

40. *Fragu P, Schlumberger M, Davy JM, Slama M, Berdeaux A.* Effects of amiodarone therapy on thyroid iodine content as measured by X-ray fluorescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:762–9.
41. *Martino E, Aghini-Lombardi F, Lippi F i sur.* Twenty-four hour radioactive iodine uptake in 35 patients with amiodarone associated thyrotoxicosis. *J Nucl Med* 1985;26:1402–7.
42. *Bartalena L, Grasso L, Brogioni S, Aghini-Lombardi F, Braverman LE, Martino E.* Serum interleukin-6 in amiodarone-induced thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:423–7.
43. *Bogazzi F, Bartalena L, Brogioni S i sur.* Color flow doppler sonography rapidly differentiates type I and type II amiodarone-induced thyrotoxicosis. *Thyroid* 1997;7:541–5.
44. *Bartalena L, Brogioni S, Grasso L, Rago T, Vitti P, Martino EM.* Interleukin-6: a marker of thyroid-destructive processes? *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1424–7.
45. *Bartalena L, Brogioni S, Grasso L, Martino E.* Increased serum interleukin-6 concentration in patients with subacute thyroiditis: relationship with concomitant changes in serum T4-binding globulin concentration. *J Endocrinol Invest* 1993;16:213–8.
46. *Roti E, Minelli R, Gardini E i sur.* Iodine-induced subclinical hypothyroidism in euthyroid subjects with a previous episode of amiodarone-induced thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1273–7.
47. *Sato K, Miyakawa M, Eto M i sur.* Clinical characteristics of amiodarone-induced thyrotoxicosis and hypothyroidism in Japan. *Endocr J* 1999;46:443–51.
48. *Jukić T, Staničić J, Petric V, Kusić Z.* Radioaktivni jod-131 ili kirurški zahvat u liječenju Gravesove hipertireoze. *Liječ Vjesn* 2010;132:355–60.
49. *Martino E, Aghini-Lombardi F, Mariotti S i sur.* Treatment of amiodarone associated thyrotoxicosis by simultaneous administration of potassium perchlorate and methimazole. *J Endocrinol Invest* 1986;9:201–7.
50. *Reichert LJM, de Rooy HAM.* Treatment of amiodarone induced hyperthyroidism with potassium perchlorate and methimazole during amiodarone treatment. *Br Med J* 1989;298:1547–8.
51. *Trip MD, Duren DR, Wiersinga WM.* Two cases of amiodarone-induced thyrotoxicosis successfully treated with a short course of anti-thyroid drugs while amiodarone was continued. *Br Heart J* 1994;72:266–8.
52. *Kusić Z, Jukić T, Franceschi M i sur.* Smjernice Hrvatskog društva za štitnjaču za racionalnu dijagnostiku poremećaja funkcije štitnjače. *Liječ Vjesn* 2009;131:328–38.
53. *Singh BN, Connolly SJ, Crijns HJ i sur.* Dronedaron for maintenance of sinus rhythm in atrial fibrillation or flutter. *N Engl J Med* 2007;357:987–99.
54. *Davy JM, Herold M, Hoglund C i sur.* Dronedaron for the Control of Ventricular Rate in Permanent Atrial Fibrillation: The Efficacy and Safety of Dronedaron for the Control of Ventricular Rate During Atrial Fibrillation (ERATO) Study *Am Heart J* 2008;156(3):527.e1–527.e9.
55. *Hohnloser SH, Connolly SJ, Crijns HJ, Page RL, Seiz W, Torp-Petersen C.* Rationale and design of ATHENA: A placebo-controlled, double-blind, parallel arm trial to assess the efficacy of dronedaron 400 mg bid for the prevention of cardiovascular hospitalization or death from any cause in patients with atrial fibrillation/atrial flutter. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008;19:69–73.
56. *Duray GZ, Torp-Petersen C, Connolly SJ, Hohnloser SH.* Effects of Dronedaron on Clinical Outcomes in Patients with Lone Atrial Fibrillation: Pooled Post Hoc Analysis from the ATHENA/EURIDIS/ADONIS Studies. *J Cardiovasc Physiol* doi: 10.1111/j.1540-8167.2010.02006.x

## SITNOPOLJE I ANALIZA GENSKOG IZRAŽAJA

### MICROARRAY AND GENE EXPRESSION ANALYSIS

LOVRO LAMOT, MANDICA VIDOVIĆ, MARIJA PERICA,  
LANA TAMBIĆ BUKOVAC, MIROSLAV HARJAČEK\*

**Deskriptori:** DNA čip; Analiza genskog izražaja; Genom; Regulacija genskog izražaja; Genomska hibridizacija; Genske mreže

**Sažetak.** Analiza genskog izražaja s pomoću sitnopolja visokopropusna je metoda u kojoj je mnoštvo molekula DNA različite duljine pričvršćeno za čvrstu podlogu u točno određenim točkama i s pomoću njih se otkriva prisutnost odgovarajućih označenih molekula RNA koje se izoliraju iz ispitivanih bioloških uzoraka. Temeljni princip na kojem počiva sitnopolje jest sparivanje komplementarnih nukleotida (A-T i C-G), što dovodi do stvaranja nukleinskih kiselina s dvostrukom uzvojnicom. Razlike u genskom izražaju između dvije skupine uzoraka otkrivaju se i kvantificiraju usporedbom vrijednosti intenziteta signala točaka na skupinama pločica na kojima se ispitivani uzorci hibridiziraju. Za sistematsku analizu rezultata dobivenih mjerenjem genskog izražaja na sitnopolju rabi se analiza grupa i analiza obilježja te analiza mreža i putova. Usporedbom izražaja svih gena u različitim stanicama iste jedinice ili u istim stanicama različitih jedinki može se dobiti uvid u mehanizme odgovorne za razvoj nekog stanja ili bolesti.

**Descriptors:** Oligonucleotide array sequence analysis – methods, instrumentation; Gene expression profiling; Genome; Gene expression regulation; Nucleic acid hybridization; Gene regulatory networks

**Summary.** Microarray gene expression analysis is high-throughput method in which many different sized DNA molecules are attached to solid surface in designated spots. These molecules are used for the discovery of specific RNA molecules isolated from various biological samples of interest. Core principle of this method is hybridization of complementary nucleotides (A-T and G-C), which leads to creation of double stranded nucleic acids. Gene expression differences in two groups of samples are discovered and quantified by comparison of signal intensity values in microarray spots. Systemic analysis of data gathered in microarray gene expression measurement is performed by various bioinformatic methods such

\* **Odjel za reumatologiju, Dječja bolnica Srebrnjak** (dr. sc. Lovro Lamot, dr. med.; Mandica Vidović, dr. med.; Marija Perica, dr. med.; prim. mr. sc. Lana Tambić Bukovac, dr. med.; izv. prof. dr. sc. Miroslav Harjaček, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. L. Lamot, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Odjel za reumatologiju, Dječja bolnica Srebrnjak, Srebrnjak 100, 10000 Zagreb, e-mail: lovro.lamot@gmail.com

Primljeno 7. lipnja 2014., prihvaćeno 20. travnja 2015.

as group analysis, annotation analysis as well as network and pathway analysis. Expression comparison of all genes in different cells of the same individual or same cells of different individuals provides an insight into the mechanism responsible for development of a certain condition or disease.

Liječ Vjesn 2015;137:188–195

Prije više od 30 godina britanski biolog Edwin Southern opisao je metodu kojom se u molekuli DNA može otkriti određeni slijed nukleotida, a njemu u čast tehnika je nazvana *Southern-blot* hibridizacija.<sup>1</sup> Nedugo nakon toga opisana je metoda kojom se može dokazati prisutnost određenih sljedova RNA, a zbog svojih sličnosti sa *Southern-blot* hibridizacijom nazvana je *northern-blot*.<sup>2</sup> Tom se metodom ukupna RNA ili mRNA izolirana iz ispitivanih stanica ili tkiva može elektroforezom na agar-gelu razdvojiti prema veličini, upijanjem (engl. *blotting*) prenijeti na nitrocelulozne membrane te hibridizirati s odgovarajućim označenim sljedovima DNA kako bi se odredila prisutnost tražene RNA. Slična metoda razvijena je i za otkrivanje proteina, a nazvana je *western-blot*.<sup>3</sup> Osim toga razvijena je i *dot blot* metoda u kojoj nije potrebno razdvajanje molekula elektroforezom, već se molekule na membranu nanose direktno u obliku točkastih mrlja (engl. *dot blot*).<sup>4</sup> Navedeni postupci omogućili su razvoj visokopropusne metode u kojoj je mnoštvo različitih molekula pod nazivom probe (engl. *probes*) pričvršćeno za čvrstu podlogu u točno određenim točkama (engl. *spots* ili *featers*) i s pomoću njih se otkriva prisutnost odgovarajućih označenih molekula koje se nazivaju ciljne molekule (engl. *targets*).<sup>5</sup> Probe imaju velik afinitet i specifičnost za ciljne molekule koje se u otopini nanose na podlogu. Sve točke poredane su u nizove (engl. *array*) smještene na pločicu (engl. *chip*) koja može biti od stakla, polimernih materijala ili silikona, a nije veća od normalnog stakalca za mikroskopiranje (slika 1.A). Upravo zbog toga navedena se pločica na engleskom jeziku naziva *microarray*, što bi u prijevodu na hrvatski jezik značilo sitnopolje ili sitnopolje.<sup>\*\*6</sup> Slično kao kod prije spomenutih metoda, i ovdje dolazi do reakcije ciljnih molekula i proba u procesu koji se zove hibridizacija (slika 1.B). Ciljne molekule prije ili poslije hibridizacije označavaju se fluorescentnim molekulama ili drugim bojama, kako bi se mogla otkriti reakcija ciljne molekule i probe. Budući da se na jednoj pločici obično nalazi nekoliko tisuća do nekoliko milijuna proba, glavna je prednost ove metode mogućnost paralelnog obavljanja brojnih analiza s pomoću kojih se može proučavati ukupni genom, transkriptom ili proteom. Nadalje, postoje i pločice koje sadržavaju desetke ili stotine proba, a rabe se za jeftino genotipiziranje virusa ili bakterija. Probe koje se rabe na pločicama mogu biti molekule cDNA umnožene PCR-om, oligonukleotidi, plazmidi ili bakterijski umjetni kromosomi (engl. *bacterial artificial chromosome*, BAC), proteini, antitijela, DNA ili RNA aptameri koji se rabe za otkrivanje određenih molekula, male molekule te ugljikohidrati. Velik broj različitih proba koje se mogu upotrijebiti na pločici stoga omogućuje široku primjenu ove metode.

Pločice ili čipovi najčešće se rabe za analizu genskog izražaja, odnosno za procjenu relativne razlike u izražaju gena između dviju različitih populacija stanica (npr. stanice oboljelih i stanice zdravih ili stanice liječenih i stanice ne liječenih bolesnika). S pomoću ove metode može se procijeni

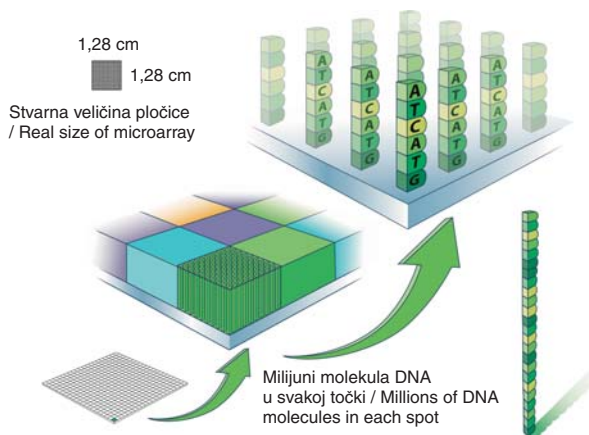
omjer smanjenog ili povećanog izražaja za svaki gen, no ne i količina (apsolutni broj molekula) mRNA u stanicama (slika 2.).<sup>7</sup> Nakon sekvencioniranja ljudskoga genoma čipovi su se počeli uvelike rabiti za istraživanje fiziologije stanice te za otkrivanje mehanizama različitih bolesti i mogućih dijagnostičkih biljega (engl. *markers*). Ujedno, ova je metoda našla primjenu u ispitivanju onečišćenosti vode analiziranjem genskog izražaja školjaka, zatim u određivanju biokompatibilnosti površina i mikročipova sa staničnim kulturama te pri analizi odgovora na zračenje. Ovisno o probama koje se rabe za analizu genskog izražaja može se upotrijebiti DNA čip, ekson čip te siRNA čip.

Osim za analizu genskog izražaja čipovi se rabe za otkrivanje polimorfizama pojedinačnog nukleotida u genomu (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) te za otkrivanje mutacija u genima. Nadalje, upotrebljavaju se za otkrivanje velikih delecija i amplifikacija u genomu s pomoću komparativne genomske hibridizacije (engl. *comparative genomic hybridization*, CGH) te za određivanje sljedova DNA na koje se vežu određeni proteini s pomoću kromatinske imunoprecipitacije (engl. *chromatin immunoprecipitation*, ChIP). Čipovi se mogu rabiti za otkrivanje patogena, za analizu mutacija u mitohondriju te za analizu razlika u određenom slijedu genoma s pomoću rekvencioniranja. Naposljetku, na čipu se mogu provoditi i reakcije složenije od hibridizacije, kao što je npr. reakcija transfekcije kojom strana DNA ulazi u eukariotsku stanicu s pomoću plazmida poredanih na staklenoj površini u točno određenom nizu. Plazmidi se mogu upotrijebiti i kao predložak za »pravodobno« (engl. *just in time*) *in situ* stvaranje proteinskog čipa, pri čemu se plazmidi koji nose različite gene nanose na površinu zajedno s antitijelom koje učvršćuje nastale proteine u određenoj točki, a tako dobiveni čip rabi se za proučavanje proteinskih interakcija.

### Grada DNA čipa

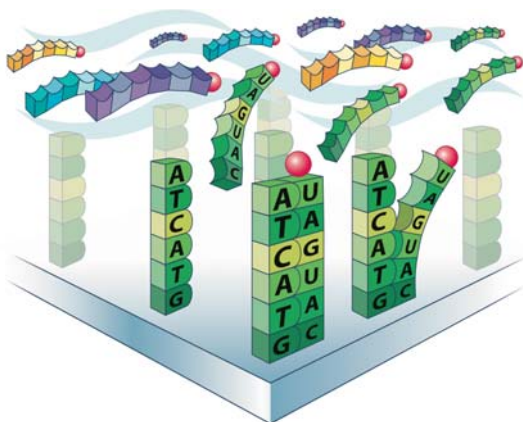
Probe na DNA čipu mogu biti molekule cDNA dužine 400 do 1 000 parova baza (engl. *base pairs*, bp) ili oligonukleotidi dužine manje od 200 bp.<sup>8</sup> Temeljni princip na kojem počiva DNA čip jest sparivanje komplementarnih nukleotida (A-T i C-G), što dovodi do stvaranja nukleinskih kiselina s dvostrukom uzvojnicom. Na površinu DNA čipa probe dolaze tiskanjem ili direktnom sintezom. Tiskanjem nastaju duže probe veće specifičnosti za ciljne molekule, dok direktnom sintezom nastaju kraće probe manje specifičnosti, ali veće gustoće, zbog čega svaki gen može biti predstavljen s više proba. Probe se tiskaju s pomoću kontaktnog ili nekotaktnog stroja za tiskanje koji na površini pločica ostavlja kapljice volumena nekoliko pL do nekoliko mL u kojima se nalaze probe.<sup>9</sup> Za tiskanje se rabe staklene pločice, najlonske membrane ili pločice s udubinama (engl. *beads, tubes*), a kao probe se upotrebljavaju cDNA ili oligonukleotidi.<sup>10</sup> Nakon tiskanja oligonukleotidi se za površinu vežu kovalentnim vezama, a cDNA elektrostatskim silama. Otisnute pločice mogu se napraviti u laboratoriju, a s obzirom na to da se probe sintetiziraju na temelju predložaka iz knjižnica u kojima su pohranjeni sljedovi DNA različitih organizama, pločice se mogu rabiti čak i za analizu organizama čiji genom još nije sekvencioniran. No, zbog male gustoće točaka koja se postiže tiskanjem razvijena je tehnolo-

\*\* S obzirom na to da se riječi sitnopolje i sitnopolje još nisu udomaćile u hrvatskom jeziku, u ovom će se radu za prijevod engleske riječi *microarray* najčešće rabiti riječi čip ili pločica, no važno je napomenuti da se u nedavno izašloj knjizi »Pedijatrijska reumatologija« prvi put u stručnoj literaturi na hrvatskom jeziku rabi riječ sitnopolje.

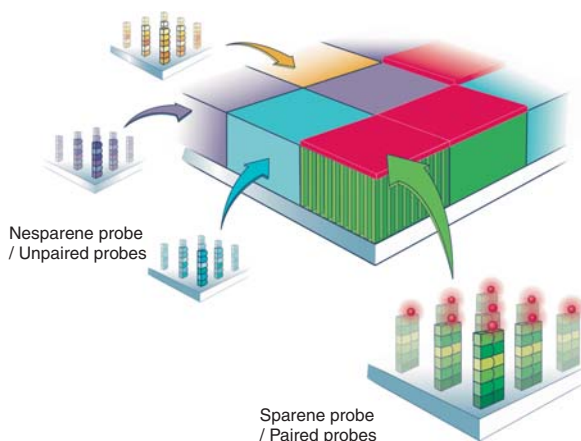


6,5 milijuna točaka na svakoj pločici / 6.5 million of spots on each microarray  
1 molekula DNA = 25 parova baza / DNA molecule = 25 base pairs

A) Grada sitnopolja. Na svakoj pločici nalazi se oko 6,5 milijuna točaka u kojima su pričvršćeni milijuni molekula DNA (probe) koje čine cjelokupni ljudski genom. S pomoću tih oligonukleotidnih proba otkriva se prisutnost odgovarajućih označenih molekula RNA (ciljnih molekula) dobivenih izolacijom iz ispitivanih stanica. / A) Microarray architecture. Each microarray has around 6.5 millions of spots in which millions of DNA molecules are attached. These attached DNA molecules are called probes and they represent the whole humane genome. Probes are used for the detection of labeled RNA molecules called targets, which are isolated from cells of interest.



B) Hibridizacija (sparivanje). Označene ciljne molekule RNA hibridiziraju se s odgovarajućim molekulama DNA (probama) pričvršćenima na pločicu. / B) Hybridization (pairing) process. Labeled RNA target molecules are hybridized with compatible DNA molecules (probes) attached to microarray.

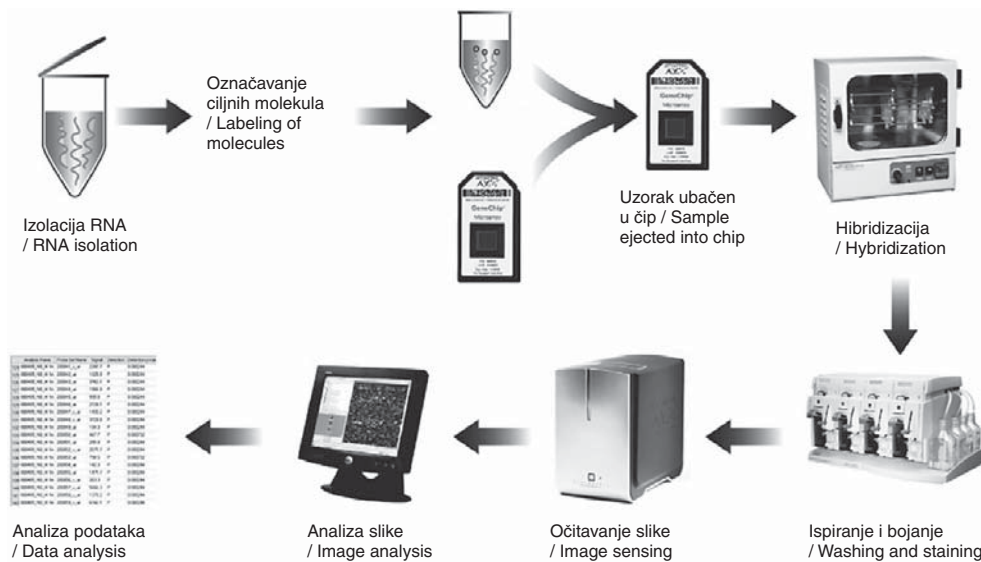


C) Očitavanje signala. Nakon sparivanja proba s označenim ciljnim molekulama odstranjuju se nesparene ciljne molekule te se u svakoj točki na pločici očitavaju vrijednosti intenziteta fluorescencije sparenih proba. / C) Signal detection. After hybridization of probes and labeled target molecules, non-hybridized target molecules are washed out and fluorescence intensity values of hybridized probes are measured in each spot.

logija koja omogućava sintezu oligonukleotida direktno na površini pločice, a tako dobivene pločice nazivaju se oligonukleotidni nizovi visoke gustoće (engl. *high-density oligonucleotide arrays*).<sup>11</sup> Jedan od takvih čipova je i GeneChip® (slika 1.A), koji je razvila američka tvrtka Affymetrix (Santa Clara, CA, SAD). Spomenuti čip proizvodi se jedinstvenom fotolitografskom tehnikom, sličnom onoj koja se rabi za proizvodnju mikroelektroničkih čipova, u kombinaciji s kemijskim reakcijama razvijenim za kombinatornu kemiju s pomoću kojih se stvara velik broj spojeva u samo jednoj reakciji.<sup>12</sup> U proizvodnji se upotrebljavaju kvarcne pločice obložene tankim slojem reagensa osjetljivog na svjetlo, koji sprječava kovalentno vezanje aktiviranih nukleotida. Izlaganje svjetlu uzrokuje odstranjivanje zaštite s površine i omogućava vezanje aktiviranih nukleotida. Vezani nukleotidi također imaju zaštitu osjetljivu na svjetlo koja se odstranjuje ponovnim izlaganjem svjetlu. Kako bi se svjetlo propuštalo samo na određene točke, rabe se litografske maske s pomoću kojih se određuje poredak nukleotida u rastućim oligonukleotidima. U ciklusima u kojima se izmjenjuju stavljanje maski, izlaganje svjetlu i vezanje nukleotida na površini pločice sintetiziraju se oligonukleotidi koji naposljetku sadržavaju 25 nukleotida. S obzirom na to da tako kratki oligonukleotidi katkad nisu dovoljno specifični, svaka odgovarajuća proba (engl. *match*) ima svoju negativnu kontrolu koja se razlikuje u samo jednom nukleotidu smještenom u sredini probe i zove se neodgovarajuća proba (engl. *mismatch*). Odgovarajuća i neodgovarajuća proba čine par proba (engl. *probe pair*), a uporaba parova proba omogućuje otkrivanje grešaka u hibridizaciji (engl. *cross-hybridization*). Jedan gen obično predstavlja 11 – 15 parova proba koji se zajednički nazivaju skupom proba (engl. *probe set*). Sljedovi koji se rabe u parovima proba odabiru se iz regije mRNA koju čini 600 baza proksimalno od poliadenilacijskog mjesta (3'-kraj), dok se odgovarajuća mRNA odabire složenim bioinformatičkim tehnikama iz različitih javno dostupnih izvora poput GeneBanka, dbEST-a i RefSeqa. Osim skupova proba koji predstavljaju odabrane gene na svakom GeneChipu nalaze se i skupovi proba koji predstavljaju gene izražene u svim stanicama (engl. *housekeeping gene*), tako da je svaki od tih gena zastupljen s tri skupa proba, od kojih jedan predstavlja 5'-kraj, jedan sredinu, a jedan 3'-kraj. Spomenute probe služe za kontrolu kvalitete hibridizirane RNA. Nadalje, na GeneChipu nalaze se i kontrolni skupovi proba (engl. *spike-in control probe*) koji se hibridiziraju s kontrolnom RNA (engl. *spike-in RNA*) te se rabe za kalibraciju prilikom očitavanja. Vrlo velika gustoća točaka na GeneChipu dopušta i velik broj kontrola, a automatizirani procesi provođenja eksperimenta jamče vrlo visok stupanj ponovljivosti (engl. *reproducibility*). Upravo zbog toga na GeneChipu je moguće provoditi eksperimente u kojima se probe hibridiziraju s ciljnim molekulama iz samo jedne populacije stanica (engl. *one-channel experiments*), za razliku od većine ostalih čipova na kojima se zbog razlika koje nastaju prilikom proizvodnje čipa, a koje utječu na omjer izražaja (engl. *expression ratio*), probe istodobno hibridiziraju s različito označenim ciljnim molekulama izoliranim iz dviju različitih populacija stanica (engl. *two-channel experiments*). Osim toga GeneChip dopušta uporabu mnogih tehnika označavanja ciljnih mole-

◀ Slika 1. Shematski prikaz Affymetrixova GeneChip® sitnopolja. Preuzeto uz dozvolu Affymetrix.

Figure 1. Schematic presentation of the Affymetrix GeneChip® microarray. Adapted with permission from Affymetrix.



Slika 2. Potrebni koraci u ispitivanju genskog izražaja na sitnopolju. Iz ispitivanih stanica izolira se mRNA koja se potom označava i ubacuje u sitnopolje (čip, pločica). U čipu dolazi do hibridizacije označenih molekula RNA (ciljne molekule) i odgovarajućih molekula DNA (probe). Nesparene ciljne molekule odstranjuju se tijekom ispiranja, a sparene se boje fluorescentnim molekulama, nakon čega se pristupa očitavanju čipova i računalnoj analizi slike. Tako dobiveni podaci pohranjuju se i obrađuju složenim računalnim postupnicima. Razlike u genskom izražaju između dva uzorka otkrivaju se i kvantificiraju usporedbom vrijednosti intenziteta signala proba sa svih pločica u eksperimentalnoj i osnovnoj (kontrolnoj) skupini.

Figure 2. The steps required in a microarray gene expression experiment. After isolaton from cells of interest, mRNA is labeled and ejected into microarray (chip) where hybridization of labeled mRNA (target molecules) and compatible DNA molecules (probes) takes place. Non-hybridized target molecules are washed out, and hybridized target molecules are labeled with fluorescent molecules. Next step is microarray scanning and computer analysis of acquired image. Gathered data are then stored and further analyzed with complex algorithms. Differences in gene expression between two samples are identified and quantified by comparison of probe intensities values from experimental and baseline groups.

kula, što olakšava dizajniranje eksperimenta i statističku analizu. S druge strane, u glavne nedostatke Affymetrixovih čipova ubrajaju se visoka cijena proizvodnje zbog uporabe velikog broja litografskih maski te visoka cijena uporabe, jer je za provođenje eksperimenta osim samih čipova potrebna i ostala oprema istog proizvođača. Nadalje, ovakav čip može se napraviti samo u laboratoriju proizvođača, zbog čega je dostupan za ograničen broj organizama, a probe koje se rabe nisu podložne nikakvim promjenama.

### Izolacija i označavanje ciljnih molekula

Ispitivanje genskog izražaja temelji se na pretpostavci da ispitivani uzorak RNA odražava trenutnu aktivnost gena u stanici, zbog čega točnost podataka dobivenih provođenjem eksperimenta na DNA čipu uvelike ovisi o kvaliteti upotrijebljene RNA.<sup>13</sup> Molekula RNA nakon izoliranja iz stanice vrlo je nestabilna i ima kratko vrijeme poluživota. Glavni razlog tomu jesu RNaze, potentni i široko rasprostranjeni katalitički enzimi prisutni u krvi i tkivu te u većini bakterija i gljiva u okolini. Stoga se za očuvanje RNA u tkivima, stanicama i krvi rabe sredstva za stabilizaciju RNA, kao što je *RNAlater*, koja omogućavaju skupljanje uzoraka u bolničkim uvjetima te transport uzoraka na sobnoj temperaturi.

RNA se može izolirati iz različitih bioloških uzoraka, poput pune krvi (engl. *whole blood*, WB) te mononuklearnih stanica periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) ili sinovijalne tekućine (engl. *synovial fluid mononuclear cells*, SFMC). Prednost uporabe krvi za izolaciju RNA leži u lakoj dostupnosti i relativno jednostavnom

načinu sakupljanja, a budući da cirkulira kroz cijelo tijelo, krv sadržava mnoge biološke informacije potrebne za razumijevanje fizioloških i patofizioloških mehanizama. Od svih stanica u krvi samo 0,1% otpada na leukocite koji jedini imaju staničnu jezgru u kojoj dolazi do prepisivanja gena, dok oko 95% otpada na zrele eritrocite koji nemaju jezgru i u kojima do prepisivanja ne dolazi. Ipak, oko 1% stanica u krvi su retikulociti – razvojni stadij eritrocita – pa je stoga većina njihove transkripcijske aktivnosti vezana uz stvaranje  $\alpha$  i  $\beta$ -globinskih lanaca za izgradnju hemoglobina. Takva globinska RNA može utjecati na rezultate ispitivanja genskog izražaja u stanicama krvi, zbog čega se prilikom izoliranja RNA iz pune krvi rabe različiti protokoli za njezino odstranjenje. Najčešće se rabe komercijalno dostupne epruvete (npr. PAXgene™ Blood RNA tubes) u kojima se nalaze sredstva za uklanjanje globinskih transkripata i za stabilizaciju RNA.<sup>14</sup> Tako skupljena krv može na sobnoj temperaturi stajati 24 sata, a na  $-80$  °C i duže, što ostavlja dovoljno vremena za transport uzorka u laboratorij u kojem se pristupa izolaciji RNA. S druge strane, pri izolaciji RNA iz mononuklearnih stanica ne izoliraju se globinski transkripti, ali ni transkripti iz granulocita, koji mogu biti korisni u ispitivanju genskog izražaja. Osim toga prije izolacije RNA iz mononuklearnih stanica potrebno je provesti razdvajanje stanica, zbog čega je skupljenu krv potrebno što prije dostaviti u laboratorij u kojem se pristupa izolaciji RNA.

I za samu izolaciju RNA danas se najčešće rabe komercijalno dostupni setovi (npr. PAXgene™ Blood RNA kit, RNeasy® kit). Male količine DNA koje zaostaju nakon po-

stupka izolacije mogu se odstraniti upotrebom DNaza. S obzirom na to da nukleinske kiseline apsorbiraju zrake svjetlosti pri određenim valnim duljinama, moguće je odrediti koncentraciju izolirane RNA mjerenjem apsorbancije razrijeđenog uzorka u spektrofotometru pri valnoj duljini od 260 nm ( $A_{260}$ ), a čistoću RNA omjerom apsorbancija pri valnoj duljini od 260 nm i 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Zbog djelovanja prije spomenutih RNaza tijekom postupka izolacije može doći do degradacije molekula RNA i kompromitiranja rezultata analize genskog izražaja.<sup>15</sup> Kako bi se to izbjeglo, prije provođenja eksperimenta na skupim DNA čipovima provodi se relativno jednostavan postupak provjere integriteta RNA molekula, za što se rabe različiti sistemi poput Agilent 2100 Bioanalyzera koji daju brojčanu vrijednost integriteta RNA (engl. *RNA Integrity Number*, RIN). Jednom izolirana RNA može se pohraniti na temperaturi od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  do provođenja eksperimenata na DNA čipu.

Da bi se reakcije među komplementarnim ciljnim molekulama i probama mogle vizualizirati, prije same hibridizacije potrebno je provesti označavanje ciljnih molekula (engl. *target labeling*). Označavanje se provodi obrnutim prepisivanjem (engl. *reverse transcription*) RNA u cDNA, a može biti direktno (engl. *direct labeling*), pri čemu se u ciljnu molekulu unose označeni nukleotidi, ili indirektno (engl. *indirect labeling*), pri čemu se u ciljnu molekulu prvo unosi nosač na koji se zatim vežu oznake.<sup>16</sup> Prilikom direktnog označavanja nukleotidi su označeni radioaktivnim izotopima, poput  $^{33}\text{P}$ , ili fluorescentnim bojama, a za indirektno označavanje rabe se nosači poput biotina, amino-grupa ili micro i nano-čestica. Indirektno označavanje zahtijeva dodatno bojenje, za što se rabe konjugati streptavidina ili konjugati antitijela na biotin s peroksidazom hrena, zlatom ili s fluorescentnim bojama koje reagiraju s amino-grupama. Uporaba fluorescentnih boja omogućuje upotrebu različitih boja za kontrolni i ispitivani uzorak te direktnu usporedbu signala na istoj pločici. Najčešće se rabe cijaninske boje (engl. *cyanine dyes*) Cy-3 i Cy-5.

### Hibridizacija

Nakon izolacije i označavanja molekule RNA nanose se na DNA čip te se provodi reakcija hibridizacije, odnosno sparivanja komplementarnih parova baza (slika 1.B). Za ovu reakciju važan je međusobni afinitet nukleinskih kiselina koje se rabe kao probe i kao ciljne molekule. Uz to je važna i temperatura pri kojoj se reakcija zbiva, s obzirom na to da se povišenjem temperature dvostruke uzvojnice ponovo razdvajaju na jednostruke. Na međusobni afinitet nukleinskih kiselina utječe slijed nukleotida i sadržaj hibridizacijske otopine u kojoj se zbiva reakcija hibridizacije. Budući da G-C par baza sadržava tri vodikove veze, a A-T samo dvije, sljedovi u kojima se nalazi više G-C parova jesu stabilniji. Nadalje, s obzirom na to da svaki par baza pridonosi sveukupnoj jačini veze, afinitet je proporcionalan dužini slijeda koji sudjeluje u reakciji. Čak i ako se sljedovi probe i ciljne molekule razlikuju u samo jednoj bazi, kao što je to slučaj u neodgovarajućim probama, dolazi do hibridizacije te se smanjuje stabilnost nastalog spoja.

### Očitavanje čipova i analiza dobivene slike

Za očitavanje pločica najčešće se rabe posebni strojevi za očitavanje (engl. *microarray scanners*) i odgovarajući programi za analizu očitanih vrijednosti (engl. *raw values*). Strojevi za očitavanje u sebi sadržavaju fluorescentne detektore u kojima je izvor svjetlosti laser odgovarajuće valne

duljine koji na pločicama pobuđuje površinu veličine nekoliko mikrometara. Fluorescencija upotrijebljenih boja bilježi se i kvantificira CCD (engl. *charge-coupled device*) kamerama ili fotomultiplajerima te na taj način nastaje digitalna slika. Za razliku od analogne slike u kojoj se boje kontinuirano izmjenjuju u prostoru, digitalna slika sastoji se od ograničenog broja točaka koje su raspoređene u koordinatnom sustavu i koje se nazivaju pikseli (engl. *pixels*). Broj piksela koji se mogu smjestiti u spomenuti koordinatni sustav jest razlučivost ili rezolucija (engl. *resolution*). Svaki piksel određen je položajem u koordinatnom sustavu i intenzitetom, odnosno dubinom boje (engl. *color depth*), a informacije o tome pohranjene su u obliku osnovnih mjernih jedinica za količinu informacije, takozvani bitovima. Jedan bit tako sadržava informacije o dva različita intenziteta boje, a količina sadržanih informacija eksponencijalno raste ovisno o broju bitova. Strojevi za očitavanje pločica uglavnom imaju dubinu boje od 16 bita, što znači da svaki piksel može predstavljati jedan od 65 535 različitih intenziteta očitano signala. Dobivena digitalna slika pohranjuje se u računalu i obrađuje s pomoću različitih komercijalno dostupnih programa za obradu slike koji omogućuju da se intenziteti piksela sa slike kvantificiraju u vrijednosti koje odgovaraju izražaju pojedinačnih gena. Prvi korak u analizi slike jest stvaranje mreže (engl. *gridding*, *grid alignment*, *spot addressing*) s pomoću koje se na slici pronalazi okvirni položaj svake točke na pločici, nakon čega se pristupa odvajanju (engl. *segmentation*) točaka i pozadine (engl. *background*). Na kraju se za svaku točku na pločici procjenjuje intenzitet signala (slika 1.C). Na ukupni intenzitet signala najčešće se gleda kao na kombinaciju stvarnog signala nastalog hibridizacijom označenih molekula i signala iz pozadine koji nastaje zbog nespecifične hibridizacije, kontaminacije ili drugih artefakata. Zbog toga se od ukupnog intenziteta signala oduzima procijenjeni intenzitet signala iz pozadine, čime se dobivaju ispravljeni intenziteti (engl. *background corrected intensities*) koji se rabe za procjenu izražaja svakoga pojedinačnoga gena.

### Obrada podataka dobivenih očitanjem čipova

Razlike u genskom izražaju između dvaju uzoraka otkrivaju se i kvantificiraju usporedbom vrijednosti intenziteta signala proba na skupinama pločica na kojima se ispitivani uzorci hibridiziraju. Jedna skupina pločica pritom se označava kao eksperimentalna, a druga kao osnovna (engl. *baseline*). Prije nego što se pristupi usporedbi potrebno je ispraviti razlike u provođenju eksperimenata nastale zbog tehničkih i bioloških čimbenika. To se postiže provođenjem normalizacije. Glavni tehnički čimbenici koji utječu na razlike jesu kvaliteta i kvantiteta označene RNA hibridizirane na probe te razlike u reagensima, bojenju i rukovanju pločicom, dok biološki čimbenici koji mogu utjecati na razlike proizlaze iz razlika u genetskoj pozadini, uvjetima rasta, vremenu uzimanja uzorka, spolu, dobi itd. Pažljivim planiranjem ispitivanja, standardiziranjem postupnika za označavanje i hibridizaciju te provođenjem normalizacije spomenute razlike mogu se znatno smanjiti. Usporedba izražaja provodi se s pomoću postupnika kojim se računa omjer vrijednosti intenziteta signala skupova proba na dvije različite skupine pločica, a može se prikazati kao omjer izražaja (engl. *expression ratio*), omjer promjene (engl. *fold change*) te kao logaritamska vrijednost omjera izražaja (engl. *log<sub>2</sub> expression ratio*), pri čemu se rabi logaritam po bazi 2. Tako, na primjer, dvostruko povećanje izražaja odgo-

vara omjeru izražaja od 2, omjeru promjene od 2 te logaritamskoj vrijednosti omjera izražaja od 1. S druge strane, dvostruko smanjenje izražaja odgovara omjeru izražaja od 0,5, omjeru promjene od -2 te logaritamskoj vrijednosti omjera izražaja od -1. Naposljetku, ako nema promjene izražaja, omjer izražaja i omjer promjene iznose 1, a logaritamska vrijednost omjera izražaja 0. Nakon što se utvrdi da je došlo do razlike u izražaju nekoga gena, provode se statistički testovi kojima se utvrđuje je li ta razlika statistički značajna. Prije toga je važno odrediti koji je statistički test za to najprikladniji. Većina statističkih testova može se svrstati u parametrijske i neparametrijske, a njihova upotreba ovisi o tome je li raspodjela podataka normalna. U slučaju normalne raspodjele podataka za analizu se rabe parametrijski testovi poput t-testa, a ako raspodjela nije normalna, rabe se neparametrijski testovi poput Mann-Whitneyjeva testa i testa sume rangova (Wilcoxonov t-test). Ako se izražaj gena uspoređuje na više skupina pločica, a ne samo na eksperimentalnim i osnovnim, rabi se parametrijski test analize varijance (ANOVA) ili neparametrijski Kruskal-Wallisov test. Pri analizi izražaja određenoga gena najčešće se rabi t-test kojim se procjenjuje je li razlika prosječne vrijednosti intenziteta skupova proba na eksperimentalnim i na osnovnim pločicama statistički značajna. S obzirom na to da prosječna vrijednost na eksperimentalnim pločicama može biti i veća i manja od prosječne vrijednosti na osnovnim pločicama, rabi se dvosmjerni t-test (engl. *two-tailed test*). Nadalje, ako se na osnovnim pločicama rabi RNA prikupljena od zdravih kontrola, rabi se neovisni t-test (engl. *unpaired t-test*), a ako se rabi nanovo prikupljena RNA istih bolesnika, upotrebljava se zavisni t-test (engl. *paired t-test*). Provođenjem t-testa dobiva se p-vrijednost. Ako je p-vrijednost manja od odabrane razine značajnosti ( $\alpha$ ), koja najčešće iznosi 0,05, tada možemo utvrditi da je ispitivana razlika statistički značajna, odnosno da je slučajna u samo jednom od dvadeset provođenja ovog testa. Međutim, ako se t-test provodi mnogo puta, kao što je to slučaj u analizi genskog izražaja, tada bi to značilo da od 10 000 gena čak njih 500 pokazuje razliku u izražaju sasvim slučajno. Stoga se pri analizi genskog izražaja rabe još i kontrolne metode, kao što je Benjamini-Hochbergova metoda, s pomoću kojih se smanjuje broj gena koji pokazuju lažnu razliku u izražaju, odnosno postotak lažnih otkrića (engl. *false discovery rate*, FDR).<sup>17</sup>

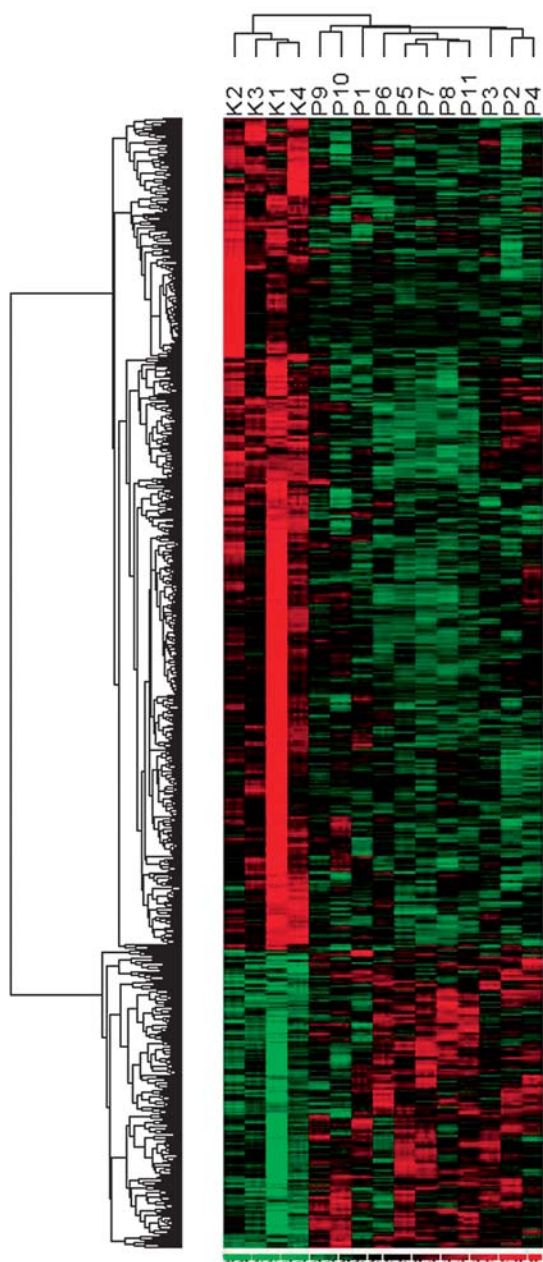
### Analiza grupa i obilježja

Za sistematsku analizu rezultata dobivenih mjerenjem genskoga izražaja na DNA čipu rabi se analiza grupa (engl. *cluster analysis*) i analiza obilježja (engl. *annotation analysis*). Analiza grupa temelji se samo na podacima dobivenim u eksperimentu, dok se analiza obilježja temelji na prijašnjim saznanjima. Analizom grupa mogu se propustiti neki obrasci koji su odmah uočljivi ako se razmatraju prijašnja saznanja, dok analiza obilježja može biti vrlo ograničavajuća ako se previše usredotočuje na već opisane gene i procese.<sup>18</sup>

Osnovna ideja koja stoji iza grupiranja podataka (engl. *clustering*) dobivenih očitanjem DNA čipa jest da geni sa sličnim izražajem imaju i sličnu biološku ulogu.<sup>19</sup> Za grupiranje se rabe metode kojima se dobiveni podaci grupiraju u unaprijed određene grupe (engl. *supervised methods*) ili metode u kojima se podaci grupiraju bez obzira na prijašnja saznanja (engl. *unsupervised methods*). Grupiranje se provodi na obrađenim podacima prikupljenim u svim ekspe-

rimentima, a kako bi se prikazao izražaj gena u svakom eksperimentu, vrijednosti za svaki gen predstavljene su kao točka u  $n$ -dimenzionalnom prostoru, pri čemu  $n$  znači broj provedenih eksperimenata. Na temelju sličnosti u izražaju mogu se grupirati geni ili eksperimenti, a moguće je istodobno obaviti i oba grupiranja pa tada govorimo o dvostrukom grupiranju (engl. *two-way clustering*; *biclustering*). Neke od često rabljenih metoda za grupiranje jesu K-prosjeci (engl. *K-means*), samoorganizirajuće mape (engl. *self-organizing map*, SOM) i K-najbliži susjed (engl. *K-nearest neighbor*, KNN), no najčešće se rabe hijerarhijsko grupiranje (engl. *hierarchical clustering*) (slika 3.) i analiza glavnih komponenata (engl. *principal component analysis*, PCA).<sup>20</sup> Prilikom hijerarhijskoga grupiranja stvara se matrica udaljenosti (engl. *distance matrix*) u kojoj se nalaze uzajamne udaljenosti gena. Nakon toga se dva najbliža gena mogu spojiti u grupu ako se rabi pristup koji počinje od pojedinačnih gena (engl. *agglomerative, bottom-up approach*), ili se grupe razdvajaju ako se rabi pristup koji počinje od pojedinačne grupe u kojoj su sadržani svi geni (engl. *divisive, top-down approach*). Ovaj postupak ponavlja se  $n-1$ -puta, a svaki put stvara se nova matrica udaljenosti. Analizom glavnih komponenata, s druge strane, smanjuje se broj dimenzija i broj točaka koje se rabe za prikaz vrijednosti izražaja gena u prostoru te se prikazuju samo razlike vrijednosti izražaja svih gena u provedenim eksperimentima. To se postiže otkrivanjem pravaca u kojima su razlike najveće, a koji se zovu glavne komponente. Najviše razlika pokazuje prva glavna komponenta, a svaka sljedeća pokazuje preostale razlike. Na taj se način stvara dvodimenzionalni ili trodimenzionalni dijagram u kojem je prikazana veza između analiziranih gena i provedenih eksperimenata.

Važan korak u analizi rezultata dobivenih očitanjem DNA čipa jest obilježavanje gena (engl. *gene annotation*), za što se najčešće rabe pravila definirana projektom genske ontologije (engl. *gene ontology project*).<sup>21</sup> Obilježavanje prema pravilima genske ontologije omogućuje standardiziranje prikaza svojstava gena i genskih produkata u različitim biološkim vrstama i bazama podataka, uvid u biološke mehanizme u koje su pojedini geni uključeni te istraživački pristup na razini sustavne biologije. U tu svrhu razvijena su tri rječnika, odnosno ontologije (engl. *ontologies*), u kojima su definirani termini što opisuju kojoj staničnoj komponenti pripada genski produkt (engl. *cellular component*), koja mu je molekularna funkcija (engl. *molecular function*) i u kojem biološkom procesu sudjeluje. Primjeri termina sadržanih u rječniku koji opisuje biološke procese jesu »rast i održavanje stanice« ili »provođenje signala« u širem smislu, dok su primjeri za procese u užem smislu »translacija«, »metabolizam pirimidina« ili »biosinteza cAMP-a«. Primjeri termina iz rječnika koji opisuje funkciju molekula u širem smislu jesu »enzim«, »transporter« ili »ligand«, dok u užem smislu funkciju molekula opisuju termini poput »adenilat ciklaza« ili »ligand Toll receptora«. Termini iz rječnika za opis staničnih komponenata jesu na primjer »ribosom«, »proteasom«, »stanična membrana« ili »Golgijevo tijelo«. Svi termini koji se rabe u rječnicima mogu se primijeniti na sve biološke organizme i neprestano se nadograđuju, a svaki od termina povezan je s jednim ili više drugih termina u istom ili u drugom rječniku. Zahvaljujući projektu genske ontologije geni se mogu obilježiti jednim ili s više termina iz svakog od spomenutih rječnika, a na temelju termina kojima su obilježeni mogu se svrstati u funkcionalno povezane skupine. S pomoću statističkih metoda može se provesti analiza zastupljenosti (engl. *enrich-*



Slika 3. Hijerarhijsko grupiranje gena. Svaki stupac označava uzorak (K1-K4 je kontrolna skupina, a P1-P11 je skupina bolesnika), dok svaki red označava gen. Crvena boja znači povišen izražaj, a zelena snižen.  
 Figure 3. Hierarchical clustering of genes. Each column represents a sample (K1-K4 are control samples and P1-P11 are patient samples), while each line represents a gene. Red color represents higher expression, while green color represents lower expression.

ment analysis) svakoga pojedinačnog termina na listi odabranih gena, kao i analiza zastupljenosti grupa funkcionalno sličnih termina. Za analizu zastupljenosti termina genske ontologije najčešće se rabe programi poput Onto-Expressa, GOstata, GoMiner-a, EASE-a i DAVID-a.<sup>22</sup>

#### Analiza mreža i putova

Kako bi se zbivanja unutar složenih bioloških sustava objasnila što zornije, elementi i veze unutar sustava prikazuju se u obliku putova (engl. *pathways*) i mreža (engl.

*networks*). Biološki su putovi niz aktivnosti koje se zbivaju preko različitih posrednika i imaju neki zajednički cilj.<sup>23</sup> Na njih možemo gledati kao na vektore usmjerene određenoj točki. Za razliku od putova veze među elementima u mreži ne moraju pokazivati neku aktivnost, zbog čega mreže nisu vektori usmjereni nekom cilju. Mreže se sastoje od čvorova (engl. *node*) međusobno povezanih rubovima (engl. *edge*) koji predstavljaju definirane veze. U biološkim mrežama čvorovi mogu biti bilo koji biološki elementi, uključujući gene i njihove produkte, nekodirajuće sljedove DNA, putove, bolesti, terapijske intervencije ili kombinaciju svega navedenoga. No, u mreži su puno važnije veze na temelju kojih možemo razlikovati genske i fizičke mreže.<sup>24</sup> U genskim mrežama postoji veza između dva različita gena (engl. *genetic linkage*), dok u fizičkim mrežama postoje fizičke, funkcionalne i regulatorne veze između uključenih elemenata.

Analizom genskog izražaja s pomoću putova mogu se otkriti putovi u kojima su statistički značajno zastupljeni geni koji su pokazali razliku u izražaju. Prednost takve analize jest da su posrednici i njihova povezanost u putovima definirani na temelju prije provedenih istraživanja, zbog čega vrlo dobro prikazuju različite biološke funkcije u zdravlju i bolesti ili nakon liječenja. No, upravo zbog već definiranih odnosa ne mogu se otkriti neka nepredviđena međudjelovanja gena, što je pak glavni nedostatak ovakve analize. S druge strane, analiza genskog izražaja s pomoću mreža, za razliku od analize s pomoću zastupljenosti funkcionalnih grupa gena i analize s pomoću putova, ne postavlja nikakva ograničenja u smislu prethodnog stvaranja grupa gena ili definiranja veza, zbog čega se smatra da mreže najbolje prikazuju složene sustave kao što su poligenne bolesti. Analizom genskog izražaja s pomoću mreža stvaraju se nove funkcionalne mreže u kojima su prikazani geni koji su pokazali razliku u izražaju i njihove međusobne veze te se na temelju toga mogu donijeti zaključci o biološkim funkcijama u kojima ti geni sudjeluju. S obzirom na to da se analize putova i mreža zasnivaju na složenim postupnicima, za njihovo provođenje rabe se računalni programi poput IPA (Ingenuity Systems Inc., <http://www.ingenuity.com>) i Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>).<sup>25</sup>

#### Plan ispitivanja i pohrana podataka

S obzirom na to da je izražaj gena pod velikim utjecajem različitih unutarnjih i vanjskih čimbenika, potrebno je provesti više eksperimenata (engl. *replication*) rabeći RNA izoliranu iz jedne (engl. *technical replication*) ili iz više osoba (engl. *biological replication*). Kako bi se smanjio broj potrebnih eksperimenata, u provođenju istraživanja često se rabi potvrda dobivenih rezultata qRT-PCR metodom u istoj ili u novoj skupini bolesnika, čime se znatno smanjuju troškovi i povećava vjerodostojnost ispitivanja. Osim toga važno je da se velika količina podataka koja se dobije u takvom ispitivanju dobro organizira i pohrani u neku od javno dostupnih baza podataka kako bi se pohranjeni rezultati mogli usporediti s rezultatima drugih istraživanja te kako bi se mogla provesti neovisna provjera dobivenih rezultata. Prilikom objave rezultata potrebno je držati se određenog standarda pa su stoga stvorene smjernice MIAME (engl. *Minimum Information About a Microarray Experiment*), u kojima je naveden minimum potrebnih informacija o eksperimentu na čipu.<sup>26</sup> U navedeni minimum spadaju informacije o dizajnu istraživanja, o upotrijebljenim pločicama i uzorcima, o izoliranju i označavanju molekula RNA,

o uvjetima u kojima je provedena hibridizacija, o očitavanju pločica te naposljetku o načinu provođenja normalizacije.

### Zaključak

U svakoj stanici s jezgrom nalazi se sveukupni genski sadržaj koji određuje građu nekog organizma. Budući da stanica rabi tek mali dio tog sadržaja, neki geni u stanici uvijek su »uključeni« i sudjeluju u procesima osobito važnim za stanicu, dok drugi mogu biti ili »uključeni« ili »isključeni«. Na »uključivanje«, odnosno na izražaj gena utječu mnogi vanjski čimbenici, poput lijekova, onečišćivača, UV zračenja, patogena, stresa i hormona, koji preko različitih signalnih putova djeluju na enzime što reguliraju epigenetske mehanizme te na čimbenike transkripcije.<sup>27</sup> Osim toga na izražaj gena utječu i unutarnji čimbenici, poput polimorfizama u cis i trans-regulatornim elementima.<sup>28</sup> Stoga usporedbom izražaja svih gena u različitim stanicama iste jedinke ili u istim stanicama različitih jedinki možemo dobiti uvid u mehanizme odgovorne za razvoj nekog stanja ili bolesti, pri čemu je vrlo važan odabir jedinki i stanica iz kojih se izolira RNA te metoda kojom se izražaj gena ispituje. Za ispitivanje izražaja svih gena u stanici danas se najčešće rabe različiti DNA čipovi, poput Affymetrixova GeneChip sustava (slika 1., 2.). Dobro isplanirano ispitivanje na DNA čipu omogućuje nam dobivanje pouzdanih rezultata uz minimalne troškove i tehničke teškoće, dok različite bioinformatičke analize omogućuju sistematsku obradu velike količine podataka koja se dobije ovakvim istraživanjem.

### LITERATURA

1. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503–17.
2. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5350–4.
3. Burnette WN. »Western blotting«: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Annal Biochem* 1981;112:195–203.
4. Kafatos FC, Jones CW, Efstratiadis A. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res* 1979;7:1541–52.
5. Dufva M. Introduction to microarray technology. *Methods Mol Biol* 2009;529:1–22.
6. Jelušić M, Malčić I, ur. Pedijatrijska reumatologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2014, str. 370.
7. Lamot L. Poremećaji genskoga izražaja u bolesnika s juvenilnim seronegativnim spondiloartropatijama. (doktorska disertacija). Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014.
8. Bilitewski U. DNA microarrays: an introduction to the technology. *Meth Mol Biol* 2009;509:1–14.
9. Hegde P, Qi R, Abernathy K i sur. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques* 2000;29:548–50.
10. Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays—a technology review. *Nat Cell Biol* 2001;3:E190–5.
11. Ehrenreich A. DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;73:255–73.
12. Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG. The affymetrix GeneChip platform: an overview. *Methods Enzymol* 2006;410:3–28.
13. Madabusi LV, Latham GJ, Andruss BF. RNA extraction for arrays. *Methods Enzymol* 2006;411:1–14.
14. Mesko B, Poliska S, Nagy L. Gene expression profiles in peripheral blood for the diagnosis of autoimmune diseases. *Trends Mol Med* 2011;17:223–33.
15. Schroeder A, Mueller O, Stocker S i sur. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006;7:3.
16. Wildsmith SE, Archer GE, Winkley AJ, Lane PW, Bugelski PJ. Maximization of signal derived from cDNA microarrays. *Biotechniques* 2001;30:202–6.
17. Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* 2003;19:368–75.
18. Breiling R. Biological microarray interpretation: the rules of engagement. *Biochim Biophys Acta* 2006;1759:319–27.
19. Brazma A, Vilo J. Gene expression data analysis. *Microbes Infect* 2001;3:823–9.
20. Iiris Hovatta KK, Lehmussola A, Saharinen J i sur. DNA Microarray Data Analysis. Helsinki: CSC – Scientific Computing Ltd.; 2005.
21. Ashburner M, Ball CA, Blake JA i sur. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000;25:25–9.
22. Khatri P, Draghici S. Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics* 2005;21:3587–95.
23. Ramanan VK, Shen L, Moore JH, Saykin AJ. Pathway analysis of genomic data: concepts, methods, and prospects for future development. *Trends Genet* 2012;28:323–32.
24. Minguez P, Dopazo J. Functional genomics and networks: new approaches in the extraction of complex gene modules. *Expert Rev Proteomics* 2010;7:55–63.
25. Ghosh S, Matsuoka Y, Asai Y, Hsin KY, Kitano H. Software for systems biology: from tools to integrated platforms. *Nat Rev Genet* 2011;12:821–32.
26. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J i sur. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001;29:365–71.
27. Javierre BM, Hernando H, Ballestar E. Environmental triggers and epigenetic deregulation in autoimmune disease. *Discov Med* 2011;12:535–45.
28. Pastinen T, Ge B, Hudson TJ. Influence of human genome polymorphism on gene expression. *Hum Mol Genet* 2006;15 Spec No 1:R9–16.

