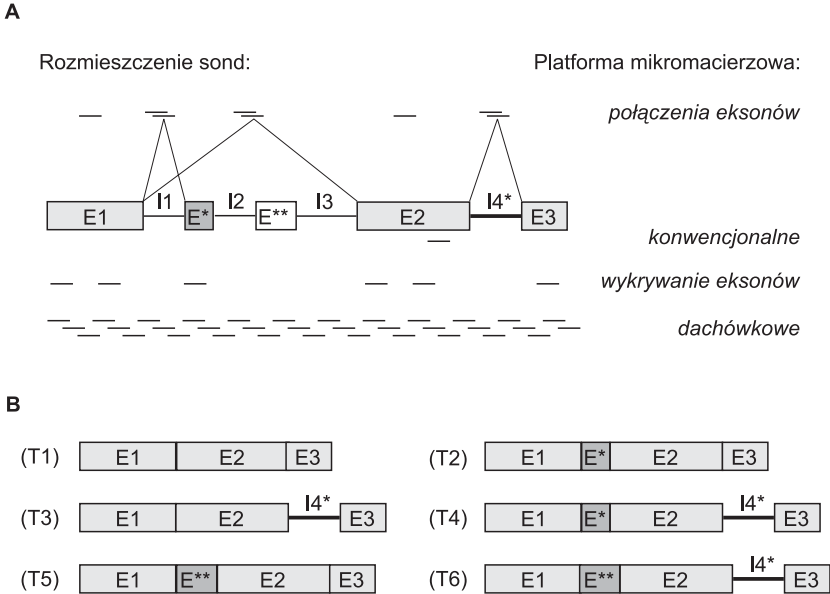
### 3. Badanie alternatywnego składania transkryptów

Alternatywne składanie transkryptów, AS (ang. *alternative splicing*), jest to proces umożliwiający powstawanie różnych wariantów mRNA z tej samej cząsteczki prekursorowej (pre-mRNA). Obecnie szacuje się, że transkrypty około 70–80% genów ludzkich podlegają alternatywnemu składaniu (33-35), co oznacza, iż są one źródłem dwóch lub większej liczby mRNA. Zjawisko to jest także stosunkowo powszechne u mniej złożonych organizmów, np. u muszki owocowej dotyczy ok. 40% trans-



Rys. 1. Ogólny schemat przebiegu eksperymentu mikromacierzowego. Wyizolowane z komórek RNA, po przepisaniu na cDNA lub aRNA, jest znakowane fluorescencyjnie i hybrydyzowane do mikromacierzy. Uzyskany obraz jest poddawany analizie ilościowej, a następnie, po normalizacji, analizie porównawczej, najczęściej w celu wyłonienia sond hybrydujących różnicowo.

kryptów (36). Białka powstałe na matrycach mRNA, złożonych w procesie AS z tego samego transkryptu, są bardzo często specyficzne pod względem lokalizacji czasoprzestrzennej w organizmie i pełnią wyspecjalizowane funkcje (37-40). Swoistym rekordzistą alternatywnego splicingu jest pre-mRNA powstający na bazie genu *Dscam* u muszki owocowej. Liczne eksony w jego sekwencji pogrupowane zostały w trzy tandemy, przy czym w dojrzałym mRNA znajduje się zawsze po jednym eksonie z danego tandemu. Liczba eksonów w połączeniu z dowolnością ich tasowania sprawia, że z jednego transkryptu *Dscam* może powstać około 38 tys. różnych mRNA, a tym samym i białek, należących do nadrodziny immunoglobulin (41,42). W badaniach funkcjonalnych wykazano, że ograniczenie ilości produktów AS powstających na matrycy genu *Dscam* powoduje dezorganizację tworzącej się siatki połączeń nerwowych. Prawdopodobnie czynnikiem warunkującym wzajemną identyfikację neuronów jest rozpoznawanie poszczególnych form białka, będącego produktem ekspresji genu *Dscam* (41).



Rys. 2. Porównanie skuteczności różnych platform mikromacierzowych w wykrywaniu alternatywnego składania pre-mRNA. A) Schemat struktury hipotetycznego genu zawierającego pięć eksonów. Trzy z nich to eksony o ekspresji konstytutywnej, potwierdzonej eksperymentalnie (E1, E2, E3), czwarty to ekson, którego istnienie przewidziano metodami bioinformatycznymi (E\*), a piąty to zupełnie niezany ekson (E\*\*). Intron (I4\*) może zostać zachowany w niektórych mRNA. Lokalizację sond stosowanych w poszczególnych platformach mikromacierzowych zaznaczono schematycznie krótkimi kreskami nad i pod rysunkiem przedstawiającym strukturę genu. B) Możliwe warianty mRNA: podstawowa (T1) oraz alternatywne (T2-T6). Szczegółowy opis w tekście.

Badania złożonego i niezwykle ciekawego zjawiska, jakim jest AS, prowadzone są w wielu różnych kierunkach – od detekcji poszczególnych wariantów mRNA, poprzez analizę funkcji białek uczestniczących w procesie wycinania intronów i łączenia eksonów w dojrzałe mRNA, po identyfikację roli biologicznej poszczególnych wariantów i kodowanych przez nie białek (37,39,40,43). Na podstawie danych eksperymentalnych dowiedziono, że AS odgrywa szczególną rolę w procesie różnicowania tkanek (35,37). O tym, jak ważny jest to sposób regulacji rozwoju i funkcjonowania organizmu świadczy najlepiej fakt, że ogromna ilość zmian chorobowych wynika właśnie z nieprawidłowego składania pre-mRNA (40,44,45). Zaburzenia w przebiegu AS stwierdzono m. in. w raku piersi i prostaty (46-48). Ma to ogromne implikacje w diagnostyce medycznej, wskazując kierunki poszukiwania nowych markerów molekularnych. Jednym z narzędzi użytecznych do badania alternatywnego składania mRNA okazały się mikromacierze DNA.

Konwencjonalne mikromacierze ekspresyjne nie nadają się do analizy AS, ponieważ zostały zaprojektowane w celu detekcji pojedynczych mRNA. Często gen reprezentowany jest przez tylko jedną sondę, komplementarną do najbardziej unikato-



wego fragmentu jego sekwencji, stanowiącego zaledwie część jednego z eksonów (rys. 2). Dlatego z myślą o analizowaniu AS stworzono dwa nowe rodzaje mikromacierzy: mikromacierze wykrywające miejsca łączenia eksonów (ang. *splice junction microarrays* lub *exon junction microarrays*) oraz macierze reprezentujące eksony (ang. *exon arrays*) (38,39).

Mikromacierze wykrywające miejsca łączenia eksonów służą do badania alternatywnego składania znanych pre-mRNA. Są one projektowane na podstawie dostępnych danych eksperymentalnych i zawierają sondy wykrywające wszystkie połączenia ekson-ekson mogące potencjalnie występować w mRNA. Często umieszczane są na nich dodatkowe sondy wykrywające każdy z eksonów (rys. 2A). Analiza takich mikromacierzy umożliwia detekcję poszczególnych wariantów splicingowych i oszacowanie ich udziału w badanym transkrypcie. Zastosowanie mikromacierzy wykrywających miejsca łączenia eksonów pozwoliło określić tkankowospecyficzny wzór występowania wielu wariantów mRNA w komórkach ssaczych (33,44-46). Ponadto uwidoczniono, że AS nie wpływa na zmianę poziomu ekspresji danego genu, stąd wniosek, że o rodzaju i ilości powstających mRNA decydują odrębne mechanizmy regulacyjne (44,47).

Macierze reprezentujące eksony zawierają po kilka sond komplementarnych do każdego z eksonów, którego występowanie potwierdzono w danych doświadczalnych lub na podstawie przeprowadzonych analiz bioinformatycznych (rys. 2A). Przykładowo na mikromacierzy Affymetrix GeneChip® Human Exon 1.0 ST umieszczono sondy dla ponad miliona eksonów obecnych w ludzkich transkryptach, po cztery sondy dla danego eksonu (<http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/exon.affx>). Zastosowanie tych mikromacierzy pozwala na połączenie klasycznych analiz ekspresji genów z wykrywaniem nowych, wcześniej nie zidentyfikowanych kombinacji składania znanych eksonów, co nie byłoby możliwe przy użyciu mikromacierzy wykrywających miejsca łączenia eksonów (35,49,50).

Najbardziej uniwersalnym narzędziem, użytecznym również w badaniach AS, są mikromacierze równomiernie pokrywające genom (zwane też mikromacierzami dachówkowymi; ang. *genome tiling microarray*). Zasady ich konstrukcji i działania zostały omówione szerzej w pracy Żmieńko i wsp. (w tym numerze „Biotechnologii”). Projektując mikromacierze dachówkowe nie uwzględnia się podziału badanego genomu / chromosomu na regiony kodujące i niekodujące (rys. 2A). Uzyskane dane nie są zatem w żaden sposób ograniczone aktualną wiedzą na temat rozmieszczenia genów w danym odcinku DNA. Mikromacierze dachówkowe są szczególnie przydatne zarówno do identyfikacji nowych eksonów lub ich fragmentów jak i nowych miejsc splicingowych (51,52).

W przedstawionym na rysunku 2 przykładzie możliwe jest powstanie sześciu różnych mRNA na matrycy jednego hipotetycznego genu, przy czym zakładamy, że dane eksperymentalne i analizy bioinformatyczne pozwolą przewidzieć występowanie wyłącznie wariantów (T1) i (T2). W tej sytuacji konwencjonalna mikromacierz ekspresyjna nie pozwoli na rozróżnienie poszczególnych wariantów, ponieważ je-



dyna sonda, jaką dysponujemy dla tego genu została zaprojektowana dla eksonu E2. Wszystkie alternatywne transkrypty zostaną zatem błędnie zakwalifikowane jako podstawowy wariant (T1). Z kolei mikromacierze reprezentujące wszystkie eksony nie uwzględniają istnienia alternatywnego eksonu E\*\* ani nie ujawnią przypadków zachowania intronu I4\*, co zamaskuje występowanie wariantów (T3-T6). Podobnie w przypadku mikromacierzy wykrywających miejsca łączenia eksonów wyniki będą niejednoznaczne i trudne w interpretacji z powodu braku sond wykrywających niektóre warianty splicingowe. Tylko zastosowanie mikromacierzy dachówkowych daje szansę na ujawnienie wszystkich sześciu transkryptów, zwłaszcza jeśli powstają one w bardzo niewielkich ilościach.

W badaniach prowadzonych za pomocą mikromacierzy wykazano wyraźnie, że nasza dotychczasowa wiedza na temat występowania i roli alternatywnego składania transkryptów jest ciągle bardzo ograniczona. Wniosek ten dotyczy także stosunkowo dobrze poznanych genomów, w tym genomu człowieka. Jednocześnie pojawia się coraz więcej przykładów potwierdzających niezwykłą skuteczność technologii mikromacierzowych w zdobywaniu nowych informacji na temat tego zjawiska.

#### **4. Analiza struktury genomu – porównawcza hybrydyzacja genomowa**

Porównawcza hybrydyzacja genomowa – CGH (ang. *comparative genomic hybridization*) jest metodą cytogenetyczną, stosowaną w celu wykrywania w genomie delecji, duplikacji lub transpozycji dużych fragmentów DNA (CNV, ang. *copy number variation*) (53). W przeciwieństwie do innych analiz kariotypu, CGH nie wymaga stosowania komórek zdolnych do podziału, polega bowiem na hybrydyzacji znakowanego fluorescencyjnie genomowego DNA do wzorcowych chromosomów metafazowych (53). Jednocześnie z badaną próbką do tych samych chromosomów hybryduje się referencyjny DNA. Dysproporcje w intensywności fluorescencji w próbce badanej w stosunku do DNA referencyjnego świadczą o zaburzeniach w liczbie kopii analizowanych fragmentów genomu. Wprowadzona w latach 90. ubiegłego wieku technika CGH znajduje zastosowanie w licznych badaniach naukowych, szczególnie dotyczących procesów nowotworowych, a także w diagnostyce medycznej (53-55).

Zastosowanie mikromacierzy złożonej z długich sond DNA o znanej lokalizacji w genomie zamiast chromosomów metafazalnych znacznie zwiększyło czułość, zakres i dokładność metody CGH, zwłaszcza w wykrywaniu delecji i duplikacji (56,57). Ponadto, amplifikacja DNA stworzyła możliwość analizy nawet niewielkich ilości materiału. Dodatkowym atutem macierzy CGH w porównaniu z klasyczną hybrydyzacją do chromosomów jest krótszy czas analizy oraz możliwość jej automatyzacji (58). Poza tym technika ta pozwala na równoczesne badanie więcej niż dwóch genomów przy dostępności odpowiednio różnicujących barwników (59). Przede wszystkim jednak, macierze CGH umożliwiają detekcję zmian liczby kopii nawet w wielu tysiącach loci jednocześnie – ich ilość jest ograniczona wyłącznie liczbą sond, na-

tomiast ich rozmiar decyduje o rozdzielczości z jaką wykrywane są aberracje chromosomalne (57,60).

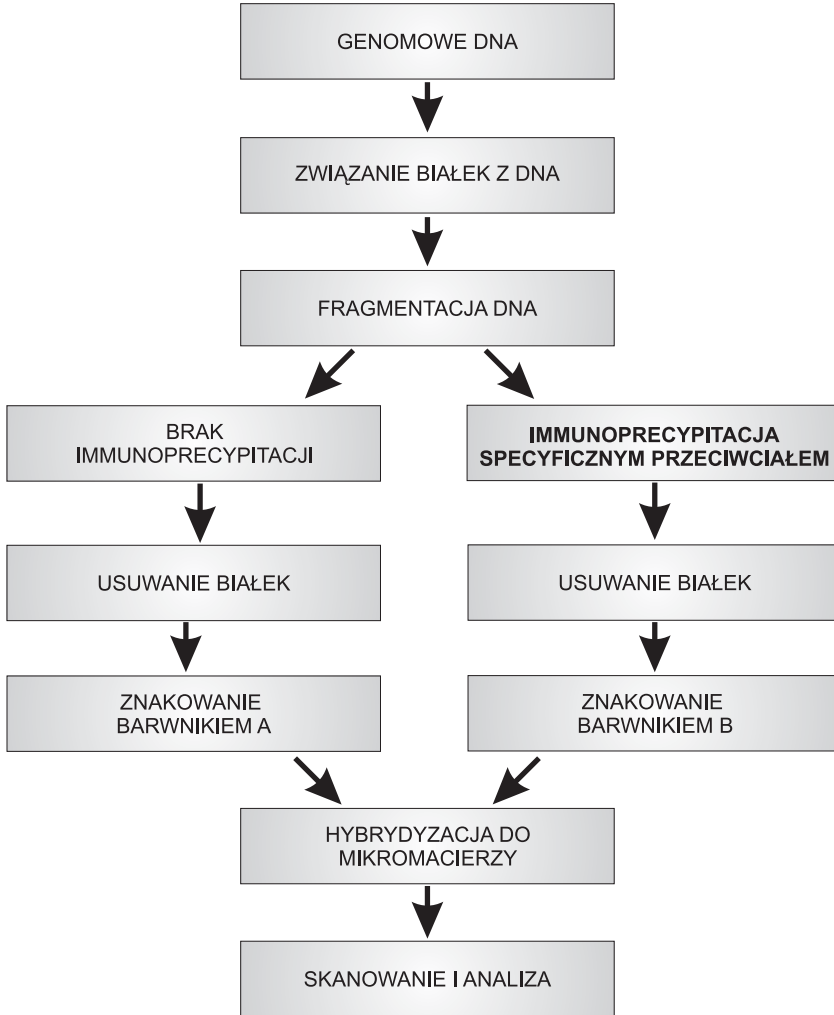
Pierwsze mikromacierze wykorzystywane w technice CGH zawierały sondy będące długimi fragmentami typu BAC (150-200 kbp). Obecnie stosowane są również mikromacierze cDNA (z sondami o długości od kilkuset do kilku tys. bp) oraz oligonukleotydowe (sondy 25-85 nt), umożliwiające bardziej precyzyjne mapowanie zmian w genomie (60). Każda z dostępnych platform mikromacierzowych ma swoje wady i zalety, można jednak przypuszczać, że największą przyszłość w tej metodzie mają oligonukleotydowe mikromacierze równomiernie pokrywające cały genom lub jego wybrany fragment, zapewniają bowiem najwyższą rozdzielczość detekcji (58, 60-63).

Mikromacierze CGH mogą znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach nauk biologicznych. Obecnie są one szczególnie często wykorzystywane w poszukiwaniach genetycznych uwarunkowań procesów chorobowych. Identyfikacja delecji/duplikacji charakterystycznych dla pacjentów z danym schorzeniem pozwala na zlokalizowanie regionów genomu odpowiedzialnych za powstawanie choroby (64). Dzięki użyciu tej techniki stwierdzono m.in., że zmiany w genie *CHD7* (takie jak mikrodelecje lub mutacje) odpowiedzialne są za występowanie zespołu CHARGE (65). Innym przykładem jest identyfikacja delecji obejmującej gen *B3GALTL*, związanej z obecnością zespołu Peters-Plus (64). Porównawcza hybrydyzacja genomowa z zastosowaniem mikromacierzy umożliwia także tworzenie map genomowych dla chorób wrodzonych. Dokładne scharakteryzowanie zespołu mutacji w danym rodzaju schorzenia ma potencjalne znaczenie diagnostyczne, co wykazano m.in na przykładzie nowotworów prostaty, piersi, żołądka czy chłoniaków (54,59,63).

## 5. Badanie oddziaływań DNA z białkami oraz modyfikacji chromatyny

Interakcje pomiędzy białkami i DNA są podstawą wielu ważnych procesów zachodzących w żywej komórce, takich jak replikacja DNA, transkrypcja, rekombinacja, naprawa DNA czy regulacja upakowania chromatyny. Jedną z metod umożliwiających analizę tych oddziaływań jest technika określana jako ChIP on chip lub ChIP-chip. Stanowi ona połączenie immunoprecypitacji chromatyny (ChIP, ang. *chromatin immunoprecipitation*) z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał oraz analizy techniką mikromacierzową wyselekcjonowanej puli kwasów nukleinowych. Metoda ChIP-chip pozwala na określenie z dużą dokładnością, jak często i w jakich miejscach genomu wiązane są konkretne białka co stwarza możliwość swobodnego mapowania interakcji białko-DNA (66,67).

Technikę ChIP on chip stosuje się od początków XXI w. Metodyka jest dość podobna w większości eksperymentów i obejmuje immunoprecypitację chromatyny, hybrydyzację fragmentów DNA do mikromacierzy oraz analizę i interpretację wyników (rys. 3) (66-68). Na wstępie komórki poddawane są działaniu formaldehydu lub



Rys. 3. Ogólny schemat przebiegu eksperymentu ChIP-chip. Opis w tekście.

innych związków chemicznych, powodujących powstawanie wiązań pomiędzy DNA i białkami. Tak przygotowany ekstrakt rozбивa się za pomocą ultradźwięków otrzymując zasocjowane z białkami fragmenty DNA o długości ok. 300-500 pz. Kolejnym etapem jest immunoprecypitacja z zastosowaniem specyficznych przeciwciał, umożliwiająca separację kompleksu DNA z interesującym nas białkiem. Następnie DNA oddzielane jest od białka, oczyszczane i znakowane fluoroforem równoległe z próbą referencyjną. Próbkę tę stanowi zazwyczaj genomowe DNA związane z białkami, ale nie poddane immunoprecypitacji lub wytrącane z przeciwciałem niespecyficznym. Obie próby hybrydyzowane są z sondami umieszczonymi na mikromacierzy,

co w rezultacie pozwala na identyfikację fragmentów genomu wiążących się z danym białkiem i stworzenie map genomowych interakcji białko-DNA (66-68).

Jakość wyników w eksperymencie ChIP-chip uzależniona jest m.in. od długości fragmentów DNA w próbce oraz cech samej mikromacierzy – jej rodzaju, długości sond oraz rozdzielczości. Podczas analizy należy również wziąć pod uwagę organizację genomu badanego organizmu, jego wielkość oraz zawartość sekwencji kodujących i niekodujących. Przykładowo, mikromacierze z sondami typu cDNA, z powodzeniem stosowane w badaniach ChIP-chip u drożdży (69,70), nie będą optymalne w przypadku genomów z dużą liczbą intronów. W tej sytuacji najlepszym rozwiązaniem jest użycie mikromacierzy dachówkowych. Dla mniejszych genomów naturalnym wyborem jest mikromacierz pokrywająca cały genom, dla bardziej skomplikowanych, np. ssaczy, często stosuje się mikromacierze dachówkowe o dużej rozdzielczości (o przylegających lub zachodzących sondach), obejmujące jedynie wybrane fragmenty, np. regiony promotorowe, sekwencje kodujące bądź niekodujące (66,67,71).

Podstawowe zastosowanie metody ChIP-chip to poszukiwanie czynników transkrypcyjnych oraz badanie ich funkcji. Pierwsze pomyslane eksperymenty tego typu, ukierunkowane na identyfikację czynników transkrypcyjnych oraz białek wiążących się do miejsc inicjacji replikacji, przeprowadzono na drożdżach, przy zastosowaniu mikromacierzy cDNA złożonej z sond o długości ok. 1 kpz. Kolejne doświadczenia na podobnych mikromacierzach pozwoliły zmapować miejsca wiązania 106 czynników transkrypcyjnych w całym genomie drożdży (69,70). Aktualnie technika ChIP-chip jest również z powodzeniem wykorzystywana do mapowania miejsc wiążących czynniki transkrypcyjne u innych organizmów (69), a także – w zmodyfikowanej postaci – do badania struktury i funkcji chromatyny: dystrybucji elementów strukturalnych, modyfikacji histonów, procesów epigenetycznych.

## 6. Podsumowanie

W artykule przedstawione zostały jedynie pojedyncze przykłady wykorzystania mikromacierzy DNA w różnego typu badaniach biomedycznych. O wielu innych można dowiedzieć się z pozostałych prac zamieszczonych w tym numerze „Biotechnologii”. Wszystkie one wskazują na olbrzymi potencjał technologii mikromacierzowych stosowanych coraz częściej nie tylko w analizie kwasów nukleinowych, lecz i innych biomolekuł, całych komórek czy nawet tkanek (14). Równolegle jednak z powstawaniem kolejnych odmian i platform mikromacierzowych rozwijane są już istniejące lub tworzone są nowe niezwykle wydajne metody badania genomów. W miejscu tym warto wspomnieć o SAGE (ang. *serial analysis of gene expression*) czy RT-PCR w czasie rzeczywistym (qPCR). Ostatniej z tych metod do niedawna używano głównie do weryfikacji wyników uzyskiwanych w eksperymentach mikromacierzowych. Automatyzacja qPCR, pozwalająca na prowadzenie setek pojedynczych reak-

cji jednocześnie, na 384-dołkowych lub większych płytках, umożliwia badanie profilu ekspresji genów na skalę zbliżoną do oferowanej przez mikromacierze, a co więcej, uzyskany wynik jest bardziej precyzyjny. Obecnie, jak się wydaje, osiągnęliśmy stan, w którym podstawowym problemem nie jest już pozyskanie danych eksperymentalnych, lecz ich analiza.

Opracowanie powstało w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego: nr PBZ-MNiI-2/1/2005.

## Literatura

1. Fodor S. P. A., Read J. L., Pirrung M. C., Stryer L., Lu A., Solas D., (1991), *Science*, 251, 767-773.
2. Fodor S. P. A., Rava R. P., Huang X. C., Pease A. C., Holmes C. P., Adams C. L., (1993), *Nature*, 364, 555-556.
3. Lockhart D. J., Dong H., Byrne M. C., Follettie M. T., Gallo M. V., Chee M. S., Mittmann M., Wang C., Kobayashi M., Horton H., Brown E. L., (1996), *Nat. Biotech.*, 14(13), 1675-1680.
4. Schena M., Shalon D., Heller R., Chai A., Brown P. O., Davis R. W., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 10614-10619.
5. Wodicka L., Dong H., Mittmann M., Ho M. H., Lockhart D. J., (1997), *Nat. Biotech.*, 15(13), 1359-1367.
6. Golub T. R., Slonim D. K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J. P., et al., (1999), *Science*, 286, 531-537.
7. Lipshutz R. J., Fodor S. P., Gingeras T. R., Lockhart D. J., (1999), *Nat. Biotech.*, 21(1 Suppl), 20-24.
8. Kisiel A., Skąpska A., Markiewicz W. T., Figlerowicz M., (2004), *Kosmos*, 3-4 (53), 295-303.
9. Mah N., Thelin A., Lu T., Nikolaus S., Kühnbacher T., Gurbuz Y., Eickhoff H., et al., (2004), *Physiol. Genomics*, 16, 361-379.
10. Meloni R., Khalfallah O., Biguet N. F., (2004), *Pharmaceutical Res.*, 49, 303-308.
11. Venkatasubbarao S., (2004), *Trends Biotechnol.*, 22,12, 630-637.
12. Chaudhuri J. D., (2005), *Med. Sci. Monit.*, 11 (2), RA52-62.
13. Shoemaker D. D., Linsley P. S., (2002), *Curr. Opin. Microbiol.*, 5, 334-337.
14. Howbrook D. N., van der Valk A. M., O'Shaughnessy M. C., Sarker D. K., Baker S. C., Lloyd A. W., (2003), *Drug Discov. Today*, 8, 642-651.
15. Sheils O., Finn S., O'Leary J., (2003), *Curr. Diagnosis Pathol.*, 9, 155-158.
16. Lucito R., Healy J., Alexander J., Reiner A., Esposito D., Chi M., Rodgers M., et al., (2003), *Genome Res.*, 13, 2291-2305.
17. Wang H. Y., Malek R. L., Kwitek A. E., Greene A. S., Luu T. V., Behbahani B., Frank B., Quackenbush J., Lee N. H., (2003), *Genome Biol.*, 4(1), R5.
18. Kane M. D., Jatkoa T. A., Stumpf C. R., Lu J., Thomas J. D., Madore S. J., (2000), *Nucleic Acids Res.*, 28(22), 4552-4557.
19. Beneš V., Muckenthaler M., (2003), *Trends in Biochem. Sci.*, 28(5), 244-249.
20. Relógio A., Schwager C., Richter A., Ansorge W., Valcárcel J., (2002), *Nucleic Acids Res.*, 30(11), e51.
21. Nielsen P. S., Ohlsson H., Alsbo C., Andersen M. S., Kauppinen S., (2005), *J. Biotech.*, 116, 125-134.
22. Hughes T. R., Mao M., Jones A. R., Burchard J., Marton M. J., Shannon K. W., Lefkowitz S. M., Ziman M., Schelter J. M., Meyer M. R., et al., (2001), *Nature Biotech.*, 19, 342-347.
23. Gershon D., (2005), *Nature*, 437, 1195-1198.
24. Spiro A., Lowe M., Brown D., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (10), 4258-4265.
25. Noda H., Kohara Y., Okano K., Kambara H., (2003), *Anal. Chem.*, 75, 3250-3255.
26. Tan W-H., Takeuchi S., (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104 (4), 1146-1151.
27. Ozanich Jr., Antolick K., Bruckner-Lea C., Dockendorff B., Easterday A., Edberg H., Grate J., Iyer S., Johnson L., Straub T., (2007), *J. Assoc. Labor. Autom.*, 12(5), 303-310.

28. Dunbar S. A., (2006), *Clin. Chimica Acta*, 363(1-2), 71-82.
29. Kuhn K., Baker S. C., Chudin E., Lieu M.-H., Oeser S., Bennett H., Rigault P., et al., (2004), *Genome Res.*, 14, 2347-2356.
30. Lu J., Getz G., Miska E. A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., et al., (2005), *Nature*, 435, 834-838.
31. Smistrup K., Bruus H., Hansen M. F. (2007), *J. Magn. Magn. Mater.*, 311, 409-415.
32. Yauk C. L., Berndt M. L., (2007), *Environ. Mol. Mutagenesis*, 48, 380-394.
33. Johnson J. M., Castle J., Garrett-Engele P., Kan Z., Loerch P. M., Armour C. D., Santos R., Schadt E. E., Stoughton R., Shoemaker D. D., (2003), *Science*, 302 (5653), 2141-2144.
34. Kampa D., Cheng J., Kapranov P., Yamanaka M., Brubaker S., Cawley S., Drenkow J., Piccolboni A., Bekiranov S., Helt G., Tammana H., Gingeras T. R., (2004), *Genome Res.*, 14, 331-342.
35. Clark T. A., Schweitzer A. C., Chen T. X., Staples M. K., Lu G., Wang H., Williams A., Blume J. E., (2007), *Genome Biol.*, 8(4), R64.
36. Stolc V., Gauhar Z., Mason C., Halasz G., van Batenburg M. F., Rifkin S. A., Hua S., Herreman T., Tongprasit W., Barbano P. E., Bussemaker H. J., White K. P. (2004), *Science*, 306, 655-660.
37. Blencowe B. J. (2006), *Cell*, 126(1), 37-47.
38. Moore M. J., Silver P. A., (2008), *RNA*, 14(2), 197-203.
39. Ben-Dov C., Hartmann B., Lundgren J., Valcárcel J., (2008), *J. Biol. Chem.*, 283(3), 1229-1233.
40. Wang G. S., Cooper T. A., (2007), *Nat. Rev. Genet.*, 8(10), 749-761.
41. Hattori D., Demir E., Kim H. W., Viragh E., Zipursky S. L., Dickson B. J., (2007), *Nature*, 449(7159), 223-227.
42. Crayton M. E. 3<sup>rd</sup>, Powell B. C., Vision T. J., Giddings M. C., (2006), *BMC Evol. Biol.*, 6, 16.
43. Keene J. D., (2007), *Nat. Rev. Genet.*, 8(7), 533-543.
44. Pan Q., Shai O., Misquitta C., Zhang W., Saltzman A. L., Mohammad N., Babak T., Siu H., Hughes T. R., Morris Q. D., Frey B. J., Blencowe B. J., (2004), *Mol. Cell.*, 16(6), 929-941.
45. Yeo G., Holste D., Kreiman G., Burge C. B., (2004), *Genome Biol.*, 5(10), R74.
46. Nagao K., Togawa N., Fujii K., Uchikawa H., Kohno Y., Yamada M., Miyashita T., (2005), *Hum. Mol. Genet.*, 14(22), 3379-3388.
47. Zhang C., Li H. R., Fan J. B., Wang-Rodriguez J., Downs T., Fu X. D., Zhang M. Q., (2006), *BMC Bioinformatics.*, 7, 202.
48. Li C., Kato M., Shiue L., Shively J. E., Ares M. Jr, Lin R. J., (2006), *Cancer Res.*, 66(4), 1990-1999.
49. Gardina P. J., Clark T. A., Shimada B., Staples M. K., Yang Q., Veitch J., Schweitzer A., Awad T., Sugenet C., Dee S., Davies C., Williams A., Turpaz Y., (2006), *BMC Genomics.*, 7, 325.
50. McKee A. E., Neretti N., Carvalho L. E., Meyer C. A., Fox E. A., Brodsky A. S., Silver P. A., (2007), *Genome Biol.*, 8(8), R159.
51. Juneau K., Palm C., Miranda M., Davis R. W., (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104(5), 1522-1527.
52. Zhang Z., Hesselberth J. R., Fields S., (2007), *Genome Res.* 17(4), 503-509.
53. Kallioniemi A., Kallioniemi O. P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J. W., Waldman F., Pinkel D., (1992), *Science*, 258, 818-821.
54. Bejjani B. A., Shaffer L. G., (2006), *J. Mol. Diagn.*, 8(5), 528-533.
55. Inazawa J., Inoue J., Imoto I., (2004), *Cancer Sci.*, 95(7), 559-563.
56. Emanuel B. S., Saitta S. C., (2007), *Nat. Rev. Genet.*, 8(11), 869-883.
57. Solinas-Toldo S., Lampel S., Stilgenbauer S., Nickolenko J., Benner A., Döhner H., Cremer T., Lichter P., (1997), *Genes Chromosomes Cancer.*, 20(4), 399-407.
58. Stankiewicz P., Beaudet A. L., (2007), *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 17(3), 182-192.
59. Pinkel D., Albertson D. G., (2005), *Nat. Genet.*, 37 Suppl, S11-17.
60. Ylstra B., van den Ijssel P., Carvalho B., Brakenhoff R. H., Meijer G. A., (2006), *Nucleic Acids Res.*, 34(2), 445-450.
61. Davies J. J., Wilson I. M., Lam W. L., (2005), *Chromosome Res.*, 13(3), 237-248.
62. Urban A. E., Korbel J. O., Selzer R., Richmond T., Hacker A., Popescu G. V., Cubells J. F., Green R., Emanuel B. S., Gerstein M. B., Weissman S. M., Snyder M., (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103(12), 4534-4539.

63. van Beers E. H., Nederlof P. M., (2006), *Breast Cancer Res.*, 8(3), 210.
64. de Ravel T. J., Devriendt K., Fryns J. P., Vermeesch J. R., (2007), *Eur. J. Pediatr.*, 166(7), 637-643.
65. Vissers L. E., Veltman J. A., van Kessel A. G., Brunner H. G., (2005), *Hum. Mol. Genet.*, 14 Spec No. 2, R215-223.
66. Buck M. J., Lieb J. D., (2004), *Genomics.*, 83(3), 347-348.
67. Hanlon S. E., Lieb J. D., (2004), *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 14(6), 697-705.
68. Wade J. T., Struhl K., Busby S. J., Grainger D. C., (2007), *Mol. Microbiol.*, 65(1), 21-26.
69. Bulyk M. L., (2006), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17(4), 422-430.
70. Kirmizis A., Farnham P. J. (2004), *Exp. Biol. Med. (Maywood).*, 229(8), 705-721.
71. Wu J., Smith L. T., Plass C., Huang T. H., (2006), *Cancer Res.*, 66(14), 6899-6902.