

PRACE POGLĄDOWE

Karolina Nowak

Mikromacierze białkowe – nowoczesna technika wykorzystywana w proteomice

Protein microarray – modern technique used in proteomics

Z Zakładu Biochemii i Biofarmaceutyków Narodowego Instytutu Leków

STRESZCZENIE

Proteomika to dziedzina nauki zajmująca się badaniem struktury, funkcji, lokalizacji białek, modyfikacji potranslacyjnych i interakcji z innymi białkami. Technologia mikromacierzy białkowych stała się kluczowym narzędziem dla dużych i wysoko wydajnych badań w proteomice. Pozwala na szybkie, łatwe i równoległe wykrywanie tysięcy białek w ramach pojedynczego eksperymentu. Stosuje się do analizy interakcji przeciwciało-antygen, białko-białko, białko-kwas nukleinowy, białko-lipid i białko-mała molekula, jak również oddziaływań enzym-substrat. W ciągu ostatnich kilku lat technologia mikromacierzy białkowych pokazała wspaniały potencjał w zakresie badań podstawowych, diagnostyki i otrzymywania leków. W artykule dokonano przeglądu bieżących metod wytwarzania i zastosowania mikromacierzy białkowych.

Słowa kluczowe: proteomika, mikromacierze białkowe, białko.

ABSTRACT

Proteomics is a field of science that studies the structure, function, location of proteins, post-translational modifications and interactions with other proteins. Protein microarray technology has become a crucial tool for large-scale and high-throughput research in proteomics. It allows fast, easy and parallel detection of thousands proteins in a single experiment. It has been applied to analyse antibody-antigen, protein-protein, protein-nucleic acid, protein-lipid and protein-small molecule interactions, as well as enzyme-substrate interactions. In the past few years, protein microarray technology has shown its great potential in basic research, diagnostics and drug discovery. This article reviews current methods in the generation and applications of protein microarrays.

Key words: proteomics, protein microarray, protein.

Od genomiki do proteomiki

W latach pięćdziesiątych XX wieku mocne poparcie eksperymentalne zyskał pogląd, że geny są odcinkami DNA determinującymi pierwszorzędową strukturę białek. Poznanie przebiegu biosyntezy białek, a w szczególności roli mRNA w tym procesie, doprowadziło do sformułowania w 1957 roku tzw. *centralnego dogmatu genetycznego*. Dogmat o przekazywaniu informacji genetycznej z DNA na RNA na drodze transkrypcji, a następnie na strukturę białka podczas translacji, obowiązuje do dziś [1].

Nawet bardzo dokładny opis działania pojedynczego genu nie wystarcza do zrozumienia, jak zawarta w nim informacja przekłada się na rozwój i funkcjonowanie całego organizmu. Obserwowany efekt ekspresji infor-

macji genetycznej jest wypadkową olbrzymiej liczby zdarzeń. Zależy on między innymi od czasu i miejsca ekspresji poszczególnych genów, ich wzajemnej pozytywnej i negatywnej regulacji, czy wpływu czynników zewnętrznych. Jednym z głównych zadań stojących przed nauką było zatem poznanie i zrozumienie tych złożonych oddziaływań.

Wyzwanie to stało się bodźcem do rozwoju dziedziny wiedzy zwanej genomiką. Dziedzina ta łączy zdobycze biologii molekularnej, biotechnologii, medycyny i informatyki. W odróżnieniu od genetyki, podstawowym obiektem jej zainteresowań jest nie gen, lecz genom. W ten sposób genomika otwiera przed badaczami możliwość analizowania procesów biologicznych w szerszym kon-

tekście wzajemnych oddziaływań i powiązań pomiędzy genami na poziomie komórek, organów, a nawet całych organizmów [2].

W 1990 roku w Stanach Zjednoczonych został zapoczątkowany międzynarodowy program biologiczny *Human Genome Project* (HGP), którego pierwszy etap zakładał zlokalizowanie wszystkich ludzkich genów, drugi zaś przebadanie ich funkcji. Przez kilkanaście lat trwały badania nad rozszyfrowaniem ludzkiego genomu, aż wreszcie 14 kwietnia 2003 roku, ostatecznie ogłoszono zakończenie *Human Genome Project* [3].

Po tym, jak naukowcom udało się poznać pełną sekwencję ludzkiego genomu okazało się, że sama znajomość naszych genów jest niewystarczająca. Istotą rzeczy jest poznanie białek, które są kodowane przez poszczególne geny i ich funkcji. Genom, który zawiera kompletną informację genetyczną organizmu jest tylko zbiorem przepisów dotyczących syntezy białek, a to one przede wszystkim tworzą strukturę komórki oraz realizują większość jej zadań. Białkami są enzymy trawiące pokarm, hormony, hemoglobina przenosząca tlen we krwi, bez białek nie mogą funkcjonować również same geny. Wszystkie żywe komórki są zbudowane z grup białek, które współdziałają z innymi grupami, co tworzy razem doskonale dopracowany system współzależnych układów. Układy takie kontrolują niemal każdy proces w komórce i zapewniają połączenia, które są podstawą integracji tkanek i organów [4].

Zbiór wszystkich białek kodowanych przez cały genom nazwano proteomem. Termin powstał na zasadzie analogii do słowa genom i pochodzi od angielskiego *PROTEin complement of the genOME* – czyli białkowe dopełnienie genomu. W przeciwieństwie do genomu, który ma charakter bardziej statyczny i podlega zmianom w bardzo małym stopniu, proteom jest obiektem bardzo dynamicznym [5]. Zestaw białek obecnych w komórce zmienia się nieustannie, w zależności od fazy cyklu komórkowego, na skutek oddziaływania z innymi komórkami w organizmie, wchodzącymi w skład różnych tkanek i organów, czy z powodu interakcji z czynnikami środowiskowymi (temperatura, czynniki stresowe itp.) [6]. Proteom zmienia się także w zależności od stanu fizjologicznego, choroby i warunków, w jakich organizm się znajduje.

Powyższe stało się przyczyną szybkiego rozwoju nowej gałęzi nauki – proteomiki. Termin ten po raz pierwszy został użyty w 1994 roku podczas konferencji w Sienie przez profesora Marka Wilkinsa [7]. Proteomika to dziedzina nauki zajmująca się badaniem struktury, funkcji, lokalizacji białek, modyfikacji potranslacyjnych i interakcji z innymi białkami. Wielu badaczy zwraca uwagę na fakt, że proteomika jest dziedziną znacznie szerszą i bardziej złożoną od genomiki, ponieważ białka są trudniejszym obiektem badań od DNA, ze względu na ich przestrzenną strukturę i występowanie w wielo-

cząsteczkowych kompleksach. Ponadto, identyfikacja proteomu nie polega wyłącznie na stworzeniu listy białek znajdujących się w określonej komórce czy tkance. Istotą proteomiki jest poszukiwanie różnic w profilach białkowych, którymi różnią się osoby zdrowe i chore [6]. Proteomika definiuje się jako całościowa analiza czasowej i przestrzennej ekspresji białek w określonym systemie biologicznym.

Skatalogowanie wszystkich białek ludzkiego organizmu oraz przypisanie im określonych funkcji jest wielkim wyzwaniem dla nauki, dlatego w 2001 roku powołano Organizację Proteomu Ludzkiego (HUPO, *Human Proteome Organization*), której celem jest koordynacja badań proteomicznych w skali międzynarodowej [8]. Głównym założeniem projektu jest poznanie potranslacyjnych modyfikacji białek, ich skomplikowanych oddziaływań międzycząsteczkowych, lokalizacji w obrębie komórki, ekspresji w zależności od warunków otoczenia, rodzaju tkanki czy opisanie zmian ich ekspresji w czasie rozwoju i procesów patologicznych. Do poznania funkcji poszczególnych białek są potrzebne nie tylko znaczne nakłady finansowe, ale również współpraca i koordynacja działań naukowców różnych specjalności. Wymagane jest nowe podejście metodologiczne odchodzące od prostej analizy poszczególnych białek, a zmierzające ku opisaniu i zrozumieniu złożonego systemu, który te białka tworzą [9]. Ponadto projekt ten umożliwi standaryzację procedur, opracowanie metod statystycznych niezbędnych do analizy i interpretacji uzyskanych wyników [10].

Do najbardziej znanych technik badawczych wykorzystywanych w proteomice należą elektroforeza dwukierunkowa w żelu poliakrylamidowym (2D-PAGE) i spektrometria mas.

Elektroforeza dwukierunkowa w żelu poliakrylamidowym jest powszechnie stosowaną techniką rozdzielania w proteomice, jednak wciąż czaso- i pracochłonna. Dwuwymiarowa elektroforeza poliakrylamidowa jest obecnie częściowo zautomatyzowana, konieczny jest jednak odpowiedni czas na przeprowadzenie poszczególnych etapów. Dodatkowo wymaga dużej ilości materiału. Białka występujące w małych stężeniach w materiale biologicznym zwykle są poniżej granicy wykrywalności [11].

Istotnym narzędziem analitycznym w proteomice jest spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*, MS). Współcześnie istnieje wiele odmian tej techniki, z których każda posiada inne zastosowanie i wymaga stosowania aparatów o innej konstrukcji. Wszystkie te techniki są oparte na jonizacji cząstek lub atomów, a następnie detekcji liczby i stosunku masy do ładunku (m/z) powstających jonów [12].

Dzięki spektrometrii mas możliwe jest otrzymywanie bardzo dokładnych wartości mas cząsteczkowych peptydów i białek. Jednak nawet najdokładniejszy pomiar masy cząsteczkowej jest często niewystarczający do

jednoznacznego zidentyfikowania danego białka lub peptydu, szczególnie, gdy rozważane są złożone mieszaniny białek, będące obiektem badań proteomicznych [13]. Uproszczenie złożoności tych mieszanin jest najczęściej konieczne ze względu na skomplikowanie próbek. Mimo wielu udoskonaleń techniki spektroskopii mas, również tutaj można napotkać problemy w pracy z białkami, m.in. możliwość fotodegradacji badanych cząsteczek na skutek jonizacji laserowej.

Połączenie konwencjonalnej dwuwymiarowej elektroforezy żelowej z postępową techniką spektrometrii mas pozwoliło na analizę i scharakteryzowanie tysięcy białek. Jednakże nadal jest to proces wieloetapowy i trwający w czasie, który nadal nie umożliwia badania całego proteomu w pojedynczym eksperymencie. W konsekwencji potrzebny jest szybki postęp w technikach i metodach odpowiednich do badań proteomicznych na olbrzymią skalę.

Do wysokowydajnych metod zalicza się mikromacierze białkowe, technika ta pozwala na szybką, łatwą i równoległą analizę białek w pojedynczym eksperymencie. W ostatnich latach technologia mikromacierzy białkowych okazała się wspaniałym narzędziem w podstawowych badaniach w diagnostyce i konstruowaniu nowych leków [14].

Technologia mikromacierzy białkowych

Mikromacierze białkowe, często nazywane też czujnikami białkowymi, służą do dokładnego określenia typu i ilości białka w badanej tkance. Z ich pomocą można określać, które z tysięcy istniejących w komórce białek oddziałują ze sobą. Wydają się być narzędziem, bez którego w przyszłości diagnostyka wielu chorób nie będzie możliwa. Działają podobnie do mikromacierzy DNA, ale opierają się głównie na immunologicznej zasadzie wiązania przeciwciał z antygenami. Macierze białkowe są wykonane z bardzo cienkich płytek, na których umieszcza się w regularnych, ściśle określonych pozycjach białka lub związki wiążące białka. Obecnie najczęściej wykorzystuje się metodę kanapkową, polegającą na wykrywaniu białka przez 2 różne przeciwciała, z których jedno przyłączone do podłoża wiąże cząsteczkę białka, a drugie przyłącza do niej znacznik fluorescencyjny. Tak przygotowany czujnik umieszcza się w czytniku sprzężonym z komputerem wyposażonym w odpowiednie oprogramowanie pozwalające na jakościowe i ilościowe oznaczenie białka [6].

Idea mikromacierzy białkowych wywodzi się z dobrze już znanych mikromacierzy genowych. Procedury i wyposażenie rozwijane w mikromacierzach DNA łatwo zostały zaadaptowane do chipów białkowych. Dlatego zastosowanie szklanej płytki jako podłoża, automatycznych urządzeń do nanoszenia molekuł na płytkę, czy skanera laserowego do detekcji, jest wynikiem dostępności gotowych rozwiązań w świecie mikromacierzy DNA [15].

W produkcji mikromacierzy białkowych wykorzystuje się różnorodne stałe powierzchnie. Głównym celem w wyborze powierzchni podłoża powinien być etap immobilizacji białka do macierzy, która pozwoli na odpowiednie utrzymanie konformacji i funkcjonalności białka przy jednoczesnym osiągnięciu maksymalnej zdolności wiążącej [16]. Właśnie na tym etapie produkcji mikromacierzy białkowych można napotkać szereg problemów. Niepowtarzalność i niejednorodność wyników w badaniach techniką mikromacierzy może być spowodowane brakiem jednolitości w aktywności immobilizowanych białek, immobilizacją białek w różnej konformacji, czy częściową denaturacją białek na powierzchni podłoża. Ponadto niespecyficzna adsorpcja białek do chipów (blokowanie na powierzchni z surowiczą albuminą wołową (BSA) czy niekontrolowana adsorpcja białek z roztworu) także może być przeszkodą dla prawidłowej immobilizacji białek [17]. Jednym z rozwiązań tych problemów jest zastosowanie do immobilizacji dobrze zdefiniowanych powierzchni. Oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami zależy od wpływu otoczenia. Nieznaczne zmiany w środowisku mają wpływ na zachowanie aktywności, dlatego należy ujednoczyć warunki, w jakich znajdują się poszczególne immobilizowane cząsteczki. Kolejnym rozwiązaniem jest rozwinięcie strategii immobilizacji poprzez dokładną kontrolę nad punktami przyłączenia i gęstością związanych ligandów oraz ocena aktywności immobilizowanych białek (region aktywny białka może być związany z sąsiednim białkiem lub powierzchnią macierzy i poprzez to może być zahamowana jego aktywność) [18]. Użycie biernych chemicznie i fizycznie powierzchni zapobiega zarówno niespecyficjnej adsorpcji jak i denaturacji immobilizowanych białek. Wypierają one stopniowo metody polegające na blokowaniu powierzchni przy pomocy BSA, co może prowadzić do niespecyficjnych oddziaływań czy przeprowadzanie eksperymentu w obecności detergentu, który może przeszkadzać w oddziaływaniach [19].

Do najczęściej stosowanych powierzchni w mikromacierzach białkowych należą szklane i plastikowe płytki oraz polimerowe membrany. Najprostszą metodą immobilizacji białek jest bezpośrednia powierzchniowa adsorpcja. Ten rodzaj unieruchamiania jest stosowany standardowo od wielu lat w testach ELISA i Western blot, jest oparty na adsorpcji makromolekuł przez elektrostatyczne siły do naładowanej powierzchni (pokryte polilizyną szklane płytki) lub przez hydrofobowe oddziaływanie (nitroceluloza lub membrany z polifluorku winylidenu (PVDF)). Płytki pokryte nitrocelulozą wykazują doskonałą zdolność wiążącą i długoterminową stabilność nadrukowywanych prób. Mimo prostoty, metody adsorpcyjne posiadają takie wady, jak: tendencja do denaturacji białek na hydrofobowych powierzchniach, wysokie niespecyficjne tło, niespecyficjność wiązania białek [20]. Równie popularną strategią immobilizacji jest mechanizm kowalencyjnego unieruchamiania ligandów

do stałych powierzchni. Mechanizm ten wykorzystuje obecności reaktywnych grup (zazwyczaj są to elektrofilne grupy, takie jak: epoksydy, aldehydy, aktywne estry), które immobilizują ligandy poprzez reakcję z ich nukleofilnymi grupami (aminowe, tiolowe czy hydroksylowe) [21]. Inną metodą wykorzystującą kowalencyjne wiązanie jest zastosowanie samoorganizujących się monowarstw (SAM) z zastosowaniem alkanotioli i n-alkilosilanów [22]. Mechanizmy polegające na powierzchniowej adsorpcji czy kowalencyjnych wiązaniach unieruchamiają białka w przypadkowej lub niespecyficzej orientacji. W celu zachowania jednolitej i specyficznej orientacji białek na powierzchni mikromacierzy stosuje się najczęściej metody wykorzystujące biomolekularne interakcje krótkich domen His znakujących białko z niklem pokrywającym powierzchnię szkła oraz interakcje pomiędzy biotyną, a powierzchnią pokrytą streptawidyną [23]. W ostatnich czasach bardzo popularną metodą jest immobilizacja białek w żelach, takich jak agaroz czy poliakrylamid. Trójwymiarowa struktura żelowa zapewnia wodne środowisko, co pozwala białkom utrzymać natywną konformację i zachować funkcjonalność [24].

Umieszczanie immobilizowanych molekuł na powierzchniach stałych może być wykonywane poprzez kontaktowe drukowanie z użyciem małych igieł do umieszczania nanolitrowych objętości prób lub niekontaktowe technologie stosujące kapilary czy nadrukowywanie kropli techniką ink-jet [25].

Użyteczność każdego rodzaju mikromacierzy zależy także od tego, jakiego rodzaju technika zostanie wykorzystana do jej analizy. Obecne strategie detekcji dla mikromacierzy białkowych są dzielone na metody wolne od znakowania, wśród nich głównie technika rezonansu plazmonów powierzchniowych (SPR) i jonizacji przez desorpcję laserową w stałej matrycy z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF) oraz metody oparte na wykorzystaniu znaczników: fluorescencyjnych, chemiluminescencyjnych, radioaktywnych i elektrochemiluminescencyjnych [26].

Wśród metod wykorzystujących znakowane próby można wyróżnić: bezpośrednie (immobilizowana jest mieszanina białek i detekcja jest wykonywana z użyciem znakowanych wiążących molekuł, takich jak przeciwciała), pośrednie (immobilizowane są przeciwciała, które wychwytyją znakowane białka) oraz metody „kanapkowe” (pierwsze immobilizowane przeciwciała wiąże badane białko, do którego przyłączane jest kolejne znakowane przeciwciała) [27]. Zazwyczaj stosuje się detekcję opartą na fluorescencji lub sondach radioaktywnych w celu określenia wiązania białek i przeciwciał do macierzy. Chociaż zastosowanie znaczników fluorescencyjnych i radioaktywnych charakteryzuje się wysoką czułością i rozdzielczością, posiada jednak pewne ograniczenia: modyfikacja białka przy pomocy sondy ma wpływ na jego aktywność, generowane są

duże koszty, występuje problem z utylizacją (szczególnie w przypadku radioizotopów) oraz ograniczenie badań tylko do tych oddziaływań, dla których cząsteczki zostały wyznakowane, co nie pozwala na odkrywanie nowych właściwości [17].

Rozwiązaniem problemu są metody detekcji nie wymagające znakowania białek i pozwalające na analizę skomplikowanych próbek o złożonym i często niezdefiniowanym składzie. Desorpcja laserowa w stałej matrycy z analizatorem czasu przelotu, MALDI TOF, wykorzystuje impuls laserowy do jonizacji próbki. Służy głównie do identyfikacji masy cząsteczkowej białek, umożliwia identyfikację białek związanych do macierzy poprzez potraktowanie ich enzymami proteolitycznymi, a następnie analizę otrzymanych peptydów. Ponieważ desorpcja zachodzi w łagodnych warunkach, można także badać enzymatyczne modyfikacje różnych białek [28]. Drugą czołową techniką detekcji bez użycia znaczników jest SPR, czyli rezonans plazmonów powierzchniowych. Pozwala na badanie w czasie rzeczywistym oddziaływań międzycząsteczkowych [29]. Technika ta daje możliwość pracy *in situ*, nie wymaga przepłukiwania i suszenia reagentów przed analizą, co jest szczególnie ważne przy ilościowym określaniu oddziaływań o niskim powinowactwie i stabilności [17]. Metody detekcji niewymagające znakowania są obecnie obiecującym narzędziem do charakteryzowania interakcji pomiędzy molekułami.

Typy i wykorzystanie mikromacierzy białkowych

W zależności od celu, jaki chcemy osiągnąć i rodzaju materiału, który umieszczamy na płytce, wyróżniamy trzy główne typy mikromacierzy białkowych: analityczne, funkcjonalne i odwróconej fazy [30].

Mikromacierze analityczne zawierają nadrukowane dobrze scharakteryzowane molekuły, takie jak: przeciwciała, lektyny, aptamery (oligonukleotydy lub peptydy, które wiążą się specyficznie z określoną cząsteczką) lub cząsteczki affibody (małe proteiny o funkcji przeciwciał) i ich hybrydyzacja przebiega ze znakowanymi białkami próbek. Wykorzystywane są głównie w diagnostyce klinicznej do badania wzorów ekspresji tkanki prawidłowej i patologicznej, odpowiedzi na lek lub opracowywania nowych zestawów diagnostycznych [31]. Do najbardziej powszechnych mikromacierzy analitycznych należą mikromacierze przeciwciał. Testy tego typu są zminiaturyzowanymi formami testów immunofluorescencyjnych. Dzięki miniaturyzacji są one szybsze i tańsze niż standardowe testy ELISA, szczególnie, jeśli poszukujemy wielu potencjalnych celów w jednej próbce. Dzięki tej technice jest również możliwe znaczne ograniczenie objętości badanej próbki [32]. Białkowe mikromacierze analityczne to jedno z najlepszych narzędzi do monitorowania ekspresji białek, identyfikacji biomarkerów, powierzchniowych markerów komórkowych i do profilowania glikolizacji.

Wykorzystywane są one również w analizach bezpieczeństwa żywności i środowiska [33].

Mikromacierze odwrotnej fazy wykorzystują również reakcję przeciwciało-białko, jednak na ich powierzchni znajduje się lizat z poszczególnych tkanek czy organelli, a hybrydyzacja przebiega z przeciwciałem specyficznym wobec badanego białka, nie wymaga znakowania białek w badanych próbach. Metoda ta pozwala na oznaczenie ilości poszukiwanego białka w wielu tkankach [34]. Ten typ mikromacierzy ma szeroki zakres zastosowań w badaniach klinicznych, takich jak: ilościowa analiza ekspresji białek w komórkach nowotworowych, płynach lub tkankach do profilowania biomarkerów; badanie sygnałów komórkowych; kliniczne prognozowanie; diagnostyka lub prognozowanie terapeutyczne. Są także stosowane do monitorowania dynamiki zmian w białkowej odpowiedzi na różne bodźce lub dawki leków, w wielu punktach czasowych. Inne zastosowania obejmują: badanie i mapowanie białkowych szlaków sygnałowych oraz poznanie molekularnych mechanizmów działania potencjalnych leków [33].

Mikromacierze funkcjonalne pozwalają na badanie funkcji białka. Nadrukowane na nich białka posiadają zachowaną natywną konformację. Cecha ta pozwala badać reakcje: białko-białko, białko-DNA, białko-RNA, białko-fosfolipid i białko-mała molekula. Zastosowanie mikromacierzy funkcjonalnych pozwala na badanie biochemicznej aktywności całego proteomu w pojedynczym eksperymencie. Możliwe jest badanie efektywności inhibitorów kinaz tyrozynowych czy aktywności czynników transkrypcyjnych [35]. Synchronizacja, ogromne przyspieszenie procesu uzyskiwania danych oraz istniejące techniczne możliwości ich interpretacji, pozwalają także

na określenie profilu ryzyka kancerogenezy czy wznowienia procesu nowotworowego [34].

Podsumowanie

Chociaż zasady technologii mikromacierzy białkowych zostały ustalone i opisane wiele lat temu, to ich potencjał nadal nie jest jeszcze całkowicie wykorzystany. Wzrastająca liczba publikacji dotyczących mikromacierzy białkowych pokazuje nadzwyczajne znaczenie tej technologii, szczególnie w dziedzinie badań diagnostycznych. Głównymi zaletami stosowania mikromacierzy w diagnostyce jest miniaturyzacja procesu analitycznego, jego przyspieszenie i synchronizacja. Miniaturyzacja pozwala na minimalizowanie ilości materiału klinicznego koniecznego do badania, a także zmniejsza koszt odczynników. Przyspieszenie procesu analitycznego umożliwia uzyskanie wyniku w czasie mniejszym niż jedna godzina. Synchronizacja oznacza, iż mamy wgląd w bardzo wiele danych i procesów, które miały miejsce w organizmie chorego w tym samym czasie [36].

Mikromacierze białkowe otwierają szansę nie tylko na weryfikację kryteriów diagnostycznych i samej diagnozy lekarskiej, ale również na powstanie nowych, wysoce selektywnych leków, pozwalających na terapię dobieganą indywidualnie dla pacjenta, a w konsekwencji eliminację objawów niepożądanych. Ponadto mogą być użyteczne w prognozowaniu odpowiedzi na podany lek i wybranie mniej lub bardziej agresywnej terapii. Pozwolą również na monitorowanie zmian zachodzących w organizmie pacjenta w trakcie terapii i po jej zakończeniu, jako alternatywy dla badań radiologicznych, neurofizjologicznych czy serologicznych.

Piśmiennictwo / References

1. Węgleński P. i wsp. *Genetyka molekularna*. Wyd. Nauk. PWN Warszawa 2002;25
2. Hieter P, Boguski M. *Functional genomics: It's all how you read it*. Science 1997;278:601-602.
3. Penisi E. *Human genome. Reaching their goal early, sequencing labs celebrate*. Science 2003;300:409.
4. Ezzell C. *Nadszedł świat białek*. Świat Nauki 2002;30-37
5. Tomaszewska K, Nalewaj J, Markowska J. *Proteomika – nowa metoda oznaczania markerów nowotworowych. Rak jajnika*. Okol.Pol. 2005;8:2:79-81.
6. Dmitrzak-Węglarz M, Hauser J. *Wykorzystanie badań protomicznych w poszukiwaniu markerów biologicznych dla chorób psychicznych*. Psychiatria 2006;3:118-127
7. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF. i wsp. *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by genome should be identified and how to do*. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 1996; 13:19-50.
8. Merrick BA. *The human proteome organization (HUPO) and environmental health*. EHP toxigenomics 2003; 111:1-5
9. Hanash S. *HUPO Initiatives relevant to clinical Proteomics*. MCP 2004;3:298-301.
10. Vercauteren FG, Bergeron JJ, Vandesande F, Arckens L, Quirion R. *Proteomic Approaches in brain research and neuropharmacology*. Eur. J. Pharmacol. 2004;500:385-398.
11. Panicker RC, Chattopadhyaya S, Yao SQ. *Advanced analytical tools in proteomics*. Analytica Chimica Act 2006;556:69-79
12. Wojtkiewicz K, Nowicka E, Tarnowski R, Widlak P. *Wykorzystanie spektrometrii mas do analizy proteomu surowicy chorych na raka piersi*. Onkologia Info 2010; VII, 2:40-47
13. Watson JT. *Introduction to Mass Spectrometry*. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1997.
14. Zhu H, Snyder M. *Protein chip technology*. Curr.Opin.Chem. Biol.2003;7(1):55-63.
15. Bertone P, Snyder M. *Advances in functional protein microarray technology*. FEBS J. 2005;272:5400-5411.
16. Zhu H, Bilgin M, Snyder M. *Proteomics*. Annu. Rev. Biochem. 2003;72:783-812.
17. Lee Y, Mrksich M. *Protein chips: from concept to practice*. Trends Biotechnol. 2002;20:S14-S18.

18. MacBeath G, Schreiber SL. *Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination*. Science 2000; 289:1760–1763.
19. Arnebrant T, Wahlgren MC. *Protein surfactant interactions at solid surfaces*. ACS Sym.Ser. 1995;602:239–254.
20. Kusnezow W, Hoheisel JD. *Solid supports for microarray immunoassays*. J. Mol. Recognit. 2003;16(4):165–176.
21. Benters R, Niemeyer CM, Wohrle D. *Dendrimer-activated solid supports for nucleic acid and protein microarrays*. Chembiochem 2001;2(9):686–694.
22. Schaeferling M, Schiller S, Paul H, Kruschina M, Pavlickowa P, Meerkamp M, Giammasi C, Kambhampati D. *Application of self-assembly techniques in the design of biocompatible protein microarray surfaces*. Electrophoresis 2002;23: 3097–3105.
23. Cretich M, Damin F, Pirri G, Chiari M. *Protein and peptide arrays: Recent trends and new directions*. Biomolecular Engineering 2006;23:77–88.
24. Howbrook DN, Van der Valk AM, O'Shaughnessy MC, Sarker DK, Baker SC, Lloyd AW. *Developments in microarray technologies*. DDT 2003;8(4):642–651.
25. Templin MF, Stoll D, Schrenk M, Traub PC, Vohringer CF, Joos TO. *Protein microarray technology*. Trends Biotech 2002;20(4):160–166.
26. Espina V, Woodhouse EC, Wulfschuhle J, Asmussen HD, Petricoin 3rd EF, Lotta LA. *Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies*. J. Immunol. Methods 2004;290(1–2):121–133.
27. Cretich M, Damin F, Pirri G, Chiari M. *Protein and peptide arrays: Recent trends and new directions*. Biomolecular Engineering 2006;23:77–88.
28. Merchant M, Weinberger SR. *Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry*. Electrophoresis 2000;21:1164–1177.
29. Ramachandran N, Larson DN, Stark PR, Hainsworth E, LaBaer J. *Emerging tools for real-time label-free detection of interactions on functional protein microarrays*. FEBS J. 2005; 272(21):5412–5425.
30. Hall DA, Ptacek J, Snyder M. *Protein microarray technology*. Mech. Ageing Dev. 2007;128:161–167.
31. Haab BB. *Antibody arrays in cancer research*. Mol. Cell Proteomics 2005;4:377–383.
32. Mezzasoma L, Bacarese-Hamilton T, Di Christina M, Rossi R, Bistoni F, Crisanti A. *Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases*. Clin. Chem. 2002; 48:121–130.
33. Yang L, Guo S, Li Y, Zhou S, Tao S. *Protein microarrays for systems biology*. Acta Biochim Biophys Sin 2011; 43(3): 161–171.
34. Sawiniec J, Borkowski K, Paluszkiwicz P. *Protein microarrays in molecular oncology*. Annales UMCS, sect. DDD 2008; 21:85–89.
35. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M, Snyder M. *Global analysis of protein activities using proteome chips*. Science 2001; 293: 2101–2105.
36. Krzemiński Z. *Postępy w diagnostyce mikrobiologicznej chorób zakaźnych*. Przegl Epidemiol 2003;57:377–380.

Adres do korespondencji / Mailing address:

Karolina Nowak

NIL

Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków

ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

tel. 22 841 21 65 wew. 322

knowak@il.waw.pl