



## Mikromacierze DNA w diagnostyce medycznej

Luiza Handschuh<sup>1,2</sup>, Tomasz Magacz<sup>2</sup>, Marek Figlerowicz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań

<sup>2</sup>Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

### DNA microarrays in medical diagnostics

#### Summary

Many techniques of molecular biology have already been successfully applied in medicine. It seems that in the nearest future, DNA microarrays can also become a useful tool in medical practice. They enable early and precise diagnostics, help to identify disease, predict its outcome and monitor its treatment. DNA microarrays are most frequently applied in medical sciences to detect chromosomal aberrations (CGH arrays), screen single nucleotide mutations (SNP arrays), identify pathogens and profile gene expression. Recently, especially designed DNA microarrays have been introduced to profile the expression of microRNA genes. The majority of projects involving DNA microarrays have been devoted to cancer research. Here, the most prominent examples are described.

#### Key words:

DNA microarrays, gene expression profiling, SNP, CGH, microRNA, cancer, medical diagnostics.

#### Adres do korespondencji

Luiza Handschuh,  
Instytut Chemii  
Bioorganicznej,  
Polska Akademia Nauk,  
Centrum Doskonałości  
CENAT,  
ul. Noskowskiego 12/14,  
61-704 Poznań;  
e-mail:  
luizahan@ibch.poznan.pl

### 1. Wstęp

Biologia molekularna jest tą dziedziną wiedzy, która w ostatnich dekadach w sposób szczególny wpłynęła na rozwój medycyny, decydując o jej obecnym kształcie. Szereg technik stosowanych początkowo wyłącznie w badaniach podstawowych, na organizmach modelowych, praktycznie zrewolucjonizowało diagnostykę medyczną. Wystarczy wspomnieć chociażby o takich metodach jak ELISA czy PCR. Za kolejny punkt przełomowy, zarówno

w biologii molekularnej jak i medycynie, z pewnością uznać można poznanie pełnej sekwencji genomu ludzkiego. W konsekwencji nastąpił rozwój różnego typu technologii mikromacierzowych, które w krótkim czasie stały się jednym z głównych narzędzi służących zarówno do badania struktury genomów, jak i mechanizmów decydujących o sposobie ich funkcjonowania. Już wkrótce technologie mikromacierzowe, jak się wydaje, znajdą zastosowanie także w medycynie praktycznej. Analiza oparta na mikromacierzach DNA umożliwi bowiem: 1) diagnozę jeszcze przed pojawieniem się wyraźnych symptomów choroby; 2) identyfikację nowych jednostek chorobowych lub nowych wariantów znanych chorób; 3) ocenę predyspozycji pacjentów do zapadania na różnego typu choroby; 4) precyzyjną ocenę stopnia zaawansowania choroby; 5) prognozowanie dalszego rozwoju choroby; 6) dobór optymalnej terapii; 7) monitorowanie odpowiedzi na terapię i badanie metabolizmu leków 8) identyfikację potencjalnych celów terapeutycznych, np. genów czy białek (1-11).

Żadna ze stosowanych dotąd metod diagnostycznych nie dostarcza tak wielkiej ilości informacji, trudno dziwić się zatem, że podjęto szereg kroków zmierzających do praktycznego wykorzystania mikromacierzy DNA (2,12). Obecnie główną przeszkodą w realizacji tego celu jest: 1) wysoki koszt zarówno samych macierzy jak i aparatury niezbędnej do przeprowadzenia testu; 2) skomplikowana analiza wyników oraz 3) brak odpowiedniej liczby właściwie przeszkolonego personelu medycznego. Dzięki opracowaniu procedur amplifikacji analizowanej próby pozyskanie odpowiedniej ilości materiału przestało już być problemem. Niezwykle dynamiczny rozwój mikro- i nanotechnologii pozwala wierzyć, że cena testu opartego na mikromacierzach będzie stopniowo spadać, a standaryzacja protokołów znakowania próbki oraz analizy wyników sprawi, że badanie będzie mogło być przeprowadzone przez każdego analityka medycznego.

W przedstawionej pracy na wybranych przykładach pokazane zostaną możliwości wykorzystania mikromacierzy DNA w diagnostyce medycznej. Mamy nadzieję, że w sposób właściwy zobrazują one olbrzymi potencjał tkwiący w technologiach macierzowych.

## 2. Wykrywanie zmian w strukturze genomu

Jednym z najbardziej oczywistych zastosowań mikromacierzy w medycynie jest diagnostyka chorób o podłożu genetycznym. W przypadku tzw. chorób jednogennych, takich jak mukowiscydoza, sprawa jest prosta – wystarczy poznać sekwencję genu (w mukowiscydozie genu CFTR, ang. *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), określić, które mutacje prowadzą do rozwoju choroby i sprawdzić ich obecność w badanej próbce DNA (6). Do tego celu nie potrzeba jednak stosować mikromacierzy. Prawdziwe wyzwanie stanowią choroby o podłożu wieloczynnikowym, do których należą m.in. nowotwory, nazywane nawet „chorobami genomowymi” (13).



Istniejąca w populacji genetyczna zmienność osobnicza, w przeważającej części spowodowana polimorfizmem pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*), ściśle wiąże się z predyspozycjami do zapadania na określone choroby (14). Szacuje się, że ogólna liczba SNP w genomie ludzkim wynosi 9-20 mln (2,3,13,14). Istnieje kilka strategii identyfikacji polimorfizmu genetycznego (14,15), jednak nie wszystkie nadają się do badań całych genomów. Pod względem ilości SNP, które można analizować w pojedynczym eksperymencie, platformy oparte na mikromacierzach nie mają sobie równych. Pierwsze chipy SNP opracowano już pod koniec lat 90. ubiegłego wieku, jednakże obejmowały one zaledwie od 500 do 2000 mutacji (3,16-18). Na przestrzeni ostatnich dziesięciu lat technologia chipów SNP bardzo się rozwinęła (3,14,19). Obecnie najnowszy chip SNP firmy Affymetrix (Genome-Wide Human SNP Array 6.0) zawiera blisko milion sond dla SNP i drugie tyle przeznaczonych do detekcji zmian liczby kopii genów (20, [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)). Konkurencyjna mikromacierz Illuminy (Human1M-Duo, technologia Infinium HD BeadChip) pozwala na identyfikację 1,1 mln SNP ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)).

Praktyczne zastosowanie mają często także mniejsze macierze, służące do identyfikacji SNP w konkretnych genach, których powiązanie z daną chorobą zostało już udowodnione. Wiadomo na przykład, że niektóre warianty polimorficzne genu ABCA4 (ang. *ATP-Binding Cassette*) powodują rozwój chorób siatkówki, m.in. zespołu Stargarda, dystrofii pręcikowo-czopkowej czy makulopatii (zwyrodnienia plamki żółtej). Macierz przeznaczona do wykrywania SNP w genie ABCA4 pozwoliła zidentyfikować wiele mutacji, nie wykrytych dotąd metodami takimi jak analiza SSCP (ang. *Single Strand Conformation Polimorphism*) i heterodupleksów (HD) (21). Niewielką macierz opracowano także do detekcji polimorfizmu genu ATP7B w populacji słowackiej (22). W genie ATP7B zidentyfikowano dotychczas ponad 300 mutacji, przy czym niektóre z nich wywołują autosomalną recesywną chorobę Wilsona. Dotychczas stosowana diagnostyka molekularna tego schorzenia korzystała z metod takich jak mapowanie restrykcyjne, amplifikacja genu ze specyficznym adapterem lub bezpośrednio sekwencjonowanie genu.

Macierze SNP nadają się nie tylko do identyfikacji polimorfizmu i mutacji, ale również do badania takich zaburzeń w genomie jak: utrata heterozygotyczności (LOH, ang. *Loss-of-Heterozygosity*), zmiana liczby kopii (CNV, ang. *Copy Number Variation*), nierównowaga alleliczna (AI, ang. *Allelic Imbalance*), disomia jednorodzicielska (UPD, ang. *Uniparental Disomy*) czy niewłaściwa metylacja chromatyny (3). LOH uznaje się za jedną z ważniejszych przyczyn inaktywacji mechanizmu supresji nowotworów. Przykładami genów pełniących rolę supresorów nowotworzenia są: p16, p53, pRB i PTEN, ulokowane w regionach genomu charakteryzujących się wysoką częstością występowania LOH (13). Zastosowanie chipów SNP pozwoliło wykryć zależność pomiędzy LOH a rozwojem wielu chorób nowotworowych, w tym raka płuc, pęcherza moczowego i białaczek. Z kolei zmianę liczby kopii skorelowano z patogenezą m.in. raka prostaty (w obrębie genów TPD52 i PSAP), czerniaka (w obrębie genu MITF) i raka jajnika (w obrębie genu Notch3) (3). Na podstawie analizy mikro-



macierzowej SNP w ostrej białaczce szpikowej wykazano dysomię jednorodzicielską w regionach chromosomów, w których znajdują się loci dla genów CEBPA, WT1, FLT3 i RUNX1. U pacjentów cierpiących na ostrą białaczkę szpikową w genach tych często występują mutacje, a wewnętrzna duplikacja tandemowa w sekwencji FLT3 stanowi jeden z markerów diagnostycznych i prognostycznych tej choroby (3).

Interesujący przykład praktycznego zastosowania mikromacierzy SNP opisali niedawno Strauss i wsp. (23). Autorzy wykorzystali chipy Affymetrix na 10 tys. SNP do określenia genotypów dziesięciorga członków rodziny amiszów, w której na świat przyszło dziecko z upośledzoną funkcją układu immunologicznego (SCID, ang. *Severe Combined Immune Deficiency Syndrome*). W izolowanej populacji amiszów chorobę tę wywołują mutacje w co najmniej sześciu różnych genach. Najskuteczniejszą formą leczenia jest przeszczep macierzystych komórek szpiku od dawcy zgodnego pod względem antygenów tkankowych HLA (ang. *Human Leukocyte Antigens*). Transplantacja powinna się odbyć w pierwszych miesiącach życia dziecka. Ze względu na niechętny stosunek amiszów do nowoczesnych technologii i systemu ubezpieczeń zdrowotnych 60% ich dzieci z objawami SCID umiera przed ukończeniem drugiego roku życia. Pomijając aspekt religijno-obyczajowy przeprowadzenie wszystkich badań, uwzględniających m. in. określenie serotypów HLA z zastosowaniem sond molekularnych i sekwencjonowanie DNA, jest kosztowne i czasochłonne. Strauss i wsp. wykazali, że za pomocą macierzy SNP można otrzymać równie miarodajne wyniki (haplotypy SNP zamiast serotypów HLA) w ciągu zaledwie trzech dni, przy czym koszt badania dla dziesięciu osób mieści się w kwocie 1500 USD. W opisanym przykładzie przebadanie całej rodziny pozwoliło stwierdzić, że po pierwsze badane niemowlę jest homozygotą pod względem zmutowanego genu RAG1, a po drugie tylko jedno z siedmiorga rodzeństwa ma identyczny haplotyp HLA, a zatem mogło stać się dawcą komórek hematopoetycznych.

Wynik analizy z zastosowaniem mikromacierzy SNP stanowi swoisty genetyczny odcisk palca (ang. *genetic fingerprint*), dodatkowo informujący o ryzyku wystąpienia różnych chorób i ewentualnej wrażliwości na terapię (3). Podstawowym problemem ograniczającym stosowanie macierzy SNP są wysokie wymagania odnośnie do czystości (homogenności) próbki do badań LOH i CNV. Zakłada się, że aby wynik badania był wiarygodny, ilość komórek nowotworowych w pobranej próbce materiału powinna przekraczać 90%. Nie zawsze jest to możliwe, bowiem fragmenty wyciętej w trakcie operacji tkanki często zawierają mieszaninę komórek. Na szczęście stosowanie metod takich jak mikrodysekcja laserowa (LCM, ang. *Laser-Capture Dissection*) pozwala na precyzyjne pobranie tkanki, której niewielka ilość może zostać skompensowana poprzez zastosowanie procedur amplifikacji próbki (13). Stwierdzono, że do badania nadaje się również DNA wyizolowane z zamrożonych tkanek, w przeciwieństwie do częściowo zdegradowanego DNA z preparatów parafinowych konserwowanych formaliną.

Do badania większych zmian w genomie, takich jak delecje czy duplikacje całych chromosomów bądź ich fragmentów, użyteczne są mikromacierze CGH (ang. *Compa-*



ratywna Genomic Hybridization), z powodzeniem stosowane przez ostatnie kilkanaście lat (13,19,24,25). Za pomocą CGH wykazano np., że gen ERBB2 podlega amplifikacji w ok. 35% przypadków raka piersi (20). Scharakteryzowano też różnice w liczbie kopii genów w raku prostaty, przewlekłej białaczce szpikowej (2) oraz nowotworze mózgu, glejaku (26).

Obok opisanych zmian na funkcjonowanie genomu wpływa także regulacja epigenetyczna. Aż 80% dinukleotydów CpG w DNA genomowym człowieka podlega metylacji. Nieprawidłowy przebieg tego procesu jest źródłem wielu chorób, szczególnie nowotworowych (2,27,28). Opracowano już technologie mikromacierzowe umożliwiające analizę wzoru metylacji i identyfikację tzw. markerów epigenetycznych m. in. w białaczce (29), chłoniaku (30), raku piersi (31), prostaty (32), jajników (33) i okrężnicy (34).

Oddziaływania DNA-białka są jeszcze jednym ze sposobów regulacji aktywności genomu. Można badać je za pomocą technologii ChIP-on-chip (24). Metoda ta pozwala precyzyjnie określić, które fragmenty chromatyny wiążą się z białkami, głównie czynnikami transkrypcyjnymi, a zatem które fragmenty DNA genomowego są aktywne transkrypcyjnie. Ponieważ liczne choroby nowotworowe spowodowane są zaburzeniami procesu transkrypcji, metoda ChIP-on-chip stanowi jedno z potencjalnych mikromacierzowych narzędzi diagnostycznych (2,13,35).

### **3. Badanie transkryptomu – diagnoza oparta na profilach ekspresji genów kodujących białka**

Każda komórka czy tkanka charakteryzuje się specyficznym dla niej profilem ekspresji genów. Markerem różnicującym stan chorobowy od fizjologicznego może być obecność albo brak określonego transkryptu (zmiana jakościowa), ale bardzo często jest to jedynie zmiana ilościowa, wyrażona w postaci kilkukrotnej różnicy w ilości danego mRNA.

Już w 1999 r. Golub i wsp. (36) wykazali, że profil ekspresji wybranych genów, wyznaczony za pomocą mikromacierzy oligonukleotydowych (chipów Affymetrix), może służyć jako klasyfikator ostrych białaczek – szpikowej i limfoblastycznej. Nie wiele później Alizadeh i wsp. (37) posłużyli się podobną metodą (macierze cDNA) do klasyfikacji chłoniaka. Opracowane przez nich narzędzie, tzw. Lymphochip, umożliwiło precyzyjne rozróżnienie dwóch podtypów chłoniaka, wywodzących się z odrębnych linii komórek i cechujących się odmienną reakcją na chemioterapię. W 2004 r. ukazały się dwie prace prezentujące klasyfikatory nowych podtypów ostrej białaczki szpikowej (38,39).

Oprócz białaczek i chłoniaków badaniami z zastosowaniem mikromacierzy ekspresyjnych objęto wiele innych chorób nowotworowych (5,7,10,12,40-42). Macierze DNA umożliwiły identyfikację genów – kandydatów na markery diagnostyczne m. in. raka: jajnika (43), piersi (44-46), prostaty (47-50), okrężnicy (51) i płuc (52,53).



Porównując profile ekspresji genów w różnych gruczolakorakach (płuc, piersi, prostaty, odbytu, macicy, jajników), zarówno pierwotnych jak i wtórnych, wyodrębniło się sygnaturę ekspresji genów typową dla przerzutów guzów litych i złej prognozy (54). Dowiedziano też, że jednym z genów podlegających represji w gruczolakorakach jest czynnik transkrypcyjny RUNX1, znany supresor nowotworów (55).

W klasycznych badaniach histologicznych uwidoczniło się podobieństwo pomiędzy procesem gojenia się ran i transformacją nowotworową. Te same mechanizmy naprawcze, które zaangażowane są w procesy zapalne (stymulacja fibroblastów, proliferacja komórek nabłonka, migracja komórek, koagulacja komórek krwi, angiogeneza) mogą być aktywowane podczas rozwoju nowotworu, lokalnej inwazji i przerzutów do innych organów. W badaniach molekularnych z wykorzystaniem mikromacierzy i analizach bioinformatycznych opartych na danych dostępnych w publicznych bazach danych wykazano, że istnieje grupa ponad pięciuset genów o podobnym profilu ekspresji w złośliwych nowotworach (piersi, płuc, układu pokarmowego, prostaty) oraz w fibroblastach różnego pochodzenia, hodowanych z dodatkiem surowicy cielęcej (FBS, ang. *Fetal Bovine Serum*) (56). Sygnatura ta, nazwana *Fibroblast Core (Common) Serum Response (CSR)*, stanowić może uniwersalne narzędzie diagnostyczne do klasyfikacji nowotworów, określenia stopnia ich zaawansowania (złośliwości), wczesnego wykrywania przerzutów i szacowania prognozy. Z zastosowaniem mikromacierzy określono także stopień złośliwości gwiaździaka, jednego z najpowszechniejszych nowotworów centralnego układu nerwowego (57,58).

Borcuk i wsp. (53) wykorzystali chipy Affymetrix do identyfikacji genów markerowych raka płuc w próbkach uzyskanych od pacjentów metodą biopsji. Mimo że preparaty pobrane w ten sposób często zawierają domieszki komórek prawidłowych (płuc, mięśni, skóry, leukocytów) wykazano, że nie przeszkadza to w ich wykorzystaniu do celów diagnostycznych z zastosowaniem mikromacierzy DNA. Zidentyfikowano blisko sto genów, których ekspresja decyduje o przynależności do histologicznej klasy raka płuc, np. gruczolakoraka, raka drobnokomórkowego i raka płaskonabłonkowego. Wyłoniono również geny o potencjalnym znaczeniu prognostycznym (53). W badaniach niedrobnokomórkowego raka płuc określono profile ekspresji genów typowe dla histologicznych podtypów tej choroby, zidentyfikowano sygnatury genowe informujące o stadium choroby, prognozie, stopniu zróżnicowania nowotworu i możliwości wystąpienia przerzutów. Stwierdzono, że organospecyficzny gen LUNX, charakteryzujący się wysokim poziomem ekspresji w zdrowych płucach, a niewykrywalny w żadnej innej zdrowej tkance, może służyć jako gen markerowy do wczesnej detekcji przerzutów (52). Zaobserwowano ponadto, że profil ekspresji genów w raku płuc u palaczy tytoniu znacząco różni się od profilu ekspresji genów w raku płuc u osób niepalących, co sugeruje udział odmiennych, zależnych od uwarunkowań środowiskowych, mechanizmów w patogenezie raka płuc (52).

Lapointe i wsp. (50) poddali analizie na mikromacierzach cDNA ponad 60 próbek guzów prostaty w zestawieniu z 40 próbkami zdrowej tkanki. Metodą grupowania



hierarchicznego uzyskano nie tylko rozróżnienie próbek chorych od zdrowych, ale także wyodrębniono trzy podklasy raka prostaty, niezależne od stopnia zaawansowania nowotworu. Dwa potencjalne markery (MUC1 i AZGP1) przeanalizowano metodą immunochemiczną na macierzy tkankowej. Stwierdzono, że wysoka ekspresja genu MUC1 świadczy o dużym ryzyku wystąpienia nawrotu choroby, w przeciwieństwie do wysokiej ekspresji genu AZGP1, charakterystycznej dla zdrowej tkanki.

Rak piersi, ze względu na powszechność występowania, jest jednym z najczęściej badanych nowotworów. Dotychczasowe metody klasyfikacji raka piersi nie są w stanie oddać klinicznej różnorodności tej choroby. Klasycznym już molekularnym markerem diagnostycznym jest ekspresja receptorów estrogenowych (ER). W badaniach mikromacierzowych wyróżniono pięć podtypów molekularnych raka piersi (45). W sposób powtarzalny w badaniach innych grup obserwuje się występowanie głównie dwóch podtypów. Jest to podtyp przewodowy (luminalny, ang. *luminal A*) i podtyp podstawny (bazalny, ang. *basal-like*). Pierwszy charakteryzuje się ekspresją genu receptora estrogenowego oraz markerów warstwy wewnętrznej nabłonka przewodów mlekowych, drugi zaś wykazuje brak ekspresji genu ER i obecność markerów warstwy podstawnej nabłonka. Podtyp luminalny charakteryzuje się lepszym rokowaniem niż podtyp bazalny. W licznych badaniach raka piersi zidentyfikowano także geny związane z prognozą (44-46,60) i wykazano różnice w profilu ekspresji genów m. in. w nowotworach wywołanych mutacjami w genach BRCA1 i BRCA2 (45,61-63). Na przykładzie raka piersi zademonstrowano również, że mikromacierze DNA mogą być pomocne w detekcji komórek nowotworowych, które uwalniane są do krwi pacjentów. Spośród 170 genów o zróżnicowanej ekspresji w nowotworach naciekających piersi wybrano 12 markerów molekularnych (o ok. 10-krotnie podwyższonej ekspresji), które można łatwo wykryć w prostym teście z próbki krwi (62). Niezwykle ważnym aspektem badań genomicznych raka piersi jest powiązanie wyników analizy ekspresji genów z terapią. W wielu przypadkach niskozaawansowanego raka piersi stosowanie uzupełniającej chemioterapii jest zbędne i przynosi organizmowi więcej szkody niż pożytku. Z kolei pewien odsetek przypadków, mimo niskiego zaawansowania i pozornie dobrego rokowania ma zwiększone ryzyko rozsewu i wymaga agresywnej terapii (41,46,60). Są już na rynku usług medycznych testy mikromacierzowe, które na podstawie profilu ekspresji wybranych genów wspomagają rokowanie i pozwalają dobrać terapię w bardziej zindywidualizowany sposób. Test MammaPrint (70-genowa sygnatura prognostyczna, cyt. 46) ma znaczenie wspomagające przy wprowadzaniu uzupełniającej chemioterapii u pacjentek poniżej 65 r.ż., z guzem T1-2 i bez przerzutów do węzłów chłonnych. Z kolei test Oncotype DX (21 genów) ma zastosowanie do pacjentek T1-2, N0, z guzami estrogenododatnimi, które są zakwalifikowane do uzupełniającego leczenia hormonalnego i chemioterapii. Na podstawie wskazań testu niektóre pacjentki mogą uniknąć niepotrzebnego w ich przypadku podawania cytostatyków.

Wiele prac poświęcono również analizom profili ekspresji genów w raku brodawkowatym tarczycy. Wykazano, że komórki guza wykazują zwiększoną ekspresję



m.in. genów odpowiedzialnych za odpowiedź immunologiczną (64). Od kilku lat prace w tej dziedzinie prowadzone są z powodzeniem także przez polski zespół pod kierunkiem prof. B. Jarząb z Centrum Onkologii w Gliwicach. Z zastosowaniem chipów Affymetrix opracowano złożony z 20 sond klasyfikator molekularny raka brodawkowatego tarczycy (65). Wykazano również, że rak brodawkowaty tarczycy charakteryzuje się wysokim poziomem ekspresji wielu genów, które nie były dotąd zaliczane do klasycznych markerów transformacji nowotworowej.

Badania ekspresji genów w chorobach nienowotworowych prowadzone są na mniejszą skalę. Na podstawie analizy wycinków tkanki sercowej, pobranych od pacjentów cierpiących na choroby serca uwidoczniono, że istnieją co najmniej dwie nierozróżnialne histologicznie odmiany kardiomiopatii rozstrzeniowej (66). Mikromacierze coraz częściej znajdują też zastosowanie w badaniach profilu ekspresji genów w chorobach mózgu, chociaż ograniczona dostępność materiału i istnienie bariery krew-mózg utrudnia przeprowadzenie testów molekularnych. Szacuje się, że w układzie nerwowym aktywnych jest ok. połowy genów zakodowanych w ludzkim genomie, przy czym wiele z nich to transkrypty specyficzne dla mózgu i syntetyzowane w niewielkich ilościach (67). Zastosowanie mikromacierzy cDNA do badania glejaka, najbardziej złośliwej odmiany guza mózgu, doprowadziło do identyfikacji potencjalnego onkogeny – granuliny (68). Z kolei u chorych na stwardnienie rozsiane (MS, ang. *Multiple Sclerosis*) wykryto podwyższoną ekspresję genów kodujących m.in. takie białka jak:  $\alpha$ -2-chimeryna (związana z przemieszczaniem i adhezją komórek), specyficzna dla neuronów enolaza i ATP-aza (biorące udział w regulacji cyklu komórkowego i homeostazy) czy receptor kwasu retinowego  $\alpha$ -1 (odpowiedzialny za przekaz sygnałów) (69). Brak genów kodujących białka presynaptyczne, zaangażowane w transmisję bodźców nerwowych, wykazano stosując macierze cDNA w badaniach schizofrenii (70). Podjęto także próby określenia profilu ekspresji genów w nowotworach głowy i szyi (71,72). Wylonione geny różnicujące kodowały białka biorące udział w adhezji komórek, inwazji, cyklu komórkowym, naprawie DNA, transkrypcji i przekazie sygnałów od czynników wzrostu. Ponadto dowiedziono, że dokonana na bazie profilów ekspresji genów klasyfikacja nowotworów głowy i szyi wykazuje większą zgodność z klasyfikacją na podstawie oceny histopatologicznej niż na podstawie umiejscowienia nowotworu (71). Przebadanie pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej zaowocowało identyfikacją genów, których ekspresja wyraźnie wzrasta lub ulega zahamowaniu podczas rozwoju guza i tworzenia przerzutów (72). Wśród genów o podwyższonej ekspresji znalazły się np. tenascyna, już wcześniej powiązana z patogenezą nowotworów głowy i szyi. Na podstawie analizy profilu ekspresji genów w 25 liniach komórkowych, wywodzących się z raka płaskokomórkowego głowy i szyi, wykazano zróżnicowanie pomiędzy liniami, widoczne w postaci wyraźnego podziału na dwie grupy o odmiennym poziomie ekspresji genów związanych z proliferacją, odpowiedzią na czynniki wzrostu, regulacją cyklu komórkowego i supresją nowotworzenia (73).

W badaniach poświęconych chorobie Alzheimera zastosowanie mikromacierzy cDNA pozwoliło wykryć zmiany w poziomie ekspresji ponad trzydziestu genów



w przypadkach średniozaawansowanej demencji. Jeden z tych genów koduje synapsynę II, białko odpowiedzialne za uwalnianie neurotransmiterów z pęcherzyków synaptycznych (74). Na podstawie analizy wyników otrzymanych z zastosowaniem chipów Affymetrix wyłoniono sporą grupę blisko 3,5 tys. genów, których ekspresja była znacząco skorelowana z obecnością symptomów charakterystycznych dla choroby Alzheimera (75). Większość z nich to geny o podwyższonej ekspresji, kodujące czynniki transkrypcyjne, supresory nowotworzenia, geny regulujące proliferację i adhezję komórek, prekursor amyloidu, a także białka metabolizmu lipidów. Kolejną grupę stanowią geny odpowiedzialne za apoptozę, procesy zapalne i stres oksydacyjny. Geny, których produkty uczestniczą w metabolizmie białek (w tym fałdowaniu i transporcie) znalazły się w grupie genów o obniżonym poziomie ekspresji. Ponad sześćset genów w ww. sygnaturze opisano jako specyficzne dla wczesnego stadium rozwoju choroby, co można wykorzystać w diagnostyce choroby Alzheimera.

Wprowadzenie metod takich jak mikrodysekcja laserowa i PCR na materiale wyizolowanym z pojedynczej komórki powinno ułatwić szersze stosowanie mikromacierzy w badaniach schorzeń centralnego układu nerwowego. Większość prac w tej dziedzinie jak dotąd powstała na bazie niewielkiej liczby pacjentów, co wprawdzie wzbogaciło naszą wiedzę na temat molekularnych podstaw rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, jednakże do praktycznego stosowania mikromacierzy w ich diagnostyce jeszcze daleko. Obecnie mikromacierze ekspresyjne najpowszechniej wykorzystywane są w diagnostyce chorób nowotworowych. Dla przykładu komercyjnie dostępnych jest już ponad 60 testów produkcji francusko-amerykańskiej firmy Ipsogen, wszystkie one ukierunkowane są na diagnostykę białaczek ([www.ipsogen.com](http://www.ipsogen.com)). Firma Ipsogen w 2008 r. rozpoczęła także sprzedaż macierzy przeznaczonych do diagnostyki raka piersi (produkt z serii MapQuant Dx™). Macierz ta, oparta na technologii Affymetrix, składa się z 97 genów, których poziom ekspresji pozwala ocenić stopień zaawansowania nowotworu i podatność na leczenie.

#### **4. Diagnostyka oparta na profilach ekspresji genów kodujących mikroRNA**

W momencie gdy dowiedziono, że małe regulatorowe RNA (mikroRNA/miRNA) pełnią podstawową rolę w wielu procesach rozwojowych i chorobowych, takich jak wzrost, proliferacja, różnicowanie komórek, apoptoza i transformacja nowotworowa, zwrócono także uwagę na ogromne znaczenie diagnostyczne tych cząsteczek (76,77). miRNA to krótkie 20-25-nukleotydowe cząsteczki kwasu rybonukleinowego, które nie kodują białek, lecz biorą udział w regulacji ekspresji genów. Ponieważ bardzo często pełnią one funkcje supresorów onkogenów, niedobór jednego lub kilku miRNA może być przyczyną rozwoju wielu chorób nowotworowych (76). Nie bez znaczenia jest fakt, że niektóre geny kodujące miRNA zlokalizowane są w miejscach chromosomów szczególnie podatnych na pęknięcia i rearanżacje (78). Tak jest m.in. w przypadku genów *miR-15a* i *miR-16a*, zlokalizowanych w podlegającym częstym de-



lecjom regionie chromosomu 13q14. Brak tych genów stwierdzono w przewlekłej białaczce limfocytowej (78). Na podstawie kompleksowej analizy mikromacierzowej stwierdzono, że 129 spośród 217 badanych miRNA charakteryzuje się obniżonym poziomem ekspresji w nowotworach w porównaniu ze zdrową tkanką, z której dany nowotwór pochodzi (77). Dodatkowo okazuje się, że tkankowospecyficzna sygnatura mikroRNA może być znacznie bardziej użyteczna w diagnostyce niż profil ekspresji genów kodujących białka. Porównując ze sobą wzory ekspresji ok. dwustu miRNA w ponad trzystu ludzkich próbkach, w tym różnych liniach komórkowych, wykazano, że znając jedynie profil miRNA w komórce można precyzyjnie określić, z jakiej linii zarodkowej ta komórka pochodzi, czy jest zdrowa lub chora oraz jaki typ nowotworu reprezentuje. Porównawczy test z udziałem mikromacierzy zawierającej sondy dla ok. 16 tys. genów kodujących białka nie dał tak jednoznacznych rezultatów (77).

W późniejszych badaniach mikromacierzowych, obejmujących 540 próbek pochodzących m.in. z guzów piersi, płuc, żołądka, prostaty, trzustki i jelita, wyodrębniono uniwersalny zestaw miRNA o podwyższonej ekspresji w guzach litych. Znalazły się w nim m.in. miR-155, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-92 oraz miR-106a (79).

W rakach piersi zidentyfikowano piętnaście miRNA o zmienionym poziomie ekspresji w porównaniu z próbkami pobranymi od zdrowych osób stanowiących kontrolę (80). Profil ekspresji tych miRNA precyzyjnie różnicuje nie tylko podtypy raka piersi, ale również stopień zaawansowania nowotworu, odzwierciedlając stan receptorów estrogenowych, szybkość proliferacji komórek oraz poziom unaczynienia guza. Największe różnice w poziomie ekspresji zaobserwowano dla miR-21, miR-125b, miR-145 oraz miR-155. Analogicznie jak w raku płuc obniżona ekspresja *let-7a* świadczy o wystąpieniu przerzutów do węzłów chłonnych oraz wysokim indeksie proliferacji, co ponadto wiąże się z gorszą prognozą (80). W gruczolakoraku płuc wysoki poziom *mir-155* i niski poziom *let-7a-2* także skorelowano z negatywną prognozą (81).

Biorąc pod uwagę fakt, że dotychczas u człowieka scharakteryzowano ponad 400 genów kodujących miRNA (a zakłada się, że ich liczba nie przekracza tysiąca), test molekularny obejmujący wszystkie miRNA jest, jak się wydaje, stosunkowo prosty w porównaniu z typową macierzą ekspresyjną, za pomocą której bada się jednocześnie kilkadziesiąt tysięcy transkryptów. Ponadto miRNA, w przeciwieństwie do mRNA cechują się większą trwałością – niezdegradowane miRNA znajdowano np. w preparatach formalinowych (82). Pozostaje jedynie problem efektywnej izolacji i znakowania miRNA, które stanowią zazwyczaj mniej niż jeden procent całkowitego RNA w komórce.

## 5. Identyfikacja patogenów

Powyżej przedstawiono przykłady mikromacierzy mających zastosowanie w diagnostyce poprzez wgląd w strukturę czy aktywność genomu ludzkiego. Nie należy zapominać jednak, że przyczyną wielu chorób ludzkich są drobnoustroje, zwykle o znacznie mniej skomplikowanych genomach niż nasz własny. Macierze zawie-



rające sondy komplementarne do sekwencji kodowanych przez genomy mikroorganizmów stanowią znakomite narzędzie do identyfikacji patogenów. Do celów diagnostycznych świetnie nadają się małe mikromacierze, zarówno oligonukleotydowe jak i cDNA, które są nie tylko tańsze, ale i prostsze w analizie. W momencie gdy mamy do czynienia z homologicznymi szczepami czy różnorodnymi populacjami drobnoustrojów nieocenione stają się mikromacierze złożone z krótkich (>25 nt) sond oligonukleotydowych, które cechują się wyższą specyficznością (83,84). W przeciwieństwie do klasycznych testów mikrobiologicznych nie trzeba czekać na wzrost mikroorganizmów w kulturze *in vitro*, co znacznie skraca czas oczekiwania na wynik badania.

Zróźnicowanie genetyczne bakterii i wirusów, powstające na skutek częstych mutacji i prowadzące do rozwoju nowych szczepów i serotypów, nie tylko utrudnia diagnozę, ale także proces leczenia choroby. Dla przykładu wirus grypy występuje w postaci trzech typów (A, B, C), przy czym typ A, ze względu na różnice w genach kodujących hemaglutyninę (HA) i neuraminidazę (NA), dzieli się na kolejne podtypy: 16 podtypów HA (H1-H16) i 9 podtypów NA (N1-N9), co daje łącznie 135 kombinacji (85,86)! Firma Combimatrix ([www.combimatrix.com](http://www.combimatrix.com)) wprowadziła już do sprzedaży (na razie do celów badawczych) chip do identyfikacji 15 podtypów HA i 9 podtypów NA. Cały test można przeprowadzić w ciągu niespełna czterech godzin. Chip ten oparty jest na technologii półprzewodników i mikromacierzy oligonukleotydowych wysokiej gęstości, co zapewnia wysoką specyficzność, ale wiąże się też z dużym kosztem (ok. 700 USD). Townsend i wsp. (85) opracowali znacznie tańszą (ok. 20 USD) mikromacierz niskiej gęstości (tzw. FluChip-55), służącą do detekcji trzech podstawowych podtypów wirusa A (H1N1, H3N2, H5N1) i wirusa grypy B. W tym przypadku cały test zajmuje ok. 11 godz. W przyszłości planowane jest wzbogacenie macierzy o sondy dla innych szczepów wirusa, w tym wirusa ptasiej grypy. Z kolei chiński zespół (86) opracował niedawno macierz pozwalającą na specyficzną detekcję 25 podtypów wirusa grypy A po uprzedniej amplifikacji materiału metodą PCR.

Przykładem bardziej uniwersalnego narzędzia do diagnostyki mikrobiologicznej może być macierz DNA służąca do detekcji 25 najpowszechniejszych patogenów krwi, m.in. *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* i *Candida* (87). Macierz ta powstała na podstawie różnic w sekwencjach bakteryjnego genu 16S rRNA oraz grzybowego 18S rRNA. Znakowanie próby odbywa się z zastosowaniem reakcji multipleksowego PCR ze starterami komplementarnymi do polimorficznych fragmentów genów rybosomalnego RNA. Autorzy podają, że wykrywalność na poziomie rodzaju sięga 100%, natomiast na poziomie gatunku 96,7%. Głównym czynnikiem ograniczającym kliniczne stosowanie tej metody detekcji patogenów jest wymagana ilość materiału wyjściowego, wahająca się w granicach od 10 (*E. coli*) do 10<sup>5</sup> komórek (*S. aureus*).

Istnieją także macierze pozwalające na wykrycie setki różnych patogenów w pojedynczym teście (2,88,89). W diagnostyce wirusów największe możliwości oferuje



ViroChip zaprojektowany przez de Rissiego (90). Zawiera on sondy specyficzne dla 22 tysięcy najbardziej konserwatywnych sekwencji z genomów wszystkich znanych wirusów. Narzędzie takie może być wykorzystane do identyfikacji poszczególnych wirusów izolowanych z płynów ustrojowych, a także do detekcji wirusów, których nie można hodować *in vitro*.

## 6. Farmakogenomika

Właściwie postawiona diagnoza nie jest jedynym czynnikiem decydującym o skuteczności leczenia. W wyborze terapeutyku równie ważne są indywidualne cechy pacjenta, determinujące odpowiedź na zastosowaną terapię. Z kolei zwalczanie patogennych drobnoustrojów utrudniają wykształcone przez nie mechanizmy oporności, takie jak np. synteza enzymów rozkładających antybiotyki. W naszych zmaganiach z tymi problemami pomocne mogą być specjalnie zaprojektowane macierze. Skonstruowano np. mikromacierz wykrywającą 90 genów oporności na antybiotyki u szczepów bakterii Gram(+), m.in. *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus* oraz *Streptococcus* (91). W podobny sposób wykorzystano mikromacierze DNA do analizy profilu ekspresji genów *Mycobacterium tuberculosis* (92), a także *Streptococcus* z grupy A (93).

W przypadku chorób nowotworowych źródło lekooporności tkwi w genomie, transkryptomie czy proteomie pacjenta. W takiej sytuacji niezawodne są klasyczne chipy genomowe czy mikromacierze do analizy profilu ekspresji genów. Każdy organizm cechuje bowiem odrębny „profil metabolizowania leku”, zależny od aktywności białek transportujących oraz enzymów metabolicznych, np. z rodziny cytochromu P-450. Mutacje w genach cytochromów często powodują brak reakcji na chemioterapię nowotworów, dlatego też chipy dedykowane polimorfizmowi genów rodziny P450 zostały opracowane stosunkowo wcześniej (10). Pierwszym opatentowanym i dopuszczonym do użycia diagnostycznego (w krajach Unii Europejskiej w 2004 r.) był AmpliChip 450 szwajcarskiej firmy Roche ([www.roche.com](http://www.roche.com)), powstały na bazie technologii Affymetrix. Przy jego użyciu analizuje się polimorfizm w sekwencjach dwóch genów należących do rodziny cytochromów CYP450 (CYP2D6 i CYP2C19), których zróżnicowana ekspresja wydatnie wpływa na metabolizm wielu leków, m.in. przeciwdepresyjnych, przeciwpsychotycznych, łagodzących objawy nadpobudliwości psychoruchowej, przeciwbólowych i nasercowych. AmpliChip 450 klasyfikuje pacjenta do jednej z czterech grup: słabo, średnio, szybko lub ultraszybko metabolizującej. Wynik takiej analizy umożliwia personalizację leczenia – indywidualny dobór zarówno samego leku jak i jego dawki, co zwiększa szanse powodzenia terapii i zmniejsza niebezpieczeństwo wystąpienia efektów ubocznych. Ponadto jest to także narzędzie pozwalające przewidzieć interakcje pomiędzy stosowanymi równolegle lekami oraz pomiędzy lekami a np. składnikami diety pacjenta.



Macierze ekspresyjne mogą być stosowane w farmakogenomice nie tylko do określenia indywidualnej wrażliwości pacjenta na dany lek, badania mechanizmów działania leków i zjawiska lekooporności, ale również do identyfikacji nowych celów terapeutycznych (52). Układy modelowe (linie komórkowe, zwierzęta laboratoryjne) posłużyły do zbadania efektu działania tysięcy potencjalnych terapeutyków. Powstały specjalne bazy danych, w których deponuje się informacje uzyskane z eksperymentów mikromacierzowych, przeprowadzonych na komórkach poddanych działaniu leków (52,94). Już w 2001 r. zespół pod kierownictwem T.R. Goluba opracował algorytm służący do klasyfikacji komórek pod kątem wrażliwości na chemioterapeutyki, w oparciu wyłącznie na profilu ekspresji genów (94). Praca ta powstała na podstawie analiz 60 ludzkich nowotworowych linii komórkowych, z zastosowaniem mikromacierzy Affymetrix. Spośród 5 tys. testowanych substancji chemicznych wybrano ponad dwieście wywołujących zróżnicowaną odpowiedź – wrażliwość w jednych, a oporność w innych liniach komórkowych. Dla każdego terapeutyku skonstruowano klasyfikator, liczący od pięciu do dwustu genów, pozwalający na określenie wrażliwości na terapię komórek wykazujących dany profil ekspresji genów.

W badaniach na mniejszą skalę zidentyfikowano pięćset genów związanych z wrażliwością na doksorubicinę i cisplatynę w linii MCF-7 raka piersi (95). W linii wrażliwej obniżeniu ekspresji czynników transkrypcyjnych i genu *bcl-2* towarzyszyło podwyższenie ekspresji cytochromu c, genów związanych z proteolizą i zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G<sub>2</sub>. Wpływ doksorubicyny, powodującej zatrzymanie wzrostu i przyspieszającej starzenie komórek, badano również na liniach komórkowych raka okrężnicy (96). W równoległej analizie dwóch linii zmutowanych (mutanty typu „knockout” genów *p53* i *p21*) wykazano, że geny odpowiedzi na chemioterapeutyk w większości znajdują się pod kontrolą genów *p53* i *p21*.

Zjawisko oporności na chemioterapię było również przedmiotem badań Okamoto i wsp. (97), którzy przy użyciu mikromacierzy i dwóch linii nowotworowych raka jajnika, odpornej i wrażliwej na cytostatyki, wyłonili 44 geny różnicujące obie linie komórek.

## 7. Podsumowanie

Nie ulega wątpliwości, że rozwój technologiczny obserwowany w ostatnich latach diametralnie zmienił oblicze diagnostyki medycznej. W zakrojonych na szeroką skalę badaniach genomicznych wykazano z jednej strony istnienie generalnych mechanizmów rozwoju chorób, a z drugiej podkreślono znaczenie zmienności osobniczej dla przebiegu i leczenia tych chorób. Wprowadzenie mikromacierzy DNA do diagnostyki klinicznej, którego jesteśmy świadkami, jest pierwszym krokiem w kierunku medycyny personalizowanej.

Mikromacierze niekoniecznie muszą być wykorzystane jako bezpośrednie narzędzie diagnostyczne, bardzo często służą jedynie wstępnej identyfikacji genów mar-



kerowych. Jeśli jest ich niewiele można skomplikowaną i kosztowną procedurę mikromacierzową zastąpić prostszą i tańszą metodą, np. RT-PCR. Podejście takie wykorzystano m. in. w przypadku chłoniaka rozlanego z dużych limfocytów B (41,98).

Ze względu na ogromne powodzenie technologii mikromacierzowych w szybkim tempie rosną zasoby informacji deponowane w mikromacierzowych bazach danych, takich jak publicznie dostępne repozytoria – Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) czy ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/>). Wiele zespołów badawczych, szczególnie o profilu bioinformatycznym, podejmuje próby porównania wyników z eksperymentów mikromacierzowych przeprowadzonych w różnych laboratoriach. Tego typu analizy (tzw. „meta-analizy”) mają ogromną wartość z medycznego punktu widzenia, pozwalają bowiem kompleksowo spojrzeć na procesy biologiczne. Ponadto, dzięki uwzględnieniu większej liczby przypadków, wzrasta wiarygodność statystyczna informacji uzyskanych z pojedynczych eksperymentów. Przykładem metaanalizy jest praca Rhodes i wsp. (99) poświęcona badaniom wspólnych mechanizmów transformacji nowotworowej w różnych rodzajach raka, oraz prace Michielsa i wsp. (100) i Yang i wsp. (101), prezentujące analizę porównawczą profilu ekspresji genów w różnych nowotworach w kontekście prognozy.

Michiels i wsp. (100) poddali ponownej analizie wyniki mikromacierzowe siedmiu eksperymentów opublikowanych w latach 1999-2003, przeprowadzonych na grupie minimum sześćdziesięciu pacjentów. Na podstawie analizy każdego z eksperymentów osobno dowiedziono, że listy pięćdziesięciu genów zidentyfikowanych jako związane z prognozą nie mają ze sobą wiele wspólnego. Co więcej, wykazano, że geny składające się na klasyfikator zmieniają się w zależności od składu pacjentów w tzw. zestawie testującym, co prowadziło do błędnej klasyfikacji pacjentów, aż w 31-49%, a zatem niewiele lepszej niż przypadkowa!

Bardziej optymistyczny wydzźwięk zaprezentowali Yang i wsp. (101) w pracy, w której porównano wyniki dla raka piersi, białaczki i międzybłoniaka, uzyskane przez cztery różne zespoły, ale z zastosowaniem tej samej platformy (Affymetrix) i identycznej mikromacierzy. Wyodrębniono 42 wspólne geny o znaczeniu prognostycznym, w tym dwa wcześniej opisane jako markery prognostyczne raka przelyku, okrężnicy i prostaty. Większość zidentyfikowanych genów miała związek z apoptozą i regulacją cyklu komórkowego. Porównania takie pokazują z jak wielką ostrożnością należy interpretować wyniki eksperymentów mikromacierzowych.

Kluczem do wprowadzenia mikromacierzy DNA do powszechnego użytku w diagnostyce medycznej jest, jak się wydaje, po pierwsze, usystematyzowanie wiedzy biologicznej na podstawie informacji uzyskanych z przeprowadzonych już eksperymentów, a po drugie standaryzacja tej metody do tego stopnia, by z użyciem takiego samego chipa i tej samej próbki DNA/RNA w dowolnym laboratorium analitycznym na świecie otrzymano podobny wynik.

Opracowanie powstało w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego: nr PBZ-MNiI-2/1/2005.



## Literatura

1. Cuperlovic-Culf M., Belacel N., Ouellette R. J., (2005), *Drug Discovery Today*, 6, 429-437.
2. Trevino V., Falciani F., Barrera-Saldana H. A., (2007), *Mol. Med.*, 13, 527-541.
3. Mao X., Young B. D., Lu Y. J., (2007), *Curr. Genomics*, 8, 219-228.
4. *Genomics and Clinical Medicine*, (2008), Ed. Kumar D., Oxford University Press.
5. García-Escudero R., Paramio J. M., (2008), *Mol. Carcinog.*, 47(8), 573-579.
6. Meloni R., Khalfallah O., Biguet N. F., (2004), *Pharmaceutical Res.*, 49, 303-308.
7. Shoemaker D. D., Linsley P. S., (2002), *Curr. Opin. Microbiol.*, 5, 334-337.
8. Crowther D. J., (2002), *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2, 5, 551-554.
9. Reynolds M. A., (2002), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 180-185.
10. Aitman T. J., (2001), *BMJ*, 323, 611-605.
11. Kisiel A., Skapska A., Markiewicz W. T., Figlerowicz M., (2004), *Kosmos*, 3-4 (53), 295-303.
12. Walker M. S., Hughes T. A., (2008), *Int. J. Mol. Med.*, 21(1), 13-7.
13. Garraway L. A., Sellers W. R., (2005), *Drug Discovery Today*, 2, 171-177.
14. Kim S., Misra A., (2007), *Annu. Rev. Bimed. Eng.*, 9, 289-320.
15. Podder M., Ruan J., Tripp B. W., Chu Z. E., Tebbutt S. J., (2008), *BMC Med. Genomics*, 31, 1-5.
16. Wang D. G., Fan J. B., Siao C. J., Berno A., Young P., Sapolsky P., Ghandour G., et al., (1998), *Science*, 280, 1077-1082.
17. Fan J-B., Chen X., Halushka M. K., Berno A., Huang X., Ryder T., Lipshutz R. J., et al., (2000), *Genome Res.*, 10, 853-860.
18. Syvanen A. C., (2005), *Nat. Genet.*, 37, S5-10.
19. Lucito R., Healy J., Alexander J., Reiner A., Esposito D., Chi M., Rodgers L., et al., (2003), *Genome Res.*, 13, 2291-2305.
20. Qin J., Jones R. C., Ramakrishnan R., (2008), *Nucl. Acids Res.*, 36(18), e116.
21. Klevering B. J., Yzer S., Rohrschneider K., Zonneveld M., Allikmets R., van den Born L. I., Maugeri A., Hoyng C. B., Cremers F. P., (2004), *Eur. J. Hum. Genet.*, 12(12), 1024-1032.
22. Gojová L., Jansová E., Külm M., Pouchlá S., Kozák L., (2008), *Clin. Genet.*, 73(5), 441-452.
23. Strauss K. A., Puffenberger E. G., Bunin N., Rider N. L., Morton M. C., Eastman III J. T., Morton D. H., (2008), *Clin. Immunol.*, 128, 31-38.
24. Żmieńko A., Handschuh L., Góralski M., Figlerowicz M., (2008), *Biotechnologia*, 4, 39-53.
25. Pollack J. R., Perou C. M., Alizadeh A. A., (1999), *Nat. Genet.*, 23, 41-46.
26. Nakahara Y., Shiraishi T., Okamoto H., Mineta T., Oishi T., Sasaki K., Tabuchi K., (2004), *Neuro. Oncol.*, 6, 281-289.
27. Laird P. W., (2003), *Nat. Rev. Cancer*, 3, 253-266.
28. Schumacher A., Kapranov P., Kaminsky Z., Flanagan J., Assadzadeh A., Yau P., Virtanen C., Winegarçon N., Cheng J., Gingeras T., Petronis A., (2006), *Nucleic Acids Res.*, 34(2), 528-542.
29. Gebhard C., et al., (2006), *Cancer Res.*, 66, 6118-6128.
30. Shi H., et al., (2006), *Carcinogenesis*, 28, 60-70.
31. Piotrowski A., et al., (2006), *Genes Chromosomes Cancer.*, 45, 656-667.
32. Lodygin D., Epanchintsev A., Messen A., Diebold J., Hermeking H., (2005), *Cancer Res.*, 65, 4218-4227.
33. Wei S. H., Balch C., Paik H. H., Kim Y. S., Baldwin R. L., Liyanarachchi S., Li L., et al., (2006), *Clin. Cancer Res.*, 12, 2788-2794.
34. Zhang D., et al. (2006), *Anal. Biochem.*, 355, 117-124.
35. Moreno-Rocha J. C., Revol de Mendoza A., Barrera-Saldana H. A., (1999), *Rev. Invest. Clin.*, 51, 375-384.
36. Golub T. R., Slonim D. K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J. P., et al. (1999), *Science*, 286, 531-537.
37. Alizadeh A. A., Eisen M. B., Davis R. E., Ma C., Lossos I. S., Rosenwald A., Boldrick J. C., et al., (2000), *Nature*, 403, 503-511.
38. Valk P. J., Verhaak R. G., Beijten M. A., Erpelinck C. A., Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovaani S., Boer J. M., Beverloo H. B., et al., (2004), *N. Engl. J. Med.*, 350, 1617-1628.



39. Bullinger L., Döhner K., Bair E., Fröhling S., Schlenk R. F., Tibshirani R., Döhner H., Pollack J. R., (2004), *N. Engl. J. Med.*, 350, 1605-1616.
40. Ross D. T., Scherf U., Eisen M. B., et al., (2000), *Nature Genetics*, 24, 227-235.
41. Cross D., Burmester J. K., (2004), *Clin. Med. Res.*, 2(3), 147-150.
42. Okamoto O. K., (2005), *Einstein*, 3(1), 31-34.
43. Welsh J. B., Zarrinkar P. P., Sapinoso L. M., Kern S. G., Behling C. A., Monk B. J., Lockhart D. J., Burger R. A., Hampton G. M., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 1176-1181.
44. Monni O., Barlund M., Mousses S., Kononen J., Sauter G., Heiskanen M., Paavola P., et al., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 5711-5716.
45. Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., Hastie T., Marron J. S., Nobel A., Deng S., et al., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 8418-8423.
46. van't Veer L. J., Dai H., van de Vijver M. J., He Y. D., Hart A. A., Mao M., Peterse H. L., et al., (2002), *Nature*, 415, 530-536.
47. Dhanasekaran S. M., Barette T. R., Ghosh D., Shah R., Varambally S., Kurachi K., Pienta K. J., Rubin M. A., Chinnaiyan A. M., (2001), *Nature*, 412, 822-826.
48. Singh D., Febbo P. G., Ross K., Jackson D. G., Manola J., Ladd C., Tamayo P., et al., (2002), *Cancer Cell.*, 1, 203-209.
49. Latil A., Bièche I., Chêne L., Laurendeau I., Berthon P., Cussenot O., Vidaud M., (2003), *Clin. Cancer Res.*, 9, 5477-5485.
50. Lapointe J., Li C., Higgins J. P., van de Rijn M., Bair E., Montgomery K., Ferrari M., Egevad L., Rayford W., Bergerheim U., Ekman P., DeMarzo A. M., Tibshirani R., Botstein D., Brown P. O., Brooks J. D., Pollack J. R., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(3), 811-816.
51. Alon U., Barkai N., Notterman D. A., Gish K., Ybarra S., Mack D., Levine A. J., (1999), 8, 96(12), 6745-6750.
52. Petty R. D., Nicolson M. C., Kerr K. M., Collie-Duguid E., Murray G. I., (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10, 3237-3248.
53. Borczuk A. C., Shah L., Pearson G. D., Walter K. L., Wang L., Austin J. H., Friedman R. A., Powell C. A., (2004), *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 170(2), 167-174.
54. Ramaswamy S., Ross K. N., Lander E. S., Golub T. R. (2003), *Nat. Genet.*, 33(1), 49-54.
55. Cameron E. R., Neil J. C., (2004), *Oncogene*, 23(24), 4308-4314.
56. Chang H. Y., Sneddon J. B., Alizadeh A. A., Sood R., West R. B., Montgomery K., Chi J. T., van de Rijn M., Botstein D., Brown P. O., (2004), *PLoS Biol.*, 2(2), E7.
57. Sallinen S.-L., Sallinen P. K., Haapasalo H. K., Helin H. J., Helen P. T., Schraml P., Kallioniemi O. P., Kononen J., (2000), *Cancer Res.*, 60(23), 6617-6622.
58. Rickman D. S., Bobek M. P., Misek D. E., Kuick R., Blaivas M., Kurnit D. M., Taylor J., Hanash S. M., (2001), *Cancer Res.*, 61(18), 6885-6891.
59. Sorlie T., Wang Y., Xiao C., Johnsen H., Naume B., Samaha R. R., Borresen-Dale A. L., (2006), *BMC Genomics*, 26, 127.
60. Cleator S., Ashworth A., (2004), *Br. J. Cancer*, 90, 1120-1124.
61. Hedenfalk I., Duggan D., Chen Y., Radmacher M., Bittner M., Simon R., Meltzer P., et al., (2001), *N. Engl. J. Med.*, 344, 539-548.
62. Martin K. J., Graner E., Li Y., Price L. M., Kritzman B. M., Fournier M. V., Rhei E., Pardee A. B., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 2646-2651.
63. Dudaladava V., Jarzab M., Stobiecka E., Chmielik E., Simek K., Huzarski T., Lubiński J., Pamuła J., Pękała W., Grzybowska E., Lisowska K., (2006), *Heredity Cancer Clin. Practice*, 4(1), 28-38.
64. Delys L., Detours V., Franc B., Thomas G., Bogdanova T., Tronko M., Libert F., Dumont J. E., Maenhaut C., (2007), *Oncogene*, 26(57), 7894-7903.
65. Jarzab B., Gubała E., Lange D., (2005), *Polish J. Endocrinol.*, 3(56), 294-301.
66. Ruppert V., Meyer T., Pankuweit S., Möller E., Funck R. C., Grimm W., Maisch B., (2008), *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 136(2), 360-369.
67. Luo Z., Geschwind D. H., (2001), *Neurobiol. Disease*, 8, 183-193.
68. Liau L. M., Lallone R. L., Seitz R. S., Buznikov A., Gregg J. P., Kornblum H. I., Nelson S. F., Bronstein J. M., (2000), *Cancer Res.*, 60, 1353-1360.



69. Whitney L. W., Becker K. G., Tresser N. J., Caballero-Ramos C. I., Munson P. J., Prabhu V. V., Trent J. M., McFarland H. F., Biddison W. E., (1999), *Ann. Neurol.*, 46, 425-428.
70. Mirnics K., Middleton F., Lewis D., Levitt P., (2001), *Trends Neurosci.*, 24, 479-486.
71. Ha P. K., Benoit N. E., Yochem R., Sciubba J., Zahurak M., Sidransky D., Pevsner J., et al., (2003), *Clin. Cancer Res.*, 9, 3058-3064.
72. Belbin T. J., Singh B., Smith R., Socci N. D., Wreesmann V. B., Sanchez-Carbayo M., Masterson J., et al., (2005), *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 131, 10-18.
73. Jeon G. A., Lee J. S., Patel V., Gutkind J. S., Thorgeirsson S. S., Kim E. C., Chu I. S., Amornphimoltham P., Park M. H., (2004), *Int. J. Cancer*, 112(2), 249-258.
74. Ho L., Guoa Y., Spielmana L., Petrescu O., Haroutunianb V., Purohitc D., Czernikd A., et al., (2001), *Neurosci. Letters*, 298, 191-194.
75. Blalock E. M., Chen K.-C., Stromberg A. J., Norris C. M., Kadish I., Kraner S. D., Porter N. M., Landfield P. W., (2005), *Ageing Res. Rev.*, 4, 481-512.
76. Esquela-Kerscher A., Slack F. J., (2006), *Nature Rev./Cancer*, 6, 259-269.
77. Lu J., Getz G., Miska E. A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., et al., (2005), *Nature*, 435, 834-838.
78. Calin G. A., Liu C. G., Sevignani C., Ferracin M., Felli N., Dumitru C. D., Shimizu M., et al., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(32), 11755-11760.
79. Volinia S., Calin G. A., Liu C. G., Ambs S., Cimmino A., Petrocca F., Visone R., Iorio M., Roldo C., Ferracin M., Prueitt R. L., Yanaihara N., Lanza G., Scarpa A., Vecchione A., Negrini M., Harris C. C., Croce C. M., (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(7), 2257-2261.
80. Iorio M. V., Ferracin M., Liu C. G., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., Magri E., Pedriali M., Fabbri M., Campiglio M., Ménard S., Palazzo J. P., Rosenberg A., Musiani P., Volinia S., Nenci I., Calin G. A., Querzoli P., Negrini M., Croce C. M., (2005), *Cancer Res.*, 65(16), 7065-7070.
81. Yanaihara N., Caplen N., Bowman E., Seike M., Kumamoto K., Yi M., Stephens R. M., et al., (2006), *Cell*, 9(3), 189-198.
82. Nelson P. T., Baldwin D. A., Searce L. M., Oberholtzer J. C., Tobias J. W., Mourelatos Z., (2004), *Nat. Methods*, 1, 155-161.
83. Kozal M. J., Shah N., Shen N., Yang R., Fucini R., Merigan T. C., Richman D. D., et al., (1996), *Nature Med.*, 2, 753-759.
84. Gingeras T. R., Ghandour G., Wang E., Berno A., Small P. M., Drobniowski F., Desmond E., et al., (1998), *Genome Res.*, 8, 435-448.
85. Townsed M. B., Dawson E. D., Mehlmann M., Smagala J. A., Dankbar D. M., Moore C. L., Smith C. B., et al., (2006), *J. Clin. Microb.*, 44(8), 2863-2871.
86. Han X., Xiangmei L., Bohua L., Yihong H., Jinhai H., Shaoqiang W., Jian L., Lin M., Guangle J., Qingyu Z., (2008), *J. Virol. Methods*, 152, 117-121.
87. Wiesinger-Mayr H., Vierlinger K., Pichler R., Kriegner A., Hirschl A. M., Presterl E., Bodrossy L., Noehammer C., (2007), *BMC Microbiol.*, 7, 78.
88. Wang D., et al., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 15687-15692.
89. Conejero-Goldberg C., et al., (2005), *Biotechniques*, 39, 741-751.
90. Wang D., Urisman A., Liu Y. T., Springer M., Ksiazek T. G., Erdman D. D., Mardis E. R., Hickenbotham M., Magrini V., Eldred J., Latreille J. P., Wilson R. K., Ganem D., DeRisi J. L., (2003), *PLoS Biol.*, 1(2), E2.
91. Perreten V., Vorlet-Fawer L., Slickers P., Ehrlich R., Kuhnert P., Frey J., (2005), *J. Clin. Microbiol.*, 43(5), 2291-2302.
92. Butcher P. D., (2004), *Tuberculosis*, 84 (3-4), 131-137.
93. Tart A. H., Walker M. J., Musser J. M., (2007), *Trends Microbiol.*, 15(7), 318-325.
94. Staunton J. E., Slonim D. K., Collier H. A., Tamayo P., Angelo M. J., Park J., Scherf U., et al. (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 10787-10792.
95. Kudoh K., Ramanna M., Ravatn R., et al., (2000), *Cancer Res.*, 60, 4161-4166.
96. Chang B. D., Swift M. E., Shen M., et al., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 389-394.
97. Okamoto A., Nikaido T., Ochiai K., Takakura S., Saito M., Aoki Y., Ishii N., et al., (2005), *Clin. Cancer Res.*, 11(16), 6030-6039.



98. Lossos I. S., Czerwinski D. K., Alizadeh A. A., Wechser M. A., Tibshirani R., Botstein D., Levy R., (2004), *N. Engl. J. Med.*, 350(18), 1828-1837.
99. Rhodes D. R., et al., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 9309-9314.
100. Michiels S., Koscielny S., Hill C., (2005), *Lancet*, 365, 488-492.
101. Yang X., Bentink S., Spang R., (2005), *Biomed. Microdevices*, 793, 247-251.