

Mikromacierze DNA i ich wykorzystanie w parazytologii i medycynie

DNA microarrays in parasitology and medical sciences

Sławomir Jaros

Pracownia Parazytologii Molekularnej, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa; E-mail: s_jaros@gazeta.pl

ABSTRACT. The article presents the current knowledge on the microarray technique and its applications in medical sciences and parasitology. The first part of the article is focused on the technical aspects (microarray preparation, different microarray platforms, probes preparation, hybridization and signal detection). The article also describes possible ways of proceeding during laboratory work on organism of which the genome sequence is not known or has been only partially sequenced. The second part of the review describes how microarray technique have been, or possibly will be, used for better understanding parasite life cycles and development, host-parasite relationship, comparative genomics of virulent organisms, development vaccines against the most virulent parasites and host responses to infection.

Key words: comparative genomics, DNA microarrays, microarray preparation, parasitology.

Wstęp

Technika mikromacierzy (z ang. microarray) zyskuje coraz szersze uznanie, a co za tym idzie, zastosowanie w rozmaitych typach laboratoriów. Jest to niezwykle uniwersalna metoda, której idea wzięła początek od badań porównawczych prowadzonych w onkologii, z czasem została zaadoptowana do innych działów nauk biologicznych i medycznych. Umożliwia ona porównanie profili ekspresji genów komórek, tkanek, organizmów znajdujących się w różnych warunkach fizjologicznych. Stosowane dotychczas metody pozwalające badać poziom ekspresji, takie jak hybrydyzacja RNA (Northern blotting) [1], metoda różnicowego namnażania (differential display) [2], metoda SAGE (serial analysis of gene expression) [3], hybrydyzacja „dotblot” [4], mają jedną wspólną wadę w porównaniu z techniką mikromacierzy, nie pozwalają na jednoczesne badanie ekspresji aż tak ogromnych ilości genów naraz, ponadto wymagają dużych ilości materiału wyjściowego [5]. Opisywana w niniejszym artykule metoda pozwala na jednoczesne analizowanie tysięcy genów [6–10], dzięki czemu moż-

na ustalić, które z nich są aktywne w określonych warunkach i w powiązaniu z jakimi innymi genami. Mikromacierze DNA definiuje się jako uporządkowane zbiory fragmentów genów (inaczej mówiąc uporządkowane fragmenty sond molekularnych) w postaci jednoniciowych odcinków DNA (o bardzo różnej długości, zależnie od typu mikromacierzy) unieruchomionych na różnego typu powierzchniach w ściśle zdefiniowanym porządku. Technika mikromacierzy zasadniczo składa się z czterech następujących etapów: (1) przygotowanie sond molekularnych i ich immobilizacja na powierzchni płytki, (2) przygotowanie wyznakowanych próbek DNA przeznaczonych do analizy, (3) hybrydyzacja próbek DNA z sondami mikromacierzy, i wreszcie (4) odczytanie sygnałów uzyskanych z hybrydyzacji i analiza danych [11].

Na końcu artykułu zamieszczono słowniczek używanych terminów.

Sondy molekularne

Omówienie pierwszego etapu techniki mikromacierzy należy rozpocząć od wymienienia głównych

typów sond molekularnych. Wyróżniamy trzy grupy sond: na bazie cDNA, genomowego DNA oraz oligonukleotydowe.

Sondy cDNA posiadają szereg zalet, a ich przygotowanie nie wymaga od badacza znajomości sekwencji genomu organizmu, na którym pracuje. Komplementarny DNA (cDNA) uzyskuje się w reakcji odwrotnej transkrypcji, w której matrycą jest wyizolowany z komórek czy tkanek mRNA. Cząsteczki cDNA kodujące wszystkie białka organizmu klonuje się do wektorów plazmidowych, a następnie rekombinowanymi plazmidami transformuje się bakterie kompetentne, uzyskując bibliotekę cDNA. Na jej bazie można przygotować sondy wykorzystując primery linkerowe zastosowanego wektora, zatem koszt uzyskania tego rodzaju sond jest relatywnie niewielki. Kolejne zalety takich sond także wynikają z natury cDNA, do ich przygotowania nie musimy znać sekwencji całego genomu, organizacji genów (ułożenia egzonów i intronów, granic występowania danego genu, jego sekwencji promotorowych i terminalnych), można je stosować w przypadku genów z dużą liczbą intronów, a każda sonda będzie odpowiadała dokładnie jednemu genowi. Niestety, sondy cDNA nie są pozbawione wad. W wyniku ich dużej długości nie można rozróżnić różnych wariantów składania genu (splicingu). Kolejną niedogodnością jest brak możliwości rozróżnienia nici sensownych od antysensownych. Trzecią wadą jest możliwość otrzymania fałszywych wyników w przypadku uzyskania biblioteki niskiej jakości. Istnieje niebezpieczeństwo zaburzenia proporcji w liczbie kopii poszczególnych genów w bibliotece, która może być nieadekwatna do wyjściowego cDNA, co więcej, niektóre geny mogą nie być w takim banku genów w ogóle reprezentowane [12]. Warto także przed przystąpieniem do konstruowania biblioteki cDNA dokładnie przemyśleć wybór tkanki oraz momentu izolacji RNA, gdyż część genów nie zawsze jest aktywna transkrypcyjnie.

Sondy na bazie genomowego DNA także uzyskuje się z wykorzystaniem bibliotek. Bibliotekę genomową otrzymuje się poprzez fragmentację DNA genomowego na małe, losowe odcinki, które następnie są klonowane do wybranego wektora plazmidowego. W tym przypadku, podobnie jak opisano powyżej, także niewielkim kosztem można uzyskać zbiór sond molekularnych wykorzystując parę primerów linkerowych danego wektora. Również tutaj nie musimy znać organizacji genomu ani jego sekwencji. W odróżnieniu od sond cDNA, bez większych trudności otrzymamy zbiór cząsteczek

charakteryzujący się wysokim stopniem reprezentatywności dla poszczególnych genów i częstości ich występowania. Nie będzie możliwości odróżnienia nici sensownych od antysensownych ani różnych wariantów splicingu [12]. Niestety, pojedyncza sonda może obejmować fragmenty dwóch lub większej liczby genów, wiele sond będzie zawierać introny, sekwencje regulatorowe, powtarzalne, ruchome i inne. W praktyce, tego typu sondy można zastosować tylko w przypadku badań nad organizmami, których genomy nie zawierają intronów, np. genom *Escherichia coli* [13], lub zawierają ich niewiele [12], np. genom *Saccharomyces cerevisiae* [13].

Ostatnia grupa sond molekularnych, sondy oligonukleotydowe, posiada najwięcej zalet. Charakteryzują się one bardzo wysoką specyficznością, za czym idzie także możliwość rozróżnienia wariantów genu posiadającego różne warianty splicingu. Można odróżnić nici sensowne od antysensownych. Co prawda, do konstrukcji mikromacierzy z sondami oligonukleotydowymi konieczna jest znajomość sekwencji genomu oraz jego organizacji, lecz dzięki temu otrzymana płytka zawiera reprezentację wszystkich genów obecnych w danym organizmie czy tkance we właściwych proporcjach. Wielokrotne użycie szeregu różnych oligonukleotydów specyficznych dla danego genu podnosi wiarygodność wyników. Przy produkcji tego typu mikromacierzy unika się generujących błędy etapów PCR i oczyszczania amplikonu. Do wad należy zaliczyć wspomnianą wcześniej konieczność znajomości sekwencji i organizacji genomu, a także wysoki koszt otrzymania. Warto jeszcze nadmienić, iż sondy te można podzielić, ze względu na długość, na dwie kategorie: długie oligonukleotydy (najczęściej około 70-mery), które uzyskuje się w syntetyzerach, a następnie nanosi na płytkę, lub krótkie oligonukleotydy (20–25-mery) uzyskiwane *in situ* np. metodą fotolitografii — system wykorzystywany przez Affymetrix Inc. (Santa Clara, CA, USA; <http://www.affymetrix.com>) oferującą macierze pod nazwą GeneChip (powszechnie używa się nazwy „chip DNA”) [6].

Stosowany przez Affymetrix system charakteryzuje się kilkoma interesującymi cechami. Każdy gen jest reprezentowany na „chipie” przez około 20 próbek. Każdą próbkę reprezentują dwa rodzaje oligonukleotydów, PerfectMatch (PM) — o sekwencji referencyjnej (jest to konkretny transkrypt), np. ATG...C...TGC oraz MisMatch (MM) — gdzie jeden nukleotyd zostaje zamieniony, np. ATG...G...TGC. Sygnał wyjściowy jest wypadkową PM i MM

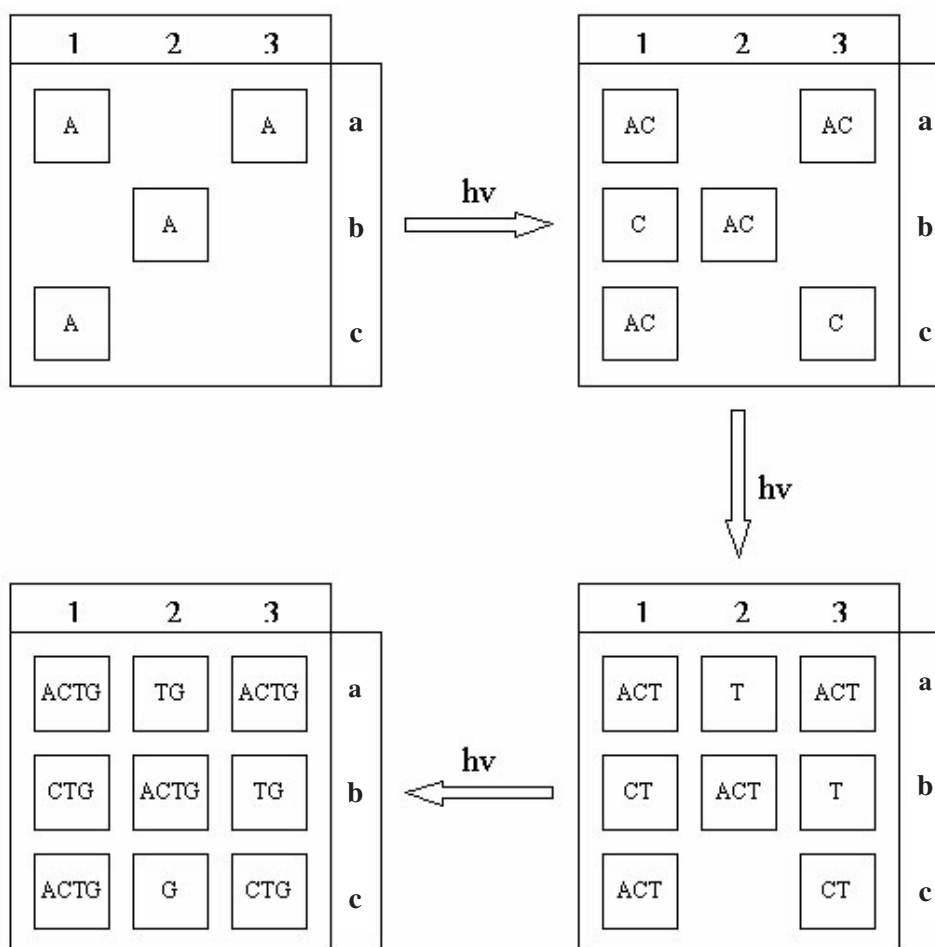
z próbek. Jeśli zauważymy, iż takich próbek dla danego transkryptu jest kilkanaście — dwadzieścia, a oligonukleotydy mają długość kilkunastu — dwudziestu nukleotydów, jesteśmy w stanie na podstawie sygnału wyjściowego z takiego zestawu próbek wykryć ewentualną nawet pojedynczą mutację i ją zlokalizować. Należy pamiętać, iż zastosowanie różnych metod analizy danych może powodować różnice w uzyskanym odczycie. Obecnie w korzystnej sytuacji są laboratoria badające genetykę nicieni oraz zarodźca malarii. Dzięki poznaniu sekwencji genomu *Caenorhabditis elegans* i *Plasmodium falciparum* chipy dla tych organizmów są opracowane i dostępne komercyjnie.

Warto dodać, iż istnieje specjalna grupa mikromacierzy, tzw. macierze SNP (ang. single nucleotide polymorphism), które wykorzystuje się do identyfikacji mutacji, polimorfizmów genowych, genotypowania.

Produkcja mikromacierzy *in situ*

Najbardziej rozpowszechnionym rodzajem syn-

tezy *in situ* jest synteza wspomnianą metodą fotolitografii opracowaną przez Fodora i wsp. [14]. Rysunki 1 i 2 przedstawiają schemat syntezy sond oligonukleotydowych *in situ* metodą fotolitografii. Krzemową płytkę, wcześniej poddaną obróbce chemicznej (hydroksylacja, a następnie silanizacja), naświetla się ultrafioletem [15]. Nie naświetla się jednak całej powierzchni, ale stosuje się przesłony umożliwiające aktywację tylko tych miejsc, w których w danym cyklu syntezy ma być przyłączony wybrany nukleotyd. Wyobraźmy sobie, że chcemy otrzymać płytkę z dziewięcioma sondami nukleotydowymi. W przypadku czterech oligonukleotydów (1a, 1c, 2b, 3a) pierwszym nukleotydem ma być adenina, przesłona uniemożliwia dotarcie promieniowaniu UV do pozostałych miejsc, nukleotyd jest wiązany tylko w wybranych czterech pozycjach. W kolejnym cyklu przyłączona zostanie cytozyna, przesłona zostanie zastosowana w pozycjach 2a, 2c, 3b. W miejscach 1a, 1c, 2b, 3a otrzymamy już strukturę dwunukleotydową o sekwencji AC, w miejscach 1b, 3c będzie to pierwszy nukleotyd. Etap trzeci to dosyntetyzowanie tyminy. Aktywuje-



Rys. 1. Schemat syntezy „Chipa DNA” metodą fotolitografii; opis w tekście

Fig. 1. GeneChip preparation using photolithographic method

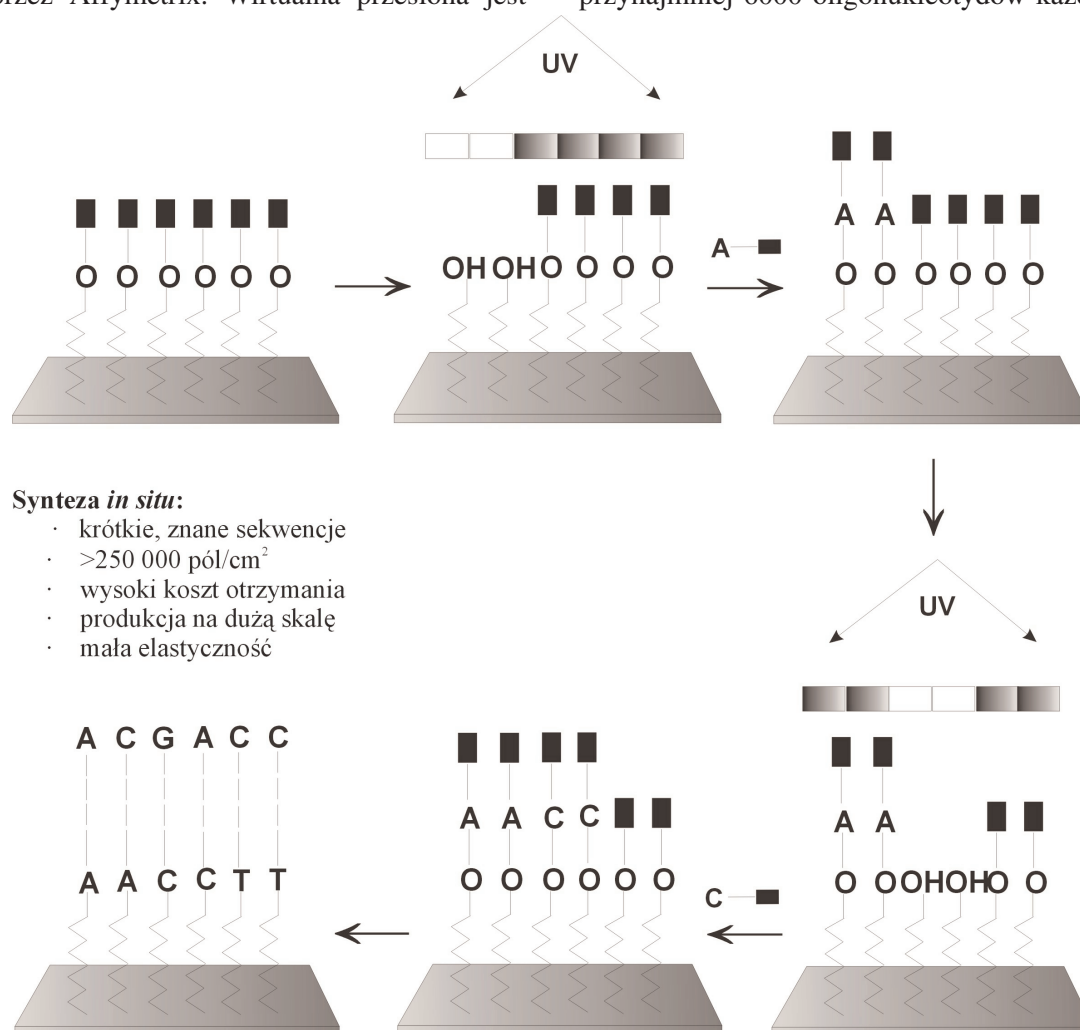
my wszystkie pozycje z wyjątkiem 2c otrzymując struktury trójnukleotydydowe o sekwencji ACT (1a, 1c, 2b, 3a), dwunukleotydydowe o sekwencji CT (1b, 3c), a także jednonukleotydydowe T (2a, 3b). W czwartym cyklu będziemy przyłączać guaninę we wszystkich miejscach. Otrzymamy struktury jedno-, dwu-, trój- i czteronukleotydydowe. Proces przeprowadzimy wielokrotnie w analogiczny sposób aż do otrzymania różnorodnych sond o długości 20–25 nukleotydów o zaplanowanej sekwencji.

Do grupy technik produkcji mikromacierzy *in situ* należy także stosowana przez firmę NimbleGen (Madison, WI, USA; <http://www.nimblegen.com>) metoda „photodeposition chemistry”. Bazuje ona na syntetyzatorze MAS (od ang. maskless array synthesizer). Jest to system umożliwiający produkcję macierzy o bardzo wysokiej gęstości sond. Wykorzystuje on pozbawiony przesłony projektor jako wirtualną przesłonę zamiast przesłon chromowych używanych przez Affymetrix. Wirtualna przesłona jest

macierzą setek tysięcy osobno adresowanych aluminiowych luster na chipie komputerowym odbijających promienie światła [15, 16] (Rys. 3).

Firma Xeotron (Houston, TX, USA; <http://www.xeotron.com>) także produkuje mikromacierze wykorzystując cyfrowy projektor mikrołuster. Mikromacierze Xeotron zawierają trójwymiarowe nanokomorę chipów wypełnionych płynem. Oligonukleotydy syntetyzuje się w nanokomorach często stosowaną metodą opisaną przez Gao i wsp. [17]. W ten sposób uzyskuje się bardzo długie oligonukleotydy o długości do 150 zasad [15].

Kompania Febit (Mannheim, Niemcy; <http://www.febit.com>) używa projektora cyfrowego do bezprzesłonowej, aktywowanej światłem syntezy mikromacierzy DNA. Charakterystyczne dla tej firmy jest wykorzystanie do syntezy DNA unikalnych trójwymiarowych mikrokanalików. Pozwala to na otrzymanie do ośmiu macierzy zawierających przynajmniej 6000 oligonukleotydów każda. Urzą-



Rys. 2. Produkcja Chipa DNA *in situ* metodą fotolitografii. Przesłony umożliwiają światłu UV dotarcie tylko do wybranych miejsc na płycie i ich aktywację, na podstawie van Hal [5] i Venkatasubbarao [15]

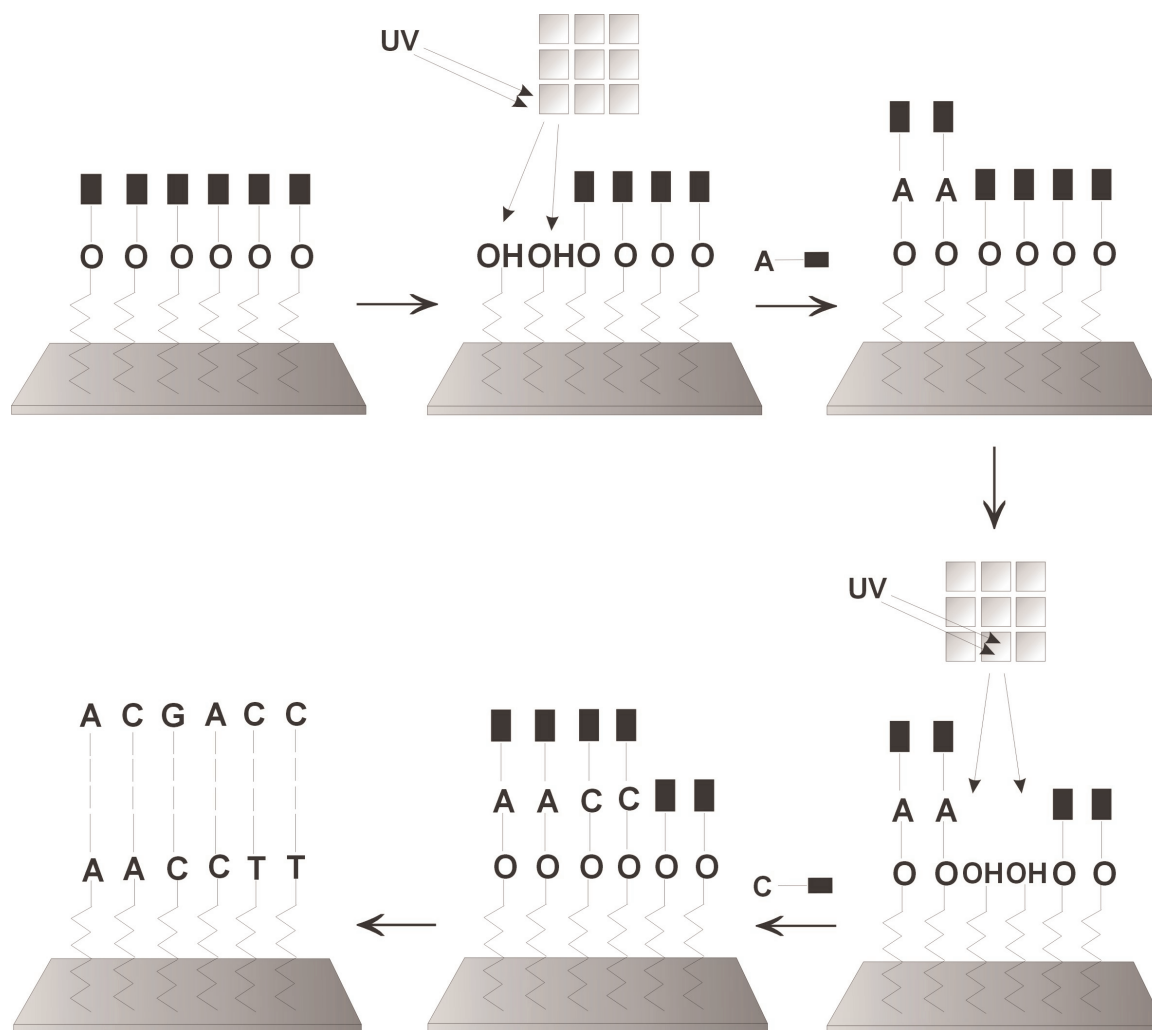
Fig. 2. GeneChip preparation using photolithographic method, according to van Hal [5] and Venkatasubbarao [15].

dzenia sprzedawane przez Febit mają tę dodatkową zaletę, iż otrzymuje się kompletny system umożliwiający syntezę DNA, produkcję mikromacierzy, hybrydyzację, detekcję sygnału hybrydyzacji oraz analizę danych [15].

Podczas gdy Affymetrix, NimbleGen, Febit i Xeotron do syntezy DNA zdecydowały się zastosować ukierunkowane napromieniowanie ultrafioletem, CombiMatrix (Mukilteo, WA, USA; <http://www.combimatrix.com>) poszło w zupełnie inną stronę. Firma bazuje na ukierunkowanej elektrochemii. Indywidualnie adresowane macierze mikroelektrodowe są podstawą produkcji tysięcy różnych cząsteczek równocześnie. Każda elektroda jest umieszczona na warstwie biokompatybilnej co ułatwia przyłączanie zsintetyzowanych cząsteczek [15].

Produkcja mikromacierzy przez bezpośrednie nanoszenie biomolekuł na płytke

Bezpośrednie nanoszenie na płytke wcześniej otrzymanych biomolekuł to alternatywne podejście do zagadnienia produkcji mikromacierzy. Określa się je w literaturze jako „micro-dispensing”. Jest to metoda wykazująca większą elastyczność, można z niej korzystać w każdym laboratorium biologii molekularnej [5, 10]. Dokładny protokół postępowania można znaleźć pod adresem: <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols.html>. Niewielkie ilości DNA w roztworze o objętości minimum 50 pl nanosi się na podłoże za pomocą specjalnych urządzeń szeroko już dostępnych w sprzedaży. Bazują one na technologii stosowanej w drukarkach atramentowych (tzw. inkjet technology). Można wśród nich wyróżnić dwie kategorie, pasywne



Rys. 3. Produkcja mikromacierzy z użyciem MAS, metoda wykorzystywana przez NimbleGen, Xeotron i Febit. Światło UV jest kierowane przy użyciu tysięcy luster, z których każde przypisane jest konkretnemu punktowi na powierzchni płytki, na podstawie van Hal [5] i Venkatasubbarao [15]

Fig. 3. Microarray preparation using MAS, this method is used by NimbleGen, Xeotron and Febit. The UV light is directed by thousands of mirrors, each of them is connected with single spot, according to van Hal [5] and Venkatasubbarao [15]

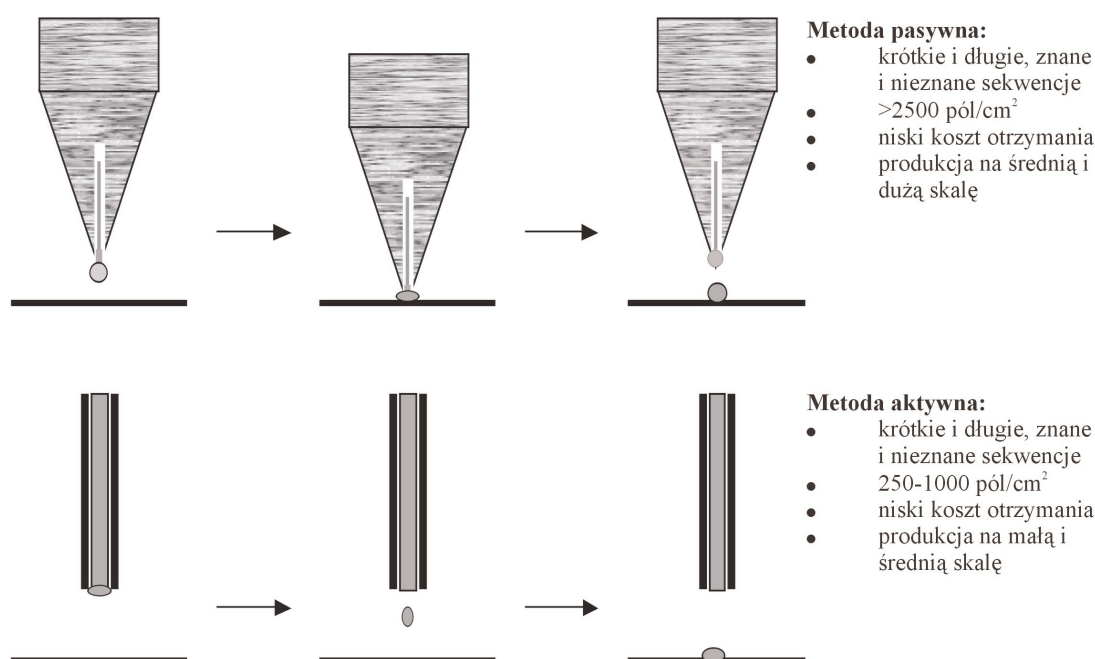
(DNA jest nakładane przez specjalną igłę/igły kontaktujące się z powierzchnią podłoża) i mniej wydajne pod względem gęstości sond, aktywne (Rys. 4). Metoda pozwala na bardzo wiele, można przykładowo aktualizować płytkę. Oligonukleotydy czy dłuższe, znane bądź nie, odcinki DNA mogą być deponowane różnie na różnych płytkach w zależności od potrzeb [5].

Jako podłoża używa się szkła lub membran, do których przytwierdza się DNA. W przypadku powierzchni szklanych używa się dodatkowo naładowanej warstwy polimeru (np. poli-L-lizyny) wiążącej ujemnie naładowane DNA [5, 10, 18]. Niestety, te oddziaływania obniżają swobodę konformacyjną związanego kwasu nukleinowego, obniżają więc powinowactwo do cząsteczek komplementarnych w badanych próbkach. Aby tego uniknąć można zastosować DNA modyfikowane na końcu 5', co umożliwi wiązanie kowalencyjne z niosącą grupy reaktywne powierzchnią szklaną [5, 19, 20]. Obecnie największą popularność zyskały płytki szklane z modyfikowaną powierzchnią. Nieustannie dążąc do zwiększenia pojemności mikromacierzy czy minimalizacji poziomu zakłóceń, testuje się także inne rodzaje podłoży, takie jak płytki pokryte złotem czy materiały tworzące strukturę trójwymiarową (np. bloczki żelu poliakrylamidowego), membrany nylonowe lub nitrocelulozowe, płytki pokryte nitrocelulozą [5, 21].

Przygotowanie próbek, hybrydyzacja i odczytanie sygnału

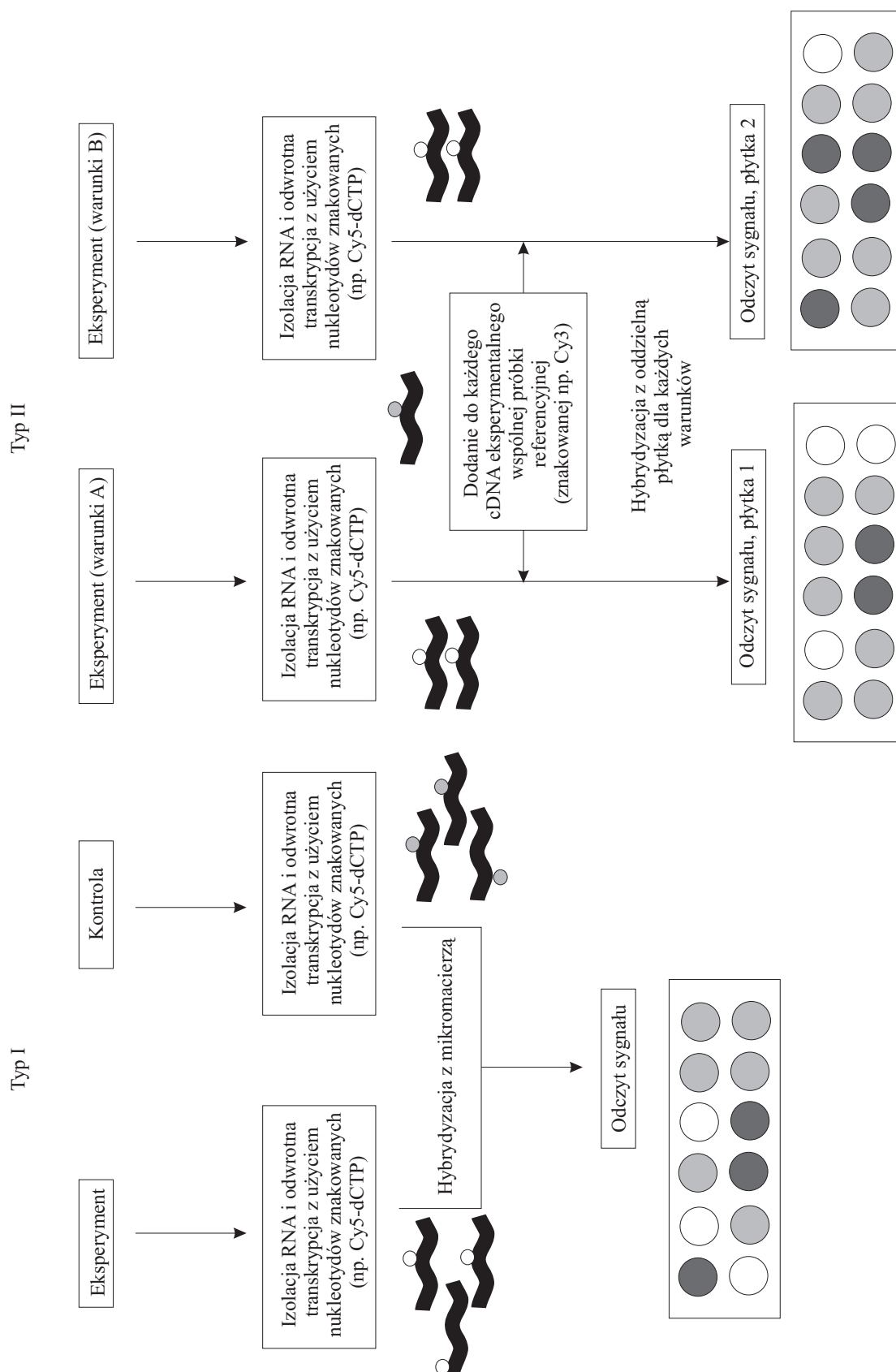
Przygotowanie materiału do analizy rozpoczyna się od izolacji RNA. Z frakcji mRNA w reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem znakowanych fluorochromami nukleotydów uzyskujemy wyznakowane cDNA. Ważne jest, aby analizowane dwie grupy cDNA były wyznakowane odmiennie. Najczęściej używa się zielonej Cy3 oraz czerwonej Cy5, rzadziej fluoresceiny i rodaminy. Cy5 posiada pewne wady. Zdarza się, że daje wysoki poziom tła fluorescencji na szklanych powierzchniach i jest bardziej podatna na rozpad podczas kolejnych skanowań. Wyznakowana pula genów w postaci cDNA jest nanoszona na macierz, na której hybrydują one z komplementarnymi sondami. Warunki hybrydyzacji, takie jak stężenie próbki, siła jonowa, temperatura, zależą głównie od wielkości fragmentów DNA obecnych na płytce i muszą być dobrane do konkretnego eksperymentu. Poziom fluorescencji w polach mikromacierzy będzie odpowiadał w sposób ilościowy poziomowi ekspresji każdego z analizowanych genów [5].

Poziom ekspresji RNA i sygnał hybrydyzacji wykazują zależność liniową w zakresie jednej kopii na 300 000 do około jednej kopii na 3000 transkryptów [22]. Stwierdzano poziomy detekcji rzędu jeden na 100 000 i jeden na 300 000 [22, 23], co sugeruje



Rys. 4. Metody produkcji mikromacierzy DNA, na podstawie van Hal [5]

Fig. 4. Microarray preparation methods, according to van Hal [5]



Rys. 5. Porównanie dwóch głównych typów eksperymentów z użyciem mikromacierzy, na podstawie Boothroyd i wsp. [12]

Fig. 5. Comparison of two general designs of microarray experiments, according to Boothroyd et. al. [12]

możliwość wykrycia jednej kopii genu na jedną do dziesięciu komórek. Potwierdzono także możliwość wykrycia dwu-trzykrotnej różnicy w ekspresji genów [19, 24]. Różnice ekspresji rzędu cztery-pięć razy można wykryć z około 95% prawdopodobieństwem, różnice rzędu dwa-trzy razy są wykrywalne z prawdopodobieństwem 50% [5].

Wszystkie eksperymenty z użyciem techniki mikromacierzy polegają zasadniczo na porównaniu polimorfizmu genów i/lub różnicy w poziomie ekspresji [12, 25–27]. Można wyróżnić dwa główne podejścia do projektowania tego typu doświadczeń porównawczych [12, 26]. Schematycznie przedstawiono je na Rys. 5. Eksperymenty Typu I polegają na wyznakowaniu różnymi fluorochromami dwóch próbek: eksperymentalnej i kontrolnej, i ich hybrydyzacji z sondami na wspólnej płytce. Po zeskanowaniu macierzy w odpowiednim czytniku będzie można przystąpić do analizy danych. Lokalizacja sond reprezentujących dany gen jest ściśle określona. Za pomocą odpowiednich siatek nanoszonych na obraz ze skanera (w przypadku znaczników Cy3 i Cy5 otrzymamy punkty zielone, czerwone i różne natężenia barw pośrednich) można precyzyjnie stwierdzić, które geny ulegają ekspresji w danych warunkach (eksperymentalnych czy kontrolnych), a które są aktywne w obu przypadkach, i po analizie poziomu natężenia fluorescencji, na jakim poziomie. Głównym ograniczeniem doświadczeń Typu I jest brak możliwości porównywania wyników z wielu płytek i eksperymentów. Doprowadziło to do opracowania Typu II, gdzie różne próbki wyznakowane tym samym fluorochromem analizuje się w odniesieniu do wspólnej kontroli, w przypadku której zastosowano inny znacznik, przy użyciu oddzielnych płytek.

Obecnie stosuje się trzy rodzaje wspólnych próbek referencyjnych. Są to: cDNA, produkty PCR i produkty PCR zawierające polilinker [12, 28–31]. Wspólna próbka cDNA powinna hybrydyzować ze wszystkimi polami mikromacierzy, co czasami jest niemożliwe w przypadku cDNA otrzymanego z materiału znajdującego się w określonych warunkach fizjologicznych. Pojawienie się nowych warunków wymaga wykonania nowych próbek. Aby ominąć tę przeszkodę, cDNA powinno być otrzymane z różnorodnego, szczegółowego pod względem warunków w jakich się znajdował w czasie kolekcji materiału. Taki materiał jest dostępny komercyjnie w przypadku mikromacierzy dla człowieka, myszy i szczura, jednak nie można mieć pewności, iż znajdują się tam geny indukowane w układzie pasożyt-żywiciel, po-

nadto w przypadku analiz parazytologicznych otrzymanie dużych ilości mRNA ze wszystkich stadiów rozwojowych jest często utrudnione. Alternatywą jest użycie produktów PCR odpowiadających wszystkim genom znajdującym się na mikromacierzy. Trzecia metoda bazuje na fakcie, iż często wszystkie sondy na płytce mają krótki, wspólny odcinek (np. polilinker wektora, w którym wstawki DNA były klonowane). W takiej sytuacji wspólny region można namnożyć (lub zsyntetyzować) i użyć jako wspólną próbkę referencyjną. Może ona być zastosowana nie tylko do standaryzacji sygnałów pochodzących z różnych płytek, ale w związku z tym, iż hybrydyzuje z każdą sondą w proporcji do ilości molarnej danego genu obecnego w mikromacierzy, do określenia względnej ilości transkryptów [12, 29, 30].

Do wizualizacji wyników eksperymentów używa się różnego rodzaju czytników. Dzielą się one na kamery CCD, skanery laserowe niekonfokalne i konfokalne skanery laserowe. Kamery CCD umożliwiają szybkie skanowanie, ale charakteryzują się niewielkim obszarem skanowania wynoszącym do 1 cm². Konfokalne skanery laserowe są zdecydowanie najlepsze pod względem wydajności odbioru promieniowania i uzyskiwanej rozdzielczości, dodatkowo posiadają małą głębię ostrości co redukuje artefakty, lecz także wymaga większej dokładności skanowania. Aby otrzymać wiarygodne ilościowe dane, średnica pojedynczego pola na mikromacierzy powinna mieć przynajmniej pięć-dziesięciokrotną wielkość piksela, co dla laserowych skanerów konfokalnych wynosi około 10 μm [5].

Analiza danych

Jedną z podstawowych trudności podczas analizy danych uzyskanych za pomocą mikromacierzy jest ustalenie, które z zaobserwowanych zmian są statystycznie istotne. Stosuje się dwa odmienne podejścia do tego problemu. Pierwszym jest ustalenie arbitralnych górnych granic jako dwu- lub trzykrotnych różnic pomiędzy dwoma sygnałami. Oczywistym ograniczeniem tego podejścia jest to, że próg arbitralny nie pozwala określić istotności statystycznej. Można także pominąć istotne biologicznie geny, które są regulowane na poziomie niższym niż wybrany próg. Alternatywą są programy takie jak SAM (ang. significance analysis of microarrays), które opracowano do identyfikacji istotnych statystycznie różnic w poziomach ekspresji; programy te bazują na powtarzaniu pomiarów dane-

go pola mikromacierzy. SAM pozwala na ustawienie parametrów wpływających na częstość odczytów fałszywie pozytywnych i identyfikację różnic w liczebności transkryptów bez względu na zmiany wartości ustalanych progów. Wyzwaniem dla badaczy, którzy pracują z organizmami, których genomy zostały zsekwencjonowane i opisane, jest stosowanie tych algorytmów statystycznych dla mikromacierzy na bazie nienormalizowanych bibliotek cDNA. SAM i inne algorytmy zostały zaprojektowane tak, aby traktować każde pole jako odrębny gen w przypadku konwencjonalnych mikromacierzy (człowiek, mysz, drożdże, *Escherichia coli*). Laboratoria pracujące z organizmami, których genomy nie zostały zsekwencjonowane często generują mikromacierze używając klonów z nienormalizowanych bibliotek cDNA, w których transkrypty o wysokim poziomie ekspresji będą nadreprezentowane [12].

Przykładowo, mikromacierze cDNA *Toxoplasma gondii* z naniesionymi około 4400 EST (ang. expressed sequence tag) z nienormalizowanej biblioteki EST bradyzoitów zawierały geny bradyzoitów o wysokim poziomie ekspresji takie jak BAG1 i SAG4, które były reprezentowane na płycie odpowiednio 70 i 23 razy. W celu analizy wszystkich tych sond jako pojedynczego genu, dane dotyczące każdej z nich zostały zgrupowane i została wyznaczona frakcja sond określonych przez SAM jako istotna. Co ważne, jeśli wcześniej opisane geny jako regulowane różnie w zależności od stadium rozwojowego były analizowane w ten sposób, olbrzymia większość sond zawierających istotne EST została zidentyfikowana przez SAM jako odmiennie regulowana [29].

Standaryzacja protokołów i porównywanie wyników z różnych platform

Jak opisano powyżej, technika mikromacierzy składa się z kilku etapów. Do każdego z nich opracowuje się protokół, według którego przeprowadzane są później eksperymenty. W laboratoriach na całym świecie powstało wiele takich protokołów [32–34].

Dostępność wielu platform różniących się od siebie pod wieloma względami rodzi pytanie o zgodność uzyskiwanych wyników. Porównanie mikromacierzy na bazie cDNA i chipów firmy Affymetrix wykazało bardzo niską korelację dla próbek z ludzkich nowotworowych linii komórkowych [35]. Porównywano także macierze cDNA

wykonane w laboratorium i macierze z Affymetrix Inc.; uzyskano zgodne wyniki w przypadku szeregu genów ze znaną regulacją [6, 36]. W badaniach porównawczych pomiędzy macierzami zawierającymi immobilizowane na płytce długie sondy oligonukleotydowe (70-mer) a chipami firmy Affymetrix produkowanymi metodą fotolitografii, gdzie próbkami był materiał ludzki, uzyskano korelację rzędu 0,8–0,9 [37]. Podobieństwo między macierzami na bazie niemodyfikowanych 70-merów na płytkach szklanych i macierzami na bazie cDNA wynosiło 0,80 [38]. W badaniach Li i wsp. [39] zarówno czułość, jak i specyficzność dla wybranych genów okazały się odmienne w analizach z zastosowaniem chipów Affymetrix Inc. i komercyjnymi macierzami zawierającymi cDNA; system oferowany przez Affymetrix okazał się bardziej wiarygodny. Park i wsp. [6] porównali trzy platformy oparte na różnego rodzaju sondach (Affymetrix MG-U74A, cDNA, nadrukowywane oligonukleotydy). W większości pomiarów uzyskano dosyć dobrą zgodność pomiędzy platformami Affymetrix i cDNA. Macierze oligonukleotydowe często nie dawały wyników zgodnych z pozostałymi. Stwierdzono także, iż analizy genów o wysokim poziomie ekspresji we wszystkich przypadkach dawały podobne rezultaty, w odróżnieniu od genów o niskim poziomie ekspresji.

Microarray Gene Expression Data Society (www.mged.org) uruchomiło system Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME). Celem MIAME jest ustalenie takich standardów dotyczących eksperymentów z użyciem mikromacierzy, które pozwolą na jednoznaczną weryfikację i interpretację wyników (<http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>, http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_checklist.html) [12].

Ograniczenia w ilości materiału do badań

Niektóre stadia rozwojowe pasożytów, takie jak *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* czy *Trypanosoma cruzi* mogą być hodowane *in vitro* z dosyć wysoką efektywnością. Istnieją też pasożyty, w których przypadku ta efektywność jest niska, a nawet zerowa. Nie opracowano bowiem satysfakcjonującej procedury hodowli *in vitro* chociażby *Plasmodium vivax*. Potrzeba analizowania takiego materiału biologicznego, dostępnego w bardzo małych ilościach, doprowadziła do powstania kilku nowych technik laboratoryjnych umożliwiających

ominięcie tego problemu. Wzorując się na procedurach hybrydyzacji *in situ* i immunofluorescencji opracowano tzw. dendromery, cząsteczki posiadające możliwość połączenia pojedynczej cząsteczki cDNA z setkami cząsteczek fluorescencyjnych. Alternatywą dla wzmocnienia powstałego sygnału jest zwielokrotnienie badanego materiału. Powszechnie stosuje się liniową amplifikację RNA prowadzącą do powstania cząsteczek cRNA z użyciem T7 RNA polimerazy [40, 41]. Technika polega na dodaniu sekwencji promotorowej dla T7Rpol do primera oligo(dT) używanego podczas syntezy pierwszej nici. Późniejsza synteza drugiej nici i transkrypcja *in vitro* jest przeprowadzana właśnie przez T7Rpol. W odróżnieniu od klasycznej reakcji PCR, zwielokrotnienie RNA przy użyciu tej techniki odbywa się liniowo. Warto nadmienić, iż tego rodzaju amplifikacja jest niezwykle dokładna oraz pozwala na zachowanie złożoności-charakteru próbki. W trakcie analizy zmian transkrypcyjnych, mających miejsce podczas cyklu wewnątrzerytrocytarnego w chromosomie 2 *Plasmodium falciparum*, przeprowadzonej z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydowych o wysokiej gęstości, zastosowano właśnie techniki amplifikacji RNA [12, 42]. Opisane techniki można także zastosować w badaniach zmian liczebności najrzadziej występujących transkryptów, trudnych do wykrycia w inny sposób mimo dostępności materiału parazytologicznego [12].

Do czego można wykorzystać mikromacierze?

Najczęstszym zastosowaniem mikromacierzy jest badanie różnic w ekspresji genów jako funkcji dowolnych zmiennych. Zmiennymi mogą być: czas w danej kondycji fizjologicznej, stadium rozwojowe, terapia farmaceutyczna, jednorodność populacji, infekcja, szczepienie, szczep, itp. Warto zauważyć, iż dla większości eksperymentów etap mikromacierzy jest pierwszym, nie ostatnim. Używa się ich jako swoistych genetycznych skanerów służących jako punkt wyjścia do rozwiązania złożonych szlaków molekularnych i komórkowych [12].

Jak już wspomniano technika mikromacierzy została opracowana na potrzeby onkologii. Z czasem zaczęto ją wykorzystywać w innych działach medycyny, głównie w parazytologii, ze względu na priorytetowe badania nad opracowaniem szczepionki przeciwko malarii. W przypadku onkologii, technika przekłada się przede wszystkim na możliwość porównania np. tkanki zdrowej i zaatakowanej

przez nowotwór pod względem wszystkich znanych onkogenów, reakcji poszczególnych genów na traktowanie farmaceutykami, możliwość identyfikacji genów odpowiadających za lekooporność, czy szeroko rozumianej analizy metabolizmu. Wykorzystanie macierzy SNP pozwala na detekcję szeregu mutacji w określonej grupie genów w przypadku konkretnego pacjenta cierpiącego na chorobę dziedziczną, umożliwi także szybkie genotypowanie.

Rozwój pasożytów i cykl życiowy

Badanie przy użyciu technik mikromacierzy zmian profilu transkrypcji genów podczas rozwoju organizmu to nowe narzędzie poszerzające możliwości badawcze parazytologów, które z pewnością pomoże w ustaleniu dokładnego przebiegu rozwoju pasożytów.

Profile transkrypcji trofozoitów *P. falciparum* w trakcie rozwoju w krwinkach czerwonych pokazały, iż występuje podwyższenie poziomu ekspresji grupy enzymów metabolicznych, w tym glikolitycznych, w chwili kiedy pasożyt ulega szybkiemu wzrostowi. Późne schizonty z kolei charakteryzują się zredukowanym ogólnym poziomem transkrypcji, z wyjątkiem grupy genów kodujących białka sygnałowe [43].

Analizy ekspresji genów podczas traktowania danego stadium rozwojowego w określony sposób (np. niedobory składników odżywczych w podłożu hodowlanym, obecność leku) może umożliwić identyfikację „wczesnych” genów, które prawdopodobnie są zaangażowane w zapoczątkowanie zmian rozwojowych, podobnie jak geny „późne”, które odpowiadają za unikalne właściwości metaboliczne i fizyczne tego stadium. Przykładowo, późne stadium tachyzoitów *Toxoplasma gondii* podczas przejścia w bradyzoity cechuje wzrost ekspresji wielu genów kodujących enzymy metaboliczne i antygeny sekrecyjne bradyzoitów [29].

Skonstruowano mikromacierze dla *Trypanosoma cruzi* zawierające 4400 sekwencji odpowiadających otwartym ramkom odczytu (ORF — z ang. open reading frame), a także losowym klonom z bibliotek genomowych (GSS library — z ang. genomic survey sequencing), (genom *T. cruzi* nie zawiera intronów) w celu określenia względnego poziomu występowania ich mRNA w stadium trypomastigoty oraz rozwijającym się stadium amastigoty. Zidentyfikowano 59 próbek GSS i ORF (43 GSS, 16 ORF), które z całą pewnością charakteryzują się podwyższonym poziomem ekspresji podczas trans-

formacji z trypomastigoty do amastigoty. Dokładne analizy tych 59 sekwencji doprowadziły do rozpoznania wśród nich 38 różnych genów. Wśród rozpoznanych genów były: kodujące białka metaboliczne (np. dehydrogenazy, peroksydazy, reduktazy, syntazy, transferazy); białka uczestniczące w syntezie innych białek (np. czynniki elongacyjne, białka rybosomalne); białka homologiczne do HSP; białka transportowe (np. transporter nukleozydów); gen białka z grupy odpowiadających za wzrost, podział komórki i syntezę DNA (centryna); gen białka strukturalnego RNA (25S rRNA). Zidentyfikowano także 13 białek o obniżonym poziomie ekspresji, w tym 3 białka metaboliczne. W przypadku stadium amastigoty rozpoznano kilkanaście wcześniej nie opisanych genów o podwyższonej ekspresji [44].

Podobne badania przeprowadzono dla *Trypanosoma brucei*; porównywano stadium bytujące w strumieniu krwi z procyklicznym. Ustalono, że około 300 sekwencji spośród ponad 21 tysięcy umieszczonych na macierzy ulega ekspresji na różnych poziomach. Wyniki sekwencjonowania pierwszych siedemdziesięciu wskazują, iż przede wszystkim różną ekspresją charakteryzują się geny podobne do kodujących główny antygen powierzchniowy (VSG — variant surface glycoprotein). W przypadku genów preferencyjnie ekspresjonowanych w stadium bytującym w strumieniu krwi, połowa zawierała sekwencje podobne do mRNA VSG. Potwierdzono wcześniejsze doniesienia o różnicach w ekspresji GPIPLC (glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase C) [45], dwóch VSG [46], terminatora transkrypcji locus EP [47] i genów alternatywnej oksydazy [48]. Wykryto także nie identyfikowane wcześniej: podjednostkę dehydrogenazy NADH, proteazę CAAX-prenylową, alternatywną oksydazę i białko GRESAG 2.1–1. Stadium procykliczne wykazało także ekspresję szeregu specyficznych białek np. przypuszczalnego transportera aminokwasów, białka HSP 83, podjednostki alfa ATPazy, podjednostki beta importyny, czy białka EP [49].

Ciekawych wniosków dostarczyły badania nad porównaniem trzech głównych stadiów rozwojowych *Leishmania major*: promastigoty, metacyklicznej promastigoty i amastigoty. Ustalono, iż frakcja genów, których mRNA wykazuje zmiany w poziomie występowania podczas cyklu infekcyjnego, wydaje się znacznie mniejsza niż zaobserwowana u innych organizmów. Zidentyfikowano ponad dwieście genów o różnym poziomie ekspresji w poszczególnych stadiach, zarówno genów o poznanej roli w biologii i wirulencji pasożyta, jak i ta-

kich, które dopiero są w trakcie analizowania. Rozpoznano grupę genów wykazujących związek z białkami o znanej funkcji, lecz których poziom transkrypcji nie był wcześniej znany. Przykładem może być metabolizm inozytolu: transkrypty syntazy inozytol-1-fosforanowej mają podwyższony poziom w stadiach amastigoty i metacyklicznym. Powierzchnia *L. major* jest bogata w cząsteczki zawierające inozytol, takie jak glikozylfosfatydyloinozytol (GPI), czy fosfoceramidy inozytolowe. Cząsteczki kotwiczące za pomocą GPI odpowiadają za wirulencję, inozytol jest też istotny dla przeżywalności pasożyta. Interesujące jest także to, że znaleziono pięć sekwencji zawierających powtórzone sekwencje telomerowe, wykazujących podwyższony poziom ekspresji w komórkach metacyklicznych i amastigoty, co sugeruje możliwość wpływania telomerów na ekspresję genów [50].

Największym wyzwaniem tego typu badań jest uzyskanie czystych preparatów badanego stadium rozwojowego i uzyskanie wystarczających ilości RNA. Metody hodowli *in vitro* na dużą skalę i możliwość selektywnej izolacji pasożytów na podstawie specyficznych dla określonych stadiów rozwojowych markerów molekularnych i/lub właściwości fizycznych często pozwalają na pokonanie tych trudności [12].

Genomika porównawcza

W literaturze fachowej można znaleźć wiele przykładów zastosowania mikromacierzy w genomice porównawczej pasożytów. Otrzymane wyniki mogą być punktem wyjścia dla lepszego zrozumienia patogenezy pasożytów, być może umożliwią także opracowanie metod zapobiegania, bądź walki z inwazjami pasożytniczymi.

Jakie czynniki u blisko spokrewnionych gatunków powodują, iż jeden z nich jest chorobotwórczy a drugi nie? Odpowiedzi na to pytanie poszukują od dawna epidemiolodzy i parazytologowie. Badania porównawcze z użyciem mikromacierzy pokazały, iż dla niektórych patogenów różnice w wirulencji mogą być wynikiem obecności, lub odwrotnie, braku pewnych krytycznych genów i/lub różnic w poziomie ich ekspresji [12]. Taka sytuacja może zaistnieć w przypadku dwóch gatunków pełzaków: chorobotwórczej *Entamoeba histolytica* oraz niepatogennej *Entamoeba dispar*. Okazało się, iż 98% genów jest identycznych u obu organizmów, jednakże zidentyfikowano również geny występujące tylko u *E. histolytica*, które mogą odpowiadać za jej chorobo-

twórczość [51, 52].

W przypadku przecinkowca cholery (*Vibrio cholera*) skuteczna transmisja z jednego żywiciela na drugiego wymaga, aby patogen posiadał zdolność do infekcji przed opuszczeniem zarażonego organizmu. Porównanie metodą mikromacierzy przecinkowców pobranych z kału chorych pacjentów z przecinkowcami hodowanymi *in vitro* wykazało dużo większą wirulencję tych pierwszych. Zidentyfikowano geny eksprymowane u *Vibrio cholera* izolowanych od chorych, kluczowe dla procesu transmisji [53].

Mikromacierzy można także użyć do porównania genomów atenuowanych szczepów szczepionkowych. Istnieją obawy, i jednocześnie sprzeciw, przeciwko stosowaniu tego typu szczepionek, ponieważ kolejne pasażę szczepu mogą doprowadzić do efektu akumulacji mutacji punktowych i delecyjnych, za czym mogłoby pójść zniesienie jego zdolności do wywoływania odporności [12]. Przykładowo różne szczepy potomne atenuowanych *Mycobacterium bovis*, BCG, wykazują różną zdolność w wywoływaniu odporności przeciwko infekcjom prątków gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis*. Chcąc wyjaśnić powody tych różnic użyto mikromacierzy z sondami odpowiadającymi całemu genomowi *M. tuberculosis* do hybrydyzacji z próbkami będącymi genomowym DNA *M. tuberculosis* oraz różnych potomnych szczepów BCG. Dzięki tym porównaniom ustalono, iż w szczepach BCG powstały i nagromadziły się delecje, co mogło doprowadzić do zdolności wywoływania odporności przeciwko *M. tuberculosis* [54].

Mikromacierze można by wykorzystać w badaniach nad pasożytami istotnymi ze względu na ich chorobotwórczość. Analizy lokalnych izolatów pasożytów mogą być kluczowe w zidentyfikowaniu genotypów związanych z unikalnymi cechami epidemiologicznymi i klinicznymi danego szczepu. Otrzymane wyniki mogłyby umożliwić szybką diagnozę i dobranie terapii optymalnej w przypadku danego szczepu [12].

Moser i wsp. [55] porównywała profile ekspresji dwóch form trzeciego stadium larwalnego (L3) *Ancylostoma caninum*: wolno żyjącą larwę inwazyjną oraz hodowaną *in vitro* stymulowaną surowicą larwę symulującą początkowe stadium pasożyta wewnątrz żywiciela. Skonstruowano macierz zawierającą 4191 klonów EST. Zidentyfikowano 113 genów różnie regulowanych u obu form larwalnych, wyniki potwierdzono reakcją PCR w czasie rzeczywistym. Wśród genów o obniżonym poziomie eks-

presji w formy stymulowanej surowicą wyróżniono siedem należących do rodziny białek sekrecyjnych ASP (ang. Ancylostoma secreted protein), chociaż także jedno białko ekskrecyjne o masie 24 kDa wykazujące podobieństwo do ASP charakteryzowało się podwyższoną ekspresją. Może to świadczyć o wzajemnie uzupełniającym się sposobie regulacji poszczególnych białek z rodzin istotnych pod względem pasożytnictwa pod wpływem stymulacji surowicą.

Analizowano także różnice w ekspresji genów u samców i samic *Schistosoma mansoni*. Wyznaczono 117 genów u samic i 80 u samców o zdecydowanie odmiennym poziomie ekspresji. Przeważająca część transkryptów skojarzonych z płcią męską jest zaangażowana w organizację strukturalną pasożyta, co kontrastuje z transkryptami wysoko eksprymowanymi u dorosłych samic biorącymi udział w rozrodzie i składaniu jaj. Do elementów strukturalnych występujących głównie u samców należą składniki układu mięśniowego, białka tegumentu i cytoskieletu. Uzyskano potwierdzenie na poziomie molekularnym zachowań samców polegających na opiece nad składającymi jaja samicami przejawiającej się w pomocy przy odżywianiu, transportowaniu przez naczynia krwionośne, czy dostarczaniu zewnątrzkomórkowych czynników wzrostu, samica w ten sposób może przeznaczyć wydatki energetyczne na produkcję jaj [56].

Innym ciekawym wynikiem było ustalenie zdecydowanie wyższego poziomu ekspresji podjednostki kanałów wapniowych V_B1 u samców niż u samic (dla odmiany $SmCaV_B2$ charakteryzują się zbliżonymi poziomami ekspresji). Fakt ten, a także podwyższony poziom ekspresji białka AHNAK (posiadającego szereg funkcji, w tym oddziaływanie z podjednostkami kanałów wapniowych typu L — 1, 2, 2a), tłumaczy zjawisko mniejszej wrażliwości samic na Prazikwantel (lek powodujący zakłócenie gospodarki Ca^{+} pasożyta) [56].

Szczepionki

Na całym świecie trwają prace nad opracowaniem szczepionek przeciwko najbardziej patogennym pasożytom. Jest to obecnie jeden z ważniejszych kierunków badawczych w parazytologii. Jednym z głównych problemów, z którym możemy się spotkać na wstępnym etapie opracowywania szczepionki to wybór antygeny. Pojawienie się techniki mikromacierzy może zdecydowanie ułatwić jego wytypowanie. Już na wstępnym etapie badań bę-

dziemy mieli pewność co do istotności wybranego celu szczepionki; dodatkowym atutem takiej drogi postępowania jest przyspieszenie jego typowania, a także uzyskanie informacji dotyczących wielu antygenów jednocześnie.

Najbardziej intensywne badania z wykorzystaniem technik mikromacierzy DNA dotyczą szczepionki przeciwko *Plasmodium falciparum*. Prowadzi się poszukiwania antygenów na bazie cDNA kodującego białka związane z błoną komórkową pasożyta, a także białka ekskrecyjno-sekrecyjne [56, 57].

Opisana wcześniej analiza genomu trypomastigoty i amastigoty *T. cruzi* [44], oprócz dostarczenia danych dotyczących różnic występujących w obu stadiach i genów uczestniczących w transformacji, miała służyć przede wszystkim właśnie do wytypowania potencjalnych antygenów szczepionkowych. Spośród uzyskanych wyników wybrano 37 genów, które będą analizowane pod kątem ich protekcyjności, m.in. wcześniej nieopisane geny regulowane dodatkowo u amastigoty (np.: CBS 5, EF 1 α , reduktaza pterydynowa, peptyd stadiowo-specyficzny, aminotransferazę tyrozynową, peroksydazę tryparedoksynową, ST1).

Fakt opracowania przez Affymetrix „chipu” dla nicienia modelowego *C. elegans*, z pewnością zaowocuje dużym przyspieszeniem badań służących opracowaniu szczepionki przeciwko nicieniom żołądkowo-jelitowym takim jak np. *Ancylostoma ceylanicum*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, czy niezwykle istotny z ekonomicznego punktu widzenia pasożyt małych przeżuwaczy (głównie owiec), *Haemonchus contortus*.

Interakcje pasożyt-żywiciel

Mikromacierze mogą być niezwykle użyteczne kiedy chcemy porównać ekspresję genów różnych stadiów rozwojowych, pasożytów znajdujących się w różnych warunkach czy jakkolwiek funkcję innych zmiennych, nie zapominajmy także o esencji parazytologii, jaką jest niewątpliwie wzajemne oddziaływanie pasożyta i żywiciela. Profilowanie transkrypcji zmian mających miejsce w komórkach żywiciela podczas infekcji, rozwoju pasożyta w fazie wczesnej i późnej, a także śmierci komórki żywiciela mogłoby dostarczyć kluczowych, nieosiągalnych wcześniej informacji. Zagadnienie można sprowadzić do trzech głównych pytań: (1) jak organizm żywiciela rozpoznaje fakt infekcji specyficznym patogenem i inicjuje stosowną odpowiedź immunologiczną? (2) jak pasożyt stymuluje tę odpo-

wieź? i (3) czy zmiany w transkrypcji genów żywiciela są korzystne dla niego, czy dla pasożyta? W przypadku niektórych patogenów użycie materiału izolowanego od zainfekowanego żywiciela może rodzić problem reakcji krzyżowych podczas hybrydyzacji transkryptów pasożyta i DNA żywiciela unieruchomionego na płytce. Niektóre wysoko konserwatywne geny pasożyta i żywiciela mogą mieć sekwencje na tyle podobne, iż będą hybrydować jedne z drugimi, np. geny niektórych białek rybosomalnych [58]. W praktyce takie geny występują, jednak stosunkowo rzadko, a specyficzność hybrydyzacji jest na tyle wysoka, że wspomniane trudności nie występują często. Takie przypadki są łatwo wykrywalne w eksperymentach pilotażowych, w których genomowe DNA pasożyta lub cDNA jest używane jako próbka nanoszona na mikromacierz zawierającą reprezentację genów żywiciela i odwrotnie [12].

Rozpoznanie przez system immunologiczny czynnika zakaźnego jest krytycznym etapem w inicjacji odpowiedzi immunologicznej przeciwko inwazji. Wyróżnia się aktywność komórek dendrytycznych, makrofagów i innych komórek odpowiedzi wrodzonej, występują także specyficzne aktywatory odpowiedzi wrodzonej, takie jak lipopolisacharydy, dwuniciowe RNA, mannan, metylowane DNA CpG (u kręgowców cytozyny szybko odnajdujące koniec 5' guanozyny są często metylowane, zależnie od tego czy dany gen jest transkrybowany czy nie) [12, 59, 60]. W wielu przypadkach zespół genów kodujących chemokiny, cytokiny i inne białka stresu jest wspólnie modulowany przez dany bodziec. Każdy bodziec stymuluje właściwe tylko dla niego pobudzenie ekspresji genów, co sugeruje iż odpowiedź wrodzona jest specyficzna dla każdego patogenu [12]. Niektóre pasożyty nie aktywują nawet części grupy genów odpowiedzi wczesnej. Przykładowo, odpowiedź zainfekowanych fibroblastów na dwa pasożyty wewnątrzkomórkowe, *T. gondii* i *T. cruzi*, różni się diametralnie. *T. gondii* stymuluje gwałtowną, klasyczną odpowiedź, natomiast *T. cruzi* indukuje dużo mniejszą reakcję, do tego zresztą zupełnie innego zestawu genów [61].

Geny zawiadujące odpowiedzią żywiciela na inwazję można podzielić na trzy klasy: (1) geny sprzyjające przeżyciu żywiciela („pro-żywiciel”); (2) geny sprzyjające rozwojowi pasożyta („pro-pasożyt”); oraz (3) geny regulowane w konsekwencji oddziaływań na dwie pierwsze klasy genów. Za pomocą mikromacierzy scharakteryzowano aktywację wielu genów z grupy „pro-żywiciel” (np. kodujące

interferon- γ , TNF- α , czy inne cytokiny) po stymulacji przez szereg patogenów. Dzięki takim analizom prawdopodobnie wkrótce zostaną zidentyfikowane kolejne takie geny. Geny „pro-pasożyt” nie są tak dobrze poznane. Opisano ich tylko kilka. Prawdopodobnie największym wyzwaniem czekającym biologów w przyszłości będzie zaszeregowanie genów do poszczególnych kategorii. Niemożliwe jest dokładne zbadanie każdego z setek modulowanych genów, dlatego na podstawie obecnego stanu wiedzy dotyczącej funkcji genów i biologii pasożyta trzeba będzie wytypować te, o przypuszczalnie największym znaczeniu. Ostatecznie, najbardziej użytecznych danych dostarczą analizy mutantów żywiciela (lub zmutowane linie komórkowe) produkujące mniej lub więcej jakiegoś białka. Ta droga okazała się niezwykle skuteczna podczas badań genów „pro-żywiciel” w ciągu ostatnich dwudziestu lat i taką pozostanie w analizach genów wytypowanych dzięki mikromacierzom. Ustalenie, jak pasożyt wpływa na zmiany w metabolizmie komórek żywiciela, będzie wymagało identyfikacji czynników modulujących transkrypcję żywiciela. Do tego doprowadzić może ustalenie jego szlaków transkrypcyjnych i sygnałowych, na które infekcja ma wpływ, a które będzie można poznać dzięki mikromacierzom [12].

Podsumowanie

Opisana technika jest uniwersalnym narzędziem badawczym, pozwalającym na uzyskanie cennych wyników. Jest to swego rodzaju przełom technologiczny, dzięki któremu możemy się spodziewać dużego przyspieszenia w rozwoju szeroko rozumianych nauk biologicznych.

Podziękowania

Autor dziękuje Pani prof. dr hab. Halinie Wędrychowicz za pomoc przy pisaniu manuskryptu.

Słowniczek

Sonda DNA — fragment DNA w formie jednoniciowej, komplementarny do określonej sekwencji

Gen wysoko konserwatywny — gen posiadający sekwencję nukleotydową identyczną lub prawie identyczną w odległych ewolucyjnie grupach organizmów

Nić sensowna — nić DNA o sekwencji odpowiadającej nici mRNA

Nić antysensowna — nić DNA komplementarna do nici sensownej

Oligonukleotyd — krótki (o długości do kilkudziesięciu zasad), jednoniciowy odcinek DNA

Polilinker — część wektora plazmidowego posiadająca sekwencję rozpoznawaną przez szereg różnych enzymów restrykcyjnych; po trawieniu wektora wybranymi enzymami do tej części przyłącza się klonowany fragment DNA (wstawka)

Primery (startery) linkerowe — primery komplementarne do sekwencji znajdujących się po obu stronach plilinkera umożliwiające namnożenie w reakcji PCR klonowanej wstawki

70-mery — oligonukleotydy o długości 70 zasad

Literatura

- [1] Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A* 74: 5350–5354.
- [2] Liang P., Pardee A.B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967–971.
- [3] Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K.W. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484–487.
- [4] Lennon G.G., Lehrach H. 1991. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends in Genetics* 7: 314–317.
- [5] van Hal N.L.W., Vorst O., van Houwelingen A.M.M.L., Kok E.J., Peijnenburg A., Aharoni A., van Tunen A.J., Keijer J. 2000. The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *Journal of Biotechnology* 78: 271–280.
- [6] Park P.J., Cao Y.A., Lee S.Y., Kim J., Chang M.S., Hart R., Choi S. 2004. Current issues for DNA microarrays: platform comparison, double linear amplification, and universal RNA reference. *Journal of Biotechnology* 112: 225–245.
- [7] Brown P.O., Botstein D. 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics* 21: 33–37.
- [8] Choi S., Hao W., Chen C.K., Simon M.I. 2001. Gene expression profiles of light-induced apoptosis in arrestin/rhodopsin kinase-deficient mouse retinas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 98: 13096–13101.
- [9] Lockhart D.J., Winzler E.A. 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405: 827–836.
- [10] Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467–470.
- [11] Grajkowska W., Czernicki T. 2002. Mikromacierze DNA (ang. cDNA microarray)-perspektywy wykorzystania w diagnostyce i terapii chorób nowotworowych ze szczególnym uwzględnieniem guzów ośro-

- kowego układu nerwowego. *Postępy Mikrobiologii* 41: 13–18.
- [12] Boothroyd J.C., Blader I., Cleary M., Singh U. 2003. DNA Microarrays in parasitology: strengths and limitations. *Trends in Parasitology* 10: 470–476.
- [13] Węgleński, P. 2000. Genetyka molekularna. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [14] Fodor S.P.A., Read J.L., Pirrung M.C., Stryer L., Lu A.T., Solas D. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251: 767–773.
- [15] Venkatasubbarao, S. 2004. Microarrays — status and prospects. *Trends in Biotechnology* 22: 630–637.
- [16] Singh-Gasson S., Green R.D., Yue Y., Nelson C., Blattner F., Sussman M.R., Cerrina F. 1999. Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital mirror array. *Nature Biotechnology* 17: 974–978.
- [17] Gao X., LeProust E., Zhang H., Srivannavit O., Gulari E., Yu P., Nishiguchi C., Xiang Q., Zhou X. 2001. A flexible light-directed A chipsynthesis gated by deprotection using solution photogenerated acids. *Nucleic Acids Research* 29: 4744–4750.
- [18] Shalon D., Smith S.J., Brown P.O. 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Research* 6: 639–645.
- [19] Schena M., Shalon D., Heller R., Chai A., Brown P.O., Davis R.W. 1996. Parallel human genome analysis microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 93:10614–10619.
- [20] Rogers Y.H., Jiang-Baucom P., Huang Z.J., Bogdanov V., Anderson S., Boyce-Jacino M.T. 1999. Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: a method for preparation of DNA microarrays. *Analytical Biochemistry* 266: 23–30.
- [21] Proudnikov D., Timofeev E., Mirzabekov A. 1998. Immobilization of DNA in polyacrylamide gel for the manufacture of DNA and DNA-oligonucleotide microchips. *Analytical Biochemistry* 259: 34–41.
- [22] 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. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology* 14: 1675–1680.
- [23] Johnston M. 1998. Gene chips: array of hope for understanding gene regulation. *Current Biology* 8: R171–R174.
- [24] Ruan Y., Gilmore J., Conner T. 1998. Towards Arabidopsis genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *Plant Journal* 15: 821–833.
- [25] Miller L.D., Long P.M., Wong L., Mukherjee S., McShane L.M., Liu E.T. 2002. Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer Cell* 2: 353–361.
- [26] Eisen M.B., Brown P.O. 1999. DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods in Enzymology* 303: 179–205.
- [27] Richter A., Schwager C., Hentze S., Ansorge W., Hentze M.W., Muckenthaler M. 2002. Comparison of fluorescent tag DNA labeling methods used for expression analysis by DNA microarrays. *Biotechniques* 33: 620–630.
- [28] Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E., Ma C., Losos I.S., Rosenwald A., Boldrick J.C., Sabet H., Tran T., Yu X., Powell J.I., Yang L., Marti G.E., Moore T., Hudson J.Jr, Lu L., Lewis D.B., Tibshirani R., Sherlock G., Chan W.C., Greiner T.C., Weisenburger D.D., Armitage J.O., Warnke R., Levy R., Wilson W., Grever M.R., Byrd J.C., Botstein D., Brown P.O., Staudt L.M. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503–511.
- [29] Cleary M.D., Singh U., Blader I.J., Brewer J.L., Boothroyd J.C. 2002. *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Eukaryotic Cell* 1: 329–340.
- [30] Dudley A.M., Aach J., Steffen M.A., Church G.M. 2002. Measuring absolute expression with microarrays with a calibrated reference sample and an extended signal intensity range. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 99: 7554–7559.
- [31] Sterrenburg E., Turk R., Boer J.M., van Ommen G.B., den Dunnen J.T. 2002. A common reference for cDNA microarray hybridizations. *Nucleic Acids Research* 30: E116.
- [32] Gash A.P. 2002. Yeast genomic expression studies using DNA microarrays. *Methods in Enzymology* 350: 393–414.
- [33] Klebes A., Biehs B., Cifuentes F., Kornberg T.B. 2002. Expression profiling of *Drosophila* imaginal discs. *Genome Biology* 3: R0038.
- [34] Hegde P., Qi R., Abernathy K., Gay C., Dharap S., Gaspard R., Hughes J.E., Snesrud E., Lee N., Quackenbush J. 2000. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques* 29: 548–562.
- [35] Kuo W.P., Jenssen T.K., Butte A.J., Ohno-Machado L., Kohane I.S. 2002. Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics* 18: 405–412.
- [36] Yuen T., Wurmbach E., Pfeffer R.L., Ebersole B.J., Sealfon S.C. 2002. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Research* 30: e48.
- [37] Barczak A., Rodriguez M.W., Hanspers K., Koth L.L., Tai Y.C., Bolstad B.M., Speed T.P., Erle D.J. 2003. Spotted long oligonucleotide arrays for human gene expression analysis. *Genome Research* 13: 1775–1785.
- [38] 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. Assessing unmodified 70-mer oligonucleotide probe performance on glass-slide microarrays. *Genome Biology* 4: R5.
- [39] Li J., Pankratz M., Johnson J.A. 2002. Differential gene expression patterns revealed by nucleotide versus long cDNA arrays. *Toxicological Sciences* 69: 383–390.
- [40] Luo L., Salunga R.C., Guo H., Bittner A., Joy K.C., Galindo J.E., Xiao H., Rogers K.E., Wan J.S., Jackson M.R., Erlander M.G. 1999. Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nature Medicine* 5: 117–122.
- [41] van Gelder R.N., von Zastrow M.E., Yool A., Dement W.C., Barchas J.D., Eberwine J.H. 1990. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 87: 1663–1667.
- [42] Le Roch K.G., Zhou Y., Batalov S., Winzeler E.A. 2002. Monitoring the chromosome 2 intraerythrocytic transcriptome of *Plasmodium falciparum* using oligonucleotide arrays. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67: 233–243.
- [43] Mamoun B.C., Gluzman I.Y., Hott C., MacMillan S.K., Amarakone A.S., Anderson D.L., Carlton J.M., Dame J.B., Chakrabarti D., Martin R.K., Brownstein B.H., Goldberg D.E. 2001. Co-ordinated programme of gene expression during asexual intraerythrocytic development of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* revealed by microarray analysis. *Molecular Microbiology* 39: 26–36.
- [44] Minning T.A., Bua J., Garcia G.A., McGraw R.A., Tarleton R.L. 2003. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 131: 55–64.
- [45] Carrington M., Bülow R., Reinke H., Overath P. 1989. Sequence and expression of the glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 33: 289–296.
- [46] Ziegelbauer K., Multhaup G., Overath P. 1992. Molecular characterization of two invariant surface glycoproteins specific for the bloodstream stage of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry* 267: 10797–10803.
- [47] Berberof M., Pays A., Lips S., Tebabi P., Pays E. 1996. Characterization of a transcription terminator of the procyclin PARP A unit of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology* 16: 914–924.
- [48] Chaudhuri M., Hill G.C. 1996. Cloning, sequencing and functional activity of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. *Molecular and Biochemical Parasitology* 83: 125–129.
- [49] Diehl S., Diehl F., El-Sayed N.M., Clayton C., Hoheisel J.D. 2002. Analysis of stage-specific gene expression in the bloodstream and the procyclic form of *Trypanosoma brucei* using a genomic DNA-microarray. *Molecular and Biochemical Parasitology* 123: 115–123.
- [50] Akopyants N.S., Matlib R.S., Bukanova E.N., Smeds M.R., Brownstein B.H., Stormo G.D., Beverley S.M. 2004. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 136: 71–86.
- [51] Diamond L.S., Clark C.G. 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 40: 340–344.
- [52] Clark C.G., Diamond L.S. 1997. Intraspecific variation and phylogenetic relationships in the genus *Entamoeba* as revealed by riboprinting. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44: 142–154.
- [53] Merrell D.S., Butler S.M., Qadri F., Dolganov N.A., Alam A., Cohen M.B., Calderwood S.B., Schoolnik G.K., Camilli A. 2002. Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature* 417: 642–645.
- [54] Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P., Salamon H., Schoolnik G.K., Rane S., Small P.M. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284: 1520–1523.
- [55] Moser J.M., Freitas T., Arasu P., Gibson G. 2005. Gene expression profiles associated with the transition to parasitism in *Ancylostoma caninum* larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology* 143: 39–48.
- [56] Fitzpatrick J.M., Johnston D.A., Williams G.W., Williams D.J., Freeman T.C., Dunne D.W., Hoffmann K.F. 2005. An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* and its application/use to investigate gender-associated gene expression. *Molecular and Biochemical Parasitology* 141: 1–13.
- [57] Diehn M., Eisen M.B., Botstein D., Brown P.O. 2000. Large-scale identification of secreted and membrane-associated gene products using DNA microarrays. *Nature Genetics* 25: 58–62.
- [58] Rathod P.K., Ganesan K., Hayward R.E., Bozdech Z., DeRisi J.L. 2002. DNA microarrays for malaria. *Trends in Parasitology* 18: 39–45.
- [59] Blader I.J., Manger I.D., Boothroyd J.C. 2001. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. *Journal of Biological Chemistry* 276: 24223–24231.
- [60] Huang Q., Liu D., Majewski P., Schulte L.C., Korn J.M., Young R.A., Lander E.S., Hacohen N. 2001. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* 294: 870–875.
- [61] Boldrick J.C., Alizadeh A.A., Diehn M., Dudoit S., Liu C.L., Belcher C.E., Botstein D., Staudt L.M., Brown P.O., Relman D.A. 2002. Stereotyped and spe-

cific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 99: 972–977.

[62] de Avalos S.V., Blader I.J., Fisher M., Boothroyd J.C., Burleigh B.A. 2001. Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal mo-

dulation of host cell transcription. *Journal of Biological Chemistry* 277: 639–644.

Wpłynęło 7 października 2005,
Zaakceptowano 5 stycznia 2006