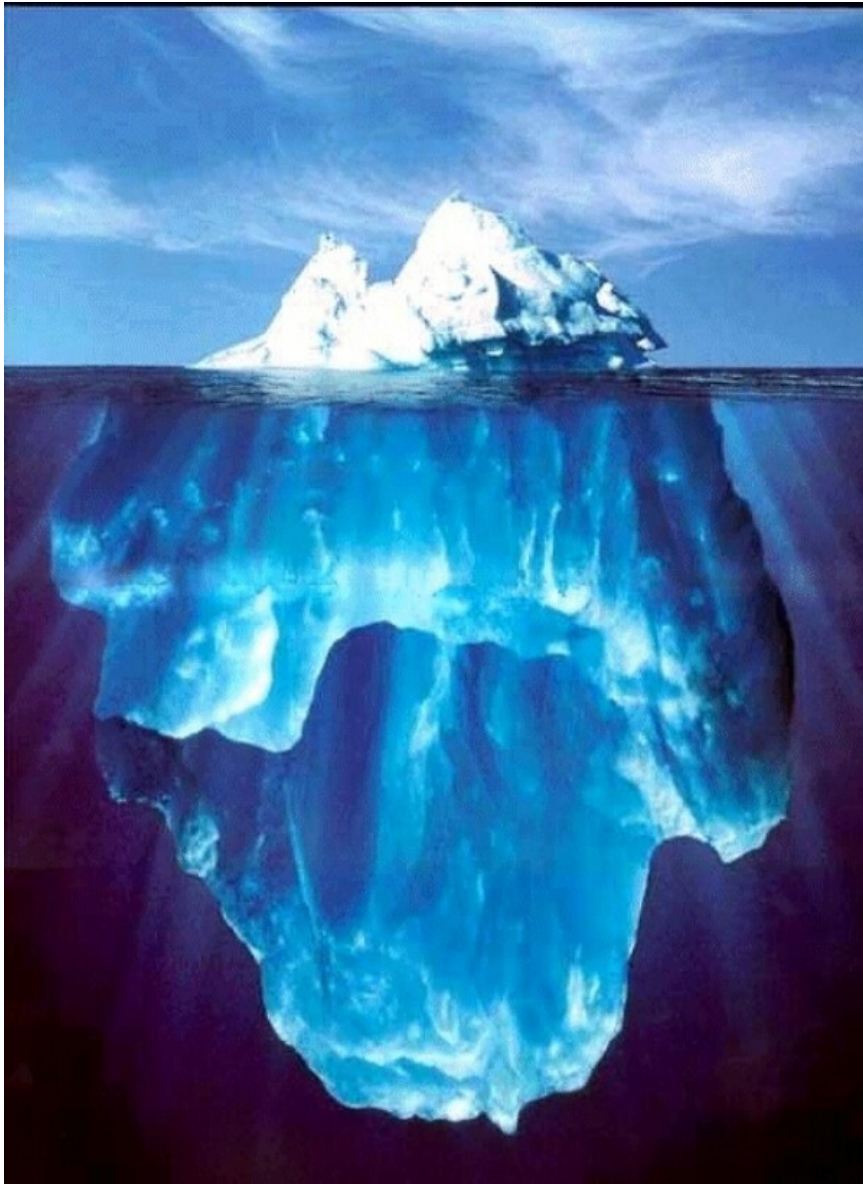


**Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno
Centrum molekulární biologie a genové terapie
Molekulární medicína, CEITEC MU**

Proteinové, buněčné a tkáňové čipy

Jitka Malčíková
26.11.2013



Genom (20-25 tis genů)

Transkripce

Posttranskripční modifikace

Alternativní sestřih

Transkriptom

Translace

Odbourávání mRNA

Posttranslační modifikace

Alternativní konformace

Proteom (miliony proteinů)

Dynamický systém – odráží momentální stav buňky

Hladina proteinu často nekoreluje s hladinou mRNA

Proteomika

Proteom - soubor všech proteinů v daném biologickém systému (buňka, tkáň, organizmus)

Klinická proteomika - studuje celkový buněčný proteom v klinických vzorcích

- Cíl - identifikovat a charakterizovat proteiny zapojené do vzniku a vývoje onemocnění

Proteomické metody

- Dvourozměrná gelová elektroforéza (2-DE)

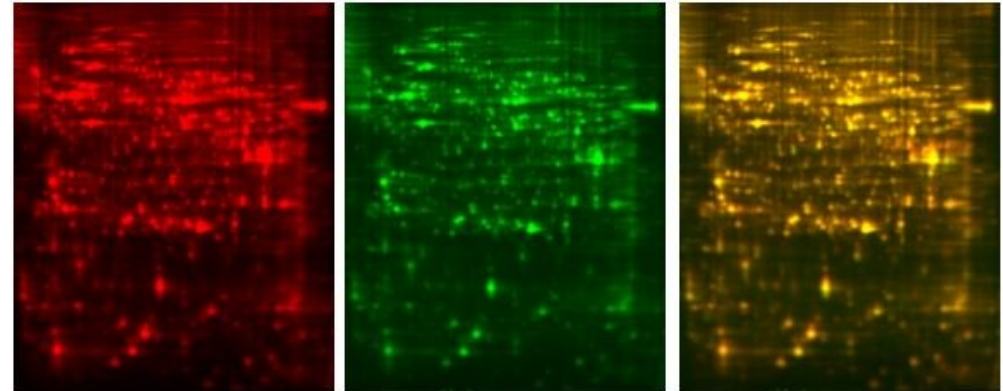
- Časově, finančně náročné
- Těžko reprodukovatelné
- Dvoubarevné značení – DIGE

- 2D Kapilární elektroforéza

- Hmotnostní spektrometrie

- Proteinové čipy

- Vysokokapacitní
- Poměrně jednoduché zpracování
- Expresní i funkční studie
- Vyžadováno minimální množství vzorku



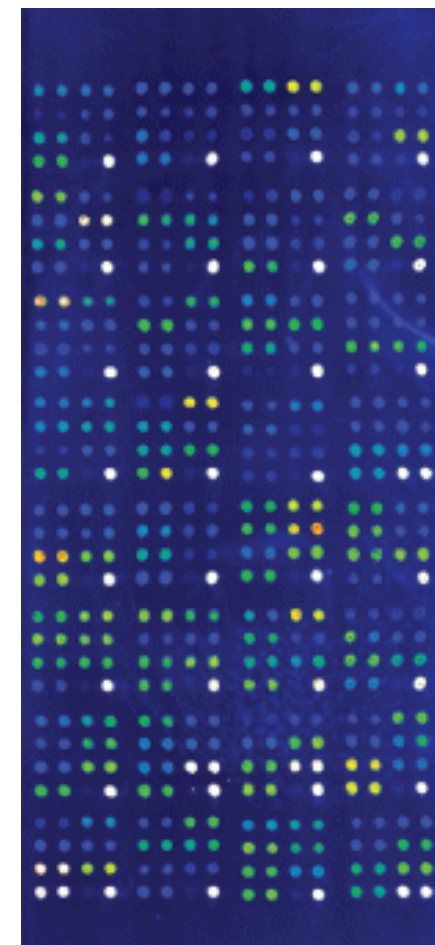
Proteinové čipy

■ Expresní

- stanovení přítomnosti a koncentrace proteinů v komplexních vzorcích
 - Protilátkové čipy
 - Lyzátové čipy
 - Antigen čipy

■ Funkční

- studium interakce proteinů s jinými molekulami
 - proteiny, peptidy, nízkomolekulární látky, oligosacharidy, DNA



Princip proteinových čipů



- Vazba protilátka-antigen - mikrosopot ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
 - Systém využívající malé množství vázané protilátky a malého objemu vzorku je citlivější než systém se stonásobně větším objemem materiálu
 - Citlivost řádově ve femtomolech - 10^6 molekul/ml
 - Množství navázané molekuly je sice velmi nízké, ale v rámci mikrosopotu lze dosáhnout vysoké hustoty
 - Stanovení koncentrace analytu ve vzorku
 - Koncentraci přímo odpovídá množství vázaného analytu

(Ekins RP, J Pharm Biomed Anal. 1989)

Princip proteinových čipů

- Stovky – tisíce proteinů imobilizovaných ve formě mikrospotů na pevném povrchu
 - membrány (polystyrenové, PVDF - polyvinyliden fluorid, nitrocelulosové)
 - standardní mikroskopická sklíčka
 - s chemicky modifikovaným povrchem (poly-lysin, aldehydické skupiny)
 - potažená membránou
- Detekční metody
 - Nejčastěji fluorescence
 - Enzymaticky – značení alkalickou fosfatázou, křenovou peroxidázou
 - Chemiluminiscence
 - Radioaktivita
 - Zvýšení signálu – značení biotinem – vazba na značený streptavidin
 - Hmotnostní spektrometrie

Čipy pro stanovení antigenů

Protilátkové čipy

- Přímý formát (FPA- forward phase arrays)
- Na povrchu spotované protilátky (velikost spotu 0,3-0,5 mm)
- Inkubace se vzorkem



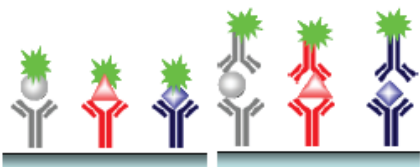
Přímé značení



Sendvičová metoda



Možnost
dvoubarevné
detekce



Vyšší citlivost
a specifita

Xiaobo et al. 2010

- Detekce stovek antigenů ve vzorku
- Expresní profilování – „large-scale“ monitorování proteinové exprese
- Cílené na určité buněčné procesy (buněčný cyklus, cytokiny, MAPK dráha, p53 dráha...)

Lyzátové čipy

- Zpětný formát (RPA – reverse phase arrays)
- Na povrchu spotované vzorky (proteinové, tkáňové lyzáty, sérum)
- Inkubace se specifickými značenými protilátkami



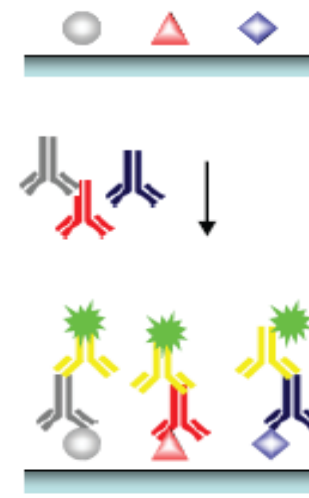
Xiaobo et al. 2010

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

Čipy pro stanovení protilátek

Antigen čipy

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

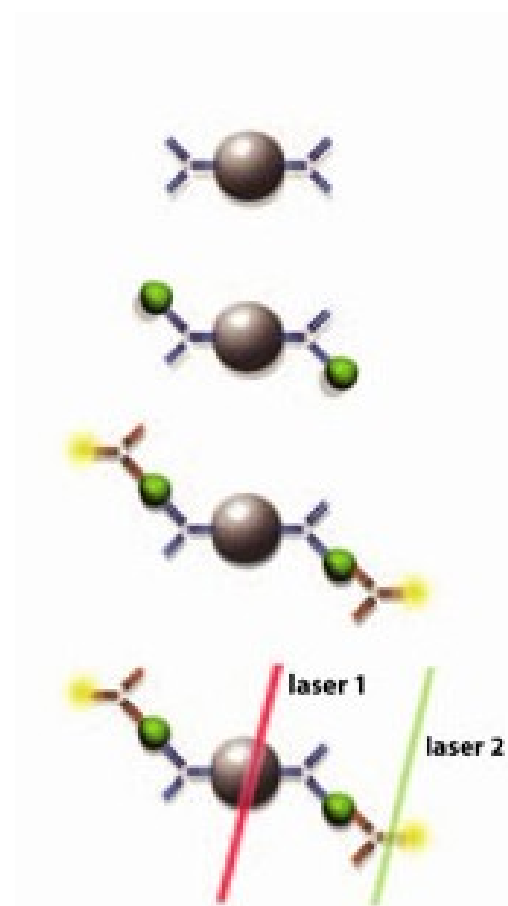


Xiaobo et al. 2010

Bead array - mikrosféry



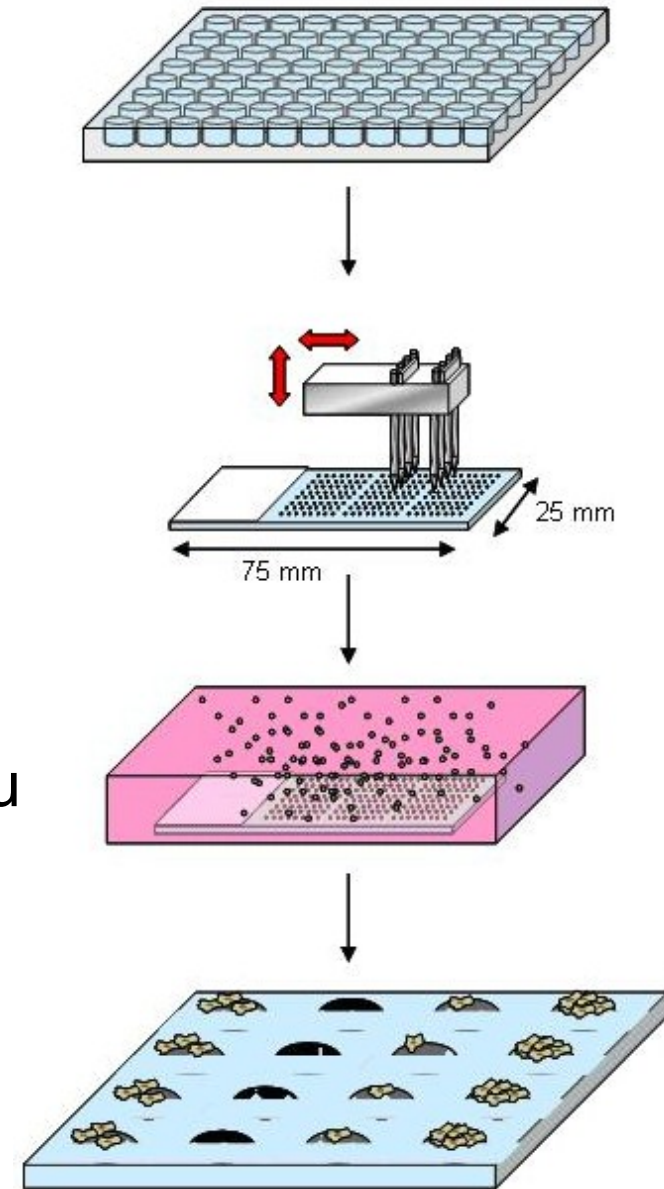
- průměr ~ 5-10 μm (velikost lymfocytu)
- polystyrenové nebo latexové kuličky
- „kódovány“ rozdílnými barvami nebo velikostmi
- Detekce – na principu flow cytometrie
 - rozpoznávání rozdílně kódovaných mikrosfér
 - identifikace a kvantifikace proteinů ve vzorku
- Množství stanovovaných proteinů je limitováno počtem druhů mikrosfér (~500)
- Možnost automatizace
- Využití – cílené – zejména detekce cytokinů, protilátek (alergie, autoimunita), ale např. i detekce fúzních proteinů a onkoproteinů



www.lucerna.chem.ch

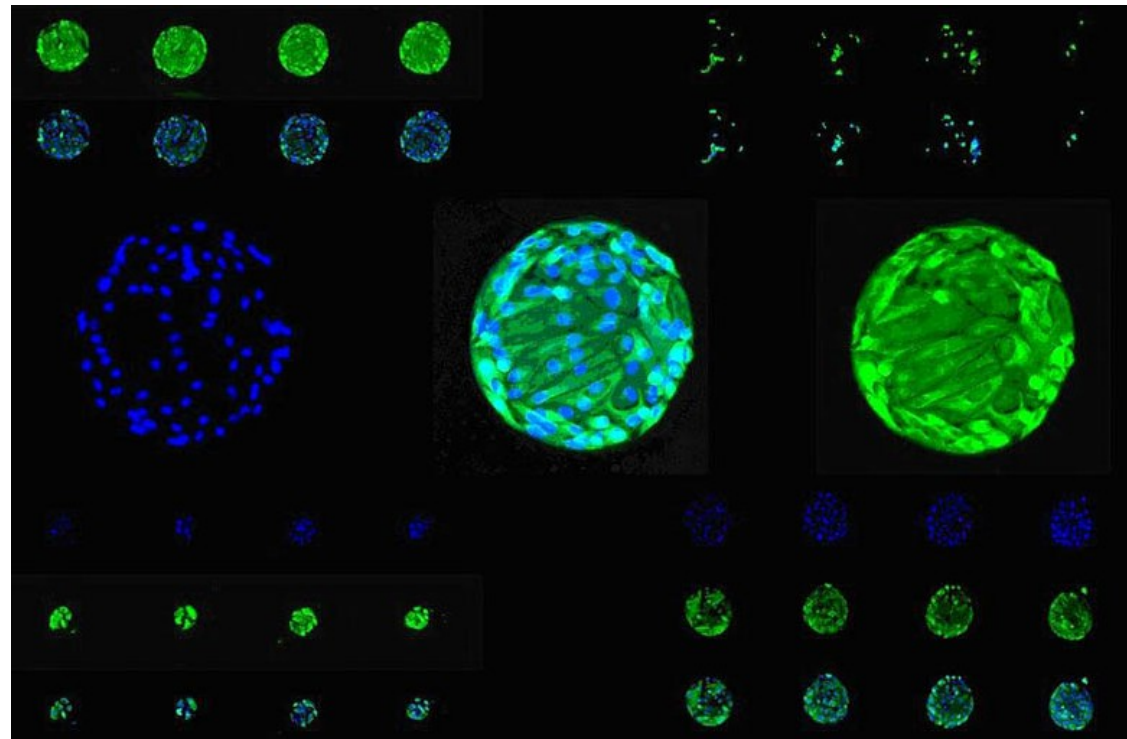
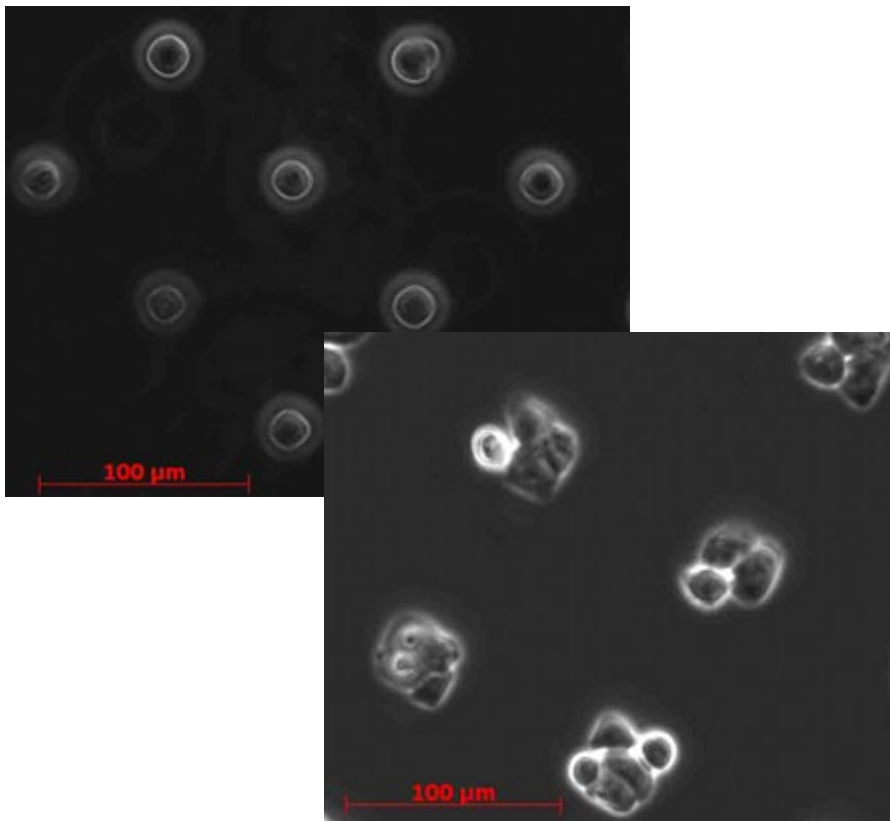
Buněčné čipy

- Přímý formát
 - Spotované protilátky
 - Inkubace s buněčnou suspenzí
 - Např. spotované CD molekuly – inkubace s leukocyty
 - charakterizace leukemických buněk
- „Transfekční čipy“ - buňky rostou na povrchu čipu s naspotovanou cDNA
 - Během růstu přijmou cDNA
 - Čip se spoty buněk exprimujících různé cizorodé proteiny



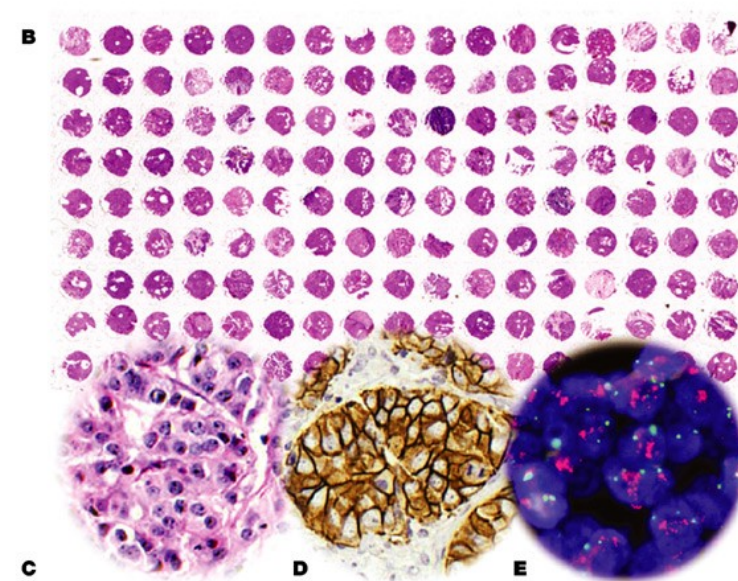
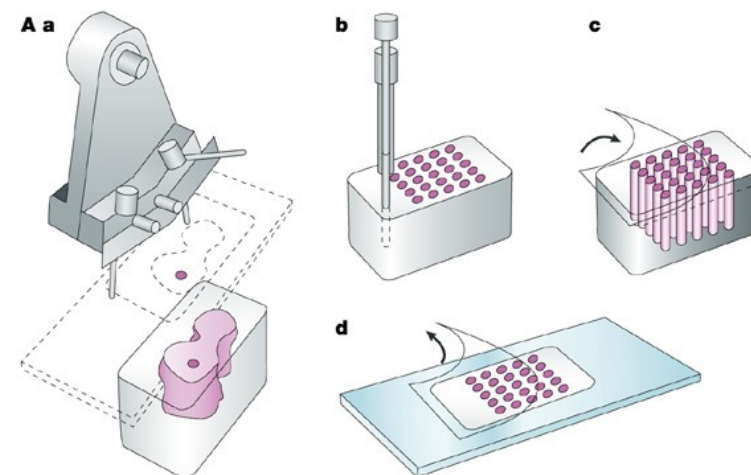
Buněčné čipy

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



Tkáňové čipy

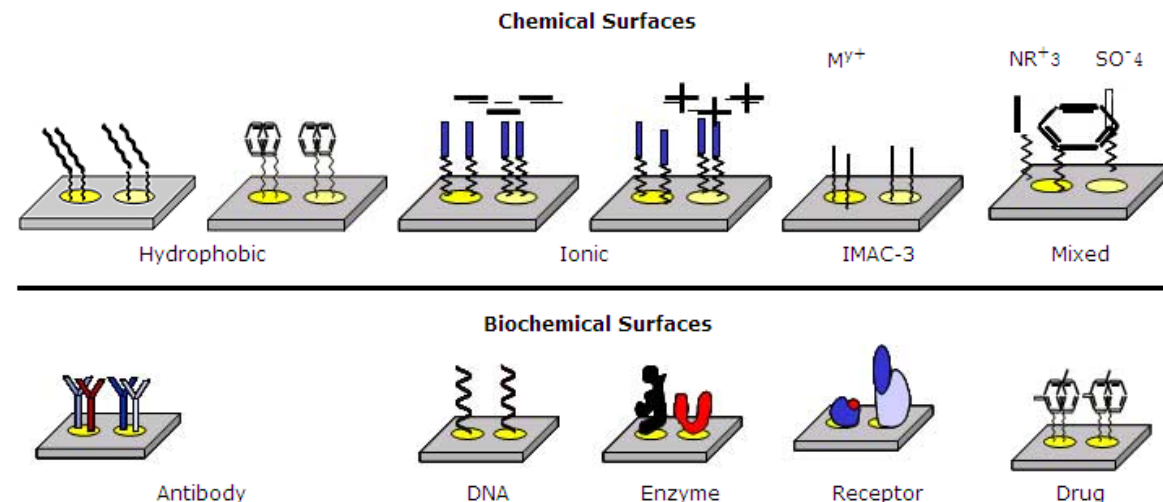
- Varianta RPA čipů (zpětný formát)
- Spotují se celé vzorky tkání např. bioptických
- Inkubace se značenými protilátkami
- Velikost spotu 0,6 - 2mm



Nature Reviews | Drug Discovery

SELDI

- Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation
- Inkubace lyzátů na makrospotech adsorpčního povrchu s různou povrchovou úpravou
- Nespecifická vazba proteinů
- Detekce hmotnostní spektrometrií
- Nižší citlivost
- Umožňuje vyhledávání neznámých biomarkerů

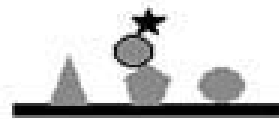


Funkční čipy

- Studium interakce s jinými molekulami
 - Inkubace s jinými proteiny, DNA, malými molekulami (oligosacharidy, terapeutika, ...)
- Studium posttranslačních modifikací
- Studium enzymatické aktivity
- Studium kofaktorů a inhibitorů
- Studium interakcí ligand-receptor



protein - DNA



protein - protein



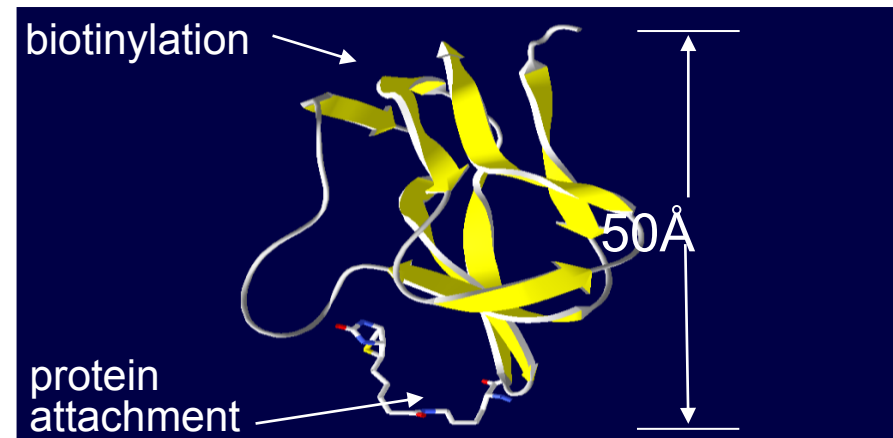
enzym - substrát

Spotovány nativní proteiny

- Potřeba zachování struktury a biologické aktivity
 - Problém imobilizace, zachování konformace a orientace na čipu i během skladování
 - 1. funkční čipy – mikrojamy v silikonovém elastomeru na povrchu mikroskopického sklíčka
(Zhu et al., Nat Genet 2000)
- Nespecifická vazba přímo na povrch
 - Adsorpce
 - Kovalentní vazba přirozených chemických skupin proteinu na upravený povrch
 - Aktivní část proteinu může být schovaná, problém zachování konformace
- Chemoselektivní vazba – připojení chemické skupiny na definovanou pozici proteinu → specifická reakce s komplementární chemickou skupinou na povrchu sklíčka
 - Orientovaná pozice na sklíčku
- Imobilizace přes specifický rekombinantní tag

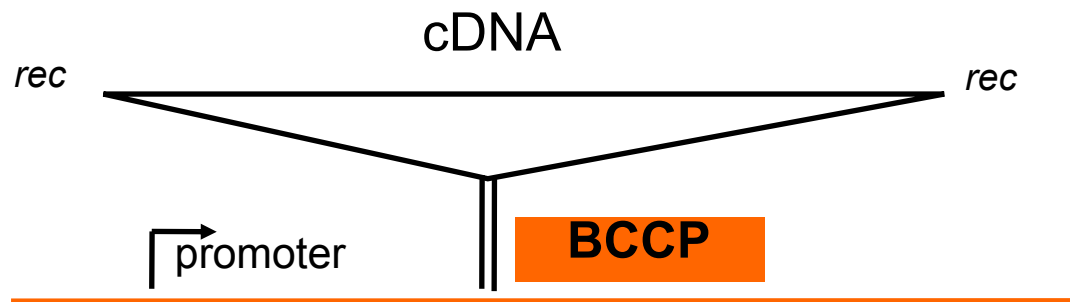
Imobilizace přes rekombinantní tag

- Během syntézy studovaného proteinu se na C nebo N konec přidá afinitní tag, který specificky interaguje s povrchem čipu
- Zachování orientace, konformace
- Funguje jako „spacer“ – oddálení proteinu od povrchu - odkrytí reaktivních míst a umožnění interakcí
 - Poly(aminokyseliny) – poly(His), poly(Cys), poly(Lys)
 - Glutathion-S transferáza (GSH)
 - MBP (maltózu vázající protein)
 - Biotinylovaný tag
 - ...



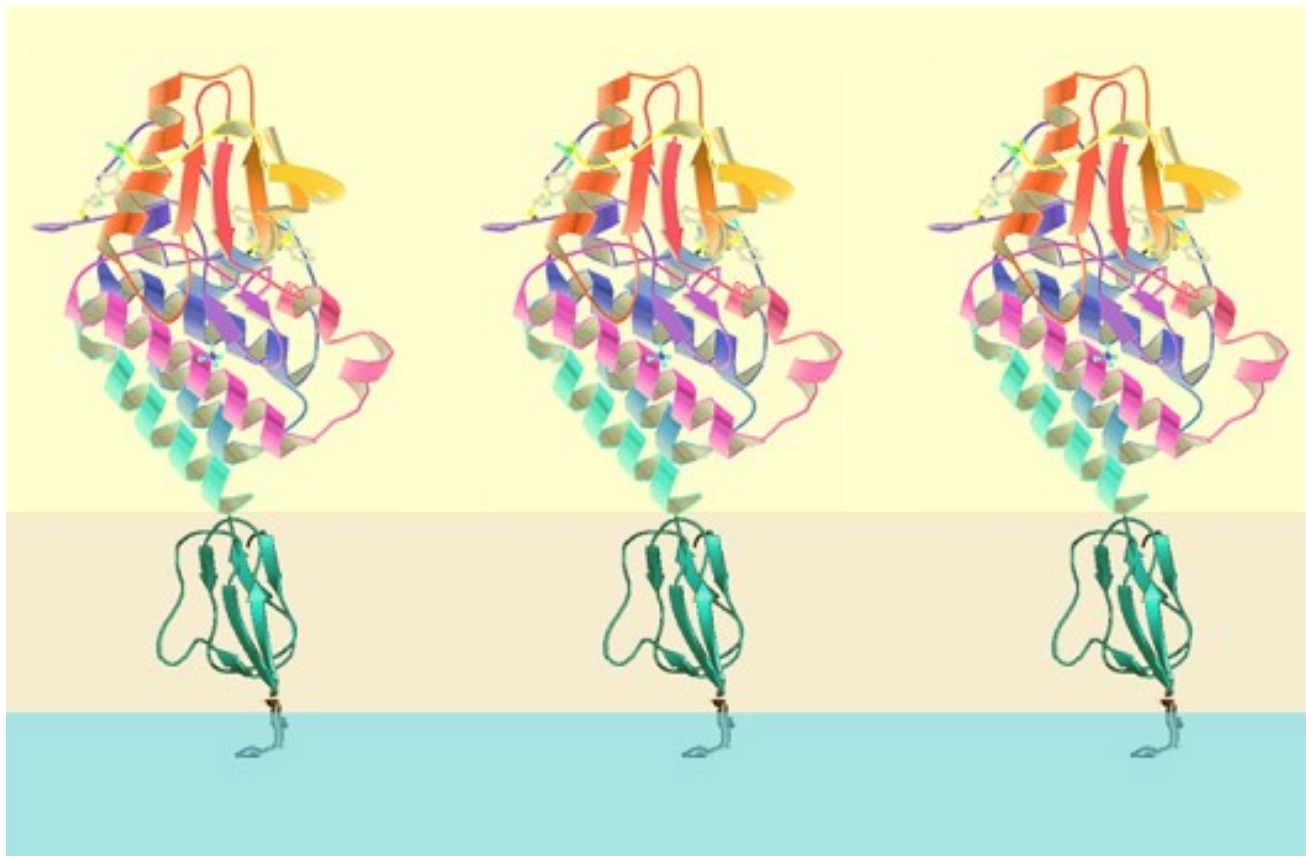
Využití interakce biotin - streptavidin

- Rekombinantní proteiny exprimované v *E.Coli*
- Proteiny jsou vázané na sklíčko přes afinitní „tag“
 - Biotinylated Carboxyl Carrier Protein (BCCP tag)
 - BCCP tag je správně složen pouze pokud je protein správně složen
 - Pouze správně složený BCCP tag je biotinylován
 - Pouze biotinylovaný protein se váže na streptavidinem pokryté sklíčko



Boutell et al., Proteomics. 2004

Využití interakce biotin - streptavidin



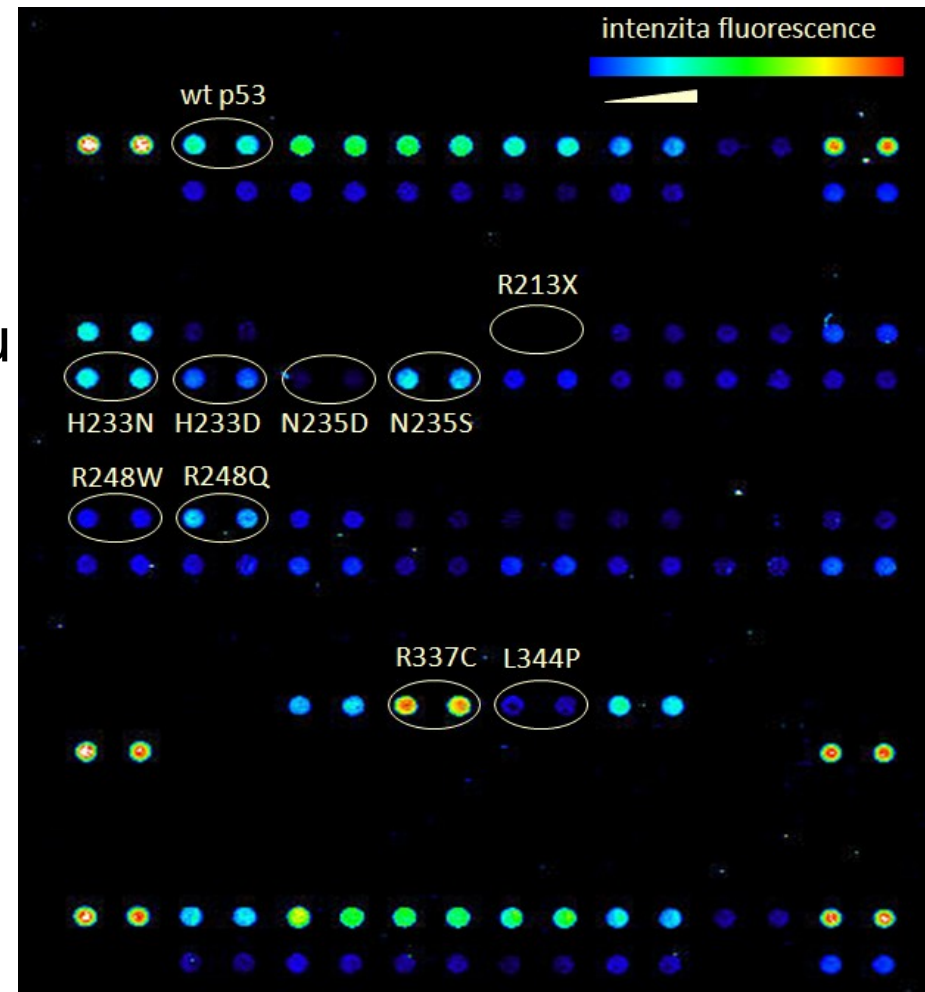
← správně složený protein

← biotinylovaný BCCP tag

← streptavidinem pokryté
mikroskopické sklíčko

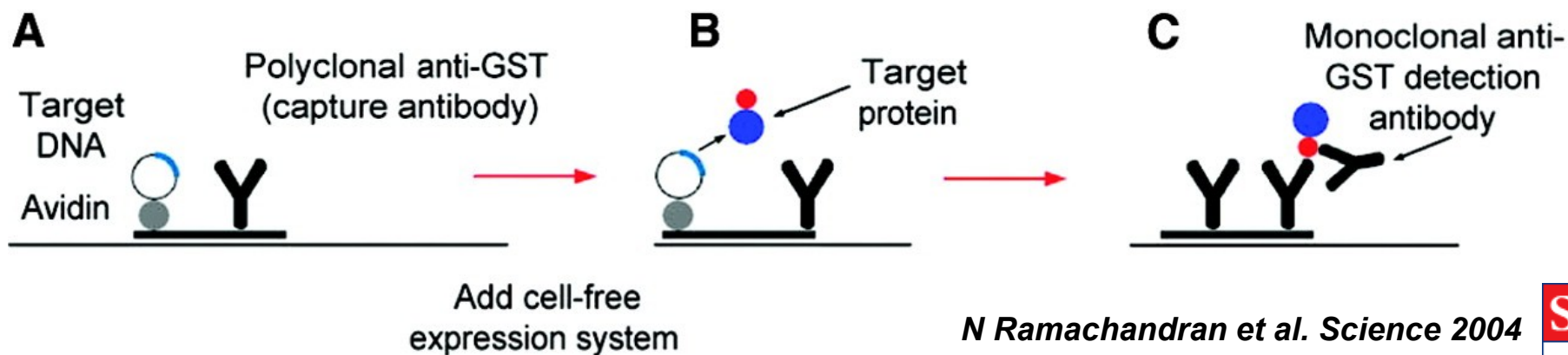
Analýza DNA-vazebných schopností p53 mutantů

- P53 array – 50 variant p53
 - wt
 - 48 mutací – 43 missense, 5 nonsense
 - polymorphismus R72P
- Studium efektu mutací a polymorfismů
 - na interakci s jinými proteiny
 - na konformaci – konformačně-specifická protilátka
 - na vazbu k DNA - vazba proteinů navázaných na čipu k fluorescenčně značeným oligonukleotidům obsahujícím responzivní elementy p53 cílových genů



In situ syntetizované čipy

- „Samoskládací“ (Self-assembling)
- cDNA naspotovaná na sklíčku
 - *in vitro* translace
 - *in situ* imobilizace



Další typy funkčních čipů

- Doménové čipy
 - Spotovány pouze jednotlivé domény proteinu
 - Pochopení protein-proteinových interakcí
- Peptidové čipy
 - Inkubace s proteiny, DNA, malými molekulami (oligosacharidy, terapeutika, ...)
- Čipy s chemickými knihovnami
 - Inkubace s proteiny (enzymy, receptory...)
 - Studium inhibitorů, studium ligand-receptorových interakcí-
vyhledávání terapeutik

Typ čipu		Molekuly imobilizované na čipu	Stanovované molekuly	Inkubace	Počet spotů	Použití
expresní	protilátkové (přímý formát)	známé protilátky	antigeny	neznámý vzorek - proteinový lyzát	> 1000	proteinové profilování
	lyzátové (zpětný formát)	neznámý vzorek - proteinový lyzát	antigeny	známé protilátky	>1000	proteinové profilování
	antigen čipy	známé antigeny	protilátky	neznámý vzorek – protilátky v séru	>1000	stanovení přítomnosti protilátek v séru
funkční	protein-protein	známé proteiny v nativním, funkčním stavu nebo peptidy,		partnerské molekuly interagující s proteiny	>100	studium interakcí proteinů s partnerskými molekulami
	protein-DNA, RNA					
	protein-nízkomolekulární látky	nebo		nebo		
	Enzym-substrát	chemické látky		proteiny		



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Využití

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

- *In vitro* diagnostika – více než u ostatních typů čipů
 - Nejčastěji diagnostika autoimunitních onemocnění
 - Diagnostika infekčních onemocnění