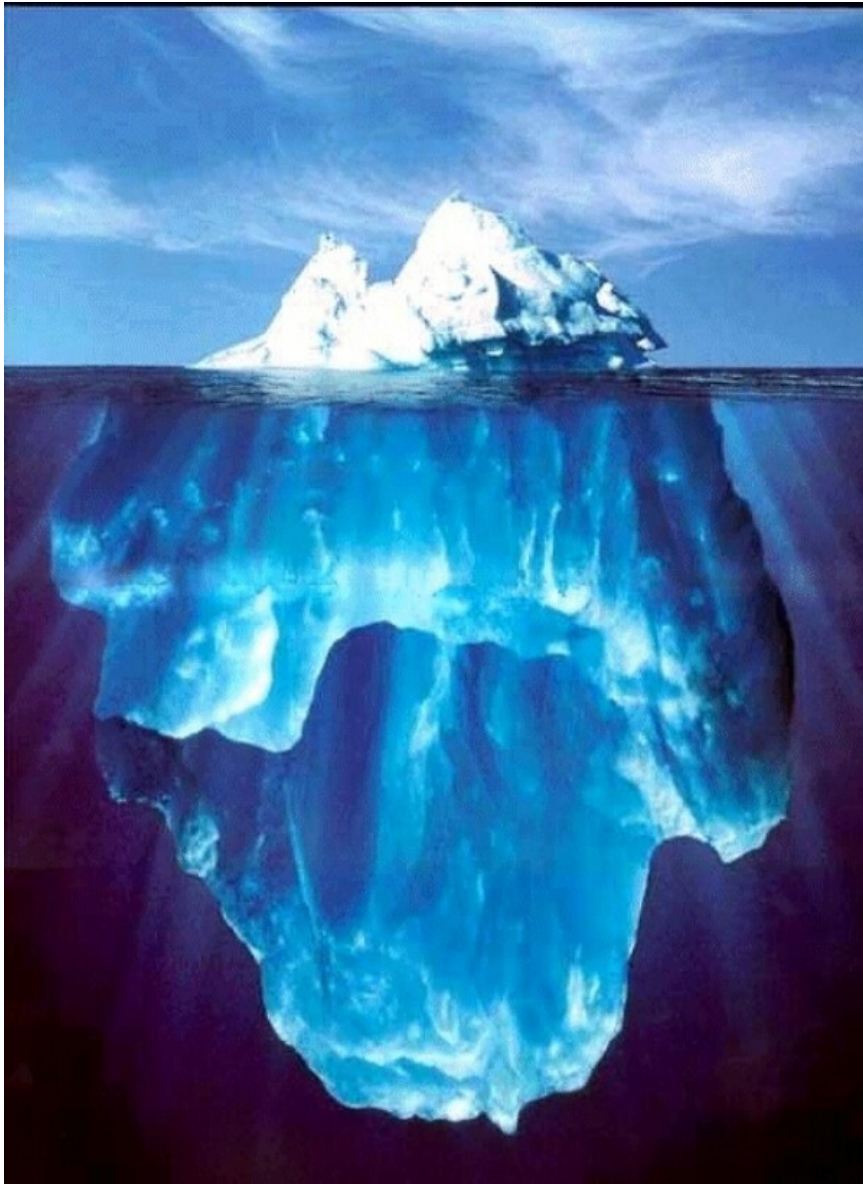


**Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno
Centrum molekulární biologie a genové terapie
Molekulární medicína, CEITEC MU**

Proteinové, buněčné a tkáňové čipy

Jitka Malčíková
28.11.2014



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

Rozsah exprese - 10^6

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Proteomické metody

- Dvourozměrná gelová elektroforéza (2-DE)
 - Časově, finančně náročné
 - Těžko reprodukovatelné
- 2D Kapilární elektroforéza
- Hmotnostní spektrometrie
- ELISA – zejména v diagnostice
- Proteinové čipy
 - Vysokokapacitní
 - Poměrně jednoduché zpracování
 - Expresní i funkční studie
 - Vyžadováno minimální množství vzorku

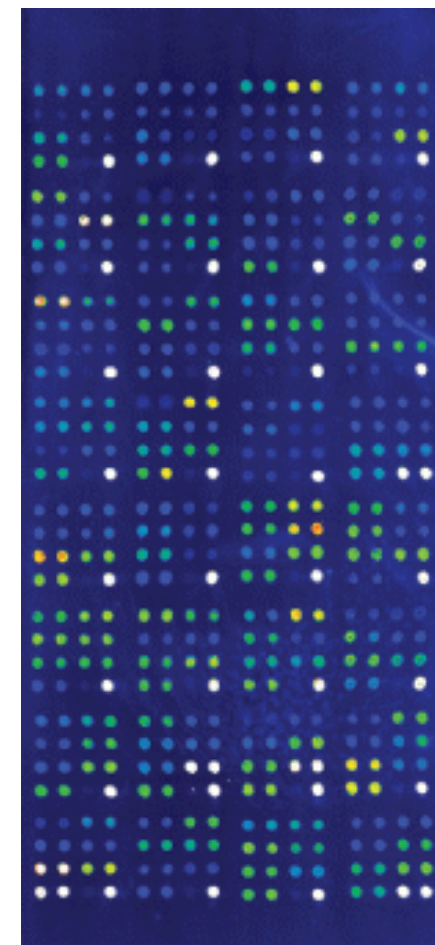


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Proteinové čipy

- Expresní („analytické“ čipy)
 - 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 - mikrospot ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
 - Miniaturizace immunoassays - malé množství vázané protilátky a malý objemu vzorku
 - Citlivější než systém se stonásobně větším objemem materiálu (vyšší poměr signal – to-noise)
 - Rychlejší provedení – kratší difuzní vzdálenost
 - Možnost multiplexování
 - Malá spotřeba materiálu
 - Citlivost řádově ve femtomolech - 10^6 molekul/ml
 - Množství navázané molekuly je sice velmi nízké, ale v rámci mikrospotu 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
- Planární povrchy
 - membrány (polystyrenové, PVDF - polyvinyliden fluorid, nitrocelulosové)
 - standardní mikroskopická sklíčka
 - s chemicky modifikovaným povrchem (poly-lysin, aldehydické skupiny)
 - potažená membránou
 - mikrospoty 100–250 nm
 - „printing“ spotů je zásadní a ovlivňuje variabilitu a reprodukcibilitu
 - Kontaktní – využívá kapilární síly
 - Piezoelektricky – využívá elektrický pulz k uvolnění kapky
 - Pomalejší ale menší variabilita
 - Variabilitu snižuje přítomnost replikátů

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



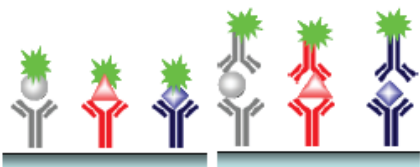
Přímé značení



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



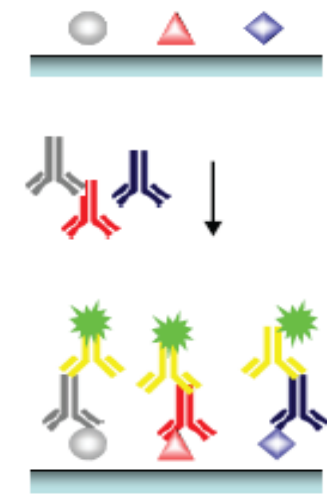
Xiaobo et al. 2010

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

Čipy pro stanovení protilátek

Antigen čipy

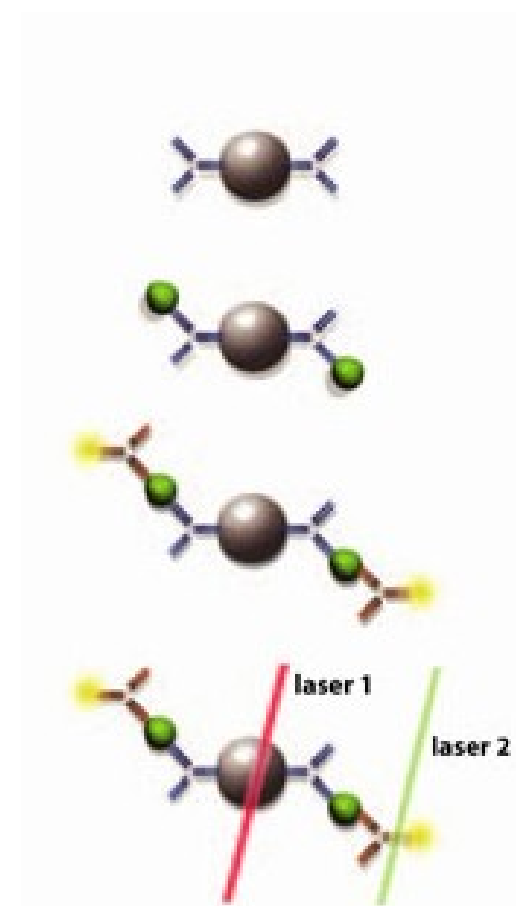
- Na povrchu spotované známé antigeny
 - syntetické proteiny, peptidy
- Inkubace se sérem obsahujícím studované protilátky
- Detekce přítomnosti protilátek ve vzorku, nejčastěji v séru



Xiaobo et al. 2010

Bead array - mikrosféry

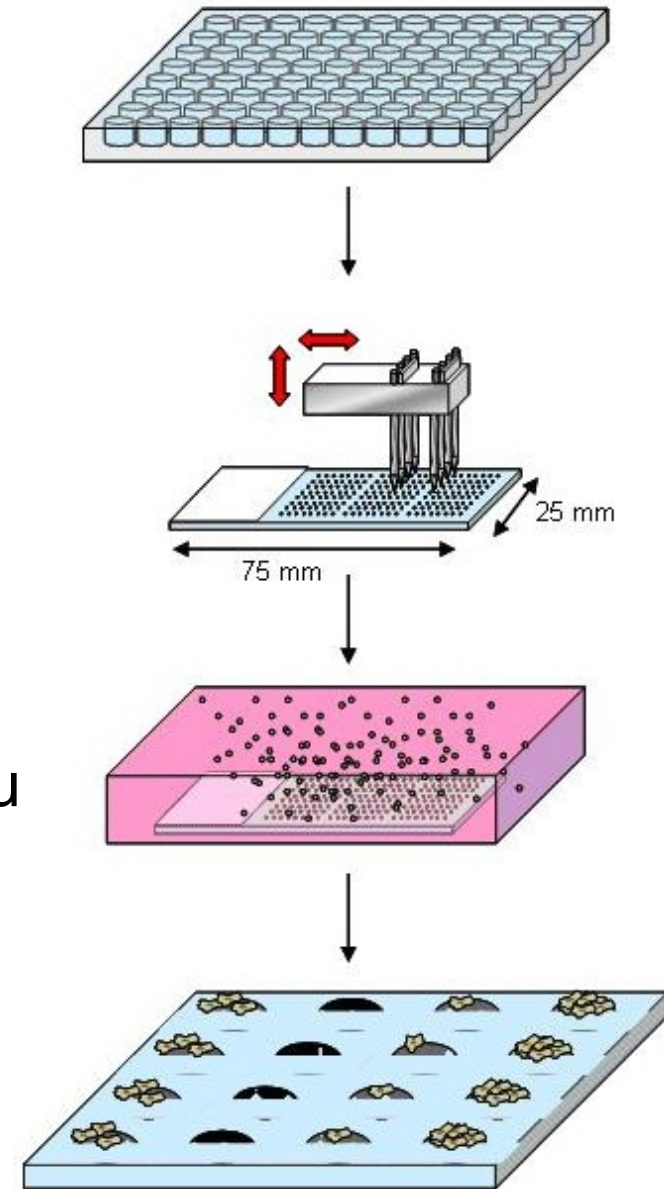
- průměr ~ 5-10 μm (velikost lymfocytu)
- polystyrenové nebo latexové kuličky
- „kódovány“ rozdílnými barvami nebo velikostmi
- Detekce – na principu flow cytometrie
 - rozpoznávání rozdílně kódovaných mikrosfér
 - identifikace a kvantifikace proteinů ve vzorku
- Množství stanovovaných proteinů je limitováno počtem druhů mikrosfér (~1000)
 - Značení Quantum dots - teoreticky až 40 000
- Možnost automatizace
- Využití – cílené – zejména detekce cytokinů, protilátek (alergie, autoimunita), ale např. i detekce fúzních proteinů a onkoproteinů
- Luminex xMAP™ - otevřený systém



www.lucerna.chem.ch

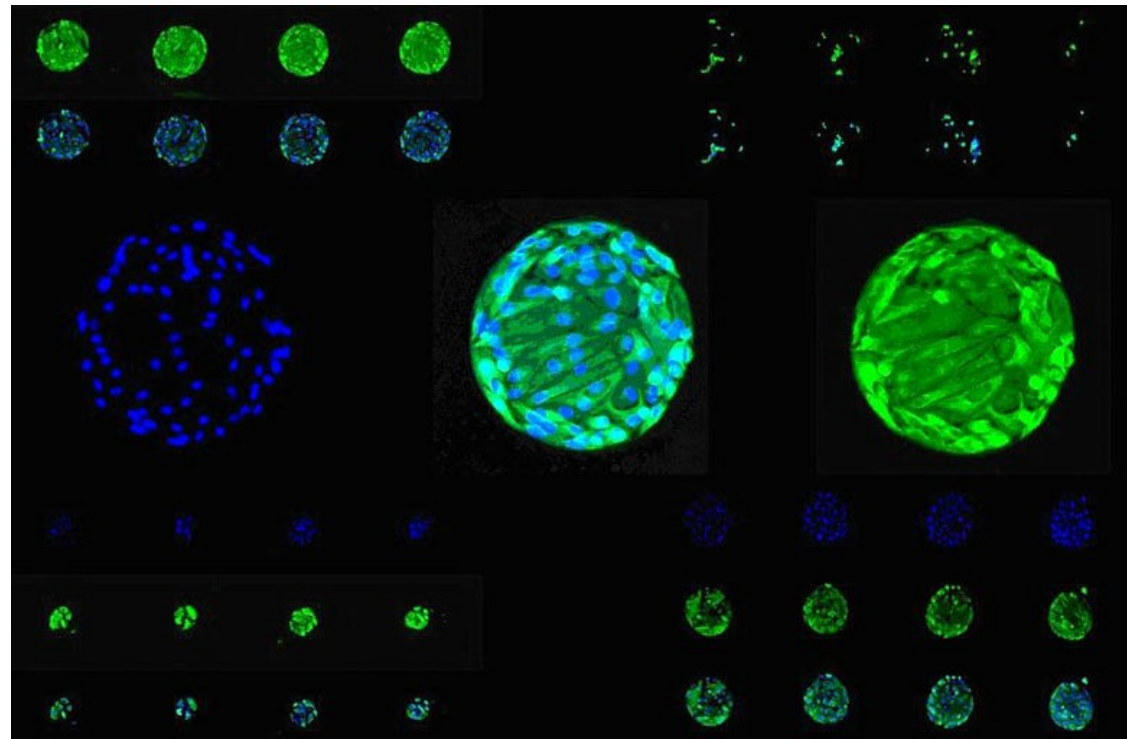
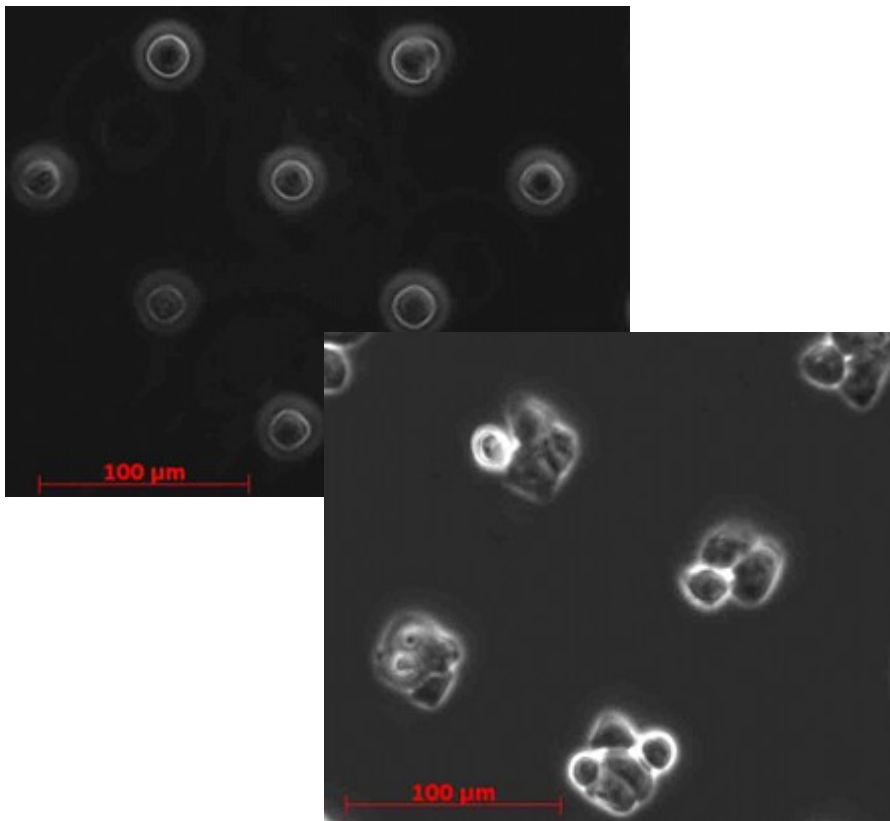
Buněčné čipy

- **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



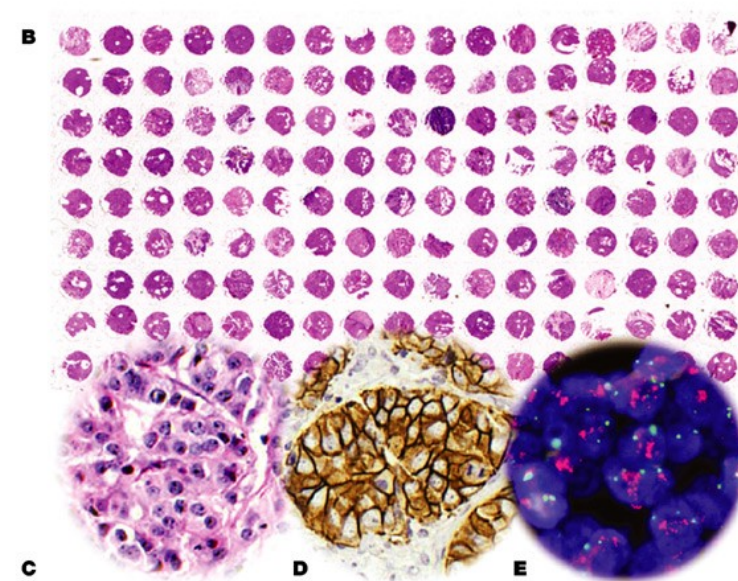
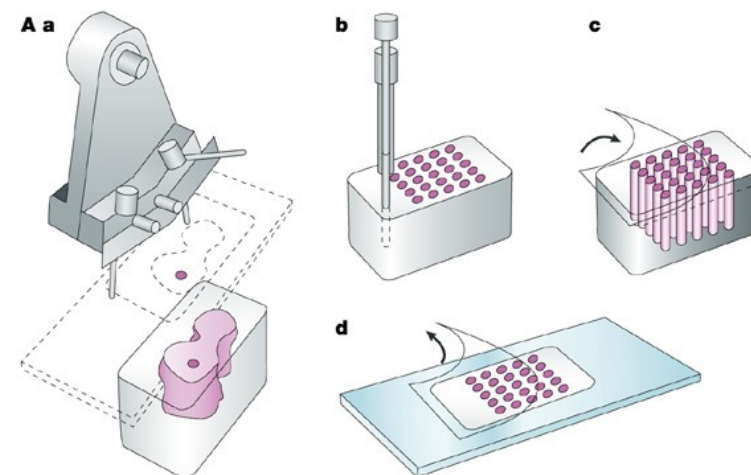
Buněčné čipy

- Detekce
 - Přímou mikroskopicky na sklíčku
 - Další charakterizace značenými protilátkami



Tkáňové čipy

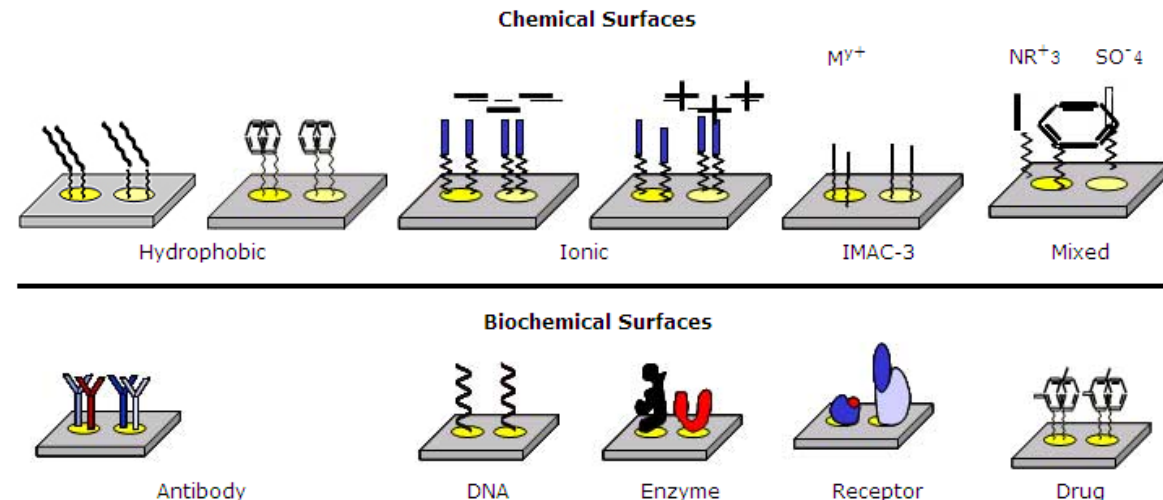
- Varianta RPA čipů (zpětný formát)
- Spotují se celé vzorky tkání např. bioptických
- Inkubace se značenými protilátkami
- Velikost spotu 0,6 - 2mm



Nature Reviews | Drug Discovery

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

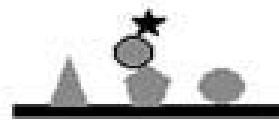


Funkční čipy

- 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



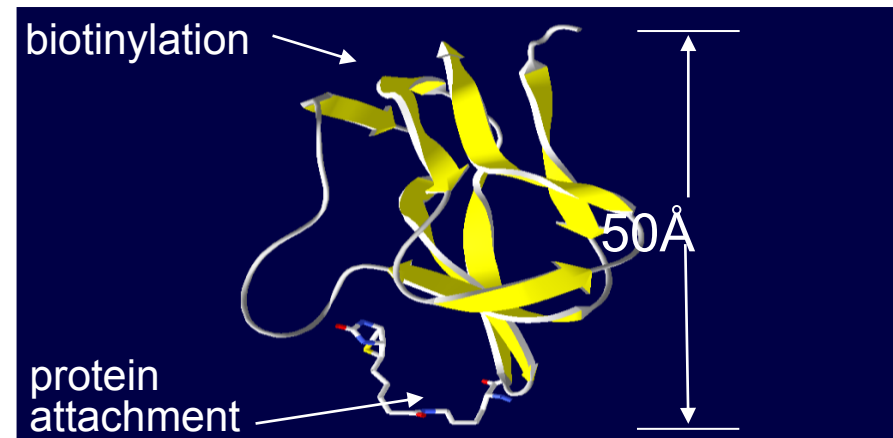
enzym - substrát

Spotovány nativní proteiny

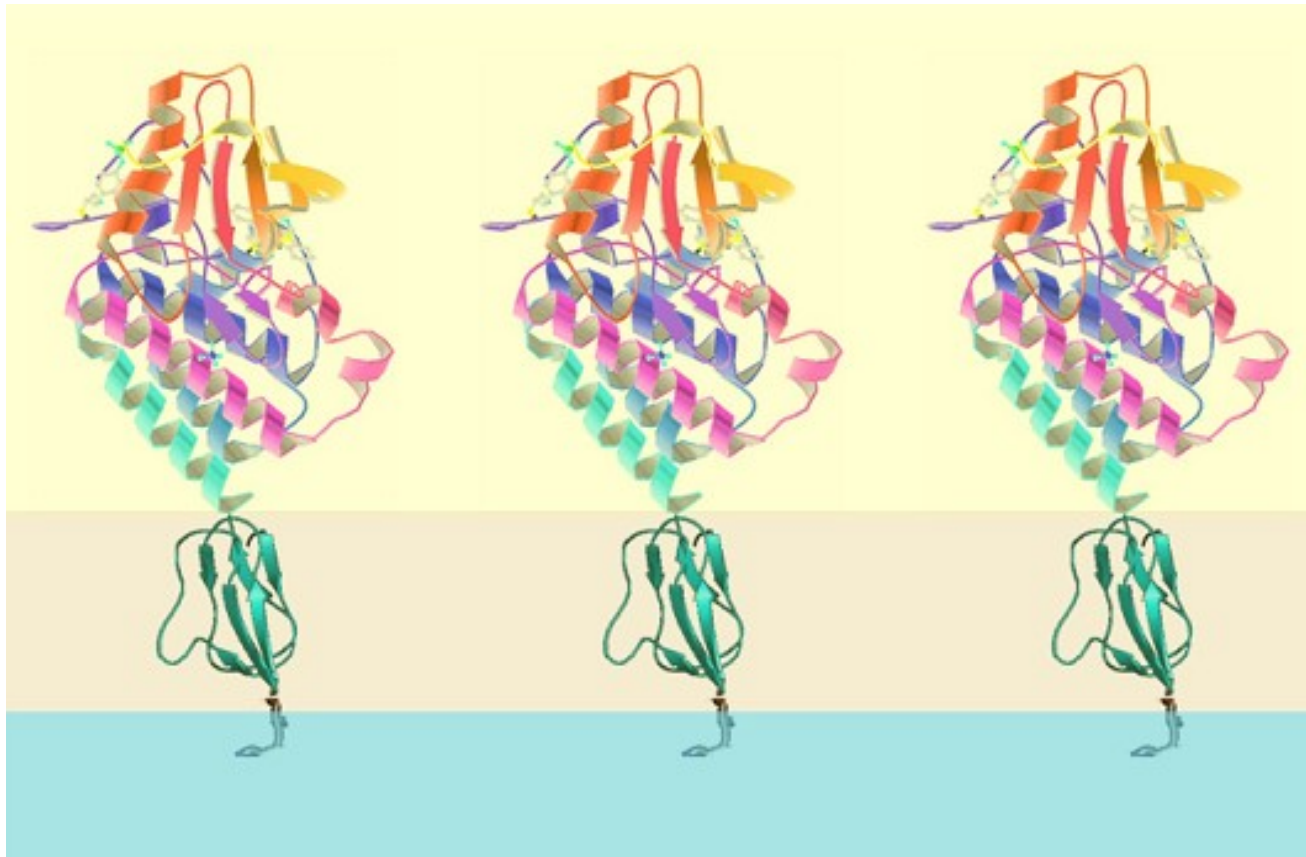
- Potřeba zachování struktury a biologické aktivity
 - Problém imobilizace, zachování konformace a orientace na čipu i během skladování
 - 1. funkční čipy – mikrojamy v silikonovém elastomeru na povrchu mikroskopického sklíčka
(Zhu et al., Nat Genet 2000)
- Nespecifická vazba přímo na povrch
 - Adsorpce
 - 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



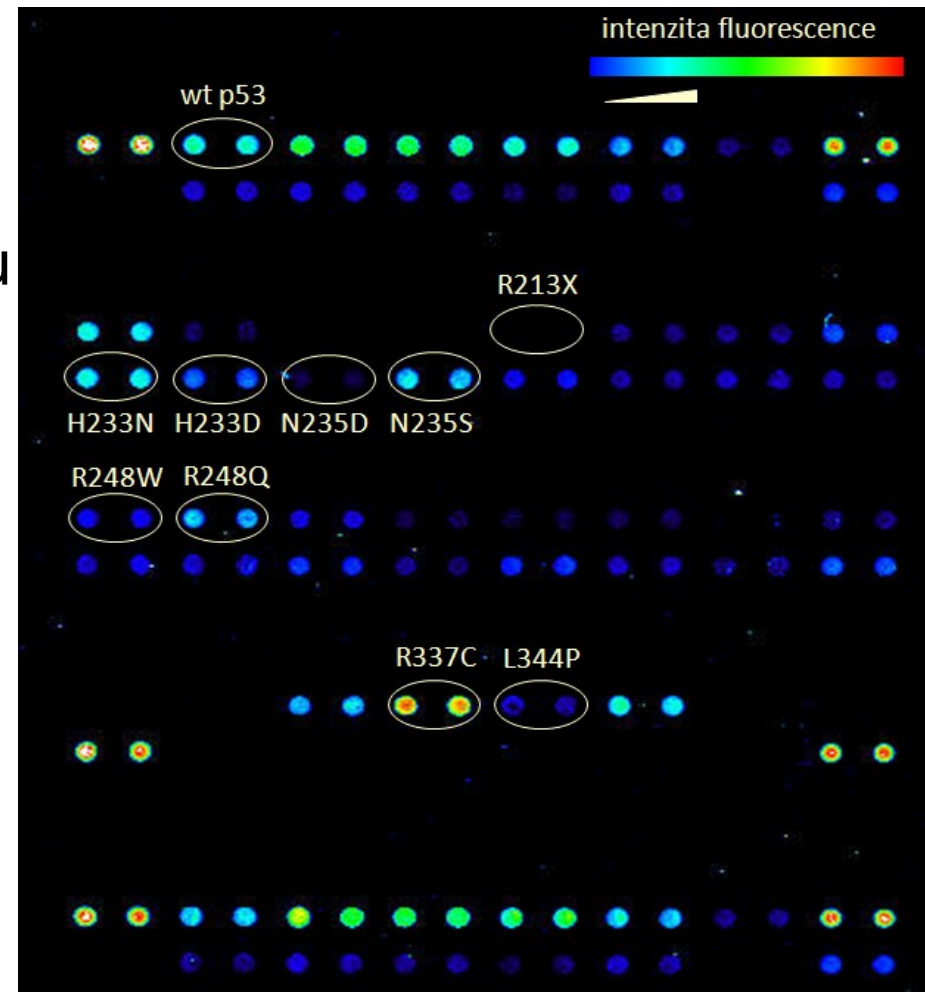
← správně složený protein

← Biotinylovaný tag

← streptavidinem pokryté
mikroskopické sklíčko

Analýza DNA-vazebných schopností p53 mutantů

- P53 array – 50 variant p53
 - wt
 - 48 mutací – 43 missense, 5 nonsense
- 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



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 | | |

Využití

- Studium biomarkerů – diagnostické, prognostické, prediktivní
- Identifikace terapeutických cílů
- Studium vlivu terapie
- Detekce autoprotilátek a autoantigenů, studium imunitní odpovědi, analýza alergenů

Využití

- *In vitro* diagnostika – více než u ostatních typů čipů
 - Nejčastěji diagnostika autoimunitních onemocnění, alergií
 - Diagnostika infekčních onemocnění
 - Profilování biomarkerů
 - Sepse a záněty
 - Neurodegenerativní onemocnění
 - Nádorová onemocnění

| Company | Application | Product |
|------------|---|---|
| Arrayit | Infection | Pathogen antigen microarrays |
| Aushon | Multiplex cytokine profiling | Ciraplex |
| R&D system | Acute phase protein profiling | Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit |
| Randox | Adhesion molecule detection Cardiac risk prediction Nervous system disfaunction Multiplex cytokine profiling Endocrinology testing Fertility hormones evaluation Metabolic syndrome and associated disorders Cancer screening and monitoring Tyiroid function testing | Adhesion Molecule Array Cardiac Array Cerebral Array Cytokine Array Endocrine Array Fertility Array Metabolic Array Tumor marker Arrays Thyroid Array |
| RayBiotech | Obesity array Angiogenesis Periodontal disease Ophtalmic array Inflammation | Quantibody® Quantibody® Quantibody® Quantibody® Quantibody® |
| Quansys | Inflammation/acute phase protein profiling Fertility hormones evaluation | Human chemokine/ cytokine Human female hormone |
| Phadia | Allergy | ImmunoCAP® ISAC |

Cretich et al., 2014



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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