

VYUŽITÍ BIOČIPŮ V NEUROLOGII A PSYCHIATRII

JÁN BOROŇ, PETR NOVOTNÝ a PETR KAČER

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Petr.Kacer@vscht.cz

Došlo 5.7.16, přijato 19.10.16.

Klíčová slova: biočip, VIPTM microarray, multiple screening, neurodegenerativní onemocnění

Obsah

1. Úvod
2. Biomarkerová diagnostika neurodegenerativních onemocnění
 - 2.1. Alzheimerova nemoc a její biomarkery
 - 2.2. Parkinsonova nemoc a její biomarkery
3. Biočipy v neurologii a psychiatrii
 - 3.1. Základní typy biočipů
 - 3.2. Návrh a výroba biočipů
 - 3.3. Aplikace biočipů v neurologii a psychiatrii
 - 3.3.1. Biočipy a Alzheimerova nemoc
 - 3.3.2. Biočipy a schizofrenie
 - 3.3.3. Biočipy a mozkové nádory
4. Závěr

1. Úvod

Neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc, ad.) jsou chronická onemocnění centrálního nervového systému. Etiologie a patogeneze těchto chorob není zcela objasněna, přičemž jejich výskyt se stále zvyšuje s tím, jak dochází ke globálnímu stárnutí populace (rostoucí průměrná doba života). Na buněčné a molekulární úrovni jsou tato onemocnění charakterizována oxidačním poškozením molekulárních buněčných struktur reaktivními oxidovými radikály (ROS), apoptózou nervových buněk, abnormálními interakcemi protein-protein, degradací proteinů, poškozením homeostázy metaloproteinů, selháním dendritického a axonálního transportu, tvorbou extracelulárních a intracelulárních agregátů, ad. Na úrovni buněčné a molekulární je v současnosti realizována i diagnostika těchto onemocnění opírající se jak o moderní zobrazovací metody, tak metody biochemické, obojí založené na znalosti specifického biomarkeru (pozn. biomarker je chemický, fyzikální nebo biologický specifický

faktor, který může být použit jako patologický indikátor, který je odlišný od fyziologického stavu organismu). Existuje rovněž genetická spojitost s patofyziologickými projevy neurodegenerativních chorob, přičemž změny pozorované v expresi genů u těchto onemocnění jsou složité a dosud nebyly zcela objasněny. Genetická vyšetření pacientů trpících neurodegenerativními chorobami často zahrnují analýzu pouze jednoho nebo několika málo genů. V současné době existují techniky, které umožňují analyzovat stovky nebo dokonce tisíce genů v jediném biologickém vzorku. Jednu z těchto progresivních technik představuje biočipová platforma (microarrays), která umožňuje získat řadu nových poznatků i v této oblasti neurovědy.

2. Biomarkerová diagnostika neurodegenerativních onemocnění

Diagnostika neurodegenerativních onemocnění byla dosud založena zejména na zhodnocení anamnestických dat, klinickém obrazu a výsledcích pomocných vyšetření. Některá neurodegenerativní onemocnění mají charakteristický nález při grafickém zobrazení mozku. Běžná biochemická vyšetření umožňují vyloučit interní a metabolická onemocnění vedoucí k neurologickému deficitu. Definitivní diagnózu je možné stanovit až *post mortem*. Doba od vzniku prvních příznaků do stanovení diagnózy onemocnění je zpravidla velmi dlouhá. Snahou je proto definovat dostatečně specifické a senzitivní biomarkery pro jednotlivá neurodegenerativní onemocnění, které by zvýšily přesnost a rychlost klinické diagnózy. Rozvoj laboratorních metod umožnil větší uplatnění likvorologické diagnostiky využívající stanovení biomarkerů. Nalezení a popis nových biomarkerů neurodegenerativních chorob může přispět nejen ke zlepšení diagnostiky a predikci průběhu onemocnění, ale rovněž k racionalizaci a monitorování průběhu farmakoterapie. Rovněž může přispět k objasnění mechanismů zodpovědných za průběh, případně vznik choroby.

Principiální obtíž při identifikaci biomarkerů u onemocnění CNS souvisí s její anatomickou stavbou. Identifikace biomarkerů neurodegenerativních onemocnění z krve a moči je z důvodů přítomnosti a fyziologické funkce hematoencefalické bariéry velice obtížná, nikoliv však nemožná. Optimálním zdrojem se ukazuje mozkomíšni likvor, jehož odběr a následné dlouhodobé uchování patří dnes k rutinním úkonům neurologických pracovišť. Biopsie mozku, s možností zisku patologicky změněných tkání, je spojena s vysokými zdravotními riziky a dnes se využívá v přísně indikovaných případech, zejména pro diferenciálně diagnostické účely.

2.1. Alzheimerova nemoc a její biomarkery

Alzheimerova nemoc (AN) je chronické progresivní neurodegenerativní onemocnění¹ postihující 10 % lidí nad 65 let a více než 30 % nad 80 let. Je nejčastější příčinou demence středního a vyššího věku. Projevuje se poruchami paměti a poruchami dalších kognitivních funkcí, emočními poruchami, změnou chování a psychotickými projevy. Etiopatogeneze tohoto onemocnění zůstává i přes intenzivní výzkum v této oblasti neobjasněna. Prognóza a průběh AN se velmi liší a doba trvání nemoci může být od několika let až více než 15 let u léčených pacientů. AN je charakterizována progresivní degenerací neuronů, gliózou, hromaděním hyper-fosforylovaného tau-proteinu (neurofibrilárními klubky) a extracelulárními depozity β -amyloidu (senilními plakami), převážně v sekundárním asociálním kortexu. I když příčina AN není jasně známa, zřejmě nejdůležitější roli hraje genetika. V patogenezi AN se uplatňuje řada mechanismů – zrychlená apoptóza, toxické působení excitačních aminokyselin, hliníku a dalších prvků, reakce volných radikálů, lipoperoxidační děje ad. Dané mechanismy vedou predilekčně k poškození cholinergního systému mozku, tedy k úbytku cholinergních neuronů a k poklesu hladiny acetylcholinu v predilekčních oblastech kortexu (entorinální kůra temporálního laloku, hippocampu, asociální oblasti neokortexu) a podkoří (*nukleus basalis Meynerti*). Klinická diagnóza AN vychází ze standardizovaných diagnostických kritérií demence. V podstatě se jedná o diagnostiku *per exclusionem*, kdy nutným předpokladem je vyloučení jiných možných příčin demence. Z tohoto důvodu existuje zřejmá poptávka ze strany lékařů po diagnostickém nástroji, který by nabídl pokud možno neinvazivní a zároveň přesnou diagnostiku tohoto onemocnění.

Biomarkery Alzheimerovy nemoci je možné rozdělit podle jejich přítomnosti před a za hematoencefalickou bariérou. Biomarkery přítomné v cerebrospinálním moku (CSF) v určité míře podávají informaci o metabolických procesech v mozku a to díky volné výměně molekul mezi mozkem a CSF. Následující skupiny biomolekul jsou považovány za relevantní biomarkery AN:

A/ Fosforylované tau-proteiny

Neurofibrilární klubka jsou složena převážně z tau-proteinu, který stabilizuje mikrotubuly a podílí se na udržování integrity cytoskeletu. Tau-protein je u AN nadměrně fosforylovan na mnoha vazebných místech, čímž dochází k tvorbě různých fosforylovaných epitopů, např. p-tau181, p-tau199, p-tau231. Takto abnormálně fosforylovaný tau-protein není schopen vázat a stabilizovat mikrotubuly, což vede k zániku neuronů.

B/ Amyloidní prekurzorový protein (APP)

APP je součástí buněčné membrány neuronů. Odbourává se dvěma cestami a to štěpením α - a β -sekretasou. V prvním případě dochází ke vzniku neškodných rozpustných peptidů, nicméně v druhém případě vznikají toxické β -amyloidové peptidy nadměrně exprimované u AN, které

se stávají jádrem tzv. senilních plaků v mezibuněčném prostoru vedoucí k zánětlivým tkáňovým změnám. Tohoto procesu se pravděpodobně účastní i mikroglie s produkcí toxických cytokinů a radikálů.

C/ β -amyloid ($A\beta$)

Proteolytické fragmenty APP, tj. peptidy s 38–43 aminokyselinami, kde dominantními složkami v placích jsou $A\beta$ -1-42 a $A\beta$ -1-40. Hromaděním nerozpustných $A\beta$ proteinů v mozku je ranou toxickou příhodou v patogenezi AN.

D/ Isoprostany

Přibývající důkazy naznačují, že oxidativní poškození hraje důležitou roli v patogenezi AN. Jako klíčové biomarkery takového poškození jsou využívány isoprostany jako produkty peroxidace lipidů, a to zejména F2-isoprostany. Specifické by mohly být tzv. neuroprostany⁵, které vznikají radikálově katalyzovanou oxidací dokosaheksenové kyseliny, vysoce koncentrované v membránách neuronů a velmi náchylné vůči oxidaci.

E/ Zánětlivé markery

S výjimkou klasických patologických rysů, tj. amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek, mozek u AN vykazuje charakteristiky zánětlivých procesů. Studie ukazují², že nadprodukce cytokinů jako jsou IL-6, IL-1, IL-2, TNF- α (v důsledku akutní zánětlivé fáze) zprostředkuje pravděpodobně nadprodukci APP, čímž se tak nepřímo podílí na patogenezi AN. Nicméně, koncentrace cytokinů v biologických tekutinách se může značně lišit v čase a může být ovlivněna individuálním genetickým pozadím, systémovými zánětlivými procesy, používáním protizánětlivých léků a expozicí faktorům životního prostředí.

F/ Produkty peroxidace lipidů

Výskyt peroxidace lipidů (LPO) v mozku u AN byl potvrzen v několika studiích^{4,6}. Byly detegovány četné markery LPO, mezi nimi reaktivní aldehydy (malondialdehyd, 4-hydroxynonenal, akrolein), F2-isoprostany, F4-neuroprostany, oxysteroly (27-hydroxysterol).

Některé mozkové bílkoviny specifické pro AN nebo jejich metabolity mohou vstupovat do plazmy přes poškozenou hematoencefalickou bariéru, takže mohou být nalezeny i v krvi nebo moči – především prozánětlivé cytokiny, isoprostany nebo $A\beta$ -1-42 a $A\beta$ -1-40.

2.2. Parkinsonova nemoc a její biomarkery

Parkinsonova nemoc (PN) je chronicko-progresivní onemocnění CNS, vznikající na podkladě degenerace specifických neuronů bazálních ganglií, vedoucí zde následně k nedostatku dopaminu. Pro vznik projevů onemocnění je nutná destrukce minimálně 80 % neuronů *striata*. Klinickým projevem PN je hypokinético-rigidní syndrom, provázený třesem a posturálními poruchami (stoje, chůze). Průměrný věk na počátku PN je kolem 60 let, ale může propuknout i dříve.

Diagnóza PN je založena především na cílené anamnéze, klinickém neurologickém vyšetření a následně na pozitivní odpovědi na *L-DOPA* test (ústup motorických příznaků PN). Ve výjimečných případech, kdy testy k diagnostice nestačí či k vyloučení klinické diagnózy PN, je k dispozici nukleárně medicínské vyšetření jednofotonovou emisní tomografií. Patogeneticky je toto onemocnění charakterizováno akumulací α -synukleinu, bílkoviny jejíž funkce není zcela zřejmá. Je kódována *SNCA* genem^{7–9} a v patologické formě vytváří Lewyho tělíska uvnitř buněk a indukuje jejich apoptózu. Současná terapie je účinná při léčbě motorických symptomů pomocí *L-DOPy*, agonistů dopaminu, antagonistů glutamátových receptorů typu NMDA (amantadin), COMT inhibitorů (inhibitory katechol-*O*-methyltransferasy), MAO-B inhibitorů (B-isoforma inhibitoru monoaminoxidasy) a anticholinergiky (inhibice převažující acetylcholinu). Bohužel, k dispozici jsou léky pouze zmírňující příznaky nemoci. V současné době není dostupná léčba, která by cíleně předešla či zpomalila progresi onemocnění.

Do dnešní doby nebyly nalezeny spolehlivé diagnostické či prognostické biomarkery, které by byly použitelné k rozlišení a hodnocení PN. Bylo nalezeno mnoho biochemických látek, které se v diagnostice využívají (proteinů, peptidů a dalších metabolitů), nicméně jsou typicky s velmi malou, případně žádnou korelací ke stadiu a progresi onemocnění. Navíc hladiny těchto látek, případně jejich metabolitů se mezi CSF a krví liší. Proto jsou v následujícím přehledu uvedeny jen některé markery a to s největším významem z hlediska diagnostiky/prognostiky PN.

A/ α -Synuklein

Tato bílkovina je hojně přítomná v CNS, převážně exprimovaná neuronálními mitochondriemi v neokortexu, hipokampu, substantia nigra ad. α -Synuklein přítomný v CSF je jistě potenciálním biomarkerem synukleinopatií (skupiny neurodegenerativních onemocnění charakterizovaných fibrilární agregací α -synukleinového proteinu v cytoplasmě) a je využíván i jako biomarker PN.

B/ β -amyloid ($A\beta$)

Isoforma $A\beta$ -42 byla ve velké míře nalezena v mozkomíšním moku různých skupin pacientů s demencí i bez. V současnosti je přijímán názor, který spojuje tento marker s PN.

C/ τ -Protein

Ačkoli je většinou spojován s patologií AN, zvýšení celkového tau- a hyperfosforylovaného tau-proteinu v CSF je ukazatelem poškození nervových buněk. Nalezené hodnoty u PN jsou však nižší než ty objevené v souvislosti s AN, což by mohlo být využito k odlišení PN od AN.

D/ Další biomarkery

V některých studiích jsou uváděny zvýšené koncentrace 8-hydroxy-2-deoxyguanosinu a glutationu v krvi pacientů s PN¹⁰. Dále bylo navrženo, že naměřené nízké

hodnoty α -synukleinu v plazmě by rovněž mohli pomoci při klinické diagnóze PN.

3. Biočipy v neurologii a psichiatrii

Rozmanitost typů neuronálních buněk v savčím centrálním nervovém systému se odráží v komplexnosti profilů genové exprese probíhající v mozku^{11–14}. Několik rychle se rozvíjejících technologických oblastí již dnes dovoluje vést analýzy neurologických a psychiatrických onemocnění na genomové úrovni. Tyto metody doplňují tradiční metody (např. northern blotting nebo *in situ* hybridizaci) obvykle používané pro studium jednoho genu během jedné analýzy. Jednou z těchto nověji aplikovaných metod jsou biočipy, které poskytují významný nástroj k výzkumu a diagnostice zahrnující analýzy na úrovni genomu, proteomu, metabolomu i buňky.

3.1. Základní typy biočipů

Biočipy^{15–17} jsou dvourozměrně uspořádané matrice, které obsahují vysokou hustotu (desítky tisíc až miliony) sond (DNA, cDNA, RNA, proteiny, protilátky, ad.) obvykle ukotvených na chemicky upraveném skleněném nebo plastovém podkladu. Princip analýzy je založen na selektivní hybridizaci imobilizovaných sond s cílovými biochemickými látkami nebo jejich fragmenty obsaženými v biologickém vzorku (moč, sérum, plazma, CSF nebo tkáň), případně syntetickými sondami (VIPTM čip) za použití nejčastěji fluorescenční nebo kolorimetrické detekce. Na základě tohoto technologického principu bylo vyvinuto několik základních typů biočipů:

A/ DNA (expresní) biočipy

Zjednodušený pohled na tok informací a probíhající biochemické procesy na buněčné úrovni lze získat měřením exprese genů a proteinů, tj. po transkripci DNA do mRNA a translaci na proteiny v buněčném ribosomu, které následně mohou působit na samotnou DNA, mRNA, metabolity nebo jiné bílkoviny. Produkce požadované bílkoviny je podmíněna přepisem genu do mRNA pomocí RNA polymerasy a mRNA mohou pak být „přeloženy“ do bílkovin v ribosomu. V závislosti na typu buňky a jejím biologickém stavu jsou na různých úrovních exprimovány specifické proteiny. Měření všech exprimovaných bílkovin v buňce by tak teoreticky poskytlo významnou informaci o aktuálním stavu buňky. Vzhledem k tomu, že exprese genů je podkladem pro translaci proteinů, znalost mRNA hladin může poskytnout nepřímý obraz o celkovém dění v buňce. Podobně může porovnání exprese genů mezi poškozenými a zdravými buňkami umožnit stanovení molekulární podstaty nemoci. Relativně homogenní charakter mRNA a rozvoj imobilizačních metod založených na vzájemné vazebné schopnosti komplementárních bází vedly k rozvoji dnes velmi vyspělé oblasti transkriptomiky za použití DNA čipů. Kromě toho, v mnoha případech jsou mRNA hladiny přímo odpovědné za produkovanou množ-

ství proteinů, což umožňuje provádět racionální úsudek ohledně úrovně exprese proteinů na základě exprese mRNA. Na druhou stranu exprese proteinů jsou regulovány ještě posttranskripčně jinými faktory, čímž může docházet k významným změnám ve výsledné buněčné produkci.

DNA biočipy se skládají z přesně uspořádaných 2D matic tzv. spotů, které obsahují vysokou hustotu DNA fragmentů (zejména oligonukleotidů; zvaných sondy), které jsou kovalentní nebo nekovalentní vazbou imobilizovány k podkladu (mikroskopické sklíčko, plast ad.). Cílová DNA nebo mRNA (izolovaná z biologického vzorku) se specificky váže na komplementární sekvenci sond, a tato vazba se děje v poměru k množství vyskytující se sekvence ve vzorku (jinými slovy čím hojnější je daná nukleová kyselina ve vzorku, tím větší množství je komplementárně vázáno). Cílem typické analýzy s použitím DNA čipu je změřit množství dané mRNA v biologickém vzorku (buňce, krvi, plodové vodě, tkáni, CSF ad.). Za tímto účelem je nutné převést nestabilní RNA pomocí enzymu reverzní transkriptasy na komplementární DNA (cDNA), která je stabilnější. Fragmenty cDNA jsou poté označeny, typicky Cy3 – zeleným a Cy5 – červeným fluoroforem, a současně aplikovány na biočip. Následným procesem, zvaným hybridizace, dochází ke spojení komplementárních fragmentů. Každý fluorofor absorbuje záření o specifické vlnové délce a re-emituje ho na komplementární vlnové délce, což umožňuje jeho detekci příslušným zařízením, např. konfokálním mikroskopem nebo laserovým skenerem. Srovnání relativní intenzity signálu každého fluoroforu pak slouží k určení relativního rozdílu exprese pro každý genový transkript. Vizuálně se pak souhrn signálů v určitém spotu (statisticky vypovídající pole s řádově desítkami až miliony sond o rozměru jednotek až stovek mikrometrů) jeví červeně nebo zeleně (v případě kvantitativně převládajících transkriptů v biologickém nebo kontrolním vzorku) nebo žlutě (v případě, že kvantita obou vzorků je srovnatelná).

B/ Proteinové biočipy

Zatímco DNA biočipy jsou mimo jiné použitelné pro měření hladin mRNA exprimovaných v buňce, nejsou schopny přímo měřit množství produkovaných bílkovin po translaci. To vedlo k vývoji proteomických biočipů. Charakterizace proteomu představuje jedinečnou výzvu vzhledem ke své dynamické povaze způsobené částečně posttranslačními modifikacemi proteinů, jako jsou fosforylace a glykosylace. Z tohoto důvodu analýza proteinů v biologickém vzorku představuje důležitý doplněk genomické analýzy, při které je zjišťována exprese mRNA. Proteinové biočipy tedy umožňují rozmanitou funkční analýzu proteinů pomocí interakce proteinů s imobilizovanými molekulami, například bílkovinami, peptidy, nízkomolekulárními látkami, oligosacharidy nebo DNA. Proteinové biočipy využívají podobných konceptů a principů jako DNA čipy, nicméně fyzikálně-chemické rozdíly mezi DNA a proteiny vyžadují různé postupy při manipulaci s biologickým vzorkem. Z tohoto důvodu tisk a imobilizace bílkovin na substrátu vyžadují mnohem více

pozornosti. „Proteinový svět“ je komplexnější, jelikož vedlejší řetězce aminokyselin umožňují mnohem více možností interakcí, než párování nukleobází. Dynamické posttranslační modifikace mají další dopad na proteinové interakce a aktivity. Dále, jejich imobilizace musí proběhnout bez poškození jejich struktury, aby byla zachována jejich funkčnost. Udržet imobilizované proteiny funkčně aktivní je mnohem obtížnější než je tomu u imobilizovaných oligonukleotidů a fragmentů nukleových kyselin. Na rozdíl od molekul nukleových kyselin, které přirozeně tvoří velmi specifické interakce s komplementárními molekulami, molekuly bílkovin obecně nemají možnost takovýchto unikátních interakcí. Z tohoto důvodu je většina proteinových biočipů tvořena omezenějším souborem bílkovin (= antigenů a protilátek), které jsou schopny tvořit specifické interakce s cílovými molekulami. Další výzvou pro výrobu proteinových biočipů je příprava vzorku, tj. izolace, čištění a syntéza bílkovin, která je obtížnější a dražší než je tomu u nukleových kyselin. Dalším nezanedbatelným parametrem je to, že proteiny nemohou být amplifikovány (namnoženy) pomocí PCR techniky. Přes tyto nevýhody, proteinové biočipy jsou slibným nástrojem pro paralelní analýzu funkcí proteinů.

Pro výrobu proteinových biočipů se používá několik technik. Tyto zahrnují kontaktní spotery využívající tiskové mikrojetličky nebo bezkontaktní systémy jako jsou piezoelektrické nebo elektrostatické přístroje. Bez ohledu na použitou techniku je nutné zajistit vhodné výrobní podmínky, jelikož bílkoviny během výroby biočipů snadno denaturují. V souladu s běžně používanými skenery biočipů, výběr fluorescenční značky obecně určuje výběr metody detekce. Přímé značení proteinového extraktu se provádí typicky fluorofory Cy3 nebo Cy5 podobně jako u DNA biočipů. Vzhledem k tomu, že fluorofory jsou velké a mohou narušovat interakci mezi analytem a protilátkami, je možné použít menší značky jako je biotin s následnou detekcí streptavidinem konjugovaným s fluoroforem. Skenování proteinových biočipů s fluorescenčně značenými vzorky vede k vizualizaci a zpracování dat podobnému jako u DNA čipů.

C/ Populační čipy

Populační čip^{18–26}, v současné době primárně na bázi tzv. VIPTM čip (Variation Identification Platform)^{18,19} využívá oproti původním DNA čipům, které jsou schopny testovat maximálně jednotky biologických vzorků, obráceně uspořádání volných sond a imobilizovaných vzorků, čímž se kapacita technologie diametrálně liší, tj. je možné testovat až 10 000 biologických vzorků (jedinců populace) během jedné analýzy, každý v minimálně deseti lokusech. Tím tato platforma umožňuje významně snížit časové a finanční nároky na jednoho pacienta v rámci určité populace. Další výhodou je v přizpůsobivosti počtu vzorků a rychlosti získání genotypových informací (typicky 24 až 48 h od získání vzorku). Tato platforma umožňuje identifikaci jakékoliv amplifikované nukleové kyseliny z jakéhokoliv organismu a již nyní aplikace zahrnují populační

screening za účelem personalizované medicíny, racionální personální preskripce, korelaci genotypů napříč populacemi jedinců s určitým zdravotním fenoménem (např. soubory mutantních genů u schizofreniků s následnou racionalizací preskripce, předpověď terapeutické účinnosti imunoglobulinové terapie u jednotlivých pacientů s relapsující remitující roztroušenou sklerózou (RRMS)²³ a hodnocení úrovně rizika vývoje autismu²⁵ ad.), diagnostiku chorob, predikci chorob, neonatální screening, transplantační testy (HLA; Human Leucocyte Antigen)²⁷, forenzní využití, parentální testy, genealogické testy ad. V oblasti veterinární a botanické se jedná zejména o populační screening za účelem šlechtění, nicméně do budoucna je pravděpodobné, že vznikne i v tomto odvětví poptávka po populačním screeningu za účelem genotypové diagnostiky. Technologie není druhově omezená, může se uplatnit v genetických studiích humánních, živočišných, rostlinných, bakteriálních i virových se zaměřením na detekci specifických sekvencí nebo menších sekvencních variant včetně SNP (Single Nucleotide Polymorphism), mutací, insercí, delecí a inserčně-delečních mutací. O tomto trendu svědčí i fakt, že patent na původní technologii VIPTM byl již využitý u několika dalších patentovaných postupů a to zejména v oblasti zemědělství, šlechtění a humánní diagnostiky. O tom, že využití populačních čipů je současným trendem v molekulární biologii, svědčí i fakt, že poslední nalezený patent s aplikací této technologie byl publikován v červnu tohoto roku. Vybrané lokusy jsou amplifikovány PCR, imobilizovány na čipu a hybridizovány fluorescenčně značeným syntetickým oligonukleotidem. Následně je hybridizovaný čip skenován fluorescenčním skenerem, přičemž je získána genotypová informace detekcí a kvantifikací fluorescenčního signálu. „Wild type jedinec“ od tzv. přenašeče a mutanta je dobře rozlišitelný díky změnám v sekvenci DNA, která má vliv na efektivitu hybridizace, což se projeví na intenzitě fluorescenčního signálu. Při využití více fluoroforů (např. Cyanin3 a 5) se zvýší spolehlivost a přesnost metody. Při správném provedení je garantována 99,99% přesnost.

3.2. Návrh a výroba biočipů

V posledních deseti letech byl zaznamenán velmi rychlý technologický pokrok ve vývoji biočipů. Byla provedena velmi důležitá zdokonalení: miniaturizace spotů umožnila lepší citlivost a analýzu většího počtu genů; detekce pomocí fluoroforů namísto radioaktivního značení umožnila ko-hybridizační experimenty; byl zaveden rigidní pevný podklad (sklo), s nímž je snazší manipulace než s původně používanými membránami. Nicméně, výroba biočipů je stále multiparametrovým procesem s nutností optimalizace každého jednotlivého kroku. Existuje několik základních způsobů výroby biočipů:

A/ *In-situ* syntéza

Do kategorie tzv. *in situ* výroby biočipů patří technologie, které uskutečňují výstavbu oligonukleotidu přímo na podkladu. Patří sem dvě základní metody, tj. fotolitografická a piezoelektrická. V prvním případě se využívá fotolitografické masky, která určuje, kde dochází k výstavbě sond na čipu a to po osvětlení UV světlem. Tím dochází k deprotekcí dříve depozitovaných funkčních nukleotidů (chráněných funkčními skupinami citlivými na UV světlo) na substrátu a připojení dalších nukleotidů. Opakováním tohoto procesu dochází k výstavbě celého oligonukleotidu. Délka sond u těchto čipů je omezena (25 nukleotidů). I přes tuto nevýhodu, použití fotolitografické techniky vede k velmi reprodukovatelným a pravidelným oblastem sond na povrchu biočipu. Nicméně, tato technologie je pro nákladnost optimalizace nevhodná pro výrobu zakázkových biočipů nebo výrobu s nízkým počtem kusů. Mezi neznámější biočipy vyráběné fotolitografickou syntézou patří GeneChip® od firmy Affymetrix¹⁷. Druhým způsobem *in-situ* výroby je bezkontaktní piezoelektrická syntéza. Oligonukleotidové biočipy jsou vyráběny pomocí piezoelektrických krystalů v tiskových hlavách, které působením elektrického proudu vytlačují velkou rychlostí nukleotidy na povrch substrátu. S využitím fosforamidové chemie dochází k výstavbě oligonukleotidu. Tato metodika tisku je účinná a nízkonákladová, ale vyžaduje průběžnou kontrolu kvality tisku z důvodu ucpávání trysek.

B/ *Mechanické spotování*

Na rozdíl od fotolitografických a piezoelektricky vyráběných čipů, spotované čipy jsou generovány pomocí mechanického nanesení předsyntetizovaných oligomerů (obvykle o 50–70 bázích) nebo cDNA amplikonů na chemicky modifikovaný substrát robotickým ramenem (spoterem). Nanesení sondy k substrátu je realizováno kontaktně nebo bezkontaktně pomocí kapilárních kovových jehliček. Spotované biočipy se využívají zejména při výrobě méně-hustotných matic a se sondami s delším řetězcem v porovnání s biočipy syntetizovanými *in-situ*.

B/ *Mechanické spotování*

Na rozdíl od fotolitografických a piezoelektricky vyráběných čipů, spotované čipy jsou generovány pomocí mechanického nanesení předsyntetizovaných oligomerů (obvykle o 50–70 bázích) nebo cDNA amplikonů na chemicky modifikovaný substrát robotickým ramenem (spoterem). Nanesení sondy k substrátu je realizováno kontaktně nebo bezkontaktně pomocí kapilárních kovových jehliček. Spotované biočipy se využívají zejména při výrobě méně-hustotných matic a se sondami s delším řetězcem v porovnání s biočipy syntetizovanými *in-situ*.

3.3. Aplikace biočipů v neurologii a psychiatrii

V oblasti biočipů jsou v současné době DNA biočipy nejvíce aplikovány pro studium profilů genové exprese v lidském mozku. I když zde představují nový výkonný nástroj pro tento druh zkoumání a diagnostiku, je zde několik významných omezení. První z nich je skutečnost, že lidská mozková tkáň jako zdroj pro izolaci minimálně degradované mRNA, kdy desítky miligramů lidské mozkové tkáně jsou potřebné k izolaci několika mikrogramů mRNA, je omezeně dostupná. Kvantita může být do určité míry překonána amplifikací výchozího materiálu pomocí PCR techniky nebo antisense RNA polymerasy, nicméně problém se získáním materiálu přetrvává. Částečně dostupnější je využití cerebrospinální tekutiny jako zdroje biomarkerů, nicméně jejich zastoupení se od mozkové tkáně liší. Z tohoto důvodu se do značné míry používá zvířecích modelů simulujících neurologická a psychiatrická onemocnění, které jsou schopny poskytnout kromě dat z behaviorálních pozorování i dostatek biologického materiálu jak *in vivo*, např. pomocí mikrodialýzy, tak *post mortem*.

Druhým parametrem je popsána skutečnost, že mnohé

transkripty jsou přítomné ve vzorcích mozku v tak malém množství, že často zůstávají pod limitem detekce biočipů na rozdíl od jiných transkriptů, které jsou naopak přítomny hojně napříč celou tkání. Zvýšení celkového množství cílového (hybridizačního) analytu většinou nezvyší citlivost biočipu (relativní výskyt transkriptů v celkovém souboru RNA spolu s charakteristikami sondy ovlivňuje detekční limit pro každý transkript). Při výše uvedených technických omezeních biočipů není divu, že první úspěšné aplikace těchto metod při studiu komplexních neurologických poruch byly zaznamenány teprve nedávno.

3.3.1. Biočipy a Alzheimerova nemoc

V jedné z prvních biočipových studií AN^{28–30}, byly porovnávány změny genové exprese u AN specifických genů a bylo zjištěno, že neurony s neurofibrilárními klubky vykazovaly významné snížení množství v několika skupinách proteinů. O rok později byla odhalena rozdílná exprese velkého počtu genových přepisů v *amygdale* a *cingulu*. Nejvýznamněji snížená exprese byla pozorována u genů zapojených do přenosu signálu, energetického metabolismu, odpovědi na stres, výstavby a funkcí synaptických váček, vázání vápníku a tvorby cytoskeletu. Významné up-regulace genových přepisů byly nalezeny v drahách zapojených do chronického zánětu, adhezi buněk, proliferace buněk a syntézy bílkovin. Ve stejném roce studie ve skupině pacientů s mírnou demencí byly pozorovány změny v genech zapojených do regulace neurotransmiterů. Biočipová analýza prokázala snížení mRNA kódující několik transkripčních faktorů, neurotrofní faktory a některé signalizační prvky (např. synaptofysin, metalotionein II ad.).

Další biočipové experimenty vedené k určení změn specifických pro AN byly provedeny na celogenomové úrovni. Byl zkoumán temenní lalok u čtyř pacientů s dobře diagnostikovanou AN a následně bylo provedeno porovnání se vzorky stejné tkáně u pacientů s demencí nesouvisející s AN a kontrolou bez nálezu demence (= kontrolní skupina). Analýza ukázala, že nejvýznamnější skupina rozdílně exprimovaných genů souvisela s vývojem nervové soustavy a jejími funkcemi, a dále s regulací odbourávání amyloidu. Dále byla zjištěna rozdílná exprese několika genů souvisejících s imunitními buňkami a chemokinovou signalizací v tkáních u pacientů s AN, což podpořilo účast imunitních buněk a různých zánětlivých mediátorů v průběhu AN. Všeobecně tyto poznatky otevřely nové cesty ve výzkumu AN stejně jako vyjasnily potenciální léčebné strategie zacílené na zánětlivé procesy a regulaci odbourávání amyloidu u pacientů s AN. Z hlediska ovlivňování neurodegenerativních procesů při Alzheimerově chorobě lze pokládat za zajímavé též studie popisující oxoisoaporfínové deriváty ovlivňující acetylcholinesterasu a agregaci β -amyloidu³⁰. V dalších pracích byly využity proteinové nanočipy již s dostatečnou specifitou a citlivostí potřebnou pro detekci tau-proteinu v klinických vzorcích, využívající jeho schopnosti se vázat na monoklonální protilátky anti-tau (tau-MAB; tau monoclonal antibody).

Hladiny tau-proteinu byly zvýšeny v CSF u jedinců s AN. Dalším velmi vhodným nástrojem pro studium tkáňových procesů na molekulárně biologické úrovni jsou tkáňové biočipy (Tissue MicroArray; TMA). Byl sestaven tkáňový biočip z *post mortem* získané lidské mozkové tkáně od pacientů s klinicky a neuropatologicky ověřenou AN, některými dalšími formami demence a věkově odpovídající kontrolou. Patnáct dárcovských bločků bylo sloučeno do dvou bloků TMA, které obsahovaly hlavní vzorky s odpovídajícími oblastmi mozku a byly zjišťovány hyperfosforylované tau-proteiny, α -synuklein a β -amyloid. Vyhodnocení odhalilo α -synuklein u AN nahromaděný ve více ohniscích. Tato studie naznačila důležitost hledání různorodé patologie v celém mozku spíše než omezení studia na několik oblastí.

3.3.2. Biočipy a schizofrenie

Základní etiologie schizofrenie zahrnuje kombinaci genetických a epigenetických faktorů, s více než deseti chromosomálními lokusy spojenými s nemocí^{31–36}. Konvergence z klinických pozorování, neuroimaging a anatomických studií zaměřila pozornost na prefrontální kortex (PFC) jako hlavní místo pro patologické změny u schizofrenie. Existuje tvrzení, že genetický podklad schizofrenie je polygenně podmíněný. Aktuální etiologický pohled tedy spočívá ve vnímání této nemoci jako multifaktoriálně podmíněné, zahrnující jak genetické, tak environmentální a vývojové aspekty, a je proto vhodný pro velké biočipové analýzy genové exprese.

Vedle využití mikročipů v neurologii, i na poli psychiatrie bylo na přelomu tisíciletí publikováno několik prací. Byla nalezena down-regulace genových transkripčních kódujících proteiny podílejících se na regulaci presynaptických funkcí v PFC (např. synapsin II, synaptojanin 1 a synaptotagmin 5), které byly trvale sníženy ve studované skupině pacientů se schizofrenií. Biočipová analýza zaznamenala down-regulace pěti genů, jejichž exprese byla zvýšena v oligodendrocytech produkujících myelin. Dále byla pozorována up-regulace v drahách postsynaptické signální transdukcce, u nichž je známo, že jsou řízeny dopaminem, což bylo obecně v souladu s dopaminovou hypotézou schizofrenie. Byly popsány tři geny, které byly trvale sníženy ve vzorcích mozkové tkáně u schizofreniků v PFC. Nálezy změněných synaptických markerů pozorované ve všech těchto studiích byly v souladu se současnými teoriemi o původu a patogenezi schizofrenie.

3.3.3. Biočipy a mozkové nádory

Studie u různých mozkových nádorů prokázaly schopnost cDNA biočipů^{38–40} rozlišit různé typy nádorů. Tato technologie umožnila identifikaci profilů genové exprese spojených s prognózou a specifickou odpovědí na léčbu. S identifikací nových souborů exprese genů spojených s určitým chováním nádoru je možné evaluovat nové terapeutické cíle a vyvíjet cílené terapie.

4. Závěr

Molekulární biologové potřebují nové nástroje pro měření komplexních buněčných funkcí. Biočipová technologie nabízí nástroj ke studiu složitých buněčných mechanismů na úrovni tisíců genů a významných biomolekul. I přestože je tato technologie relativně nová, zaznamenala své úspěchy napříč mnoha vědními disciplínami, zejména v medicíně. V neurovědách biočipy odhalily rozdílnou expresi genů v různých oblastech mozku a poskytly náhled do neuronové buněčné biologie a tím na dopady genetických vad na poruchy neurologického vývoje. Jedním z hlavních omezení využití funkční genomiky v neurovědách je složitost samotného mozku a četná různorodost buněk i v relativně malé oblasti mozku. Biočipy jsou vhodným nástrojem pro rychlé odhalování funkčních změn i v malých vzorcích biologického materiálu, nicméně pro zavedení do rutinní klinické praxe je potřeba ověření této analytické metody alternativním způsobem. Za tímto účelem se používají techniky jako např. kvantitativní PCR (RT-PCR), Northern blotting a *in situ* hybridizace.

Tato práce byla uskutečněna v rámci Národního programu udržitelnosti (NPU I LO1215), MŠMT – 34870/2013 a projektů TA04010838, LH12116.

LITERATURA

- Shoemaker L., Achrol A., Sethu P., Steinberg G., Chang S.: *Neurosurgery* 70, 518 (2010).
- Vašatová M., Tichý M., Vávrová J.: *Klin. Biochem. Metab.* 18, 1 (2010).
- Barbulovic-Nad I., Lucente M., Sun Y., Zhang M., Wheeler A. R., Bussmann M.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 26, 237 (2006).
- Berger T., Reindl M.: *J. Neurol. Sci.* 259, 21 (2007).
- Björkhem I., Cedazo-Minguez A., Leoni V., Meaney S.: *Mol. Aspects Med.* 30, 171 (2009).
- Craig-Schapiro R., Fagan A. M., Holtzman D. M.: *Neurobiol. Dis.* 35, 128 (2009).
- Roberts L. J., Fessel J. P.: *Chem. Phys. Lipids* 173, 123 (2004).
- Roberts L. J., Fessel J. P., Davis S. S.: *Brain Pathol.* 143, 231 (2005).
- Uéda K., Fukushima H., Masliah E., Xia Y., Iwai A., Yoshimoto M., Otero D. A., Kondo J., Ihara Y., Saitoh T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11282 (2005).
- Xia Y., Saitoh T., Uéda K., Tanaka S., Chen X., Hashimoto M., Hsu L., Conrad C., Sundsmo M., Yoshimoto M., Thal L., Katzman R., Masliah E.: *J. Alzheimers Dis.* 3, 485 (2002).
- Bogdanov M., Matson W. R., Wang L., Matson T., Saunders-Pullman R., Bressman S. S., Flint Beal M.: *Brain* 131, 389 (2008).
- Dufva M.: *Biomol. Eng.* 22, 173 (2005).
- Fehlbaum-Beurdeley P., Prado A. Ch. J., Pallares D., Carriere J., Guihal C.: *Alzheimers Dement.* 6, 25 (2010).
- Geschwin D. H.: *Lancet Neurol.* 2, 275 (2003).
- Graeber M. B.: *Exp. Neurol.* 216, 249 (2009).
- Johansen K. K., White L. R., Sando S. B., Arslly J. O.: *Parkinsonism Relat. D.* 16, 307 (2010).
- Karakach T. K., Flight R. M., Douglas S. E., Wentzell P. D.: *Chemometr. Intell. Lab.* 104, 28 (2010).
- Schena M. (Telechem International Inc): WO2002003849 A3 (2002).
- Schena M. (Telechem International Inc): US6913879 B1 (2005).
- Skog J., Breakefield X., Brown D., Miranda K., Russo L. (The General Hospital Corporation): EP2604704A1 (2013).
- Skog J., Breakefield X., Brown D., Miranda K., Russo L. (The General Hospital Corporation): WO2009100029A1 (2009).
- Benson A.: US 2005065737 (2005).
- Meuer S., Giese T., Jacobi Ch., Wietek S. (Octapharma Ag): WO 2013186352 (20013).
- Jiang H., Chen F., Ge H., Li P., Li X., Wang J., Wang J., Yang H., Zhang X. (PCT Int. Appl.): WO 2013053183 (2013).
- Carayol J. (Integrage): WO2013132074 A3 (2013).
- Fan J., Gunderson K. (Illumina, Inc.): WO2011071923 A3 (2010).
- Dobrovolná M., Vraná M., Dyr J. E.: *Chem. Listy* 109, 45 (2015).
- Lamartine J.: *Mater. Sci Eng. C* 26, 354 (2006).
- Marcotte E. R., Srivastava L. K., Quirion R.: *Pharmacol. Therapeut.* 100, 63 (2003).
- Hošťálková A., Siatka T., Chlebek J., Opletal L., Drašar P., Cahlíková L.: *Chem. Listy* 109, 846 (2015).
- Martikainen P., Louhelainen A. M., Kauppinen T., Alafuzoff I.: *Brain Res.* 1089, 33 (2006).
- Meloni R., Khalfallah O., Biguet N. F.: *Pharmacol. Res.* 49, 303 (2004).
- Mirmics K., Middleton F. A., Lewis D. A., Levitt P.: *Trends Neurosci.* 24, 479 (2001).
- Morris C. M., Wilson K. E.: *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 515 (2004).
- Newton S. S., Bennett A., Duman R. S.: *Methods* 37, 238 (2005).
- Ottervald J., Franzén B., Nilsson K., Andersson L. I., Khademi M.: *J. Proteomics* 73, 1117 (2010).
- Poetz O., Schwenk J. M., Kramer S., Stoll D., Templin M. F., Joos T. O.: *Mech. Ageing Dev.* 126, 161 (2005).
- Russel S., Meadows L. A., Russel R. R.: *Academic Press. Inc.* 411 (2009).
- Vestergaard M., Kerman K., Kim D. K., Hiep H. M., Tamiya E.: *Talanta* 74, 1038 (2008).
- Weeraratna A. T., Kalehua A., Deleon I., Bertak D., Maher G., Wade M. S., Lustig A., Becker K. G., Wood F. F., Walker D. G., Beach T. G., Taub D. D.: *Exp. Cell Res.* 313, 450 (2007).

41. Bauer J., Böhm J., Dočekal P., Fiksa J., Havlová M., Havrdová E., Mečíř P., Nevšimalová S., Obenberger J., Roth J., Růžička E., Seidl Z., Süssová J., Sonka K., Špačková N., Tichý J.: *Neurologie*. Galén, Praha 2005.

J. Boroň, P. Novotný, and P. Kačer (*University of Chemistry and Technology in Prague, Prague*): **The Use of Biochips in Neurology and Psychiatry**

In the light of recent advances in sequencing, which is becoming increasingly available, the microarray technology has partly assumed a complementary and application role. The last two decades, however, brought into applica-

tion a genuine microarray approaches and technologies, especially population (VIPTM) chips, enabling one to cost-effectively screen populations of tens of thousands of individuals (from humans to microorganisms) and thus effectively generate solutions for personalized medicine as well as multi-patient studies and therapies of neurodegenerative diseases. The paper summarizes basic and advanced contemporary microarray platforms and biomarkers useful for the research and diagnostics of neurodegenerative diseases including the microarray state of the art population (VIPTM) chips. Since the development and function of the nervous system is highly dependent on the products of gene expression, individual genotype and phenotype, the described diagnostic tools will likely contribute to a highly demanded elucidation of the molecular mechanisms and therapeutic solutions for neurodegenerative diseases.