

СЪВРЕМЕННИ МИКРОЧИПОВИ ДНК ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНАТА

С. П. Хаджидекова

Катедра по медицинска генетика, Медицински факултет, Медицински университет – София

MODERN DNA MICROARRAY TECHNOLOGIES IN MEDICINE

S. P. Hadjidekova

Department of Medical Genetics, Medical Faculty, Medical University – Sofia

Резюме: ДНК микрочиповите методи са високопроизводителни технологии, които намират все по-голямо приложение в медицината и молекулната биология. Новите микрочипови ДНК платформи позволяват изследване на хиляди гени едновременно или сравнение на генната експресия от две различни тъканни проби. С напредъка в развитието на технологиите се разработват различни технически платформи с нарастваща резолюция, даваща възможност за анализ на промени в единични гени. Принципът на микрочиповата сравнителна геномна хибридизация (СГХ) се базира на конкурентната хибридизация на белязани с различни флуоресцентни багрила тествана и контролна ДНК върху картирани и секвенирани геномни клонове, фиксирани върху твърд носител под формата на микрочипове. В зависимост от целите на анализа микрочиповете се класифицират като експресионни, генотипизиращи, метилационни, CNVs чипове, ChIP-on-chip. Тази техника все още е в начален стадий и обещава да направи революция в идентифицирането на гени, участващи в развитието на различни заболявания.

Ключови думи: микрочипови технологии, генетична диагноза

Адрес за кореспонденция: Д-р Савина Петрова Хаджидекова, главен асистент, Катедра по медицинска генетика, МФ, МУ, МФ – Деканат, СБАЛАГ „Майчин дом“, ет. 6, ул. „Здраве“ № 2, 1431 София, e-mail: savinaagova@yahoo.com

Summary: The DNA microarray platforms are a high-throughput technology applied in medicine and molecular biology. The new microarray methods allow simultaneous examination of thousand genes or comparison of the gene expression from two different tissue probes. With the progress in the development of new technologies several technical platforms at increasingly high resolution have been developed, giving the possibility to analyze changes in a single gene. The method consists in co-hybridization of alternative labeled with different fluorescent dyes test and control DNA to a selected set of pre-spotted genomic fragments (usually on glass slide). Depending on the purpose of the analysis the microarrays are divided in arrays for expression profiling, genotyping, methylation analysis, CNVs analysis and ChIP-on-chip microarrays. This technique is still in its infancy and promises to revolutionize the identification of genes involved in the development of various diseases.

Key words: microarray technology, genetic diagnosis

Address for correspondence: Assist. Prof. Savina Petrova Hadjidekova, MD, PhD, Department of Medical Genetics, MF, MU, 2 Zdrave St., Bg-1431 Sofia, e-mail: savinaagova@yahoo.com

В постгеномната ера включването на нови методични подходи е обещаващо за по-доброто разбиране на етиопатогенезата на редица идиопатични заболявания. Едни от най-съвременните методи за геномен анализ са микрочиповите ДНК технологии.

Методът на микрочип-базираната сравнителна геномна хибридизация (СГХ) е разработен в края 90-те години на XX в. от Solinas-Toldo и сътр. и Pinkel и сътр. [18, 22]. Благодарение на голямата си резолюция и чувствителност микрочиповата СГХ бързо

се превръща в ключов подход при проучването на генома на раковите клетки [5, 15, 18], при откриването на нови синдроми и кандидат-гени за различни заболявания [16, 21], при диагностиката на пациенти с множествени вродени малформации и/или интелектуална недостатъчност, при пренаталната генетична диагностика [4, 11], а понастоящем се използва и за целите на предимплантационната генетична диагностика [12]. Именно високата резолюция е причина за драматично увеличение на гените, идентифицирани чрез молекулно кариотипиране, и вероятно все повече гени ще се идентифицират по този начин. Изясняването на небалансираните геномни микроаберации чрез микрочипова СГХ при пациенти води не само до описание на нови синдроми, но също така и до диагностично доизясняване на вече описани синдроми [6].

Принципът на микрочиповата СГХ се базира на конкурентната хибридизация на алтернативно белязани тествана и контролна ДНК върху картирани и секвенирани геномни клонове, фиксирани върху твърд носител (най-често предметно стъкло) под формата на микрочипове.

С напредъка в развитието на технологиите се разработват различни технически платформи с нарастваща резолюция. В близко бъдеще ДНК фрагментите ще се прилагат върху микрочиповете с все по-голяма гъстота, увеличавайки резолюцията и създавайки възможност за анализ на дисбаланси в отделни гени [3].

Според вида на анализа микрочиповете могат да се разделят на експресионни, генотипизиращи, метилационни, CNVs чипове, ChIP-on-chip.

ЕКСПРЕСИОННИ ЧИПОВЕ

Експресионният анализ на ниво РНК дава възможност едновременно да се измери активността на хиляди гени в тоталната РНК, което намира приложение при изучаването на ефектите на определена терапия, на промените на експресията по време на ембрионалното или индивидуалното развитие. Експресионното профилиране може да се използва и при идентификацията на гени с променена експресия под действието на патогенни микроорганизми. Принципът на метода се базира на изолиране на геномна РНК и превръщането ѝ в кДНК, която хибридизира върху чипове, съдържащи олигонуклеотиди от целия геном [7]. Подвид на експресионните чипове са miRNA (микро-РНК) чиповете. Микро-РНК са малки молекули, siRNA подобни молекули, които регулират генната експресия, като се свързват към специфични мРНК и модулират транслацията им. Доказани са вариации в

експресионните нива на miRNA в различните тъкани и стадии на развитие и е установена понижена експресия при пациенти с хронична лимфоцитна левкоза, аденокарцином на колона и лимфом на Бъркит [2]. Приложението на miRNA базираните чипове ще допринесе за по-доброто разбиране на ролята на miRNA за генната регулация [23].

ЧИПОВЕ ЗА МЕТИЛАЦИОНЕН АНАЛИЗ

Метилационните чипове също се използват за експресионен анализ, тъй като е добре известно, че метилирането на ДНК има съществен ефект върху генната експресия. В човешкия геном 4% от цитозиновите остатъци са метилирани в 5' позиция. ДНК метилирането има ключова роля за геномния импринтинг, поддръжката на геномния интегритет и е важен фактор при развитието на неопластичните процеси [9].

ГЕНОТИПИЗИРАЩИ ЧИПОВЕ

По същество те са SNPs чипове с дължина на олигонуклеотидите между 25 и 50 bp. Олигонуклеотидите съответстват на различни еднонуклеотидни замени в човешкия геном и позволяват скрининг за скачени хромозомни локуси с помощта на голям брой полиморфни маркери. Генотипизиращите чипове се използват за цялостни геномни асоциативни проучвания, при които се сравняват алелните и генотипните честоти на огромен брой ДНК полиморфизми между неродствени пациенти и незасегнати индивиди от една и съща популация [8]. Този подход е изключително полезен при идентифицирането и анализа на позиционни кандидат-гени при различни мултифакторни заболявания. Създадени са подробни карти на генетичните варианти в човешкия геном, които позволяват бърз достъп до детайлна информация за генетични заболявания, гени, последователности, полиморфизми. Една такава публично достъпна база данни е HarMap (www.harmap.org), която каталогизира SNPs в четири от най-големите човешки популации [17]. В допълнение към информацията, която се получава за вариациите в алелните копия, SNPs чиповете позволяват разпознаването на събития, непроменящи генната доза, като UPD и митотична рекомбинация и загуба на хетерозиготност [24].

Генотипизиращите чипове са в основата на революционна техника, наречена кариокартиране (copy mapping). SNP генотипизиращият анализ на родителите и потомството позволява картирането на кросовете между родителските хаплотипи и конструирането на кариокарта, съгласно Мендело-

вите закони. Това дава възможност за идентифициране на информативни локуси за всеки от четирите родителски хаплотипа, картиране на унаследяването на хаплотипите и позицията на всеки кросовър при пробанда. Така, за разлика от конвенционалния кариотип може да се установи родителският и прародителският произход на хромозомите и хромозомните сегменти в рекомбинантните хромозоми. Това позволява едновременно цялостен геномен анализ за скаченост на моногенни болести и детекция на хромозомни дисбаланси (тризомия – при наличие на 2 хаплотипа от един родител, монозомия – при липса на хаплотип от единия родител). Кариокортиране може да се проведе след цялостна геномна амплификация и на единична клетка за целите на предимплантационната генетична диагностика, давайки възможност за диагностика на всички известни моногенни болести [13].

Най-популярните SNPs платформи са различни варианти на микрочипове на Affymetrix и Illumina. Affymetrix използва набор от алел-специфични олигонуклеотиди с дължина 25 bp, фотолиитографски синтезирани върху чипа (<http://www.affymetrix.com/>). Олигонуклеотидите са подбрани така, че само половината от тях са комплементарни на еднонуклеотидната замяна. В случая не се прилага кохибридизация, тъй като чиповете са едноканални и хибридизира само тестваната ДНК. Тестваната ДНК се смилва с рестриктази, лигира се към адаптори и се амплифицира чрез универсални праймери, които разпознават секвенцията на адапторите. Амплифицираната ДНК впоследствие се фрагментира, бележи и хибридизира върху SNPs чипа.

Illumina разработва алтернативна платформа, базираща се на BeadArray технология, при която върху носител са нанесени над 500 000 силиконови гранули (<http://www.illumina.com/>). Към всяка гранула са прикрепени копия от една и съща локус-специфична олигонуклеотидна последователност с дължина 50 bp и резолюция до 1-800 bp [3]. След цялостна геномна амплификация тестваната ДНК хибридизира с комплементарните ѝ олигонуклеотидни фрагменти върху гранулите. След хибридизацията на ДНК фрагментите следва ензим-медирано алел-специфично удължаване на олигонуклеотидите върху гранулите, белязване на пробите с флуорохроми и имунохистохимична флуоресцентна детекция на сигналите.

CNVs ЧИПОВЕ

Базирант се на конкурентна хибридизация между различно белязани с флуорохроми контролна и тествана ДНК върху фиксирани на твърд носител

ДНК фрагменти, като резолюцията зависи само от размера и гъстотата на фиксираните клонове. В единична реакция може се скринира целият геном за вариации в броя копия, което го прави високо-ефективен при анализ на заболявания, зависими от генната доза. В практиката се прилагат два формата чипове: таргетни и чипове за цялостен геномен анализ. В исторически план първите създадени чипове са таргетни, съставени от ВАС клонове (Bacterial Artificial Chromosome), покриващи райони с известни микроделеционни/микродупликационни синдроми [19]. След тях се появяват чиповете за цялостен геномен анализ (ЦГА), съдържащи клонове от целия геном на определени интервали [14]. По-късно академичните среди предлагат чипове, покриващи целия геном, но съставени от застъпващи се клонове, т.нар. "tilling" чипове [10]. Прилагането на микрочиповете в диагностиката предизвиква полемика в научните среди. Оформят се два контрапункта – привърженици на таргетните чипове и привърженици на чиповете за ЦГА. Противниците на ЦГА формата смятат, че огромното количество информация, което се получава за CNVs при пациент, е объркващо и трудно за интерпретиране в клиничен аспект, тъй като голям брой от CNVs се срещат и при здрави хора и все още са с неясно клинично значение. Поради тази причина те препоръчват приложението на ЦГА чиповете да се ограничи до научноизследователските проекти [20]. От друга страна, поддръжниците на ЦГА чиповете смятат, че подходът към цялостен геномен анализ има съществени предимства: 1) подобно на цитогенетичния метод в единична реакция може да се скринира целият геном; 2) позволява изследването на пациенти, чието заболяване не отговаря на критериите на познатите генетични синдроми; 3) удвоява степента на детекция на патологични CNVs в сравнение с таргетните чипове [25]; 4) дава възможност за откриване на нови микроделеционни/микродупликационни синдроми [1]. Като недостатъци могат да се посочат високата цена на експеримента и необходимостта в някои случаи при установяване на CNVs с неясно клинично значение да бъдат изследвани и родителите.

CHIP-ON-CHIP ЧИПОВЕ

ChIP-on-chip техниката, известна още като Location Analysis, комбинира хроматинна преципитация с микрочипова технология. Прилага се при проучването на взаимодействията между белтъците (хистони, транскрипционни фактори) и ДНК, епигенетични модификации и позволява идентификацията на цистроми и свързващи места за ДНК свързва-

щи протеини. Методиката включва крос-свързване, имунопреципитация на белтък–ДНК комплексите, пречистване, амплифициране и хибридизация върху високорезолутивни чипове [26].

В заключение, микрочиповите геномни технологии все по-често намират приложение като основен генетичен скринингов метод както в изследователската дейност, така и в диагностиката. Техниката позволява детекция на патологични субмикроскопски геномни нарушения. Високата резолюция на метода го прави основен метод на избор при определяне на кандидат-районите за гени, отговорни за генетични заболявания при човека. Поради факта, че повечето нарушения включват локуси с множество гени, предизвикателствата са: 1) да се идентифицират гените, отговорни за даден фенотип, и 2) да се разгадае ролята на отделните гени, локализирани в небалансирания участък. Тъй като вариации в генома оказват голямо влияние върху състоянието на здраве и болест, детайлното проучване на геномните изменения би могло да разкрие нова информация за фенотипния ефект на гени с неясна понастоящем функция.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Barber, J. C. et al. 8p23.1 duplication syndrome; a novel genomic condition with unexpected complexity revealed by array CGH. – *Eur. J. Hum. Genet.*, **16**, 2008, № 1, 18-27.
2. Calin, G. A. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2004, № 9, 2999-3004.
3. Carter, N. P. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. – *Nat. Genet.*, **39**, 2007, 7 Suppl., S16-21.
4. D'Amours, G. et al. Whole-genome array CGH identifies pathogenic copy number variations in fetuses with major malformations and a normal karyotype. – *Clin. Genet.*, 2011.
5. Davies, J. J., I. M. Wilson et W. L. Lam. Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. – *Chromosome Res.*, **13**, 2005, № 3, 237-248.
6. De Ravel, T. J. et al. What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). – *Eur. J. Pediatr.*, **166**, 2007, № 7, 637-643.
7. Diaz, E. G. et A. Barisone. DNA microarrays: sample quality control, array hybridization and scanning. – *J. Vis. Exp.*, 2011, № 49.
8. Eberle, M. A. et al. Power to detect risk alleles using genome-wide tag SNP panels. – *PLoS Genet.*, **3**, 2007, № 10, 1827-1837.
9. Egger, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. – *Nature*, **429**, 2004, № 6990, 457-463.
10. Erdogan, F. et al. Characterization of a 5.3 Mb deletion in 15q14 by comparative genomic hybridization using a whole genome "tiling path" BAC array in a girl with heart defect, cleft palate, and developmental delay. – *Am. J. Med. Genet. A.*, **143**, 2007, № 2, 172-178.
11. Evangelidou, P. et al. Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. – *Mol. Cytogenet.*, **3**, 2010, 24.
12. Fiorentino, F. et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. – *Hum. Reprod.*, 2011.
13. Handyside, A. H. et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. – *J. Med. Genet.*, **47**, № 10, 2009, 651-658.
14. Iafrate, A. J. et al. Detection of large-scale variation in the human genome. – *Nat. Genet.*, **36**, № 9, 2004, 949-951.
15. Jonsson, G. et al. Distinct genomic profiles in hereditary breast tumors identified by array-based comparative genomic hybridization. – *Cancer Res.*, **65**, 2005, № 17, 7612-7621.
16. Koole, D. A. et al. A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. – *Nat. Genet.*, **38**, № 9, 2006, 999-1001.
17. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. – *Nature*, **437**, 2005, № 7063, 1299-1320.
18. Pinkel, D. et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. – *Nat. Genet.*, **20**, 1998, № 2, 207-211.
19. Shaffer, L. G. B. et A. Bejjani. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. – *Cytogenet. Genome Res.*, **115**, 2006, № 3-4, 303-309.
20. Shaffer, L. G. et al. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. – *J. Pediatr.*, **149**, 2006, № 1, 98-102.
21. Shaw-Smith, C. et al. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. – *Nat. Genet.*, **38**, 2006, № 9, 1032-1037.
22. Solinas-Toldo, S. et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. – *Gen. Chrom. Cancer*, **20**, 1997, № 4, 399-407.
23. Sun, Y. et al. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. – *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2004, № 22, e188.
24. Tan, D. S. et al. Getting it right: designing microarray (and not 'microarray') comparative genomic hybridization studies for cancer research. – *Lab. Invest.*, **87**, 2007, № 8, 737-754.
25. Veltman, J. A. B. et B. de Vries. Diagnostic genome profiling: unbiased whole genome or targeted analysis? – *J. Mol. Diagn.*, **8**, 2006, № 5, 534-537; discussion 537-539.
26. Zheng, Y. ChIP-on-chip for FoxP3. – *Methods Mol. Biol.*, **707**, 2011, 71-82.