

## Biološki čipovi otkrivaju tajne genoma

Ana Tomašić Paić<sup>1\*</sup>, Miroslav Poznić<sup>2</sup>, Snježana Jurić<sup>1</sup>, Hrvoje Fulgosi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut "Ruđer Bošković", Zavod za molekularnu biologiju, Laboratorij za elektronsku mikroskopiju,  
P.P. 180, HR – 10002, Zagreb, RH

<sup>2</sup>Institut "Ruđer Bošković", Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za sistemsku biomedicinu,  
P.P. 180, HR – 10002, Zagreb, RH

\*Autor za korespondenciju: Dipl. ing. Ana Tomašić Paić

Ruđer Bošković Institute, Bijenička c. 54, P.O.Box 180, HR-10002 Zagreb, Croatia

Tel.: +385 1 456 1019 / Fax: +385-1-4561-177 / E-mail address: Ana.Tomasic.Paic@irb.hr

Pregledni rad

UDK 575-113

Prispjelo: lipanj 2010.

Nedavna otkrića na području tehnologije DNA-čipova omogućuju znanstvenicima istraživanje ekspresije tisuća gena u jednoj jedinjoj reakciji, pri čemu se stvara velika količina podataka. Biološki se čipovi temelje na metodi hibridizacije, te dozvoljavaju uvid u ekspresiju gena na razini čitavoga genoma. Štoviše, čipovi se upotrebljavaju kako bismo istražili stanične i signalne putove i osnovne aspekte rasta i razvoja organizma tj. biološke životne procese. Nedavno sekvencionirani genomi biljke *Arabidopsis thaliana* i čovjeka otkrivaju postojanje mnoštva gena uključenih u određene ljudske bolesti koji imaju svoje ortologe prisutne u višim biljkama. Ključni proteini uključeni u bolesti, a posebno njihovi načini ekspresije i principi nastalih mutacija, sve se više objašnjavaju primjenom čipova. Navedeni će tehnološki napredak, nadamo se, pridonijeti skorom otkriću podrijetla genetskih bolesti i ubrzati stvaranje specifičnih genskih terapija, a čemu ćemo barem malim djelićem pridonijeti i mi našim istraživanjima.

**Ključne riječi:** genski čipovi, Affymetrix tehnologija, *Arabidopsis thaliana*, ljudske bolesti

### Uvod

Tijekom proteklih nekoliko desetljeća informacijska tehnologija omogućuje revolucionarna otkrića na području biotehnoških znanosti mikročipova. Razvoj tehnologije mikročipova uvelike pridonosi istraživanju genoma. Unatoč svojoj "veličini", DNA mikročipovi imaju mogućnost pohranjivanja velike količine bioloških informacija i stoga su od velike važnosti za razvoj funkcionalne genomike, odnosno istraživanja funkcije gena. Informacije uklopljene unutar mikročipova sadrže točno određen slijed nukleotida ili građevnih blokova DNA koji čine genom nekog organizma.

Grupa znanstvenika na čelu s dr. Stephenom P. A. Fodorom je 1990-tih godina razvila revolucionarnu ideju ujedinjenja tehnologije poluvodiča s naprednom tehnikom kombinatorijalne kemije u svrhu ugradnje velike količine bioloških podataka na malu staklenu ili plastičnu površinu čipa. Primjena mikročipova u laboratorijima ima svrhu istraživanja tisuća gena određenoga tkiva istovremeno, ispitivanjem ekspresijskoga profila cjelokupnoga genoma nekoga organizma. Svaki tip stanice ili tkiva karakterizira drugačiji model razine ekspresije gena te će proizvesti različite skupine proteina u vrlo specifičnim količinama. Ekspresija ili ispoljavanje gena je pojam koji opisuje prijepis (transkripciju) informacije sadržane u deoksiribonukleinskoj kiselini (DNA), skladištu genetske informacije, u mRNA (glasnička molekula), odnosno u proteine (translacija) koji vrše većinu

značajnih funkcija stanice. Proučavanjem količine nastalih transkripata u stanici utvrđuje se koji se geni prepisuju, čime se dobiva uvid u način na koji stanica odgovara na uvjete u okolišu poput klimatskih promjena, stresa i drugih nepovoljnih uvjeta. Mehanizam ekspresije gena djeluje kao *on/off switch* ili sklopka koja koordinira aktivnost gena u stanici, te prema potrebi povećava ili smanjuje razinu ekspresije pojedinačnoga gena (1).

Na oligonukleotidne mikročipove nanosi se izolirani biološki materijal u obliku komplementarne ribonukleinske kiseline (cRNA) iz ispitivanoga i kontrolnoga uzorka iz kojih se mogu vrlo brzo detektirati aktivnosti tisuće prisutnih gena ili djelića genetskoga koda ispitivanoga genoma, te iščitati razlike u ispoljavanju pojedinačnih gena. Korištenjem odgovarajućega čitača (Affymetrix Scanner) dobivamo uvid u podatke koji se potom analiziraju primjenom suvremenih matematičkih algoritama. Svrha analize podataka jednim dijelom temelji se na razumijevanju odnosa gena i biološkoga značaja kodiranoga proteina te otkrivanja genetskih uzročnika bolesti i ispitivanja npr. uloge "otpadne DNA". Dobiveni ekspresijski profili tisuća gena ukazuju na promjenu razine ekspresije gena genetički izmijenjenih ili oboljelih organizama u odnosu na nepromijenjeni ili zdravi genom. Mikročip tehnologija se također upotrebljava za identifikaciju heterozigota ili nekih drugih promjena u genomu primjenom platformi SNP-a (pojedinačni nukleotidni polimorfizmi).

Analiza glasničke RNA (mRNA), odnosno nastalih transkripata organizma, predstavlja moćan alat u razumijevanju regulacije i funkcije gena. Primjena čipova postaje nezaobilazan dio genomskih, proteomskih i drugih istraživanja. Posljednjih godina pokrenuto je nekoliko velikih biotehnoških projekata poput SAGE (serijska analiza ekspresije gena), MPSS-a (masivno paralelno označavanje sekvenciranjem) i DNA mikročipova (2). Mikročip eseji omogućuju paralelno ispitivanje i analiziranje mnoštva podataka, usporedbom tisuća gena ili genskih produkata na čipu. Analizu cjelokupnoga genoma moguće je provesti u jednoj jedinjoj reakciji u tek nekoliko sati. Općeniti je trend u biomedicinskim istraživanjima upravo minijaturizacija konvencionalnih eseja (3), čime se smanjuje potreba za velikom potrošnjom reagenasa, povećava se koncentracija početnoga uzorka te ubrzava sama kinetika reakcije. Među čipovima najrašireniju primjenu na tržištu danas imaju Affymetrix GeneChip® platforme, koje se odlikuju visokom reproducibilnošću rezultata i značajnim kapacitetom platformi visoke rezolucije. Među ostalim mikročipovima ističu se i oni proizvođača Agilent Technologies, Amersham Biosciences, NimbleGen Systems, Illumina, GE Healthcare, Applied Biosystems, Beckman Coulter, Eppendorf Biochip Systems. Prema potrebi mikročipove moguće je proizvesti i za specifične primjene u laboratorijima.

### Primjena čipova u medicini

Genomika, kao znanstvena grana genetike, bavi se istraživanjem strukture i funkcije gena. Svoj "procvat" doživljava 2000. godine kada je dobiven uvid u cjelokupni genetski kod čovjeka, tzv. "knjigu života". Međunarodni "Human Genome" projekt okupio je znanstvenike u suradnji s privatnom tvrtkom Celera Genomics kako bi sudjelovali u određivanju slijeda oko 30 tisuća gena ljudskoga organizma. Unatoč velikoj sličnosti ljudskog genoma unutar populacije, raznih etničkih ili dobnih skupina, utvrđena je rasprostranjenost brojnih varijacija u genetskom kodu. Varijacije se mogu povezivati s genetskim bolestima, kao što je iznimno rijetka Huntingtonova bolest, genetski poremećaj u središnjem živčanom sustavu, koji karakterizira progresivni motorički poremećaj, demencija i smrt. Huntington gen (HD), nađen na četvrtom kromosomu, sadrži CAG slijed kao dio sekvence, no kod oboljelih se broj dupliciranih tripleta ponavlja 40 do 120 puta, dok se kod šire populacije ponavlja do 26 puta. Primjenom čipa praćena je ekspresija približno šest tisuća gena u *corpus striatumu*, predjelu mozga posebno zahvaćenom bolešću, te je utvrđeno svega 2% gena čija je aktivnost u signalnom i neurotransmitterskom putu smanjena (4).

Primjena čipova pridonosi razumijevanju mehanizama koji uzrokuju genetičke bolesti, što bi moglo rezultirati stvaranjem genetski oblikovanih tzv. inteligentnih lijekova, u nadi kako bi se svakoj oboljeloj osobi u budućnosti osigurao odgovarajući lijek. Čipovima dolazimo do novih spoznaja o specifičnim defektnim genima i njihovim promjenama u ispoljavanju uslijed izmijenjene regulacije i mogućih "trigger" faktora koji uzrokuju nastanak bolesti. GeneChip® Human Genome

U133A 2.0 (Slika 1.) sadrži 14.500 dobro karakteriziranih gena čovjeka, a koristi se u istraživanjima procesa razvoja bolesti, odnosno ljudske biologije. Navedeni čip omogućuje analizu ekspresije 18.400 transkripata i genetskih varijacija, te se sastoji od 22.000 proba i 500.000 oligonukleotidnih značajki.

### Čipovi u molekularnoj biologiji

Revolucija primjene čipova u molekularnoj biologiji započela je 2000. godine uspješnim sekvenciranjem osnovnoga modelnog sustava, genoma biljke *Arabidopsis thaliana*, Talijinog uročnjaka, prikazanog na Slici 2. (*Arabidopsis Genome Initiative*). Ta biljka iz porodice *Brassicaceae* vrlo je pogodna za genetska istraživanja, jer ima najmanji genom među vaskularnim biljkama (125 Mbp), kratko generacijsko vrijeme, daje mnoštvo sjemenki, a cvjetovi se samooprašuju (5). Genom joj se sastoji od 5 kromosoma koji sadrže 26 000 gena. Geni su udruženi i blisko raspoređeni (prosječno 4,6 kbp udaljeni) na kromosomima, što upućuje na kratke regulatorne regije prisutne u genomu biljaka u usporedbi sa životinjskim genomom. Određivanjem slijeda nukleotida genoma uročnjaka, otvorile su se neslućene mogućnosti utvrđivanja funkcije pojedinačnih gena ili skupine gena i njihove uloge u razvoju i životu biljke. Istraživanja također uključuju postupke uvođenja nasumičnih mutacija neposredno u DNA (kemijska mutageneza), zatim inserciju strane DNA (npr. transpozona ili T-DNA regije iz bakterije *Agrobacterium tumefaciens*) u genom transformirane biljke, također prikupljanje mutanata različitih fenotipa, izradu kromosomske mape mutiranih gena i uvođenje molekularnih markera u identifikaciji (6) ili oplemenjivanju sorti.

Iako je genom uročnjaka sekvenciran 2000. godine, tek je 40% gena istraženo i njihova je funkcija poznata. Situacija je slična i za bakteriju *E. coli*, nematodu *C. elegans*, mušicu *D. melanogaster* te kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (7).

Istraživanjem Talijinoga uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) otkriveno je mnoštvo "prototipova" proteina ili proteinskih domena koji su također uključeni u razvoj ljudskih bolesti i druge aspekte biologije čovjeka. Postaje evidentno kako većina ljudskih gena za koje se sumnjalo ili pretpostavljalo da igraju važnu ulogu u procesima nastanka bolesti imaju svoje genske ekvivalente tj. ortologe (homologni geni koji dijele istu funkciju, a mogu se naći u vrlo različitim organizmima) u uročnjaku. *Arabidopsis* sadrži brojne gene slične onima koji uzrokuju ljudske bolesti, od raka do preranoga starenja te Wilsonove bolesti, kongenitalne kronične bolesti jetre uslijed abnormalnoga metabolizma bakra.

Oko 70% gena koji su uključeni u razvoj raka kod ljudi imaju svoje srodne gene prisutne u uročnjaku, 67% ortologa prisutno je u vinskoj mušici *Drosophila melanogaster*, 72% ortologa u nematodi *Caenorhabditis elegans*, te 41% u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* (8). Uočena sličnost funkcionalnih gena uključenih u različite stanične procese genoma čovjeka i njihova zastupljenost u drugim organizmima (Slika 3.), sugerira da su to stari i evolucijski očuvani proteini, čije se



SLIKA 1.  
GeneChip® Human Genome U133A 2.0 proizvođača Affymetrix  
FIGURE 1.  
GeneChip® Human Genome U133A 2.0, made by Affymetrix

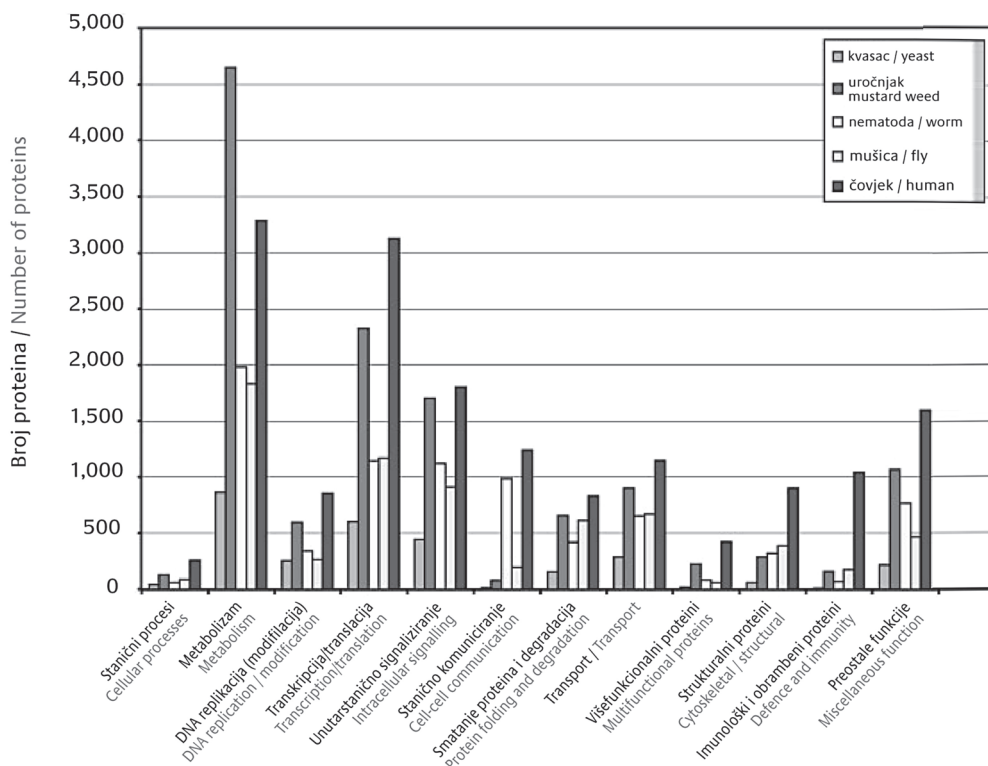


SLIKA 2.  
Uzgoj biljke *Arabidopsis thaliana* Col-0 (L. Heynh.) u komori za uzgoj biljaka  
FIGURE 2.  
Plant *Arabidopsis thaliana* Col-0 (L. Heynh.) breeding in growth chamber

podrijetlo može slijediti do zajedničkoga eukariotskog pretka (LECA, *Last Eukaryotic Common Ancestor*) od prije 1 do 2 milijarde godina. Štoviše, tijekom evolucije eukariota brojni funkcionalni geni (molekularni pomagači i proteini sličnih funkcija) višestruko su se duplicirali (paralozi), te postupkom horizontalnoga prijenosa gena (pseudoparalozi) prenosili iz bakterija u prve eukariote. Velik broj prisutnih paraloga i pseudoparaloga rezultat je evolucijske razmjene gena, što je utvrđeno komparativnom analizom genoma, te se smatraju osnovnim biljezima prilikom utvrđivanja podrijetla eukariota (9).

Uslijed izlaganja biljaka infekcijama različitim patogenima poput bakterija, virusa, nematoda, te insekata prisutnih u okolišu, biljke su razvile vrlo složeni mehanizam obrane. Biljke odgovaraju na navedene infekcije *disease resistance* genima čija aktivacija rezultira smanjenim rastom patogena te programiranom staničnom smrću (apoptoza) inficiranih stanica (poznatom kao hipersenzitivan odgovor, HR). Najpoznatija skupina *disease resistance* gena kodira proteine koji se sastoje od središnjega nukleotidno-vezujućeg mjesta

(NB, *nucleotid binding*) i karboksi-terminalne regije bogate ponavljajućim slijedom leucina (LRR, *leucine-rich repeat*). Biljni NB-LRR proteini jesu primarni unutarstanični receptori biljnoga obrambenog sustava koje kodiraju *disease resistance* geni (10). Oko 150 ovih gena otkriveno je u uročnjaku, te je istraživana njihova uloga i u drugim cvjetnicama. Biljni NB-LRR proteini strukturalno i funkcionalno slični su NOD-u (*nucleotide-binding oligodimerization domain*)-LRR porodici proteina otkrivenoj u sisavaca, zvanih CATERPILLAR proteinima, također uključenim u upalne procese i imuni odgovor. Ljudski NOD protein-aktivirajući faktor 1 apoptozne proteaze (APAF-1) posjeduje NB (*nucleotide binding*) domenu uz veliku homologiju proteinskoga slijeda s biljnim NB-LRR proteinima (8). Ekvivalenti ljudskim ortolognim i paralognim (homologni geni nastali duplikacijom gena u istoj vrsti, no nemaju istu funkcionalnu ulogu) genima u imunološkom sustavu životinja su geni različitih naziva: NOD/CARD/CATERPILLAR (11). Štoviše, genetske varijacije u NOD2 i CIITA (*major histocompatibility complex*, MHC razred II transaktivator) u ljudi i Naip 5 (inhibitorni protein neuronske apoptoze) u miševa, povezani su s upalnim bolestima,



SLIKA 3.  
 Funkcionalna raznovrsnost ljudskih gena vrlo je slična i u drugim vrstama  
 FIGURE 3.  
 The functional diversity of human genes is shared by other species

odnosno povećanom osjetljivošću na bakterijske infekcije. Pretpostavlja se da su NOD2 proteini sisavaca citosolni senzori koji induciraju apoptozu, te sudjeluju u regulaciji upalnih procesa. Biljni NB-LRR proteini se povezuju s molekularnim pomagačima HSP90 i SGT1 koji su uključeni u imunološki odgovor. Posljedično je otkriveno kako citosolni HSP90 i SGT1 ortologni geni u životinja kontroliraju funkciju NOD/CATERPILLAR proteina prisutnih u njihovom imunološkom sustavu. Prvi ljudski NOD gen (CIITA) izoliran je 2000. godine i pokazuje sličnost s NB-LRR biljnim *disease resistance* genima (11), te je upravo NOD2, gen homolog biljnoga NB-LRR, prvi gen kandidat za istraživanje Kronove bolesti, rijetkoga upalnog poremećaja tankoga crijeva (8).

Činjenica je kako bolesti proizlaze uslijed određenih promjena u aktivnosti proteina u osnovnim staničnim procesima, uslijed mutacija, genetskih varijacija odnosno aberacija na kromosomima. Poznavanje funkcije pojedinačnih gena biljke uročnjaka može pomoći u razumijevanju uloge srodnih gena uključenih u kompleksne molekularne putove i procese u čovjeku, te pridonijeti istraživanju uzroka bolesti i mehanizama nastanka bolesti.

### Affymetrix tehnologija

Razvoj tehnologije mikročipova i njihova biološka primjena u okviru molekularnih znanosti temelji se na postojećim industrijskim principima izrade poluvodiča. Umjesto

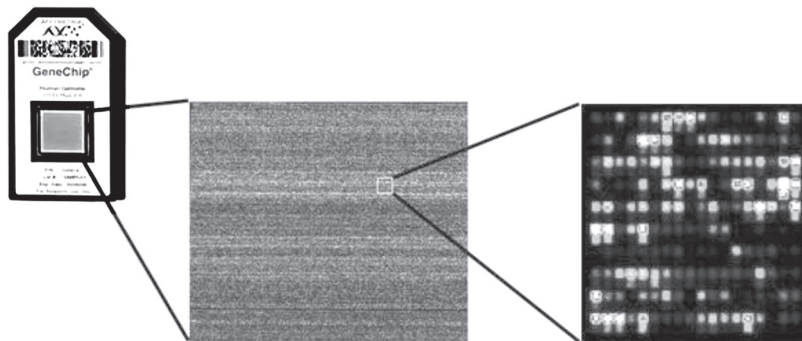
urezivanja minijaturnih električnih sklopova, oligonukleotidni-mikročipovi sadrže milijune odsječaka nukleinskih kiselina i drugih biopolimera ili biokemijskih građevnih blokova utisnutih na čip (12). ATH1 GeneChip® (patentirani nosač američkoga proizvođača Affymetrix) sustav je platforme za analizu transkripcijske aktivnosti gena prisutnih u genomu modelnoga organizma *Arabidopsis thaliana*. ATH1 Arabidopsis GeneChip® konstruiran je u suradnji s TIGR-om (*The Institute for Genomic Research*), a sadrži više od 22.500 probnih grupa koje predstavljaju približno 24.000 sekvenci gena (13).

Rezultati analize kompletnoga nukleotidnog slijeda genoma *Arabidopsis* pružaju nam uvid u organizaciju genoma i genskog sadržaja te omogućuju karakterizaciju i identifikaciju gena u svrhu istraživanja njihove strukture i funkcije. ATH1 biološki mikročipovi temeljeni na informacijama dobivenim sekvenciranjem, primjenjuju se upravo u svrhu istraživanja regulacije gena uključenih u proces fotosinteze i mnoge druge fiziološke i metaboličke procese regulirane unutrašnjim i okolišnim čimbenicima.

Affymetrix GeneChip Instrument System (Affymetrix, High Wycombe, UK) sustav je koji se (Slika 4.) sastoji od Affymetrix radne jedinice, hibridizacijske peći (GeneChip® Hybridization Oven 640), ispiralice (Affymetrix GeneChip® Fluidics Station 450), čitača (Affymetrix GCS3000 7G



SLIKA 4.  
Sustav platforme Affymetrixa  
FIGURE 4.  
Affymetrix platform system



SLIKA 5.  
Hibridizirane probe čipa  
FIGURE 5.  
Hybridized chip probes

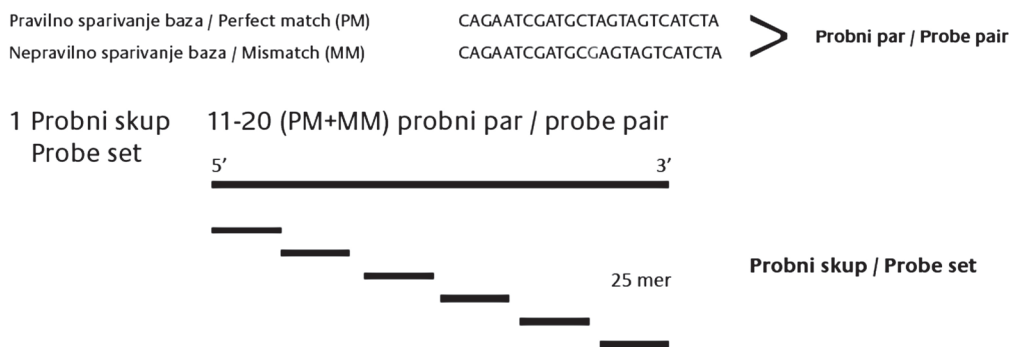
GeneChip® Scanner) i programa za analizu podataka (Affymetrix GCOS v1.2 system software and Data Mining Tool 3.0).

### Affymetrix genski čip

Genski čip je mali nosač, odnosno pločica na koju su vezani kratki odsječci jednolančane DNA (sintetički oligonukleotidi), odnosno DNA fragmenti koji su robotiziranim sustavima utisnuti u velikom broju malih točaka visoke gustoće. U svakoj se točki na mikročipu nalaze oligonukleotidne probe poznatih slijedova nukleotida, dugačke 25 do 30 baza koje su imobilizirane na čipu *in situ* fotolitografskom sintezom (Slika 5.). Nukleotidi se dodaju rastućem lancu u svakom novom krugu sinteze, dok nije postignuta odgovarajuća duljina oligonukleotidnoga lanca. Ukoliko se na površinu cDNA (komplementarna DNA) mikročipova utiskuju cDNA molekule, prethodno su umnožene lančanom reakcijom polimerazom i pročišćene, te se u vrlo malim količinama nanose na pripadajuće mjesto (*feature*) na čipu tehnologijom mehaničkoga utiskivanja (*microspotting*) ili mlaznoga tiskanja (*ink jetting*). Iako je tehnika fotolitografije daleko naprednija od mikroiinjektiranja obzirom na gustoću utisnutih točaka na čipu, u budućnosti se očekuje proizvodnja cDNA čipova koji će sadržavati i do 100.000 točaka na površini čipa od ~6,5 cm<sup>2</sup>.

Materijal koji hibridizira na čipu (*array*) je cRNA (komplementarna RNA) koja predstavlja uzorak, odnosno *target*. *In vitro* transkripcijom cRNA je sintetizirana iz cDNA (komplementarne DNA) molekule, te je naknadno obilježena biotinom i obojana fluorescentnom bojom s konjugiranim streptavidinom. Tako pripremljena cRNA hibridizira s oligonukleotidnim probama na čipu prema načelu komplementarnosti baza. Nastale hibridizacijske točke jednostavno se detektiraju i kvantificiraju odgovarajućim čitačem i obrađuju pripadnim programskim algoritmima.

Svaki ciljni transkript, odnosno gen predstavljen je s dvije oligonukleotidne probe (*probe pair*). Jedna je proba predstavljena ispravnom sekvencom dijela gena pri čemu dolazi do pravilnoga ili referentnoga sparivanja (PM, *perfect match*), a druga sekvenca vodi nepravilnom (MM, *mismatch*) sparivanju nukleotida (Slika 6.). Razlika između MM i PM proba je u jednom nukleotidu u sredini MM probe (13. nukleotid). Svaki skup proba (*probe set*) sadrži 11-20 parova oligonukleotidnih proba, odnosno različitih dijelova gena početnoga, središnjega i završnoga dijela sekvence (5' i 3' dio gena). Svrha različitosti proba je u utvrđivanju nespecifičnoga vezanja, pozadinskih šumova i u kontroli vjerodostojnosti signala. Vrijednost razine ekspresije svakoga pojedinačnog



SLIKA 6.  
Probni par i probni skup gena  
FIGURE 6.  
Gene probe pair and probe set

gena predstavljena je prosječnom razlikom PM i MM proba zajedno sintetiziranih na čipu (14).

Prosječna površina čipa od 1,6384 cm<sup>2</sup> i površina pojedinačne točke na čipu od 4,096 x 10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup>, omogućuje ugradnju oko 400.000 različitih komplementarnih proba, odnosno milijune kopija specifičnih oligonukleotidnih lanaca gena. Oligonukleotidi se "usidruju" na 3' kraju proba čime se povećava vjerojatnost hibridizacije s jednolančanom nukleinskom kiselinom. Hibridizacija fluorescentno obilježene cRNA i proba na čipu detektira se očitanjem površine čipa laserskim čitačem. Intenzitet zabilježenoga signala u boji raste od crne, plave, zelene, žute, narančaste, crvene do bijele boje. Upravo crvena i bijela boja ukazuju na veliku količinu prisutnih transkripata u uzorku.

Nakon što platforma skenira fluorescencijski signal s čipova, slijedi analiza slika (.DAT file). Fluorescencijski signal rezultat je uspješne hibridizacije oligonukleotidnih proba s obilježenom komplementarnom RNA (cRNA). Stoga signal "reflektira" vrijednost ekspresije gena određenoga uzorka, obzirom da je proporcionalan prisutnoj količini transkripata. Transkript se smatra prisutnim u ispitivanom uzorku u odnosu na kontrolni uzorak ukoliko je razlika signalnih intenziteta PM i MM proba statistički značajno iznad vrijednosti pozadinskih ili *background* signala.

Ekspresijske vrijednosti pojedinačnoga gena utvrđuju se na osnovi sakupljenih informacija skupa PM/MM proba pomoću Affymetrix GeneChip Operating Software-a (GCOS). Navedeni program koristi statističke algoritme (*Statistical Expression Algorithm*) u svrhu izračunavanja kvalitativnih (*absent/present*) i kvantitativnih (*signal*) vrijednosti signalnoga intenziteta pojedinačnoga transkripta. GCOS je produkt kombinacije programa "Micro Array Suite" (MAS) i "Micro DB" ujedinjenih u program za automatsku analizu intenziteta prisutnih točaka (*pixels*) na čipu.

Mikročip tehnologija generira velike količine kompleksnih podataka koji se pohranjuju u odgovarajućim bazama podataka (Gene Expression Omnibus, Array Express).

Pohranjivanju podataka prethodi složena analiza desetaka tisuća gena primjenom različitih akademskih ili komercijalno dostupnih računalnih programa, poput GeneSpring (Silicon Genetics), Microarray Suite i Data Mining Tool (Affymetrix). Kod višestrukih mjerenja razine transkripata mikročipovima pojavljuju se systemske razlike među čipovima koje se moraju normalizirati prije integriranja podataka u pojedinačne analize. Prema Bolstadu (15), normalizacija na kvantile predstavlja najprihvatljiviju metodu normalizacije skupova podataka mikročipova, kojom se izjednačava raspodjela ekspresijskih vrijednosti svih uzoraka eksperimenta. Odabir statistički dostupne metode u svrhu identificiranja diferencijalno ekspimiranih gena između dva različita stanja, ispitivanoga i kontrolnoga, može značajno utjecati na konačan zaključak (16). Stoga je izuzetno važno unaprijed ustanoviti koja je metoda najbolja za analizu bioloških podataka. Nakon analize slijedi interpretacija podataka, odnosno sustavno povezivanje u smisleni cjelinu ili biološki značaj. Geni kod kojih je došlo do promjene ekspresijskoga profila (diferencijalno ekspimirani geni) svrstavaju se u skupine gena sličnih ekspresijskih profila primjenom tzv. *clustering* (klastering) metode. Odgovarajućim statističkim pristupom poput hijerarhijskoga ili *K-means* klasteriranja geni se povezuju u klaster. Tako možemo identificirati i promjene u ekspresiji gena koji su uključeni u isti metabolički ili signalni put.

### Zaključci

Velike prednosti tehnologije bioloških čipova, odnosno DNA mikročipova u otkrivanju svojstava genoma leže u mogućnostima paralelnih analiza ekspresijskih profila tisuća gena specifičnom hibridizacijom. Time se dobiva uvid u međusobnu interakciju pojedinačnih gena unutar stanice uz razumijevanje regulatornih mehanizama njihovih signalnih i biokemijskih putova. Stoga se čipovi primjenjuju u istraživanjima specifičnih i rijetkih oboljenja (dijagnostika) u svrhu utvrđivanja genetskih varijacija i predispozicija na bolesti. Također, primjena čipova izražena je i u poljoprivrednoj i prehrambenoj znanosti. Budući aspekti primjene čipova uključuju gensku terapiju, a samim time i razvoj farmakogenomike ili biološki aktivnih lijekova.

Razvoj nanotehnologije, bioinženjerstva i neuroznanosti pridonijet će povezivanju znanja i dostignuća sa zajedničkim ciljem stvaranja poluvodičkih nano čipova s mogućnošću implantiranja u ljudski mozak. Takvi bi čipovi mogli djelovati kao osjetila i pobuđivači, mogli bi vratiti vid slijepima, onima slabije memorije pomoći u razvijanju sjećanja i učenju jezika, te svakom pojedincu otvoriti put enciklopedijskim bazama podataka. Kao osjetilni pojačivači mogli bi pojačati doseg naših osjetila u promatranju ultravioletne i infracrvene svjetlosti, u mentalnoj komunikaciji s drugim pojedincima (*cyberthink*), čime bi se unaprijedila kvaliteta života i poslovanja (17).

Unatoč primjeni DNA mikročipova u svrhu liječenja i sprječavanja bolesti poput multiple skleroze, dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti, te u znanstvene svrhe, otvaraju se i brojna etička pitanja vezana uz spoznaju o individualnim genetskim osobinama pojedinaca i njihovom značaju za društvene sredine. Iako "oštećeni" geni ne moraju nužno značiti da će osoba oboljeti od neke bolesti, ona ipak pokazuje veću predispoziciju na pojavnost bolesti što može rezultirati obilježavanju takve osobe kao društveno neprihvaćene individue. Zabilježeni slučajevi u SAD-u govore kako neke velike tvrtke traže uvid u genetske mape prilikom zapošljavanja i zdravstvenoga osiguravanja zaposlenika. To pokazuje nužnost razvoja pravnoga okvira u skladu s razvojem tehnologije, a s ciljem zaštite slobode i digniteta kako pojedinaca, tako i cijele populacije. Potencijalne revolucionarne implikacije poluvodičkih čipova i mikročipova zahtijevaju otvoren multidisciplinarni dijalog i temeljitu procjenu u svrhu internacionalnoga razmatranja etičkoga pitanja razumne primjene čipova u budućnosti. Uostalom, što su izazovi veći, veća je i naša odgovornost, i to ne samo znanstvenika i istraživača, nego i društva općenito.

#### LITERATURA

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>
2. Pollock JD. Gene expression profiling: methodological challenges, results, and prospects for addiction research. *Chem Phys Lipids*. 2002;121:241–56.
3. Fodor SPA. Massively parallel genomics. *Science*. 1997;277:393–5.
4. Luthi-Carter R, Strand A, Peters NL, Solano SM, Hollingsworth ZR, Menon AS, i sur. Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2000;9:1259–71.
5. Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*. 1998;282:679–82.
6. Koncz C, Németh K, Rédei GP, Schell J. T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*. 1992;5:963–76.
7. Michelmore R, Burtis K, Gusfield D. The UC Davies genomics initiative. Technical report. University of California, Davis; 2000. Dostupno na adresi: <http://genomics.ucdavis.edu/what.html>.
8. Jones AM, Chory J, Dangel JL, Estelle M, Jacobsen SE, Meyerowitz EM, i sur. The impact of *Arabidopsis* on human health: diversifying our portfolio. *Cell*. 2008;133:939–43.
9. Makarova KS, Wolf YI, Mekhedov SL, Mirkin BG, Koonin EV. Ancestral paralogs and pseudoparalogs and their role in the emergence of the eukaryotic cell. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:4626–38.
10. Jones JDG, Dangel JL. The plant immune system. *Nature*. 2006;444:323–9.
11. Ting JPY, Kastner DL, Hoffman HM. Caterpillars, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:183–95.
12. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, i sur. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*. 1996;14:1675–80.
13. Redman JC, Haas BJ, Tanimoto G, Town CD. Development and evaluation of an *Arabidopsis* whole genome Affymetrix probe array. *Plant J*. 2004;38:545–61.
14. Draghici S. Statistical intelligence: effective analysis of high-density microarray data. *Drug Discov Today*. 2002;7:55–63.
15. Bolstad B, Irizarry R, Astrand M, Speed T. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19:185–93.
16. Jeffery IB, Higgins DG, Culhane AC. Comparison and evaluation of methods for generating differentially expressed gene lists from microarray data. *Bioinformatics*. 2006;7:359–75.
17. [http://www.lahey.org/NewsPubs/Publications/Ethics/JournalWinter2001/Journal\\_Winter2001\\_Feature.asp](http://www.lahey.org/NewsPubs/Publications/Ethics/JournalWinter2001/Journal_Winter2001_Feature.asp)

## BIOLOGICAL CHIPS UNLOCK THE SECRETS OF GENOME

Ana Tomašić Paić<sup>1\*</sup>, Miroslav Poznić<sup>2</sup>, Snježana Jurić<sup>1</sup>, Hrvoje Fulgosi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rudjer Bošković Institute, Division of Molecular Biology, Laboratory for Electron Microscopy, P. O. Box. 180, HR – 10002, Zagreb, Croatia

<sup>2</sup>Rudjer Bošković Institute, Division of Molecular Medicine, Laboratory for Systems Biomedicine, P. O. Box. 180, HR – 10002, Zagreb, Croatia

\*Corresponding author: Dipl. ing. Ana Tomašić Paić

Rudjer Bošković Institute, Bijenička c. 54, P.O.Box 180, HR-10002 Zagreb, Croatia

Tel.: +385 1 456 1019 / Fax: +385-1-4561-177 / E-mail address: Ana.Tomasic.Paic@irb.hr

Review

### ABSTRACT

Recent advances in microarray technology allowed scientists to investigate expression of thousands of genes in a single reaction, thus generating a vast amount of data. Biological chips, based on hybridization methods, enable detection of genes on a genomic scale. Moreover, chips are used to elucidate fundamental life processes such as cellular and signalling pathways and basic aspects of growth and development of organisms. Recently sequenced model plant *Arabidopsis thaliana* and human genome revealed that a majority of human genes involved directly or indirectly in certain human diseases have their orthologs in vacular plants. Determination of key proteins involved in human health and disease, especially their gene expression patterns and mutations, are becoming rapidly examined and investigated by using biological chips. These technological advances will hopefully uncover the origin of genetic illnesses and likely lead to creation of specific gene therapies.

**Key words:** gene chips, Affymetrix technology, *Arabidopsis thaliana*, human diseases