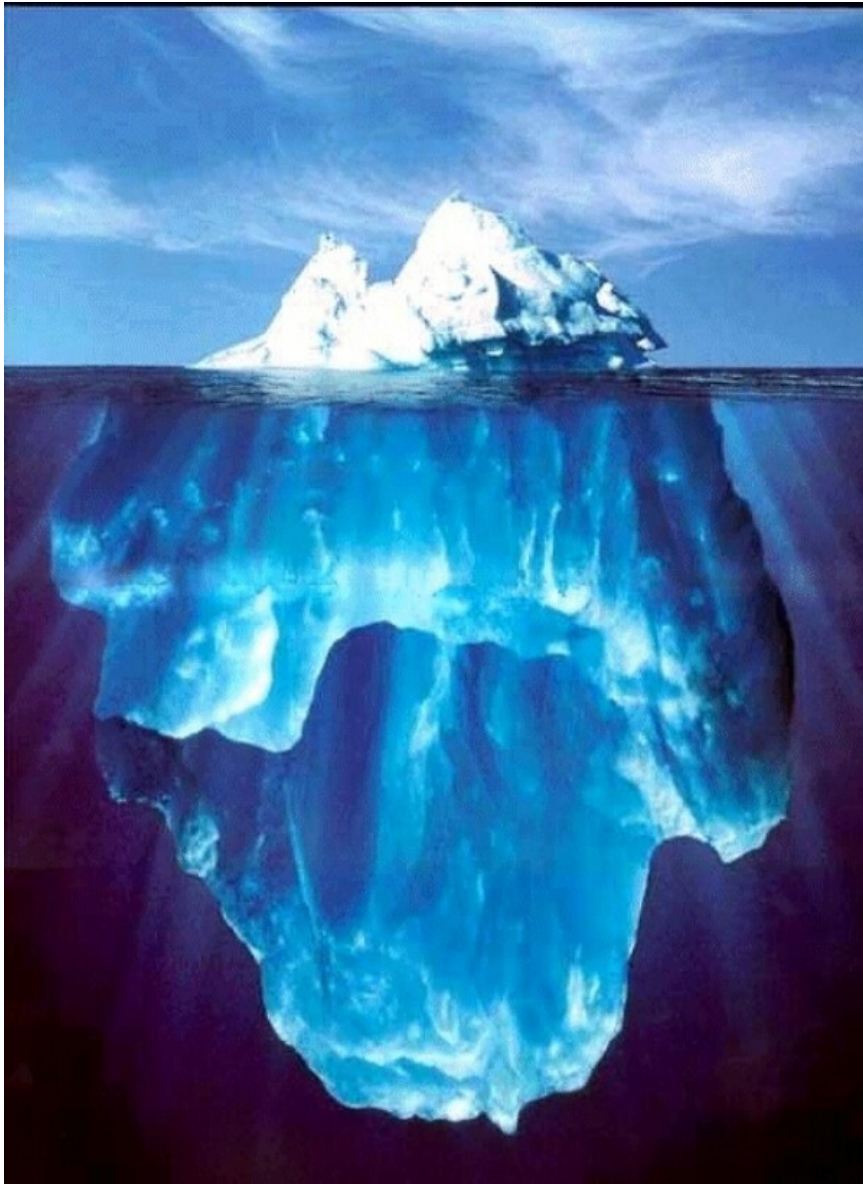


**Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno  
Centrum molekulární biologie a genové terapie  
Molekulární medicína, CEITEC MU**

# Proteinové, buněčné a tkáňové čipy

Jitka Malčíková  
2.12.2011



## Genom (20-25 tis genů)

Transkripce

Posttranskripční modifikace

Alternativní sestřih

## Transkriptom

Translace

Odbourávání mRNA

Posttranslační modifikace

Alternativní konformace

## Proteom (miliony proteinů)

Dynamický systém – odráží momentální stav buňky

Hladina proteinu často nekoreluje s hladinou mRNA

# Proteomika

Proteom - soubor všech proteinů v daném biologickém systému (buňka, tkáň, organizmus)

Klinická proteomika - studuje celkový buněčný proteom v klinických vzorcích

- Cíl - identifikovat a charakterizovat proteiny zapojené do vzniku a vývoje onemocnění

# Proteomické metody

- Dvourozměrná gelová elektroforéza (2-DE)

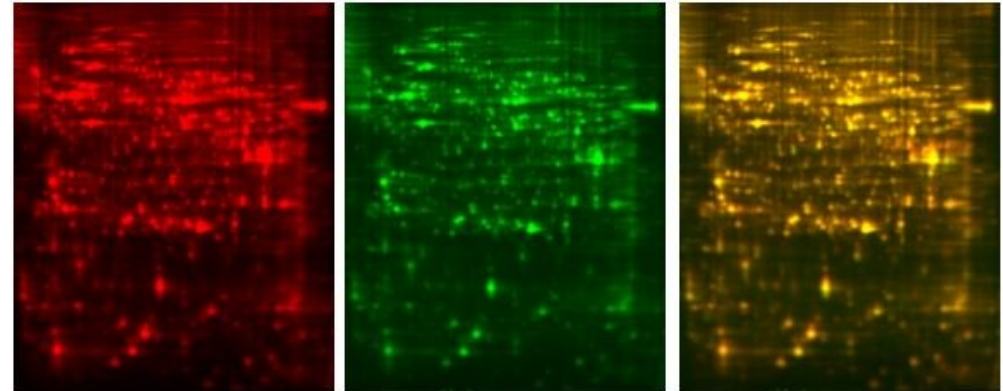
- Časově, finančně náročné
- Dvoubarevné značení – DIGE

- 2D Kapilární elektroforéza

- Hmotnostní spektrometrie

- Proteinové čipy

- Vysokokapacitní
- Poměrně jednoduché zpracování
- Expresní i funkční studie
- Vyžadováno minimální množství vzorku



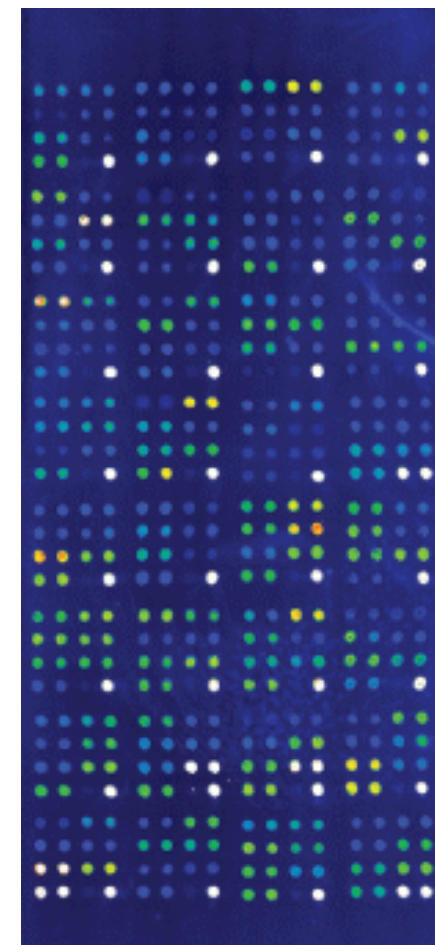
# Proteinové čipy

## ■ Expresní

- stanovení přítomnosti a koncentrace proteinů v komplexních vzorcích
  - Protilátkové čipy
  - Lyzátové čipy
  - Antigen čipy

## ■ Funkční

- studium interakce proteinů s jinými molekulami
  - proteiny, peptidy, nízkomolekulární látky, oligosacharidy, DNA



# Princip proteinových čipů



- Vazba protilátka-antigen - mikrosopot ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
  - Systém využívající malé množství vázané protilátky a malého objemu vzorku je citlivější než systém se stonásobně větším objemem materiálu
  - Citlivost řádově ve femtomolech -  $10^6$  molekul/ml
    - Množství navázané molekuly je sice velmi nízké, ale v rámci mikrosopotu lze dosáhnout vysoké hustoty
  - Stanovení koncentrace analytu ve vzorku
    - Koncentraci přímo odpovídá množství vázaného analytu

*(Ekins RP, J Pharm Biomed Anal. 1989)*

# Princip proteinových čipů

- Stovky – tisíce proteinů imobilizovaných ve formě mikrospotů na pevném povrchu
  - membrány (polystyrenové, PVDF - polyvinyliden fluorid, nitrocelulosové)
  - standardní mikroskopická sklíčka
    - s chemicky modifikovaným povrchem (poly-lysin, aldehydické skupiny)
    - potažená membránou
- Detekční metody
  - Nejčastěji fluorescence
  - Enzymaticky – značení alkalickou fosfatázou, křenovou peroxidázou
  - Chemiluminiscence
  - Radioaktivita
  - Zvýšení signálu – značení biotinem – vazba na značený streptavidin
  - Hmotnostní spektrometrie

# Čipy pro stanovení antigenů

## Protilátkové čipy

- Přímý formát (FPA- forward phase arrays)
- Na povrchu spotované protilátky (velikost spotu 0,3-0,5 mm)
- Inkubace se vzorkem



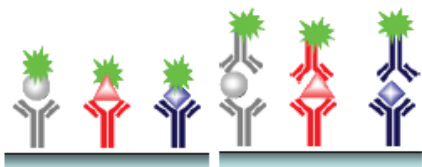
Přímé značení



Sendvičová metoda



Možnost  
dvoubarevné  
detekce



Vyšší citlivost  
a specifita

Xiaobo et al. 2010

- Detekce stovek antigenů ve vzorku
- Expresní profilování – „large-scale“ monitorování proteinové exprese
- Cílené na určité buněčné procesy (buněčný cyklus, cytokiny, MAPK dráha, p53 dráha...)

## Lyzátové čipy

- Zpětný formát (RPA – reverse phase arrays)
- Na povrchu spotované vzorky (proteinové, tkáňové lyzáty, sérum)
- Inkubace se specifickými značenými protilátkami



Xiaobo et al. 2010

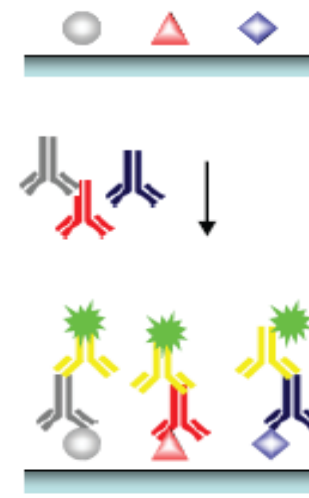
- Srovnání exprese až desítek antigenů u stovek různých vzorků
  - Nevýhoda – malá hustota studovaných molekul ve spotu
- pre-fractionace pomocí 2D kapalinové chromatografie



# Čipy pro stanovení protilátek

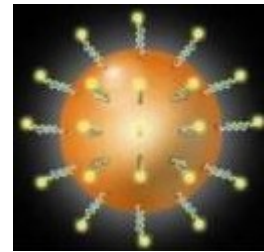
## Antigen čipy

- Na povrchu spotované známé antigeny
  - syntetické proteiny, peptidy
- Inkubace se sérem obsahujícím studované protilátky
- Detekce přítomnosti protilátek ve vzorku, nejčastěji v séru

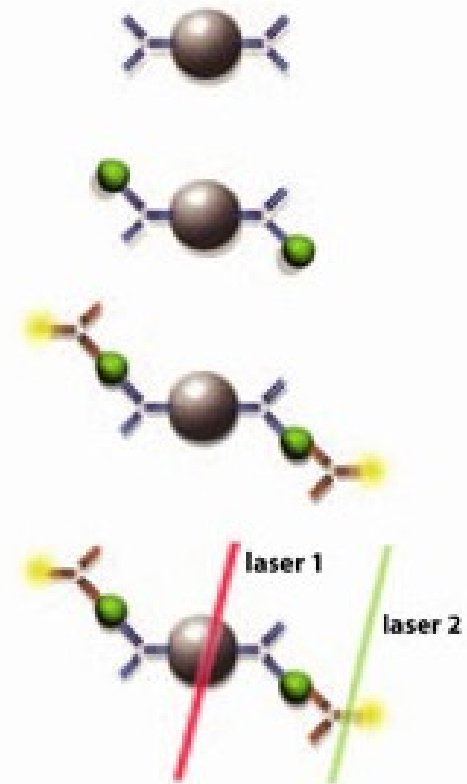


Xiaobo et al. 2010

# Bead array - mikrosféry



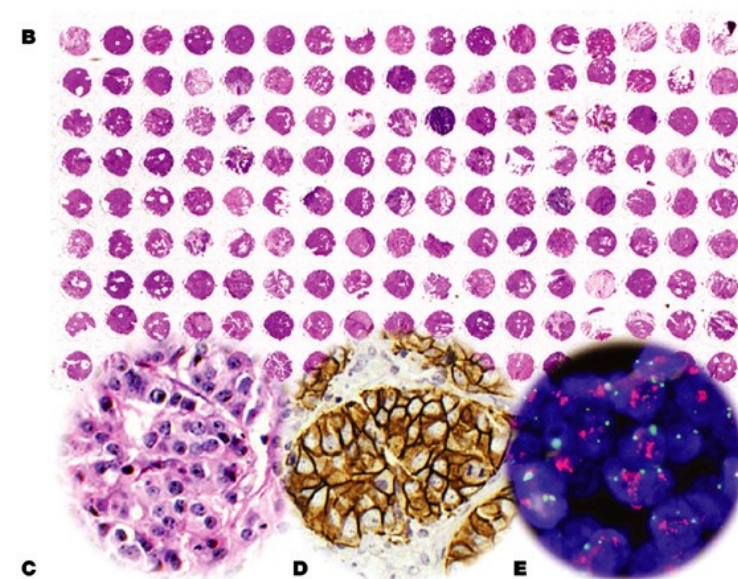
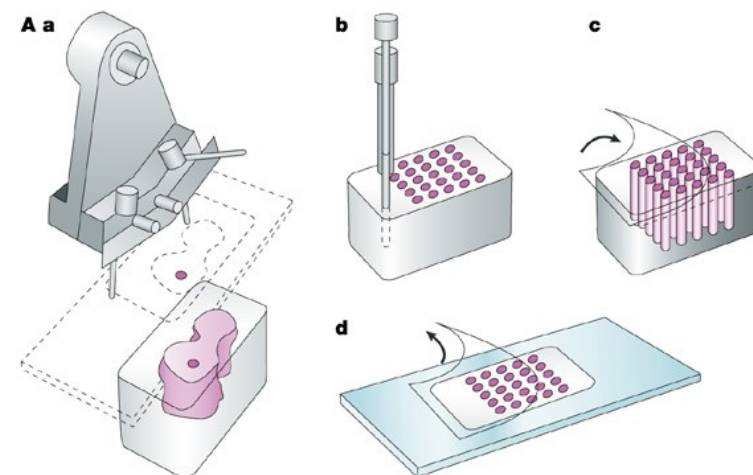
- průměr ~ 10  $\mu\text{m}$  (velikost lymfocytu)
- polystyrenové nebo latexové kuličky
- „kódovány“ rozdílnými barvami nebo velikostmi
- Detekce - např. flow cytometricky
  - rozpoznávání rozdílně kódovaných mikrosfér
  - identifikace a kvantifikace proteinů ve vzorku
- Množství stanovovaných proteinů je limitováno počtem druhů mikrosfér (~100)
- Možnost automatizace
- Využití – cílené – zejména detekce cytokinů, ale např. i detekce fúzních proteinů a onkoproteinů



[www.lucerna.chem.ch](http://www.lucerna.chem.ch)

# Tkáňové čipy

- Varianta RPA čipů (zpětný formát)
- Spotují se celé vzorky tkání např. bioptických
- Inkubace se značenými protilátkami
- Velikost spotu 0,6 - 2mm



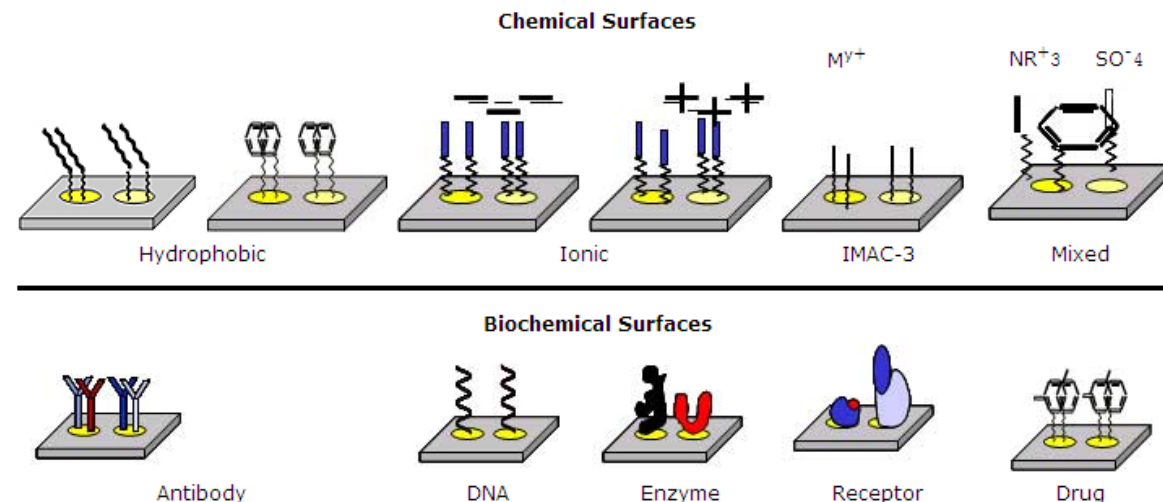
Nature Reviews | Drug Discovery

# Buněčné čipy

- **Přímý formát**
  - Spotované protilátky
  - Inkubace s buněčnou suspenzí
  - Např. spotované CD molekuly – inkubace s leukocyty – charakterizace leukemických buněk
- „Transfekční čipy“ - buňky rostou na povrchu čipu s naspotovanou cDNA
  - Během růstu přijmou cDNA
  - Čip se spoty buněk exprimujících různé cizorodé proteiny
- **Detekce**
  - Přímou mikroskopicky na sklíčku
  - Další charakterizace značenými protilátkami

# SELDI

- Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation
- Inkubace lyzátů na makrospotech adsorpčního povrchu s různou povrchovou úpravou
- Nespecifická vazba proteinů
- Detekce hmotnostní spektrometrií
- Nižší citlivost
- Umožňuje vyhledávání neznámých biomarkerů

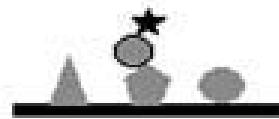


# Funkční čipy

- Studium interakce s jinými molekulami
  - Inkubace s jinými proteiny, DNA, malými molekulami (oligosacharidy, terapeutika, ...)
- Studium posttranslačních modifikací
- Studium enzymatické aktivity
- Studium kofaktorů a inhibitorů
- Studium interakcí ligand-receptor



protein - DNA



protein - protein



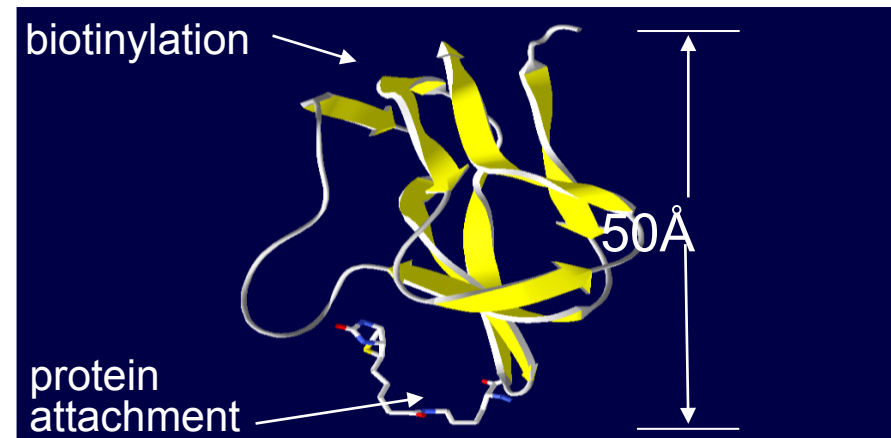
enzym - substrát

# Spotovány nativní proteiny

- Potřeba zachování struktury a biologické aktivity
  - Problém imobilizace, zachování konformace a orientace na čipu i během skladování
  - 1. funkční čipy – mikrojamy v silikonovém elastomeru na povrchu mikroskopického sklíčka  
(Zhu et al., Nat Genet 2000)
- Nespecifická vazba přímo na povrch
  - Adsorpce
  - Kovalentní vazba přirozených chemických skupin proteinu na upravený povrch
  - Aktivní část proteinu může být schovaná, problém zachování konformace
- Chemoselektivní vazba – připojení chemické skupiny na definovanou pozici proteinu → specifická reakce s komplementární chemickou skupinou na povrchu sklíčka
  - Orientovaná pozice na sklíčku
- Imobilizace přes specifický rekombinantní tag

# Imobilizace přes rekombinantní tag

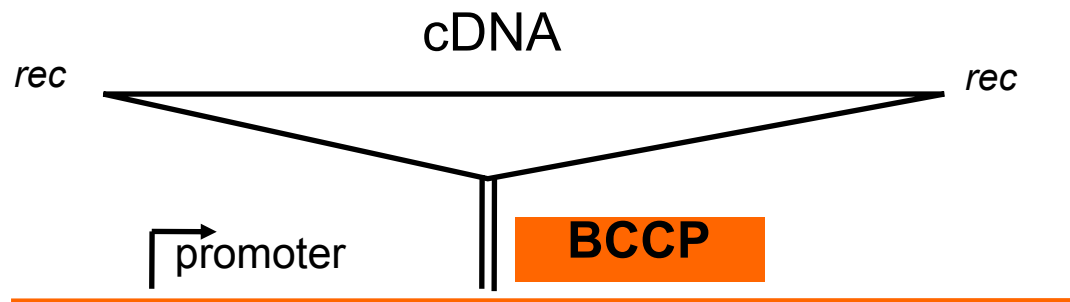
- Během syntézy studovaného proteinu se na C nebo N konec přidá afinitní tag, který specificky interaguje s povrchem čipu
- Zachování orientace, konformace
- Funguje jako „spacer“ – oddálení proteinu od povrchu - odkrytí reaktivních míst a umožnění interakcí
  - Poly(aminokyseliny) – poly(His), poly(Cys), poly(Lys)
  - Glutathion-S transferáza (GSH)
  - MBP (maltózu vázající protein)
  - Biotinylovaný tag
  - ...





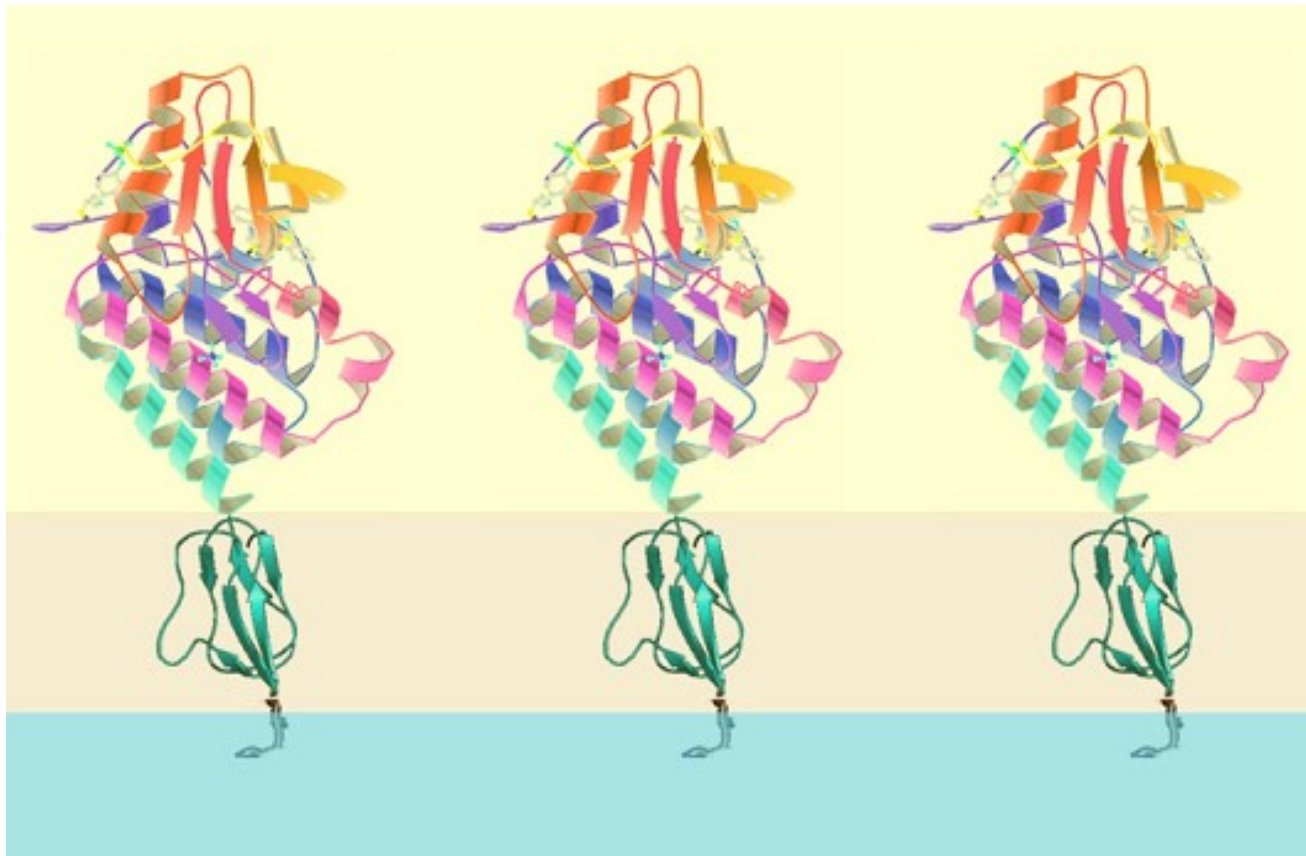
# Využití interakce biotin - streptavidin

- Rekombinantní proteiny exprimované v *E. Coli*
- Proteiny jsou vázané na sklíčko přes afinitní „tag“
  - Biotinylated Carboxyl Carrier Protein (BCCP tag)
  - BCCP tag je správně složen pouze pokud je protein správně složen
  - Pouze správně složený BCCP tag je biotinylován
  - Pouze biotinylovaný protein se váže na streptavidinem pokryté sklíčko



*Boutell et al., Proteomics. 2004*

# Využití interakce biotin - streptavidin



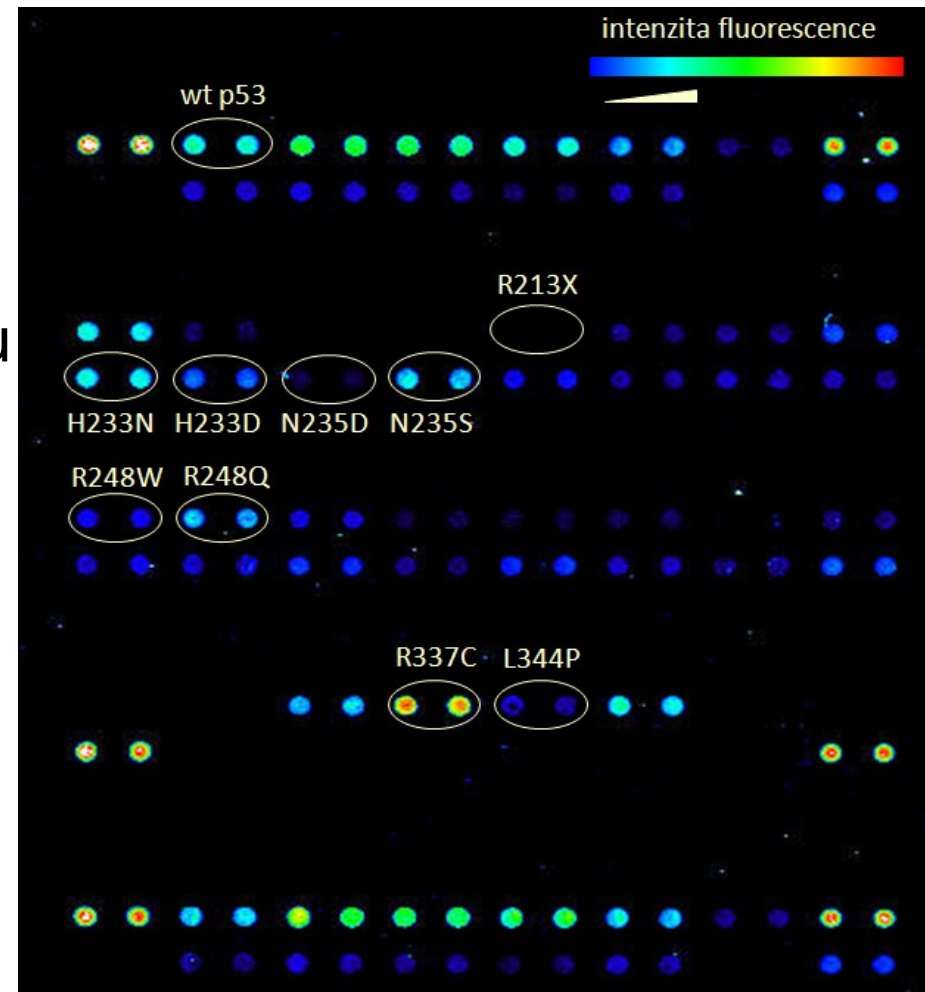
← správně složený protein

← biotinylovaný BCCP tag

← streptavidinem pokryté  
mikroskopické sklíčko

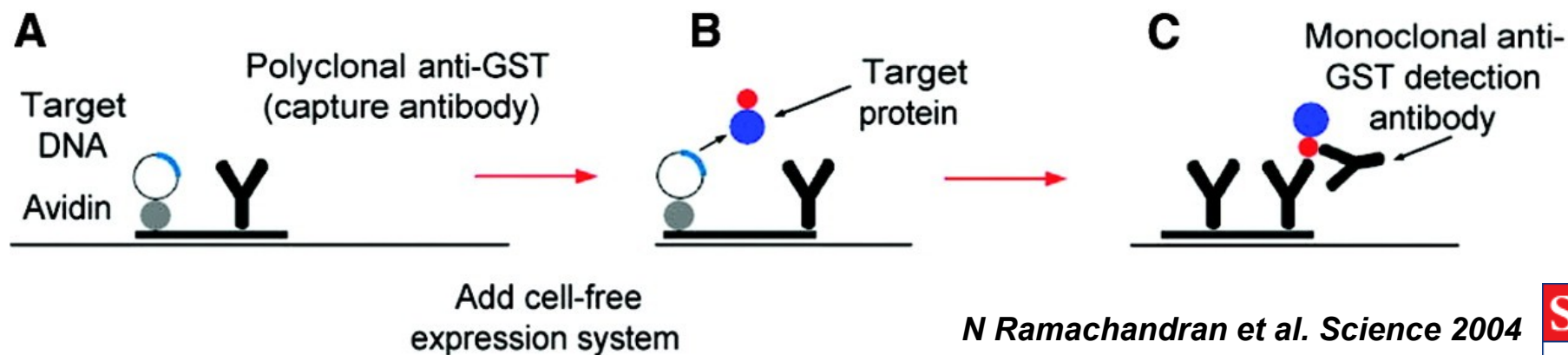
# Analýza DNA-vazebných schopností p53 mutantů

- P53 array – 50 variant p53
  - wt
  - 48 mutací – 43 missense, 5 nonsense
  - polymorphismus R72P
- Studium efektu mutací a polymorfismů
  - na interakci s jinými proteiny
  - na konformaci – konformačně-specifická protilátka
  - na vazbu k DNA - vazba proteinů navázaných na čipu k fluorescenčně značeným oligonukleotidům obsahujícím responzivní elementy p53 cílových genů



# *In situ* syntetizované čipy

- „Samoskládací“ (Self-assembling)
- cDNA naspotovaná na sklíčku
  - *in vitro* translace
  - *in situ* imobilizace



# Další typy funkčních čipů

- Doménové čipy
  - Spotovány pouze jednotlivé domény proteinu
  - Pochopení protein-proteinových interakcí
- Peptidové čipy
  - Inkubace s proteiny, DNA, malými molekulami (oligosacharidy, terapeutika, ...)
- Čipy s chemickými knihovnami
  - Inkubace s proteiny (enzymy, receptory...)
  - Studium inhibitorů, studium ligand-receptorových interakcí-  
vyhledávání terapeutik

Typ čipu		Molekuly imobilizované na čipu	Stanovované molekuly	Inkubace	Počet spotů	Použití
expresní	protilátkové (přímý formát)	známé protilátky	antigeny	neznámý vzorek - proteinový lyzát	> 1000	proteinové profilování
	lyzátové (zpětný formát)	neznámý vzorek - proteinový lyzát	antigeny	známé protilátky	>1000	proteinové profilování
	antigen čipy	známé antigeny	protilátky	neznámý vzorek – protilátky v séru	>1000	stanovení přítomnosti protilátek v séru
funkční	protein-protein	známé proteiny v nativním, funkčním stavu nebo peptidy,		partnerské molekuly interagující s proteiny	>100	studium interakcí proteinů s partnerskými molekulami
	protein-DNA, RNA					
	protein-nízkomolekulární látky	nebo		nebo		
	Enzym-substrát	chemické látky		proteiny		



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Využití

- Studium biomarkerů – diagnostické, prognostické, prediktivní
- Identifikace terapeutických cílů
- Studium vlivu terapie
- Detekce autoprotilátek, studium imunitní odpovědi
  
- *In vitro* diagnostika – více než u ostatních typů čipů
  - Nejčastěji diagnostika autoimunitních onemocnění
  - Diagnostika infekčních onemocnění