

KOUZLA MIKROSOUBORŮ

Již dnes se DNA-mikrosoubory nebo DNA-čipy používají k objasnění podstaty zdraví i nemoci, či k urychlení vývoje nových léků. Předpokládá se, že jejich použití přiblíží den, kdy současná léčba, v podstatě shodná pro všechny pacienty, bude nahrazena terapií „ušitou“ pacientovi přesně na míru.

STEPHEN H. FRIEND
A ROLAND B. STOUGHTON

OBRAZEC BODŮ se objeví, když jsou vzorky tkání analyzovány DNA-čipy. Individuální rozdíly v těchto vzorech mohou jednoho dne pomoci lékařům vyladit léčbu podle specifických potřeb pacienta.



VĚTŠINA LIDÍ, kteří každoročně onemocní roztroušeným lymfomem B-buněk, zpočátku velmi dobře odpovídá na standardní způsob léčby. Přesto téměř u poloviny z nich dojde ke smrtelnému návratu rakoviny. Lékaři se velmi dlouho domnívali, že hlavním důvodem, proč se nemoc u některých nemocných stabilizuje, zatímco jiní jí rychle podléhají, je to, že nemoc přichází v různých podobách způsobených různou formou zúčastněných molekul. Ještě před dvěma lety neexistoval způsob, jak identifikovat případy tohoto onemocnění, které jsou pro pacienta nejvíce nebezpečné a kdy je nutno nasadit velmi intenzivní, avšak také nejvíce riskantní terapii.

Vynálezem metody DNA-čipů nastal v této bezvýhodné situaci zlom, a to díky výzkumům v Národním ústavu zdraví (NIH), na Stanfordské univerzitě a dalších místech. Vědcům totiž tato metoda umožnila srovnávat celkový obraz aktivity stovek



genů v nádorových buňkách pacientů, u nichž byla diagnostikována rychlá nebo pomalá forma nemoci. Tento úspěch by měl vést k vývoji diagnostického testu, který bude schopen určit pacienty s nejhorší prognózou a umožní zvolit odpovídající léčbu.

DNA-čipy, které byly poprvé komerčně využity v roce 1996, jsou dnes hlavním pilířem pro vývoj nových léků. Více než dvacet firem se dnes zabývá prodejem čipů nebo přístrojů a softwaru, který je nutný pro vyhodnocení výsledků. Tento vynález působí revoluci i ve výzkumu normálních buněk těla a molekulárních abnormalit, které jsou podstatou zdravotních potíží. Připravuje také cestu pro rychlejší a přesnější diagnózu, která lékařům umožní léčbu individualizovat. Tím je myšlena cílená terapie přesné formy onemocnění u konkrétního pacienta a následný výběr léků s největší možnou účinností a nejmírnějšími vedlejší účinky.

Miniaturní pomocníci

Genové čipy jsou vyráběny v různých druzích. Jejich společným rysem je, že jsou schopny ohodnotit genetický materiál testovaných tkání. Obsahují uspořádané pole jednovláknových molekul DNA (sond), které jsou uchyceny na podložce ne větší než otisk palce. Tyto čipy využívají jednu užitečnou vlastnost DNA – komplementární párování bází.

DNA je molekula, ze které je v lidské buňce vytvořeno více než 30 tisíc genů, tedy kódovaných sekvencí nezbytných pro vznik příslušné bílkoviny. Je sestavena ze čtyř stavebních kamenů, které jsou obvykle

označeny prvním písmenem z názvu chemické báze (tj. A, C, G a T), jíž se tyto stavební kameny navzájem liší. Báze A jednoho řetězce se bude párovat pouze s bází T řetězce druhého, tedy T je komplementem báze A. Obdobně báze C se bude párovat pouze s bází G.

Z výše uvedeného vyplývá, že pokud se molekula DNA z testovaného vzorku bude vázat na sondu tvořenou sekvencí ATCGGC, můžeme usuzovat, že molekula ze vzorku má komplementární sekvenci TAGCCG. Tato striktní pravidla komplementárního párování platí i pro molekulu RNA, která je molekule DNA chemicky velmi podobná. Tedy i sekvence jakékoli molekuly RNA, která bude na DNA sondu navázána, může být určena obdobným způsobem.

Reakce založené na komplementárním párování bází byly po léta součástí mnoha biologických testů. Ale výkonnost mikročipů DNA je přímo ohromující. Tato metoda umožňuje na jednom čipu paralelně sledovat desetitisíce takových komplementárních reakcí. Takto široký záběr je umožněn tím, že každé jednotlivé sondě (ať kóduje gen nebo jen kratší sekvenci DNA) je na šachovnici čipu přidělena přesně definovaná souřadnice. Další nezbytnou podmínkou je, že každá molekula RNA nebo DNA z testovaného vzorku přicházejícího do styku s čipem je označena fluorescenční nebo jinou značkou, která umožní detekci skenerem. Po přečtení čipu skenerem převede počítač hrubá data do barevně kódovaných údajů.

Vědci původně hodlali využít genové čipy k dvěma rozdílným účelům. Jednak pro

takzvanou genovou typizaci, která porovnáním DNA na čipu s DNA vzorku umožňuje zjistit, které geny jsou ve vzorku přítomny, anebo pro rozluštění pořadí bází v dosud ještě nepřečtených úsecích DNA. Dnes jsou tyto nástroje používány nejen ke stanovení přítomnosti nebo sekvence genů ve vzorku, ale také k určení jejich aktivity neboli exprese. Expresí genů rozumíme přepis jejich sekvence do informační RNA (mRNA) v jádře a následný překlad do bílkoviny – ten se již odehrává v cytoplasmě. Molekuly mRNA jsou vlastně dočasnými přenašeči informace z genů jádra do cytoplasmy, kde je podle nich sestavena molekula bílkoviny.

Lovci genů

Genová typizace je také používána pro porovnávání genů v různých organismech, což například umožňuje najít klíč k evoluci organismů. Slouží také k porovnání genů v nádorech a zdravých tkáních, což vede k odhalení i nepatrných rozdílů ve složení genů nebo jejich počtu. Jednou jistě bude porovnávání genů pacientů pomocí DNA-čipů běžně používáno v lékařské praxi.

Velmi pečlivě navržené čipy by například mohly oznámit přesnou příčinu infekce v případech, kdy symptomy podobné chřipce (bolest, vysoká horečka, těžké dýchání) neukazují zřetelně na jednoho viníka. Povrch čipu může být upraven tak, že se na něj navážou ty sekvence DNA, které reprezentují geny objevující se pouze u vybraných původců určitých onemocnění. V laboratoři by se izolovala DNA ze vzorků napadených tkání pacienta (třeba ze sliznice nosní dutiny pacienta) a navázání pacientovy DNA na určité sekvence v DNA čipu by určilo původce onemocnění. Obdobně čipy, které jsou nyní vyvíjeny, mohou být použity k odhalení bioteroristů, kteří by zamořili nějakou oblast např. specifickým typem antraxu nebo jinými nebezpečnými exotickými mikroorganismy.

DNA-čipy detekující různé geny mohou také určit genetickou náchylnost jedince k jistým typům onemocnění. Většina genetických rozdílů mezi lidmi, které vedou k určitým typům onemocnění je způsobena polymorfismem jednoho nukleotidu - SNP (z anglického *single nucleotide*

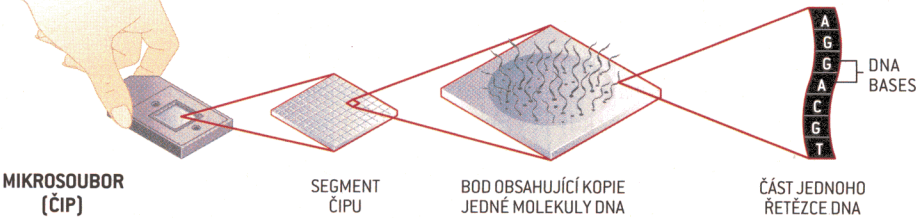
Shrnutí/Něco málo o mikrosouborech

- Mikrosoubory (*microarrays*), které jsou známé i pod názvem DNA-čipy nebo genové čipy, mohou současně sledovat tisíce molekulárních reakcí na destičce, která je menší než podložní sklíčko používané při mikroskopování. Čipy mohou být navrženy buď pro detekci specifických genů nebo pro měření exprese genů ve vzorcích tkání.
- Tyto vlastnosti jsou nedocenitelné pro buněčné biologы, pro vědce studující podstatu rakoviny a dalších komplexních onemocnění a pro odborníky vyvíjející nová léčiva.
- Na vývoji bílkovinných čipů, které jsou příslibem pro diagnostiku a biologický výzkum, se pracuje.
- Vědecké a diagnostické informace získané pomocí DNA-čipů a bílkovinných čipů mohou pomoci lékařům poskytnout individuálně zaměřenou terapii.

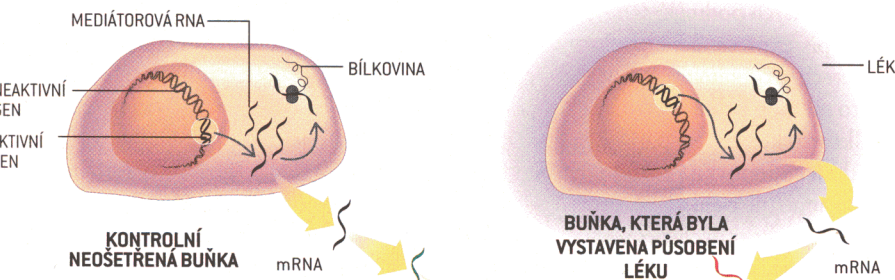
JAKÝM ZPŮSOBEM PRACUJÍ GENOVÉ ČIPY

CHTĚJÍ-LI VĚDCI ZNÁT RYCHLOU ODPOVĚĎ na to, zda může nová testovaná látka poškodit játra, mohou sledovat níže uvedený návod a přitom hledat odpověď na

otázku: mění testovaná látka činnost genů v jaterní tkáni způsobem, o kterém se ví, že odráží poškození jater? Odpověď ano by naznačovala problémy při jejím použití.



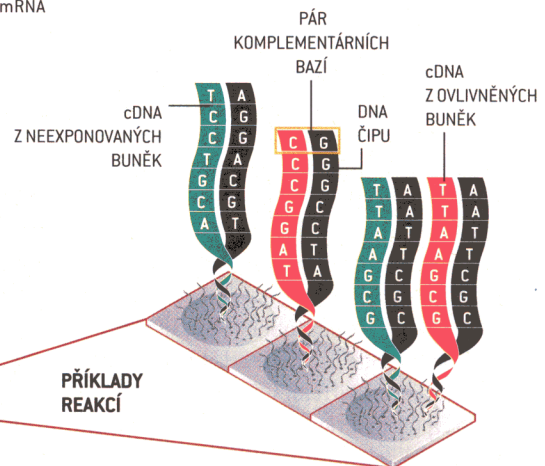
1 Vytvořte nebo si kupte čip obsahující jednořetězcové DNA reprezentující tisíce různých genů, které jsou umístěny na přesně definované souřadnici na destičce. Každý takovýto bod je tvořen tisíci až milióny kopií DNA.



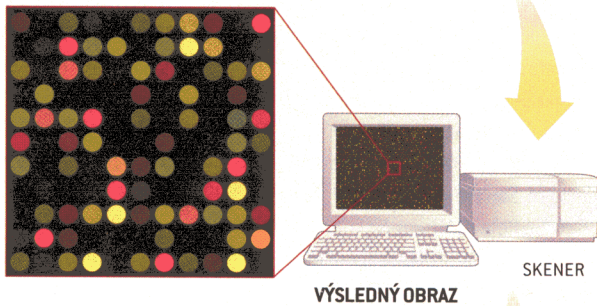
2 Získejte dva vzorky jaterních buněk. Na jeden vzorek působte testovanou látkou. Potom z buněk obou vzorků izolujte informační RNA (mRNA) - kopii genu a vzor pro syntézu bílkoviny.

3 Přepište mRNA do stabilnější formy, takzvané komplementární DNA (cDNA) a přidejte fluorescenční značku, zelenou na cDNA z buněk, na které se novou látkou nepůsobilo, a červenou na cDNA z buněk které byly s touto látkou inkubovány.

4 Aplikujte označené cDNA na čip. Navázání proběhne úspěšně, pokud cDNA najde na čipu komplementární sekvenci. Vazba značí, že gen byl v testovaném vzorku aktivní (exprimovaný).



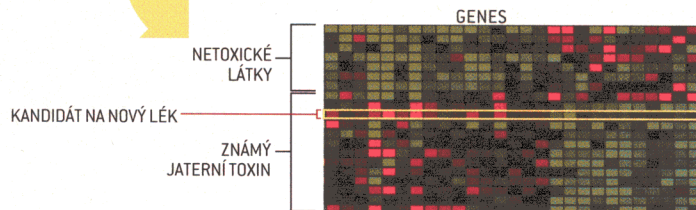
- GEN, KTERÝ ZŘETELNĚ ZVÝŠIL AKTIVITU V OŠETŘENÝCH BUŇKÁCH.
- GEN, KTERÝ ZŘETELNĚ SNÍŽIL AKTIVITU V OŠETŘENÝCH BUŇKÁCH.
- GEN, KTERÝ BYL STEJNĚ AKTIVNÍ V OŠETŘENÝCH I V KONTROLNÍCH BUŇKÁCH.
- GEN, KTERÝ BYL V OBOU SKUPINÁCH NEÚČINNÝ.



5 Vložte čip do skeneru a vyhodnoťte počítačem poměr červené a zelené barvy v každém bodě. Tento poměr kvantifikuje jakoukoli změnu v aktivitě genu způsobenou testovanou látkou.

6 Určete, zdali nějaké geny výrazně odpovídají na testovanou látku způsobem, o němž se ví, že podporuje nebo odráží poškození jater. Nebo porovnejte celkový obraz výrazně exprimovaných genů s obrazem, který je tvořen aktivitou těchto genů v přítomnosti známého jaterního toxinu. Výrazná podobnost bude naznačovat, že nově testovaná látka je také toxická. V uvedeném diagramu každý rámeček v řadě reprezentuje odpověď jednotlivých genů na přítomnost testované látky.

HYPOTETICKÝ PROFIL AKTIVITY GENŮ V BUŇKÁCH VYSTAVENÝCH RŮZNÝM LÁTKÁM



polymorphism), při kterém dochází k změně jednoho nukleotidu v genu za jiný. Může být sestaven genový čip nesoucí různé, s některou nemocí spojené varianty genu, který tak pomůže odhalit určitý typ změny v genu a tím předpovědět pravděpodobnost propuknutí například Alzheimerovy choroby, cukrovky či rakoviny určitého typu. Lidé s nejvyšším rizikem pak mohou být podrobeni podrobnějšímu sledování, intenzivní preventivní péči a popřípadě časnému lékařskému zásahu. Zůstává ovšem otevřenou otázkou, zda se tyto testy budou zamlouvat veřejnosti, neboť druhou stranou mince znalosti těchto údajů může být zvýšená úzkost jimi vyvolaná a potenciální diskriminace ze strany zaměstnavatelů a pojišťovacích společností.

Jiné hodnotné informace, které mohou čipy typu SNP poskytnout, nemusí pro občany představovat rovnou ohrožení jejich duševního stavu, zaměstnatelnosti a pojistitelnosti. Varianty našich genů ovlivňují, jak naše tělo zpracovává léky, které přijímáme, což následně ovlivňuje jejich účinnost a intenzitu vedlejších účinků. Čipy odhalující naši unikátní genetickou citlivost by pomohly lékařům při výběru nejvhodnějších léků. Čipy typu SNP, které zachycují přítomnost mutací zvyšujících nebezpečnost nádorů, by mohly pomoci určit patologům, zdali nezhoubně vypadající nádor není nebezpečnější, než se zdá z jeho mikroskopického vyšetření. Oba tyto typy genových čipů jsou právě testovány pro lékařské použití.

Genová exprese pod lupou

Obdobně přitažlivou aplikací genových čipů je jejich využití pro charakterizaci genové exprese, která v posledních letech uchvátila mnoho vědeckých týmů. Tato metoda je založena na stanovení množství různých molekul mRNA ve vzorcích tkání. Obecně lze říci, že čím více kopií dané molekuly mRNA buňka vyrobí, tím více vyrobí i dané bílkoviny, obsah různých mRNA ve vzorku tedy přibližně odpovídá i typu a množství přítomných bílkovin. Bílkoviny jsou velmi často středem našeho zájmu, protože řídí či uskutečňují většinu dějů v buňkách našeho těla. Čipy, které přímo měří hladiny bílkovin v buňce, jsou právě vyvíjeny (viz rámeček na straně xxxxx), ale

jejich zhotovení zůstává pro nás stále ještě výzvou.

Využitím čipů jako čidla změn aktivity genů v různých buňkách mohou vědci získat rychle detailní snímek toho, jak se mění buněčné funkce účinkem léků či během nemoci. Často může být výhodnější znát celkový obraz aktivity genů v měřeném vzorku v závislosti na změně podmínek než mít pouze informaci o tom, kdy je vypnut a zapnut jeden určitý gen. V takovýchto případech je výsledný obraz v podstatě těsnopisným zápisem o celkovém stavu buňky v určitých podmínkách.

Popis exprese genů se ukázal v mnoha směrech neocenitelný. Buněční biologové si tuto metodu velmi oblíbili, neboť poznání bílkovin, které převažují v případech, kdy je tkáň exponována různým podmínkám, nám umožní pohled do přirozených buněčných obranných procesů i do patologických změn, provázejících vývoj celé řady onemocnění.

SOUBOR SPOLEČNOSTÍ ZABÝVAJÍCÍ SE ČIPY

V následujícím seznamu jsou některé společnosti prodávající nebo vyvíjející produkty spojené s mikročipy a jejich servisem.

DNA-mikročipy

Affymetrix, Santa Clara, Kalifornie
 Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornie
 Amersham Biosciences, Piscataway, New York
 Axon Instruments, Union City, Kalifornie
 BioDiscovery, Marina del Rey, Kalifornie
 Clontech, Palo Alto, Kalifornie
 Genomic Solutions, Ann Arbor, Michigan
 Mergen, San Leandro, Kalifornie
 Motorola Life Sciences, Northbrook, Illinois
 Njanogen, San Diego, Kalifornie
 Partek, St. Peters, Missouri
 PerkinElmer, Boston, Massachusetts
 Rosetta Inpharmatics, Kirkland, Washington
 Spotfire, Cambridge, Massachusetts
 Virtek Vision International, Ontario, Kanada

Bílkovinné čipy

Biacore International, Uppsala, Švédsko
 Biosite Diagnostics, San Diego, Kalifornie
 Ciphergen, Fremont, Kalifornie
 Large Scale Biology, Germantown, Maryland

Pro mnoho biologů je také přínosem použití čipů pro hledání funkce neznámých genů, které jsou objevovány při sekvenování DNA – připomeňme si, že prakticky celý lidský genom byl již sekvenován. Funkce neznámých genů (přesněji bílkovin, které jsou těmito geny kódovány) může být zjištěna i jinými metodami, ale tyto přístupy nepracují vždy dobře a rychle. Při použití čipů pro hledání funkce určitého genu se využívá přístup zvaný anglicky „guilt-by-association“ (vinen ze spolčení) – v podstatě to znamená najít další již známé geny, které se chovají podobným způsobem jako neznámý gen. Čipy nám zde pomáhají poměrně rychle určit takové geny, a tím i napovědět, jakých dějů se nový gen může účastnit.

Tento přístup vychází z vědomí toho, že žádný gen není svou funkcí osamocený. Pokud skupina genů ve tkáni odpovídá společným zapnutím nebo vypnutím na nějaký vliv, řekněme na lék, infekci nebo mutaci, mohou vědci předpokládat, že tyto podobně aktivní geny budou zapojeny do jedné regulační dráhy. Jinými slovy - různé geny, zapojené do jedné regulační dráhy, jsou zapotřebí, aby byla vyvolána určitá buněčná odpověď. Lze tedy s jistotou opatrností odhadnout, že funkce původně záhadných genů je nějakým způsobem spojena s již známou funkcí ostatních genů ze stejné skupiny.

Nástroje pro vývoj nových léků

Také vědci vyvíjející nové léky mohou využít výhod plynoucích z metody „vinen ze spolčení“ objevem bílkovin, o nichž doposud nebylo známo, že jsou zapojeny do průběhu nějaké nemoci. Jakmile budou takové proteiny objeveny, mohou se využít jako cíl pro nová a lepší léčiva.

Například Peter S. Linsley, náš kolega pracující v Rosetta Inpharmatics, chtěl nalézt nové cíle pro látky, které by umožnily lépe bojovat proti zánětlivým onemocněním, při kterých imunitní systém zvrhne ničí části vlastního těla. Chtěl proto zjistit, které geny bílých krvinek imunitního systému zvyšují nebo snižují tvorbu svých proteinů paralelně s genem kódujícím bílkovinu interleukin-2 (IL-2). IL-2 se výrazně podílí v průběhu zánětlivých onemocnění.

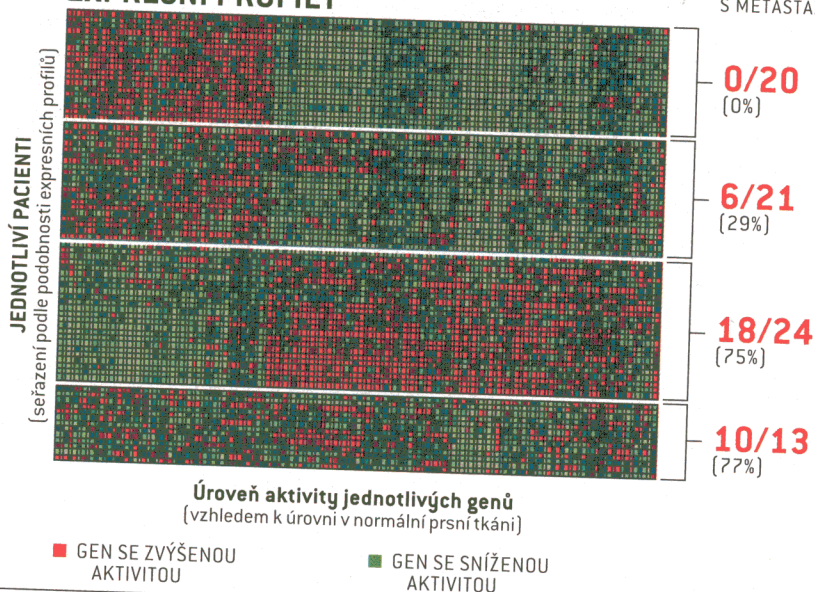
PŘEDPOVÍDÁNÍ PRŮBĚHU RAKOVINY

VĚDCI Z ROSETTA INPHARMATICS a Holandského institutu pro výzkum rakoviny předpokládají, že čipy mohou být použity k rozlišení pacientů s rozdílnou prognózou rakoviny. K tomu závěru došli studiem exprese genů z malého lokalizovaného nádoru prsu u žen, které byly sledovány nejméně pět let po jeho odstranění. Expresní profily (celkový obraz aktivit všech vybraných a sledovaných genů z nádoru) se mezi pacientkami lišily. Mate-

matická analýza odhalila, že u pacientek, jejichž expresní profil se podobal „otisku“ špatné prognózy, který vznikl průměrem expresních profilů z metastázuujících nádorů, docházelo s větší pravděpodobností k rychlému návratu onemocnění než u pacientek, jejichž profily se podobaly „otisku“ dobré prognózy, který byl typickým obrazem pro nemetastázuující nádory. Pokud budou tyto výsledky potvrzeny i dalšími vědeckými týmy, budou

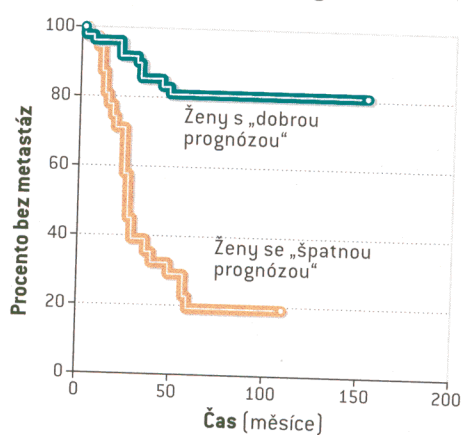
lékaři schopni rozpoznat, jak intenzivní terapii pacientky potřebují, a to podle toho, jak výrazně se jejich expresní profily podobají standardizovaným profilům pro dobrý nebo špatný vývoj.

EXPRESNÍ PROFILY



PODÍL PACIENTŮ S METASTÁZAMI

OSUDY PACIENTŮ



Najít odpověď se mu podařilo pomocí zjištění expresního profilu genů v bílých krvinkách, které byly vystaveny různým chemikáliím. Výsledky vyhodnotil pomocí složitějšího programu, který byl schopen porovnáním vzniklých profilů odhalit skupinu genů, jejichž exprese se měnila pouze tehdy, když byl IL-2 aktivován. Tato sada genů obsahovala neznámý gen, jehož funkce nebyla do té doby popsána. Přibližně ve stejnou dobu jiná laboratoř v Pasteurově ústavu v Paříži pomocí jiných metod nezávisle potvrdila, že tento gen je opravdu zapojen v dráze IL-2. Obě tato zjištění naznačují, že bílkovina kódovaná nově objeveným genem by mohla být dobrým cílem pro protizánětlivá léčiva.

Farmaceutičtí vývojoví pracovníci využijí expresní profily pro jiný cíl. Chtějí vybrat kandidáty na léčiva, která by neměla nežádoucí vedlejší účinky. Vědci, kteří chtějí zjistit, zdali určitá sloučenina není nebezpečná pro srdce, mohou například vytvořit soubor všech profilů genové exprese srdeč-

ních buněk, které byly vystaveny vlivu různých známých látek a léčiv. Pokud pro takovýto pokus použijí i nový lék, mohou následně pomocí počítače porovnat novou charakteristiku s tímto „vzorem“. Pokud nová charakteristika je podobná té, která vznikla použitím látky způsobující poškození srdce, je to signál, že nově zkušované léčivo může způsobovat obdobné problémy.

Vzor expresních profilů může také pomoci najít vysvětlení, proč daný lék má určitý vedlejší účinek. Jednou z naléhavých otázek je, proč inhibitory proteáz, které zachraňují život lidem infikovaným HIV (vi-

rem, který způsobuje onemocnění AIDS), zvyšují obsah cholesterolu a triacylglycerolů v krvi, způsobují neobvyklé přemístění tělního tuku a insulinovou odolnost. Jelikož je známo, že játra ovlivňují syntézu a odbourávání lipidů (lipidy zahrnují cholesterol i triacylglyceroly) a bílkovin obsahujících lipidy, naše skupina z Rosetty společně se skupinou Rogera Ulricha z Abbotových laboratoří se rozhodla zjistit, zdali *ritonavir*, jeden z inhibitorů proteáz, má v játrech nějaké vedlejší účinky.

Pomocí čipu, který obsahoval kolem 25 000 krysích genů, jsme vytvořili expresní

AUTORI

STEPHEN H. FRIEND a ROLAND B. STOUGHTON jsou spolupracovníky v *Rosetta Inpharmatics* v Kirklandu ve státě Washington. Tento ústav byl založen v roce 1996, aby vyvinul metody pro molekulární profilování, jež by využívaly počítače a genové čipy. Tato společnost se minulý rok stala součástí *Merck & Co.* Friend je v současnosti viceprezidentem pro základní výzkum ve společnosti *Merck* a prezidentem *Rosetty*. Původně byl pediatrem specializovaným na onkologii a molekulárním biologem na Harvardově univerzitě. Poté se stal ředitelem molekulární farmakologie v centru rakovinných studií Freda Hutchinsona a spoluzaložil společnost *Rosetta*. Stoughton získal PhD. ve fyzice, je viceprezidentem pro informatiku v *Rosettě*. Ještě před tím, než se začal zajímat o biotechnologie, se účastnil vývoje obrazové analýzy a přístrojů pro zpracování obrazového signálu v geofyzice a astrofyzice.

Proteinové čipy – nová alternativa

N. Leigh Anderson a Gunars Valkirs

STEJNĚ JAKO GENOVÉ ČIPY mohou bílkovinné čipy, které na malém povrchu zachycují bílkoviny místo molekul DNA, měřit hladinu bílkovin ve tkáních. Tímto způsobem se hladina bílkovin určuje přímo a podle dostupných srovnání se tento přístup zdá přesnější, než řada současných biochemických metod. Pouze tato metoda je schopna odhalit interakce mezi tisíci bílkovinami přítomnými ve tkáni.

Díky těmto vlastnostem jsou bílkovinné čipy pro vědce velmi atraktivní. Velké naděje se vkládají například do rozšíření diagnostických možností přímo v ordinaci.

Bílkovinné čipy by měly být výhodné pro diagnostiku, protože na rozdíl od čipů DNA mohou posbírat informace přímo ze snadno získatelné krevní plazmy. Většina onemocnění, od infekčních nemocí po poškození srdce či ledvin, zanechává v krvi identifikovatelné stopy ve formě vytvářených nebo uvolněných bílkovin. Navíc v jediném testu by bylo možné sledovat většinu nebo všechny známé bílkoviny, jejichž výskyt je spojen s nějakou nemocí. Je nutné zdůraznit, že v běžných testech se najednou sleduje pouze jedna nebo nanejvýš několik bílkovin.

Bílkovinné čipy se podobají genovým čipům. Stovky až tisíce bílkovin (v milionech kopií) je umístěno na přesně definovaném místě tenké destičky. Vazba bílkovin ze vzorku krve na čip odhalí povahu a množství bílkovin v testovaném vzorku.

Typ bílkovin navázaných na čipu se může lišit v závislosti na typu testu, který má být pomocí čipu proveden. Avšak čipy, které se nejvíce podobají těm pro možné komerční využití, jsou založeny na protilátkách, významných molekulách imunitního systému, neboť každá protilátka je schopná rozeznat a vázat jednu specifickou bílkovinu,

presněji jeden specifický segment této bílkoviny. Některé bílkovinné čipy pracují na základě takzvané sendvičové metody. Na čipu je navázána první protilátka, která ve vzorku vyhledává specifickou bílkovinu. Druhá protilátka pak k bílkovině, teď už zachycené na čipu, připojuje fluorescenční značku (viz schéma).

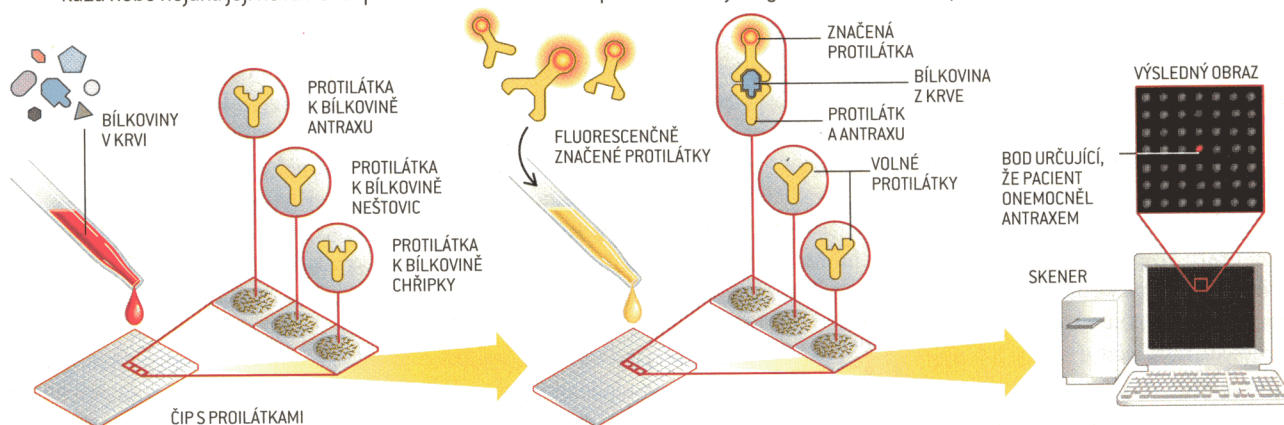
Dříve než budou bílkovinné čipy využívající vlastnosti protilátek použity vědci a lékaři, bude nutné překonat nejméně dvě velké překážky. První z nich je, že je nutno vyvinout techniku, která by umožnila masovou produkci mnoha různých protilátek najednou, a to takových, které se vážou pouze na jednu specifickou bílkovinu a tak pevně, aby bylo možné odhalit i bílkovinu, která je ve vzorku zastoupena v malém množství. Naštěstí se již daří tento problém překonat. Druhá překážka je zásadnější. Doposud bylo odhaleno pouze minimum ze stovek a možná i tisíců bílkovin signalizujících přítomnost či vývoj nějakého onemocnění. Dokud výrobci bílkovinných čipů nebudou vědět jaké bílkoviny hledat, bude možné pomoci této metody ve vzorku tkáně odhalit pouze omezený počet bílkovinných značek spojených s některou z nemocí. Naštěstí mnoho vědců se momentálně snaží zachytit nové, pro nějakou nemoc specifické bílkoviny. Postupný pokrok ve výrobě protilátek ve spojení s objevy nových bílkovin povede ke vzniku druhé generace bílkovinných čipů, která by mohla přinést zásadní změny biomedicínskému výzkumu i klinické praxi.

N. Leigh Anderson a Gunars Valkirs spolupracují na vývoji bílkovinných čipů. Anderson je vědecký vedoucí korporace Large Scale Biology v Germantownu ve státě Maryland. Valkirs je technologickým vedoucím Biosite Diagnostics v San Diegu v Kalifornii.

JAK FUNGUJE PROTEINOVÝ ČIP

JEDNOHO DNE budou moci lékaři využít „sendvičovou“ metodu k identifikaci původce infekčního onemocnění. Je to známá virová nákaza nebo nějaká její nová nebezpečná varianta? Mohl to způsobit

původce tuberkulózy, nebo je to snad vinou antraxu či neštovic, jejichž původce někdo použil k bioterorismu? Následující vysvětlení vám snad přinese odpověď.



1 Naneste krev na čip skládající se z protilátek, jimž je přidělen určitý čtverec v síti souřadnic. Každý čtverec obsahuje mnoho kopií protilátky, která je schopna vázat specifickou bílkovinu z organismu a může představovat jasného původce onemocnění.

2 Naneste fluorescenčně značenou protilátku schopnou se vázat na bílkovinu rozeznávanou protilátkou navázanou na čipu. Pokud se bílkovina z krve navázala na čip, jedna s fluorescenčně označených protilátek se na ni naváže a uzavře ji v takzvaný protilátkový sendvič.

3 Vložte čip do skeneru a zjistíte, který mikroorganismus je přítomný v těle pacienta. V tomto případě je viníkem antrax.

profil genů z tkáně krysích jater, které byly vystaveny různým chemikáliím, potenciálně jedovatým pro jaterní tkáň. Poté jsme testované sloučeniny rozdělili do skupin na základě podobnosti expresních charakteristik asi 2 400 genů - tedy těch, které na testované sloučeniny výrazně odpovídaly. V dalším kroku jsme vpravili ritonavir do krysích jater a vzniklý expresní profil jsme porovnali s těmi, co jsme vytvořili dříve.

Zjistili jsme, že ritonavir působí na expresi genů, které jsou obvykle utlumeny známými látkami snižujícími hladinu lipidů. Ritonavir také snižuje tvorbu bílkovin vytvářejících proteasomy, což jsou struktury odpovědné za odbourávání již nefunkčních bílkovin, včetně bílkovin obsahujících lipidovou složku. Tyto výsledky naznačují, že ritonavir zvyšuje produkci lipidů v játrech a následně i v krvi, neboť zvyšuje jejich syntézu a zpomaluje degradaci bílkovin obsahujících lipidy. Další studie, která upřesní mechanismus, jakým způsobem ritonavir ovlivňuje biosyntetickou dráhu lipidů a degradaci bílkovin, poskytnou podněty, jak snížit vedlejší účinky této látky.

Léčba na míru

Už jen samo získání většího počtu léků s menšími vedlejšími účinky by byl skvělý úspěch molekulárního profilování pomocí genových čipů. Ale mnoho lékařů věří v mnohem lepší výsledky. Mají představu, že díky genovým čipům bude možné rozdělit pacienty se stejnými symptomy do skupin, které by měly užitek z rozdílného přístupu k jejich léčbě. Jak již bylo zmíněno u studií lymfomů na začátku článku, lékaři zabývající se terapií rakoviny nutně potřebují určit pacienty, u kterých je nutno nasadit co nejvíce agresivní léčbu hned od počátku.

Na studiu rakoviny prsu, kterým se zabývala naše skupina z Rosetta společně s vědci z Holandského ústavu pro rakovinu z Amsterdamu, lze demonstrovat, jakým způsobem mohou být genové čipy nápomocny (viz rámeček na straně 39). V tomto případě jsme chtěli vyvinout test, který by pomohl určit, které mladé ženy s raným stádiem rakoviny prsu (bez známek přítomnosti rakoviny v lymfatických uzlinách), potřebují chemoterapii, která by po chirurgickém zákroku zabránila rozší-

ření nádoru - metastázám, a které by mohly být této drastické terapie ušetřeny. Ačkoli okolo 90% mladých žen s rakovinou prsu v rané fázi absolvuje chemoterapii, odhaduje se, že 70–80% z nich by bylo v pořádku i bez ní. Bohužel, standardní testy nemohou vyčlenit ženy s nejvyšším rizikem. Začali jsme vytvářet expresní profily asi sta nádorů žen, které byly léčeny dalších pět let po operaci. Nejdříve jsme pracovali s čipy, které nesly 25 000 lidských genů. Nakonec jsme identifikovali asi 70 genů, které přesvědčivě naznačovaly brzký výskyt metastáz. Opačný obraz exprese naznačoval dobrou prognózu. Je zřejmé, že některé nádory jsou naprogramované metastázovat, aniž dorostou do velikosti koruny, kdežto jiné, často velmi velké, takový program k šíření neobsahují.

Do doby, než se stane expresní profilování rutinním testem při vyšetření rakoviny prsu, musí být naše výsledky potvrzeny někým dalším. Předpokládá se, že během dvou let mnoho lékařských center začne testovat expresní profily jako pomůcku pro terapii nejen rakoviny prsu, ale i dalších typů zhoubných onemocnění. Také jiné nemoci potřebují lepší diagnostické nástroje. Pomocí expresních profilů by mohli být do podskupin vyžadujících specifické ošetření rozdělení také pacienti trpící například astmatem, cukrovkou nebo obezitou. Tyto aplikace se nyní studují.

Dříve, než se plně využije celý výzkumný a terapeutický potenciál genových čipů, bude třeba překonat ještě mnoho překážek. Čipy, skenery a další nutné vybavení je stále velmi drahé, což plodí závist na chudších pracovištích. Je však pravděpodobné, že cena bude postupně klesat.

Ale ani v případech příznivých cen nemusí být tato technika v lékařských ordinacích

a běžných lékařských laboratořích snadno proveditelná. Jen málo pracovníků má potřebné vybavení a schopnosti připravit správně vzorky tkání pro testy pomocí čipů. Dalším problémem v diagnóze, řeckněme jaterních onemocnění, bude nesnadnost získání jaterní tkáně.

Všechny výše popsané problémy se momentálně zdají jen těžko řešitelné, ale věřme, že díky lidskému důvtipu budou v budoucnu překonány. Jednou z cest by mohlo být použití dostupných tkání jako akceptovatelných „dvojníků“ těch, jejichž izolace je jen velmi těžko proveditelná. Navíc se nabízí možnost, že by čipy byly použity pouze pro získání informací nutných pro vývoj testů, které by byly prováděny jinými laboratorními metodami.

Až bude k dispozici více podrobných informací o procesech jak na buněčné úrovni, tak na úrovni celého těla, budou lékaři schopni získávat přesnější diagnózy, které povedou k propracovanějším terapiím (pravděpodobně zahrnujícím i genovou terapii) přizpůsobeným genetickému pozadí pacienta a jeho momentálnímu fyziologickému stavu. Je možné si představit, že někde kolem roku 2020 by mohla zdravotnická zařízení provádět simulace molekulárního stavu svých zákazníků. Tato virtuální simulace by mohla být obnovována na základě dat získaných během pravidelných lékařských prohlídek pomocí čipů a nových vědeckých poznatků. Řada potenciálních zákazníků asi nebude nadšena touto myšlenkou a raději se vzdá možných úlev na sazbách zdravotního pojištění (a s ní pravděpodobně i nejkvalitnější zdravotní péče) pro vyšší pocit soukromí. Avšak ti, kteří se do takového programu zapojí, pravděpodobně budou zdravější a úspěšně odsunou účinky stárnutí. SA

CHCETE-LI VĚDĚT VÍCE:

The Chipping Forecast. Supplement to *Nature Genetics*, Vol. 21, strany 1–60; leden 1999.

Genomics, Gene Expression and DNA Arrays. David Lockhart and Elizabeth Winzeler in *Nature*, Vol. 405, strany 827–836; 15. června 2000.

Experimental Annotation of the Human Genome using Microarray Technology. D. D. Shoemaker et al. in *Nature*, Vol. 409, strany 922–927; 15. února 2001.

Další informace mikrosouborech:

<http://bioinformatics.phrma.org/microarrays.html>

<http://industry.ebi.ac.uk/~alan/MicroArray/>

www.rii.com/publications/default.htm

http://ihome.cuhk.edu.hk/~b400559/2001j_mray.html

www.biologie.ens.fr/en/genetiqu/puces/links.html#news