

Proteinové čipy v moderní klinické biochemii

Vacek J.

Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, Brno

SOUHRN

Objevy a vývoj nových technologií umožňují studovat nové vlastnosti genomu, transkriptomu a proteomu v průběhu procesu diagnózy, progresu a léčby. Proteinové čipy (biočipy) mohou být využity pro kvalitativní analýzu a studium interakcí proteinů (enzym-substrát, protilátka-antigen, protein-DNA/RNA, receptor-ligand). Své uplatnění nachází také při sledování posttranslačních modifikací (fosforylace, oxidace atd.). Z pohledu klinické biochemie jsou čipy používány pro analýzy prognostických a diagnostických markerů. Ukazuje se, že provoz čipových sad je finančně méně náročný, než je tomu u konvenčních zařízení. Tato práce se zabývá současným vývojem technologie proteinových čipů s ohledem na jejich uplatnění v klinické diagnostice a molekulární medicíně.

Klíčová slova: proteiny, proteom, patologické procesy, biomarkery, biočipy, biosenzory.

SUMMARY

Vacek J.: Protein arrays in modern clinical biochemistry

The emergence of novel technologies allows researchers to facilitate the comprehensive analyses of genomes, transcriptomes, and proteomes in disease diagnostics, progression and treatment. Protein arrays (biochips) have been used for the protein identification and for study of different protein interactions (enzyme-substrate, antibody-antigen, protein-DNA/RNA, receptor-ligand) and/or study of protein post-translation modifications (phosphorylation, oxidation, etc.). Array-based technology has been used to identify protein-markers that might be important for diagnostics and therapy. These techniques are smaller than conventional testing systems and highly economical in the use of specimens and reagents. This article summarizes fundamentals and recent developments in protein arrays technology and its potential use in clinical diagnostics and molecular medicine.

Key words: proteins, proteome, pathological processes, biomarkers, biochips, biosensors.

Úvod

Proteiny představují řídicí a regulační aparát buňky. Jedná se o komplikovaný systém složený z velkého množství strukturních a regulačních individuí, které jsou ve vzájemné interakci mezi sebou a velkým počtem intracelulárních i extracelulárních signálů. Tyto v čase probíhající biomolekulární interakce jsou podstatou buněčné signalizace, díky které je spouštěna a řízena většina anabolických a katabolických reakcí v buňce. Proteom člověka je složen z několika tisíc proteinů plnících rozmanité funkce (obr. 1). Některé z nich se vyskytují ve všech buňkách těla, avšak mnoho proteinů plní své funkce pouze ve specifických tkáních (tkáňová specifita). Kromě toho ne všechny proteiny jsou zastoupeny v celé buňce, ale naopak jsou lokalizovány v typických buněčných kompartmentech. Navíc se obsah proteinů buňky v čase mění v závislosti na vývojové fázi organismu a vlivu prostředí. Na rozdíl od neměnné genetické konstituce organismu je proteom typický svou proměnlivostí a heterogenitou. Vzhledem k významným funkcím, které proteiny v organismu zastávají, vede ve většině případů nefunkční protein k patologickému procesu. Příčinou vzniku patologických proteinů může být mnoho. Pokud se nejedná o mutace v genu, který protein kóduje, je obvykle příčina patologické reakce v chybné kotranslační nebo posttranslační úpravě polypeptidu. Zájem lékařů o proteiny je spojen s jejich významem v procesu kancerogeneze, ve spojitosti s neurodegenerativními procesy, funkčností imunitního systému, onemocněním srdce nebo vývojem nových léčiv [1]. Proteiny, přítomné v krvi nebo jiných tělních

tekutinách, reflektují fyziologický stav organismu a je možné je využít jako markery (biomarkery), které lze efektivně využívat k diagnostice či monitorování průběhu nemoci nebo léčby pacientů [2–5].

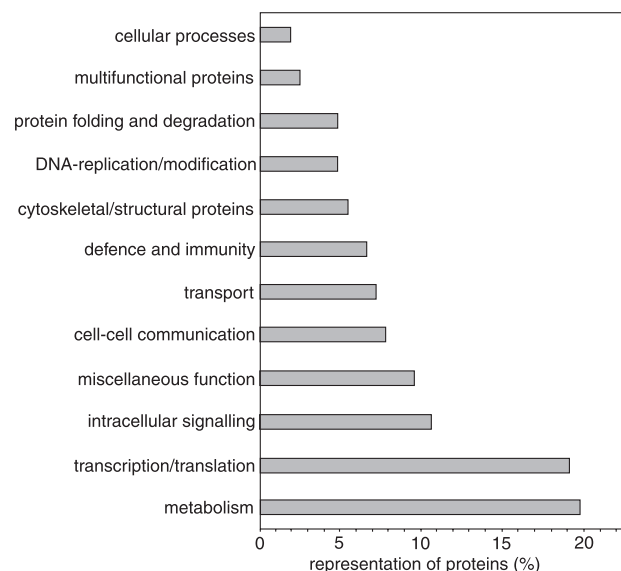


Fig. 1. Composition of human proteom

This analysis includes ca. 17 000 proteins (= 100 %). The protein categories were derived from classification Gene Ontology project. Data source [35].

Zájem vědců o proteiny v posledních letech výrazně vzrostl a poznatky základního výzkumu jsou postupně aplikovány v experimentální i praktické medicíně. Tento výrazný krok kupředu byl podmíněn objevy no-

vých analytických nástrojů, které umožnily studium proteomu. Mezi podstatné objevy, které přispěly k objasnění biologických funkcí proteinů, patří rentgenová strukturní analýza a nukleární magnetická rezonance. Zahájení mapování proteomů bylo iniciováno navržením nových ionizačních technik ESI (Electrospray Ionization) a MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization), díky nimž je možné analyzovat makromolekuly hmotnostní spektrometrií. Kombinace 2D-gelové elektroforézy a hmotnostní spektrometrie je dnes základním nástrojem pro identifikaci peptidů a proteinů v tělních tekutinách a jednotlivých orgánech [6]. Podobně jako je tomu u většiny významných biologických objevů i v medicíně našla proteomika své místo až po zavedení patřičných experimentálních postupů a metod [7]. V předkládané práci jsou prezentovány výsledky, které byly v posledních letech dosaženy v oblasti vývoje čipů sloužících k detekci proteinů. Problematika je popisována v souvislosti s aplikací těchto technologií v klinické biochemii a molekulární diagnostice.

Proteinové čipy a jejich konstrukce

Většina analytických metod používaných pro detekci proteinů vyžaduje poměrně zdlouhavou přípravu vzorku, po níž přichází separační procedura, která je obvykle on-line spojena s detektorem [8]. Technologie čipů by tyto kroky, předcházející samotné detekci proteinů, měla odstranit. Vývoj DNA čipů historicky předcházel vzniku prvních proteinových čipů a mnohdy byly poznatky získané ve výzkumu zaměřeném na detekci nukleových kyselin aplikovány i na problematiku analýzy proteinů. Stanovení DNA pomocí čipů je ve většině případů založeno na Watson-Crickově párování bází dvou nukleotidových řetězců (hybridizace), kde jeden z řetězců je imobilizován na povrch čipu. V takovém případě se na povrch čipu váže pouze DNA, která je komplementární k imobilizovaným nukleotidům (ve většině případů jde o oligonukleotidy) a vzniklé duplexy jsou detekovány. Na rozdíl od proteinových čipů je výhodou čipů pro DNA možnost použít PCR pro amplifikaci detekovaných molekul – detaily [9, 10]. Nejenom v tomto ohledu, ale i v jiných případech, je technologie proteinových čipů v určitých aspektech omezena (např. strukturální změny, nežádoucí interakce nebo ztráta biologické aktivity proteinu během analýzy).

Podstatou čipů pro detekci proteinů je jejich imobilizace na pevný povrch (tzv. substrát). Nejčastěji se používá destička nebo fólie vyrobená ze skla, silikonu, teflonu, plastů nebo běžných syntetických polymerů (polystyren, nitrocelulóza, polyvinylidendifluorid apod.). Proteiny mohou být imobilizovány na substrát nebo jeho modifikovaný povrch fyzikální sorpcí (nekovalentní interakcí) nebo kovalentní vazbou. Velmi často je na povrch substrátu speciální technologií nanášena (např. vrstva zlata, hliníku nebo jiného kovu). Na tuto anorganickou vrstvu se nanáší organický film (obr. 2). Vlastnosti organického filmu by měly být takové, aby po nanesení vzorku nedocházelo ke ztrátě jeho kompaktnosti a dehydrataci. K omezení dehydratace pro-

teinů na povrchu čipu se používá agaróza, dextranové a polyakrylamidové gely nebo jiné hydrofilní polymery (např. poly-L-lysin) [11, 12]. Hydrofilní vlastnosti organického filmu jsou velmi důležité, jelikož obecně přispívají k afinitě mezi proteinem a povrchem čipu. Většina proteinů disponuje hydrofilními aminokyselinami na svém povrchu a hydrofobní aminokyseliny jsou orientovány do vnitřní struktury molekuly. Hydrofilní proteiny tak mohou být přitahovány hydrofilním povrchem čipu. V ideálním případě tvoří organický film homogenní monovrstva molekul (SAM: Self-Assembled Monolayer) s volnými hydrofilními konci. Důležitou součástí organického filmu jsou také specifická vazebná místa pro afinitní značku proteinu. Proces imobilizace proteinu na organický film je klíčovým krokem v konstrukci čipu. To, s jakou efektivitou a afinitou se bude protein vázat, je výsledkem optimalizace komplexní procedury zahrnující např. volbu vhodných vazebných pufrů nebo upravení teploty a pH. Mnohdy je tato práce usnadněna znalostí konformace a fyzikálně-chemických vlastností vazebného místa (disociačních konstant) proteinu.

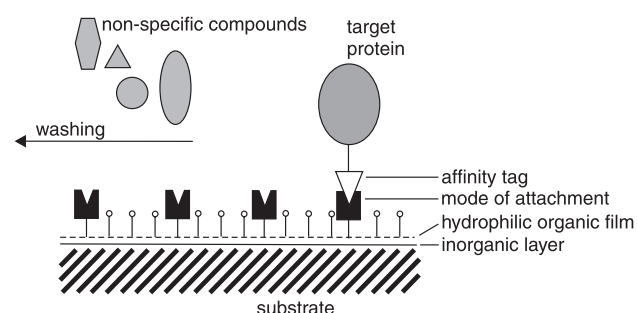


Fig. 2. Scheme of protein array architecture

Protein is immobilized via an affinity tag onto an organic layer (self-assembled monolayer) of chemical chip interface. Other proteins and non-specific compounds are washed from chip surface.

K tomu, aby bylo možné protein navázat na povrch čipu, je potřeba jeho strukturu modifikovat afinitní značkou. Tato značka je specificky rozpoznána látkou, kterou je organický film čipu modifikován (Target Protein Arrays). Často se proteiny značí biotinem (tzv. biotinylace proteinu). Protein značený biotinem se může vázat na čip modifikovaný avidinem nebo streptavidinem. Jinou možností je značení proteinu polyaminokyselinovou sekvencí jako je poly(His), poly(Lys) nebo také poly(Cys). Například při použití poly(His) se histidiny váží s čipem, který byl modifikován niklem. Jinou možností je imobilizace rekombinantních fúzních proteinů GST (glutathion-S-transferáza), MBP (maltózu vázající protein), TRX (thioredoxin) nebo GFP (zelený fluoreskující protein). Například fúzní protein GST (protein, který je na C-konci značený GST) je možné navázat imobilizovanou anti-GST protilátkou [12, 13].

Pokud není protein značený, může být navázán protilátkou imobilizovanou na povrchu čipu (antibody arrays). Obvykle se protilátka imobilizuje adsorpcí na nitrocelulózovou membránu čipu nebo je protilátka na čip ukotvena afinitní značkou tak, jak bylo popsáno výše (např. biotinem) nebo přímo vazbou na SAM čipu. Na čip modifikovaný protilátkou se váže detekovaný pro-

tein, který byl označen společně s ostatními proteiny v připraveném homogenátu. V případě proteinových čipů s imobilizovanou protilátkou se s úspěchem používají principy a experimentálně ověřené postupy známé z testu ELISA [14]. Vysoké selektivity lze dosáhnout se dvěma protilátkami (sendvičový test). V sendvičovém testu je používána kombinace polyklonální a monoklonální protilátky. Selektivita je přitom zaručena specificitou monoklonální protilátky pouze k jednomu epitopu antigenu. Pokud jsou použity oba typy protilátek, je na povrch čipu imobilizována protilátka polyklonální, na kterou se váže detekovaný protein. Jakmile tato vazba proběhne, je na protein navázána značená monoklonální protilátka, jejíž signál se detekuje [13, 15]. Ramachandran et al. [16] navrhli ve své práci NAPPA čip (Nucleic Acid Programmable Protein Array) založený na vazbě proteinu polyklonální protilátkou. NAPPA systém je svou konstrukcí unikátní v tom, že detekovaný protein je syntetizován přímo na povrchu čipu. Na čip je speciální technologií imobilizovaná plazmidová DNA pomocí biotin/avidinové vazby. Plazmid obsahuje sekvenci pro syntézu fúzního proteinu GST. Syntéza probíhá *in situ* na povrchu čipu rozetřením lyzátu z králíčích retikulocytů s T7 polymerázou. Detekovaný protein je tak syntetizován s C-terminální GST značkou a vázán polyklonální anti-GST protilátkou, která je také imobilizovaná na povrchu čipu. Detekce navázaného proteinu probíhá po vazbě monoklonální anti-GST protilátky technologií TSA (Tyramide Signal Amplification). *In situ* syntézou detekovaného proteinu je možné zabránit jeho poškození v průběhu přípravy vzorku.

Proteiny se vážají pouze na určitá vazebná místa (spoty) čipu a detekce navázaného proteinu je realizována automatickými skenery a roboty [17]. V případě, že by docházelo k nežádoucím interferencím v průběhu detekce, je zbylá matrice analytu po vazbě proteinu na čip odmyta. Čip sloužící k identifikaci většího počtu proteinů (technologie mapování proteomu) obsahuje obvykle několik stovek až tisíc spotů s protilátkami k analyzovaným proteinům. Detekce probíhá pomocí automatických digitálních skenerů vybavených CCD-kamerou (Charge-Coupled Device) rozeznávající pozice spotů čipu a detekující intenzitu signálu (např. fluorescenční nebo chemiluminiscenční skenery). Signál poskytující naznačený protein je detekován fluorometricky, chemiluminiscenčně, elektrochemicky, metodou povrchové plazmonové rezonance (SPR: surface plasmon resonance) [18] nebo hmotnostní spektrometrií SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization) s analyzátozem TOF (time-of-flight) [7, 19, 20].

Čipy, které jsou použity jako on-line součást průtokových systémů, HPLC nebo kapilární elektroforézy, spoty neobsahují. Spoty mohou být vytvořeny na povrchu substrátu odlišnými způsoby. Nejjednodušší způsob je vytvořit spoty přímo na anorganické vrstvě kovu (plain-glass slide). Složitějším, avšak efektivnějším způsobem je vytvořit spoty v matici polyakrylamidového gelu naneseného na kovovou vrstvu čipu. V takovém případě tvoří spoty jamky (microwell chip) v matici, nebo naopak bločky (3D gel pad chip) vystupující nad povrch roviny kovové vrstvy. To, jakým způsobem se

matrice zhotoví na povrchu čipu, můžeme demonstrovat na práci Mirzabekova et al. [21]. Autoři využili (3D gel pad chip) technologii fotopolymerace akrylamidu na fólii pokrytou 1 μm vrstvou chrómu. Nejprve nanесли na vrstvu kovu 3% akrylamidový roztok, na který byla umístěna mřížka s okénky 100 \times 100 μm . Takto připravená vrstva akrylamidu byla ozařována UV-lampou, čímž bylo docíleno polymerace akrylamidu v okénkách mřížky. Zbylý akrylamid vyplňující prostor mezi okénky, který nebyl vystaven UV-záření, byl po odstranění mřížky odmyt a na povrchu čipu zůstaly pouze polyakrylamidové spoty. Polyakrylamidové spoty byly aktivovány glutaraldehydem nebo hydrazidem a na takto upravené spoty byly vázány proteiny. Uvedený čip bylo možné použít pro imobilizaci protilátky, na kterou se vázal antigen značený FITC (fluoresceinizotiokyanát) nebo peroxidázou (detekuje se produkt enzymatické reakce). Obdobně mohou být spoty modifikovány antigenem a sledovat vazbu FITC značené protilátky nebo provádět sendvičový test. Spoty vyrobené z gelu jsou výhodné také pro sledování enzymatických reakcí probíhajících přímo na čipu. Na aktivovaný polyakrylamidový gel se dá snadno imobilizovat alkalická fosfatáza a sledovat její inhibici L-fenylalaninem [21].

Aplikace čipů v proteomice

Výsledky, které byly doposud získány v základním výzkumu, jsou s úspěchem aplikovány v komerčních testech. Podobně jako u DNA/RNA čipů, které umožňují identifikaci velkého množství DNA nebo transkriptů (mRNA) během jedné analýzy, je snaha využít čipy pro mapování proteomů. Aplikovatelnost čipů pro identifikace většího počtu proteinů byla prvním impulzem pro přenos technologie čipů do komerční sféry. Separční techniky v on-line spojení se systémem čipů se využívají při analýze složitých maticí, které znesnadňují vazbu detekovaných proteinů na povrch čipu. V tomto směru je velmi perspektivní využití mikrofluidních systémů [22].

Aplikace čipů je orientována do dvou oblastí proteomiky. V prvním případě se jedná o využití čipů k mapování proteomů. K takovému účelu slouží protilátkou značené čipy, jako je komerční čip BD Clontech (Palo Alto, CA, USA) s 378 imobilizovanými protilátkami. Proces detekce je automatizován fluorescenčním skenerem. Čipy s imobilizovanou protilátkou jsou využitelné pro detekci série enzymů, jejichž přítomnost indikuje např. přítomnost funkční metabolické dráhy. Jsou-li k dispozici potřebné protilátky, je aplikovatelnost těchto zařízení velmi vysoká vzhledem k možnosti identifikovat neomezený počet proteinů. Kvantifikace navázaných proteinů je nepřesná (semikvantitativní) a umožňuje získat informaci o přítomnosti nebo naopak nepřítomnosti proteinu ve vzorku. V druhém případě jsou čipy využívány ke studiu chemických/fyzikálních modifikací proteinů a interakcí proteinů s širokým spektrem biomolekul nebo i nízkomolekulárních ligandů. Podmínkou je, aby byl imobilizovaný protein biologicky aktivní a aby podmínky (pH, koncentrace solí, teplota atd.), kterým

je protein na povrchu čipu vystaven, umožnily jeho vazbu se studovanou látkou. Z hlediska molekulární biologie se soustřeďuje zájem vědců na problematiku sledování interakcí protein-DNA, protein-RNA, protein-protein, protein-cukr a protein-ligand (léčivo, signální molekula, toxin atd.). Proteinové čipy je možné aplikovat i při sledování posttranslačních modifikací proteinů (fosforylace, oxidace atd.) nebo studiu jejich konformačních (denaturace/renaturace) změn [23].

Ke komerčnímu využití jsou k dispozici i další proteinové čipy. Například firma CIPHERGEN Biosystems (Fremont, CA, USA) dodává CM5 čip, kde detekce proteinu je prováděna hmotnostní spektrometrií (SELDI-TOF-MS). Proteinový čip CM5 je vyroben ze skla, které je potaženo 50 nm filmem ze zlata, k němuž je přes thiohydroxyalkan vázán dextran modifikovaný streptavidinem. Zlato napařené na povrch substrátu je velmi často používáno proto, že nepodléhá oxidacím jako jiné kovy.

Proteinové čipy v klinické biochemii

V posledních pěti letech narůstá množství publikací zaměřených na využití proteinových čipů v klinické biochemii. Ve většině případů jsou tyto práce zaměřeny na identifikace proteinů hrajících roli v infekčních chorobách a rakovině. Yip et al. identifikovali SELDI-TOF-MS čipem SAA (Serum Amyloid A) protein, který indikuje rozsah pneumonie u těžkého akutního respiračního syndromu (SARS) [24]. Jiný autorský kolektiv sledoval mikro-ELISA technikou biomarker PSA (Prostate-Specific Antigen), jehož přítomnost v plazmě souvisí s rakovinou prostaty [25]. Proteinové čipy byly s úspěchem aplikovány při sérologickém vyšetření. Pět typů SELDI-TOF-MS čipů (IMAC3, WCX, SAX2, H50, NP20) od CIPHERGEN Biosystems bylo použito pro sledování spektra proteinů v séru dětí s neuroblastomem [26]. K analýze se používaly 3 µl vzorky séra, které se po naředění vazebným pufrům nanášely na jednotlivé čipy. Každý z uvedených čipů fungoval na jiném principu, např. čip H50 byl specifický k hydrofobním proteinům a IMAC3 k proteinům vázající kovy. Získané výsledky byly reprezentovány jako profil peptidů a proteinů v séru v závislosti na jejich molekulové hmotnosti, a to pro každý čip odděleně. Při srovnání profilů zdravých jedinců s profily pacientů s diagnózou neuroblastomu, byly pozorovány prokazatelné rozdíly. Proteiny, které byly pozorovány v séru nemocných pacientů a jejichž přítomnost nebyla potvrzena u zdravých dětí, byly identifikovány pomocí databáze ExPASy [26]. Uvedeným způsobem komparace proteinového spektra zdravých a nemocných subjektů se poměrně s úspěchem nalézají nové biomarkery nádorových onemocnění. Stejnou čipovou sadu použil tým amerických výzkumníků při hledání nového markeru karcinomu endometria [27]. Analýzy byly prováděny v homogenátech připravených ze zdravé a maligní tkáně děložní sliznice. U vzorků maligní sliznice byl – na rozdíl od vzorků zdravých jedinců – hmotnostní spektrometrií identifikován protein s molekulovou hmotností 10 843 Da. Následně byl z homogenátů maligní tkáně tento protein izolován a po naště-

pení trypsinem detailně studován hmotnostní spektrometrií. Získané CID (collision-induced dissociation) hmotnostní spektrum identifikovalo protein jako chaperonin 10 [27]. Obdobně postupoval tým amerických výzkumníků při sérologickém vyšetření pacientů s hepatocelulárním karcinomem [28]. Sofistikovanější strategie kombinující analýzu genomu s proteomem byla použita při hledání markeru rozpoznávající adenokarcinom tlustého střeva a ovaria [29]. Celkem 60 rakovinných buněčných linií bylo testováno čipovými sadami pro DNA, mRNA a proteiny. Na základě analýzy získaných molekulárních profilů byl jako marker pro karcinom tračnicku navržen villin a pro karcinom ovaria to byl moesin. Z výsledků práce Nishizuka et al. vyplývá, že kombinace analýzy DNA, sledování koncentrace transkriptu a exprese proteinu přinášejí vícerozměrný pohled při hledání nových markerů rakoviny.

Čipy byly také aplikovány pro imunofenotypizaci leukemických buněk. S čipem, na jehož povrch byly imobilizovány protilátky, lze získat výsledky srovnatelné s výsledky analýz metodou průtokové cytometrie, která se pro účely imunofenotypizace leukémií běžně používá. Frakce leukocytů získaná z krve pacientů je možné nanášet přímo na povrch čipu. Tento systém se dá v praxi využít pro diagnózu leukémie [30].

Uvedené práce demonstrují možnost aplikace proteinových čipů v klinické praxi. Dá se předpokládat, že v případě proteinů bude technologie čipů důležitým diagnostickým nástrojem. Technologie čipů je – na rozdíl od klasických analytických metod – ekonomicky méně náročná jak z hlediska pořizovací ceny, tak z hlediska provozu zařízení. Z aplikací SELDI-TOF-MS, které byly výše popsány, lze usuzovat, že čipy mohou v budoucnu výrazně urychlit hledání nových biomarkerů. Značný potenciál je ve využití proteinových čipů při vývoji nových léčiv. V této oblasti by bylo možné využít receptory imobilizované na čipu ke studiu jejich vazby s léčivem. Obdobně by mohly být studovány obecně vazebné a inhibiční vlastnosti farmaceutických preparátů, jako je Avastin®, což je protilátka (inhibující růstový faktor VEGF) využívaná v terapii kolorektálního karcinomu. Další biomedicínské aplikace proteinových čipů jsou uvedeny v odborné literatuře [31, 32].

Diskuse

Přelom tisíciletí s sebou přinesl několik významných biologických objevů, které bude možné využít pro lékařské účely. Mezi ty nejvýznamnější patří kompletní sekvenace lidského genomu [35] a naklonování lidského embrya [33]. Tyto dva objevy tvoří základ pro budoucí rozvoj genové terapie a terapeutického klonování. Využití genů v klinické praxi a molekulární diagnostice je bezesporu vysoce efektivním nástrojem dnešní medicíny [9]. Na rozdíl od DNA byla problematika proteinů a jejich využití v diagnostice nastolena výrazně později. Přítomnost genu nebo jeho transkriptu však ne vždy koresponduje se studovaným fyziologickým projevem, který je realizován až funkčními proteiny. V tomto ohledu by se v budoucnu mohly čipy, detekující proteinové

biomarkery patologických procesů, stát významným diagnostickým nástrojem. Výhoda sledování koncentrace těchto biomarkerů spočívá v tom, že mohou indikovat ranné fáze vývoje nemoci, které histopatologické nebo jiné vyšetření není schopno postihnout [3].

Technologie čipů s imobilizovanými protilátkami je z části omezena složitou procedurou předcházející získání protilátky. Mohl by být tento problém v budoucnosti vyřešen syntézou protilátek v laboratorních podmínkách? *De novo* umělá syntéza proteinů zaznamenává v posledním desetiletí významné úspěchy. Dnes je možná příprava polypeptidů o délce cca 250 aminokyselin. Významným krokem vpřed je syntéza erythropoetinu firmou Gryphon v roce 2001 technologií fungující na principu spojování oligopeptidických fragmentů [34]. Vyjdeme-li z předpokladu, že proces sbalování proteinů je řízen primární sekvencí polypeptidu, je zde možnost využít tyto techniky i pro syntézu větších molekul s biologicky aktivní konformací. Výhodou je, že proteinový čip nemusí být modifikován celou protilátkou, ale pouze tou částí (fragmentem protilátky), která rozpoznává daný epitop antigenu. Mimo jiné protilátka může být použita opakovaně, v případě, že po detekci proteinu provedeme disociaci vazby mezi antigenem a protilátkou [21].

S rozvojem nanotechnologií se stále častěji můžeme setkat s miniaturizací čipové technologie. Byly publikovány práce popisující výrobu mikročipů s více jak 1600 spoty o velikosti 150–200 μm na ploše 1 cm² a zařízení schopné dávkovat 5 nl vzorky [7]. Dá se předpokládat, že nanotechnologie bude v budoucnu udávat směr vývoje proteinových čipů a zvýší jejich aplikovatelnost v diagnostické praxi.

Literatura

1. Banks, R. E., Dunn, M. J., Hochstrasser, D. F. et al. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet*, 2000, 356, p. 1749–1756.
2. Srinivas, P. R., Verma, M., Zhao, Y., Srivastava, S. Proteomics for cancer biomarker discovery. *Clin. Chem.*, 2002, 48, p. 1160–1169.
3. Srinivas, P. R., Srivastava, S., Hanash, S., Wright, G. L. Proteomics in early detection of cancer. *Clin. Chem.*, 2001, 47, p. 1901–1911.
4. Zelená, J., Potěšil, D., Vacek, J. et al. Metallothionein jako prognostický marker nádorových onemocnění. *Klin. Onkol.*, 2004, 17, p. 190–195.
5. Kizek, R., Vacek, J., Adam, V., Vojtěšek, B. Vztah metallothioneinu k rakovině a protinádorové léčbě. *Klin. Biochem. Metab.*, 2004, 12, p. 72–78.
6. Aebersold, R., Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003, 422, p. 198–207.
7. Lee, K. H. Proteomics: a technology-driven and technology-limited discovery science. *Trends Biotechnol.*, 2001, 19, p. 217–222.
8. Hühner, A. F. R., Aced, G. I., Parkins, M. D. et al. Separation and analysis of peptides and proteins. *Anal. Chem.*, 1997, 69, p. 29R–57R.
9. Ramaswamy, S., Golub, T. R. DNA microarrays in clinical oncology. *J. Clin. Oncol.*, 2001, 20, p. 1932–1941.

10. Kricka, L. J. Nucleic acid detection technologies – labels, strategies, and formats. *Clin. Chem.*, 1999, 45, p. 453–458.
11. Wilson, D. S., Nock, S. Functional protein microarrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, 6, p. 81–85.
12. Talapatra, A., Rouse, R., Hardiman, G. Protein microarrays: challenges and promises. *Pharmacogenomics*, 2002, 3, p. 1–10.
13. Templin, M. F., Stoll, D., Schrenk, M. et al. Protein microarray technology. *Drug Discov. Today*, 2002, 7, p. 815–822.
14. Lukáš, Z., Dráberová, E., Feit, J., Vojtěšek, B. *Imunohistochemické metody v biologii a bioptické diagnostice*. In *Sborník prací Lékařské fakulty Masarykovy univerzity* (č. 112), Brno: Masarykova univerzita 1997, 147 s.
15. Fathman, C. G., Soares, L., Chan, S. M., Utz, P. J. An array of possibilities for the study of autoimmunity. *Nature*, 2005, 435, p. 605–611.
16. Ramachandran, N., Hainsworth, E., Bhullar, B. et al. Self-assembling protein microarrays. *Science*, 2004, 305, p. 86–90.
17. Zhu, H., Snyder, M. Protein arrays and microarrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, 5, p. 40–45.
18. Wilson, W. D. Analyzing biomolecular interactions. *Science*, 2002, 295, p. 2103–2105.
19. Nelson, R. W., Nedelkov, D., Tubbs, K. A. Biosensor chip mass spectrometry: a chip-based proteomics approach. *Electrophoresis*, 2000, 21, p. 1155–1163.
20. Natsume, T., Nakayama, H., Isobe, T. BIA-MS-MS: biomolecular interaction analysis for functional proteomics. *Trends Biotechnol.*, 2001, 19 (Suppl.), p. S28–S33.
21. Arenkov, P., Kukhtin, A., Gemmell, A. et al. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal. Biochem.*, 2000, 278, p. 123–131.
22. Regnier, F. E., He, B., Lin, S., Busse, J. Chromatography and electrophoresis on chips: critical elements of future integrated, microfluidic analytical systems for life science. *Trends Biotechnol.*, 1999, 17, p. 101–106.
23. Meri, S., Baumann, M. Proteomics: posttranslational modifications, immune responses and current analytical tools. *Biomol. Eng.*, 2001, 18, p. 213–220.
24. Yip, T. T. C., Chan, J. W. M., Cho, W. C. S. et al. Protein chip array profiling analysis in patients with severe acute respiratory syndrome identified serum amyloid A protein as a biomarker potentially useful in monitoring the extent of pneumonia. *Clin. Chem.*, 2005, 51, p. 47–55.
25. Wiese, R., Belosludtsev, Y., Powdrill, T. et al. Simultaneous multianalyte ELISA performed on a microarray platform. *Clin. Chem.*, 2001, 47, p. 1451–1457.
26. He, Q. Y., Zhu, R., Ren, Y. et al. Serological protein profiling of neuroblastoma by ProteinChip SELDI-TOF technology. *J. Cell. Biochem.*, 2005, 95, p. 165–172.
27. Yang, E. C. C., Guo, J. Z., Diehl, G. et al. Protein expression profiling of endometrial malignancies reveals a new tumor marker: Chaperonin 10. *J. Proteome Res.*, 2004, 3, p. 636–643.
28. Schwegler, E. E., Cazares, L., Steel, L. F., et al. SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2005, 41, p. 634–642.
29. Nishizuka, S., Chen, S. T., Gwadry, F. G. et al. Diagnostic markers that distinguish colon and ovarian adenocarcinomas: identification by genomic, proteomic, and tissue array profiling. *Cancer Res.*, 2003, 63, p. 5243–5250.

30. **Belov, L., Huang, P., Barber, N. et al.** Identification of repertoires of surface antigens on leukemias using an antibody microarray. *Proteomics*, 2003, 3, p. 2147–2154.
31. **Jain, K. K.** The role of protein-chip technology in molecular diagnostics. *IVD Technology*, July/August 2002, <http://www.device-link.com/ivdt>
32. **Ng, J. H., Ilag, L. L.** Biomedical applications of protein chips. *J. Cell. Mol. Med.*, 2002, 6, p. 329–340.
33. **Hwang, W. S., Ryu, Y. J., Park, J. H. et al.** Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*, 2004, 303, p. 1669–1674.
34. **Middelberg, A. P. J.** Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.*, 2002, 20, p. 437–443.
35. **Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J. R. et al.** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, 409, p. 860–921.

Do redakce došlo 15. 7. 2005.

Adresa pro korespondenci:

Ing. Jan Vacek

Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie

Biofyzikální ústav AVČR

Královopolská 135

612 65 Brno

e-mail: jan.vacek@ibp.cz

Recenze knihy

G. H. Hoffmann, W. J. Nyhan, J. Zschocke, S. G. Kahler, F. Mayatcpek:

Dědičné metabolické poruchy

Grada 2006, přeložila prim. MUDr. S. Šťastná, CSc., MBA



Velmi užitečná publikace sestavená novou generací lékařů heidelberské kliniky a dalších spolupracovníků, kterou vydalo nakladatelství Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2002.

Do češtiny velmi dobře a zasvěceným způsobem přeložila prim. MUDr. Šťastná, která se problematikou dědičných metabolických poruch zabývá.

Publikace na 400 stránkách pojednává o screeningu, prevenci, diagnosti-

ce i léčbě dědičných metabolických poruch v celém jejich rozsahu, s výjimkou lipidózy. Tato prudce se rozvíjející oblast, především pediatrické, genetické a biochemické medicíny, vyžaduje neustálé doplňování patogenetických i patognomonických poznatků, aby umožnila čtenáři přehlednout a pochopit dlouhou řadu nemocí známých i méně známých. O většině z nich jsme si ještě donedávna mysleli, že mutace jednoho genu znamená jednu nemoc a že molekulární genetické vyšetření nám jistě zajistí definitivní diagnózu. Genový polymorfismus spolu se zevními vlivy prostředí nás vedou i u známých chorob do nových a nových metabolických zvláštností, stále složitějších a pro každého pacienta poněkud odlišných. Tato publikace, sponzorovaná firmami Milupa a SHS International, konečně zaplňuje více než 20letou mezeru v českém písemnictví o dědičných metabolických poruchách. Poslední byla publikace Hyánka a et al., vydaná v roce 1975 v Avicenu. Nová publikace byla už opravdu nanejvýše potřebná.

Meritum této nové publikace spočívá v tom, že vede čtenáře od základní symptomatologie, přes doporučení vhodných vyšetření až k diferenciální diagnóze a možnostem léčby. Tato cesta bývá velmi složitá a náročná, protože celou řadu případů se stále nedaří plně zařadit a objasnit.

Grafická úprava a tabulkové přehledy v publikaci jsou velmi kvalitní a výstižné.

Publikace je určena jak pro rychlou orientaci v nepřehledné „džungli“ metabolitů nahlédnutím do obsáhlých tabulek a metabolických schémat či diagnostických postupů, tak pro systematické a důkladné prostudování podstaty všech dnes známých a pro diferenciální diagnostiku potřebných nemocí. Provede čtenáře úskalími zcela nových doplňujících poznatků, hodnotí dosud akceptované postupy – počínaje screeningem novorozenců, diagnostickými laboratorními metodami, hodnotou molekulárně genetických vyšetření, ověřenými léčebnými postupy až po efektivní prenatální či pre-matrimonální prevenci. Jsou uvedeny referenční hodnoty všech diagnosticky významných metabolitů a jejich interpretace, význam a diagnostická pomoc enzymových vyšetření, validita DNA analýz jednotlivých genových mutací, které mají pro diagnózu význam.

V závěru pak tabulkové přehledy hodnoty dávají vyčerpávající recentní údaje o každé nemoci, aniž by čtenář musel hledat v 5000stránkové metabolické „bibli“ Scrivera et al.: *Metabolic Bases of Inherited Diseases*.

Kniha je vhodná nejenom pro pediatrii a biochemiky, neurology, genetiky, neonatology, ale také – jak „úspěšně odléčené“ děti dorůstají do dospělého věku – i pro internisty, praktické lékaře, gynekology, porodníky, endokrinology a další odborníky, protože se s dospělými pacienty trpícími dědičnými metabolickými chorobami jistě setkají. Dědičná metabolická onemocnění se totiž většinou nepodaří vyléčit, jen se podaří zabránit změnám poškozujícím CNS, srdce, játra či jiné citlivé tkáně. Dědičnost respektuje přísně genetické zákony, a tak genetická prevence při volbě životního partnera přivádí adolescenty a dospělé znova do péče odborných lékařů. Úroveň jak diagnostiky, tak prevence i léčby dědičných metabolických poruch je v našich zemích vysoká, srovnatelná s nejvyspělejšími zeměmi Evropy, a tak tato dobrá publikace jistě přispěje k jejímu dalšímu zlepšení.

Prof. MUDr. Josef Hyánek, DrSc.

Metabolická ambulance Nemocnice na Homolce

e-mail: josef.hyanecek@homolka.cz