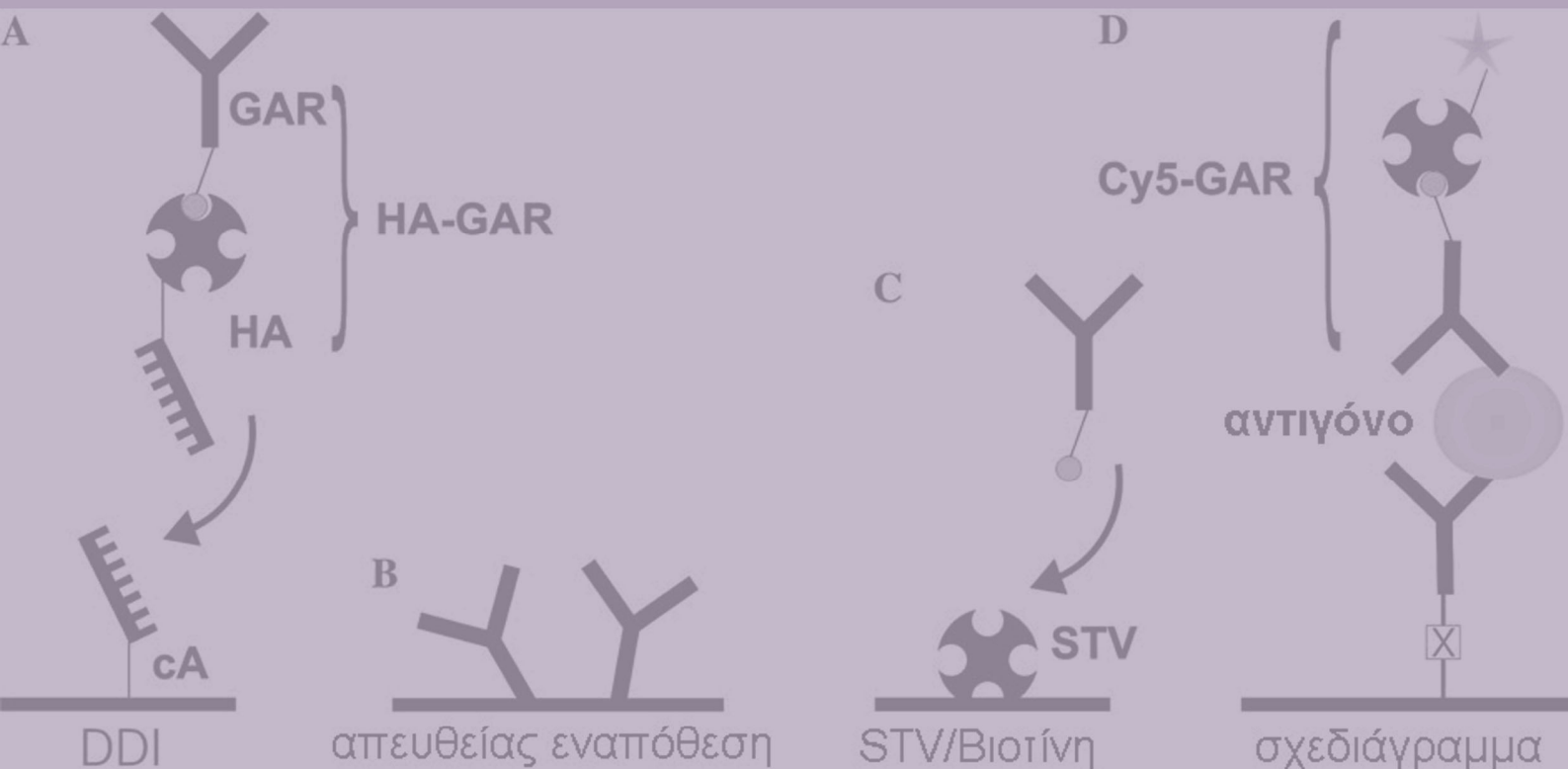


## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

### Πρωτεϊνικά chips Προβλήματα και ενίσχυση της αξιοπιστίας τους

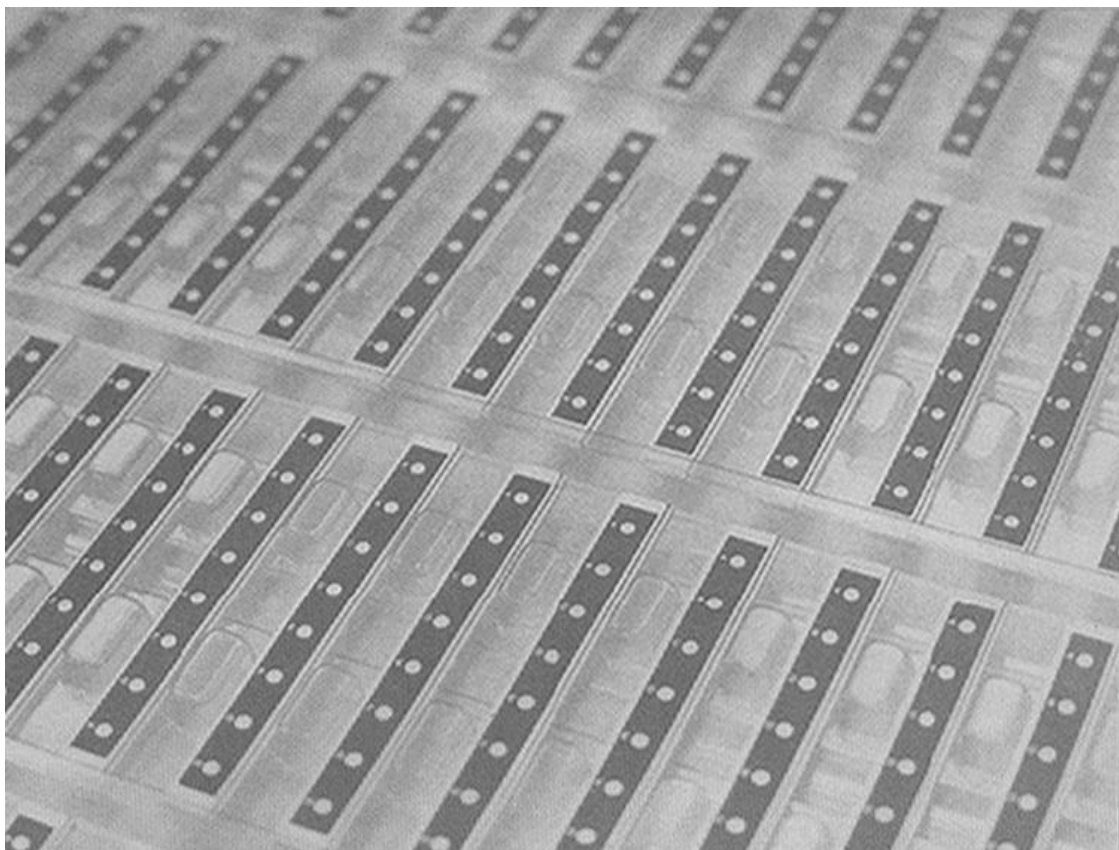


## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

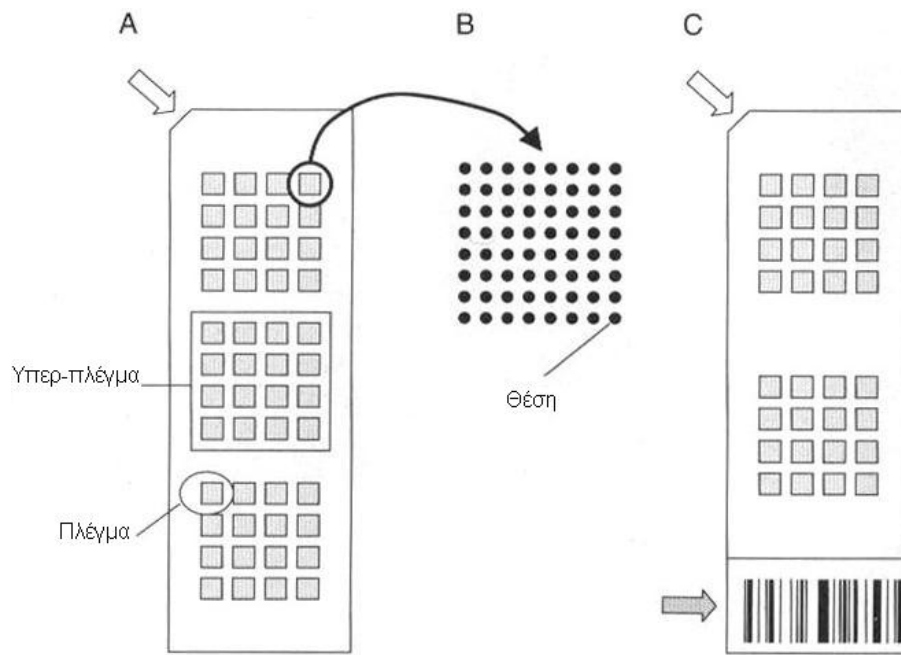
Ορισμός. ....	2
Ιστορικό. ....	4
Εφαρμογές chips. ....	6
Αναγκαιότητα πρωτεϊνικών chips – διαφορές με DNA chips. ....	11
Το ιδανικό πρωτεϊνικό chip. ....	17
Διαχωρισμός – καθαρισμός πρωτεϊνών. ....	20
Σήμανση. ....	22
Είδη πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών. ....	23
Παράγοντες δέσμευσης. ....	32
Αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. ....	42
Ανίχνευση. ....	47
Μηχανισμοί εναπόθεσης. ....	66
Μέθοδοι ακινητοποίησης. ....	72
Επιστρώσεις. ....	84
Επιφάνειες πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών. ....	87
Συμπεράσματα – μελλοντικές εξελίξεις. ....	112
Βιβλιογραφία. ....	114

## ΟΡΙΣΜΟΣ

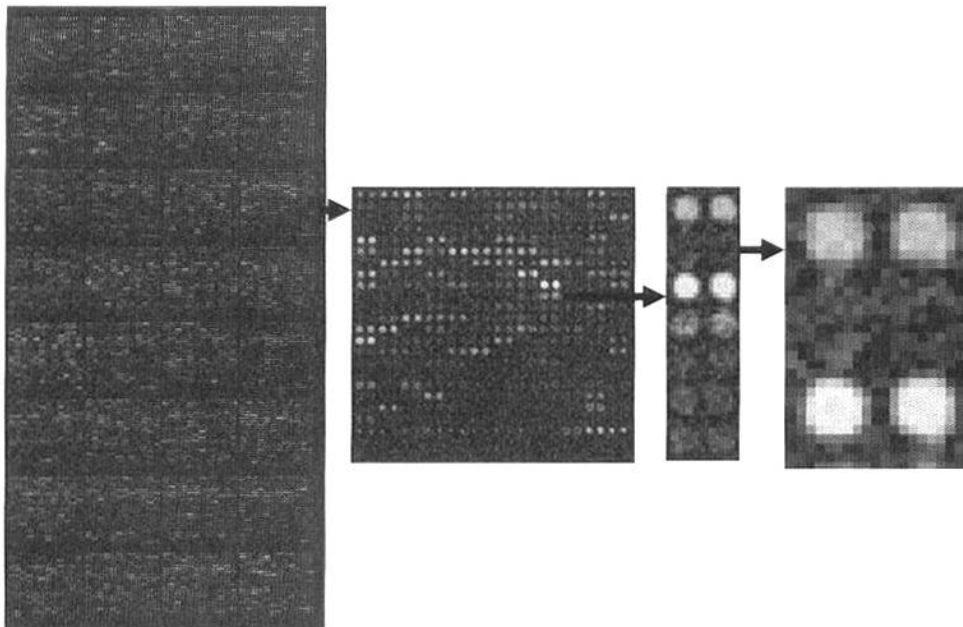
Πρωτεϊνική μικροσυστοιχία (αλλιώς biochip ή πρωτεϊνικό chip) συνιστά ένα συνήθως γυάλινο πλακίδιο, πάνω στο οποίο διαφορετικά μόρια πρωτεΐνης έχουν επισυναφθεί σε ξεχωριστές τοποθεσίες, διατεταγμένα ώστε να σχηματίζουν μία μικροσκοπική συστοιχία. Αυτά χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, υποστρώματα πρωτεϊνικών κινασών ή στόχοι μικρών, βιολογικά ενεργών μορίων. Η πιο κοινή πρωτεϊνική μικροσυστοιχία είναι η μικροσυστοιχία αντισωμάτων, όπου αντισώματα εναποτίθενται πάνω στο πρωτεϊνικό chip (συνήθως από γυαλί ή πυρίτιο) και χρησιμοποιούνται ως μόρια δέσμευσης (capture) για την ανίχνευση πρωτεϊνών από διαλύματα κυτταρικών λυμάτων. Οι πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες βρίσκουν εφαρμογή ως όργανα μέτρησης στη βιοϊατρική, για να καθοριστεί η παρουσία και/ή η ποσότητα πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα, π.χ. αίμα. Υπάρχουν διάφοροι τύποι πρωτεϊνικών chips, ωστόσο οι πιο κοινοί είναι τα chips γυάλινης διαφάνειας και οι μικροσυστοιχίες νανο-πηγαδιών.[23]



Εικόνα 1. Συστοιχίες πρωτεϊνικών chips SELDI. Σχηματική απεικόνιση πρωτεϊνικού chip SELDI. Τα πρωτεϊνικά chips κατασκευάζονται σε μορφή μικροπιλοδότησης ώστε με την χρήση 12 πρωτεϊνικών chips SELDI να μπορεί να μεταφερθεί το διάλυμα από μια πλάκα μικροπιλοποίησης 96 πηγαδιών.



Εικόνα 2. Πλέγματα και θέσεις. (A) Αυτό το σχηματικά απεικονισμένο biochip διαχωρίζεται σε τρεις μεγαλύτερες “περιοχές υπέρ-πλέγματος”. Κάθε υπέρ-πλέγμα αποτελείται από 16 μικρότερα πλέγματα, τα οποία με τη σειρά τους υποδιαιρούνται σε 64 θέσεις το καθένα. (B) Διευκρινιστικά, ένα πλέγμα είναι το μοντέλο θέσεων που καθορίζεται από μία μόνο ακίδα. Κάθε πλέγμα μπορεί να περιέχει ξεχωριστές θέσεις διαφορετικών μακρομορίων. (C) Αν πρέπει να χρησιμοποιηθούν πολλά biochips, συνιστάται η εργασία με biochips σημασμένα με barcode (γκρι βέλος). Επωφελής είναι επίσης η χρήση biochips που επιτρέπουν ευδιάκριτη απεικόνιση με ξεχωριστή σήμανση (άσπρο βέλος).



Εικόνα 3. Απεικόνιση μικροσυστοιχίας 18 000 θέσεων : 18 432 θέσεις εφαρμόστηκαν εις διπλούν πάνω σε ένα γυάλινο biochip. Τα 9216 διαφορετικά είδη υποδιαιρέθηκαν σε 16 πλέγματα 576 θέσεων το καθένα.

## ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Αρχικά φανταζόμασταν τα biochips ως ένα μικρό παράθυρο με χιλιάδες θέσεις σ' ένα σκοτεινό δίκτυο. Θεωρούσαμε ότι προσφέρουν έλεγχο υψηλής ρυθμοαπόδοσης (HTS) και οικονομία.

Το πρώτο είναι δυνατό γιατί η ανάλυση της υβριδοποίησης σε μία συγκεκριμένη αλληλουχία αυτοματοποιείται εύκολα μέσω της διευθέτησης μεγάλης ποσότητας από ποικίλες αλληλουχίες νουκλεϊκού οξέος σε ένα πολύ μικρό χώρο. Η οικονομία χρόνου είναι συνέπεια της αυτοματοποίησης αλλά ακόμα και τότε υπάρχουν ελάχιστοι χρόνοι επώασης. Επιπλέον η φόρτωση των biochips και ο ποιοτικός έλεγχος παίρνουν πολύ χρόνο.[21]

Το θεωρητικό υπόβαθρο για δοκιμασίες δέσμευσης-προσδεμάτων, βασισμένες σε μικροσυστοιχίες αναπτύχθηκαν από τον Ekins et al. στα τέλη της δεκαετίας του 1980. Σύμφωνα με το μοντέλο της δοκιμασίας μιας αναλυόμενης ουσίας, οι μικροσυστοιχίες αντισωμάτων όχι μόνο επιτρέπουν ταυτόχρονη εξέταση ενός συνόλου αναλυόμενων ουσιών αλλά θα έπρεπε να είναι πιο ευαίσθητες και γρήγορες ως συμβατικά συστήματα εξέτασης.

Οι πρώτες προσεγγίσεις συστοιχιών ήταν προσπάθειες για μικροσκοπικοποίηση βιοχημικών και ανοσολογικών δοκιμασιών που εφαρμόζονταν συνήθως με πλάκες μικροπιλοποίησης 96 πηγαδιών. Ο Mendoza et al. κατασκεύασε συστοιχίες αντισωμάτων αποτελούμενες από 96 πηγαδάκια, με 144 στοιχεία το καθένα για δοκιμασίες τύπου ELISA. Μία άλλη τάση στην αρχική φάση της ανάπτυξης ήταν η χρήση φίλτρων μεμβράνης ως υποστηρικτικό υλικό της συστοιχίας λόγω της μεγαλύτερης ικανότητάς τους για πρόσδεση πρωτεϊνών.[8]

Το κόστος των πρώτων biochips ήταν 1 εκατομμύρια δολάρια ανά biochip, γεγονός που συντέλεσε στην επιβράδυνση της εμπορικής διάδοσής τους. Πλέον όμως η αγορά τους αναπτύσσεται με αστραπιαία ταχύτητα. Το εύρος των προσφερόμενων biochips όσο και ο απαραίτητος εξοπλισμός είναι τόσο ουσιαστικό που δεν υπάρχει καμία έλλειψη εξειδίκευσης σε σχέση με αυτή τη σχετικά νέα τεχνολογία.

Στη μέση της δεκαετίας του 90 είχαμε ταχεία εξέλιξη της τεχνολογίας των υπολογιστών. Παρόμοια ανάπτυξη προβλέπονταν και για το πεδίο της βιοτεχνολογίας. Έτσι ήταν απλά ζήτημα χρόνου μέχρις ότου οι λέξεις bio και chip να συνδεθούν. Μετά τη δημιουργία του biochip έγινε «έκρηξη» εφαρμογών από chips (πρωτεΐνες, DNA, πεπτιδία κλπ.) με αποτέλεσμα ο όρος τεχνολογία μικροσυστοιχιών να χρησιμοποιηθεί ως γενικός όρος γι' αυτήν την τεχνολογία. Κι αυτό γιατί όπως προκύπτει από την ετυμολογία της λέξης πρόκειται για μια εντυπωσιακά μεγάλη συγκέντρωση μορίων σε έναν πολύ μικρό χώρο.

Σήμερα σε ένα τετραγωνικό εκατοστό μπορούμε να έχουμε από λίγες εκατοντάδες μέχρι πάνω από 200.000 θέσεις ανάλογα με την τεχνολογία διάταξης, τα μόρια που προσδένονται και το προς λύση πρόβλημα.

Με τα microchips μεγάλος αριθμός από διαφορετικά μόρια αντιδρούν μεταξύ τους σε καθορισμένο χρονικό διάστημα. Αυτές οι εκατομμύρια αντιδράσεις δε θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν με τις δαπανηρές μεθόδους πλακών μικροπιλοποίησης, καθώς αυτές

απαιτούσαν επιπλέον αντιδραστήρια και επαναλήψεις για να αναλυθούν τα αποτελέσματα. Η στροφή προς τις μικροσυστοιχίες ήταν λοιπόν αναγκαία και λογική. Με τις μικροσυστοιχίες είναι πλέον δυνατό να μειωθεί ο όγκος ανά αντίδραση σε λίγα δισεκατομμυριοστά ενός λίτρου του διαλύματος.

Μετά τη διαπίστωση των πλεονεκτημάτων των biochips ήταν πλέον αναγκαία η παραγωγή ρομποτικών μηχανισμών που να μπορούν να αναγνωρίσουν πιπέτες και να μεταφέρουν νανο- και πικόλιτρα αναπαραγωγίσιμα σε μια διάμετρο 100, 10 και <1 μm. Όργανα μέτρησης, συστήματα λογισμικού και γενικά όλα τα συστήματα που είχαν αναπτυχθεί για πλάκες μικροτιτλοποίησης έπρεπε να προσαρμοστούν στις μικροσυστοιχίες.

Γενικά γι' αυτούς που επιτελούν κάτω από 1000 επωάσεις ανά μέρα είναι καλύτερο να χρησιμοποιούν πλάκες μικροτιτλοποίησης. Αλλιώς, για 1000 επωάσεις και πάνω δικαιολογείται το πέρασμα στην τεχνολογία των μικροσυστοιχιών.[21]

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ CHIPS

Η ανάπτυξη των biochips έδωσε σημαντική ώθηση στην ταχέως αναπτυσσόμενη βιοτεχνολογία, η οποία καλύπτει ένα μεγάλο φάσμα ερευνητικών προσπαθειών, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιωματικής, της πρωτεωμικής, της υπολογιστικής βιολογίας και της φαρμακευτικής έρευνας, ανάμεσα σε άλλες δραστηριότητες. Εξελίξεις σ' αυτές τις περιοχές δίνουν στους επιστήμονες νέες μεθόδους για τη διευκρίνιση των σύνθετων βιοχημικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα μέσα στα κύτταρα, με τελικό στόχο την κατανόηση και θεραπεία των ανθρώπινων ασθενειών. Ταυτόχρονα, η τεχνολογία των ημιαγωγών συνεισφέρει σταθερά στην τελειοποίηση της επιστήμης της μικροσκοπικοποίησης (microminiaturization). Η συγχώνευση αυτών των δύο πεδίων τα τελευταία χρόνια έχει δώσει τη δυνατότητα στους βιοτεχνολόγους να αρχίσουν να εφαρμόζουν τα παραδοσιακά ογκώδη εργαλεία τους σε όλο και μικρότερες επιφάνειες, πάνω στα λεγόμενα biochips. Αυτά τα chips είναι ουσιαστικά εργαστήρια σε μικρογραφία, που μπορούν να εκτελούν εκατοντάδες ή χιλιάδες ταυτόχρονες βιοχημικές αντιδράσεις. Τα biochips δίνουν τη δυνατότητα στους ερευνητές να ελέγχουν σε μικρότερο χρόνο μεγάλους αριθμούς βιολογικών αναλυόμενων ουσιών για μία ποικιλία σκοπών, από τη διάγνωση ασθενειών μέχρι την ανίχνευση ουσιών βιοτρομοκρατίας.

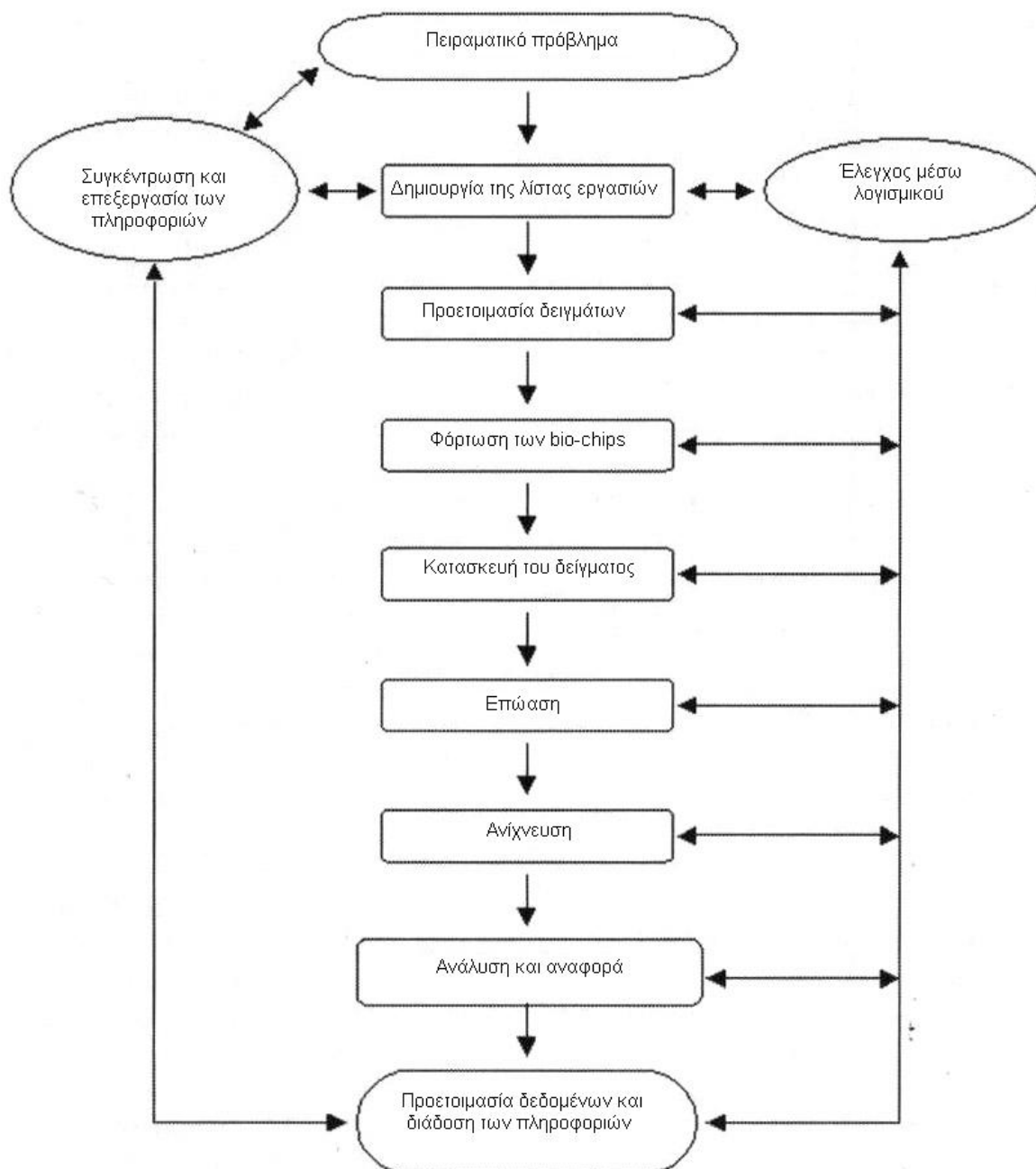
Εφαρμογή των μικροσυστοιχιών έχει γίνει σε μεμβράνες από nylon αλλά σήμερα κυρίως σε chips από γυαλί, χωρίς όμως να περιορίζονται σ' αυτά. Οι πιθανές χρήσεις των μικροσυστοιχιών είναι σχεδόν απεριόριστες, καθώς επιτρέπουν κάθε είδος πειράματος, αρκεί να έχει να κάνει με αλληλεπίδραση μορίων.

Για την προσαρμογή και την εφαρμογή ενός πειράματος στις μικροδιατάξεις, πρέπει να υπάρχουν οι κατάλληλες προϋποθέσεις :

- Η αλληλεπίδραση μεταξύ των αλληλεπιδρόντων μερών πρέπει να είναι αρκετά σταθερή.
- Ένα από τα αλληλεπιδρόντα πρέπει να έχει φυσικά διακριτικά ώστε να είναι δυνατή μία ποσοτική εξέταση.
- Πρέπει το άλλο αλληλεπιδρόν να μπορεί να προσδεθεί σταθερά στο chip.
- Σημαντικό είναι να είναι δυνατή η εξέταση πολλών από τις συνιστώσες παράλληλα.

Εφόσον ικανοποιηθούν οι παραπάνω απαιτήσεις μπορεί να γίνει μεγάλος αριθμός πειραμάτων, ξεκινώντας από έλεγχο φαρμακευτικής στόχευσης μέχρι μεταγραφική ανάλυση και ταυτοποίηση συγκεκριμένων αντισωμάτων.

Οι χρήσεις των μικροδιατάξεων μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη φύση των χρησιμοποιούμενων δειγμάτων (DNA, πρωτεΐνη, PNA, ιστοί ή άλλες ουσίες), το επιστημονικό πρόβλημα ή με τη φύση της δοκιμασίας που χρησιμοποιείται σε ένα συγκεκριμένο πείραμα μικροδιάταξης. Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στην εικόνα 4.



Εικόνα 4. Γραφική απεικόνιση ενός σχεδίου ροής εργασίας για ένα εργαστήριο υψηλής ρυθμοαπόδοσης (HTS). Το πειραματικό πρόβλημα βρίσκεται στο πάνω μέρος του πλάνου. Κάθε στάδιο της διαδικασίας εφαρμογής και της ανάλυσης ελέγχεται και καταγράφεται από το λογισμικό. Η ανάληψη και η επεξεργασία της πληροφορίας, κατά κανόνα, γίνεται στην αρχή και στο τέλος της όλης διαδικασίας της ροής εργασίας, αλλά μπορεί και να συντονιστεί από το λογισμικό κατά τη διάρκεια του κάθε ξεχωριστού σταδίου.



Ανάλογα με την αρχιτεκτονική της διάταξης και τα δείγματα, είναι δυνατό να τεθούν ερωτήματα από ποικίλους τομείς, όπως :

- Ανάλυση της διαφοράς των προτύπων μεταγραφής ποικίλων δειγμάτων ιστών, όπου το RNA φέρει την πληροφορία.
- Ερωτήματα σε σχέση με τις γονιδιωματικές διαφορές, όπου το DNA είναι ο φορέας της πληροφορίας.
- Ποσοτικοποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, όπου η πρωτεΐνη φέρει την πληροφορία.
- Βιβλιοθήκες τμημάτων ιστών εγκαθιδρύονται, όπου το RNA, το DNA ή οι πρωτεΐνες χρησιμεύουν ως φορείς πληροφορίας.
- Με τη βοήθεια των biochips αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και DNA μπορούν να ποσοτικοποιηθούν σε μεγάλη κλίμακα.
- Αλληλεπιδράσεις μεταξύ άλλων ουσιών (όπως τα φαρμακευτικά προϊόντα) με σχετικές και κατάλληλες δομές-στόχους, με άλλα λόγια αλληλεπιδράσεις που αποδίδονται στην κλασική φαρμακολογία.

Με τον κατάλληλο πειραματικό σχεδιασμό μπορούν να απαντηθούν ερωτήματα όπως :

- Τι συμβαίνει στον αποδιατεταγμένο ιστό;
  - Πώς αλλάζει το πρότυπο μεταγραφής κατά τη διάρκεια της διαδικασίας;
  - Ποιο επίπεδο μεταγραφής παρουσιάζει ένα συγκεκριμένο όργανο;
  - Τι επίδραση έχουν τα φαρμακευτικά προϊόντα ή τα περιβαλλοντικά δηλητήρια στην έκφραση;
  - Τι συμβαίνει στο πλαίσιο των κυκλικών παρεκκλίσεων (cyclical variations) (ερωτήματα του βιολογικού ρολογιού).
  - Πώς αντιδρά το ανοσοποιητικό σύστημα στα εισβάλλοντα παθογόνα;
  - Σε τι βασίζονται ασθένειες όπως η παχυσαρκία, η αρτηριοσκλήρωση και το άσθμα;
- κλπ....

Η λίστα αυτή θα μπορούσε να συνεχίζεται για πάντα. Ένα ιδιαίτερο ενδεχόμενο προκύπτει όταν συγκρίνονται δύο παράμετροι. Πρόκειται για ένα θέμα ερωτηματικών εξαρτώμενων από τον χρόνο ή τη συγκέντρωση ή απλώς για τη σύγκριση των προτύπων έκφρασης διαφορετικών οργάνων. Μ' αυτό μπορεί κανείς να αναγνωρίσει ομάδες συνέκφρασης με παρόμοια χαρακτηριστικά έκφρασης.

Μια άλλη ομάδα εφαρμογών μικροσυστοιχιών αναφέρεται σε διαφορές-πολυμορφισμούς του γονιδιωματικού DNA. [21] Τέτοιες παρεκκλίσεις όπως και η μελέτη των προτύπων έκφρασης των γονιδίων, η ανίχνευση των θέσεων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων και η

ανίχνευση μεταλλάξεων στις αλληλουχίες σε μεγάλη κλίμακα μπορούν να εξεταστούν με τις μικροσυστοιχίες DNA.[1]

Εκτός όμως από τα παραπάνω πεδία υπάρχουν φυσικά και πιο σχετικές περιοχές που αφορούν τόσο στην αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, στην αλληλεπίδραση DNA – πρωτεϊνών πρωτεϊνών-λιπιδίων, πρωτεϊνών-φαρμάκων, πρωτεϊνών-υποδοχέων και αντιγόνων-αντισωμάτων όσο και στη μελέτη των δραστηριοτήτων των κινασών και για τη μελέτη προφίλ του ορρού. Η βιοχημική μελέτη χιλιάδων πρωτεϊνών μπορεί να χαρακτηριστεί και να ποσοτικοποιηθεί με παράλληλο τρόπο μέσω της χρήσης των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών. Τα πρωτεϊνικά chips δεν έχουν χρησιμοποιηθεί μόνο για να χαρακτηριστούν λειτουργίες προηγουμένως μη χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών, αλλά και για να ανακαλυφθούν νέες λειτουργικές δυνατότητες ήδη χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών. Οι πρωτεωμικές μικροσυστοιχίες αποτελούν κι έναν έξοχο τρόπο να ανακαλυφθούν στόχοι φαρμάκων. Ολόκληρα πρωτεώματα τυπωμένα πάνω σ' ένα chip μπορούν να ανιχνευτούν με μικρά μόρια σε ένα πείραμα για να ανακαλυφθούν αλληλεπιδράσεις.

Θα ήταν παράτολμο να καταγράψουμε όλες τις δυνατές επιστημονικές χρήσεις των σχετικά καινούριων πρωτεϊνικών chips. Μπορούμε για παράδειγμα να χαρακτηρίσουμε πιο σωστά περιοχές πρόσδεσης αντισωμάτων ή να εξετάσουμε τη δραστηριότητα φωσφορυλίωσης των κινασών. Η τοποθέτηση πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών σε ένα chip καθιστά δυνατή την αναγνώριση των αλληλεπιδρώντων μορίων της καθεμίας από τις πρωτεΐνες για τις οποίες ενδιαφερόμαστε. Άλλες εφαρμογές στις οποίες εξετάζονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ DNA/RNA και πρωτεϊνών είναι επίσης δυνατές. Πρόκειται για την αναγνώριση των ομάδων υποκινητών ή για την αναζήτηση πρωτεϊνών που προσδένονται σε RNA αλλά και για άλλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ νουκλεϊκών οξέων και των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Οι ποικίλες συχνότητες DNA/RNA όπως και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες μπορούν έτσι να τοποθετηθούν στα biochips. Αυτό βοηθάει ιδιαίτερα στις μελέτες υποκινητών, καθώς η πιο ευνοϊκή και ουσιώδης δομή των ομάδων υποκινητών μπορεί να μετρηθεί με ένα ή το πολύ με λίγα πειράματα, αρκεί να χρησιμοποιείται έξυπνος σχεδιασμός. Προβλήματα που αφορούν στη μεταφορά mRNA σε διάφορες περιοχές του κυττάρου (κυρίως του νευρικού κυττάρου) έχουν αναδειχθεί. Γι' αυτό οι αντιδράσεις μεταξύ RNA και πρωτεΐνης λαμβάνουν όλο και μεγαλύτερη προσοχή.

Ένα ακόμα πεδίο εφαρμογής των μικροσυστοιχιών περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση των βιομορίων (όπως οι πρωτεΐνες) με μικρότερα φαρμακολογικά σχετιζόμενα μόρια. Με τα φαρμακολογικά πειράματα αναζητούμε νέους φαρμακολογικούς οδηγούς, όσον αφορά στην αλληλεπίδραση με σχετικές πρωτεΐνες ή με άλλους ενδιαφέροντες φαρμακολογικούς στόχους. Δυστυχώς όμως τα φαρμακολογικά ενδιαφέροντα μόρια ανευρίσκονται συχνά σε μεμβράνες, γεγονός που κάνει την ανάλυσή τους με μικροσυστοιχίες δύσκολη.

Συνοψίζοντας, είναι αξιοπρόσεκτο το ότι η εστίαση στις μικροσυστοιχίες είναι στενά συνδεδεμένη με την προσπάθεια των επιστημόνων να φέρουν εις πέρας παράλληλα έναν

μεγάλο αριθμό πειραμάτων. Στόχος τους είναι να μην ξοδεύουν υλικά όταν αυτό δεν είναι απαραίτητο και να επιτευχθεί επιτάχυνση των διαδικασιών. Αυτό επιτυγχάνεται με τις μικροσυστοιχίες, καθώς αυτές καθιστούν δυνατά εξαιρετικά γρήγορα και κατανοητά πειράματα.[21][1]

DNA

Η ζήτηση για την ανακάλυψη καινοτόμων φαρμάκων από την φαρμακευτική βιομηχανία και την βιομηχανία βιοτεχνολογίας τροφοδοτεί ξέφρενους ρυθμούς στην έρευνα για ανακαλύψεις στην περιοχή αυτή της λειτουργικής γονιδιωματικής και πρωτεωμικής. Κάποιοι τομείς που επωφελήθηκαν μέσα από όλη αυτή τη δραστηριότητα είναι οι τομείς της επιστήμης των επιφανειών και των εργαλείων για έλεγχο υψηλής ρυθμοαπόδοσης. Πολυάριθμες επιφάνειες με ποικίλες χημικές λειτουργίες σε μια ευρεία περιοχή υποστρωμάτων κατασκευάστηκαν για να ακινητοποιούν σύνθετα μόρια όπως DNA, πρωτεΐνες, αντισώματα, λιπίδια και ολιγοσακχαρίτες. Η αλληλεπίδραση αυτών των ακινητοποιημένων σε επιφάνειες ανιχνευτών με ποικίλους στόχους παρακολούθηθηκε σε μία διάταξη υψηλής ρυθμοαπόδοσης με την χρήση μικροσυστοιχιών. Η μεγαλύτερη εστίαση σήμερα γίνεται στην έρευνα για τις αλληλεπιδράσεις του DNA για να ανιχνευθεί η έκφραση των γονιδίων και ο πολυμορφισμός στους ανθρώπους με χρήση μικροσυστοιχιών DNA. Βιολόγοι, χημικοί, επιστήμονες ασχολούμενοι με υλικά και μηχανικοί έχουν συνεργαστεί για να αναπτύξουν τις μικροσυστοιχίες DNA, που καθιστούν δυνατή, θεωρητικά, την παρακολούθηση των επιπέδων έκφρασης όλων των γονιδίων σε έναν οργανισμό ταυτόχρονα. Το κλειδί σ' αυτήν την τεχνολογία ήταν η ανάπτυξη δοκιμασιών προσδιορισμού βασισμένων σε επιφάνειες, στις οποίες πολυάριθμοι ανιχνευτές ακινητοποιούνται με έναν τρόπο προσπελάσιμο στον χώρο. Τέτοιες μορφές δοκιμασιών προσφέρονται για μικροσκοπικοποίηση και πολλαπλότητα.

Ωστόσο, αν και οι μικροσυστοιχίες DNA αποτελούν ενδιαφέροντα εργαλεία για την αποκρυπτογράφηση της συμπεριφοράς της γονιδιακής έκφρασης, η τεχνική αυτή δεν έχει καταφέρει να εξηγήσει με αξιόπιστο τρόπο τα επίπεδα της έκφρασης της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο. Μετρήσεις που βασίζονται στο mRNA παρέχουν μόνο έναν έμμεσο τρόπο. Φυσικά, αυτό που πραγματικά επιθυμούμε να γνωρίζουμε είναι το πώς επιδρούν στα επίπεδα της πρωτεΐνης και στις δραστηριότητες μια γενετική τροποποίηση, τα φάρμακα ή μια αλλαγή στο περιβάλλον. Οι μελέτες όμως για την γονιδιακή έκφραση δεν είναι σε θέση να θέσουν ευθέως θέματα όπως οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών που λαμβάνουν χώρα υπό την επήρεια ποικίλων ενζύμων. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση, η γλυκοχυλίωση, η πρωτεόλυση και η ακυλίωση είναι σημαντικές για τον έλεγχο της κυτταρικής ρύθμισης και των μονοπατιών της μεταγωγής σήματος, καθώς επηρεάζουν πολύ τις δραστηριότητες πολλών πρωτεϊνών. Προφανώς μία συστοιχία βασισμένη σε νουκλεϊκά οξέα δεν επηρεάζεται από τέτοιες επιδράσεις. Επίσης, οι συστοιχίες των γονιδίων δε λαμβάνουν υπόψη τον σημαντικό ρόλο των υδατανθράκων εντός των κυτταρικών μεμβρανών και τις αλληλεπιδράσεις τους με πρωτεΐνες όπως οι λεκτίνες, ενώ τα επίπεδα έκφρασης πολλών γονιδίων υπόκεινται σε σημαντική μετα-μεταγραφική ρύθμιση, που σημαίνει ότι τα επίπεδα των μηνυμάτων δεν αντανακλούν πάντα με ακρίβεια τα επίπεδα της

πρωτεΐνης. Τέλος, οι πολλές απαιτήσεις για την παρασκευή του δείγματος για τις μικροσυστοιχίες DNA καθιστούν κάποιες εφαρμογές μη πρακτικές.

Ενώ λοιπόν η χρήση των μικροσυστοιχιών DNA θα συνεχίσει να αυξάνεται στην έρευνα της λειτουργικής γονιδιωματικής, υπάρχει μια αυξανόμενη τάση για εστίαση στις πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αποτελούν το κλειδί ποικίλων κυτταρικών μηχανισμών και λειτουργούν ως βιοδείκτες στη διάγνωση ασθενειών.

Η παρακολούθηση της πρωτεϊνικής δραστηριότητας και των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών είναι σημαντικές κατά τη διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων. Κατά παράδοση, τα περισσότερα φάρμακα βασίζονταν σε μικρά μόρια-στόχους. Ωστόσο, η προηγούμενη δεκαετία είδε την ανάδυση μιας νέας κατηγορίας φαρμάκων, βασισμένων σε αντισώματα. Γρήγορα βήματα στην μελέτη των αντισωμάτων με μεθόδους γενετικής μηχανικής και στη σύνθεση ανθρωπίνων αντισωμάτων έχουν επιταχύνει την ανάπτυξη ενός μεγάλου εύρους ενδιαφερόντων φαρμάκων βασισμένων σ' αυτά τα μόρια. Τώρα που η σημασία των πρωτεϊνών και των μικρών μορίων στην έρευνα για την ανακάλυψη φαρμάκων είναι σαφής, είναι ενδιαφέρον το να διαπιστώσουμε αν μια διάταξη υψηλής ρυθμοαπόδοσης, παρόμοια μ' αυτή που εφαρμόζεται στην περίπτωση των συστοιχιών DNA μπορεί να εφαρμοστεί στην έρευνα αυτών των μορίων.

Γιατί όμως είναι απαραίτητη μια τέτοια διάταξη; Ένα καλό παράδειγμα είναι ένα πείραμα με στόχο την ανίχνευση όλων των προσδεδωμένων μορίων μίας δεδομένης πρωτεΐνης X. Οι περισσότεροι ερευνητές θα εφαρμόζαν μια από τις δύο παρακάτω τεχνικές γι' αυτόν τον σκοπό, είτε ένα πείραμα δύο υβριδίων ή χρωματογραφία πρωτεϊνικής συγγένειας. Η πρώτη είναι πολύ χρήσιμη αλλά μειονεκτεί στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν πρέπει να χρησιμοποιηθούν ως μέρος των τεχνητών συντετηγμένων πρωτεϊνών. Αυτό σημαίνει ότι οι δοκιμασίες πρόσδεσης κατά τις οποίες επιθυμεί κανείς να χρησιμοποιήσει ένα πολυ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο, για παράδειγμα, δεν μπορούν να διεξαχθούν χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες που δεν εκφράζονται καλά σε ζυμομύκητες ή που είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως «δόλωμα» σ' αυτήν τη δοκιμασία. Ίσως το σημαντικότερο είναι ότι ο έλεγχος των συνθηκών σε μια *in vivo* δοκιμασία είναι πολύ περιορισμένος, ενώ σε ένα πείραμα βασισμένο σε συστοιχία πρωτεϊνικής λειτουργίας, οι συνθήκες μπορούν να προσαρμοστούν κατά βούληση. Η βασισμένη στη συστοιχία μέθοδος ξεχωρίζει από την χρωματογραφία συγγένειας στο ότι σ' αυτήν γίνεται ανίχνευση μόνο από απευθείας πρόσδεση. Μια μοναδική εφαρμογή συστοιχιών πρωτεϊνικής λειτουργίας θα ήταν η διερεύνηση αλληλεπιδράσεων μικρού μορίου-πρωτεΐνης σε κλίμακα εύρους πρωτεωμικής, για τις οποίες δεν υπάρχουν πολλές καλές μέθοδοι. Αυτός ο τύπος εφαρμογής σχετίζεται με ένα πρόβλημα που συναντάται συχνά στη φαρμακευτική βιομηχανία και είναι το εάν ένα δεδομένο υποψήφιο φάρμακο προσδένεται σφιχτά σε οποιαδήποτε άλλη πρωτεΐνη πέρα από την πρωτεΐνη-στόχο για την οποία είναι φτιαγμένο. Αυτού του είδους η

ανάλυση θα γινόταν σχετικά σαφής με την χρήση συστοιχίας πρωτεϊνικής λειτουργίας και ενός υποψηφίου σημασμένου φαρμάκου.

Πριν γίνουν προσπάθειες για την ανάπτυξη εργαλείων μικροσυστοιχιών για την έρευνα των πρωτεϊνών, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τις ακόλουθες βιολογικές και τεχνολογικές προκλήσεις. Οι πρωτεΐνες σε αντίθεση με το DNA είναι ιδιαίτερα σύνθετα και ποικιλόμορφα μόρια, των οποίων η ποσότητα στον ανθρώπινο οργανισμό ποικίλει. Οι περισσότερες ενδιαφέρουσες πρωτεΐνες βρίσκονται σε σχετικά μικρές ποσότητες και συνήθως είναι παρούσες σε ένα σύνθετο σύμπλεγμα άλλων πρωτεϊνών και κυτταρικών υλικών. Η παρασκευή του δείγματος, περιλαμβανόμενης της απομόνωσης και της συγκέντρωσης στη συνέχεια των πρωτεϊνών-στόχων δεν είναι ασήμαντη. Ο καθαρισμός και η αναπαραγωγή των πρωτεϊνών είναι πολύ περίπλοκοι, οι πρωτεΐνες στην φυσική τους διαμόρφωση είναι δύσκολο να προσδεθούν στο υπόστρωμα του biochip ενώ η διατήρηση της διαμόρφωσής τους ακέραιης ενώ ακινητοποιούνται πάνω στις μικροσυστοιχίες αποτελεί μεγάλη πρόκληση. Καθώς είναι ευρέως γνωστό ότι η διαμόρφωση των πρωτεϊνών επηρεάζει τη λειτουργία τους, οποιοσδήποτε αλλαγές εισήχθησαν κατά το στάδιο της ακινητοποίησης στην επιφάνεια θα επηρεάσουν δραστικά την φυσική συμπεριφορά βιομοριακής αλληλεπίδρασης αυτών των ευαίσθητων μορίων, οδηγώντας σε αλλοιωμένα ή λανθασμένα αποτελέσματα. Οι πρωτεΐνες έχουν επίσης την τάση να αποδιατάσσονται πάνω στις επιφάνειες, κυρίως αυτές που είναι φορτισμένες και να παρουσιάζουν μη ειδική πρόσδεση σ' αυτές.

Με τα νουκλεϊκά οξέα τα προβλήματα διαχείρισης και σταθερότητας είναι ασήμαντα. Το DNA είναι πολύ σταθερό. Σε κατάλληλα διαλύματα μπορεί να αποθηκευτεί για αρκετά χρόνια και να χρησιμοποιηθεί ξανά. Τα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να αποδιαταχθούν πολλές φορές, π.χ. με θέρμανση και να τα επαναφέρουμε στην φυσική τους διαμόρφωση μιας συγκεκριμένης μονόκλωνης έλικας ή ενός συμπληρωματικού διπλού σκέλους. Κατά κανόνα αυτό δεν είναι δυνατό με τις πρωτεΐνες.

Για τους λόγους αυτούς, αν και η επινόηση των συστοιχιών DNA μπορεί να παρέχει έμπνευση και κάποια τεχνική καθοδήγηση για την ανάπτυξη των πρωτεϊνικών biochips, η λεπτομερής μεθοδολογία για την κατασκευή των πρωτεϊνικών συστοιχιών διαφέρει σημαντικά από αυτήν που είναι φτιαγμένη για το DNA. Είναι σημαντικό δηλαδή το να διατάσσουμε πρωτεΐνες, εφόσον είναι δυνατό, χωρίς να τους επιτρέπουμε να αποδιατάσσονται λόγω αφυδάτωσης ή να έρχονται σε επαφή με συχνά χρησιμοποιούμενα υλικά συσκευών όπως ατσάλι, πλαστικό, γυαλί κλπ. Η δυνατότητα μικροσκοπικοποίησης καθιστά αυτά τα θέματα πολύ πιο σημαντικά γιατί η αναλογία επιφάνειας-όγκου αυξάνεται δραματικά καθώς μειώνονται οι όγκοι του δείγματος σε κλίμακες νανολίτρων και πικολίτρων. Παρά τις δυσκολίες αυτές όμως και παρά το γεγονός ότι η τεχνολογία των πρωτεϊνικών συστοιχιών είναι 7 χρόνια πίσω από την αντίστοιχη των νουκλεϊκών οξέων, έχουν σημειωθεί σημαντικές πρόοδοι που καθιστούν

δυνατές εντυπωσιακές εφαρμογές αυτής της εξελισσόμενης τεχνολογίας, όπως την παράλληλη και με δυνατότητα μικροσκοπικοποίησης πρωτεϊνική ανάλυση.[21] [9] [17] [7]

Στην περίπτωση των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών το ακινητοποιημένο υλικό είναι πρωτεΐνη ή κάποια ουσία ικανή να δεσμεύει πρωτεΐνες από σύνθετα βιολογικά δείγματα, όπως αναλύεται στη συνέχεια. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα αυτών των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών είναι οι πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν ως συνάρτηση έρευνας, χρόνου και ποιότητας δείγματος. Ένα μόνο χαρακτηριστικό μιας πρωτεϊνικής μικροσυστοιχίας μπορεί να απαιτήσει την εναπόθεση λιγότερου του ενός πικογραμμάριου πρωτεΐνης, που είναι περίπου ένα εκατομμύριο φορές λιγότερο από αυτό που χρησιμοποιείται για την επίστρωση μιας πλάκας μικροτιλοποίησης 96 πηγαδιών.[9]

Ο στόχος της ιατρικής και βιολογικής έρευνας προς το παρόν είναι να ανακαλυφθεί η επίδραση των σημειακών πολυμορφικών μεταλλάξεων SNPs που θεωρούνται σχετικές με κάποιες ασθένειες, στη βιολογική δραστηριότητα των πρωτεϊνών των προερχόμενων από γονίδια. Για τον σκοπό αυτό πρέπει να μελετηθεί η φυσική πρωτεΐνη. Κατά κανόνα για την έναρξη μιας ασθένειας δεν ευθύνεται μία αλλά αρκετές πρωτεΐνες.

Για τη μελέτη όμως της κάθε πρωτεΐνης πρέπει πρώτα να την απομονώσουμε από το κύτταρο.

Οι πρωτεΐνες μπορούν να συντεθούν εξωτερικά, να καθαριστούν και να προσκολληθούν στη συστοιχία. Εναλλακτικά μπορούν να συντεθούν επιτόπου και να προσκολληθούν απευθείας στη συστοιχία. Η πρωτεϊνοσύνθεση γίνεται μέσω βιοσύνθεσης, έκφρασης DNA σε ακυτταρικά συστήματα ή χημικής σύνθεσης. Η επιτόπια σύνθεση είναι δυνατή με τα τελευταία δύο. Με τη μέθοδο της έκφρασης DNA σε ακυτταρικά συστήματα οι πρωτεΐνες προσκολλώνται στο υποστηρικτικό υλικό αμέσως μετά την παραγωγή τους.

Τα μόρια δέσμευσης που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως αντισώματα. Ωστόσο πρόσφατα υπάρχει μια τάση προς άλλους τύπους μορίων που είναι παρόμοια στη φύση τους με πεπτιδία ή απταμερή. Τα αντισώματα παρουσιάζουν κάποια προβλήματα, συμπεριλαμβανομένου του γεγονότος ότι δεν υπάρχουν αντισώματα για τις περισσότερες πρωτεΐνες και επίσης προβλήματα με την ειδικότητα σε κάποια εμπορικά παρασκευάσματα αντισωμάτων. Ωστόσο τα αντισώματα εξακολουθούν να εκπροσωπούν το καλύτερα χαρακτηριζόμενο και αποτελεσματικό πρωτεϊνικό παράγοντα δέσμευσης για μικροσυστοιχίες. Η μικροσυστοιχία αντισωμάτων συνιστά μία πρωτεϊνική μικροσυστοιχία, όπου ένα σύνολο αντισωμάτων δέσμευσης διατάσσεται και καθηλώνεται πάνω σε μία στερεή επιφάνεια, όπως γυαλιού, πλαστικού και πυριτίου με σκοπό την ανίχνευση αντιγόνων. Η μικροσυστοιχία αντισωμάτων συχνά χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της πρωτεϊνικής έκφρασης από κυτταρικά λύματα γενικά στην έρευνα και για ειδικούς βιοδείκτες από ορό ή ούρα για διαγνωστικές εφαρμογές. Πρόσφατα, νουκλεϊκά οξέα, υποδοχείς, ένζυμα και πρωτεΐνες έχουν διαταχθεί πάνω στο chip και χρησιμοποιούνται ως μόρια δέσμευσης. Αυτό θα επιτρέψει σε ένα μεγάλο εύρος

πειραμάτων να πραγματοποιηθεί πάνω σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και όλων των άλλων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων πρόσδεσης.

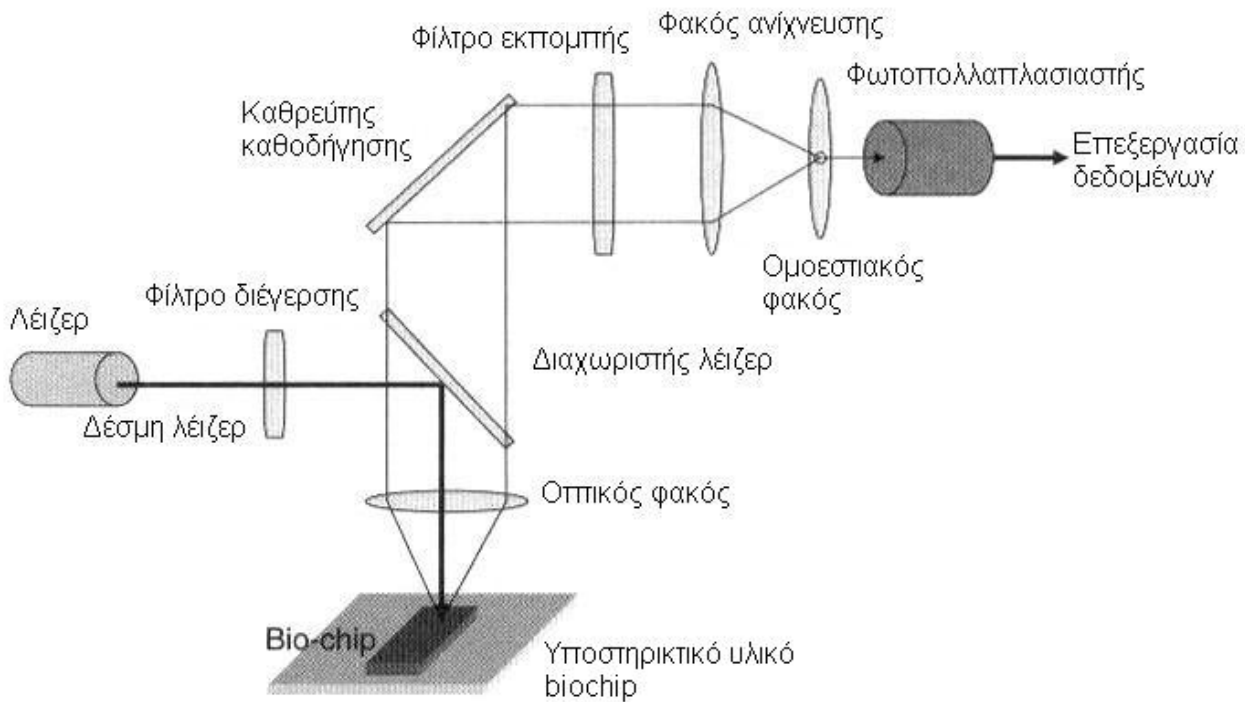
Αν και οι πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούν παρόμοιες μεθόδους ανίχνευσης με αυτές των μικροσυστοιχιών DNA, το πρόβλημα είναι ότι οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης σ' ένα βιολογικό δείγμα μπορεί να είναι κατά πολλές τάξεις μεγέθους διαφορετικές από αυτές των mRNAs. Επομένως, οι μέθοδοι ανίχνευσης των πρωτεϊνικών chips πρέπει να έχουν πολύ μεγαλύτερο εύρος ανίχνευσης.

Η προτιμώμενη μέθοδος ανίχνευσης σήμερα είναι η ανίχνευση φθορισμού. Η μέθοδος αυτή είναι ασφαλής, ευαίσθητη και μπορεί να έχει υψηλή ανάλυση. Είναι συμβατή με τους συνήθεις σαρωτές των μικροσυστοιχιών, αν και μπορεί να χρειαστούν κάποιες μικρές αλλαγές στο λογισμικό. Παρακάτω θα αναλυθούν περισσότερες μέθοδοι και θα παρατεθούν τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους.

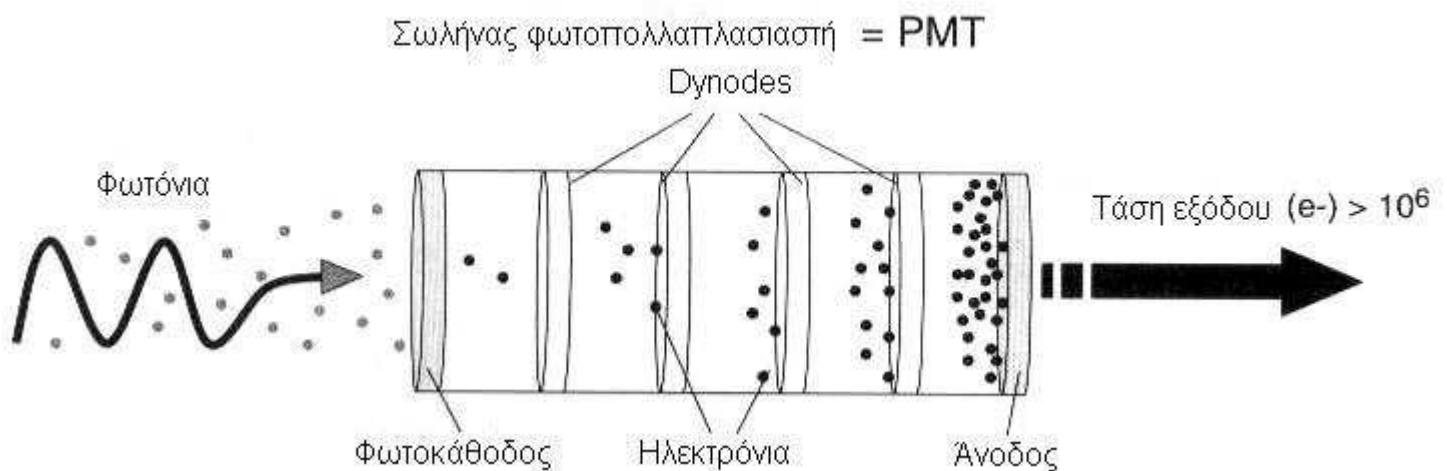
Με τις εφαρμογές μικροσυστοιχιών η επαλήθευση μιας συγκεκριμένης πρόσδεσης ανάμεσα σε συζευγμένα μόρια και αλληλεπιδρόντα συνήθως λαμβάνει χώρα με τη μέτρηση των εντάσεων φθορισμού. Κατά κανόνα τα μόρια φθορισμού συνδέονται με τα ελεύθερα προσδέματα έτσι ώστε να εντοπιστεί ένα συγκεκριμένο σήμα φθορισμού μετά την αλληλεπίδραση των δύο αλληλεπιδρόντων μερών. Το σήμα φθορισμού δημιουργείται και τελικά μετριέται με έναν σαρωτή και μετατρέπεται σε ψηφιακή μορφή. Για την κατανόηση του μηχανισμού αυτού απαιτούνται γνώσεις ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, όπως και του διαγράμματος ενός ανιχνευτή.

Ένας ανιχνευτής μικροσυστοιχιών πρέπει να έχει πολύ υψηλή ανάλυση και οι θέσεις με απόσταση κέντρων μόλις λίγα μικρόμετρα πρέπει να μετρηθούν και να διαφοροποιηθούν η μία από την άλλη σε σχέση με την ένταση φθορισμού τους. Μετά τη μέτρηση, τα δεδομένα πρέπει να ψηφιοποιηθούν και να γίνουν διαθέσιμα σε κατάλληλη μορφή φωτογραφίας.[21][22]  
Ο τρόπος λειτουργίας ενός συστήματος μικροσυστοιχιών λέιζερ φαίνεται στις εικόνες 5 και 6.





Εικόνα 5. Τυπικό σχέδιο ενός συστήματος λείζερ μικροσυστοιχίας. Μια δέσμη φωτός οδηγείται από την πηγή του λείζερ μέσα από διάφορα φίλτρα, φακούς και καθρέφτες πάνω στην μικροσυστοιχία. Μετά την εκπομπή της φοριζουσας ομάδας το φωτεινό σήμα μεγάλου μήκους κύματος οδηγείται μέσω φίλτρου, καθρέφτη και φακών μέσα σε έναν φωτοπολλαπλασιαστή. Εκεί ενισχύεται και τελικά μετατρέπεται σε ψηφιακή πληροφορία.



Εικόνα 6. Ο σωλήνας του φωτοπολλαπλασιαστή (PMT). Τα πρωτόνια προσπίπτουν στην φωτοκάθοδο κι έτσι προκαλούν την αποφόρτιση των φωτοηλεκτρονίων, τα οποία, λόγω του ηλεκτρικού πεδίου μέσα στον PMT, πετούν προς την κατεύθυνση της άνοδου και προσπίπτουν σε άλλα ηλεκτρόδια (dynodes). Τότε απελευθερώνονται περισσότερα ηλεκτρόνια, ώστε να παραχθεί μια εκθετική ενίσχυση των ηλεκτρονίων. Έτσι ένα αναλογικό σήμα με αυξημένη τάση εξόδου ( $e^-$ ) εκπέμπεται από την άνοδο.

## ΤΟ ΙΔΑΝΙΚΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ CHIP

Τα τελευταία χρόνια οι μικροσυστοιχίες έχουν εξελιχθεί σε πολύτιμο εργαλείο έρευνας για τους επιστήμονες και η χρήση τους στην διαγνωστική είναι πολλά υποσχόμενη για την ιατρική. Οι μικροσυστοιχίες αποτελούνται από ακινητοποιημένα βιομόρια, απευθυνόμενα στον χώρο σε υποστρώματα όπως επίπεδες επιφάνειες (συνήθως επικαλυμμένες γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες), μικροπηγάδια ή συστοιχίες σφαιριδίων. Τα ακινητοποιημένα βιομόρια, αναφερόμενα και ως ανιχνευτές, συνήθως περιλαμβάνουν ολιγονουκλεοτίδια, προϊόντα PCR, πρωτεΐνες, πεπτιδία, υδατάνθρακες και άλλα μικρά μόρια. Στην ιδανική περίπτωση, οι ανιχνευτές θα πρέπει να διατηρούν τη δραστηρότητά τους, να παραμένουν σταθεροί και να μην εκροφούν κατά τη διάρκεια των πειραματικών σταδίων. Η συλλογή των διευθετημένων (σε συστοιχίες) μορίων πάνω στο υπόστρωμα, στη συνέχεια ανιχνεύεται με εκχυλίσματα κυττάρων, ορρό, προϊόντα PCR ή άλλα δείγματα εις αναζήτηση γεγονότων μοριακής αναγνώρισης. Η ελάχιστη μη ειδική πρόσδεση βιομορίων στην επιφάνεια είναι συνεπώς ένα από τα πιο σημαντικά κριτήρια για υψηλής ποιότητας πειράματα μικροσυστοιχιών.[11]

Το ιδανικό πρωτεϊνικό biochip προσδένει τα πεπτιδία-στόχους ή τις πρωτεΐνες στην απαραίτητη στερεοχημική κλίση και όπως προαναφέρθηκε ελαχιστοποιεί ή εμποδίζει την αποδιάταξη της πρωτεΐνης, ώστε να διατηρηθεί η φυσική διαμόρφωση. Η πιο απλή λύση είναι ένας ομοιοπολικός δεσμός επίτοπων ειδικών αντισωμάτων πάνω σ' ένα πρωτεϊνικό chip, ο οποίος επιτρέπει μια υψηλής συγγένειας, ειδική και στοχευμένη πρόσδεση της πρωτεΐνης-στόχου. Ο επίτοπος του αντισώματος πρέπει να επιλέγεται με τέτοιο τρόπο, ώστε η προς πρόσδεση πρωτεΐνη να είναι τοποθετημένη στον σωστό προσανατολισμό ως προς τη μήτρα του biochip, για να μπορεί να γίνει εξαναγκασμένη βέλτιστη πρόσδεση με ένα άλλο πρόσδεμα. Εάν π.χ. χρησιμοποιούνται ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες για την παραγωγή πρωτεϊνικών chips συνιστάται να σημαίνονται οι συγγένειες των πρωτεϊνών.

Προκειμένου να διατηρήσουμε τα πρωτεϊνικά διαλύματα σταθερά για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα, οι αναστολείς πρωτεάσης, τα μετατοπισμένα ρυθμιστικά διαλύματα γλυκερίνης (50%) και χαμηλές θερμοκρασίες (4 - 8 °C) , τα οποία χρησιμοποιούνται κατά τον χειρισμό, πρέπει να διατηρηθούν. Το ίδιο ισχύει και για τις μικροσυστοιχίες, όπου η συγκέντρωση της γλυκερίνης πρέπει να περιορίζεται σ' ένα μέγιστο 40%. Αυτό γίνεται γιατί ένα υπερβολικά υψηλό ιξώδες μπορεί να επηρεάσει αρνητικά μια επαρκή και ισομερή κατανομή θέσεων. Όταν οι προς ανίχνευση πρωτεΐνες εφαρμοστούν στην επιφάνεια του biochip, το περιβάλλον γύρω από την πρωτεΐνη αλλάζει αισθητά. Η ηλεκτροστατική ή ομοιοπολική πρόσδεση στην επιφάνεια του biochip μπορεί να προκαλέσει αλλαγή στην φυσική διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Αρκετά συχνά οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται αυθόρμητα και χάνουν τελείως τη βιολογική τους δραστηρότητα. Δυστυχώς, το ποιες πρωτεΐνες επηρεάζει αυτό δεν μπορεί να προβλεφθεί. Γι' αυτό το λόγο πρέπει να υπάρχουν θετικοί μάρτυρες κατά τη διάρκεια του πειράματος μικροσυστοιχίας, όπως η επαλήθευση της διαμόρφωσης της φυσικής πρωτεΐνης μέσω

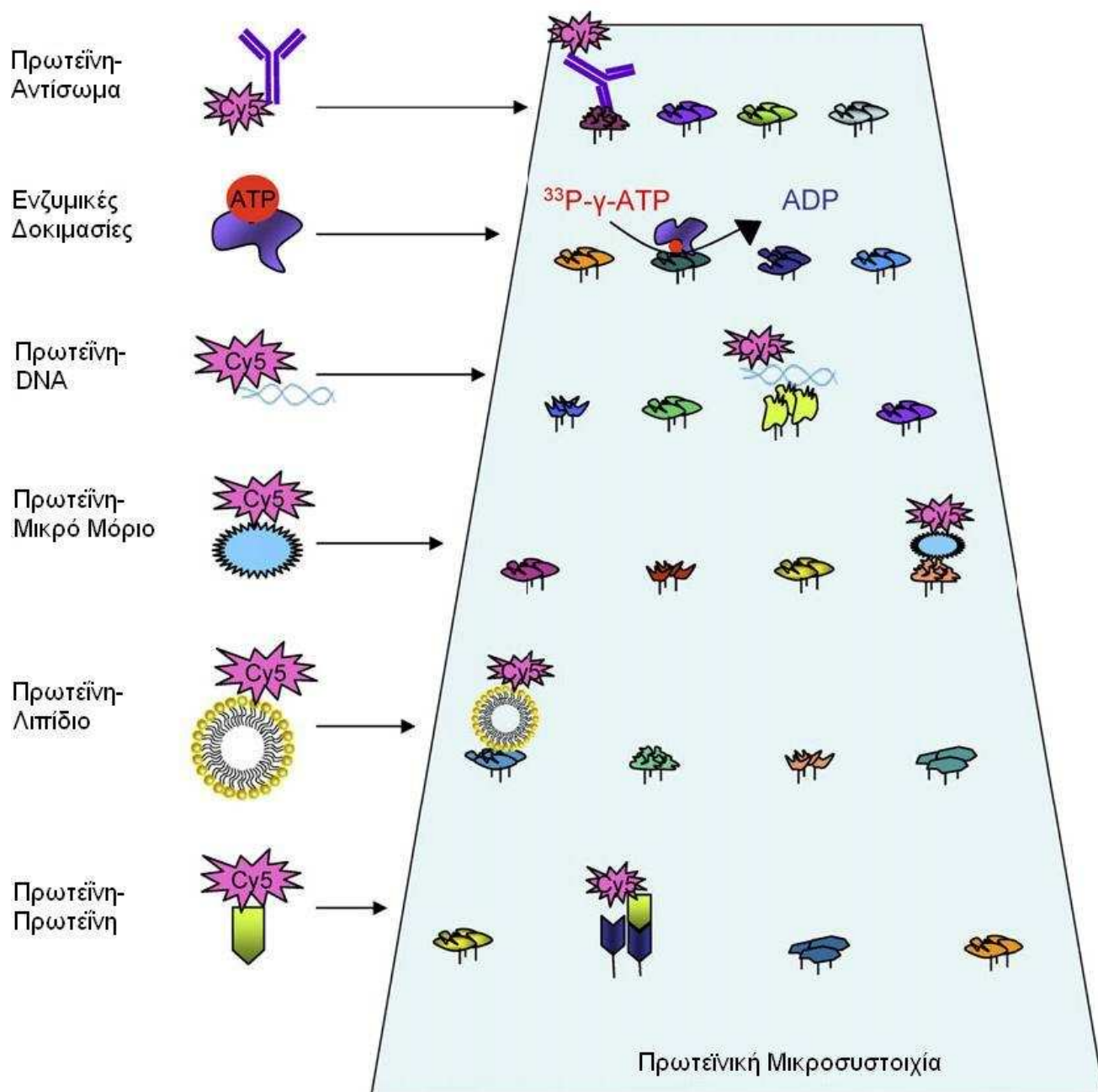
ειδικών αντισωμάτων ή επαληθεύσιμων ενζυμικών δοκιμασιών μέσω της δεσμευμένης πρωτεΐνης.[21]

Πέρα από τη διατήρηση των πρωτεϊνών σε ενεργό κατάσταση, είναι σημαντικό τα πρωτεϊνικά chips να τις διατηρούν σε μεγάλες πυκνότητες, να είναι συμβατά με τους πιο εμπορικούς μηχανισμούς στοίχισης και σαρωτές και να μπορούν να τυπώνονται με τέτοιο τρόπο ώστε οι πρωτεΐνες να παραμένουν σε υγρό περιβάλλον.[2]

Οι προκλήσεις για τη δημιουργία μιας μικροσυστοιχίας πρωτεώματος περιλαμβάνουν όχι μόνο τη δημιουργία της απαραίτητης βιβλιοθήκης υπερέκφρασης, αλλά και η ανάπτυξη μιας έκφρασης υψηλής ρυθμοαπόδοσης και πρωτοκόλλου καθαρισμού απαραίτητου για την παραγωγή χιλιάδων καθαρών, λειτουργικών πρωτεϊνών που να μπορούν να καθηλωθούν πάνω σε μια στερεή επιφάνεια.

Μια πρωτεϊνική μικροσυστοιχία είναι μόνο τόσο χρήσιμη όσο η ποιότητα των πρωτεϊνών που είναι διατεταγμένες πάνω στο chip. Η παραγωγή των πρωτεϊνών σε ομόλογα συστήματα αναμένεται να βελτιώσει πολύ την ποιότητα των πρωτεϊνών και να τις παράγει σε ενεργή κατάσταση. Επειδή η λειτουργία πολλών αν όχι των περισσοτέρων πρωτεϊνών δεν είναι γνωστή, είναι αδύνατο να καθορίσουμε εντελώς αν η κάθε πρωτεΐνη πάνω στη συστοιχία είναι ενεργή και λειτουργική. Είναι ωστόσο πιθανό για μια μεγάλη πλειοψηφία των πρωτεϊνών πάνω σε πρωτεωμικά chips ζυμομυκήτων τουλάχιστον κάποιο υλικό να είναι λειτουργικό, γιατί ένας αριθμός επιτυχημένων βιοχημικών δραστηριοτήτων έχει επιβεβαιωθεί και ανακαλυφθεί με την χρήση πρωτεωμικών chips. Αυτές οι βιοχημικές δραστηριότητες περιλαμβάνουν μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, πρωτεϊνών-φωσφολιπιδίων, πρωτεϊνών-DNA και πρωτεϊνών-μικρών μορίων, όπως και ενζυμικών αντιδράσεων (εικόνα 7). Είναι πιθανό η θέση των ετικετών συγγένειας που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό να επεμβαίνει στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών.

Πρόσφατα περιγράφηκε μια μέθοδος για την απευθείας παραγωγή των πρωτεϊνών πάνω στα chips. Το DNA τοποθετείται πάνω σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα και υποβάλλεται σε ένα σύστημα *in vitro* μεταγραφής και μετάφρασης. Αυτή η μέθοδος είναι πλεονεκτική επειδή παράγει πρωτεΐνη απευθείας πάνω στην πλάκα χωρίς αυτή να απαιτεί καθαρισμό και επειδή οι πρωτεΐνες δε χρειάζονται αποθήκευση.[1]



Εικόνα 7. Εφαρμογές λειτουργικών πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών. Ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα των διαφορετικών δοκιμασιών που έχουν πραγματοποιηθεί στις λειτουργικές πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες. Οι πρωτεΐνες ακινητοποιούνται με μεγάλη πυκνότητα πάνω σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα και η πλάκα μπορεί να ανιχνευτεί για ποικίλες αλληλεπιδράσεις. Αν και εδώ η ομάδα-φορέας φθορισμού που φαίνεται είναι η Cy5, πολλές άλλες ομάδες-φορείς φθορισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανίχνευση.

## ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ-ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται συνήθως με δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-EG) λαμβανομένου υπόψη του φορτίου και του μεγέθους της πρωτεΐνης. Αρχικά οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ορθογώνια, με βάση το μοριακό τους βάρος, με χρήση ισοηλεκτρικής εστίασης και στη συνέχεια διαχωρίζονται με έκπλυση από την πηκτή, αναλύονται με ιονισμό σε ένα φασματόμετρο μάζας και η σύνθεση των αμινοξέων προσδιορίζεται διαμέσω των προτύπων. Με τη βοήθεια της τεχνολογίας της βιο-πληροφορίας είναι δυνατό να χαρακτηριστεί πιο λεπτομερειακά η πρωτεΐνη που ανακαλύψαμε. Ωστόσο οι στατιστικές πληροφορίες δεν περιγράφουν επαρκώς τις λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών. Γι' αυτό το επόμενο βήμα είναι η ανάλυση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών, όπου οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες μπορούν να εξεταστούν πιο λεπτομερειακά και οι έως τώρα άγνωστες λειτουργίες τους μπορούν να αποσαφηνιστούν. Για να γίνει το βήμα αυτό είναι απαραίτητο να είναι διαθέσιμο ένα λειτουργικό πρωτότυπο. Προκειμένου να απλοποιηθεί το πρόβλημα παραγωγής του πρωτεϊνικού chip, θα επιτρέψουμε την υπόθεση ότι μόνο μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη από ένα συγκεκριμένο κύτταρο πρέπει να απομονωθεί. Πρώτα πρέπει να επιλέξουμε το υλικό και εάν είναι απαραίτητο να το απομονώσουμε και να το καθαρίσουμε εκ των προτέρων. Οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στα στάδια καθαρισμού (εικόνα 8) εξαρτώνται πολύ από τις βιοχημικές ιδιότητες της προς απομόνωση πρωτεΐνης.

Ο καθαρισμός των ενζύμων είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος. Συχνά μια πρωτεΐνη καθαρίζεται πλήρως και ανακαλύπτουμε ότι η ενζυμική δραστηριότητα έχει χαθεί. Κάθε πρωτεΐνη έχει τις ιδιαιτερότητές της και συνεπώς ο καθαρισμός μπορεί να είναι από πολύ απλός μέχρι αδύνατος. Οι υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της διάσπασης και διαλυτοποίησης των μεμβρανικών πρωτεϊνών, η χρήση απορρυπαντικών, οργανικών μέσων αραίωσης ή όξινων ή βασικών ρυθμιστικών διαλυμάτων ή και συχνό πάγωμα/ξεπάγωμα μπορούν να συντελέσουν σε ορισμένη απώλεια της φυσικής διαμόρφωσης και κατά συνέπεια της βιολογικής λειτουργίας της πρωτεΐνης. Δυστυχώς η φυσική διαμόρφωση της πρωτεΐνης σπάνια μπορεί να αποκατασταθεί με μεθόδους επαναφοράς.

Ο καθαρισμός κάθε ενζύμου συμβιβάζει μια διαδικασία σταδίων καθαρισμού. Όλα τους καταναλώνουν χρόνο και χρήμα. Κάθε στάδιο καθαρισμού προκαλεί μια ελάχιστη ή και ουσιαστική απώλεια της ολικής δραστηριότητας. Όλες οι βιοχημικές δραστηριότητες της πρωτεΐνης πρέπει να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να καταφέρουμε έναν επαρκή και ταχύ καθαρισμό. Μεταξύ των συγκεκριμένων ιδιοτήτων των πρωτεϊνών είναι η διαλυτότητα, το μέγεθος της πρωτεΐνης, η υδροφοβικότητα της επιφάνειας, το φορτίο της πρωτεΐνης και η ειδική εναλλασσόμενη δύναμη αλληλεπίδρασης με άλλα μόρια. Ο συνδυασμός των μεμονωμένων βημάτων καθαρισμού πρέπει να είναι καλά συντονισμένος ώστε να μην επέλθει περαιτέρω διαπίδυση και παρεμπόδιση των διαδικασιών, καθώς αυτές σημαίνουν απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας. Το σε τι βαθμό πρέπει να υπάρχει η καθαρισμένη πρωτεΐνη

μέσα σ' ένα ομογενές διάλυμα εξαρτάται πολύ από το πρόβλημα που καλείται να λύσει το πείραμα. Μία μόνο ζώνη σε μία SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρώση Coomassie (SDS-PAGE) αρκεί για κάποια πειράματα, ενώ άλλες εφαρμογές απαιτούν μια πολύ καθαρή πρωτεΐνη. Εκτός από τον καθαρισμό των αρχικών πρωτεϊνών από τα αντίστοιχα κύτταρα ή ιστούς, πολλές πρωτεΐνες μπορούν να συντεθούν ανασυνδυασμένα, μέσω ποικίλων συστημάτων έκφρασης.[21]



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση μιας διαδικασίας καθαρισμού πρωτεΐνης. Αρχίζοντας με μια βασική γλυκοζυλιωμένη και φωσφορυλιωμένη μη μεμβρανικά σχετιζόμενη 50-kDa πρωτεΐνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι εικονιζόμενες διαδικασίες καθαρισμού. Κάθε στάδιο χρωματογραφίας στήλης θα μπορούσε να ακολουθηθεί από διαπίδωση ή συμπύκνωση. Γενικά αυτό θα προκαλέσει μια απώλεια στις προς καθαρισμό πρωτεΐνες, σε τέτοιο βαθμό ώστε μετά την όλη διαδικασία καθαρισμού θα έχει απομείνει μόνο 10% του αρχικού υλικού.

## ΣΗΜΑΝΣΗ

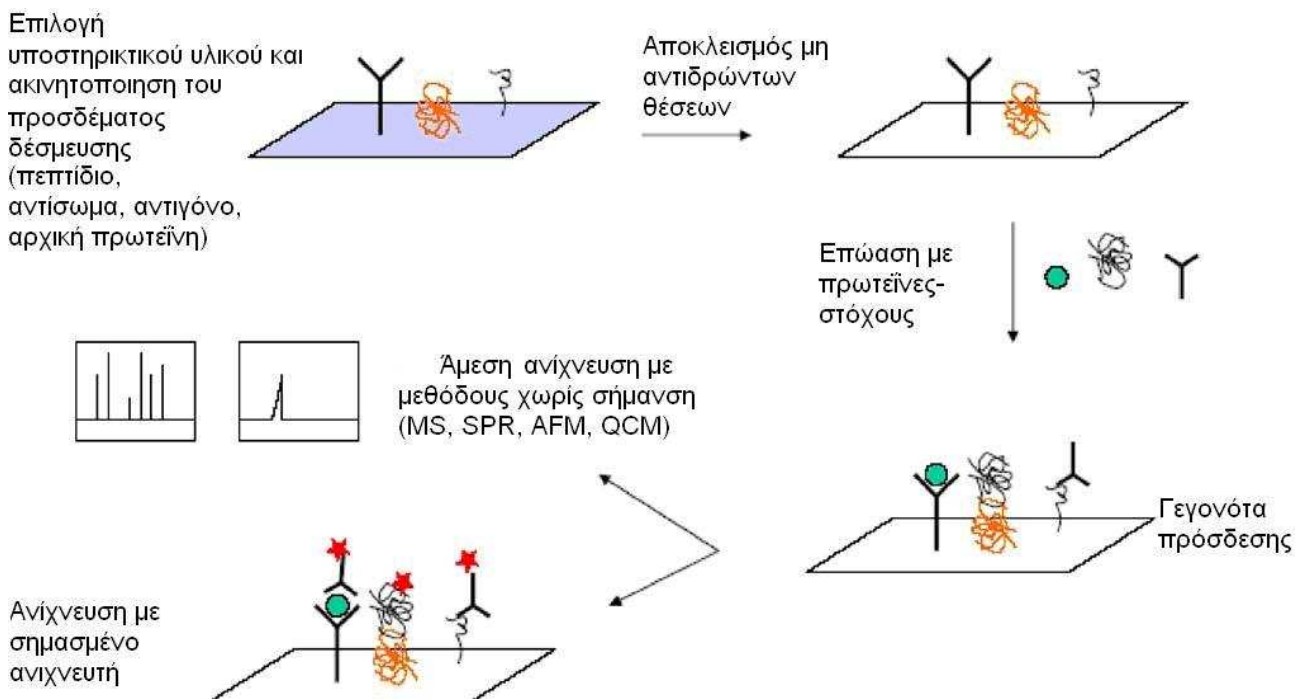
Επιφάνειες με ετικέτες συγγένειας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ομοιόμορφο προσανατολισμό των πρωτεϊνών πάνω στην επιφάνεια του chip. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών μακριά από την επιφάνεια του chip πρέπει να δίνει στα αντιδραστήρια ευκολότερη πρόσβαση στις ενεργές πλευρές των πρωτεϊνών. Επιπλέον, για να ανιχνευτούν οι δραστικές πρωτεΐνες σε ένα πρωτεωμικό chip, σημαίνονται μικρά μόρια-ανιχνευτές με ετικέτες φθορισμού, συγγένειας, φωτοχημικές ή ραδιοϊσότοπων. Οι σημάνσεις φθορισμού γενικά προτιμώνται, καθώς είναι ασφαλείς και αποτελεσματικές και είναι συμβατές με τους διαθέσιμους λείζερ σαρωτές μικροσυστοιχιών.

Ανεξάρτητα όμως από τον τύπο της χρησιμοποιούμενης σήμανσης, υπάρχουν προβλήματα σχετικά με τη σήμανση των μορίων που χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές σε ένα πρωτεωμικό chip. Το σημαντικότερο από αυτά τα προβλήματα είναι η πιθανότητα να παρέμβει η ίδια η σήμανση στην ικανότητα του ανιχνευτή να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη-στόχο και να αλλάξει κατά πολύ τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, αντιδράσεις που μετατρέπουν θετικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες λυσίνης σε αμίδια θα μπορούσαν να έχουν ως αποτέλεσμα σημαντική αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, έχει πρόσφατα αναπτυχθεί και ένας αριθμός από μεθόδους ανίχνευσης χωρίς σήμανση.

Η σημερινή κύρια τεχνολογία για ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων χωρίς σήμανση είναι ο συντονισμός επιφάνειας πλασμονίου (SPR), που ανιχνεύει τον τοπικό δείκτη διάθλασης. Άλλες επιλογές περιλαμβάνουν νανοσωλήνες άνθρακα, νανοςύρματα άνθρακα και μικροηλεκτρονικά συστήματα προβόλων. Αν και αυτές οι τεχνολογίες δεν είναι κατάλληλες για ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων υψηλής ρυθμοαπόδοσης, είναι πολλά υποσχόμενες.[1]

## ΕΙΔΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

Ένα γενικό σχέδιο ενός τυπικού πειράματος πρωτεϊνικής συστοιχίας παρέχεται στην εικόνα 9 : ένα μεγάλο σύνολο από προσδέματα δέσμησης (πρωτεΐνες ή πεπτιδία) διατάσσεται πάνω σε ένα στερεό υποστηρικτικό υλικό, μετά την έκπλυση και τον αποκλεισμό των μη αντιδρώντων θέσεων της επιφάνειας, η συστοιχία ανιχνεύεται με ένα δείγμα που (εκτός από μια ποικιλία μη σχετιζόμενων μορίων) περιλαμβάνει τις υπό μελέτη ενώσεις που συμμετέχουν στη μοριακή αναγνώριση. Εάν γίνει μια αλληλεπίδραση, ένα σήμα αναφαίνεται πάνω στην επιφάνεια (με μια ποικιλία τεχνικών ανίχνευσης). Σαρώνοντας ολόκληρη τη συστοιχία ένας μεγάλος αριθμός διαδικασιών πρόσδεσης ανιχνεύονται παράλληλα.



Εικόνα 9. Γενικό σχέδιο ενός τυπικού πειράματος πρωτεϊνικής μικροσυστοιχίας. Ένα σύνολο από προσδέματα δέσμησης (πρωτεΐνες, αντισώματα, πεπτιδία) διατάσσεται πάνω σε ένα κατάλληλο στερεό υποστηρικτικό υλικό. Μετά τον αποκλεισμό των μη αντιδρώντων θέσεων η συστοιχία ανιχνεύεται με επώαση με ένα δείγμα που περιέχει τα μόρια-στόχους. Εάν προκύψει συμβάν μοριακής αναγνώρισης, ένα σήμα αναφαίνεται είτε με απευθείας ανίχνευση είτε με έναν σημασμένο ανιχνευτή. MS : φασματοσκοπία μάζης, SPR : συντονισμός επιφάνειας πλασμονίου, AFM : μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων, QCM (Quartz crystal microbalance) : μικροίσοροπία κρυστάλλου χαλαζία. Οι παραπάνω μέθοδοι ανίχνευσης αναλύονται παρακάτω.



Οι πρωτεϊνικές συστοιχίες συνήθως εμπίπτουν σε τρεις κατηγορίες :

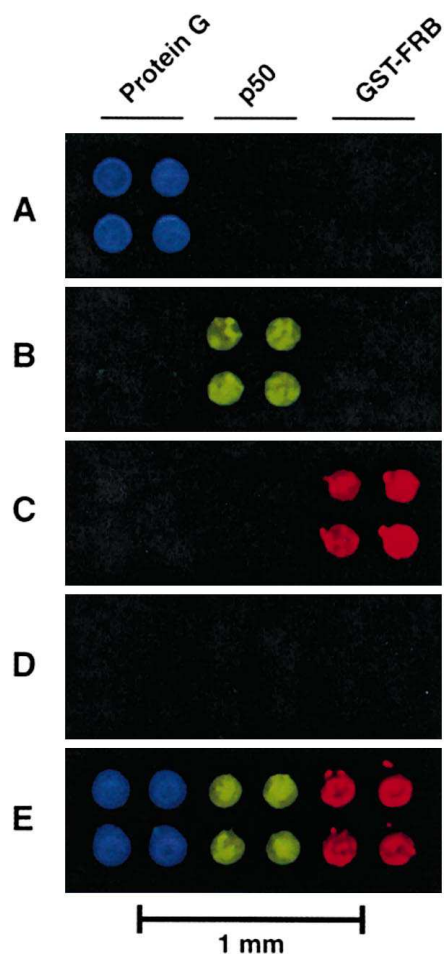
1. συστοιχίες πρωτεϊνικής λειτουργίας (λειτουργικές)
2. συστοιχίες πρωτεϊνικής ανίχνευσης (ή αναλυτικές συστοιχίες)
3. συστοιχίες ανάστροφης φάσης

1. Στις συστοιχίες πρωτεϊνικής λειτουργίας (που γενικά στοχεύουν στην ανακάλυψη της πρωτεϊνικής λειτουργίας στην θεμελιώδη έρευνα) ένα μεγάλο σύνολο (χιλιάδων) καθαρισμένων φυσικών πρωτεϊνών ή πεπτιδίων ή ακόμα κι ένα ολόκληρο πρωτέωμα εναποτίθεται και ακινητοποιείται με έναν καθορισμένο τρόπο. Η κάθε πρωτεΐνη καταλαμβάνει μία καθορισμένη θέση πάνω στο chip. Η συστοιχία χρησιμοποιείται τότε για παράλληλη εξέταση ενός εύρους βιοχημικών αλληλεπιδράσεων (π.χ. των δραστηριοτήτων των φυσικών πρωτεϊνών) σ' ένα μόνο πείραμα. Οι συστοιχίες πρωτεϊνικής λειτουργίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη της επίδρασης των υποστρωμάτων ή των αναστολέων ενζυμικών δραστηριοτήτων, των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, πρωτεΐνης-DNA, πρωτεΐνης-RNA, πρωτεΐνης-φωσφολιπιδίων, πρωτεΐνης-μικρών μορίων, πρωτεΐνης-φαρμάκου ή ορμόνης-τελεστή ή για τη μελέτη χαρτογράφησης επιτόπων. Οι λειτουργικές πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες διαφέρουν από τις αναλυτικές στο ότι οι πρώτες συντίθενται από μικροσυστοιχίες που περιέχουν πλήρες μήκος λειτουργικών πρωτεϊνών ή περιοχές πρωτεϊνών.

Η κατασκευή και χρήση των συστοιχιών πρωτεϊνικής λειτουργίας αποτελεί ένα πολύ πιο απλό πρόβλημα από την ανάπτυξη πρακτικά χρήσιμων συστοιχιών ανίχνευσης πρωτεϊνών. Πράγματι, σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στο παραπάνω πεδίο. Μελετητές έχουν περιγράψει τις χημικές διαδικασίες της ακινητοποίησης και την απαραίτητη ρομποτική για τη δημιουργία συστοιχιών πρωτεϊνικής λειτουργίας μεγάλης πυκνότητας. Επίσης έχουν αναφερθεί πειράματα-μοντέλα που δείχνουν ότι αυτές οι συστοιχίες θα ήταν πράγματι χρήσιμες για κάποιους τύπους πειραμάτων πρόσδεσης (εικόνα 10).

Το κύριο ζητούμενο για να περάσουμε από την επίδειξη επιτευξιμότητας σε πραγματικές μικροσυστοιχίες λειτουργίας πρωτεϊνών θα είναι η παραγωγή χιλιάδων πρωτεϊνών που θα τοποθετηθούν πάνω στην πλάκα. Εφόσον απαιτούνται μόνο μικρές ποσότητες πρωτεϊνών, το πιο πιθανό είναι ότι θα χρησιμοποιηθούν γι' αυτόν τον σκοπό μέθοδοι μεταγραφής/μετάφρασης *in vitro*. Κάποιες μεγάλες συλλογές διατεταγμένων κλώνων είναι εμπορικά διαθέσιμες. Ο λόγος για τον οποίο οι συστοιχίες πρωτεϊνικής λειτουργίας είναι πολύ πιο απλές από τις συστοιχίες πρωτεϊνικής ανίχνευσης είναι ότι είναι εμφανές το τι θα τοποθετηθεί στην πλάκα. Ο άλλος λόγος είναι το ότι τουλάχιστον για εφαρμογές της πρώτης γενιάς των συστοιχιών πρωτεϊνικής λειτουργίας χρησιμοποιείται μόνο ένας μικρός αριθμός διαλυτών αναλυόμενων ουσιών. Οι ουσίες αυτές μπορούν να σημανθούν

συνθετικά, επιτρέποντας εύκολα ορατή εμφάνιση των θέσεων του chip στις οποίες προσδένονται. Στην περίπτωση των συστοιχιών πρωτεϊνικής ανίχνευσης δεν είναι εμφανές το τι θα τοποθετηθεί στην πλάκα και η φθορίζουσα σήμανση του κυτταρικού εκχυλίσματος, δείγματος αίματος κλπ μπορεί να μην αποτελεί την βέλτιστη προσέγγιση για την ορατή εμφάνιση της διαδικασίας της πρόσδεσης. Με λίγα λόγια, φαίνεται πιθανό ότι οι συστοιχίες πρωτεϊνικής λειτουργίας θα γίνουν ευρέως διαθέσιμες στο εγγύς μέλλον και θα καταλάβουν σημαντική θέση ανάμεσα στις τεχνικές για την ανάλυση μοριακών αλληλεπιδράσεων σε κλίμακα εύρους γονιδιώματος.



Εικόνα 10. Παράδειγμα προτύπου μικροσυστοιχίας πρωτεϊνικής λειτουργίας και της χρήσης του στην ανίχνευση αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Σε χημικά τροποποιημένη γυάλινη πλάκα τοποθετούνται πρωτεΐνη G (protein G), p50 και FKBP-περιοχή πρόσδεσης ραπαμυκίνης του FRAP (GST-FRB), σε τέσσερις θέσεις το καθένα. Η πλάκα ανιχνεύθηκε με ποικίλες πρωτεΐνες φθορίζουσας σήμανσης. (A) Πλάκα που ανιχνεύτηκε με BODIPY-FL-IgG, γνωστό για το ότι προσδένει την πρωτεΐνη G. (B) Πλάκα που ανιχνεύτηκε με Cy3 με σήμανση IκBa, γνωστό για το ότι προσδένει p50. (C) Πλάκα που ανιχνεύτηκε με Cy5 με σήμανση FKBP12, γνωστό για το ότι προσδένει FRB, παρουσία της ραπαμυκίνης. (D) Όμοια με (C), με τη διαφορά ότι η ραπαμυκίνη δεν ήταν παρούσα. (E) Πλάκα που ανιχνεύτηκε και με τις τρεις προαναφερθείσες πρωτεΐνες, παρουσία ραπαμυκίνης. Τα BODIPY-FL, Cy3 και Cy5 βάφτηκαν τεχνητά μπλε, πράσινο και κόκκινο αντίστοιχα.

2. Στις μικροσυστοιχίες πρωτεϊνικής ανίχνευσης, συνήθως αντί για τις ίδιες τις φυσικές πρωτεΐνες, μια συστοιχία αντιδραστηρίων συγγένειας υψηλής ειδικότητας σε κάθε πρωτεΐνη, ικανά να αναγνωρίζουν το πολυπεπτιδίο-στόχο τους σε σύνθετα βιολογικά διαλύματα, όπως ένα κυτταρικό εκχύλισμα (αντιγόνων ή αντισωμάτων), ακινητοποιείται πάνω σε ένα υποστηρικτικό υλικό και χρησιμοποιείται για να καθορίσει τις ποσότητες της πρωτεΐνης σε μια σύνθετη μεσοκυττάρια ουσία όπως ο ορός. Αυτός ο τύπος chip χρησιμεύει ως αναλυτικό εργαλείο κατά κάποιον τρόπο ανάλογο με τις μικροσυστοιχίες DNA με την έννοια ότι δύναται να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση των πρωτεϊνικών επιπέδων σε ένα δεδομένο βιολογικό δείγμα με έναν μαζικό παράλληλο τρόπο. Οι αναλυτικές συστοιχίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για δοκιμασίες προσδιορισμού αντισωμάτων, για διαγνώσεις αλλεργίας ή αυτοάνοσα νοσήματα ή για την εξέταση του προφίλ ενός περίπλοκου μίγματος πρωτεϊνών, προκειμένου να μετρηθούν συγγένειες πρόσδεσης, ειδικότητες και το επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεϊνών στο μίγμα σε μεγάλη κλίμακα. Σ' αυτήν την τεχνική, μία βιβλιοθήκη από αντισώματα, απταμερή και αφισώματα (affibodies) διατάσσονται πάνω σε μία γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα. Αυτοί οι τύποι μικροσυστοιχιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση διαφορικών προφίλ έκφρασης και για κλινική διαγνωστική. Παραδείγματα συμπεριλαμβάνουν προφίλ απόκρισης σε περιβαλλοντικό stress και υγιών έναντι ιστών από ασθενείς. Η δυναμική επίδραση των chips πρωτεϊνικής ανίχνευσης εκτείνεται πολύ πέρα από την βασική έρευνα. Φαίνεται πιθανό ότι αν αυτή η τεχνολογία περνούσε στην πράξη, θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση της ιατρικής διαγνωστικής του 21<sup>ου</sup> αιώνα. Δεδομένης της τεράστιας δυναμικής αγοράς για τέτοιες συσκευές, το βιομηχανικό ενδιαφέρον για τα chips ανίχνευσης πρωτεΐνης είναι πολύ υψηλό. Λόγω της συχνής χρήσης τους, οι μικροσυστοιχίες αντισωμάτων αναλύονται εκτενέστερα πιο κάτω.
3. Ένας τρίτος τύπος πρωτεϊνικής μικροσυστοιχίας, που σχετίζεται με τις αναλυτικές μικροσυστοιχίες είναι γνωστός ως πρωτεϊνική μικροσυστοιχία ανάστροφης φάσης (Reverse Phase Array, RPA). Στις μικροσυστοιχίες ανάστροφης φάσης, τα κύτταρα απομονώνονται από ποικίλους ιστούς που μας ενδιαφέρουν και υφίστανται λύση. Το κυτταρικό λύμα διατάσσεται πάνω σε πλάκα νιτροκυτταρίνης, με χρήση μικροστοιχητή ακίδας επαφής. Οι πλάκες στη συνέχεια ανιχνεύονται με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος και τα αντισώματα ανιχνεύονται συνήθως με δοκιμασίες χημειοφωταύγειας, φθορισμού ή χρωματομετρικές δοκιμασίες. Πεπτιδία αναφοράς τυπώνονται πάνω στις πλάκες για να μπορεί να γίνει η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών των δειγμάτων κυτταρικών λυμάτων. Οι μικροσυστοιχίες ανάστροφης φάσης επιτρέπουν και τον προσδιορισμό της παρουσίας τροποποιημένων πρωτεϊνών που μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της ασθένειας. Ειδικότερα, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, που συνήθως μεταβάλλονται ως αποτέλεσμα ασθένειας μπορούν να εντοπιστούν με τη χρήση

μικροσυστοιχιών ανάστοφης φάσης. Εφόσον καθοριστεί ποια πρωτεϊνική οδός μπορεί να είναι δυσλειτουργική στο κύτταρο, μπορεί να οριστεί μια συγκεκριμένη θεραπεία ώστε να στοχευτεί η δυσλειτουργική πρωτεϊνική οδός και να αντιμετωπιστεί η ασθένεια που μας ενδιαφέρει. [11] [1] [7]

### Μικροσυστοιχίες αντισωμάτων

Ο πιο κοινός τύπος αναλυτικών συστοιχιών πρωτεϊνών είναι οι μικροσυστοιχίες αντισωμάτων στις οποίες αντισώματα (ή μιμητές αντισωμάτων) που προσδένουν ειδικά αντιγόνα, διατάσσονται πάνω σε μία γυάλινη συνήθως πλάκα σε υψηλή πυκνότητα. Ένα κυτταρικό λύμα περνάει πάνω από τη συστοιχία και το προσδεμένο αντιγόνο ανιχνεύεται μετά από έκπλυση. Το ιδανικό, βασισμένο στην πρωτεωμική αναλυτικό εργαλείο θα αποτελούνταν από μία μικροσυστοιχία ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνικών προσδεμάτων υψηλής συγγένειας και υψηλής ειδικότητας, το καθένα για κάθε πρωτεΐνη του πρωτεώματος που μας ενδιαφέρει. Για τον άνθρωπο αυτό θα σήμαινε να απομονώσουμε καλής ποιότητας μονοκλωνικά αντισώματα της τάξεως των 100000 ή το ισοδύναμο. Στην πραγματικότητα ο αριθμός θα ήταν πολύ μεγαλύτερος, καθώς η ανίχνευση διαφορετικών μετα-μεταφραστικά τροποποιημένων τύπων μιας πρωτεΐνης είναι ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα του περάσματος από τις αναλυτικές τεχνικές των νουκλεϊκών οξέων σε τεχνικές βασισμένες στις πρωτεΐνες. Ας θεωρήσουμε ότι θα απαιτούνταν 1000000 προσδέματα υψηλής συγγένειας για να παρασκευαστεί η ιδανική μικροσυστοιχία πρωτεϊνικής ανίχνευσης. Θα ενδιαφερόταν κανείς να απομονώσει τόσα πολλά μονοκλωνικά αντισώματα; Φυσικά ο τομέας θα προχωρήσει με έναν προοδευτικό τρόπο και ένας λογικός μέσος στόχος θα ήταν να κατασκευαστούν συστοιχίες 1000 πρωτεϊνικών προσδεμάτων κατευθυνόμενων απευθείας έναντι των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν, για παράδειγμα σε μία συγκεκριμένη κατάσταση ασθένειας. Ωστόσο αυτοί οι αριθμοί κάνουν εμφανές το πρώτο πρόβλημα που πρέπει να επιλυθεί για να αναπτυχθούν σοβαρά οι μικροσυστοιχίες πρωτεϊνικής ανίχνευσης : η γρήγορη και επαρκής απομόνωση πρωτεϊνικών προσδεμάτων υψηλής συγγένειας και ειδικότητας. Αν και τα πρώτα chips πρωτεϊνικής ανίχνευσης θα βασίζονται σχεδόν σίγουρα σε μονοκλωνικά αντισώματα παραγόμενα με παραδοσιακά μέσα, αυτά θα είναι κυρίως για επίδειξη. Μακροπρόθεσμα είναι απλά μη πρακτικό να φτιαχτούν πολλές χιλιάδες μονοκλωνικών αντισωμάτων με τις συνηθισμένες τεχνικές παρασκευών πρωτεϊνών/ανοσοποίησης ζώων/τεχνικών υβριδισμού. Αυτό δε σημαίνει ότι τα αντισώματα δεν αποτελούν πολλά υποσχόμενους παράγοντες πρόσδεσης για χρήση στις συστοιχίες πρωτεϊνικής ανίχνευσης. Αντιθέτως, είναι σήμερα η μόνη κατηγορία μορίων που μπορούν γενικά να χρησιμεύσουν ως προσδέματα υψηλής ειδικότητας και συγγένειας σχεδόν για οποιαδήποτε πρωτεΐνη. Η μεγαλύτερη πρόκληση με αυτές τις μεθόδους είναι η επιλογή εναλλακτικών μεθόδων για την απομόνωση και την παραγωγή

αντιδραστηρίων που ταυτοποιούν την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει με αρκετά υψηλή ακρίβεια και με έναν τρόπο υψηλής ρυθμοαπόδοσης και κλιμακωτή αύξηση. Αν και τα αντισώματα είναι τα παραδοσιακά αντιδραστήρια επιλογής για την ανίχνευση πρωτεϊνών στα σύνθετα μείγματα, οι πολυκλωνικοί ορροί συχνά δεν είναι ειδικοί και είναι ακριβοί στην παραγωγή. Επίσης η συμβατική μέθοδος του υβριδιώματος για την παραγωγή λίαν ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι χρονοβόρα, επίπονη και δαπανηρή.

Μέχρι σήμερα οι περισσότερες μικροσυστοιχίες αντισωμάτων παράγονταν με κάποιες δεκάδες ή λίγες εκατοντάδες εμπορικά διαθέσιμων πολυ- ή μονο- κλωνικών αντισωμάτων. Αν και είναι διαθέσιμες εμπορικά δεκάδες χιλιάδες αντισωμάτων, αυτός ο αριθμός είναι ανεπαρκής επειδή για την πλειοψηφία των περισσότερων από εκατό χιλιάδων πρωτεϊνών που συνιστούν το ανθρώπινο πρωτέωμα δεν υπάρχουν διαθέσιμα αντισώματα. Το γεγονός ότι πολλά αντισώματα είναι γλυκοζυλιωμένα και περιέχουν μεγάλες υποστηρικτικές δομές βασισμένες στις πρωτεΐνες σημαίνει ότι συχνά παρουσιάζουν διασταυρωτή αντιδραστικότητα με περισσότερες από μία πρωτεΐνη-στόχο. Αυτό μπορεί να συμβάλει σε ένα μεγάλο αριθμό λανθασμένων θετικών αποτελεσμάτων. Έτσι άλλο ένα πρόβλημα είναι η απόκτηση αντισωμάτων υψηλής ειδικότητας. Οι πρωτεΐνες συχνά βρίσκονται σε ένα πολύ μεγάλο δυναμικό εύρος. Έτσι, αντιδραστήρια που θα μπορούσαν να έχουν υψηλή συγγένεια για μία πρωτεΐνη αλλά έχουν χαμηλή συγγένεια για μία άλλη, θα εξακολουθούν να ανιχνεύουν την πρωτεΐνη χαμηλής συγγένειας αν αυτή είναι η επικρατούσα. Μια ομάδα ερεύνησε την ικανότητα 115 καλά χαρακτηρισμένων ζευγών αντισώματος-αντιγόνου να αντιδρούν σε υψηλής πυκνότητας μικροσυστοιχίες πάνω σε τροποποιημένες γυάλινες πλάκες. Το 30% των ζευγών έδειξε τις αναμενόμενες γραμμικές σχέσεις δείχνοντας ότι ένα μέρος των αντισωμάτων ήταν κατάλληλα για ποσοτική ανάλυση. Έτσι, για να επιτραπεί η διεξαγωγή πειραματικών διαδικασιών όπως η ανίχνευση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, πολλές ομάδες χρησιμοποιούν δοκιμασίες σάντουιτς, όπου χρησιμοποιούνται επιπρόσθετα αντισώματα. Μια δοκιμασία σάντουιτς εκτελείται με εναπόθεση του πρώτου αντισώματος πάνω στη συστοιχία και στη συνέχεια ανίχνευση χρησιμοποιώντας ένα δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει ένα διαφορετικό τμήμα των πρωτεϊνών. Αυτή η προσέγγιση - που αναλύεται παρακάτω - αυξάνει δραματικά την ειδικότητα της ανίχνευσης του αντιγόνου, αλλά απαιτεί την ύπαρξη τουλάχιστον δύο υψηλής ποιότητας αντισωμάτων για το κάθε προς ανίχνευση αντιγόνο.

Επειδή όμως, όπως προαναφέρθηκε, η ανίχνευση πρωτεϊνών με αλληλεπιδράσεις αντισώματος-αντιγόνου χαρακτηρίζεται από ένα ευρύ φάσμα ειδικότητας και συγγένειας, είναι δύσκολο να αποκτήσουμε ένα μεγάλο σύνολο μορίων αντισωμάτων υψηλής ειδικότητας. Γι' αυτό οι περισσότερες συστοιχίες αντισωμάτων έχουν περιορισμένη χρήση και περιέχουν λίγους καλά καθορισμένους παράγοντες δέσμησης κατευθυνόμενους σε μια συγκεκριμένη τάξη πρωτεϊνικών δεικτών. [5] [6]

## Τεχνικές πλευρές της παραγωγής μικροσυστοιχιών αντισωμάτων

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, η δημιουργία των μικροσυστοιχιών αντισωμάτων είναι περιπλεγμένη με αρκετές κοινές βιοφυσικές και χημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών :

- Δεν υπάρχει απλή μέθοδος πρωτεϊνικής ενίσχυσης όπως η PCR για τα νουκλεϊκά οξέα.
- Οι πρωτεΐνες είναι χημικά και δομικά πολύ πιο σύνθετες και ετερογενείς από το mRNA και το DNA. Γι' αυτό είναι δύσκολο να καθοριστούν γενικές στρατηγικές ανίχνευσης και ακινητοποίησης που να μπορούν να εφαρμοστούν αδιακρίτως για όλες τις πρωτεΐνες.
- Σε αντίθεση με το DNA, οι πρωτεΐνες χάνουν εύκολα την βιοχημική τους δραστικότητα λόγω αποδιάταξης, αφυδάτωσης ή οξειδωσης. Επιπλέον, περισσότερες από 50% είναι αδιάλυτες ή δομικά ασταθείς.
- Η ανίχνευση των πρωτεϊνών με αλληλεπιδράσεις αντισώματος/αντιγόνου χαρακτηρίζεται από ένα ευρύ φάσμα ειδικότητας και συγγένειας. Επίσης, είναι δύσκολη η απόκτηση ενός μεγάλου συνόλου μορίων αντισωμάτων υψηλής ειδικότητας.

Παρά τις υποσχέσεις για έρευνα του πρωτεώματος με μικροσυστοιχίες αντισωμάτων, υπάρχουν λίγες σε βάθος μελέτες σχετικά μ' αυτές τις σημαντικές παραμέτρους. Η στόχευση μιας ταυτόχρονης ανάλυσης με τεχνικές μικροσυστοιχιών αντισωμάτων πολύ υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας μερικών χιλιάδων κυτταρικών πρωτεϊνών από βιολογικά δείγματα βρίσκεται ακόμα σε ένα αρχικό στάδιο ανάπτυξης. Πολυάριθμες τεχνικές δυσκολίες πρέπει να επιλυθούν και διαδικασίες πρέπει να βελτιωθούν για να καθιερωθούν οι πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες ως αξιόπιστο εργαλείο στην πρωτεωμική.

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες μικροσυστοιχίες αντισωμάτων παράγονταν με κάποιες δεκάδες ή λίγες εκατοντάδες εμπορικά διαθέσιμων πολυ- ή μονοκλωνικών αντισωμάτων. Ήδη από οικονομικής άποψης όμως, η δημιουργία τέτοιων μικροσυστοιχιών αντισωμάτων αποτελεί μια ακριβή προσπάθεια, η οποία χειροτερεύει λόγω του ότι επί του παρόντος, μόνο σχετικά μεγάλα ποσά αντισωμάτων διανέμονται από τους προμηθευτές, συνήθως μεταξύ 0,1 και 2 mg. Στην πράξη, μεταξύ 3000 και 4000 θέσεων μπορούσαν να παραχθούν από μόνο 8 μg αντισώματος. Συνεπώς, τα περισσότερα αντισώματα πάνε χαμένα. Στο μέλλον, οι προμηθευτές αντισωμάτων μπορεί να παρέχουν μεγάλες ομάδες αντισωμάτων, με μόνο μικρές ποσότητες κάθε μορίου, παρόμοια με την πρόσφατη τάση στις υπηρεσίες ολιγονουκλεοτιδίων.

Αν και κάποιες δεκάδες χιλιάδες αντισωμάτων είναι εμπορικά διαθέσιμες, αυτός ο αριθμός είναι ανεπαρκής, όχι μόνο γιατί για πολλές πρωτεΐνες δεν υπάρχουν διαθέσιμα αντισώματα αλλά κι επειδή ο αριθμός των μορίων-αισθητήρων που απαιτούνται για την ανάλυση είναι μεγαλύτερος από τον αριθμό όλων των αναλυόμενων ουσιών. Σε πολλές περιπτώσεις, υποδοχείς με διαφορετικές σταθερές διάστασης και ειδικοί σε διαφορετικούς επιτόπους χρειάζονται για κάθε πρωτεΐνη-στόχο. Επομένως, η μαζική παραγωγή αντισωμάτων με ελάχιστη διασταυρωτή αντιδραστικότητα παρουσιάζει ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα. Κλασικές στρατηγικές παραγωγής αντισωμάτων με ανοσοποίηση ζώων φαίνονται μη πρακτικές. Οι βιβλιοθήκες έκθεσης ανασυνδυασμένων αντισωμάτων είναι πιο πολλά υποσχόμενες. Αυτή η τεχνική βασίζεται σε άμεση σύζευξη του κάθε μορίου πρόσδεσης στον DNA κώδικά του.

Εις πολλαπλούν εξέταση βιβλιοθηκών φάγων έχει καταδειχθεί ως μέσο για υψηλότερη ρυθμοαπόδοση. Ακόμα κι έτσι όμως, η απαίτηση για βακτηριακά κύτταρα-ξενιστές περιορίζει την έκταση της πολυπλοκότητας της βιβλιοθήκης φάγων. Οι τεχνικές έκθεσης mRNA και ριβοσωμάτων ξεπερνούν αυτό το πρόβλημα, καθώς όλα τα στάδια, ενίσχυση, μεταγραφή, μετάφραση, επιλογή, καθαρισμός και η ωρίμανση της συγγένειας αντισωμάτων λαμβάνουν χώρα ολοσχερώς *in vitro*. Με την χρήση της τεχνικής ριβοσωματικής έκθεσης, κάποια τμήματα αντισωμάτων με συγγένειες στη χαμηλή picomolar περιοχή θα μπορούσαν να απομονωθούν. Επομένως οι δύο τελευταίες τεχνικές καθιστούν δυνατή την καθιέρωση μίας πολυπλοκότητας πέρα από αυτήν των βιβλιοθηκών φάγων. Επιπλέον, ο αυτοματισμός της διαδικασίας παραγωγής διευκολύνεται, γεγονός που αποτελεί ιδιαίτερο πλεονέκτημα για την μελλοντική επεξεργασία των αντισωμάτων. Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μέσο για την απομόνωση ειδικών αντισωμάτων είναι η επώαση μερικών κυττάρων ή τομών ιστών με βιβλιοθήκες έκθεσης. Ωστόσο, ένα εγγενές μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι μόνο προσδέματα έναντι περισσότερων πρωτεϊνών θα μπορούσαν να απομονωθούν μέχρι τώρα. Η εξέταση υψηλής ρυθμοαπόδοσης, βασισμένη στις *in vitro* τεχνικές δεν έχει αναπτυχθεί ακόμα τόσο εκτεταμένα όσο οι δοκιμασίες με το *in vivo* σύστημα έκθεσης φάγων.

Το 90% περίπου των πρωτεϊνών αποτελεί μόνο το 10% της συνολικής πρωτεϊνικής μάζας. Επιπλέον, πολλές σχετιζόμενες με ασθένειες πρωτεΐνες είναι παρούσες υπό τη μορφή λίγων μόνο μορίων ανά κύτταρο. Τα επίπεδα έκφρασης ποικίλουν μεταξύ 5 και 6 τάξεων μεγέθους σε διαφορετικά βιολογικά δείγματα. Για τον λόγο αυτό, η ευαισθησία των μικροσυστοιχιών αντισωμάτων θα έπρεπε να είναι τουλάχιστον στην περιοχή πικογραμμαρίου. Υπό την συνθήκη ότι ο ανοσοπροσδιορισμός δεν επηρεάζει την αρχική συγκέντρωση αναλυόμενης ουσίας, θεωρητικά προτείνεται ένα όριο ανίχνευσης μικροσυστοιχιών αντισωμάτων περίπου  $10^{-17}$ M. Μια τόσο υψηλή ευαισθησία όμως θα χρειαζόταν σχετικά μεγάλους όγκους δειγμάτων. Εκτός από την επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος και του όγκου του δείγματος θα

περίμενε κανείς τα αντισώματα χαμηλής ειδικότητας να επηρεάζουν το συνολικό αποτέλεσμα με πρόσδεση κάποιων αντιγόνων.

Αν και μία μικρή περιοχή θέσεων είναι γενικά πλεονεκτική, μείωση πέρα από κάποιο όριο μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ευαισθησία. Το όριο αυτό ορίζεται από τη μέθοδο ανίχνευσης και την αναλυτική της ικανότητα. Ο αριθμός των ξεχωριστών αποτελεσμάτων πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος ώστε να διαχωρίζεται το σήμα από την εσωτερική πειραματική μεταβλητότητα. Τα περισσότερα δημοσιευμένα συστήματα μικροσυστοιχιών αντισωμάτων αναφέρουν ένα όριο ανίχνευσης στην περιοχή του νανογραμμαρίου. Πιθανότατα η πιο συχνή προσέγγιση είναι η ανίχνευση του προσδεμένου στόχου με ένα δεύτερο σημασμένο μόριο δέσμευσης σε έναν προσδιορισμό τύπου σάντουιτς, όπως περιγράφεται παρακάτω. [8] [7]



## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ

Γενικά η μικροσυστοιχία ανίχνευσης πρωτεΐνης υποστηρίζεται από τρεις ξεχωριστές τεχνολογίες : χημεία των επιφανειών, που παρέχει ειδικά επεξεργασμένες επιφάνειες, ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης υψηλής ρυθμοαπόδοσης και παραγωγή λειτουργικών παραγόντων δέσμησης. Πρέπει να υπάρχει διασύνδεση μεταξύ αυτών των τεχνολογιών-κλειδιά για να δημιουργηθούν πολύτιμα συστήματα ανίχνευσης πρωτεϊνών. Η πρωτεϊνική μικροσυστοιχία συμπεριλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό παραγόντων δέσμησης που επιλεκτικά προσδένονται στις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν πάνω σε στερεές επιφάνειες. Στην τεχνολογία των πρωτεϊνικών chips υποψήφιοι για μόρια δέσμησης δεν είναι μόνο πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των αντισωμάτων, φυσικών και επεξεργασμένων πρωτεϊνών αλλά και απταμερή DNA/RNA, πεπτιδία και άλλα οργανικά μόρια. Συνεπώς, όταν αντισώματα καθλώνονται πάνω στη στερεή επιφάνεια, η μέθοδος θα έπρεπε να καλείται «μικροσυστοιχία αντισωμάτων» και με τον ίδιο τρόπο όταν πεπτιδία είναι παράγοντες δέσμησης, η τεχνολογία θα έπρεπε να καλείται «μικροσυστοιχία πεπτιδίων».

Οι μικροσυστοιχίες ανίχνευσης πρωτεϊνών μας επιτρέπουν κυρίως να εκτελούμε δύο είδη ανάλυσης, ανάλογα με τον σκοπό της πρωτεϊνικής ανίχνευσης (εικόνα 11). Ο ένας είναι ο προσδιορισμός του συνόλου των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν, σε σύνθετα πρωτεϊνικά μίγματα με πολύ ειδικούς παράγοντες δέσμησης για κάθε πρωτεΐνη -στόχο, για παράδειγμα μέσω αλληλεπιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος. Ο άλλος είναι η εξεύρεση των λειτουργιών των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν, συμπεριλαμβανομένων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-προσδέματος, ενζυμικών δραστηριοτήτων και ούτω καθεξής.

Σαν αποτέλεσμα της επίδρασης αυτής της αναδυόμενης τεχνολογίας στις πρωτεωμικές σπουδές, δεκάδες σημαντικών ανασκοπήσεων πάνω στις μικροσυστοιχίες ανίχνευσης πρωτεϊνών έχουν αναφερθεί τα τελευταία χρόνια. Αυτές οι ανασκοπήσεις περιγράφουν την ιδέα μιας τέτοιας τεχνολογίας μικροσυστοιχιών και εστιάζουν στην παραγωγή των μικροσυστοιχιών και την ανάπτυξη παραγόντων δέσμησης. Αν και η τεχνολογία μικροσυστοιχιών ανίχνευσης πρωτεϊνών θα είναι απαραίτητη στις μελέτες πρωτεωμικής, φαίνεται να είναι ακόμα στη μέση της πορείας προς τον τελικό προορισμό, όπου ένα μικροσκοπικό, ευρέως διαθέσιμο chip, που θα μας επιτρέψει σε επίπεδο ρουτίνας να λαμβάνουμε από χιλιάδες μέχρι δεκάδες χιλιάδες σημαντικών παραμέτρων σε ένα μόνο πείραμα. Επιπλέον, άρθρα ανασκοπήσεων που καλύπτουν μια ευρύτερη περιοχή, συμπεριλαμβανομένων όλων των θεμάτων χημείας των επιφανειών, μεθόδων ανίχνευσης και παραγόντων δέσμησης, σπάνια δημοσιεύονται, παρόλο που οι τρεις τεχνολογίες που φαίνεται να είναι ανεξάρτητες συνδέονται στενά μεταξύ τους. [4]

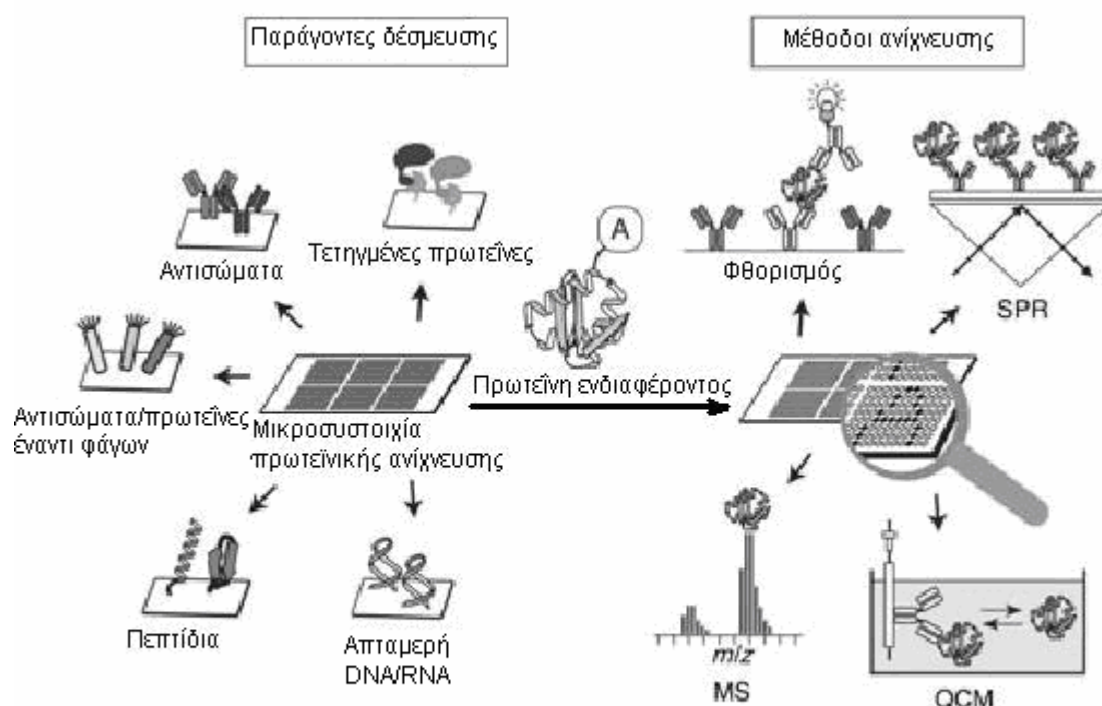


Εικόνα 11. Οι μικροσυστοιχίες ανίχνευσης πρωτεΐνης υποστηρίζονται από τρεις τεχνολογίες (χημεία των επιφανειών, μέθοδος ανίχνευσης και παράγων δέσμησης) που είναι ανεξάρτητες αλλά σχετίζονται μεταξύ τους. Αυτές οι μικροσυστοιχίες προσφέρουν κυρίως δύο τύπους ανάλυσης, ένας εκ των οποίων είναι το να μάθουμε την συνολική πρωτεΐνη σε σύνθετα μίγματα πρωτεϊνών ποικίλων βιολογικών δειγμάτων και ο άλλος το να μάθουμε τις πρωτεϊνικές λειτουργίες που περιλαμβάνουν μοριακή αναγνώριση και ενζυμικές δραστηριότητες. Αυτές οι μικροσυστοιχίες δύνανται να εφαρμοσθούν ως διαγνωστικά εργαλεία και σε βιολογικές μελέτες, όπως και για την μελέτη του προφίλ δικτύου πρωτεϊνών, ανακάλυψη φαρμάκων και επιβεβαίωση φαρμάκου-στόχου.

Σε αντίθεση με τις μικροσυστοιχίες DNA, για τις οποίες οι ανιχνευτές δέσμησης σχεδιάζονται και συντίθενται εύκολα, η επιλογή και η παραγωγή των παραγόντων δέσμησης αποτελούν τα πιο βασικά σημεία για τις μικροσυστοιχίες πρωτεϊνικής. Ένας παράγοντας πρωτεϊνικής δέσμησης πρέπει να είναι σε θέση να αναγνωρίσει τον στόχο του ανάμεσα σε 10.000 άλλα πρωτεϊνικά είδη σε ένα δείγμα και στη συνέχεια να τον διατηρήσει κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας. Επομένως, το πρόσδεμα δέσμησης πρέπει να είναι αυστηρά ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει και με μια συγγένεια επαρκή για να δεσμεύσει ακόμη και πρωτεΐνες πολύ χαμηλής συγκέντρωσης. Το άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό ενός παράγοντα πρωτεϊνικής δέσμησης είναι η σταθερότητά του. Αυτό το ζήτημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό για

τη ικανότητα να διατηρηθεί η δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της ακινητοποίησης πάνω στην επιφάνεια και για τα διάφορα στάδια της δοκιμασίας που μπορεί να απαιτήσουν αυστηρές συνθήκες για την απομάκρυνση των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Υπάρχει μια ευρεία ποικιλία προσδεμάτων δέσμησης που χρησιμοποιούνται στις πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες. Αντισώματα και τμήματά τους, αντιγόνα, συντετηγμένες πρωτεΐνες, DNA/RNA απταμερή, πεπτίδια, σάκχαρα, μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (molecularly imprinted polymers, MIPs), μόρια που δεν βασίζονται σε πρωτεΐνες, όπως το DNA, το RNA ή το PNA και άλλες κατηγορίες μικρομοριακών παραγόντων δέσμησης έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχουν ακινητοποιηθεί πάνω σε στερεές επιφάνειες. Η σημαντικότερη κατηγορία αυτών είναι τα αντισώματα λόγω της υψηλής τους σταθερότητας, της ειδικότητας και της συγγενείας τους με τα μόρια-στόχους. [11] [4]

Οι αποκλίνουσες ιδιότητες των παραγόντων δέσμησης αποτελούν ουσιώδη σημεία για την ανάπτυξη κάθε είδους μικροσυστοιχίας (εικόνα 12). Τα χαρακτηριστικά τους για την μικροσυστοιχία ανίχνευσης πρωτεϊνών παρουσιάζονται περιληπτικά στον πίνακα 1.



Εικόνα 12. Ταξινόμηση των αντιπροσωπευτικών πρωτεϊνικών παραγόντων δέσμησης και των εφαρμόσιμων μεθόδων ανίχνευσης για την ανάπτυξη της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών πρωτεϊνικής ανίχνευσης. Στο παρόν στάδιο, είναι δύσκολο να συναχθεί ποιος παράγοντας δέσμησης ή ποια μέθοδος ανίχνευσης είναι με σαφήνεια η πιο κατάλληλη για το είδος της μικροσυστοιχίας. Κάθε υποψήφιος παράγοντας έχει ένα μοναδικό πρότυπο δυνητικών εφαρμογών.

Παράγοντες δέσμευσης	Παραγωγή/καθαρισμός	Μόρια-στόχοι	Στόχοι (προς ανάλυση)
αντισώματα	κύτταρα υβριδιώματος	αντιγόνα	ποσότητα πρωτεΐνης
αντιγόνα	ανασυνδυασμένα, εκχύλιση	αντισώματα	ποσότητα πρωτεΐνης
συντετηγμένες πρωτεΐνες	ανασυνδυασμένες, συγγένεια καθαρισμός	πρωτεΐνες	ποσότητα πρωτεΐνης /λειτουργίες
πρωτεΐνες/τμήματα αντισωμάτων εκτεθειμένα σε φάγους	βιβλιοθήκη συμπληρωματικού DNA, επιλογή in vitro	πρωτεΐνες	ποσότητα πρωτεΐνης /λειτουργίες
αππαμερή DNA/RNA	SELEX	μικρά μόρια-πρωτεΐνες	ποσότητα πρωτεΐνης
πεπτιδία	χημική σύνθεση	αντισώματα, ένζυμα	πρωτεϊνικές λειτουργίες
υδατάνθρακες	χημική σύνθεση, εκχύλιση	πρωτεΐνες με προσδεδεμένα σάκχαρα	πρωτεϊνικές λειτουργίες
μικρά μόρια	χημική σύνθεση	υποδοχείς, ένζυμα	πρωτεϊνικές λειτουργίες
MIPs	χημική σύνθεση	μικρά μόρια-πρωτεΐνες	ποσότητα πρωτεΐνης

Πίνακας 1. Παράγοντες δέσμευσης που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν στην ανάπτυξη της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών ανίχνευσης πρωτεϊνών.

(SELEX, systematic evolution of ligands by exponential enrichment process = συστηματική εξέλιξη προσδεμάτων με διαδικασία εκθετικού εμπλουτισμού)

### Μικροσυστοιχίες αντίσωματος/αντιγόνου

Οι μικροσυστοιχίες αντισωμάτων έχουν τη δυναμικότητα να φέρουν επανάσταση στα πρωτεϊνικά διαγνωστικά, καθότι τα αντισώματα είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες δέσμευσης με υψηλή συγγένεια και ειδικότητα στα μόρια-στόχους. Ωστόσο οι βασικές απαιτήσεις των μικροσυστοιχιών αντισωμάτων είναι η δημιουργία μεθόδων επιλογής/παραγωγής/καθαρισμού για την παραγωγή αντισωμάτων με υψηλή συγγένεια και μειωμένη διασταυρωτή αντιδραστικότητα, η ενσωμάτωση των ανιχνευτών στις επιφάνειες των

αντισωμάτων, η ομογένεια της προσκόλλησης των πρωτεϊνών στο στερεό υπόστρωμα και οι μέθοδοι ακινητοποίησης που διατηρούν τις φυσικές διαμορφώσεις και δραστηριότητες.

Η πιο σημαντική απαίτηση από τις προαναφερθείσες είναι η καθιέρωση μεθόδων για την επιλογή, την παραγωγή και τον καθαρισμό αντισωμάτων με υψηλή συγγένεια και μειωμένη διασταυρωτή αντιδραστικότητα. Η διαδικασία ανάπτυξης αντισωμάτων υψηλής ποιότητας είναι συνήθως δαπανηρή και επίπονη. Για τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAb), μόλις δημιουργηθούν τα κυτταρικά υβριδώματα, οι κλώνοι θα παράσχουν δυνητικά απεριόριστα αντισώματα με ειδικότητα σε έναν μόνο επίτοπο. Η παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων περιορίζεται σε ποσότητα από το ποσό του ορρού που μπορεί να ληφθεί από το ανοσοποιημένο ζώο. Τα πολυκλωνικά αντισώματα περιέχουν πολλαπλή ειδικότητα επιτόπων αλλά μπορούν καμιά φορά να παράσχουν μεγαλύτερη ειδικευση από τα mAb εάν η ανεπιθύμητη διασταυρωτή αντιδραστικότητα απομακρυνθεί με καθαρισμό ανοσοσυγγένειας χρησιμοποιώντας καθαρισμένα αντιγόνα.

Ένας από τους σημαντικότερους στόχους στις μικροσυστοιχίες πρωτεϊνικής ανίχνευσης είναι η ανάλυση της αλλαγής της πρωτεϊνικής ποσότητας/ύπαρξης σε ένα πολύ μεγάλο δυναμικό εύρος (παράγοντες της τάξης  $10^6$ - $10^{10}$ ), σε βιολογικά δείγματα όπως οι βιοψίες ή ο ορρός, υπό ποικίλες συνθήκες, εφαρμόσιμες διαγνωστικά με την χρήση μιας διχρωματικής προσέγγισης (που αναλύεται παρακάτω). Σε τέτοιες διαγνωστικές εφαρμογές, η χρήση της ανοσοαπόκρισης αντιγόνου-αντισώματος είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική, χάρη στην υψηλή ειδικότητα και συγγένεια. Μικροσυστοιχίες αντισωμάτων που περιέχουν περισσότερα από 200 πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα ειδικευμένα για τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση και πρωτεΐνες πυρηνικής σηματοδότησης είναι εμπορικά διαθέσιμες. [11] [13] [4]

### Μικροσυστοιχίες συντετηγμένης πρωτεΐνης

Για να ανιχνεύσουμε τις πρωτεϊνικές λειτουργίες σε ένα τύπο μικροσυστοιχίας, οι πρωτεΐνες εναποτίθεντο επίσης σε μικροκατασκευασμένες επιστρώσεις υδροδιαλυτής πηκτής πολυακρυλαμιδίου ή ακινητοποιούνταν απευθείας σε ποικίλες χημικά τροποποιημένες γυάλινες πλάκες. Αν και η προηγούμενη διάταξη μπορεί να διατηρήσει τις φυσικές πρωτεΐνες ενεργές πάνω στη μικροσυστοιχία, είναι δύσκολο να παρασκευάσουμε και να αλλάξουμε τα ρυθμιστικά διαλύματα εσωτερικά κατά τον σχηματισμό της πηκτής, ενώ η τελευταία διάταξη ουσιαστικά επιτρέπει μη ειδικές προσδέσεις πρωτεϊνών στην επιφάνεια, πιθανότατα προκαλώντας τους απώλεια των φυσικών τους διαμορφώσεων και δραστηριοτήτων. Η εισαγωγή των ετικετών συγγένειας στο N ή C άκρο ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών αποτελεί μία τεχνολογία γνωστή για την ευκολία καθαρισμού των πρωτεϊνών από ένα σύνθετο μείγμα, ώστε να καταστεί δυνατή ακινητοποίηση ειδικής θέσης των πρωτεϊνών πάνω σε στερεές επιφάνειες με τις δραστηκότητές τους ακέραιες και κάποιες φορές επιτυγχάνεται βελτίωση της

διαλυτότητας των κατασκευασμάτων (constructs). Μέχρι στιγμής, κάποιες συγχωνεύσεις (fusions) συγγένειας έχουν αναπτυχθεί σε ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες.

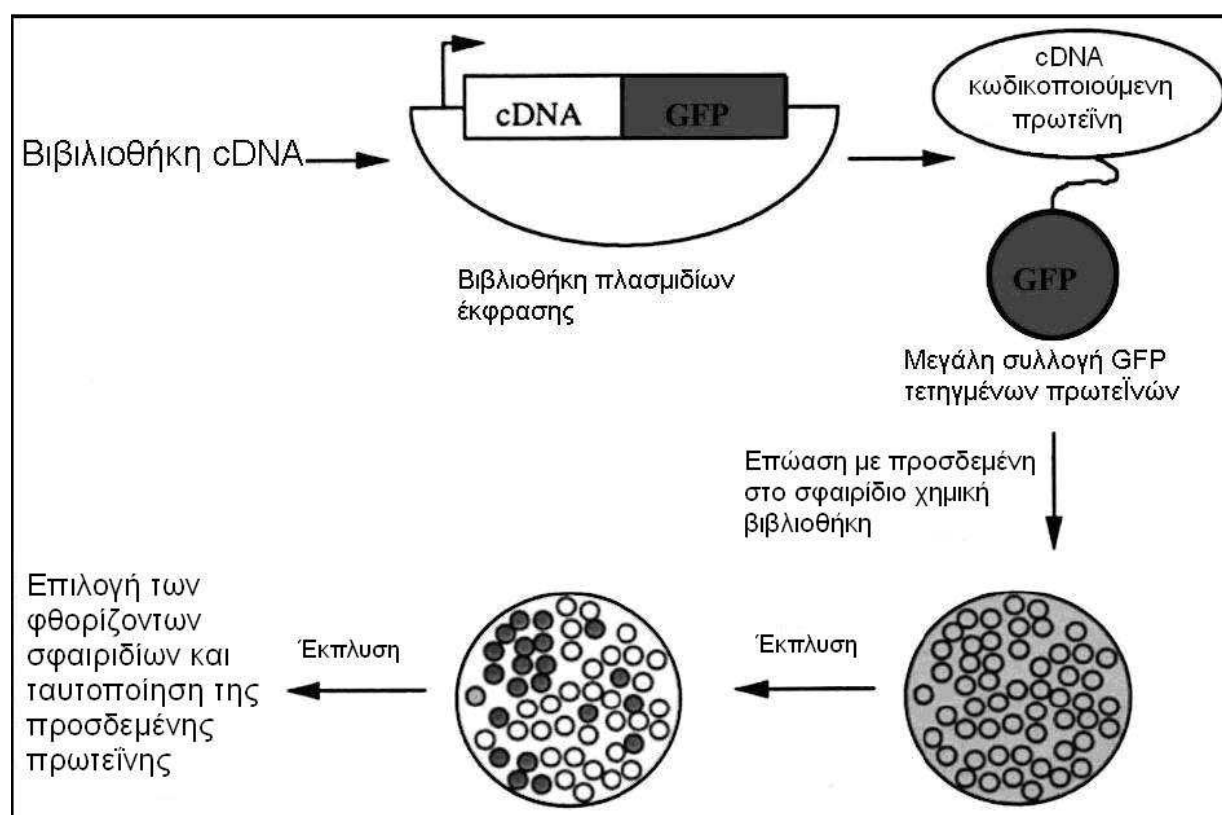
Η προσέγγιση μικροσυστοιχίας συντετηγμένης πρωτεΐνης είναι πολύ ελκυστική και θα αποτελέσει την κύρια τάση ανάμεσα στις μεθοδολογίες που πραγματοποιούν ανάλυση αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στο είδος της μικροσυστοιχίας σαν αποτέλεσμα της υψηλής ρυθμοαπόδοσης καθαρισμού πρωτεΐνης και των πρωτοκόλλων πρόσδεσης ανιχνευτή. Οι ετικέτες συγγένειας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σύνδεσμοι για πρόσδεση με αντίστοιχες επιφάνειες μέσα από αλληλεπιδράσεις ειδικής θέσης/μη ομοιοπολικές, επιταχύνοντας έτσι την ανάπτυξη της τεχνολογίας της μικροσυστοιχίας συντετηγμένης πρωτεΐνης. Μια τέτοια καλή στρατηγική παρουσιάζει όμως ακόμα κάποια προβλήματα : 1) μερικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορεί να μην υπάρχουν στις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, ανάλογα με το σύστημα έκφρασης, 2) η έκφραση/καθαρισμός των μεμβρανικών πρωτεϊνών αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα και 3) τα πρωτόκολλα των δοκιμασιών απαιτούν αντισώματα-αντιστόχους τροποποιημένα με ομάδες σήμανσης ή τεχνικές ποσοτικής σήμανσης για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν σε σύνθετα μείγματα.

#### Μικροσυστοιχίες τμημάτων αντισωμάτων και πρωτεϊνών εκτεθειμένων σε φάγους (Phage-displayed antibody-and protein fragment microarrays)

Αν και πολλά μονόκλωνα αντισώματα που μπορούν να προσδεθούν στα ειδικά τους αντιγόνα είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμα, οι χρονοβόρες και ιδιαίτερα ακριβές διαδικασίες που εμπλέκονται στην τεχνολογία υβριδιώματος αποτελούν ακόμα ένα εμπόδιο. Η τεχνική της έκφρασης-έκθεσης στην επιφάνεια του φάγου είναι μία από τις συμβατικές και πολύ ισχυρές μεθόδους συνδυαστικής βιολογίας. Η τεχνολογία ακολουθεί την αρχή ότι πολυπεπτίδια συντετηγμένα με τις πρωτεΐνες της κάψας του βακτηριοφάγου μπορούν να εκτεθούν στην επιφάνεια σωματιδίων φάγων που επίσης περιέχουν το κωδικοποιόν γονίδιο. Μ' αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μια συσχέτιση μεταξύ γονότυπου και φαινότυπου και εντελώς διαφορετικές βιβλιοθήκες ( $>10^{11}$ ) DNA-κωδικοποιούμενων πολυπεπτιδίων ή πρωτεϊνών μπορούν να παραχθούν και να καθαριστούν με μεθόδους μοριακής βιολογίας. Έτσι, παρέχοντας εναλλακτικά ικριώματα για τους παράγοντες δέσμευσης, αναδύθηκε η μεθοδολογία των τεχνητών τμημάτων αντισωμάτων και/ή πολυπεπτιδίων εκτεθειμένων σε φάγους (phage displayed artificial antibody fragments) με εναλλακτικά ικριώματα. Πολύ πρόσφατα ανασκοπήσεις έχουν αναφερθεί στην τεχνολογία έκθεσης σε φάγους συμπεριλαμβανομένης της δημιουργίας αντισωμάτων εκτεθειμένων σε φάγους (antibody phage-display) βιβλιοθηκών αντισωμάτων. Και οι δύο ανασκοπήσεις υποδηλώνουν ότι περισσότερη μελέτη χρειάζεται όσον αφορά στην βελτιστοποίηση και τον αυτοματισμό της τεχνικής της έκθεσης πρωτεϊνών (πολυπεπτιδίων) σε φάγους (phage-displayed proteins

(polypeptides)) προκειμένου να μελετηθεί ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών πρωτεϊνών παράλληλα.

Πλέον η ταυτοποίηση οργανικών ενώσεων που προσδένουν πρωτεΐνες μέσω συνδυαστικών μεθόδων βιβλιοθηκών εξελίσσεται σε κάτι κοινό. Γενικά, μια βιβλιοθήκη φτιάχνεται με σύνθεση στερεής φάσης χρησιμοποιώντας μεθοδολογία διαχωρισμού/δεξαμενής (split/pool) και, αν είναι απαραίτητο, κωδικοποιημένες ετικέτες συμπεριλαμβάνονται στο συνθετικό σχέδιο. Η συλλογή σφαιριδίων αναμιγνύεται στη συνέχεια με ένα σημασμένο παράγωγο πρωτεΐνης και τα σφαιρίδια που προσδένονται στην πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει ταυτοποιούνται. Συνήθως, αυτή η διαδικασία διεξάγεται με μία μόνο πρωτεΐνη-στόχο αλλά δεν υπάρχει λόγος να μη γίνει παράλληλα χρησιμοποιώντας πολλούς στόχους ταυτόχρονα (εικόνα 13).



Εικόνα 13. Ένα σχεδιάγραμμα για την εξέταση χημικών βιβλιοθηκών έναντι πολλών πρωτεϊνών-στόχων ταυτόχρονα. Μια βιβλιοθήκη που περιέχει πολλές σημασμένες πρωτεΐνες (σ' αυτήν την περίπτωση τήγματα GFP) εκφράζεται και το μείγμα επώαζεται με μια βιβλιοθήκη χημικά προσδεμένων σφαιριδίων (bead-bound chemical library) κατασκευασμένη με σύνθεση διαχωρισμού/δεξαμενής (split/pool synthesis). Μετά την πλύση, τα σφαιρίδια που παραμένουν φθορισμένα συλλέγονται και σημειώνονται ως πιθανά πρωτεϊνικά προσδέματα.

### Μικροσυστοιχίες απταμερών DNA/RNA

Τα απταμερή είναι μόρια ολιγονουκλεοτιδίων παραγόμενα με διαδικασία SELEX. Έχουν τα δυνητικά χαρακτηριστικά αμφοτέρων των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Μπορούν εύκολα να συντεθούν και να ενισχυθούν και να ανταγωνίζονται τα αντισώματα στη συγγένεια με στόχους περιλαμβανομένων των πρωτεϊνών. Ωστόσο τα απταμερή έχουν και κάποια μειονεκτήματα. Είναι σχετικά μικρής σταθερότητας παρουσία ενζύμων αποδόμησης στα βιολογικά δείγματα κι επίσης μικρότερης ποικιλομορφίας στα χαρακτηριστικά πρόσδεσης λόγω των τεσσάρων μόνο συστατικών (A,T,G,C/U) συγκριτικά με τις πρωτεΐνες που αποτελούνται από 20 διαφορετικά αμινοξέα. Χημική τροποποίηση του κάθε συστατικού θα ήταν χρήσιμη για να υπερνικηθούν αυτά τα εμπόδια και να παραχθούν μεγάλης σταθερότητας, ειδικά και ποικίλα απταμερή. [4]

### Πεπτιδικές μικροσυστοιχίες

Τα πεπτίδια, γενικά, έχουν κάποια ανώτερα χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες. Είναι 1) οικονομικά, 2) ιδιαίτερα σταθερά έναντι ξήρανσης και οξείδωσης, 3) εύκολα στον χειρισμό, στην σύνθεση και σήμανση με χρωμοφόρα και 4) μπορούν να μιμηθούν τις βιολογικές δραστηριότητες των πρωτεϊνών. Ωστόσο κάποιες φορές στερούνται υψηλής συγγένειας και ειδικότητας έναντι των πρωτεϊνών-στόχων και δεδομένου ότι έχουν μικρή μοριακή μάζα, δεν είναι εύκολα προσβάσιμα όταν προσροφώνται μη ειδικά σε στερεά υποστηρικτικά υλικά. Επιπλέον, επειδή τα πεπτίδια συχνά στερούνται μιας σαφώς καθορισμένης τρισδιάστατης δομής, ένας σωστός προσανατολισμός είναι ουσιαστικός για την προώθηση της αλληλεπίδρασής τους με τον στόχο. Γι' αυτούς τους λόγους, η ακινητοποίηση πεπτιδίων μικρού μήκους συχνά απαιτεί ομοιοπολική σύνδεση των παραγώγων επάνω σε ένα στερεό υποστηρικτικό υλικό.

Κατά την προηγούμενη δεκαετία η τεχνολογία πεπτιδικής μικροσυστοιχίας εξελίχθηκε σε διαδεδομένο και ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη μοριακής-αναγνώρισης αποτελώντας απομίμηση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και αντιγόνου-αντισώματος και για την ταυτοποίηση βιολογικά ενεργών πεπτιδίων, παρά τα μειονεκτήματα που αναφέρθηκαν ανωτέρω. Εφαρμογές όπως η χαρτογράφηση επιτόπων και ο χαρακτηρισμός των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, ενζύμου-υποστρώματος και ανασταλτική δραστηριότητα έχουν εξεταστεί, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη μεθοδολογιών παράλληλης πεπτιδικής σύνθεσης. [11] [4]



### Μικροσυστοιχίες μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών (MIPs)

Αν και, βασικά, τα αντισώματα είναι πολύ ελκυστικοί παράγοντες δέσμησης για τον σχεδιασμό μικροσυστοιχιών ανίχνευσης πρωτεϊνών, για την ανάλυση του πρωτεϊνικού περιεχομένου σε ένα δείγμα μείγματος, η μικρή χημική και φυσική σταθερότητα των βιομορίων πιθανώς εμποδίζει την ευρύτερη χρήση τους υπό βιοφυσικές συνθήκες. Τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIPs) αναδύονται ως μία από τις εναλλακτικές προσεγγίσεις και περιλαμβάνουν τη χρήση βιομιμητικών υποδοχέων, ικανών να προσδένουν την αναλυόμενη ουσία που μας ενδιαφέρει με σχετικά υψηλή συγγένεια και ειδικότητα. Τα συνθετικά MIPs σχηματίζονται με μια διαδικασία που εμπλέκει συμπολυμερισμό των λειτουργικών και των σταυρο-συνδεόμενων μονομερών, παρουσία της αναλυόμενης ουσίας που μας ενδιαφέρει ως μόριο εκμαγείο. Μεταγενέστερη απομάκρυνση του μορίου εκμαγείου αποκαλύπτει θέσεις πρόσδεσης που είναι συμπληρωματικές σε μέγεθος και σχήμα της αναλυόμενης ουσίας. Η προσέγγιση MIP αναπτύχθηκε για τη δέσμηση σχετικά μικρών μορίων. Η ανίχνευση σχετικά μικρών μορίων έχει μέχρι σήμερα δειχθεί με επιτυχία. Προκειμένου να επεκταθεί η δυνατότητα χρήσης των MIPs σε πρωτεωμικές μελέτες, η κατασκευή περισσότερο ομογενών θέσεων πρόσδεσης για το μόριο-στόχο είναι σημαντική στα συνθετικά πολυμερή.

### Μικροσυστοιχίες υδατανθράκων

Οι υδατάνθρακες σε γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια και πρωτεογλυκάνες έχουν σημαντικούς ρόλους στα βιολογικά συστήματα, όπως στην κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και σηματοδότηση. Οι μικροσυστοιχίες υδατανθράκων είναι μία αναδυόμενη τεχνολογία για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων υδατανθράκων-πρωτεϊνών πάνω σε μικροσκοπικοποιημένες και παράλληλες πλατφόρμες. Παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα, ευαισθησία και τη δυνατότητα ανάλυσης και ανακάλυψης γνωστής και/ή νέας μοριακής αναγνώρισης μεσολαβούμενης από υδατάνθρακες με παράλληλο τρόπο. Αυτή η τεχνολογία θα επιτρέψει την εστίαση σε γεγονότα που μεσολαβούνται από υδατάνθρακες σε κλίμακα εύρους πρωτεωμικής χωρίς την επέμβαση άλλων πρωτεϊνών σε αφθονία, στη καλούμενη «εστιασμένη πρωτεωμική μελέτη».

### Μικροσυστοιχίες μικρών μορίων

Παράλληλα με την ανάπτυξη των συστοχιών αντισωμάτων και συστοχιών συντετηγμένης πρωτεΐνης έχουν επίσης αναπτυχθεί και μικροσυστοιχίες μικρών μορίων. Οι μικροσυστοιχίες αυτές είναι σταθερές και εύκολες στην παρασκευή κι έχουν τη δυνατότητα να επιταχύνουν την

επιβεβαίωση της πρωτεΐνης-στόχου, περιλαμβανομένης της ανακάλυψης ενζύμου και προσδέματος.

Η πραγματική πρόκληση όσον αφορά στην ανάπτυξη συστοιχιών ανίχνευσης πρωτεΐνης βασισμένων σε μικρά μόρια συνίσταται στην απομόνωση προσδεμάτων υψηλής συγγένειας. Γενικά φαίνεται σαφές ότι τα μόρια-οδηγοί θα πρέπει να υποστούν σημαντική επεξεργασία για να πετύχουμε μεγάλα άλματα στην συγγένεια.

#### Μικροσυστοιχίες κυττάρων και ιστών

Αναλύσεις των επιπέδων έκφρασης γονιδίων και πρωτεϊνών από τις μικροσυστοιχίες DNA και μικροσυστοιχίες ανίχνευσης πρωτεϊνών αντίστοιχα, αποτελούν την απαρχή για την παροχή σημαντικών πληροφοριών για τις βιολογικές λειτουργίες των βιοοργανισμών. Οι μικροσυστοιχίες κυττάρου και ιστού θα επιτρέψουν τη μείωση των απαιτούμενων ποσοτήτων δείγματος και θα επιταχύνουν τις διαδικασίες βιολογικής εκτίμησης των προσδεμάτων για να ανακαλυφθούν ικανά φάρμακα και βιοδείκτες. Κάποιες μικροσυστοιχίες κυττάρων και ιστών έχουν ήδη δημιουργηθεί και μελετηθεί με γονιδιακή δραστικότητα, πρωτεϊνική έκφραση, διερεύνηση επιφάνειας κυττάρου κ.ο.κ. [4]

Όσο δύσκολο κι αν είναι το να απομονώσουμε και να παραγάγουμε χιλιάδες πρωτεϊνικά προσδέματα υψηλής συγγένειας και ειδικότητας, μπορεί να είναι ακόμα πιο δύσκολο το να βρούμε έναν καλό τρόπο να παρακολουθήσουμε την πρόσδεση της πρωτεΐνης στο chip. Οι σκέψεις που συνίστανται σε συγκρίσεις με τις μικροσυστοιχίες DNA, μπορεί να μην είναι ιδιαίτερα χρήσιμες.[7]

## ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Όπως προαναφέρθηκε, στις περισσότερες θεωρήσεις στον τομέα των πρωτεϊνικών συστοιχιών κυριαρχούν συγκρίσεις με τις μικροσυστοιχίες DNA. Μια ιδιαίτερα παραπλανητική πλευρά αυτής της λογικής είναι ότι οδηγεί τους εργαζόμενους στον τομέα στο να αγνοήσουν της συνέπειες του γεγονότος ότι οι πρωτεΐνες τείνουν να συνδέονται μεταξύ τους. Πράγματι, εκτιμάται πλέον γενικά ότι στα περισσότερα βιολογικά γεγονότα μεσολαβούν «πρωτεϊνικές μηχανές», που περιλαμβάνουν από οπουδήποτε από μερικά μέχρι σχεδόν 100 διαφορετικά πολυπεπτίδια. Αυτό οδηγεί σε μια περιπλοκή του σχεδιασμού των στρατηγικών για την ανακάλυψη προσδεμάτων.

Για τη λήψη πρωτεϊνικών προσδεμάτων, σχεδόν όλοι όσοι εμπλέκονται στον τομέα σχεδιάζουν την δημιουργία κάποιου είδους βιβλιοθήκης (αποτελούμενης από αντισώματα, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα ή απταμερή πρωτεΐνης, ή μικρά μόρια) έναντι ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ή πρωτεϊνικών περιοχών. Ωστόσο, η εμπειρία κάποιων εργαστηρίων δείχνει ότι τα προσδέματα που αποκτώνται με τέτοιο τρόπο σχεδόν πάντα προσδένονται σε φυσικές περιοχές αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης-στόχου. Αυτό μάλλον συμβαίνει επειδή οι θέσεις των φυσικών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης αποτελούν τις περιοχές της πρωτεΐνης με την μεγαλύτερη δυνατότητα πρόσδεσης. Με άλλα λόγια κάποιες περιοχές της πρωτεΐνης έχουν πιθανώς εξελιχθεί για να εμποδίσουν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες στο πολύ συμπυκνωμένο μέσο του κυττάρου.

Αυτό έχει ενδιαφέρουσες συνέπειες σ' ό,τι αφορά την χρήση των απομονωμένων ενώσεων ως προσδεμάτων για τις συστοιχίες ανίχνευσης πρωτεΐνης. Τουλάχιστον σε πειράματα όπου χρησιμοποιούνται εκχυλίσματα κυττάρων που παρασκευάζονται υπό λίγο πολύ φυσιολογικές συνθήκες, φαίνεται πιθανό ότι η πλειοψηφία των προσδεμάτων στο chip θα πρέπει να ανταγωνιστεί αρχικούς παράγοντες για την πρόσδεση της πρωτεΐνης-στόχου. Ανάλογα με τις σχετικές συγγένειες του ακινητοποιημένου προσδέματος και την φυσική πρωτεΐνη-ανταγωνιστή για τον παράγοντα-στόχο και κάποιους άλλους παράγοντες, αυτός ο ανταγωνισμός θα έχει σαν αποτέλεσμα την πρόσδεση στο chip μόνο ενός τμήματος της πρωτεΐνης-στόχου μέσα στο εκχύλισμα (εικόνα 14). Εφόσον οι συγγένειες των φυσικών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μπορούν να ποικίλουν μεταξύ πολλών τάξεων μεγέθους, αυτό σημαίνει ότι η απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης που προσδένεται σε μία θέση πάνω στη συστοιχία μπορεί να αποκλίνει πολύ από την πραγματική της συγκέντρωση στο δείγμα. Κάποιες πρωτεΐνες μπορεί να μην συνδέονται καθόλου αν η θέση πρόσδεσης είναι εγκλεισμένη στο εσωτερικό ενός σταθερού συμπλέγματος. Αυτό είναι ένα από τα πολλά προβλήματα που είναι σύμφυτα με τις απόλυτες μετρήσεις με την χρήση αυτής της τεχνολογίας. Η κατάσταση είναι ανάλογη με μία με την οποία οι μοριακοί βιολόγοι είναι αρκετά εξοικειωμένοι. Αν απομονώσει κανείς ένα αντίσωμα έναντι μιας δεδομένης πρωτεΐνης, ακόμα κι αν εφαρμόζει καλά ένα πείραμα στυπώματος Western, όπου τα συμπλέγματα της

πρωτεΐνης έχουν υποστεί θραύση, μπορεί να είναι ή να μην είναι χρήσιμο σε μία εφαρμογή ανοσοκαθίζησης. Όλα εξαρτώνται από την προσβασιμότητα του επιτόπου που αναγνωρίζεται από το αντίσωμα.

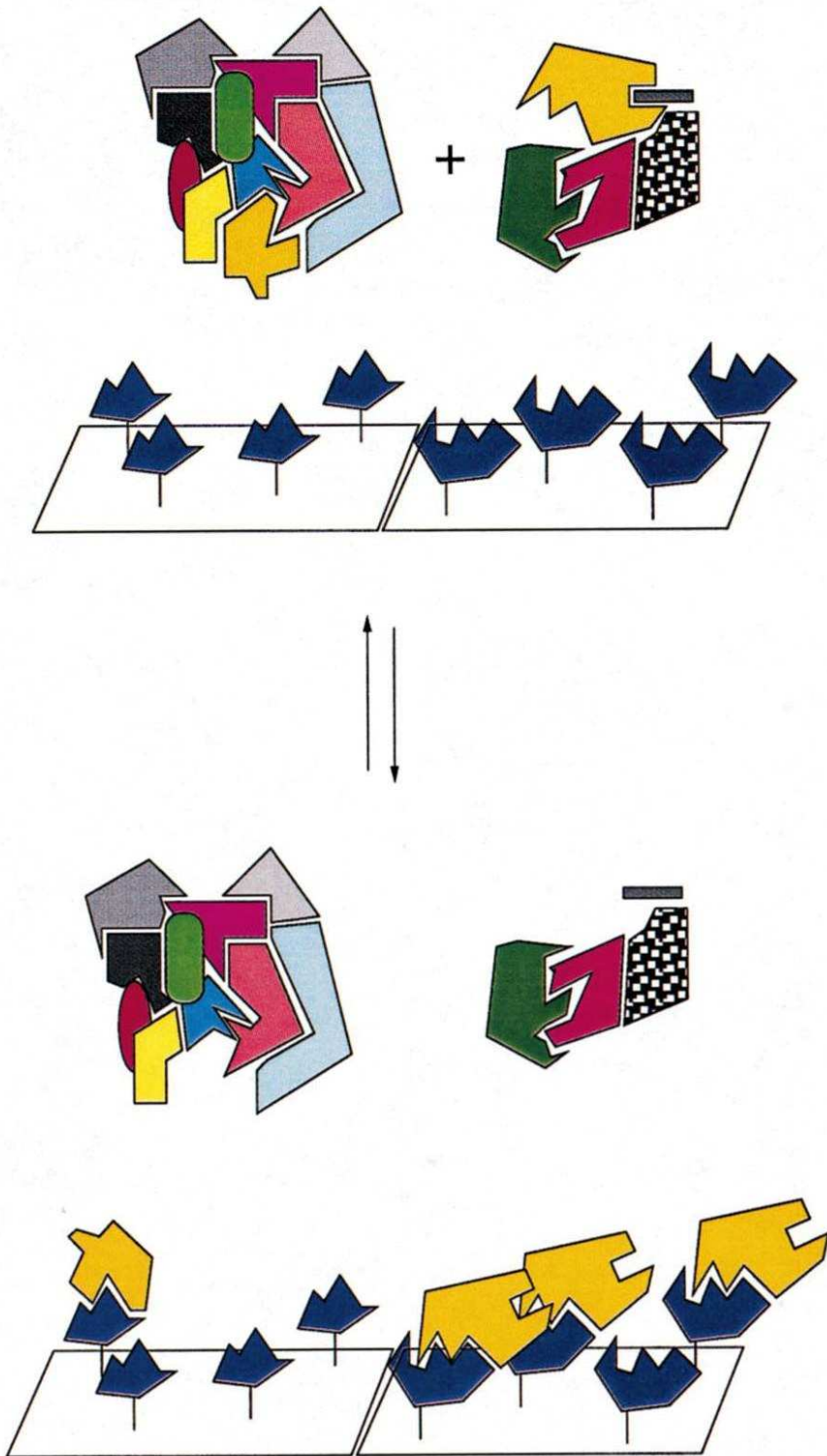
Οι περίπλοκες επιδράσεις των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης βελτιώνονται σε κάποιον βαθμό αν κανείς επιχειρήσει μόνο σχετικές μετρήσεις μεταξύ δύο δειγμάτων. Με άλλα λόγια θα ήλπιζε κανείς ο ενδογενής «λόγος κατανομής» μεταξύ ενός πεπτιδίου-στόχου που προσδένεται στο ακινητοποιημένο πρόσδεμα και μιας ανταγωνιστικής φυσικής πρωτεΐνης να είναι σταθερός, επιτρέποντας έτσι συγκριτικές μετρήσεις μεταξύ των δύο διαφορετικών δειγμάτων. Δυστυχώς, αυτό δε θα ισχύει πάντα.

Το ζήτημα των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης προσφέρει ιδιαίτερες προκλήσεις στην ανάπτυξη του συντονισμού επιφάνειας πλασμονίου (SPR) ως τεχνικής ανίχνευσης. Το αν μία πρωτεΐνη X προσδένεται σε μία δεδομένη θέση πάνω σ' ένα chip ως ελεύθερο πολυπεπτίδιο ή ως μία από τις δεκάδες των πρωτεϊνών σ' ένα σταθερό σύμπλεγμα προφανώς μας παρέχει πολύ διαφορετικές εντάσεις σήματος (εικόνα 15). Αυτό είναι ένα πλεονέκτημα της φασματομετρίας μάζας έναντι του συντονισμού επιφάνειας πλασμονίου ως το πιο επιθυμητό εργαλείο «άμεσης ανάλυσης» για πρωτεϊνικές συστοιχίες, δεδομένου ότι η φασματομετρία μάζας θα απομονώσει όλες τις διαφορετικές πρωτεΐνες στο σύμπλεγμα, επιτρέποντας μόνο στο σήμα της πρωτεΐνης X να αναλυθεί. Έχει παρουσιαστεί ενδιαφέρον σε ό,τι αφορά στη σύζευξη των SPR και MS και αν μπορούσαμε να εκμεταλλευτούμε τα πλεονεκτήματα και των δύο τεχνικών, αυτό θα αποτελούσε μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την ανίχνευση.

Ένα τελευταίο σημείο σχετικό μ' αυτό το θέμα είναι ότι θα μπορούσε να αποφευχθεί το πρόβλημα αν μπορούσε κάποιος να απαιτήσει με κάποιον τρόπο να συνδέσει το πρόσδεμα στην πρωτεΐνη-στόχο σε μια περιοχή που δε συμμετέχει στις φυσικές αλληλεπιδράσεις. Αυτό δε θα είναι εύκολο αλλά μπορεί να καταστεί δυνατό. Η απλούστερη προσέγγιση θα ήταν να χρησιμοποιήσουμε ως στόχους στα πειράματα εξέτασης βιβλιοθηκών κατάλληλους πεπτιδικούς επιτόπους που προέρχονται από την πρωτεΐνη-στόχο αντί για την ανέπαφη πρωτεΐνη αυτή καθαυτή. Αυτοί οι επιτόποι θα επιλέγονταν με βάση δομικές γνώσεις ή (πιο συχνά) σε εικασίες βασισμένες στην βιοπληροφορική σχετικά με το ποιες περιοχές της πρωτεΐνης είναι λιγότερο πιθανό να εμπλακούν σε διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Δυστυχώς, αυτή η προσέγγιση θα περιπλέξει την απομόνωση του προσδέματος, αφού θα είναι πιο δύσκολο να λάβουμε ενώσεις που προσδένουν πεπτιδικούς επιτόπους απ' ό,τι αυτές που εισχωρούν στις μοριακές σχισμές και κοιλοότητες διαθέσιμες σε μια αναδιπλωμένη πρωτεΐνη. Αυτό είναι ιδιαίτερα αληθές αν αναφερόμαστε σε προσδέματα μικρών μορίων. Ενώ μπορεί κανείς να φανταστεί την επιλογή μονοκλωνικών αντισωμάτων που προσδένουν πεπτιδικούς επιτόπους με τρόπο υψηλής ρυθμοαπόδοσης, δεν υπάρχει ακόμα αρκετή βιβλιογραφία πάνω σ' αυτό το θέμα.

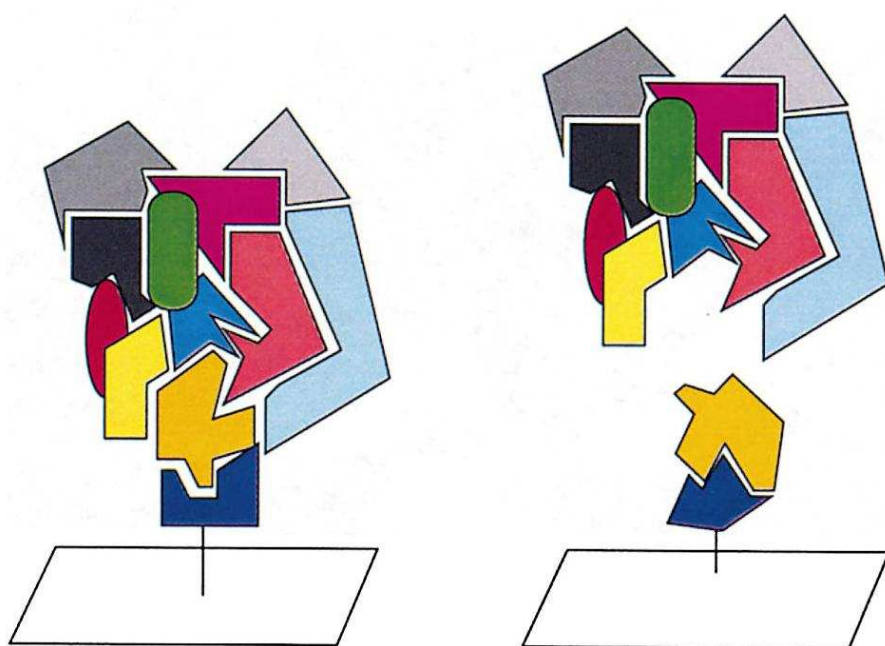
Η πρωτεΐνη-στόχος προσδένεται σφιχτά από κυπαρικές πρωτεΐνες

Η πρωτεΐνη-στόχος προσδένεται ασθενώς από κυπαρικές πρωτεΐνες



Εικόνα 14. Το αποτέλεσμα των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε πρωτεΐνη που προσδένεται σε ακινητοποιημένα προσδέματα δέσμευσης. Η παραπάνω εικόνα παρουσιάζει δύο πολυ-πρωτεϊνικά συμπλέγματα, καθένα εκ των οποίων περιέχει μία πρωτεΐνη (πορτοκαλί) για την οποία ένα ειδικό πρόσδεμα είναι παρόν στη συστοιχία (μπλε). Οι απεικονίσεις παρουσιάζουν περιπτώσεις στις οποίες

μια πρωτεΐνη προσδένεται σφιχτά στο σύμπλεγμα και η άλλη ασθενώς. Αν το πρόσδεμα δέσμευσης πρέπει να ανταγωνιστεί άλλες πρωτεΐνες στο σύμπλεγμα για τον παράγοντα-στόχο τότε οι διαφορετικές συγγένειες των στόχων με τα φυσικά τους αλληλεπιδρώντα θα έχουν ως αποτέλεσμα τη δέσμευση πάνω στην συστοιχία διαφορετικών ποσοτήτων αυτού του παράγοντα. Αυτή η απλή ανάλυση δε λαμβάνει υπόψη το γεγονός ότι οι συγγένειες προσδέματος δέσμευσης - πρωτεΐνης-στόχου θα είναι επίσης αναμφισβήτητα διαφορετικές. Παράγοντες όπως αυτοί θα καταστήσουν την απόλυτη ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων με χρήση της τεχνολογίας συστοιχιών ιδιαίτερα δύσκολη. Ωστόσο, ενώ άλλες περιπλοκές παραμένουν, οι μετρήσεις σχετικών μεταβολών μεταξύ δύο δειγμάτων θα επηρεάζονται λιγότερο από τέτοιες επιδράσεις.



Εικόνα 15. Προσδέματα δέσμευσης που συνδέονται σε μια επιφάνεια της πρωτεΐνης-στόχου που δεν εγκλείεται σε φυσικά συμπλέγματα (αριστερά) δε θα υφίσταντο περιπλοκές λόγω του ανταγωνισμού με φυσικές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (δεξιά). Ωστόσο, επειδή τα πειράματα επιλογής που χρησιμοποιούν ανέπαφες πρωτεΐνες ή περιοχές πρωτεϊνών γενικά παρέχουν ενώσεις που αναγνωρίζουν τις επιφάνειες φυσικής αλληλεπίδρασης, η λήψη προσδεμάτων όπως παρουσιάζεται αριστερά μπορεί να απαιτήσει την χρήση ειδικών επιτόπων ως στόχων στην εξέταση των βιβλιοθηκών. Αν χρησιμοποιούνταν SPR για την παρακολούθηση της πρόσδεσης, αυτοί οι δύο τύποι γεγονότων πρόσδεσης θα παρείχαν δραματικά διαφορετικές αποκρίσεις. Για να μπορεί να εφαρμοστεί αυτή η τεχνική λοιπόν, θα πρέπει κανείς να ξέρει αν το πρόσδεμα δέσμευσης συνδέεται με την πρωτεΐνη-στόχο απομονωμένα ή ως μέρος ενός συμπλέγματος. Αυτό αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην εφαρμογή του SPR ως τεχνικής ανάλυσης συστοιχιών ακόμα κι αν διατίθενται όργανα ικανά για πολλαπλές μετρήσεις.

Περίληπτικά, είναι ασφαλές να πούμε ότι τα εκτεταμένα δίκτυα αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που υπάρχουν στο κύτταρο θα παρέχουν μία σημαντική πρόκληση όσον αφορά στη σωστή ερμηνεία των δεδομένων που λαμβάνονται από τις μικροσυστοιχίες πρωτεϊνικής ανίχνευσης.

Υπάρχουν δύο μεγάλα τεχνικά εμπόδια που πρέπει να αντιμετωπιστούν για να μπορέσουν να παραχθούν σχετικά περίτεχνες συστοιχίες πρωτεϊνικής ανίχνευσης. Το ένα είναι η ανάπτυξη τεχνολογιών υψηλής ρυθμοαπόδοσης για την απομόνωση πρωτεϊνικών προσδεμάτων υψηλής ειδικότητας και συγγένειας. Το άλλο είναι η επινόηση μιας ισχυρής μεθόδου για την ανίχνευση της πρόσδεσης των πρωτεϊνών ενός βιολογικού δείγματος σε μια συστοιχία, κατά προτίμηση χωρίς την ανάγκη χημικής τροποποίησης των πρωτεϊνικών αναλυόμενων ουσιών. Όταν αυτά τα θέματα επιλυθούν, θα παραμείνουν αρκετές ενδιαφέρουσες δευτερεύουσες προκλήσεις, περιλαμβανόμενης της ανάπτυξης μεθόδων για τον διάκριση μεταξύ διαφορετικών τύπων της ίδιας πρωτεΐνης και στρατηγικών για να αντιμετωπιστούν οι περιπλοκές που υπαγορεύονται από τις φυσικές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.[7]

## ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Οι μέθοδοι ανίχνευσης για την ανάλυση κάθε συστοιχίας είναι απαραίτητες για να προσφέρουν υψηλή ρυθμοαπόδοση, υψηλή αναλογία σήματος-θορύβου, σχετικά χαμηλό κόστος οργάνων, καλή ανάλυση και αναπαραγωγίσιμα αποτελέσματα. Αν και η καταλληλότερη μέθοδος ανίχνευσης που ικανοποιεί αυτά τα κριτήρια βρίσκεται ακόμα υπό μελέτη υπάρχει μια ποικιλία υποψήφιων μεθόδων ανίχνευσης για πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες που γενικά ταξινομούνται ως εξής :

- Μέθοδοι χωρίς σήμανση, συμπεριλαμβανομένης 1) της φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry, MS), 2) του συντονισμού επιφάνειας πλάσμονιου (Surface Plasmon Resonance, SPR) και του ζυζευγμένου σε πλέγμα συντονισμού επιφάνειας πλάσμονιου (Grating-Coupled Surface Plasmon Resonance, GC-SPR), 3) της μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων (Atomic Force Microscopy, AFM), 4) των μικρο-ηλεκτρομηχανικών συστημάτων (Micro-Electromechanical Systems, MEMS), 5) της ανάλυσης μικροϊσορροπίας ακίδων πυριτίου (cantilevers), 6) των ανώμαλων ανακλάσεων της χρυσής επιφάνειας (anomalous reflections, AR) και 7) της ανάλυσης κρυστάλλου χαλαζία (Quartz-Crystal Microbalance analysis, QCM).
  
- Μέθοδοι με σήμανση ανιχνευτών, συμπεριλαμβανομένης 1) της σήμανσης με φθορισμό, 2) της ισοτοπικής σήμανσης (ανίχνευση ραδιενέργειας), 3) της χρωμογονικής ανίχνευσης, 4) της σήμανσης με χημειοφωταύγεια, 5) της ηλεκτροχημειοφωταύγειας 6) της ηλεκτροχημικής ανίχνευσης και 7) της φασματοσκοπία συσχέτισης φθορισμού (fluorescence correlation spectroscopy, FCS). Απαραίτητη είναι η σήμανση με ανιχνευτές φθορισμού για τις μεθόδους 1 και 7, με ραδιοϊσότοπα για τη μέθοδο 2, με μία κατάλληλη λειτουργική ομάδα/μόριο για τη μέθοδο 4 και με ηλεκτρικά ενεργούς ανιχνευτές για τη μέθοδο 6. Τα χαρακτηριστικά ορισμένων από τις διαφορετικές μεθόδους με βάση τη διαθεσιμότητά τους για μικροσυστοιχίες ανίχνευσης πρωτεϊνών βρίσκονται στον πίνακα 2 και αναλύονται παρακάτω. [11] [4]



	Σήμανση ανιχνευτή	Ποσοτική ανάλυση	Υψηλή ρυθμοαπόδοση	Κόστος οργάνων	Σχόλια
<b>Φθορισμός</b>	ναι	ναι/όχι	ναι	φτηνό	ευαίσθητη, μεγάλο δυναμικό εύρος
<b>Χημειοφωταύγεια</b>	ναι	ναι/όχι	ναι	φτηνό	ευαίσθητη, μεγάλο δυναμικό εύρος
<b>Ραδιοϊσότοπα</b>	ναι	ναι	ναι/όχι	μέτριο	θέματα ασφάλειας
<b>MS</b>	όχι	όχι	όχι	ακριβό	άμεση πρόσβαση μοριακής μάζας, απευθύνεται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις
<b>Φασματοσκοπία SPR</b>	όχι	ναι	όχι	ακριβό	μέτρηση μάζας, κινητικές παράμετροι
<b>AR</b>	όχι	ναι	ναι	φτηνό	μέτρηση μάζας, απλή οπτική γεωμετρία, εύκολη για μικροσκοπικοποίηση, κινητικές παράμετροι
<b>Ανάλυση QCM</b>	όχι	ναι	όχι	φτηνό	μέτρηση μάζας, κινητικές παράμετροι
<b>FCS</b>	ναι	ναι/όχι	ναι	ακριβό	Ευαισθησία για ένα μόνο μόριο, υγρή φάση (δε χρειάζεται ακινητοποίηση)
<b>Ηλεκτροχημική ανίχνευση</b>	ναι/όχι	ναι	ναι/όχι	φτηνό	ευαίσθητη, μεγάλο δυναμικό εύρος, εύκολη για μικροσκοπικοποίηση, κινητικές παράμετροι

Πίνακας 2. Μέθοδοι ανίχνευσης που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν στην ανάπτυξη της τεχνολογίας μικροσυστοιχιών ανίχνευσης πρωτεϊνών.

Κάθε μέθοδος ανίχνευσης παρουσιάζεται ποιοτικά με βάση τα παρακάτω 5 κριτήρια : 1) απαίτηση για σήμανση ανιχνευτή/ών, 2) ποσοτική αναγνώριση του συνολικού ποσού και των δραστηριοτήτων της πρωτεΐνης, 3) δυνατότητα ανάλυσης υψηλής ρυθμοαπόδοσης, 4) κόστος οργάνων (διαθεσιμότητα) και 5) σχόλια σχετικά με δυναμικούς/ισχύοντες περιορισμούς.

## Μέθοδοι χωρίς σήμανση

Μπορεί να φανταστεί κανείς τη διαδικασία της **φασματομετρίας μάζας** εικονιζόμενος την βύθιση μίας συστοιχίας πρωτεϊνικής ανίχνευσης σε μια κατάλληλη μήτρα, στη συνέχεια τη δειγματοληψία σε κάθε θέση της συστοιχίας με εκρόφηση-ιοντισμό λέιζερ time-of-flight (matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight) MS.

Η φασματομετρία μάζας μας επιτρέπει να αποκτήσουμε άμεσα πληροφορίες (μοριακές μάζες) για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν και δεν απαιτεί καθόλου σήμανση μορίων, που πολλές φορές αλλοιώνουν τη διαμόρφωση και τις δραστηριότητες των μορίων-στόχων και αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών. Ωστόσο έχει τα μειονεκτήματα της σχετικά δύσκολης ποσοτικοποίησης και της χαμηλής ρυθμοαπόδοσης. Επομένως θα αποτελούσε πρόκληση η σύγκριση των εντάσεων των πρωτεϊνικών σημάτων από αντίστοιχες θέσεις δύο διαφορετικών chips. Φυσικά, δεν μπορεί κανείς να αναμείξει δύο διαφορετικά δείγματα και να τα εφαρμόσει σε ένα μόνο chip, καθώς τα σήματα που προέρχονται από την ίδια πρωτεΐνη στα δύο δείγματα δε θα μπορούσαν να γίνουν διακριτά. Οι τεχνικές της φασματοσκοπίας μάζας σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους παράλληλα ή/και σε σειρά μπορεί όμως να προσφέρουν πιο ισχυρή ανάλυση για την κατανόηση των πρωτεωμικών μελετών. Αν μπορούσε μάλιστα να επινοηθεί μια έξυπνη τεχνική με την οποία θα μπορούσε κανείς να σημάνει ιστοπικά τις πρωτεΐνες in vivo, τότε η άμεση ανάλυση MS των πρωτεϊνών από δύο δείγματα, προσδεμένα στο chip θα μπορούσε να διεξαχθεί ποσοτικά.

**Επιφανειο-ενισχυόμενη εκρόφηση/ιοντισμός με λέιζερ** (surface-enhanced laser desorption/ionization, SELDI) **TOF MS** είναι μια πρωτοποριακή προσέγγιση που προσφέρει καθαρισμό και επιλογή των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν πάνω στο chip και στη συνέχεια ιονισμό των κατακρατούμενων προς ανίχνευση μορίων σε έναν ανιχνευτή για μια ταξινόμηση βασισμένη στην αναλογία μάζας/φορτίου.

Η **φασματοσκοπία SPR** (εικόνα 16) είναι γνωστή για το ότι μας επιτρέπει να μελετήσουμε την κινητική αλληλεπιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος, πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και υποδοχέα-προσδέματος σε πραγματικό χρόνο, χωρίς σημασμένο μόριο και αποτελεί τεχνολογία αιχμής στον τομέα της ανίχνευσης μοριακών αλληλεπιδράσεων χωρίς σήμανση. Τα μόρια δέσμευσης ακινητοποιούνται πάνω σε μια λεπτή μεμβράνη μετάλλου (χρυσού ή ασημιού) και προστίθεται η μη σημασμένη αναλυόμενη ουσία. Η αλλαγή στη γωνία ανάκλασης του προσπίπτοντος φωτός δείχνει την ποσότητα των μορίων-στόχων που δεσμεύονται πάνω στις επιφάνειες. Η φασματοσκοπία SPR είναι ένα πραγματικά ευέλικτο εργαλείο αλλά επιτρέπει ανάλυση μόνο λίγων διαύλων ανά πείραμα. Αυτή η μέθοδος απαιτεί την τοποθέτηση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων πάνω επιφάνειες χρυσού για τις διατάξεις μικροσυστοιχιών. Σήμερα, μέχρι 400 προσδέσεις αντισώματος-στόχου πραγματικού χρόνου θα μπορούσαν να μετρηθούν

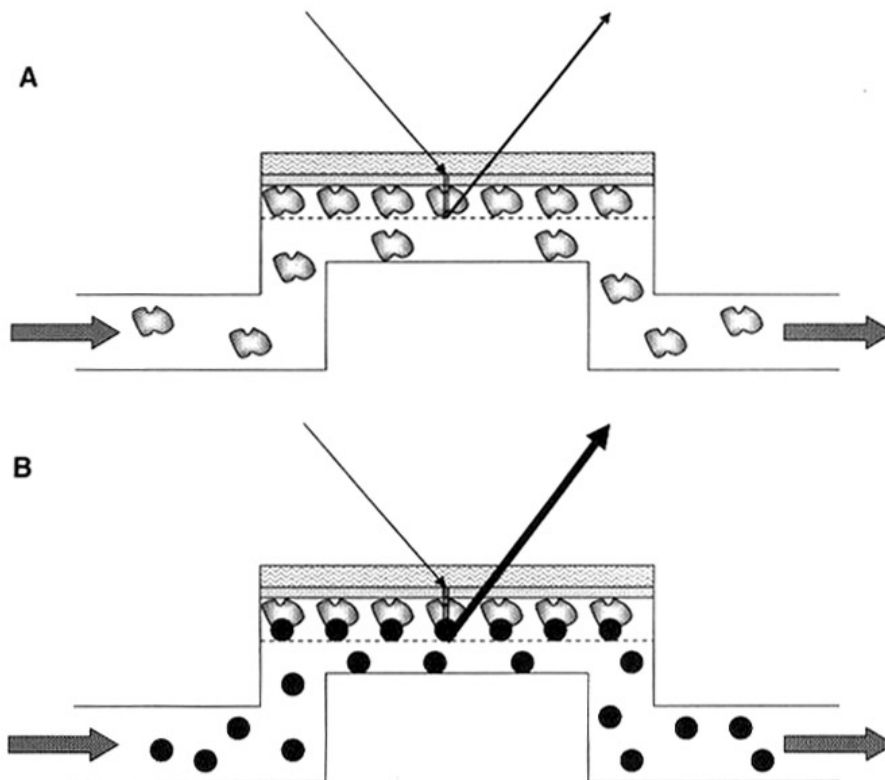
ταυτόχρονα μέσα σε μία μόνο ώρα με την χρήση μικροσυστοιχιών αντισωμάτων σε συνδυασμό με την τεχνολογία SPR.

Το τεχνικό εμπόδιο εδώ είναι ότι για αναλυθούν χιλιάδες θέσεις σε μία σχετικά μικρή χρονική περίοδο πρέπει να δημιουργηθεί ένα ικανό όργανο SPR. Λογικά ένα τέτοιο όργανο θα μπορούσε να κατασκευαστεί επιτρέποντας στο λέιζερ να κινηθεί από στοιχείο σε στοιχείο (ή το πιθανότερο, μετακινώντας ένα chip πολλών στοιχείων σε σχέση με ένα ακίνητο λέιζερ). Ειρωνικά, το θέμα που πιθανότατα θα αποδειχθεί το πιο προβληματικό για την ανάπτυξη των βασισμένων στο SPR συστοιχιών ανίχνευσης πρωτεϊνών είναι ότι μπορεί να δύσκολο να διεξαχθούν σχετικές μετρήσεις πρωτεϊνικών δειγμάτων στην ίδια συστοιχία, γεγονός που μάλλον οι περισσότεροι χρήστες θα θέλουν. Επομένως, μάλλον θα έπρεπε κανείς να προσπαθήσει να συγκρίνει απόλυτα σήματα, ειλημμένα από δύο διαφορετικές θέσεις, γεγονός που έχει τα δικά του προβλήματα, περιλαμβανομένων περιπλοκών λόγω των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Ωστόσο μεσο- ή μακρο-πρόθεσμα, ο SPR είναι μία πολλά υποσχόμενη τεχνολογία στο πεδίο των πρωτεϊνικών συστοιχιών, ειδικά όταν το πεδίο τελικά γυρίζει σε ποσοτικές μετρήσεις.

Ο **συζευγμένος σε πλέγμα συντονισμός επιφάνειας πλασμονίου (GC-SPR)** είναι μια μέθοδος για την αξιολόγηση της αναλυόμενης ουσίας σε μια πολυπλεγμένη μορφή. Στην GC-SPR, η αναλυόμενη ουσία ρέει έναντι ειδικών ανιχνευτών (π.χ. αντισώματα) που έχουν ακινητοποιηθεί σε ένα chip-αισθητήρα. Η επιφάνεια του chip φωτίζεται με p-πολωμένο φως που συζεύγνυται με τα ηλεκτρόνια της επιφάνειας χρυσού για να σχηματίσει μία επιφάνεια πλασμονίου. Σε μια συγκεκριμένη γωνία πρόσπτωσης, αποκαλούμενη γωνία GC-SPR, παρουσιάζεται το μέγιστο ποσό σύζευξης, μειώνοντας έτσι την ένταση του ανακλώμενου φωτός. Επειδή οι περιοχές του τσιπ μπορούν να αναλυθούν ανεξάρτητα, αυτό το σύστημα μπορεί να αξιολογήσει 400 αλληλεπιδράσεις μεταξύ της αναλυόμενης ουσίας και του υποδοχέα σε ένα μόνο chip.

Η **AFM** αποκαλύπτει την αλλαγή στο ύψος μιας ακινητοποιημένης πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση με το συγγενές της μόριο. Έχει εισαχθεί για ανίχνευση σε μοναδικό μοριακό επίπεδο σε πρωτεϊνικές νανοσυστοιχίες που δημιουργούνται με νανολιθογραφία Dip-Pen αλλά χρησιμοποιείται και αυτήν την περίοδο ευρέως για τον χαρακτηρισμό επιφάνειας στις πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες.

Τα υλικά **μικρο-ακίδων πυριτίου (micro-cantilevers)** ως βιοαισθητήρες είναι λωρίδες πυριτίου που προσκολλώνται στη μία τους άκρη, σε ένα μόριο δέσμευσης (αντίσωμα ή πρωτεΐνη) προσδεμένο στην επιφάνεια. Όταν μια αναλυόμενη ουσία προσδένεται πάνω στο micro-cantilever, η κάμψη του ως αποτέλεσμα επιφανειακής πίεσης μετριέται από την απόκλιση μιας οπτικής δέσμης ή από τη μεταβολή μιας ηλεκτρικής αντίστασης σε μια πιεζοηλεκτρική λεπτή μεμβράνη πάνω στο cantilever. Εναλλακτικά, μετριέται μια αλλαγή στη μηχανική συχνότητα συντονισμού της.



Εικόνα 16. Το σύστημα συντονισμού επιφάνειας πλασμονίου (SPR) στο αισθητήριο chip. (A) Οι πρωτεΐνες διοχετεύονται μέσω ενός συστήματος διαύλων μικρορευστότητας προκειμένου να προσδεθούν στην επιστρωμένη με χρυσό και dextran επιφάνεια (γκρι) του chip αισθητήρα. Η πρόσδεση γίνεται πάνω από το σύστημα διαύλων ώστε πιθανή καθίζηση να μην επηρεάζει τα αποτελέσματα. Η αντανάκλαση μιας μόνο δέσμης φωτός (λεπτό βέλος) μετράται σε σύνδυασμό με το προσδεμένο μόριο (βέλος μετρίου πάχους). (B) Εάν μεταγενέστερα διαλύματα με πιθανά προσδέματα διοχετευτούν μέσω του συστήματος διαύλων μικρορευστότητας, τότε σύνδεση των προσδεμάτων (μαύρος κύκλος) γίνεται με τα προηγούμενως προσδεμένα μόρια πρόσδεσης (γκρι). Η αντανάκλαση (πλατύ βέλος) της μοναδικής δέσμης φωτός (λεπτό βέλος) αλλάζει ανάλογα με το προσδεμένο σύμπλεγμα. Έτσι επαληθεύεται η ειδική πρόσδεση μεταξύ προσδέματος και πρωτεΐνης.

Οι **AR** είναι ένα χαρακτηριστικό φαινόμενο του χρυσού που συμπεριφέρεται σαν διηλεκτρικό με ένα μεγάλο δείκτη απόσβεσης σε μπλε ή μωβ φως, επειδή προκαλείται μεγάλη μείωση στην ανακλαστικότητα της χρυσής επιφάνειας, όταν αυτή τροποποιείται με ένα διάφανο στρώμα επιφάνειας, λόγω πολλαπλών αντανακλάσεων στην επιφάνεια. Η μέθοδος AR έχει έναν αριθμό πλεονεκτημάτων : 1) η οπτική γεωμετρία είναι απλή, γεγονός που διευκολύνει τη την μικροσκοπικοποίηση, 2) τα αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευτούν ποσοτικά με επίλυση των εξισώσεων του Maxwell, 3) η χρυσή επιφάνεια μπορεί να παρασκευασθεί με μία απλή μέθοδο εξάτμισης υπό κενό και 4) οι AR δεν είναι δράση συντονισμού και μπορούν να

λάβουν χώρα σε ένα μεγάλο εύρος μηκών κύματος του φωτός (350 - 500 nm), επιτρέποντας έτσι τη χρήση μη επιλεκτικών πηγών φωτός με μία ευρεία ζώνη εκπομπής, όπως η δίοδος εκπομπής φωτός (LED). Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσφέρει ποσοτική ανάλυση βιολογικών γεγονότων στις διατάξεις μικροσυστοιχιών και τη χρήση φτηνών και διαθέσιμων ανιχνευτών μεγέθους μικρομέτρων. Η βελτιστοποίηση του συστήματος βρίσκεται ήδη σε εξέλιξη.

**Η QCM** είναι μία ευαίσθητη συσκευή μέτρησης μάζας στον αέρα και σε υδατικά διαλύματα και η συχνότητα συντονισμού έχει αποδειχτεί ότι μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της μάζας στο ηλεκτρόδιο QCM σε επίπεδο νανογραμμαρίου. Η μέθοδος QCM έχει χρησιμοποιηθεί για την παρατήρηση βιολογικών συμβάντων όπως οι μοριακές αλληλεπιδράσεις σε πραγματικό χρόνο.

Όλες οι χωρίς σήμανση μέθοδοι ανίχνευσης είναι πολλά υποσχόμενα εργαλεία για τον χαρακτηρισμό συμβάντων πρόσδεσης πάνω στις επιφάνειες. Δεν απαιτούν σήμανση μορίων που μπορεί να έχει επιπτώσεις στην πρωτεϊνική δραστηριότητα. Εντούτοις, είναι γενικά βασισμένες σε σύνθετο εξοπλισμό που δεν είναι εύκολα διαθέσιμος σε όλα τα κλινικά εργαστήρια.

#### Μέθοδοι με σήμανση ανιχνευτών

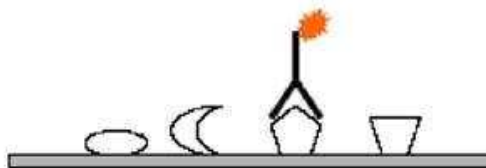
Οι μέθοδοι με σήμανση ανιχνευτών έχουν εξελιχθεί άμεσα από κλινικούς ανοσοπροσδιορισμούς και πρωτόκολλα ραδιοανοσοπροσδιορισμών ή ELISA όπου χρησιμοποιούνται ευρέως.

Μπορούν να διακριθούν σε (βλ. εικόνα 17) :

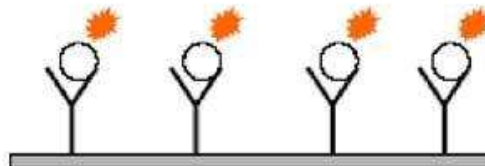
- (1) Άμεσες (όταν ακινητοποιείται ένα μίγμα πρωτεϊνών και η ανίχνευση τελείται με χρήση σημασμένων μορίων πρόσδεσης όπως τα αντισώματα).
- (2) Έμμεσες (όταν τα ακινητοποιημένα αντισώματα χρησιμοποιούνται ως προσδέματα δέσμευσης και ανιχνεύονται με σημασμένες πρωτεΐνες)
- (3) Σάντουιτς (όταν ένα πρώτο ακινητοποιημένο αντίσωμα δρα ως παράγοντας δέσμευσης για τη προσδιοριζόμενη πρωτεΐνη που αναφάνεται με αναγνώριση με ένα δευτερογενές σημασμένο αντίσωμα).

## Μέθοδοι Ανίχνευσης με χρήση σημασμένων ανιχνευτών

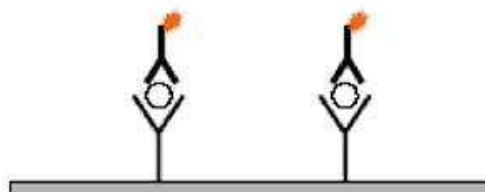
1: Άμεση (ειδική ανίχνευση με σημασμένο αντίσωμα)



2: Έμμεση (αντισώματα δέσμευσης ανιχνεύονται με σημασμένες πρωτεΐνες)



3: Δοκιμασία σάντουιτς με σημασμένο δευτερογενές αντίσωμα



Εικόνα 17. Απλουστευμένη απεικόνιση (σχεδιασμένη χωρίς κλίμακα) των μεθόδων με σήμανση ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται συνήθως στις μικροσυστοιχίες ανίχνευσης πρωτεϊνών.

Στην άμεση προσέγγιση, που αναφέρεται συνήθως ως πρωτεϊνική μικροσυστοιχία ανάστροφης φάσης, κάθε θέση της συστοιχίας περιέχει ένα μεμονωμένο δείγμα δοκιμής. Επομένως, μια συστοιχία μπορεί να περιλαμβάνει διάφορους ορρούς διαφορετικών ασθενών ή κυτταρικά λύματα που περιέχουν ένα σύνθετο μείγμα πρωτεϊνών. Στη συνέχεια η συστοιχία επωάζεται με μια πρωτεΐνη ανίχνευσης (συνήθως ένα αντίσωμα) επιτρέποντας την σύγκριση μιας μόνο αναλυόμενης ουσίας σε διαφορετικά δείγματα.

Στην έμμεση προσέγγιση ανίχνευσης ένα γνωστό πρόσδεμα δέσμευσης ακινητοποιείται πάνω στην επιφάνεια και ανιχνεύεται με ένα σημασμένο σύνθετο μείγμα πρωτεϊνών. Το προς έλεγχο δείγμα μπορεί να είναι ένα κυτταρικό λύμα ή ένας ορρός στον οποίο πολλαπλές αναλυόμενες ουσίες μετρώνται ταυτόχρονα. Σε μία διχρωματική προσέγγιση μπορούν να συγκριθούν φαρμακολογικές θεραπείες ή προφίλ πρωτεϊνικής έκφρασης.

Η διάταξη της δοκιμασίας τύπου σάντουιτς βασίζεται σε ακινητοποιημένα αντισώματα για την δέσμευση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει ενώ ένα δεύτερο σημασμένο αντίσωμα κατευθυνόμενο έναντι της δεσμευμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιείται για ανίχνευση. Στην προσέγγιση αυτή, απαιτούνται δύο ξεχωριστά αντισώματα, το καθένα με συγγένεια για τον διαχωρισμό των επιτόπων πάνω στην πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.

Τα προβλήματα των μεθόδων με σήμανση ανιχνευτών είναι η παραγωγή αντισωμάτων και η ποσοτική σήμανση αντισωμάτων/αντιγόνων. Υπάρχουσες συλλογές ειδικών αντισωμάτων αναλυόμενων ουσιών καλύπτουν ένα περιορισμένο κλάσμα του πρωτεώματος.

Οι μέθοδοι με σήμανση ανιχνευτών βασίζονται στον φθορισμό, την χημειοφωταύγεια, την ηλεκτροχημειοφωταύγεια ή χρωμογονικές ή ραδιενεργές στρατηγικές σήμανσης. Οι μέθοδοι ανίχνευσης που αναπτύσσονται για μικροσυστοιχίες, λόγω της μικροσκοπικοποιημένης διάταξης, απαιτείται να παρέχουν υψηλή ευαισθησία (υψηλή αναλογία σήματος/θορύβου) και υψηλή ρυθμοαπόδοση. Η χρήση φθορίζοντων ανιχνευτών και οι τεχνικές ενίσχυσης σήματος με χρωμογονικούς ή φθορίζοντες ανιχνευτές συνήθως οδηγεί σε αποδόσεις που πληρούν αυτά τα κριτήρια.

Οι φθορισμοφόρες ομάδες υπάρχουν σε διαφορετικούς σχηματισμούς με στενά φάσματα διέγερσης και εκπομπής, γίνονται όλο και πιο δημοφιλείς και αποτελούν σήμερα την μέθοδο επιλογής για την ανίχνευση μικροσυστοιχιών. Η επιλογή ενός **φθορίζοντος ανιχνευτή** εξαρτάται από τον τύπο του δείγματος, τα φάσματα εκπομπής και το υπόστρωμα.

Η σήμανση των δειγμάτων με φθορισμοφόρους ομάδες, παρόμοια με την διαδικασία που χρησιμοποιείται συνήθως για τη μελέτη του μεταγραφικού προφίλ μικροσυστοιχιών cDNA, είναι κατάλληλη για τη μελέτη του πρωτεϊνικού προφίλ στις μικροσυστοιχίες αντισωμάτων. Ωστόσο, η άμεση σήμανση έχει και τα μειονεκτήματά της. Η ομοιοπολική προσκόλληση των φθορισμοφόρων ομάδων μειώνει, για παράδειγμα, την διαλυτότητα των πρωτεϊνών. Ένας πολύ υψηλός βαθμός της σήμανσης μπορεί να παρέμβει και στην αναγνώριση αντιγόνου-αντισώματος. Και οι δύο παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τόσο την ένταση του σήματος όσο και τη μη ειδική πρόσδεση. Επιπρόσθετα, η έκταση της σήμανσης εξαρτάται από το είδος της πρωτεΐνης, τη συγκέντρωσή της στο αναλυόμενο δείγμα και τον τύπο της φθορισμοφόρου ομάδας. Συνεπώς, και το προς ανάλυση δείγμα και το δείγμα ελέγχου θα πρέπει να σημαίνονται με οποιαδήποτε από τις δύο φθορισμοφόρους ομάδες και να αναλύονται σε αμοιβαίες επωάσεις.

Οι χρωστικές Cy3 και Cy5 χρησιμοποιούνται ευρέως για την φθορίζουσα ανίχνευση πρωτεϊνών. Η προσέγγιση της διχρωματικής ανίχνευσης με Cy5 και Cy3 έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για την σύγκριση των πρωτεϊνικών επιπέδων σε δύο διαφορετικά δείγματα. Τα σχήματα πολυχρωματικής ανίχνευσης είναι ιδιαίτερα ωφέλιμα, όταν οι μετρήσεις των μικροσυστοιχιών δεν ποσοτικοποιούνται απόλυτα αλλά σχετικά. Η ταυτόχρονη ανίχνευση των ειδών επιτρέπει άμεση σύγκριση της έντασης φθορισμού σε διαφορετικά δείγματα, χωρίς παρεκκλίσεις μεταξύ των chips.

Η **σήμανση με ραδιενέργεια** εφαρμόζεται κυρίως με χρήση διαφορετικών ισοτόπων, όπως  $^{32}\text{P}$  ή  $^3\text{H}$  ενσωματωμένων σε πρωτεΐνες ή με ανιχνευτές τριωδοθυρονίνης με  $^{125}\text{I}$ . Η ανίχνευση σήματος απεικονίζεται με αυτοραδιογραφία και ποσοτικοποιείται με ένα πυκνόμετρο. Η ραδιενέργεια είναι κατάλληλη για την ανάλυση των συστοιχιών, ειδικά για την ενζυμική φωσφορυλίωση, λόγω της ευαισθησίας και της ειδικότητας, όπως και της δυνατότητας ανίχνευσης φθορισμού. Η τεχνική χρησιμοποιεί πλήρως δραστικές πρωτεΐνες και επιτρέπει την ακριβή ποσοτικοποίηση του ποσού της πρωτεΐνης που αναλύεται. Ωστόσο, λόγω ανησυχιών ασφάλειας και προβλημάτων αποβλήτων δε χρησιμοποιείται πλέον ευρέως. Επιπλέον δεν είναι πλήρως συμβατή με μεθοδολογίες ελέγχου υψηλής ρυθμοαπόδοσης.

Τα **χρωμογόνα** είναι υποστρώματα για μια ενζυμική αντίδραση που παράγει ένα αδιάλυτο έγχρωμο προϊόν. Ένζυμα που χρησιμοποιούνται συχνά για χρωμογονικές αντιδράσεις είναι η αλκαλική φωσφατάση και ραφανιδική υπεροξειδάση. Αυτά τα ένζυμα δρουν σε άχρωμα χημικά υποστρώματα παράγοντας σταθερά έγχρωμα προϊόντα.

Η **χημειοφωταύγεια**, που είναι η φωταύγεια που παράγεται με μια χημική αντίδραση, χρησιμοποιείται γενικά στις μικροσυστοιχίες για την ανίχνευση πρωτεϊνών που αναγνωρίζονται από δευτερογενή αντισώματα σημασμένα με αλκαλική φωσφατάση ή ραφανιδική υπεροξειδάση. Η ενζυμική οξειδωση των υποστρωμάτων όπως λουμινόλη παράγει μια παρατεταμένη εκπομπή φωτός που δεσμεύεται από μία κατάλληλη κάμερα (CCD).

Η χημειοφωταύγεια έχει επίσης υψηλή ευαισθησία αλλά προς το παρόν δίνει σχετικά χαμηλότερη ανάλυση και σχετικά περιορισμένο δυναμικό εύρος.

Η τεχνική ανίχνευσης που βασίζεται στην ηλεκτροχημεία αναπτύχθηκε πρωταρχικά για την ανάλυση υβριδοποίησης DNA και έχει την δυνατότητα της πραγματοποίησης μετρήσεων χαμηλού κόστους, σε πραγματικό χρόνο και με υψηλή ευαισθησία. Κατά την **ηλεκτροχημική ανίχνευση** για βιολογικά συστήματα, έχουν επισημανθεί δύο σημαντικά εμπόδια : 1) η χρήση ηλεκτροχημικά δραστικών παραγόντων που διευκολύνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων και 2) η ανάπτυξη μεθοδολογιών τροποποίησης επιφάνειας, που παρέχουν επιφάνειες για την ηλεκτροχημεία, καθορισμένες σε ικανοποιητικό βαθμό και αναπαραγωγήσιμες.

Η **FCS** είναι τον τελευταίο καιρό όλο και πιο δημοφιλής στις βιοχημικές και βιοφυσικές εφαρμογές λόγω μιας σημαντικά βελτιωμένης αναλογίας σήματος-θορύβου και ευαισθησίας ενός μορίου όχι στην επιφάνεια αλλά σε έναν αρκετά μικρό όγκο διαλύματος, που μπορεί να αντιπροσωπεύει βιολογικά συμβάντα με μεγαλύτερη ακρίβεια και αναπαραγωγή από τις



μορφές μικροσυστοιχιών που βασίζονται σε στερεά υποστηρικτικά υλικά . Η μέθοδος βασίζεται στην καταγραφή χωροχρονικών συσχετισμών ανάμεσα σε ταλαντευόμενα σήματα φωτός συνδεδεμένα με την παγίδευση μοναδικών μορίων στο ηλεκτρικό πεδίο. Οι χρόνοι διάχυσης που λαμβάνονται από τα ταλαντευόμενα σήματα παρέχουν πολύτιμη πληροφορία σχετικά με το μοριακό μέγεθος του συμπλέγματος που σχηματίζεται. Αν και το σύστημα δοκιμασίας FCS αναμένεται να επιτρέψει την ανάλυση μοριακών αλληλεπιδράσεων σε μία κλίμακα εύρους πρωτεωμικής, υπάρχουν κάποιες βασικές απαιτήσεις, στο ότι παράγοντες δέσμησης σημασμένοι με φθορισμοφόρο ομάδα είναι απαραίτητοι για την παρακολούθηση και οι αλλαγές στον λαμβανόμενο χρόνο διάχυσης εξαρτώνται σημαντικά από τις διαφορές στο μοριακό μέγεθος πριν και μετά την δημιουργία του συμπλέγματος.

Από τις παραπάνω τεχνικές ανίχνευσης που αναφέρθηκαν, το σύστημα αισθητήρα με φθορισμό σε σύζευξη με αντισώματα φαίνεται να είναι το πιο απλό και ευέλικτο γιατί μπορεί να παρέχει αναλύσεις υψηλής ακρίβειας και ευαισθησίας. Τα προβλήματα, ωστόσο, είναι η παραγωγή αντισωμάτων που μπορούν να αναγνωρίσουν μόνο τα ειδικά τους αντιγόνα και η ποσοτική σήμανση αντισωμάτων/αντιγόνων. Η ραδιενέργεια χρησιμοποιείται συχνά για τον έλεγχο ειδικών υποστρωμάτων πρωτεϊνικών κινασών παρουσία ιστοτοπικά σημασμένης τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) λόγω της μη συμβατότητας των φωσφορυλιωμένων αντισωμάτων ειδικών της αλληλουχίας σε μερικές περιπτώσεις. Στο άμεσο μέλλον, όταν θα έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα η παραγωγή μικροπροτύπων και αναπαραγωγίμων επιφανειών, η μέθοδος απεικόνισης SPR θα καταστεί μία από τις πιο εξέχουσες τεχνικές για την ανάλυση μοριακών αλληλεπιδράσεων χωρίς καμία σήμανση. Για να βελτιώσουμε τη συνολική αξιοπιστία και αποτελεσματικότητα των μεθόδων για την μελέτη του προφίλ των μοριακών αλληλεπιδράσεων σε κλίμακα πρωτεωμικής, μπορούν να εφαρμοσθούν αρχικά τα υψηλής ρυθμοαπόδοσης αναλυτικά πρωτόκολλα και στη συνέχεια να επακολουθήσουν ακριβέστερες μέθοδοι ανάλυσης όπως MS και SPR φασματοσκοπία.[4] [7] [8] [11]

Πρόσφατες εφαρμογές των πρωτεϊνικών biochips αναφέρονται στον πίνακα 3. Η πιο συνηθισμένη χρήση των μικροσυστοιχιών αυτών είναι ο μικρο-ανοσοπροσδιορισμός, στον οποίο συστοιχίες διαφορετικών αντισωμάτων δέσμησης ακινητοποιούνται και στη συνέχεια εκτίθενται σε ένα βιολογικό δείγμα. Αναλυόμενες πρωτεΐνες προσδένονται στους ακινητοποιημένους παράγοντες δέσμησης και κατόπιν ανιχνεύονται με φθορισμό, φωταύγεια κλπ. Ποικίλοι παράγοντες πρόσδεσης πρωτεϊνών που παράγονται με συνδυαστικές μεθόδους μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν στη θέση παραδοσιακών αντισωμάτων, όπως τεχνητές πρωτεΐνες, RNA ή απταμερή DNA, αλλοστερικά ριβοένζυμα, πεπτιδία, μικρά μόρια κλπ.[9]

<b>Εφαρμογές μικροσυστοιχιών πρωτεϊνικής λειτουργίας</b>		
<b>Εφαρμογή</b>	<b>Αριθμός πρωτεϊνών</b>	<b>Ανίχνευση</b>
<b>Συστοιχίες αντισωμάτων</b>		
Μελέτη πρωτεϊνικού προφίλ	115	Φθορίζουσα
Μέτρηση ποσοτήτων πρωτεΐνης στο αίμα	3	Σάντουιτς ELISA/φθορισμός
Μέτρηση ποσότητας κυτοκινών	7, 24	Σάντουιτς ELISA/χημειοφωταύγεια
Δέσμευση λευκοκυττάρων/προδιορισμός φαινότυπου λευχαιμιών	60	Οπτική μικροσκοπία
<b>Συστοιχίες αντιγόνων</b>		
Ανάστροφος ανοσοπροσδιορισμός για τη μέτρηση αυτοάνοσων αντισωμάτων	18	ELISA/χημειοφωταύγεια
Ανάστροφοι ανοσοπροσδιορισμοί για τη μέτρηση αλλεργιών	5	Σύνθεση DNA κυλιόμενου κύκλου φθορίζοντος ανιχνευτή
<b>Ακίνητοποιημένες πρωτεΐνες από βιβλιοθήκες cDNA</b>		
Ειδικότητα υποστρώματος κινάσης	119	Ραδιοπροσδιορισμός
Ταυτοποίηση πρωτεϊνών που προσδέχουν καλμοδουλίνη και φωσφολιπίδια	5800	Φθορίζων ανιχνευτής

Πίνακας 3.

Οι παραδοσιακές προσεγγίσεις στις μικροσυστοιχίες βασίζονται σε άμεσους προσδιορισμούς πρόσδεσης, όπου ο βαθμός του υβριδισμού και το σήμα που ανιχνεύεται αποτελούν ένα μέτρο της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας στο πειραματικό δείγμα. Αυτή η προσέγγιση, προερχόμενη από το πεδίο των νουκλεϊκών οξέων, μπορεί να αποτύχει αν εφαρμοστεί σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ αντισώματος και αντιγόνου λόγω έλλειψης των χαρακτηρισμένων αντισωμάτων, της σημαντικής ετερογένειας των συγγενειών των αντισωμάτων, της εξάρτησής τους από το βαθμό τροποποίησης της πρωτεΐνης κατά σήμανση και της εγγενούς διασταυρωτής αντιδραστικότητας των αντισωμάτων. Τα προβλήματα αυτά μπορούν δυνητικά να περιορίσουν τις δυνατότητες των προσδιορισμών της συγγένειας εις πολλαπλούν και σε πολλές περιπτώσεις να αποκλείσουν την ποσοτική μελέτη του προφίλ της πρωτεΐνης με χρήση μικροσυστοιχιών αντισωμάτων.

Ένας αριθμός από προσεγγίσεις που στοχεύουν στο να επιτύχουν ποσοτική μελέτη του προφίλ της πρωτεΐνης σε πολλαπλή μορφή έχουν αναφερθεί πρόσφατα. Από αυτές που έχουν αναφερθεί, οι τρεις πιο υποσχόμενες οδοί συμπεριλαμβάνουν ενίσχυση σήματος, πολυχρωματική ανίχνευση και προσεγγίσεις ανταγωνιστικής εκτόπισης σε δοκιμασίες συγγένειας εις πολλαπλούν (multiplex affinity assays) συγγένειας. Συγκεκριμένα η ανταγωνιστική εκτόπιση υπερνικά τα προβλήματα τα σχετιζόμενα με ποσοτικοποίηση των

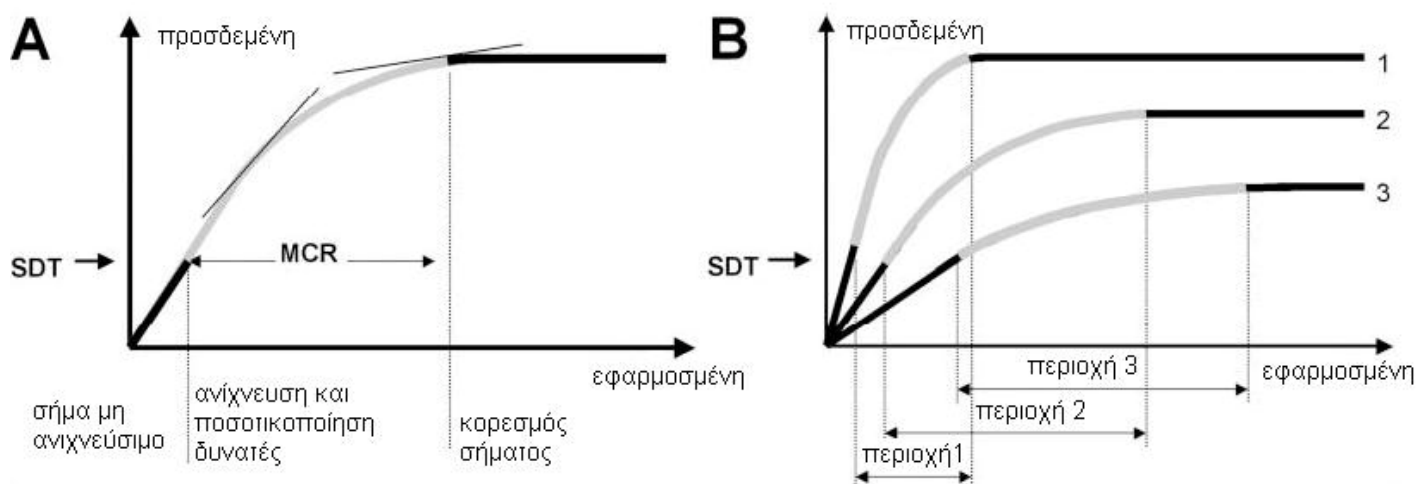
αλληλεπιδράσεων συγγένειας και παρέχει την πιο γενική προσέγγιση ιδιαίτερα σε παράλληλους προσδιορισμούς συγγένειας, συμπεριλαμβανομένων των μικροσυστοιχιών αντισωμάτων.

Δεδομένης της επιτυχίας στο πεδίο των συστοιχιών των νουκλεϊκών οξέων, πολλοί έχουν αποδεχθεί ότι οι συστοιχίες αντισωμάτων θα έπρεπε να αποφέρουν παρομοίως άμεσα δεδομένα. Αντίθετα από τις προσδοκίες, η τεχνολογία μικροσυστοιχιών έχει συχνά αποτύχει στο να παραγάγει σημαντικά αποτελέσματα όταν εφαρμόζεται στις πρωτεΐνες. Σε αντίθεση με τα mRNAs, οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν μια πολύ ευρύτερη περιοχή συγκεντρώσεων και φυσικοχημικών ιδιοτήτων, με αποτέλεσμα οι πειραματικές συνθήκες να μην μπορούν να βελτιστοποιηθούν ταυτόχρονα για όλες τις πρωτεΐνες που προσδιορίζονται. Επιπλέον παραδοσιακές προσεγγίσεις στις μικροσυστοιχίες βασίζονται σε άμεσους προσδιορισμούς πρόσδεσης, όπου ο βαθμός της υβριδίσωσης και το σήμα που ανιχνεύεται αποτελούν μια εκτίμηση της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας στο πειραματικό δείγμα. Αυτή η προσέγγιση έχει λειτουργήσει με ολιγονουκλεοτίδια και τμήματα cDNA αλλά μπορεί να αποτύχει αν εφαρμοστεί σε αλληλεπιδράσεις αντισώματος-αντιγόνου, κυρίως λόγω της σημαντικής ετερογένειας των συγγενειών των αντισωμάτων (που μπορεί να εκτείνεται σε πολλές τάξεις μεγέθους). Το πιο σημαντικό, η σήμανση των πρωτεϊνών, σε αντίθεση με τη σήμανση των νουκλεϊκών οξέων, έχει ως αποτέλεσμα τη χημική τροποποίηση των πρωτεϊνών και μπορεί συχνά να επιφέρει βλάβη στους επιτόπους αντιγόνων και να τροποποιήσει τη συγγένεια της αλληλεπίδρασης. Όλα αυτά τα προβλήματα μαζί περιορίζουν τις δυνατότητες προσδιορισμών της συγγένειας εις πολλαπλούν και σε πολλές περιπτώσεις αποκλείουν την ποσοτική μελέτη του προφίλ της πρωτεΐνης με τη χρήση μικροσυστοιχιών αντισωμάτων.

Υπάρχει μια ποικιλία μεθόδων για τον προσδιορισμό καθαρών πρωτεϊνών ή για τον προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης σ' ένα μείγμα. Αυτές περιλαμβάνουν απορρόφηση UV (1), τη μέθοδο Lowry (2), τη δοκιμασία BCA (bicinchoninic acid) (3), τη μέθοδο Bradford (4), ιωδιούχο χαλκό (5) και τις τεχνικές με χρωστική αργύρου (6). Ωστόσο αυτές οι μέθοδοι δεν επιτρέπουν multiplexing (προσδιορισμούς εις πολλαπλούν) λόγω των φυσικών τους περιορισμών, της δαπάνης, της μικρής δυνατότητας αναπαραγωγής και της μεγάλης κατανάλωσης δείγματος. Όλες αυτές οι μέθοδοι απαιτούν είτε παρασκευάσματα καθαρής πρωτεΐνης ή πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τις τεχνικές απομόνωσης της πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες γενικά χωρίζονται, καθαρίζονται και προσδιορίζονται με βάση ή τις φυσικές τους ιδιότητες (π.χ. μέγεθος, φορτίο, υδροφιλία/υδροφοβία) ή τον βαθμό της παρουσίας μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων ή τις λειτουργικές τους ιδιότητες (π.χ. σύνδεση προσδέματος, αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών κ.λ.π.) ή με τη χρήση αντιδραστηρίων συγγένειας (π.χ. αντισώματα ή τμήματά τους, ενώσεις μιμούμενες τα αντισώματα, τεχνητά παραγόμενα αντιδραστήρια συγγένειας όπως μοριακά πολυμερή από αποτύπωση κ.λ.π.). Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των βασισμένων σε αντιδραστήρια

συγγένειας δοκιμασιών είναι η δυνατότητα για ταυτόχρονη αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών, με την ευκαιρία μίας γρήγορης απόκρισης. Έτσι εξηγείται και το αυξημένο ενδιαφέρον για τις δοκιμασίες που βασίζονται στη συγγένεια. Ωστόσο, λόγω της φύσης της αναγνώρισης της συγγένειας, η ποσοτικοποίηση τέτοιων αλληλεπιδράσεων μπορεί να είναι προβληματική.

Το σχήμα 18Α δείχνει τι συμβαίνει όταν ένα αντίσωμα χρησιμοποιείται για να προσδέσει ένα αντιγόνο-στόχο. Το μετρήσιμο εύρος συγκέντρωσης για το αντιγόνο-στόχο περιορίζεται από το κατώτερο και το ανώτερο όριο. Ενώ το κατώτατο όριο ανίχνευσης του σήματος εξαρτάται από το συγκεκριμένο σύστημα ανίχνευσης που χρησιμοποιείται, ο κορεσμός του σήματος θα καθορίσει τη μέγιστη συγκέντρωση πρωτεΐνης που μπορεί να μετρηθεί. Εξάλλου λόγω του μη γραμμικού χαρακτήρα μιας ισόθερμης της πρωτεϊνικής πρόσδεσης, που γίνεται πιο «ρηχή» στις πιο υψηλές συγκεντρώσεις αντιγόνου, η διασπορά των πειραματικών δεδομένων και οι αναλυτικές ικανότητες του συστήματος ανίχνευσης μπορούν να περιορίσουν ακόμα περισσότερο το εύρος της μετρήσιμης συγκέντρωσης σε υψηλές συγκεντρώσεις αντιγόνου. Επιπλέον, το κάθε σύστημα δοκιμασίας (είτε ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί ELISA, είτε αποτύπωση ή κάθε θέση-σημείο σε μια συστοιχία αντισωμάτων κλπ) θα χαρακτηρίζεται από ένα μοναδικό σύνολο παραμέτρων πρόσδεσης. Γι' αυτό, αν είναι απαραίτητη η ποσοτικοποίηση της πρόσδεσης, θα χρειαστεί μια βαθμονομημένη καμπύλη για καθένα από τα αναλυόμενα αντιγόνα. Αυτό παύει να είναι πρακτικό όταν επιδιώκονται περισσότερες δοκιμασίες. Αν και το αποτελεσματικό μετρήσιμο εύρος συγκέντρωσης μπορεί να επεκταθεί προς τα πάνω για κάθε ξεχωριστή πρωτεΐνη, με το να κάνουμε προσδιορισμό σε ένα πιο αραιωμένο δείγμα, αυτό δεν μπορεί εύκολα να επεκταθεί και προς τα κάτω χωρίς τη χρήση πρόσθετης ενίσχυσης σήματος. Στην πράξη, μία δοκιμασία συγγένειας απαιτεί διεξαγωγή και βαθμονομημένης καμπύλης και μιας σειράς από αραιώσεις του αγνώστου δείγματος, ώστε να διασφαλίσουμε ότι τουλάχιστον μία αραιώση θα πέσει μέσα στο εύρος των βαθμονομημένων προτύπων διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης μπορούν να μετρηθούν με τη χρήση πιο αποτελεσματικών συστημάτων σήμανσης/ανίχνευσης (πχ πρωτεϊνική σήμανση μέσω DNA (DNA-mediated protein labeling)) ή με την εφαρμογή τεχνικών πρόσθετης ενίσχυσης σήματος (όπως στην ELISA) ή χρησιμοποιώντας την ισόθερμη ενίσχυση κυλιόμενου κύκλου (isothermal rolling-circle amplification, RCAT).



Εικόνα 18. Ένα παράδειγμα άμεσης πρόσδεσης αντισώματος-αντιγόνου. (A) Η ποσότητα της πρωτεΐνης που προσδένεται στο αντίσωμά της θα κορεστεί αυξανόμενης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, εμποδίζοντας ακριβείς μετρήσεις σε υψηλές συγκεντρώσεις. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις δεν μπορούν να ανιχνευθούν λόγω των ορίων ευαισθησίας της ανίχνευσης. Το μετρήσιμο εύρος της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης είναι περιορισμένο. Η ισόθερμη της πρόσδεσης δεν είναι γραμμική και συνεπώς η απόλυτη συγκέντρωση δεν μπορεί να προσδιοριστεί εκτός εάν βαθμονομηθεί όλο το εύρος. Αυτό καθιστά την προσέγγιση της άμεσης πρόσδεσης ακατάλληλη για ποσοτικούς προσδιορισμούς συγγένειας της πρωτεΐνης υψηλής ρυθμοαπόδοσης (συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών). (B) Ένα σύνολο από τρεις ισόθερμες άμεσης πρόσδεσης. Το εύρος της ανιχνευσιμότητας για την καθεμία δεικνύεται με πιο ανοιχτό χρώμα (περιοχή 1, 2, 3). Το κατώτατο όριο ανιχνευσιμότητας του σήματος καθορίζεται από την ευαισθησία ανίχνευσης (και τη συγγένεια της αλληλεπίδρασης), ενώ το ανώτατο εύρος περιορίζεται από τον κορεσμό της πρόσδεσης. Η κλίση των ισόθερμων πρόσδεσης, το κατώτατο όριο ανίχνευσης και το εύρος της ανίχνευσης είναι διαφορετικά για το καθένα από τα προσδέματα συγγένειας που εικονίζονται.

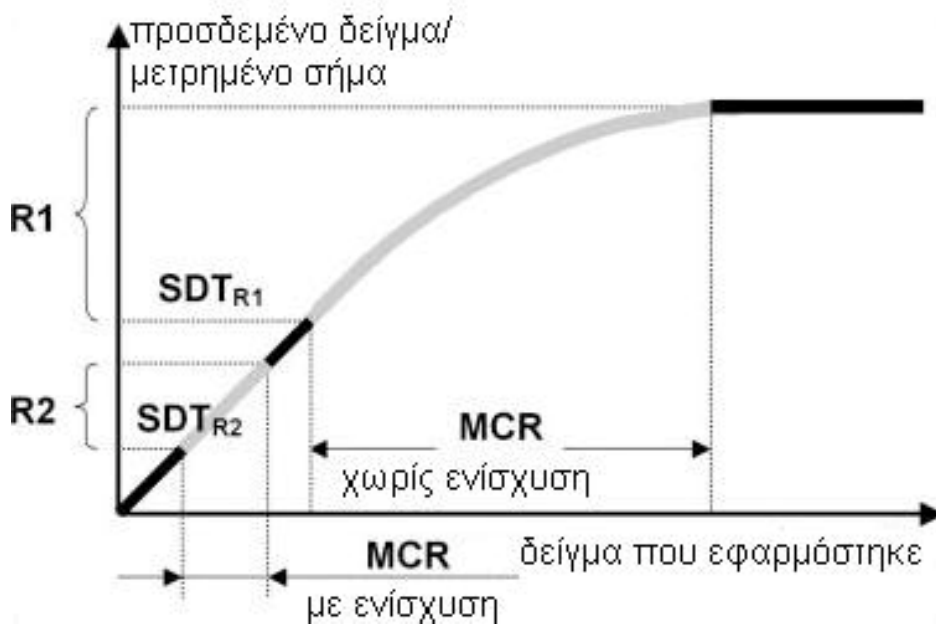
Ένας συνδυασμός σχεδόν 15 χρόνων εμπειρίας της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών DNA και της διαπίστωσης ότι η πρωτεϊνική έκφραση και λειτουργία πρέπει να αναλυθούν για να επιταχυνθεί η πρόοδος στην ιατρική, κατέστησαν τον αυτοματισμό, τη μικροσκοπικοποίηση και την επένδυση, απαραίτητα για την τεχνολογική πρόοδο που απαιτείται για να επιτραπεί η δημιουργία λειτουργικών δοκιμασιών συγγένειας πρωτεϊνών. Ωστόσο μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί μόνο λίγες εξειδικευμένες δοκιμασίες πρωτεϊνών για αναλύσεις εστιασμένες σε ομάδες πρωτεϊνών ή πεπτιδίων και διαγνωστικών chips χαμηλής πολυπλοκότητας για εξετάσεις δειγμάτων ασθενών. Παρόλο που η πολυπλοκότητα των δοκιμασιών συγγένειας αυξάνεται και πλέον έχει φτάσει σε ένα μέγιστο αριθμό θέσεων της τάξεων λίγων εκατοντάδων, μια συστοιχία-αντισωμάτων εύρους πρωτεωμικής βρίσκεται σήμερα πολύ πέρα από τις δυνατότητες της βιοτεχνολογίας. Αν υποθέσουμε ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα

περιέχει περίπου 40000 διαφορετικά γονίδια και ότι τουλάχιστον 10 διαφορετικά συρραμμένες ή μετα-μεταφραστικά τροποποιημένες ισομορφές παράγονται τυπικά από κάθε γονίδιο, μία πρωτεϊνική συστοιχία θα έπρεπε να περιέχει περίπου 400 000 διαφορετικά αντισώματα διατεταγμένων εις διπλούν ή εις πολλαπλούν για να είναι πλήρως κατανοητά. Δύο μεγάλοι περιορισμοί είναι ο μικρός αριθμός διαφορετικών «ειδικά» χαρακτηρισμένων αντιδραστηρίων συγγένειας που διατίθενται και οι περιορισμοί λόγω της φύσης των αλληλεπιδράσεων συγγένειας. Αυτά τα δύο προβλήματα συσχετίζονται. Υπάρχουν πολλά μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα διαθέσιμα που μπορούν να λειτουργήσουν σε προσδιορισμούς πρωτεϊνών. Ωστόσο, οι συγγένειες αυτών των αντισωμάτων ποικίλουν πολύ και μόνο σπάνια θα λειτουργήσουν σωστά σε μια μικροσυστοιχία ή σε άλλα παρόμοια συστήματα. Επιπλέον, είναι δύσκολο να εξακριβώσουμε αν ένα σήμα που παράγεται από ένα τέτοιο αντίσωμα αντιστοιχεί σε μόνο μία «σωστή πρωτεΐνη» έναντι της οποίας επιλέχθηκε αρχικά. Ένας τρόπος να ελέγξουμε τις παραμέτρους των αντιδραστηρίων συγγένειας είναι ο σχεδιασμός συνθετικών πιο ελεγχόμενων αντιδραστηρίων. Τρεις προσεγγίσεις που έχουν αναφερθεί πρόσφατα, επιτρέπουν να ξεπεραστούν μερικώς ή πλήρως οι περιορισμοί των συστημάτων παράλληλης συγγένειας και περιγράφονται κατωτέρω.

### Ενίσχυση σήματος

Η ενίσχυση σήματος γενικά επιτρέπει την ανίχνευση μικρότερων ποσοτήτων και μεταθέτει τα παράθυρα του μετρήσιμου εύρους συγκέντρωσης (MCR) (δηλ. το εύρος ανίχνευσης) προς μικρότερες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών. Ωστόσο, αν εφαρμοστεί σε μία δοκιμασία προσδιορισμού συγγένειας, η ενίσχυση σήματος μετακινεί το παράθυρο ανίχνευσης πέρα από συνθήκες κορεσμού (η λιγότερο γραμμική ισόθερμη πρόσδεσης, σχ. 19), με αποτέλεσμα μια πιο γραμμική καμπύλη πρόσδεσης και συνεπώς πιο ποσοτικά αποτελέσματα.

Συμπερασματικά, η ενίσχυση σήματος αυξάνει την ευαισθησία της δοκιμασίας, επεκτείνοντας έτσι το μετρήσιμο γραμμικό εύρος με μια δοκιμασία άμεσης πρόσδεσης, δίνοντας μεγαλύτερη ευαισθησία και ευρύτερη δυνατότητα εφαρμογής σε συνδυασμό με απαιτούμενο λιγότερο δείγμα. Ωστόσο, η ενίσχυση τυπικά απαιτεί ειδική σήμανση πρωτεϊνών και συχνά σημαίνει λιγότερο δυνατές τεχνικές με περισσότερα στάδια, μεγαλύτερους χρόνους και είναι επιρρεπής σε μεγαλύτερα ποσοστά λάθους.



Εικόνα 19. Ένα παράδειγμα άμεσης πρόσδεσης αντισώματος-αντιγόνου απεικονιζόμενο για συστήματα με ή χωρίς ενίσχυση σήματος. Φαίνονται το κατώτατο όριο ανίχνευσης σήματος (SDT) και το μετρήσιμο εύρος συγκέντρωσης (MCR). Η ενίσχυση σήματος έχει ως αποτέλεσμα μια μετακίνηση του εύρους ανίχνευσης (σύγκριση R1 και R2) και μια μετακίνηση του μετρήσιμου εύρους συγκέντρωσης προς τα κάτω, μακριά από τη μη γραμμική περιοχή (κορεσμός πρόσδεσης).

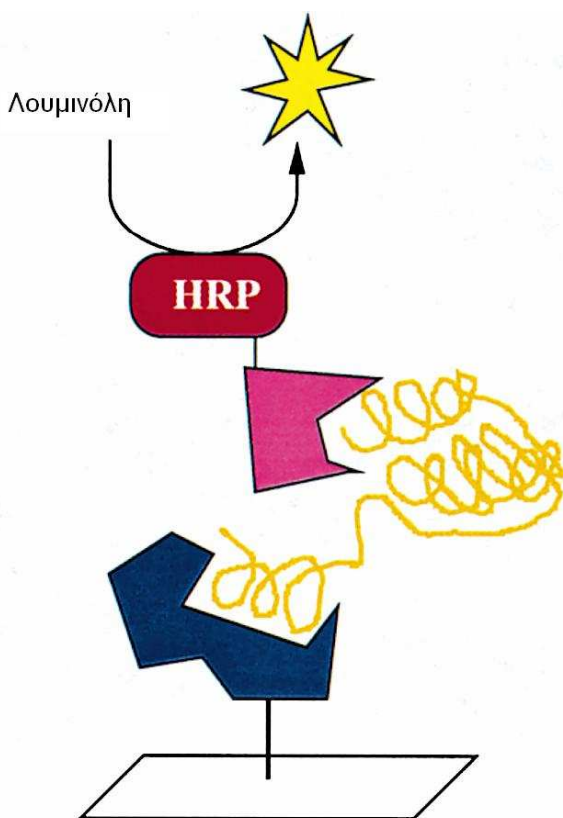
### ΕΙΣ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΣΑΝΤΟΥΙΤΣ (multiplexed sandwich assays)

Συστήματα που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών πρωτεϊνών σε μία δοκιμασία έχουν αναπτυχθεί με βάση την συνήθη μεθοδολογία ELISA. Μια εναλλακτική μέθοδος για την ανίχνευση σημασμένων αναλυόμενων ουσιών είναι η «δοκιμασία σάντουιτς» (εικόνα 20), που χρησιμοποιεί δύο αντισώματα που προσδένονται ταυτόχρονα στο ίδιο αντιγόνο : Για παράδειγμα, ένα ακινητοποιημένο αντιδραστήριο δέσμευσης (συνήθως ένα αντίσωμα) χρησιμοποιείται για την πρόσδεση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει και ένα δεύτερο αντίσωμα «ανίχνευσης» είτε σημασμένο με φθορισμό είτε συζευγμένο με ένα ένζυμο που μπορεί να παραγάγει ένα φθορίζον, φωταυγές ή έγχρωμο προϊόν όταν παρέχεται το κατάλληλο υπόστρωμα (π.χ. βιοτίνη) προσδένεται σε ένα δεύτερο επίτοπο πάνω στη δεσμευμένη πρωτεΐνη για να δημιουργήσει ένα «σάντουιτς αντισωμάτων». Το σημασμένο πρόσδεμα σάντουιτς προσκολλάται στο chip μόνο εάν η αναλυόμενη πρωτεΐνη έχει προσδεθεί.

Η πρωτεϊνική δοκιμασία ELISA τύπου σάντουιτς προσφέρει το πλεονέκτημα της χρήσης παραδοσιακών τεχνολογιών και προσαρμοσμένων πρωτοκόλλων για την παραγωγή ποσοτικών δεδομένων, που βασίζονται σε εσωτερικές πρότυπες καμπύλες. Το δείγμα της πρωτεΐνης δεν απαιτεί σήμανση και αυτό αποτρέπει την αλλοίωση και κάλυψη των επιτόπων

αναγνώρισης, και οι ουσίες σε μικρή συγκέντρωση μπορούν να ανιχνευθούν μέσω των σταδίων ενίσχυσης σήματος. Επιπλέον, η χρήση δύο αντισωμάτων ανά αναλυόμενη ουσία δηλ. για δέσμευση και ανίχνευση, αυξάνει την ειδικότητα της δοκιμασίας επειδή δύο διαφορετικά αντιδραστήρια πρέπει να αναγνωρίσουν ταυτόχρονα την πρωτεΐνη για να παραγάγουν το σήμα. Ωστόσο, εφόσον χρειάζονται περισσότερα από ένα αντισώματα ανά αναλυόμενη πρωτεΐνη, με καθένα από αυτά να απαιτείται για την αναγνώριση ενός ιδιαίτερου επιτόπου και ενός που απαιτεί τροποποίηση, αυτό αυξάνει το κόστος, τον χρόνο και την περιπλοκότητα της δοκιμασίας.

Επίσης, δεδομένου ότι τα προσδέματα δέσμευσης και σάντουιτς δεν ανταγωνίζονται το ένα το άλλο για την πρωτεΐνη-στόχο, τα πειράματα ανταγωνιστικής πρόσδεσης ή πρέπει να διεξαχθούν με τα προσδέματα απομονωμένα σε έναν αρχικό έλεγχο ή ένας δεύτερος έλεγχος θα πρέπει να γίνει για προσδέματα που συνδέονται με την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει παρουσία κορεσμένων ποσοτήτων του αρχικά επιλεγμένου προσδέματος. Σε κάθε περίπτωση αυτό περιπλέκει περισσότερο το ήδη μεγάλο πρόβλημα της απομόνωσης των προσδεμάτων.



Εικόνα 20. Σχηματική εικόνα μιας δοκιμασίας τύπου σάντουιτς για την ανίχνευση της πρόσδεσης της πρωτεΐνης-στόχου (πορτοκαλί) στο ακινητοποιημένο πρόσδεμα (μπλε). Ένας δεύτερος παράγοντας πρωτεϊνικής πρόσδεσης (ροζ) θα απομονωθεί που δεν ανταγωνίζεται το ακινητοποιημένο πρόσδεμα δέσμευσης. Το τελευταίο μόριο θα συντηχθεί με το HRP (κόκκινο) ή κάποιο άλλο ένζυμο αναφοράς που θα επιτρέψει την ενίσχυση και οπτική εμφάνιση του γεγονότος της πρόσδεσης. Αυτό το είδος στρατηγικής ανίχνευσης δεν απαιτεί χημική σήμανση του πρωτεϊνικού δείγματος.



## Διχρωματική ανίχνευση

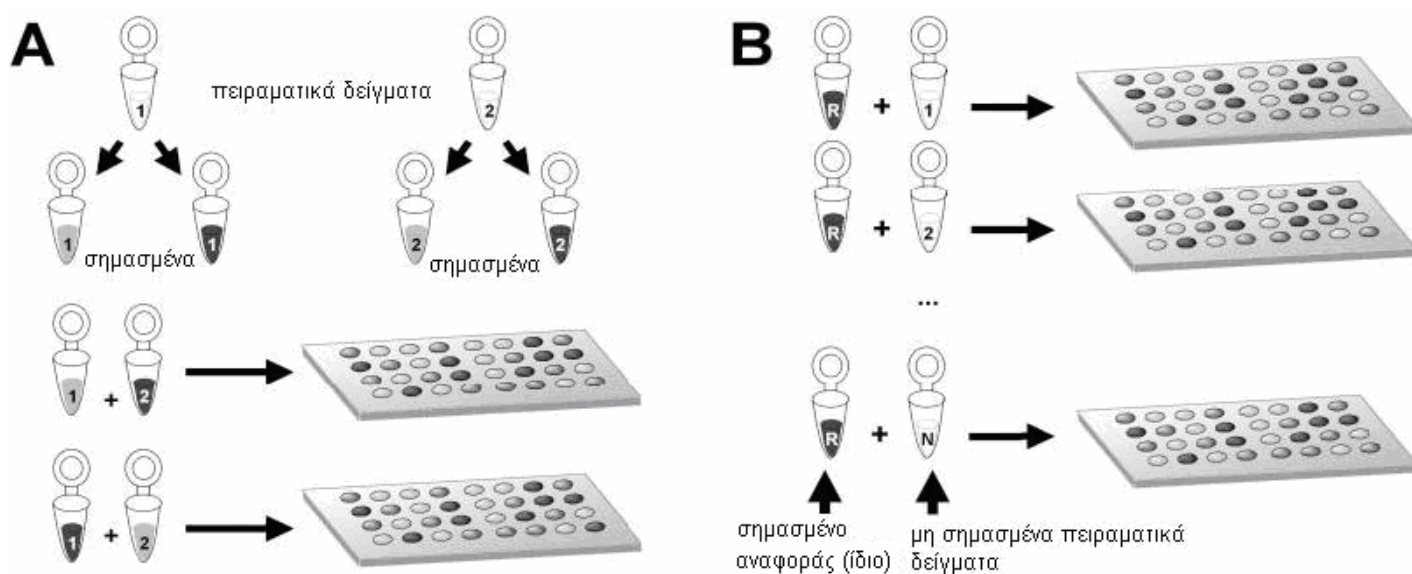
Η προσέγγιση της διχρωματικής ανίχνευσης εφαρμόστηκε με επιτυχία στην μελέτη του προφίλ των νουκλεϊκών οξέων με χρήση μικροσυστοιχιών και επεκτάθηκε στη συνέχεια στην πρωτεϊνική ανίχνευση. Πρόκειται για μία τυπική μορφή δοκιμασίας άμεσης πρόσδεσης, βασισμένης σε φθορισμό, στην οποία ομοιοπολικά ακινητοποιημένα αντισώματα χρησιμοποιούνται για να δεσμεύσουν αντιγόνα που έχουν σημανθεί με φθορισμό. Κατά συνέπεια η δοκιμασία δε μετράει συγκεντρώσεις πρωτεΐνης. Αντ' αυτού παρέχει ένα σχετικό μέτρο πρωτεϊνικής ποσότητας, δηλαδή τα επίπεδα πρωτεΐνης σε ένα δείγμα συγκρίνονται με αυτά σε ένα δεύτερο δείγμα. Η διχρωματική ανίχνευση είναι μία δοκιμασία στην οποία δύο δείγματα με διαφορετική σήμανση ανταγωνίζονται για την πρόσδεση στο ίδιο αντίσωμα-στόχο. Η ισορροπία των χρωμάτων δείχνει ποια από τις δύο ενώσεις ήταν παρούσα στη μεγαλύτερη συγκέντρωση και ποια στη μικρότερη. Σημαντικό είναι ότι ο ανταγωνιστικός χαρακτήρας της δοκιμασίας αντισταθμίζει την ετερογένεια των αντισωμάτων, έναν από τους μεγαλύτερους περιορισμούς των παραλλήλων δοκιμασιών συγγένειας.

Συμπερασματικά, με τη δοκιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων σε ένα πείραμα με χρήση διχρωματικής ανίχνευσης, ξεπερνιέται το πρόβλημα της ετερογένειας στις συγγένειες των αντισωμάτων αλλά μπορούν να καταστούν αναγκαίες πρόσθετες αντιδράσεις σήμανσης και πολλαπλές δοκιμασίες πρόσδεσης, αν και αυτό μπορεί να αυξήσει την εμπιστοσύνη στα αποτελέσματα των μετρήσεων. Ωστόσο, ακόμα και αυτή η τεχνική έχει δυσκολίες στην αντιστάθμιση των διακυμάνσεων που μπορεί να λάβουν χώρα κατά τη σήμανση των πρωτεϊνών.

## Μονοχρωματική ανίχνευση δοκιμασιών ανταγωνιστικής εκτόπισης

Οι τρέχουσες τεχνικές που βασίζονται σε μικροσυστοιχίες υπόκεινται σε κάποιους περιορισμούς. Επιπλέον, η εγγενής ετερογένεια των πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων σημαίνει ότι προσλαμβάνουν τη σήμανση σε διαφορετικό βαθμό και μπορεί να εμπλουτιστούν ή να αραιωθούν διαφορετικά κατά τα στάδια του καθαρισμού. Η τεχνική της μονοχρωματικής ανίχνευσης (που περιγράφεται περιληπτικά στην εικόνα 21) δεν απαιτεί σήμανση των πειραματικών δειγμάτων της πρωτεΐνης κι έτσι η κατανάλωση του δείγματος μειώνεται. Αυτή η προσέγγιση είναι συγκριτικά ευνοϊκή για τις παραδοσιακές πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες με πολλούς τρόπους. Για παράδειγμα η ποιοτική σύγκριση δύο μόνο δειγμάτων με τη χρήση στρατηγικής της διχρωματικής ανίχνευσης θα απαιτούσε τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις σήμανσης του πειραματικού δείγματος, έναν σαρωτή με δύο λέιζερ και δύο μικροσυστοιχίες. Η ανταγωνιστική δοκιμασία απαιτεί μόνο μία αντίδραση σήμανσης, σαρωτή ενός λέιζερ και δύο συστοιχίες. Ο αριθμός των συστοιχιών που απαιτούνται για την ανταγωνιστική δοκιμασία

είναι ίσος με τον αριθμό των προς σύγκριση δειγμάτων 3B). Πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η ανεξαρτησία από παραγόμενη μη ειδική πρόσδεση (background), η μη απαίτηση επιλογής και ταιριάσματος των συγγενειών των αντισωμάτων (που σε άλλη περίπτωση περιορίζει τον μέγιστο αριθμό αντισωμάτων στη δοκιμασία παράλληλα σε μία μόνο συστοιχία) και η δυνατότητα προσδιορισμού ευρείας περιοχής πρωτεϊνικών συγκεντρώσεων (δεν υπάρχει ανώτατο όριο στη συγκέντρωση των αντισωμάτων κατά τον προσδιορισμό). [3] [9]



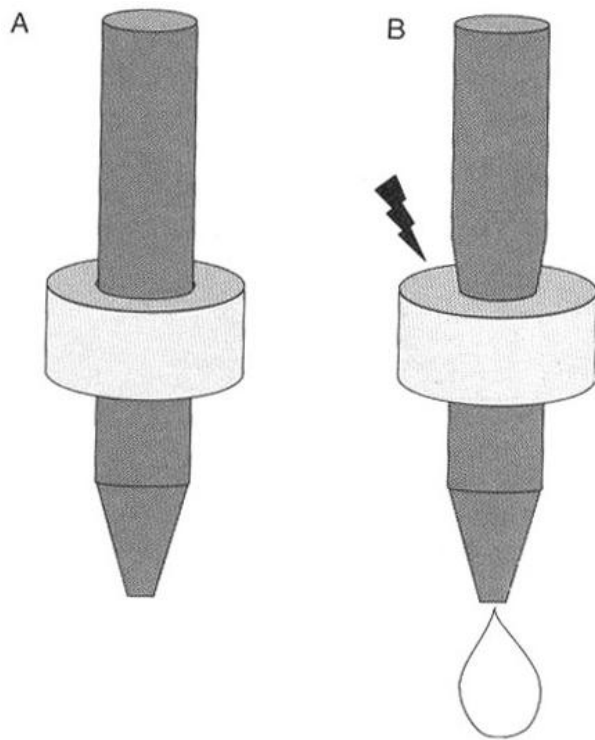
Εικόνα 21. Μελέτη ποσοτική του προφίλ πρωτεΐνης με χρήση συστοιχιών αντισωμάτων. (A) Διχρωματική ανίχνευση εφαρμόζεται σε συστοιχίες αντισωμάτων. Προκειμένου να αντισταθμιστεί η διαφορετική σήμανση/τροποποίηση των δειγμάτων, τα δύο προς σύγκριση δείγματα έχουν σημανθεί ξεχωριστά με δύο διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές (που εικονίζονται με ανοιχτό και σκούρο γκρι). Τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις σήμανσης και δύο δοκιμασίες πρόσδεσης απαιτούνται για τη σύγκριση δύο πειραματικών δειγμάτων. (B) Πρωτόκολλο μονοχρωματικής ανταγωνιστικής εκτόπισης. Μόνο ένα σημασμένο δείγμα αναφοράς απαιτείται και τα πειραματικά δείγματα δε χρειάζονται σήμανση. Το σημασμένο δείγμα αναφοράς μπορεί να είναι παρόμοιο ή ίδιο με ένα από τα πειραματικά δείγματα ή μπορεί να είναι ένα γενικό μίγμα μορίων όπως πρωτεΐνες, πεπτιδία κλπ, αρκεί να είναι προσδεμένα από τα αντισώματα σε στοίχιση και μπορούν να εκτοπισθούν από πρωτεΐνες, παρούσες στο πειραματικό δείγμα. Η δοκιμασία συγκρίνει τις δυνατότητες εκτοπισμού (τιμές  $K_D$ ) μεταξύ των μη σημασμένων πειραματικών δειγμάτων, σε σχέση με τα αντισώματα.

## ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ

Η παρασκευή μικροσυστοιχιών από καθαρισμένες πρωτεΐνες αποτελεί μεγαλύτερη πρόκληση από την κατασκευή των αντίστοιχων DNAs. Πέρα από τις περιπλοκές της προετοιμασίας εκατοντάδων χιλιάδων διαφορετικών πρωτεϊνικών δειγμάτων, οι πρωτεΐνες πρέπει να παραμένουν ενεργές κατά την κατασκευή και ανίχνευση των μικροσυστοιχιών. Ρομποτικό τύπωμα πρωτεϊνών πάνω σε επιφάνειες έχει εφαρμοστεί με χρήση οργάνων σχεδιασμένων για εναπόθεση DNA. Ένα μειονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι οι μεγάλοι χρόνοι τυπώματος που, σε συνδυασμό με τους μικρούς όγκους που τοποθετούνται στις επιφάνειες, έχουν γενικά ως αποτέλεσμα την ξήρανση των θέσεων των πρωτεϊνών. Για την βελτίωση αυτού του προβλήματος απαιτείται η διατήρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε ψύξη κατά την αποθήκευσή τους για όσο το δυνατό περισσότερο χρόνο, η ύγρανση του θαλάμου της εναπόθεσης και επίσης η προσθήκη γλυκερόλης στα πρωτεϊνικά διαλύματα για να διατηρήσουν οι πρωτεΐνες την φυσική τους κατάσταση πάνω στην επιφάνεια της πλάκας. Οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για το τύπωμα των πρωτεϊνικών συστοιχιών είναι παρόμοιες μ' αυτές που αναπτύχθηκαν για τις μικροσυστοιχίες DNA, αλλά με κάποιες σημαντικές διαφορές, όπως το ποσοστό υγρασίας του περιβάλλοντος, η πυκνότητα του τυπώματος και η απόσταση μεταξύ των δειγμάτων.

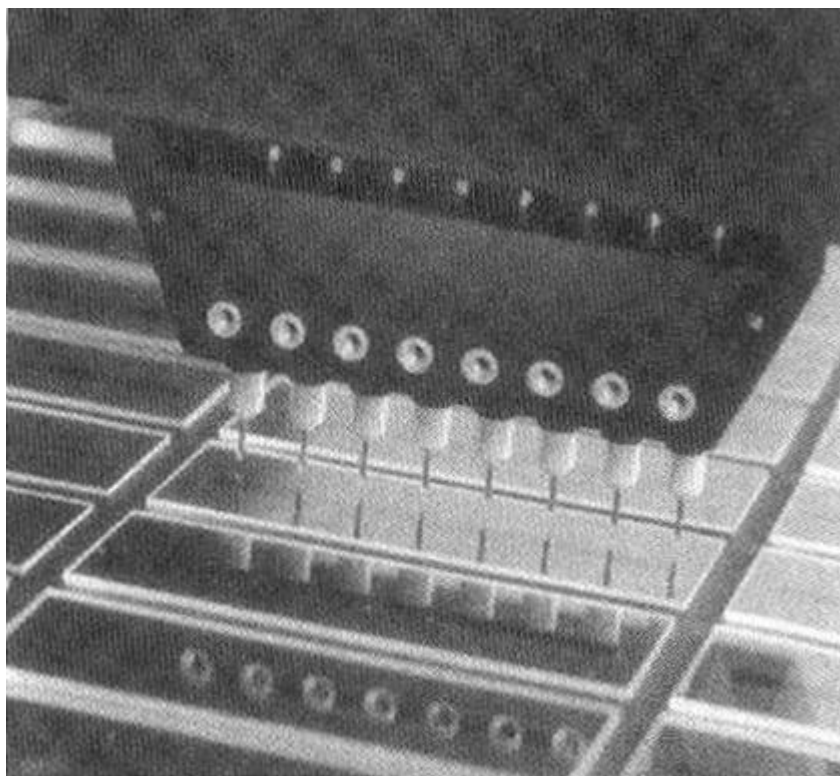
Όπως και με τις συστοιχίες DNA, η ακρίβεια της κατασκευής πρέπει να εκτιμάται σχετικά με την συνοχή του τυπώματος κατά μήκος όλων των στοιχείων πάνω στη συστοιχία, την συνοχή μεταξύ στοιχείων από πολλαπλές συστοιχίες και την ομοιομορφία των συγκεντρώσεων των δειγμάτων.[9] [12]

Συνήθως τα πρωτεϊνικά chips παρασκευάζονται ακινητοποιώντας πρωτεΐνες πάνω σε μία επεξεργασμένη αντικειμενοφόρο πλάκα χρησιμοποιώντας έναν διανεμητή επαφής ή έναν μικροστοιχητή άνευ επαφής (εικόνες 22, 23, 24). Άλλες μέθοδοι τυπώματος περιλαμβάνουν εναπόθεση με στάμπα υδροπηκτικής από υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα, τύπωμα inkjet, ηλεκτροψεκασμό μέσα από μια διηλεκτρική μάσκα πλέγματος και απευθείας εφαρμογή πρωτεϊνικών διαλυμάτων μέσω δικτύων μικρορευστότητας. Με όλες αυτές τις μεθόδους η πρόκληση είναι το να διατηρήσουμε τις πρωτεΐνες συνεχώς ενυδατωμένες και το να ελαχιστοποιήσουμε την αποδιάταξη των πρωτεϊνών από τα ποικίλα υλικά συσκευών και τη μεσοεπιφάνεια υγρού-αέρα. Πρόκειται για μία περιοχή ιδιαίτερη ανάγκη για καινοτομίες και βελτιώσεις. Επειδή όπως προαναφέρθηκε είναι ιδιαίτερης σημασίας το να παραμένουν οι πρωτεΐνες σε υγρό περιβάλλον κι επειδή τα δείγματα ρυθμιστικών διαλυμάτων περιέχουν ένα υψηλό ποσοστό γλυκερόλης, η διαδικασία του τυπώματος λαμβάνει χώρα σε ένα περιβάλλον ελεγχόμενης υγρασίας.

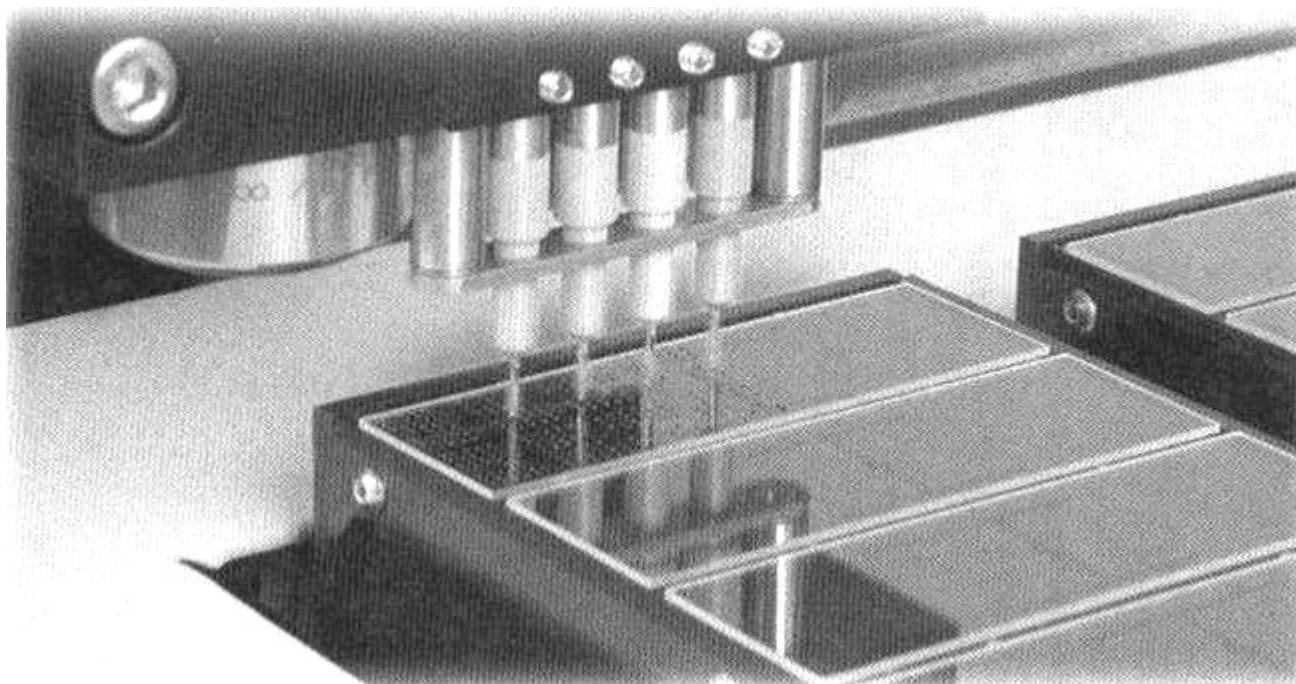


Εικόνα 22. Τεχνολογία πιεζο-διανεμητή και εφαρμογή inkjet. Η αρχή της εφαρμογής inkjet βασίζεται στον ψεκασμό και την εναπόθεση των μακρομορίων στο σχήμα ξεχωριστών θέσεων πάνω στην επιφάνεια του biochip. Όλα τα μακρομόρια μπορούν να φορτωθούν πάνω στο biochip με τον τρόπο αυτό. (Α) Ένας κεραμικός δακτύλιος τοποθετείται γύρω από έναν ελαστικό σωλήνα. (Β) Εάν ένας ηλεκτρικός σφιγμός (λάμψη) εφαρμοστεί στον κεραμικό δακτύλιο, αυτό συσπάζεται γύρω από την ελαστική μάνικα, πιέζοντας έτσι προς τα έξω μια σταγόνα από το μακρομοριακό διάλυμα.

Επειδή ο εξοπλισμός και οι διαδικασίες που αναπτύχθηκαν για τις μικροσυστοιχίες DNA προσαρμόζονται εύκολα στην ανάπτυξη των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών, η επιλογή της χρήσης κατεργασμένων αντικειμενοφόρων πλακών ακολουθεί τους ήδη διαθέσιμους ρομποτικούς μηχανισμούς στοίχισης και σαρωτές λέιζερ που έχουν γίνει συνήθεις στις μικροσυστοιχίες DNA. Ένας αριθμός διαφορετικών επιφανειών πλάκας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πρωτεϊνικά chips. Στην επιλογή της επιφάνειας πλάκας, οι στόχοι πρέπει να είναι η ακινητοποίηση της πρωτεΐνης πάνω στο chip, η διατήρηση της διαμόρφωσης και της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης και το να πετύχουμε μέγιστη ικανότητα πρόσδεσης. Είναι επίσης σημαντικό να εξετάσουμε αν είναι επιθυμητός ένας τυχαίος ή ομοιόμορφος προσανατολισμός των πρωτεϊνών πάνω στην επιφάνεια της πλάκας. Για τυχαία προσκόλληση των πρωτεϊνών μέσω αμινών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν γυάλινες επιφάνειες αλδεϋδικών ή εποξειδικών παραγώγων. Η επίστρωση της γυάλινης επιφάνειας με νιτροκυτταρίνη, επιστρώσεις πηκτής ή poly-L-λουσίνη επίσης επιτυγχάνει έναν τυχαίο προσανατολισμό των πρωτεϊνών, καθώς οι πρωτεΐνες προσροφώνται παθητικά πάνω στην επιφάνεια (εικόνα 25).[1] [9]

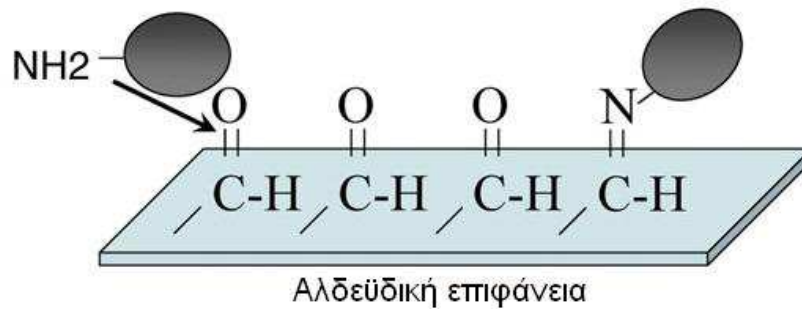


Εικόνα 23. Βελόνες πιεζο-διανεμητή. Το παράδειγμα αυτό απεικονίζει τις βελόνες του δοχείου και τις δεξαμενές υγρού των πιεζοσυστοιχιών της Perkin Elmer.

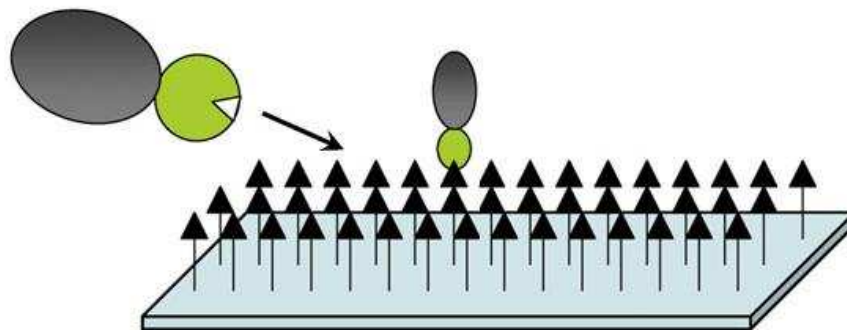


Εικόνα 24. Πιεζο-διανεμητής πάνω σε γυάλινους φορείς. Η κεφαλή τυπώματος τεσσάρων βελόνων των Πιεζοσυστοιχιών τοποθετεί τα δείγματα πικολίτρων πάνω σε κανονικούς γυάλινους φορείς.

(A) Τυχαία προσκόλληση



(B) Προσκόλληση προσδέματος



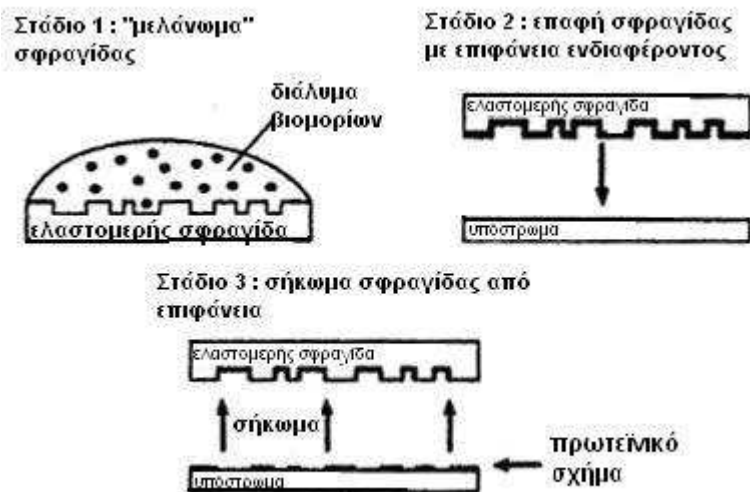
Εικόνα 25. Μέθοδοι προσκόλλησης πρωτεϊνών. (A) Οι πρωτεΐνες μπορούν να προσκολληθούν τυχαία μέσω διαφορετικών χημικών μεθόδων, συμπεριλαμβανομένων των αλδεϋδο- και εποξειδοκατεργασμένων πλακών που ομοιοπολικά προσδένουν την πρωτεΐνες από τις πρωτοταγείς αμίνες τους ή με προσρόφηση πάνω σε πλάκες επικαλυμμένες με νιτροκυτταρίνη ή επιστρώσεις πηκτής ακρυλαμιδίου. (B) Οι πρωτεΐνες μπορούν να είναι ομοιόμορφα προσανατολισμένες πάνω σε πλάκες επικαλυμμένες με πρόσδεμα.

Οι περισσότεροι σημερινοί μηχανισμοί εναπόθεσης για μικροσυστοιχίες διαθέτουν την κατάλληλη τεχνολογία για να χειριστούν τις αρχικές προκλήσεις που αντιμετωπίζει η ανάπτυξη των πρωτεϊνικών chips. Οι μηχανισμοί εναπόθεσης επαφής, αν και χρήσιμοι στον να διανέμουν όγκους μεγέθους νανόλιτρων δεν είναι κατάλληλοι, ούτε συνιστώνται για την εναπόθεση των πρωτεϊνών. Η φυσική επαφή μεταξύ του μεταλλικού (ή συνθετικού υλικού) άκρου του μηχανισμού και της επιφάνειας μπορούν να προκαλέσουν αποδιάταξη των ευαίσθητων πρωτεϊνών. Εκτός από την επίδρασή τους στα δείγματα ανιχνευτών, τέτοιοι μηχανισμοί εναπόθεσης μπορεί να βλάψουν και την επιφάνεια της μικροσυστοιχίας μέσω φυσικής χάραξης. Επίσης οι θέσεις νανόλιτρων έχουν την τάση να εξατμίζονται γρήγορα. Η ελαχιστοποίηση αυτών των φαινομένων επιτυγχάνεται συνήθως με την προσθήκη γλυκερόλης

στα διαλύματα των πρωτεϊνικών ανιχνευτών κατά το στάδιο της εναπόθεσης. Ενώ όμως το διάλυμα αυτό ελαχιστοποιεί τα φαινόμενα εξάτμισης, αυξάνει δραματικά το ιξώδες του διαλύματος του δείγματος, οδηγώντας σε φαινόμενα επιφανειακής τάσης που καθιστούν τη διανομή του δείγματος δύσκολη. Οι μηχανισμοί εναπόθεσης άνευ επαφής γενικά συνιστώνται για την εναπόθεση πρωτεϊνών σε επιφάνειες μικροσυστοιχιών. Τέτοιοι μηχανισμοί έχουν μικρό μηχανικό φορτίο στο προς εναπόθεση ρευστό και ως αποτέλεσμα αυτού, η κινητική ενέργεια του υγρού που διανέμεται είναι χαμηλή. Αυτό εμποδίζει την αύξηση της θερμοκρασίας του υγρού κι έτσι ελαττώνεται ο κίνδυνος της πρωτεϊνικής αποδιάταξης. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι επίσης γνωστοί για την υψηλή αναπαραγωγισιμότητα της διανομής.

Εκτός από την φύση του μηχανισμού εναπόθεσης, είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι στο τέλος η επιφάνεια είναι αυτή που επηρεάζει τις τελικές ιδιότητες της θέσης. Οι υδρόφιλες και υδρόφοβες ιδιότητες της επιφάνειας του υποστρώματος καθορίζουν το μέγεθος και το σχήμα της θέσης. Μεγάλες διαμέτροι θέσεων παρατηρούνται όταν η επιφάνεια είναι ιδιαίτερα υδρόφοβη και το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται κατά την εναπόθεση έχει χαμηλότερη επιφανειακή τάση. Έχει παρατηρηθεί ότι όσο πιο υδρόφοβη είναι η επιφάνεια του υποστρώματος (υπό την επήρεια ρυθμιστικών διαλυμάτων υψηλής επιφανειακής τάσης), τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα οι θέσεις που προκύπτουν να επιδεικνύουν ανομοιογένεια στο σχήμα τους και στην κατανομή των δειγμάτων στις θέσεις. Η επιφανειακή τάση ενός ρυθμιστικού διαλύματος μπορεί να αυξηθεί με την προσθήκη αλατιού και /ή με την προσθήκη ενός πολύ πολικού διαλύτη. Γενικά, η χρήση οργανικών διαλυτών δε συνιστάται, καθώς αυτοί τείνουν να προκαλούν αποδιάταξη στις πρωτεΐνες. Η κατανόηση της αλληλεπίδρασης του ρυθμιστικού διαλύματος εναπόθεσης και της επιφάνειας του υποστρώματος με τις ιδιότητες της θέσης αποτελεί μεγάλη πρόκληση και μια άριστη στρατηγική μπορεί να επιτευχθεί μόνο όταν βασίζεται σε πειραματικές δοκιμές και μελέτες σφάλματος.

Για ερευνητικά εργαστήρια μικρής κλίμακας υπάρχουν άλλες εναλλακτικές. Μια ενδιαφέρουσα μέθοδος είναι η χρήση τυπώματος μικροεπαφής (εικόνα 26) στον σχηματισμό περιοχών μεγέθους μικρομέτρων πάνω στην επιφάνεια της πρωτεϊνικής μικροσυστοιχίας. Πρωτεΐνες και άλλα μικρομόρια μπορούν να «σφραγιστούν» πάνω στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας μέσα σε λεπτά με την χρήση μιας ελαστομερούς κύριας σφραγίδας. Οι πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν ακινητοποιούνται αρχικά πάνω στην σφραγίδα με έναν μη αναστρέψιμο τρόπο και κατόπιν μεταφέρονται στην επιφάνεια υπό φυσική επαφή. Ο ακριβής μηχανισμός της μεταφοράς των πρωτεϊνών από την σφραγίδα στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος, αν και πιστεύεται ευρέως ότι τριχοειδείς δυνάμεις παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την όλη διαδικασία. Αν και η τεχνική αυτή είναι επιτυχημένη όσον αφορά στη διάταξη των πρωτεϊνών στις αυτο-διευθετούμενες μονοστοιβάδες (self-assembled monolayers, SAMs), ο ρόλος της σφραγίδας στην επιρροή των προσαρμοσμένων ιδιοτήτων όπως η πυκνότητα της στοίβαξης, ο προσανατολισμός και η σταθερότητα των πρωτεϊνών στην επιφάνεια απομένει να διευκρινιστεί.[17]



Εικόνα 26. Αναπαράσταση της διαδικασίας τυπώματος μικροεπαφής. Το στάδιο 1 υποδεικνύει την επικάλυψη της ελαστομερούς σφραγίδας με τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν. Μόλις η σφραγίδα καλυφθεί με μια στρώση από πρωτεΐνες, οι τελευταίες έρχονται σε επαφή με την αισθητήρια επιφάνεια της μικροσυστοιχίας (στάδιο 2). Κατά το στάδιο αυτό, οι πρωτεΐνες 'σφραγίζονται' ή διατάσσονται πάνω στην επιφάνεια του αισθητήρα. Μόλις γίνει ο σχηματισμός, η σφραγίδα απομακρύνεται απαλά καθώς ανασηκώνεται από τη μεσεπιφάνεια (στάδιο 3).



## ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Μία σημαντική πλευρά της ανάπτυξης των συστοιχιών των λειτουργικών πρωτεϊνών είναι η επιλογή ενός πειραματικού υποστηρικτικού υλικού και η σχετική μέθοδος επιφανειακής προσκόλλησης και ακινητοποίησης των πρωτεϊνών. Αν οι πρωτεΐνες μπορούν να ακινητοποιηθούν χωρίς να διασπάται η φυσική τους διαμόρφωση, το πιθανότερο είναι ότι θα παραμείνουν ενεργές *in vitro*. Η μέθοδος ακινητοποίησης θα επηρεάσει πολύ και τον προσανατολισμό με τον οποίο οι πρωτεΐνες προσκολλώνται στην επιφάνεια του υποστηρικτικού υλικού. Η επεξεργασία ενός κοινού σημείου προσκόλλησης για όλα τα δείγματα, συνήθως μέσω της συμπερίληψης ετικετών συγγένειας, διασφαλίζει ότι τουλάχιστον ένα υποσύνολο των πρωτεϊνών διατηρεί μια ομοιόμορφη παρουσίαση στους συνδέσμους (binders) φάσης-διαλύματος. Η διάταξη της συστοιχίας πρέπει να είναι συμβατή με τα κατάλληλα όργανα ανίχνευσης και να παρουσιάζει ευρεία δυναμική περιοχή τιμών έντασης, σχετική με πρόσδεση πρωτεϊνών ή γεγονότα κατάλυσης. Επιπροσθέτως, η μη ειδική πρόσδεση σημασμένων δειγμάτων θα έπρεπε να ελαχιστοποιείται προκειμένου να μειωθεί η μη ειδική πρόσδεση και να αυξηθεί το ποσοστό σήματος-θορύβου της πειραματικής διάταξης.

Προκειμένου λοιπόν να εδραιώσουμε αξιόπιστες αναπαραγωγίμες μικροσυστοιχίες ανίχνευσης πρωτεϊνών, είναι απαραίτητο να τοποθετήσουμε τους παράγοντες δέσμευσης με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρούν της ενεργό μορφή τους πάνω σε μια στερεή επιφάνεια. Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές μέθοδοι ακινητοποίησης για επίπεδες επιφάνειες (εικόνα 27):

- μη ειδική/μη ομοιοπολική
- μη ειδική/ομοιοπολική
- ειδικής θέσης/μη ομοιοπολική
- ειδικής θέσης/ομοιοπολική

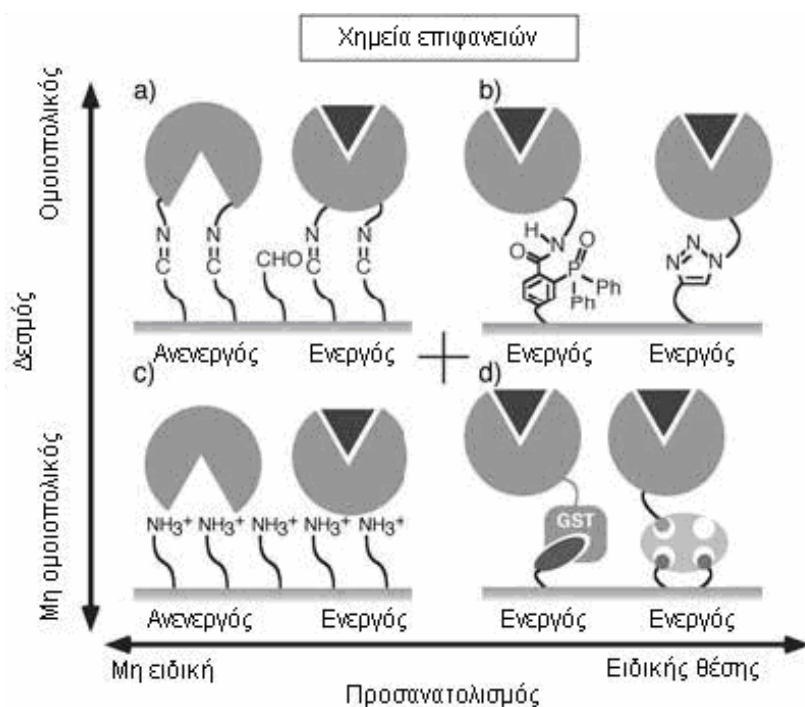
και για τρισδιάστατες επιφάνειες η μέθοδος υγρού συστήματος.

Στις απλές μη ειδικές τεχνικές ακινητοποίησης οι παράγοντες δέσμευσης προσδένονται σε μαλακές μεμβράνες όπως το PVDF και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και σε γυάλινα πλακίδια τροποποιημένα με νιτροκυτταρίνη (πλακίδια FAST) ή poly(L-λυσίνη).

Το πρωτόκολλο της μη ειδικής/ομοιοπολικής ακινητοποίησης χρησιμοποιεί στερεές επιφάνειες τροποποιημένες με λειτουργικότητες αλδεϋδης, εποξειδίου ή ηλεκτριμιδυλο εστέρα/ισοθειοκυανικά .

Οι τεχνικές ακινητοποίησης ειδικής θέσης/μη ομοιοπολικής χρησιμοποιούν ετικέτα συγγένειας και στις τεχνικές ειδικής θέσης/ομοιοπολικής χρησιμοποιούνται ευρέως αυτο-διευθετούμενες

μονοστοιβάδες (self-assembled monolayers, SAMs) πάνω σε επιφάνεια χρυσού ως εργαλείο τροποποίησης της επιφάνειας.



Εικόνα 27. Ταξινόμηση με βάση την πρόσδεση στην επιφάνεια των παραγόντων δέσμευσης. Περιπτώσεις ενεργούς-ανενεργούς διαμόρφωσης. a) Μη ειδικές/ομοιοπολικές προσδέσεις. b) Προσδέσεις ειδικής θέσης/ομοιοπολικές. c) Απλές μη ειδικές/μη ομοιοπολικές προσδέσεις μέσω φυσικής/χημικής προσρόφησης. d) Προσδέσεις ειδικής θέσης/μη ομοιοπολικές.

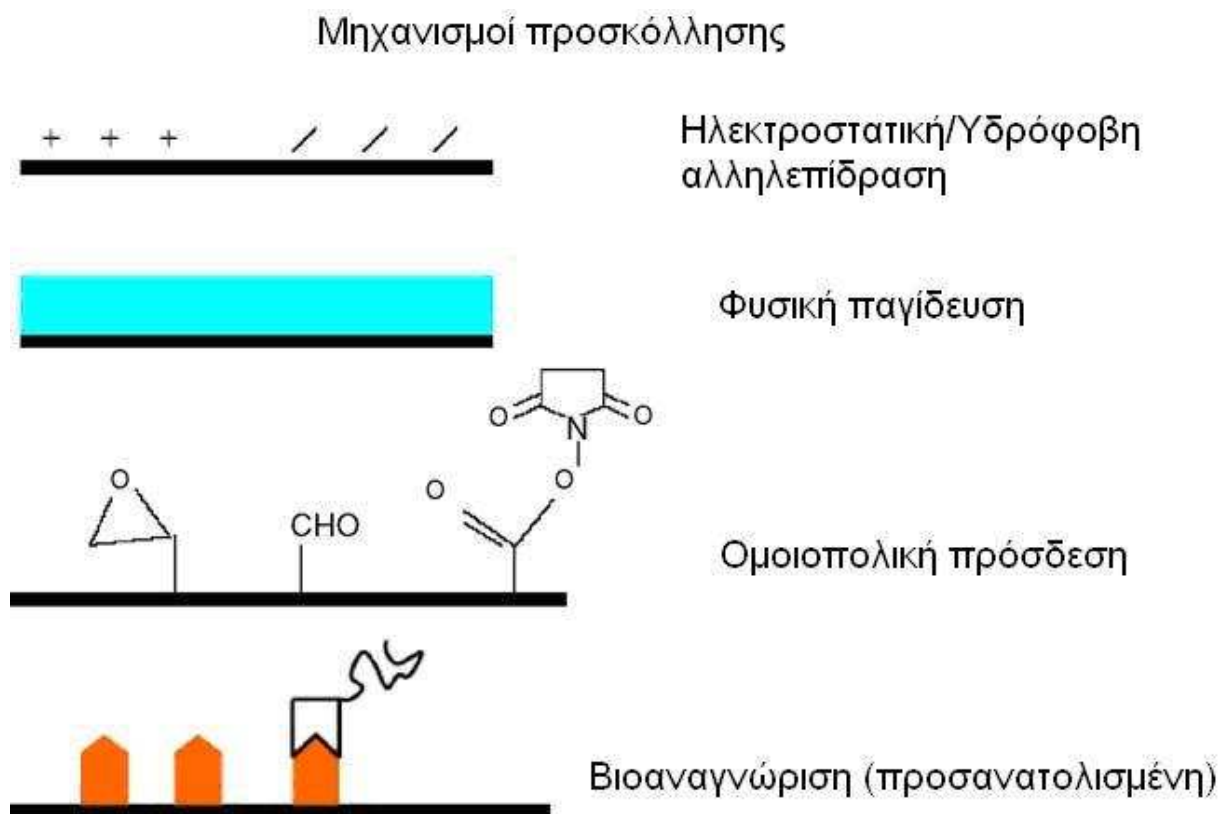
Επίσης έχουν αναπτυχθεί τρισδιάστατες πλατφόρμες, που αποτελούν ένα ομογενές υδατώδες περιβάλλον που προλαμβάνει την αποδιάταξη της πρωτεΐνης αποτελεσματικότερα απ' όταν οι πρωτεΐνες επικολλώνται σε επίπεδες επιφάνειες, αλλά είναι δύσκολο να αλλάξουμε διαλύτες εσωτερικά κατά την δημιουργία του πηγματος.

Ως περαιτέρω εφαρμογές της χημείας των επιφανειών, έχουν αναφερθεί μέθοδοι για την ακινητοποίηση μεμβρανικών πρωτεϊνών πάνω σε υποστρώματα chip με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρήσουν τις δραστηριότητες και τις φυσικές τους διαμορφώσεις ακέραιες.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, αν και υπάρχουν διάφορες επιλογές όσον αφορά στην κατασκευή κάποιας πλατφόρμας μικροσυστοιχιών, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς στις πρωτεωμικές μελέτες, δεν μπορούμε ακόμα να συνάγουμε ποια χημεία των επιφανειών είναι η πιο κατάλληλη για τα κριτήρια της κατανάλωσης χρόνου, του κόστους εκτέλεσης και της αναπαραγωγιμότητας. Χρειαζόμαστε περισσότερο χρόνο και πειράματα για να

δημιουργήσουμε ιδιαίτερα επεξεργασμένες επιφάνειες κατευθυνόμενες στο κέντρο της τεχνολογίας ακινητοποίησης.[4] [12]

Μια άλλη, γενικότερη ταξινόμηση των μηχανισμών προσκόλλησης του προσδέματος δίνεται στην εικόνα 28.



Εικόνα 28. Απλοποιημένη αναπαράσταση (σχεδιασμένη χωρίς κλίμακα) των πιο κοινών μηχανισμών προσκόλλησης για προσδέματα δέσμευσης.

Ο πιο απλός τρόπος για την πρόσδεση μιας πρωτεΐνης είναι μέσω επιφανειακής προσρόφησης. Αυτή η προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί στην τυπική ELISA και στο σύμπωμα Western για πολλά χρόνια και βασίζεται στην προσρόφηση των μακρομορίων είτε με ηλεκτροστατικές δυνάμεις πάνω σε φορτισμένες επιφάνειες (πλάκες με επίστρωση με πολυλυσίνη) ή με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (PVDF μεμβράνες). Οι επιστρωμένες με νιτροκυτταρίνη πλάκες παρουσιάζουν άριστη ικανότητα πρόσδεσης και μακροπρόθεσμη σταθερότητα των τυπωμένων ανιχνευτών. Ωστόσο, η μη ειδική πρόσδεση στην νιτροκυτταρίνη μπορεί να αποτελέσει σημαντικό πρόβλημα. Παρά την απλότητά της, η μέθοδος προσρόφησης παρουσιάζει κάποια προβλήματα :

- οι προσκολλημένες πρωτεΐνες μπορούν να απομακρυνθούν υπό αυστηρές συνθήκες έκπλυσης
- το επίπεδο της μη ειδικής πρόσδεσης είναι συνήθως υψηλό, λόγω της μη ειδικής πρωτεϊνικής προσρόφησης-εκρόφησης
- οι πρωτεΐνες που προσροφώνται σε υδρόφοβες επιφάνειες τείνουν να αποδιατάσσονται.

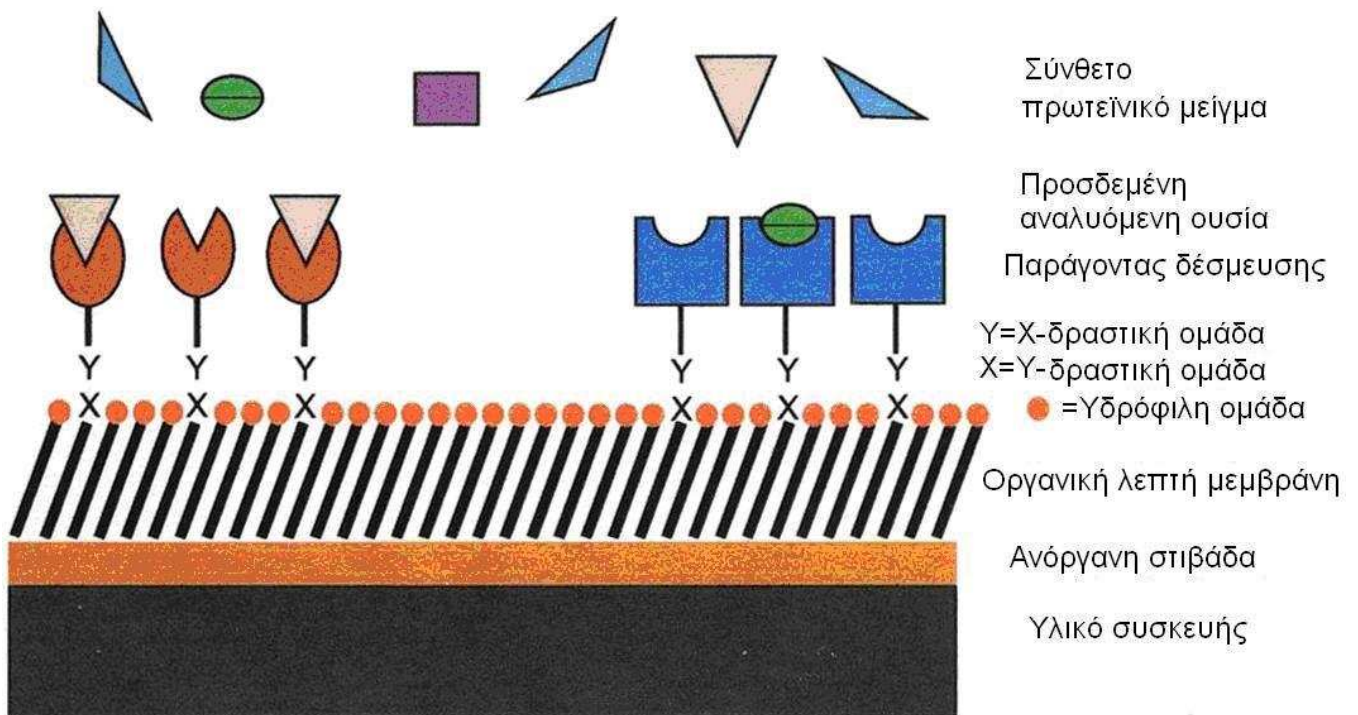
Ο απλούστερος τύπος ακινητοποίησης πρωτεϊνών είναι πάνω σε επιφάνειες που έχουν υψηλή εγγενή ενέργεια πρόσδεσης στις πρωτεΐνες γενικά. Τα πιο κοινά υποστρώματα των επιφανειών αυτών είναι υδρόφοβα πλαστικά όπως το πολυστυρένιο, στο οποίο οι περισσότερες πρωτεΐνες προσροφώνται φυσικά με αλληλεπιδράσεις van der Waals, υδρόφοβες και υδρογονοδεσμικές και δεσμών υδρογόνου. Αυτός ο τύπος φυσικής προσρόφησης χρησιμοποιείται γενικά για την ακινητοποίηση «αντισωμάτων δέσμησης» σε προσδιορισμούς ELISA. Το πλεονέκτημα αυτού του τύπου ακινητοποίησης είναι ότι είναι πολύ απλή στην εφαρμογή γιατί δεν απαιτεί καμία τροποποίηση της πρωτεΐνης για την προσκόλλησή της στην επιφάνεια. Το μειονέκτημα είναι ότι οι περισσότερες από τις ακινητοποιημένες πρωτεΐνες μπορεί να απενεργοποιηθούν λόγω αποδιάταξης και στερεοχημικού αποκλεισμού. Η φυσική προσρόφηση πρωτεϊνών πάνω σε επιφάνειες έχει επίσης την τάση να είναι ετερογενής, με πρωτεΐνες συναθροιζόμενες σε περιοχές. Παρόμοια ετερογένεια παρατηρείται σε άλλες επιφάνειες που χρησιμοποιούνται για μη ομοιοπολική πρωτεϊνική προσρόφηση, όπως γυαλί με επίστρωση νιτροκυτταρίνης και poly-λυσίνης.

Η φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών πάνω σε επιφάνειες είναι αποτέλεσμα ενός μεγάλου αριθμού ασθενών επαφών και μπορεί να επηρεάσει την πρωτεϊνική δομή και δραστικότητα. Μια μέθοδος που προτιμάται στηρίζεται σε έναν ή έναν μικρό αριθμό ισχυρών δεσμών μεταξύ της πρωτεΐνης και της επιφάνειας, αφήνοντας την πρωτεΐνη ως επί το πλείστον αναλλοίωτη, εκτός από την περιοχή του σημείου επαφής.

Οι επιφάνειες μπορούν να υποστούν επεξεργασία για να αποφευχθεί μη ειδική πρωτεϊνική προσρόφηση, ενώ γίνονται μόνο ειδικές αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν. Μια βέλτιστη σύνθεση μιας πρωτεϊνικής μικροσυστοιχίας βασισμένη σ' αυτές τις αρχές παρουσιάζεται στην εικόνα 29. Μια μέθοδος για να επιτευχθεί αυτό είναι η παραγωγή επιφανειών με πολυ(αιθυλενογλυκόλη), που είναι γνωστή για το ότι εμποδίζει τη μη ειδική πρωτεϊνική προσρόφηση. Με τον σχηματισμό παραγώγων ενός κλάσματος των αλυσίδων της πολυ(αιθυλενογλυκόλης) με βιοτίνη, η στρεπταβιδίνη μπορεί να προσκολληθεί ειδικά στην επιφάνεια. Επειδή η στρεπταβιδίνη είναι τερταμερής, οι βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες μπορούν με τη σειρά τους να ακινητοποιηθούν. Αυτό η μέθοδος προσκόλλησης ειδικών πρωτεϊνών σε

κατά τ' άλλα ανθιστάμενες σε πρωτεΐνες επιφάνειες έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πρωτεϊνικών συστοιχιών μεγάλης πυκνότητας πολύ υψηλής ποιότητας.

Για να αυξηθεί ο αριθμός των πρωτεϊνών που μπορούν να ακινητοποιηθούν ανά μονάδα μονάδας, ο Mirzabekov και οι συνάδελφοί του προσκολλούν επιστρώσεις πηκτικής σε επιφάνειες, δίνοντας έτσι στα στοιχεία μια τρίτη διάσταση, εμποδίζοντας την γρήγορη εξάτμιση και δημιουργώντας όρια μεταξύ των στοιχείων.[9]



Εικόνα 29. Σχέδιο μιας ιδανικής πρωτεϊνικής συστοιχίας. Το υποκείμενο υλικό συσκευής θα μπορούσε να είναι γυαλί, σιλικόνη ή κάποια άλλη επίπεδη επιφάνεια. Μια λεπτή ανόργανη στιβάδα όπως ένα ευγενές μέταλλο ή οξειδίο μετάλλου εφαρμόζεται σ' αυτήν την επιφάνεια και μπορεί να διευκολύνει την ανίχνευση της διαδικασίας της πρωτεϊνικής πρόσδεσης (π.χ. μια στιβάδα χρυσού για την επιφάνεια συντονισμού πλασμονίου). Πάνω από αυτήν την ανόργανη στιβάδα συγκεντρώνεται μία λεπτή οργανική μεμβράνη στην οποία η λειτουργικότητα (στη θέση) ωμέγα είναι υδρόφιλη. Αυτή η μονοστιβάδα επικαλύπτει την επιφάνεια του chip καθιστώντας την ανθεκτική στην πρωτεΐνη. Ωστόσο το chip είναι σχεδιασμένο με τέτοιο τρόπο ώστε περιέχει στοιχεία που είναι επικαλυμμένα με ανάμεικτες μονοστιβάδες στις οποίες ένα τμήμα των λειτουργικοτήτων ωμέγα κατέχει μία ομάδα (X) που μπορεί να αντιδράσει με ένα τμήμα (Y) κατεργασμένο σε μια ειδική θέση πάνω στις προς ακινητοποίηση πρωτεΐνες. Η επεξεργασμένη πρωτεΐνη είναι συνεπώς προσανατολισμένη πάνω στην επιφάνεια με τέτοιο τρόπο ώστε η ενεργός πλευρά ή πλευρά πρόσδεσης να μην είναι αντιμέτωπη την λεπτή μεμβράνη και κατά συνέπεια να αλληλεπιδρά βέλπιστα με πρωτεΐνες στο βιολογικό δείγμα. Η εικόνα δείχνει δύο στοιχεία, το καθένα εκ των οποίων σχηματίζει παράγωγο με διαφορετικό παράγοντα δέσμησης και διαχωρίζεται με μία εντελώς ανθεκτική σε πρωτεΐνες περιοχή. Μετά την ακινητοποίηση διαφορετικών πρωτεϊνών πάνω σε διαφορετικές περιοχές, ένα σύνθετο πρωτεϊνικό μείγμα μπορεί να εφαρμοστεί στο chip και κάθε στοιχείο θα δεσμεύσει συγκεκριμένες πρωτεΐνες ενώ θα απωθήσει άλλες.

Η ομοιοπολική πρόσδεση πρωτεϊνών και πεπτιδίων πάνω στο υπόστρωμα αποτελεί μια πιο ισχυρή προσέγγιση.

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος για ακινητοποίηση πρωτεϊνών μέσω ομοιοπολικών (ή βασισμένων σε βιοτίνη) αλληλεπιδράσεων είναι η τυχαία σύζευξη υπολειμμάτων λυσίνης πάνω σε πρωτεΐνες, σε αμινο-δραστικές επιφάνειες (ή αντιδραστήρια βιοτινυλίωσης). Όταν η δομή μιας πρωτεΐνης είναι γνωστή, μπορεί να είναι χρήσιμο το να την ακινητοποιήσουμε με τέτοιο τρόπο ώστε η πρωτεΐνη να είναι προσκολλημένη στην επιφάνεια με μοναδικό προσανατολισμό κατά τον οποίο η βιολογικά σημαντική πλευρά να μην είναι αντιμέτωπη με την επιφάνεια. Αυτό επιτυγχάνεται ευκολότερα όταν χρησιμοποιούμε ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, στις οποίες μπορούν να εισαχθούν αμινο- ή καρβοξυ-τελικές ετικέτες. Μια ετικέτα ιστιδίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών με προσανατολισμένο τρόπο, όπως μπορεί κι ένα υπόλειμμα αμινο-τελικής σερίνης ή θρεονίνης. Για μη ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, πρέπει κανείς να εκμεταλλευτεί τις υπάρχουσες λειτουργικές ομάδες στην πρωτεΐνη. Κάποιες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί και για τον προσανατολισμό αντισωμάτων και των τμημάτων τους πάνω σε επιφάνειες. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτά τα προσανατολισμένα αντισώματα διατηρούν ένα υψηλότερο και πιο ομογενές επίπεδο δραστηριότητας σε σχέση με τα τυχαία προσανατολισμένα. Αντισώματα πλήρους μήκους μπορούν να προσανατολιστούν πάνω σε επιφάνειες και μέσω πρόσδεσης στην ακινητοποιημένη πρωτεΐνη A ή G, αλλά αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να μην είναι αρκετά σταθερή για κάποιες εφαρμογές.

Αξιόλογη προσπάθεια έχει γίνει τα τελευταία χρόνια για την βελτίωση της ακινητοποίησης των πρωτεϊνών πάνω σε επιφάνειες τροποποιημένου γυαλιού χρησιμοποιώντας έναν αριθμό διαφορετικών στρατηγικών που πρόσφατα έχουν συγκριθεί συστηματικά. Ο μηχανισμός ομοιοπολικής προσκόλλησης απαιτεί την παρουσία αντιδραστικών ομάδων πάνω στο υποστηρικτικό υλικό, ικανών να αντιδράσουν με πυρινόφιλες ομάδες (αμινο,θειόλης, υδροξυλο) πάνω στα μόρια-προσδέματα. Οι λειτουργικές ομάδες πάνω στην επιφάνεια εισάγονται με τροποποίηση του γυαλιού με οργανοσιλάνια. Εναλλακτικά μπορούν να εισαχθούν με πιο σύνθετες μοριακές αρχιτεκτονικές όπως οι αυτοδιευθετούμενες μονοστιβάδες ή πολυμερή εμβολιασμένα στην επιφάνεια. Τα οργανοσιλάνια μπορούν να παράσχουν απευθείας τις λειτουργικές ομάδες για την προσκόλληση των προσδεμάτων ή να αντιδράσουν με ένα διλειτουργικό πρόσδεμα που φέρει την επιθυμητή δραστική ομάδα. Μια επιφάνεια μικροσυστοιχίας έχει αναπτυχθεί με ProLinker, ένα παράγωγο calixcrown με μια διλειτουργική ιδιότητα σύζευξης που επιτρέπει επαρκή ακινητοποίηση πρωτεϊνών δέσμευσης πάνω σε στερεές μήτρες όπως μεμβράνες από χρυσό ή αμινο-μένες γυάλινες πλάκες.

Η χρήση μιας μήτρας που εγκλείει την πρωτεΐνη σε ένα δομημένο περιβάλλον είναι ένας εναλλακτικός τρόπος για την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών. Αυτός ο μηχανισμός δεν περιλαμβάνει την σταυροσύνδεση των μορίων δέσμευσης με την επιφάνεια αλλά είναι βασισμένος στην φυσική παγίδευση των πρωτεϊνών σε πηκτές όπως το πολυακρυλαμίδιο ή η

αγαρόζη. Η τρισδιάστατη δομή αυτών των υποστρωμάτων γενικά αυξάνει την ικανότητα φόρτωσης και δεν παρεμβαίνει στις δυναμικές λειτουργικές θέσεις ή ρυθμιστικές περιοχές της πρωτεΐνης. Επιπλέον, το υδατικό περιβάλλον της πηκτής μειώνει την αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Ωστόσο, η δομή της πηκτής μπορεί να αποτελέσει εμπόδιο στη διάχυση και η μοριακή αναγνώριση μπορεί να απαιτήσει μεγαλύτερους χρόνους επώασης. Μια σύνθετη προσέγγιση, βασισμένη στην νανο-επεξεργασία τρισδιάστατων λεπτών μεμβρανών πολυηλεκτρολυτών, τοποθετημένων πάνω σε γυάλινη πλάκα με διαδοχική προσρόφηση των πολυηλεκτρολυτών μέσω τεχνικής αυτοδιευθέτησης έχει αναφερθεί.

Είτε η προσκόλληση γίνεται με προσρόφηση, φυσική παγίδευση ή με ομοιοπολική σύζευξη, η ακινητοποίηση λαμβάνει χώρα με τυχαίο ή μη ειδικό προσανατολισμό.

Επιπροσθέτως των μη ειδικών μεθόδων, στα μόρια-ανιχνευτές μπορούν να μπουν ετικέτες και να ακινητοποιηθούν με μία ειδική, μη ομοιοπολικού τύπου αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ετικέτα και ένα ακινητοποιημένο μόριο δέσμευσης.

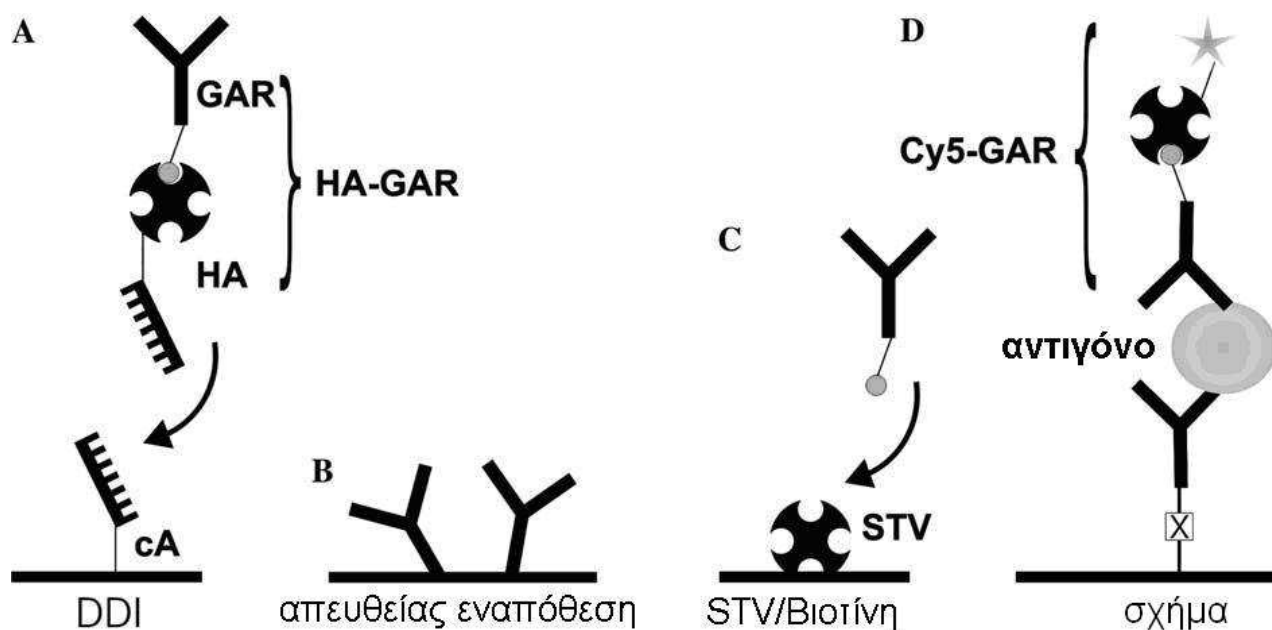
Με χρήση στρατηγικών βασισμένων στην συγγένεια, η ακινητοποίηση γίνεται με έναν προσανατολισμένο, ομοιόμορφο και ειδικό τρόπο. Το μειονέκτημα αυτής της προσέγγισης έγκειται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες πρέπει ή να βιοτινυλιωθούν ή να σημανθούν με ετικέτα. Σε άρθρο τους οι Cha et al. (2005) συνέκριναν τις καταλυτικές δρασικότητες των ακινητοποιημένων σε επιφάνειες πυριτίου ενζύμων με και χωρίς προσανατολισμό. Οι συγγραφείς θεμελίωσαν τον βασικό ρόλο του προσανατολισμού του ανιχνευτή για μια αξιόπιστη χρήση των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών ως ποσοτικών εργαλείων στην βιοϊατρική έρευνα. [11][9]

### Μέθοδος ακινητοποίησης DDI

Οι μικροσυστοιχίες αντιγόνων και αντισωμάτων ερευνώνται εντατικά αυτήν την περίοδο για μια ευρεία περιοχή εφαρμογών στην βιοϊατρική διαγνωστική, ώστε να καθορίσουν ταυτόχρονα διάφορες παραμέτρους σε μεμονωμένα δείγματα με περιορισμένη ποσότητα υλικού. Αν και πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες έχουν παρασκευαστεί και χρησιμοποιηθεί για υψηλής ρυθμοαπόδοσης εξέταση αντισωμάτων, ανάλυση των αλληλεπιδράσεων αντιγόνων-αντισωμάτων, και ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών στόχων μικρών μορίων, η σταδιακή ρομποτική ακινητοποίηση των διαφόρων πρωτεϊνών σε χημικά ενεργοποιημένες επιφάνειες περιορίζεται κάποιες φορές από την αστάθεια πολλών πρωτεϊνών που μπορεί να αποκαλύψει μια σημαντική τάση για αποδιάταξη και συνεπώς απώλεια λειτουργικότητας. Για να ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια, έχει αναπτυχθεί η κατευθυνόμενη από το DNA (DDI) ακινητοποίηση των πρωτεϊνών, που χρησιμοποιεί ομοιοπολικά συζεύγματα συντιθέμενα από μονόκλωνο DNA και στρεπταβιδίνη ως μοριακούς προσαρμογείς για τη δημιουργία της ετικέτας των βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών με ολιγομερή ssDNA. Η DDI παρέχει μια χημικά ήπια διαδικασία για την επιλεκτικής θέσης προσκόλληση ευαίσθητων πρωτεϊνών σε ένα

στερεό υποστηρικτικό υλικό, με την χρήση υποστρωμάτων ενεργοποιημένου λειτουργικά DNA ως στρώματος ακινητοποίησης (εικόνα 30A). Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της DDI στις εφαρμογές ανοσοπροσδιορισμού είναι ότι η πρόσδεση του αντιγόνου-στόχου από τα αντισώματα μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα ομοιογενές διάλυμα αντί για μια ετερογενή ανοσορόφηση στερεής φάσης και στη συνέχεια τα ανοσοσύμπλοκα που δημιουργούνται συλλαμβάνονται στη μικροσυστοιχία DNA με υβριδισμό νουκλεϊκού οξέος.

Η σύγκριση των ποικίλων μεθόδων ακινητοποίησης αποκάλυψε ότι η DDI και η απευθείας εναπόθεση του αντισώματος δέσμησης οδηγούν στις υψηλότερες εντάσεις φθορισμού. Ωστόσο, στην τεχνική DDI παρατηρήθηκε βελτιωμένη ομογένεια θέσεων και καλύτερη αναπαραγωγισιμότητα. Επιπλέον, η DDI επέτρεψε την οικονομικότερη χρήση των υλικών των αντισωμάτων. Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή ευελιξία και ευκολία στον χειρισμό, η βασισμένη στην DDI αυτο-διευθέτηση των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών παρέχει έτσι μια ανταγωνιστική εναλλακτική για την παραγωγή ισχυρών και εύκαμπτων πρωτεϊνικών biochips.[13]



Εικόνα 30. Σχηματικός σχεδιασμός διαφορετικών τεχνικών ακινητοποίησης για την πρόσδεση αντισωμάτων πάνω σ' ένα στερεό υποστηρικτικό υλικό. Για να διευκολυνθεί η κατευθυνόμενη από DNA ακινητοποίηση (DDI) το σύζευγμα αντίσωμα-DNA HA-GAR (που ελήφθη με τη σύζευξη του HA (σύζευγμα DNA-STV) και του GAR (goat anti-rabbit IgG antibody)) υβριδοποιήθηκε με συμπληρωματικά oligονουκλεοτίδια δέσμησης cA. (A) Επιπροσθέτως, το μη βιοτινυλιωμένο αντίσωμα GAR τοποθετήθηκε απευθείας πάνω στις ενεργοποιημένες πλάκες γυαλιού (B) ή το GAR προσδέθηκε μέσω της βιοτίνης στη στρεπταβιδίνη, που προηγουμένως ακινητοποιήθηκε ομοιοπολικά στην ενεργοποιημένη γυάλινη πλάκα (C). Τα τρία διαφορετικά πρωτεϊνικά biochips χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια στον σε μικροκλίμακα ανοσοπροσδιορισμό φθορισμού για την ακινητοποίηση ενός αντιγόνου και την παραγωγή σήματος μέσω του Cy5-GAR (D).



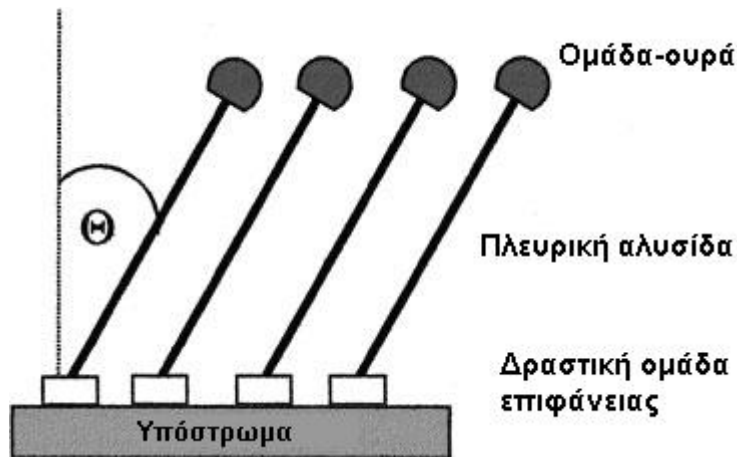
## Αυτο-διευθετούμενες μονοστιβάδες (SAMs)

Όπως προαναφέρθηκε, προκειμένου να διευκολυνθεί η ακινητοποίηση των παραγόντων δέσμευσης, αυτο-διευθετούμενες μονοστιβάδες (self-assembled monolayers, SAMs) χρησιμοποιούνται ως εργαλείο τροποποίησης της επιφάνειας.

Οι αυτό-διευθετούμενες μονοστιβάδες είναι μοριακές αρχιτεκτονικές που σχηματίζονται αυθόρμητα κατά την αλληλεπίδραση μιας επιφανειακής ενεργούς ομάδας κεφαλής (σε διάλυμα) με ένα κατάλληλο υπόστρωμα. Ανάλογα με την φύση του υποστρώματος (μεταλλικές ή οξειδικές (oxidic) επιφάνειες) μια κατάλληλη ενεργός ομάδα κεφαλής (εικόνα 31) και ένας διαλύτης-μέσο μπορούν να επιλεγθούν για να παραγάγουν μια καλά διευθετημένη μονοστιβάδα. Οι θειόλες και τα δισουλφίδια είναι τα πιο συνηθισμένα δραστικά μόρια που χρησιμοποιούνται πάνω σε υποστρώματα ευγενών μετάλλων όπως ο χρυσός και ο άργυρος, ενώ σιλάνια χρησιμοποιούνται γενικά σε μη μεταλλικές οξειδικές (oxidic) επιφάνειες, όπως  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  και  $\text{TiO}_2$ . Τα περισσότερα από τα παραπάνω δραστικά μόρια είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες αν και οι διαλύτες στο νερό θειόλες μπορούν να συντεθούν και για ειδικές εφαρμογές που απαιτούν υδατικό περιβάλλον. Οι επιφανειακές δραστικές ομάδες-κεφαλές συνήθως είναι συζευγμένες με μια αλκυλική αλυσίδα ή ένα παράγωγο αλκυλικής αλυσίδας, καθώς είναι γνωστό ότι δημιουργούν πυκνά στοιβαγμένες μονοστιβάδες. Το τελικό άκρο της αλκυλικής αλυσίδας μπορεί επίσης να σχηματίσει παράγωγα αποδίδοντας έναν αριθμό από ενεργές ομάδες όπως  $-\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$  και  $\text{COOR}$ , παράγοντας έτσι επιφάνειες με διαφορετικές υγραντικές και μεσοφασικές ιδιότητες.

Η εγγύτητα των προσροφώμενων μορίων αποτελεί τον λόγο για τον οποίο οι δυνάμεις van der Waals παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδομοριακή σταθεροποίηση. Το πάχος αυτών των μονοστιβάδων είναι συνήθως κλίμακας νανομέτρων στην κατακόρυφη κατεύθυνση και, ως αποτέλεσμα αυτού, μπορούν να ονομαστούν νανο-συναθροίσεις.

Αν και οι SAMs έχουν κατασκευαστεί για ένα μεγάλο εύρος επιφανειών, οι μονοστιβάδες που βασίζονται σε θειόλες αλκανίου πάνω σε χρυσό έχουν ερευνηθεί εκτεταμένα για τους εξής λόγους : (1) ευκολία στην κατασκευή, (2) βαθμός τελειότητας, (3) χημική σταθερότητα υπό εργαστηριακές συνθήκες, (4) διαθεσιμότητα υλικών και (5) ευελιξία στην εισαγωγή ποικίλων λειτουργικών χημικών ομάδων, με αποτέλεσμα διαφορετικές επιφανειακές ιδιότητες. Παρέχουν επίσης πολύ καλό έλεγχο στις ιδιότητες της επιφάνειας. Χρησιμοποιώντας αυτές τις αρχές, μπορούν να αναπτυχθούν επιφάνειες με καλές ιδιότητες βιοσυμβατότητας , ώστε να ανταπεξέρχονται στις σύνθετες ανάγκες των πρωτεωμικών μελετών. Σε αντίθεση με τις συστοιχίες που βασίζονται στο γυαλί ή στα πολυμερή, οι SAMs πάνω σε χρυσό έχουν το επιπλέον πλεονέκτημα ότι οι επιφανειακές ιδιότητες μπορούν να χαρακτηριστούν επαρκώς χρησιμοποιώντας και οπτικά και μηχανολογικά και ηλεκτροχημικά αναλυτικά εργαλεία.



Εικόνα 31. Σχηματική αναπαράσταση μιας διευθέτησης SAM. Η μονοστιβάδα σχηματίζεται από την εξώθερμη αλληλεπίδραση μιας δραστικής ομάδας επιφάνειας με το υπόστρωμα, ακολουθούμενης από πλευρική επαναδιάταξη των πλευρικών αλυσίδων και της ομάδας-ουράς. Η επαναδιάταξη συμβαίνει για να μεγιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις van der Waals μεταξύ των ποικίλων μορίων, με αποτέλεσμα να σχηματίσουν γωνιακή κλίση οι μονάδες της πλευρικής αλυσίδας σε σχέση με την επιφάνεια.

Οι SAMs μπορούν να δράσουν ως βιοσυμβατές διεπιφάνειες κατά τη χημική σύζευξη των πρωτεϊνών σε ένα υπόστρωμα μικροσυστοιχίας, είτε μέσω ομοιοπολικής πρόσδεσης είτε μέσω χημείας συμπλόκων είτε μέσω υπερμοριακών αλληλεπιδράσεων. Εκτός από τις παραπάνω μεθόδους, οι πρωτεΐνες έχουν και μια τάση να αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Κανονικά, αυτές οι αλληλεπιδράσεις αποτελούν αυτό που περιγράφεται ευρέως ως μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Ειδικές SAMs βασισμένες σε πολυαιθυλενο-γλυκόλη και poly-L-λυσίνη-g-πολύ(αιθυλενογλυκόλη) είναι γνωστές για την αντίστασή τους σε τέτοιες αλληλεπιδράσεις κι έτσι χρησιμοποιούνται ευρέως στον σχεδιασμό των περισσότερων βιοαισθητήρων και μικροσυστοιχιών. Ενώ η αδράνεια της πολύ(αιθυλενογλυκόλης) είναι εξαιρετική, οι SAMs που φέρουν στο άκρο τους μανιτόλη μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ευρέως για την παρεμπόδιση των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων των κυττάρων των θηλαστικών και των πρωτεϊνών με τα υποστρώματα των πρωτεϊνικών chips.

Αν λοιπόν κατανοήσουμε την χημική φύση των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν, «έξυπνες» SAM επιφάνειες μπορούν να κατασκευαστούν για την εφαρμογή μελετών της πρωτεϊνικής έκφρασης υψηλής ποιότητας.[17]

## Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα της προσκόλλησης

Το στερεό υποστηρικτικό υλικό επηρεάζει σε βάθος την ποιότητα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών, καθώς επηρεάζει όχι μόνο την επαρκή προσκόλληση του αντισώματος αλλά και τον βαθμό της μη ειδικής πρόσδεσης, για παράδειγμα, και την προσβασιμότητα των αντισωμάτων στα αντιγόνα, που διαφέρει ιδιαίτερα σε δομή. Οι συχνά χρησιμοποιούμενες τροποποιήσεις γυαλιού όπως η ενεργοποίηση με αλδεϋδη ή η επίστρωση με poly-L-λυσίνη ή νιτροκυτταρίνη, είναι συνήθεις επιφάνειες για την προσκόλληση DNA. Αυτό αντανακλά το γεγονός ότι οι πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες αναπτύχθηκαν κυρίως σε εργαστήρια που προηγουμένως ασχολούνταν με μικροσυστοιχίες DNA. Η κλασική χημεία πρωτεϊνικής ή πεπτιδικής ακινητοποίησης, ωστόσο, προσφέρει ένα πλήθος καλά καθιερωμένων και σχετικά απλών στρατηγικών πρωτεϊνικής πρόσδεσης σε γυάλινο υποστηρικτικό υλικό, που προσδένονται για να βελτιώσουν σημαντικά την απόδοση των συστοιχιών αντισωμάτων. Ενώ είναι δύσκολο να καθορίσουμε γενικές στρατηγικές ακινητοποίησης που δεν κάνουν δηλαδή διακρίσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, η δομική ομοιότητα των αντισωμάτων κατευνάζει αυτήν την πλευρά. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται ποικίλες διαδικασίες που κρίθηκαν κατάλληλες για τροποποίηση γυάλινων πλάκων.

Κατά κύριο λόγο, η προσανατολισμένη προσκόλληση είναι μία στρατηγική ακινητοποίησης που προτιμάται. Οι ενεργές πλευρές των αντισωμάτων είναι καλύτερα προσβάσιμες και η σταθερότητά τους βελτιώνεται. Σε κάθε περίπτωση, λαμβάνονται υψηλότερες εντάσεις σήματος σε σχέση με την τυχαία προσκόλληση. Ωστόσο και οι δύο στρατηγικές απαιτούν ενεργοποίηση των αντισωμάτων, πρόσθετα στάδια καθαρισμού και στη συνέχεια έλεγχο της συγκέντρωσης αντισωμάτων. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί ασύμβατο με πρακτικές εφαρμογές, κατά τη διάρκεια των οποίων γίνεται χειρισμός μεγάλων αριθμών δαπανηρών και κάποιες φορές μοναδικών μορίων. Καταρχήν, ο χειρισμός και ο καθαρισμός στη συνέχεια πολύ μικρών ποσοτήτων αντισωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές απώλειες. Δεύτερον, τα αντισώματα πρέπει να ενεργοποιηθούν απευθείας πριν από την τοποθέτηση, αλλά δεν μπορούν να διατηρηθούν σ' αυτήν την κατάσταση για μεγάλο χρονικό διάστημα, σπαταλώντας έτσι πολύτιμο υλικό. Επιπλέον, κάποια μονόκλωνα αντισώματα δεν έχουν κατάλοιπα υδατάνθρακα. Για τους λόγους αυτούς, η διαδικασία τυχαίας προσκόλλησης θα μπορούσε να είναι καλύτερη.

Χημεία των επιφανειών	Τρόπος πρόσδεσης
Πηκτή πολυακρυλαμιδίου ενεργοποιούμενη από ομάδες υδραζιδίου (hydrazide)	Κατάλοιπα υδατανθράκων σε αντισώματα οξειδωμένα με NaIO <sub>4</sub>
poly-L-λυσίνη	Προσρόφηση
Νιτροκυτταρίνη	Προσρόφηση
Κυανοσιλάνιο (πλάκα μικροπιλοποίησης)	Προσρόφηση
Σιλάνιο αλδεΰδης	Αμινομάδες
BSA/διλειτουργική N-υδροξυσουκινιμίδιο Αμινοσιλάνιο/διλειτουργικό	Αμινομάδες
N-υδροξυσουκινιμίδιο (πλάκα μικροπιλοποίησης)	Αμινομάδες
Hydrogel αλδεΰδης	Αμινομάδες
Μερκαπτοσιλάνιο/μαλεϊμίδο- N-υδροξυσουκινιμίδιο	Αμινομάδες
Εποξειδικό σιλάνιο	Αμινομάδες, υδροξυλομάδες, ομάδες θειόλης
Επίστρωση νικελίου	Ετικέτα ιστιδίνης
Νετραβιδίνη	Βιοτινυλιωμένα αντισώματα
Αβιδίνη	Ετικέτα βιοτινυλιωμένης ιντενείνης (intenein) των πρωτεϊνών

Πίνακας 4. Στρατηγικές προσκόλλησης για την παραγωγή μικροσυστοιχιών

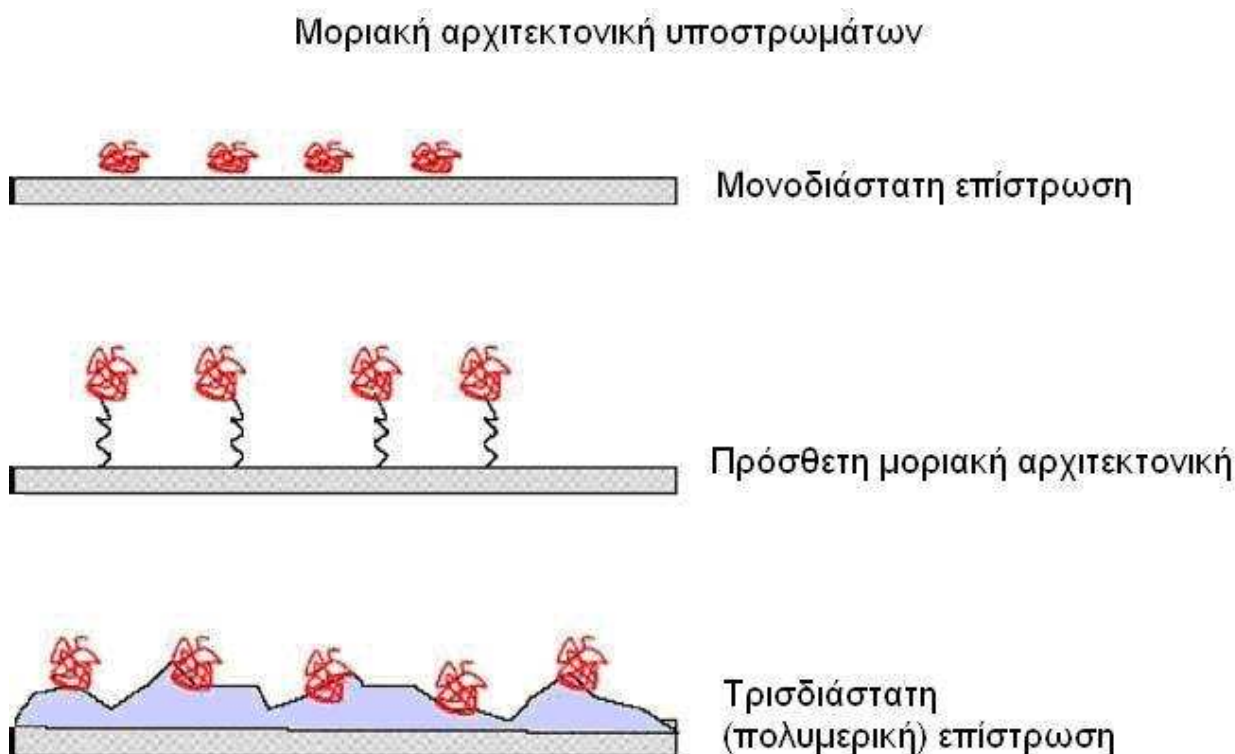
Ενώ η κατευθυνόμενη προσκόλληση για ένα σύνολο από φυσικές πρωτεΐνες δεν αποτελεί ασήμαντο θέμα, οι βιβλιοθήκες έκφρασης ανασυνδυασμένων χιμαιρικών (υβριδικών) πρωτεϊνών προσφέρουν καλύτερες ευκαιρίες. Σε σύγκριση με τις πλάκες αλδεΰδης, η προσκόλληση ειδικής θέσης σε πλάκες με επίστρωση νικελίου επέδειξαν μεγαλύτερη ένταση σήματος.

Η δυνατότητα προστασίας των αντισωμάτων έναντι αποδιάταξης κατά την παραγωγή μικροσυστοιχιών είναι ακόμα μία σημαντική τεχνική πλευρά. Συχνά προστίθεται γλυκερόλη στο διάλυμα εναπόθεσης για να αποφευχθεί η αφυδάτωση και κατά συνέπεια η αποδιάταξη του αντισώματος. Επίσης, προσθήκη δισακχαριτών, οι οποίοι συχνά χρησιμοποιούνται ως προστατευτικά αντιδραστήρια σε διαδικασίες λυοφιλίωσης βελτιώνει σημαντικά την σταθερότητα.

Η σωστή αποθήκευση των πλακών μετά την τοποθέτηση των αντισωμάτων αποτελεί σημαντικό στοιχείο τόσο από πλευράς χρόνου όσο και από πλευράς εξοικονόμησης υλικού. Επιτρέπει παραγωγή μεγάλης ποσότητας πλακών και κατά συνέπεια συνεχή κατανάλωση. Καθότι το υψηλό επίπεδο υγρασίας επηρεάζει την χημική σταθερότητα των πρωτεϊνών, η λυοφιλίωση ή η διατήρηση στην κατάψυξη αποτελούν σημαντικές διαδικασίες.

## ΕΠΙΣΤΡΩΣΕΙΣ

Πέρα από τον μηχανισμό προσκόλλησης (προσρόφηση, φυσική παγίδευση σε πηκτές, ομοιοπολική πρόσδεση ή προσανατολισμένη μοριακή αναγνώριση) , η μοριακή αρχιτεκτονική της επικάλυψης παίζει έναν σημαντικό ρόλο και πρέπει να ληφθεί υπόψη. Μια σχηματική απεικόνιση κοινών μοριακών αρχιτεκτονικών των επιφανειών παρέχεται στην εικόνα 32.



Εικόνα 32. Απλοποιημένη αναπαράσταση (σχεδιασμένη χωρίς κλίμακα) των πιο κοινών μοριακών αρχιτεκτονικών των επιφανειών.

Οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια, ασχέτως του μηχανισμού προσκόλλησης, μπορούν να έρχονται άμεσα σε επαφή με την ενεργοποιημένη γυάλινη επιφάνεια πάνω σε μια μονοδιάστατη επίστρωση. Εναλλακτικά, ο ανιχνευτής μπορεί να εισαχθεί σε μια απλή αρχιτεκτονική μονοστιβάδας, όπως στο SAM ή την πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) ή σε μια πιο σύνθετη τρισδιάστατη δομή όπως ένα δενδριμερικό πολυμερές ή ένα τυχαίο συμπολυμερές. Η καινοτόμος πτυχή αυτής της προσέγγισης στηρίζεται στο γεγονός ότι το πολυμερές αυτοπροσροφάται πάνω στην επιφάνεια του γυαλιού πολύ γρήγορα, απλά εμβαπτίζοντας τις γυάλινες πλάκες μέσα σ' ένα αραιωμένο υδατικό διάλυμα του πολυμερούς και χωρίς να καταναλωθεί χρόνος στην προεπεξεργασία του γυαλιού. Επομένως, η διαδικασία επίστρωσης

είναι μια γρήγορη και ανέξοδη μέθοδος παραγωγής υδρόφιλων λειτουργικών επιφανειών που φέρουν ενεργούς εστέρες, ικανούς να αντιδράσουν με αμινομάδες σε τροποποιημένο DNA, πρωτεΐνες και πεπτιδία.

Τα υλικά που παραδοσιακά σχετίζονται με συμβατικές πρωτεϊνικές δοκιμασίες συνήθως δεν είναι συμβατά με ρομποτικούς μηχανισμούς στοίχισης, δεν μπορούν να παράσχουν την ευαισθησία ή το δυναμικό εύρος που αναμένεται από τα πειράματα μικροσυστοιχιών ή να συνεισφέρουν μη ειδικές συνδέσεις υψηλού φθορισμού που έχει ως αποτέλεσμα χαμηλά ποσοστά σήματος-θορύβου. Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα έχει διερευνηθεί ένας αριθμός καινοτόμων διατάξεων για τη δημιουργία πρωτοτύπων πρωτεϊνικών συστοιχιών. Ανάμεσα σ' αυτές, δύο χρησιμοποιούν πηκτή αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου τοποθετημένης πάνω σε γυάλινες πλάκες, συνδυάζοντας έτσι την χρησιμότητα ενός στερεού υποστηρικτικού υλικού με την ικανότητα φόρτωσης και πρόσδεσης ενός πορώδους στρώματος πηκτής. Αυτές οι μέθοδοι επινοήθηκαν αρχικά για την αύξηση της δυναμικής ικανότητας φόρτωσης των δειγμάτων DNA πάνω σε μία επίπεδη επιφάνεια μικροσυστοιχίας, αλλά γενικά είναι εφαρμόσιμες σε μια ποικιλία υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των νουκλεϊκών οξέων, των πρωτεϊνών και των μικρών μορίων.

Η απόδοση πλάκας copoly (DMA-NAS-MAPS) ερευνήθηκε στην αξιολόγηση του ρευματοειδούς παράγοντα (RF) σε δείγματα ανθρώπινων ορρών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι ακινητοποιημένες πρωτεΐνες διατηρούν μία ενεργό διαμόρφωση και είναι εύκολα προσβάσιμες. Επιπλέον, μετά από τον προσδιορισμό, οι πλάκες παρουσίασαν μια πολύ χαμηλή μη ειδική πρόσδεση. Η πολυμερική επιφάνεια εξετάστηκε επίσης ως υποστηρικτικό υλικό πεπτιδικής μικροσυστοιχίας σε μια μελέτη χαρτογράφησης επιτόπου. Αυτή η μελέτη εισηγείται ότι αν και οι πλάκες copoly (DMA-NAS-MAPS) προσδένουν το μόριο δέσμευσης με μια τυχαία διαμόρφωση, το υδατικό μικρο-περιβάλλον που δημιουργείται από την πολυμερική επίστρωση παρείχε μια καλή δυνατότητα πρόσβασης του προσδέματος χωρίς να χρειάζεται κάποιος διάμεσος μεταξύ του ανιχνευτή και της επιφάνειας.

Πρόσφατα εισήχθη μια νέα μέθοδος για την ανάπτυξη επιφανειών πολυμερικών μικροσυστοιχιών βασισμένη στην επίστρωση των υποστρωμάτων με πολλαπλές στιβάδες πολυηλεκτρολυτών που τελειώνουν με poly(ακρυλικό οξύ) (PAA) ακολουθούμενης από ενεργοποίηση των ελεύθερων ομάδων – COOH του PAA. Αυτή η επιφάνεια και ανθίσταται στην μη ειδική προσρόφηση και επιτρέπει την ομοιοπολική ακινητοποίηση των συστοιχιών ενεργών αντισωμάτων. Επιπλέον, η εναπόθεση αυτών των επιστρώσεων σε υποστηρικτικά υλικά μικροπορώδους αλουμίνας είχε ως αποτέλεσμα μια αύξηση κατά 500 φορές στην περιοχή της επιφάνειας σε σχέση με τα υποστηρικτικά υλικά δύο διαστάσεων, οδηγώντας σε μείωση των ορίων ανίχνευσης στις πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες κατά δύο τάξεις μεγέθους.

Οι υπερμοριακές δομές θεωρούνται γενικά ευνοϊκές όσον αφορά στη διατήρηση της πρωτεϊνικής δραστηριότητας. Επιπλέον, λόγω της μειωμένης σταθεράς ταχύτητας αντίδρασης κοντά στην περιοχή της επιφάνειας, η αναγνώριση των μικρών μορίων, όπως τα πεπτιδία,

συχνά εμποδίζεται. Η πολυμερική επίστρωση της επιφάνειας δρα ως σύνδεσμος και απομακρύνει τον προσδεμένο ανιχνευτή από την επιφάνεια, με αποτέλεσμα μια πολύ γρηγορότερη και αποδοτική αντίδραση με το στόχο. Αυτό το ζήτημα είναι πολύ σημαντικό όταν έχουμε να κάνουμε με μικροσυστοιχίες μικρών μορίων ως πεπτιδικές συστοιχίες.

Εκτός από τις κατάλληλες επιφάνειες, πρέπει να αναπτυχθούν και τα ρυθμιστικά διαλύματα τυπώματος ώστε να παρέχονται σταθερές και φυσιολογικές συνθήκες στις πρωτεΐνες που εναποτίθενται στην επιφάνεια (π.χ. γλυκερίνη, σακχαρόζη, η σακχαρόζη προστίθεται συχνά σε PBS που είναι το πιο κοινό ρυθμιστικό διάλυμα τυπώματος). Η διαλυτότητα αποτελεί συχνά θέμα για τα υδροφοβικά πεπτίδια που απαιτούν τη χρήση των απορρυπαντικών στο ρυθμιστικό διάλυμα εναπόθεσης.

Παρά την έλλειψη μιας ιδανικής επιφάνειας με καθολική εφαρμογή ή μιας προσέγγισης ακινητοποίησης, όπως καταδεικνύεται από την βιβλιογραφία, είναι σαφές ότι οι υπάρχουσες μέθοδοι είναι περισσότερο από επαρκείς για πολλές εφαρμογές και γενικά, η λειτουργία των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών εμφανίζεται ισχυρή σε μια ευρεία ποικιλία στρατηγικών ακινητοποίησης. [11] [12]

## ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

Ο στόχος των πεπτιδικών και πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών είναι η μελέτη των μοριακών αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν μεταξύ δύο αλληλεπιδρόντων : ενός που περιέχεται σε ένα υγρό δείγμα κι ενός ακινητοποιημένου πάνω σε ένα στερεό υποστηρικτικό υλικό. Οι επιφάνειες που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ακινητοποίηση DNA είναι συνήθως ακατάλληλες για πρωτεΐνες, λόγω των βιοφυσικών διαφορών μεταξύ των δύο τάξεων βιοαναλυόμενων ουσιών.

Οι κύριες απαιτήσεις της επιφάνειας όπου γίνεται η δοκιμασία μίας πρωτεϊνικής μικροσυστοιχίας είναι :

- Μέριμνα για βέλτιστες συνθήκες σύνδεσης των προσδεμάτων δέσμευσης (ανιχνευτών) με υψηλές δυνατότητες πρόσδεσης. Σε αντίθεση με το DNA, με τον αρνητικά φορτισμένο σκελετό φωσφορικού άλατος, οι πρωτεΐνες δεν παρέχουν μια ομοιόμορφη εξωτερική επιφάνεια, για την οποία θα μπορούσε να σχεδιαστεί μια ειδική επίστρωση με καλή πρόσφυση.
- Το υποστηρικτικό υλικό πρέπει να είναι κατάλληλο για κατασκευή υψηλής ρυθμοαπόδοσης και διαδικασίες ελέγχου. Αυτό περιλαμβάνει γρήγορη και οικονομική παραγωγή σε υψηλές ποσότητες, καταλληλότητα για ανίχνευση με χρήση φθορισμού με χαμηλό αυτοφθορισμό, και ευκολία χειρισμού κατά τη διάρκεια των διαδικασιών αποθήκευσης και προετοιμασίας, όπως και υψηλή αναπαραγωγισιμότητα.
- Διατήρηση της βιολογικής δραστηριότητας των προσδεμάτων δέσμευσης (οι πρωτεΐνες τείνουν να ξεδιπλώνονται όταν ακινητοποιούνται πάνω σε μία βάση, ώστε να επιτρέψουν στις εσωτερικές υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες να σχηματίσουν υδροφοβικούς δεσμούς με την στερεή επιφάνεια).
- Προσβασιμότητα του προσδέματος από αλληλεπιδρόν (οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και υποστρωμάτων μειώνουν την προσβασιμότητα του στόχου, πιθανότατα οδηγώντας σε λανθασμένα αρνητικά αποτελέσματα). Αυτό το θέμα είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τις πεπτιδικές μικροσυστοιχίες λόγω της μικρής μοριακής μάζας των προσδεμάτων δέσμευσης.
- Χαμηλός βαθμός μη δεσμικής μη ειδικής αλληλεπίδρασης (η επίτευξη μιας μη δεσμικής μη ειδικής πρόσδεσης χαμηλού βαθμού είναι πολύ δύσκολη όταν το δείγμα είναι ένα σύνθετο μείγμα χιλιάδων μορίων όπως ο ορός).[11] [14]



Κατά κανόνα, όταν γίνεται πρόσδεση μιας πρωτεΐνης σε μια μήτρα πρέπει να γίνονται συμβιβασμοί. Ο στόχος της πρόσδεσης είναι να συνδέσουμε τη φυσική πρωτεΐνη με τον σωστό προσανατολισμό πάνω στη μήτρα χωρίς να κινδυνεύει να διαφύγει, με συνεχή χειρισμό.

Το πρωτεϊνικό chip είναι ένα μικρό στοιχείο, στην επιφάνεια του οποίου είναι δυνατό να προσδεθούν φυσικές απομονωμένες, ανασυνδυασμένα εκφρασμένες πρωτεΐνες ή συνθετικά παραγόμενα πεπτιδία. Ακόμα και όταν τα πρωτεϊνικά αυτά chips ονομάζονται biochips μικροσυστοιχιών, αυτό δε σημαίνει πάντα ότι πρόκειται για ιδιαίτερα φορτισμένες μικροσυστοιχίες (μέχρι 200.000 θέσεις/cm<sup>2</sup>), όπως μπορεί να συμβεί με τις μικροσυστοιχίες DNA. Συνήθως τα πρωτεϊνικά chips έχουν λίγες θέσεις (8000 – 10000). Το πώς αυτές οι πρωτεΐνες ή πεπτιδία δένονται πάνω σ' ένα υπόστρωμα του biochip (ενεργοποιημένη γυάλινη επιφάνεια, μέταλλο ή πλαστικό) εξαρτάται κυρίως από την προεργασία του biochip αλλά και από τις ιδιότητες του μορίου της πρωτεΐνης. Η επιφάνεια ενός biochip μπορεί να είναι επίπεδη, δυσδιάστατη ή τρισδιάστατη.[21]

#### Δυσδιάστατες επιφάνειες (2-D) πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών

Οι δυσδιάστατες διατάξεις των chips είναι πιθανό να αποτελέσουν το σύστημα επιλογής λόγω της ευκολίας του χειρισμού τους, των χαμηλών σημάτων μη ειδικής πρόσδεσης και μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Για την παραγωγή βιοσυμβατών δυσδιάστατων επιφανειών μπορεί να γίνει χρήση της τεχνολογίας βιοτίνης-στρεπταβιδίνης. Η επιφάνεια στρεπταβιδίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση μιας ευρείας περιοχής βιοτινυλιωμένων μορίων (νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, σακχαρίδια). Οι αρχιτεκτονικές βιοτίνης- στρεπταβιδίνης έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως υποστηρικτικά υλικά αισθητήρα για τη μελέτη πολυάριθμων βιομοριακών αλληλεπιδράσεων. Ένας από τους λόγους που οδήγησαν στη γρήγορη ανάπτυξη της εφαρμογής της τεχνολογίας είναι η ευκολία με την οποία μπορούν να βιοτινυλιωθούν τα διάφορα βιομόρια. Ωστόσο σύμφυτα με τα συζευγμένα με βιοτίνη μόρια είναι και τα παρακάτω : (1) οι βιοχημικές και φυσικές ιδιότητες των βιομορίων δεν επηρεάζονται σημαντικά από το στάδιο της βιοτινυλίωσης και (2) οι ιδιότητες της βιοτίνης δεν επηρεάζονται από το παραγόμενο βιομόριο. Η σχετική ευκολία με την οποία η βιοτίνη προσκολλάται σε οργανικά μόρια υποκατεστημένα με μια θειόλη καθιστά δυνατή την χρήση υποστρωμάτων χρυσού ως υποκείμενες πλατφόρμας για την κατασκευή πρωτεϊνικών συστοιχιών.

Μεταξύ των επίπεδων biochips συγκαταλέγονται και τα λεγόμενα biochips αμινοσιλανίου. Αυτά είναι κατάλληλα τόσο για νουκλεϊκά οξέα όσο και για πρωτεΐνες και ενεργοποιούνται ομοιοπολικά. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι συνδέτες οργανοσιλανίου για την ενεργοποίηση των θετικά φορτισμένων επιφανειών αμινοσιλανίου. Με τη χρήση ενός

ηλεκτρονιόφιλου ατόμου πυριτίου λαμβάνει χώρα μία πυρινόφιλη προσθήκη μεταξύ των υδροξυλικών ομάδων μιας γυάλινης επιφάνειας και του 3-αμινοπροπυλοτριμεθοξυσιλανίου. Μ' αυτόν τον τρόπο η επιφάνεια αμινοσιλανίου του biochip αποκτά θετικό φορτίο. Έτσι υπάρχει η δυνατότητα μιας μη ειδικής αλλά μη ομοιοπολικής σύζευξης μιας πεπτιδικής αλυσίδας ή μιας πρωτεΐνης υπό κορεσμό των αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων (για παράδειγμα ασπαρτικό ή γλουταμινικό). Ένας σχετικά μόνιμος ηλεκτροστατικός δεσμός δημιουργείται μέσω της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με τις ομάδες αμινοσιλανίου του biochip αμινοσιλανίου. Η πρόσδεση των αρνητικά φορτισμένων μακρομορίων ονομάζεται μη ειδική προσρόφηση. Γι' αυτό ο στερεοχημικός προσανατολισμός των μακρομορίων δεν μπορεί να προβλεφθεί.

Μια εναλλακτική ομοιοπολική πρόσδεση των μακρομορίων π.χ. σε ενεργοποιημένο γυάλινο μέσο είναι η χρήση επίπεδων επιφανειών αλδεϋδης. Η παραγωγή των επιφανειών αλδεϋδης είναι παρόμοια με αυτή των biochips αμινοσιλανίου. Και τα δύο απαιτούν πρόσδεση μεταξύ συνδεδετών οργανοσιλανίου και των υδροξυλικών ομάδων του γυάλινου μέσου. Κανονικά η δραστική ομάδα αλδεϋδης ( $R-CH=O$ ) προσδένεται στην επιφάνεια του biochip με μια αλειφατική ομάδα ή με ένα μεγέθους 8-12 ανθράκων βραχίονα διαχωριστή. Μέσω πυρινόφιλης προσθήκης πρωτοταγών αμινών σχηματίζονται διπλοί δεσμοί με την αντίδραση ονομάζεται σχηματισμός της βάσης schiff. Η αφυδάτωση λαμβάνει χώρα σαν φυσικό γεγονός μετά την προσθήκη μακρομορίων σε μια επιφάνεια αλδεϋδης και χωρίς επιπλέον ενέργεια ή καταλύτες. Με την πλατφόρμα μικροσυστοιχίας η υγρασία είναι <45% προκειμένου να επάγουμε επαρκή αφυδάτωση. Ωστόσο με τις επιφάνειες αλδεϋδης δεν είναι δυνατό να διευθετήσουμε επακριβώς τις πρωτεΐνες. Η στερεοχημική τοποθέτηση είναι τυχαία όπως και στην περίπτωση με τις επιφάνειες αμινοσιλανίου. Εκτός από τον ομοιοπολικό δεσμό άλλο ένα διακριτό πλεονέκτημα σε σχέση με τις επιφάνειες αμινοσιλανίου είναι το γεγονός ότι οι επιφάνειες αλδεϋδης είναι υδροφοβικές. Εξαιτίας αυτού τα τοποθετούμενα πρωτεϊνικά διαλύματα είναι λιγότερο αραιωμένα, καθιστώντας δυνατές πιο ακριβείς θέσεις. Καθώς ο σχηματισμός βάσης Schiff συμβαίνει αυθόρμητα, η επιφάνεια αλδεϋδης πρέπει να απενεργοποιηθεί μετά την πρόσδεση των πρωτεϊνών. Αλλιώς είναι πιθανό να λάβει χώρα ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών αλληλεπιδρώντων με διαθέσιμες ελεύθερες ομάδες αλδεϋδης.

Σημαντικό είναι επίσης να χρησιμοποιείται εξαρτημένος τύπος επιφάνειας των μικροσυστοιχιών, γιατί αυτά τα biochips παρουσιάζουν έναν ελάχιστο αυτο-φθορισμό, επιτρέποντας ακόμα και φόρτωση των πρωτεϊνών και δεν υποβάλλονται σε μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με τις προς ανίχνευση πρωτεΐνες ή τα μέρη πρόσδεσής τους.

Ιδιότητα	Επιφάνεια αμινοσιλανίου	Αλδεϋδική επιφάνεια
Φορτίο επιφάνειας	Θετικό	Ουδέτερο
Χαρακτήρας επιφάνειας	Υδρόφιλη	Υδρόφοβη
Μέθοδος πρόσδεσης	Μη ειδική	Ομοιοπολική
Διαδικασία πρόσδεσης	Ψήσιμο στον φούρνο, σύζευξη UV, σταυροσύνδεση	Αφυδάτωση
Χημεία πρόσδεσης	Ηλεκτροστατική	Βάση Schiff
Απαιτούμενος σύνδεσμος	Κανένας	Πρωταρχική αμίνη
Καταλληλότητα για DNA και ολιγονουκλεοτίδια	Πολύ καλή	Πολύ καλή
Καταλληλότητα για πεπτιδία και πρωτεΐνες	Καλή	Πολύ καλή

Πίνακας 5. Σύγκριση επιφανειών υποστρώματος αλδεϋδης και αμινοσιλανίου. Οι ιδιότητες των πιο δημοφιλών υποστρωμάτων για biochips συγκρίνονται.

Εκτός των επιπέδων αμινοσιλανίων και των επικαλυμμένων με αλδεϋδη biochips που περιγράφηκαν παραπάνω, είναι διαθέσιμη μία πληθώρα από επιπλέον δυσδιάστατες εναλλακτικές για έμμεση πρόσδεση μιας καθαρής ή ανασυνδυασμένα εκφραζόμενης πρωτεΐνης. [17] [21]

#### Τρισδιάστατες (3-D) επιφάνειες πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών.

Στην τρισδιάστατη ομάδα των biochips, λεπτές ταινίες δομής πολυμερούς μεμβράνης είναι τοποθετημένες σε στρώσεις πάνω στους φορείς του γυάλινου μέσου. Η υδροφοβική αλληλεπίδραση επιφέρει πολύ μεγάλη δυνατότητα πρόσδεσης. Το πλεονέκτημα αυτών των 3D biochips είναι ότι οι τοποθετημένες πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν με δραστικές επιφανειακές ομάδες της μήτρας του biochip και συνεπώς δεν υφίσταται αλλαγές η διαμόρφωσή τους, λόγω των φορτίων της επιφάνειας. Οι πρωτεΐνες είναι σφιχτά τοποθετημένες στη μήτρα μετά την εναπόθεση και μπορούν να διατηρήσουν την φυσική τους στερεοχημική κλίση. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι η βελτιωμένη πιθανότητα εύρεσης ενός πιθανού αλληλεπιδρόντος.[17] [21]

Οι τρισδιάστατες επιφάνειες πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών που βασίζονται σε ένα περιβάλλον τύπου υδροπηκτής αναπτύσσονται επίσης σήμερα για να μιμηθούν τις ιδιότητες της μεγάλης ποσότητας του διαλύματος. Κριτικοί των δυσδιάστατων επιφανειών υποστηρίζουν ότι τέτοιες επιφάνειες είναι πολύ σκληρές για να επιβιώσουν οι ευαίσθητες πρωτεΐνες. Ένα τρισδιάστατο ρευστό περιβάλλον είναι κατάλληλο για να παραμείνουν οι πρωτεΐνες στην ενεργό κατάστασή τους. Καθώς οι τρισδιάστατες αρχιτεκτονικές έχουν μεγαλύτερη περιοχή επιφάνειας από τα

κανονικά δυσδιάστατα συστήματα, μπορούν να εισαχθούν πιο πολλές δραστικές ομάδες σ' αυτό το πλαίσιο, για να διευκολύνουν την αυξημένη ακινητοποίηση των ανιχνευτών.

Πορώδης χρυσός, υλικά sol-gel, λαχνοειδή πολυμερή και επιφάνειες δεξτράνης αποτελούν τυπικά παραδείγματα τέτοιας τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την αύξηση της επιφανειακής πυκνότητας των ακινητοποιημένων ανιχνευτών. Η χρήση αυτής της τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής για εφαρμογές αισθητήρων εξαρτάται πολύ από τον αριθμό των συνθετικών σταδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή αυτής της αρχιτεκτονικής κι επίσης στην φύση του υποστρώματος. Την τελευταία δεκαετία SAMs τροποποιημένες με δεξτράνη έχουν γίνει το σύστημα επιλογής για πολλές μελέτες βιομοριακών αλληλεπιδράσεων. Η διευρυμένη χρήση αυτής της τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής προωθήθηκε κυρίως λόγω της τεράστιας εμπορικής επιτυχίας της SPR, κατασκευαστή οργάνων του κατασκευαστή BIACORE.

Πολυάριθμες επιφάνειες πρωτεϊνικών chips μπορούν να δημιουργηθούν με την ενεργοποίηση της επιφάνειας δεξτράνης. Με την χρήση της δεξτράνης ως βάση, μπορούν να παραχθούν επιφάνειες που ενσωματώνουν θειόλη, αμίνη, (στρεππ)αβιδίνη ή αλδεϋδικές ομάδες. Καθότι αυτά τα chips αισθητήρα είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά και μπορούν να αντέξουν στάδια αναγέννησης οξέων ή βάσεων, μπορούν να ξαναχρησιμοποιηθούν αρκετές φορές χωρίς κάποια ουσιαστική απώλεια της επιφανειακής πυκνότητας των προσδεμάτων.

Ενώ όμως αυτές οι τρισδιάστατες επιφάνειες έχουν πολλά πλεονεκτήματα, εξακολουθούν να αντιμετωπίζουν προβλήματα που σχετίζονται με τις δράσεις μεταφοράς μάζας και υψηλά σήματα της μη ειδικής πρόσδεσης, προερχόμενα από μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Οι τρισδιάστατες επιφάνειες από δεξτράνη επιβάλλουν στη μεταφορά μάζας περιορισμούς που μπορούν να μεταβάλουν την ενδογενή κινητική της αλληλεπίδρασης.[17]

Οι συμβατικές τεχνικές για τη διάταξη βιομορίων πάνω σε επίπεδα υποστρώματα κανονικά περιλαμβάνει απευθείας εφαρμογή των θέσεων πάνω σε επιφάνειες με χρήση ιδιαίτερα αυτοματοποιημένων οργάνων μικροεναπόθεσης. Η επίπεδη διάταξη χρησιμοποιείται ευρέως παρόλο που η τυπική επίπεδη συστοιχία κάποιες φορές πάσχει από έλλειψη ομοιομορφίας και την βραδεία διάχυση των στόχων στην επιφάνεια πρόσδεσης. Κάποιοι συγγραφείς έχουν δείξει ότι μία ενεργός μίξη του διαλύματος υβριδισμού έχει ως αποτέλεσμα κέρδος σε ευαισθησία και βελτιώνει την ακρίβεια και την αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών. Μια διαφορετική προσέγγιση για την υπαρνίκηση αυτού του προβλήματος συνίσταται στην χρήση συστοιχιών κωδικοποιημένων μικροσωματιδίων για την εφαρμογή υβριδισμού σε ένα περιβάλλον παρόμοιο με διάλυμα. Σε αντίθεση με την κωδίκευση θέσης ή χώρου, στις οποίες είναι η ακριβής θέση πάνω στην επιφάνεια της συστοιχίας που επιτρέπει την ταυτοποίηση του αναλυόμενου μορίου, στις μη επίπεδες συστοιχίες κάθε μικροφορέας πρέπει να είναι κωδικευμένος για να εκτιμηθεί η ταυτότητα του κάθε ανιχνευτή. Οι μικροφορείς με διαφορετικούς ανιχνευτές προσκολλημένους στην επιφάνεια μπορούν να αναμειχθούν στο

ίδιο φιαλίδιο που περιέχει την αναλυόμενη ουσία-στόχο. Σ' αυτό το περιβάλλον που μοιάζει με διάλυμα, οι αντιδράσεις βαίνουν με κινητική διαλύματος. Ο μοναδικός κώδικας πάνω σε κάθε μικροφορέα επιτρέπει είτε στο πρόσδεμα είτε στην χημική ένωση που είναι προσκολλημένη στην επιφάνεια του φορέα να ταυτοποιηθεί με σαφήνεια.

Ένα ακόμη πλεονέκτημα της χρήσης των μικροσωματιδίων όπως σφαιρίδια από latex ή γυαλί σε δοκιμασίες διάταξης συστοιχίας αφορά στην αυξημένη επιφάνεια πρόσδεσης που παρέχουν τρισδιάστατα σωματίδια. [11]

### Συστοιχίες από γυαλί

Οι πρώτες στρατηγικές για την κατασκευή πρωτεϊνικών συστοιχιών σε γυαλί αναπτύχθηκαν από την ομάδα του Mirzabekov. Συστοιχίες παράγονταν με την ακινητοποίηση πρωτεϊνών σε μικροσκοπικούς θύλακες πήγματος που ήταν προσκολλημένοι στην γυάλινη επιφάνεια. Διαφορετικοί ανοσοπροσδιορισμοί, ανίχνευση αντιγόνων και ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας διεξάγονταν. Λόγω της τρισδιάστατης δομής της μήτρας η πρωτεϊνική ακινητοποίηση ήταν πολύ επαρκής. Το ομογενώς υγρό περιβάλλον ελάττωνε την πρωτεϊνική αποδιάταξη. Μειονεκτήματα των επιστρώσεων πηκτής είναι η περίπλοκη παρασκευή και η δυσκολία της επανάκτησης των μορίων από το πήγμα, λόγω της οποίας αυξάνεται η μη ειδική πρόσδεση.

Με την χρήση ρομποτικού εξοπλισμού προσαρμοσμένου από την παραγωγή των μικροσυστοιχιών cDNA, οι MacBeath και Schreiber περιέγραψαν μία στρατηγική κατασκευής που θα άνοιγε προοπτικές για δυναμικά απλή μεγάλης κλίμακας πρωτεϊνική ανάλυση. Οι πρωτεΐνες τοποθετούνταν πάνω σε μία γυάλινη επιφάνεια επικαλυμμένη με είτε σιλάνιο που περιέχει αλδεΰδη ή ένα αντιδραστήριο σταυροσύνδεσης που αντιδράει με πρωτοταγείς αμίνες. Αυτή η στρατηγική χρησιμοποιούνταν για την εξέταση αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-προσδέματος και για την ταυτοποίηση ειδικών υποστρωμάτων κάποιων πρωτεϊνικών κινασών. Οι Haab et al. ανέπτυξαν μικροσυστοιχίες αντισώματος-αντιγόνου πάνω σε γυάλινες πλάκες επιστρωμένες με poly-L-λυσίνη. Ωστόσο, από τα 115 δοκιμαζόμενα ζεύγη αντισώματος-αντιγόνου, μόνο 50% των αντιγόνων και 20% των διατεταγμένων αντισωμάτων παρείχαν ειδικά και ακριβή αποτελέσματα. Οι αλληλεπιδράσεις αντισώματος-αντιγόνου μπορούσαν να ανιχνευθούν σε συγκεντρώσεις χαμηλές, της τάξεως 1ng/mL. Τέτοιες συστοιχίες μπορούν να παραχθούν με την χρήση πολλών πρωτοκόλλων, του εξοπλισμού και του λογισμικού που ήδη υπάρχουν για τις μικροσυστοιχίες DNA, διευκολύνοντας έτσι την προετοιμασία, την διαδικασία και την αξιολόγηση των δεδομένων. Ωστόσο, η πολύ μεγαλύτερη πολυπλοκότητα των πρωτεϊνών παρουσιάζει μία πρόκληση που απαιτεί πολλές καινοτόμες τεχνικές λύσεις. Για τον λόγο αυτό μεγάλη σημασία έχει δοθεί στην προσαρμογή υπαρχουσών τεχνολογιών μικροσυστοιχιών με γυάλινες πλάκες για χρήση με

πρωτεΐνες. Σαν αποτέλεσμα αυτού, η πρακτική του τυπώματος απευθείας πάνω σε χημικά κατεργασμένες γυάλινες επιφάνειες, εκτός από την έμμεση λειτουργία τους ως στερεό υποστηρικτικό υλικό, τώρα χρησιμοποιείται πιο ευρέως για πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες. Ο βασικός παράγοντας-κίνητρο για την χρήση των γυάλινων πλακών είναι η εκμετάλλευση των ρομποτικών μικροστοιχητών θέσεων και σαρωτών λέιζερ που είναι πλέον κοινοί για την παρασκευή μικροσυστοιχιών DNA και την απόκτηση εικόνας αντίστοιχα. Η συνήθης διάταξη μικροσυστοιχιών συνεπώς παρέχει την ευκαιρία για επιστήμονες μιας πιο ευρείας περιοχής να υιοθετήσουν πρωτεωμικές μορφές υψηλής ρυθμοαπόδοσης (HT) χρησιμοποιώντας την υπάρχουσα υποδομή και εξοπλισμό ανάλυσης για την ανάλυση και παρασκευή μικροσυστοιχιών DNA.

Ένας αριθμός διαφορετικών χημικών κατεργασιών που περιλαμβάνουν poly(L-λυσίνη), αλδεϋδη, νικέλιο, εποξυ, αβιδίνη και νιτροκυτταρίνη είναι κατάλληλες για την ακινητοποίηση πρωτεϊνών πάνω σε γυαλί. Η επιλογή της χημείας των επιφανειών θα καθορίσει τη μέθοδο πρωτεϊνικής προσκόλλησης στο ενεργοποιημένο λειτουργικά υποστηρικτικό υλικό, το οποίο με τη σειρά του θα καθορίσει το εάν οι πρωτεΐνες απαιτούν τροποποίηση πριν την στοίχιση. Οι αμινο-δραστικές επιστρώσεις δεν απαιτούν την τροποποίηση των πρωτεϊνών για την αποτελεσματική ακινητοποίηση, καθώς η ομοιοπολική προσκόλληση επιτυγχάνεται μέσω τις τυχαίας σταυροσύνδεσης των αμινομάδων. Η πρωτεϊνική προσκόλληση σε πλάκες επιστρωμένες είτε με νικέλιο είτε με αβιδίνη γίνεται μέσω πρόσδεσης συγγένειας σε υπολείμματα ιστιδίνης ή βιοτίνη αντίστοιχα και συνεπώς απαιτεί μια ανασυνδυασμένη προσέγγιση για την κατασκευή τετηγμένων πρωτεϊνών.

Το πλεονέκτημα της μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης είναι ότι επειδή η προσκόλληση συμβαίνει αποκλειστικά στην ετικέτα συγγένειας, ένα σημαντικό υποσύνολο πρωτεϊνών θα ακινητοποιηθεί με έναν μάλλον ενιαίο προσανατολισμό, όπου οι λειτουργικές τους περιοχές εκτίθενται στο διάλυμα και είναι διαθέσιμα για αλληλεπίδραση με το σημασμένο δείγμα. Άλλα βασισμένα σε μεμβράνη διαλύματα όπως η τεχνολογία πλακών επιφάνειας φθορίζουσας συστοιχίας διευκολύνουν την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών μέσω παθητικής προσρόφησης πάνω σε μια επιφάνεια νιτροκυτταρίνης και σε πολλές περιπτώσεις αποδίδουν υψηλότερα ποσοστά σήματος-θορύβου σε σύγκριση με πλάκες με επεξεργασία με poly(L-λυσίνης) ή αλδεϋδης. [8] [12]

Εκτός του ότι είναι συμβατές με τον καθιερωμένο εξοπλισμό των μικροσυστοιχιών και με τον εξοπλισμό ανίχνευσης που χρησιμοποιείται για DNA chips, οι γυάλινες πλάκες έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι οικονομικές. Η πλειοψηφία των μελετών τώρα χρησιμοποιεί γυάλινες πλάκες. Ωστόσο έχουν υψηλή ταχύτητα εξάτμισης και είναι επιρρεπείς σε πιθανή διασταυρωτή μόλυνση.

Οι περισσότερες ομάδες πλέον διατάσσουν απευθείας πρωτεΐνες και αντισώματα πάνω σε επίπεδα γυάλινα πλακίδια και η ανίχνευση διεξάγεται σε περιβάλλον ελεγχόμενης υγρασίας.[2]

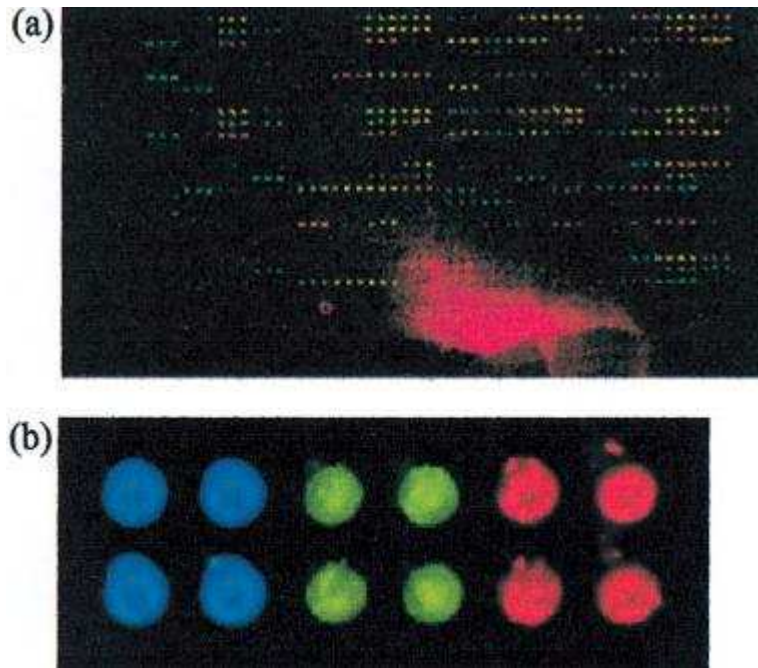
## Επίχριση επιφανειών

Από την έναρξη του Προγράμματος για το Ανθρώπινο Γονιδίωμα (Human Genome Project), το γυαλί έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως υπόστρωμα για την παρασκευή μικροσυστοιχιών DNA. Ενώ τέτοιες συστοιχίες έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την έρευνα της γονιδιακής έκφρασης, του πολυμορφισμού των νουκλεοτιδίων (SNP) και των αλληλεπιδράσεων DNA-πρωτεΐνης, η ποιότητα των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από τέτοιες συστοιχίες ήταν κάθε άλλο παρά ικανοποιητική. Σύνθετα θέματα που αναφέρονται σε μορφολογία θέσης, ομοιογένεια του σήματος κατά μήκος της θέσης, επίχριση της μικροσυστοιχίας και μη ειδική προσρόφηση εξακολουθούν να μην είναι πλήρως διευκρινισμένα. Πέρα από τις παραπάνω προκλήσεις, είναι ακόμα δύσκολη η σύγκριση πειραματικών αποτελεσμάτων που έχουν ληφθεί σε δύο διαφορετικά εργαστήρια με την χρήση του ίδιου συνόλου συστοιχιών. Η αναπαραγωγιμότητα των δεδομένων αποτελεί μείζον θέμα και αν η τρέχουσα τάση συνεχιστεί, θα καταστεί πολύ δύσκολη η ακριβής αξιολόγηση των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων που σχηματίζουν την βάση πολλών ερευνητικών μελετών και μελετών ανακάλυψης φαρμάκων.

Οι περισσότερες σημερινές αναλύσεις των βασισμένων στις πρωτεΐνες αλληλεπιδράσεων πάνω σε μικροσυστοιχίες βασίζονται σε επιφάνειες και διατάξεις που έχουν χρησιμοποιηθεί στην περίπτωση των συστοιχιών DNA. Εποξειδικές πλάκες, πλάκες αλδεϋδης ή πλάκες γυαλιού με επίστρωση πολυλυσίνης χρησιμοποιούνται σήμερα για την ακινητοποίηση αντιγόνων ή αντισωμάτων. Κατόπιν πειράματος με χρήση συστοιχιών πολυλυσίνης για την παρακολούθηση των αλληλεπιδράσεων 115 ζευγών αντιγόνου/αντισώματος με χρήση σύνθετων διαλυμάτων πρωτεϊνικών μειγμάτων προέκυψε ότι ενώ το ποσοστό επιτυχίας των δεδομένων των αλληλεπιδράσεων ήταν 20-50%, παραμένουν ανησυχίες σχετικά με την επίχριση των μικροσυστοιχιών και την μη ειδική πρόσδεση (εικόνα 33). Η επίχριση των μικροσυστοιχιών είναι ένα κοινό τεχνητό προϊόν που βρίσκεται στις περισσότερες συστοιχίες που βασίζονται στο γυαλί και είναι μία από τις μεθόδους με την οποία λαμβάνει χώρα διασυνομιλία μεταξύ γειτονικών ανιχνευτών, οδηγώντας σε λανθασμένα αποτελέσματα. Εκτός από την επίχριση των μικροσυστοιχιών, τα ηλεκτροστατικά φορτία που υπάρχουν στο γυαλί μπορούν να οδηγήσουν και στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

Σε άλλη μία μελέτη αναφέρθηκαν αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεγάλης κλίμακας με την χρήση γυάλινων πλακών, επιστρωμένων με αλδεϋδη. Ενώ οι πλάκες διέκριναν επιτυχώς τις ειδικές και μη ειδικές αλληλεπιδράσεις, εξακολουθούν να υπάρχουν θέματα σχετικά με την «σβέση» ή την εξουδετέρωση των υπολοίπων δραστικών ομάδων πάνω στις πλάκες. Ενώ η μορφολογία θέσης δεν προκαλεί μεγάλη ανησυχία στις συνήθεις ερευνητικές μελέτες των εργαστηρίων, αποκτάει μεγάλη σημασία όταν διερευνώνται κάποιες χιλιάδες πρωτεϊνικών δειγμάτων τοποθετημένων σε μία μόνο πλάκα. Οι εντάσεις φθορισμού που προέρχονται από τις θέσεις (εικόνα 33) και τις γειτονικές τους περιοχές (αν οι θέσεις δεν είναι

ομοιογενείς) μπορούν να επηρεάσουν τη διαδικασία απόκτησης δεδομένων. Επιπλέον, εάν η χημεία επιφανειών ανάμεσα στις θέσεων δεν είναι ομογενής, μπορεί να παρατηρηθούν ποικίλες εντάσεις του σήματος φθορισμού για την ίδια θέση. Εάν η ανάλυση δεδομένων δεν είναι ιδιαίτερα εξελιγμένη, τέτοιες θέσεις μπορούν να οδηγήσουν γενικά σε μειωμένες δράσεις κατά το στάδιο της ανάλυσης, οδηγώντας σε παραπλανητικά επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. [17]



Εικόνα 33. (α) Αλληλεπιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος πάνω σε γυάλινες πλάκες με επίστρωση poly-luciferin. Προσοχή στην κηλίδα (smearing) στο κατώτατο άκρο της πλάκας. Τέτοια φαινόμενα επίχρησης μπορούν να οδηγήσουν σε διασυνομιλία μεταξύ των γειτονικών θέσεων. (β) Αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης πάνω σε πλάκες με επίστρωση αλδεύδης. Τέτοιες πλάκες πάσχουν από φτωχή μορφολογία και ανομοιογένεια του σήματος κατά μήκος της θέσης, δημιουργώντας προβλήματα κατά το στάδιο απόκτησης των δεδομένων.



## Συγκριτική μελέτη υλικών επιφανειών

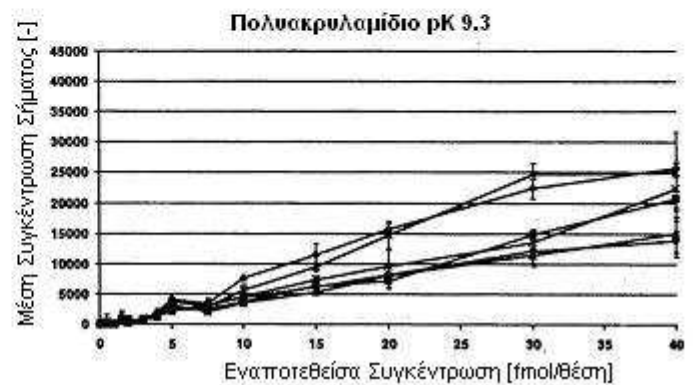
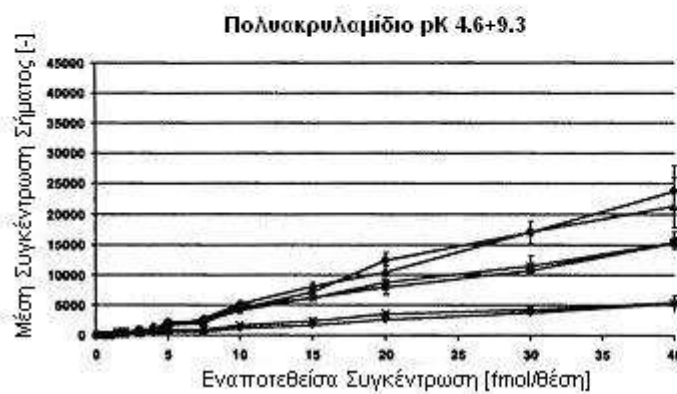
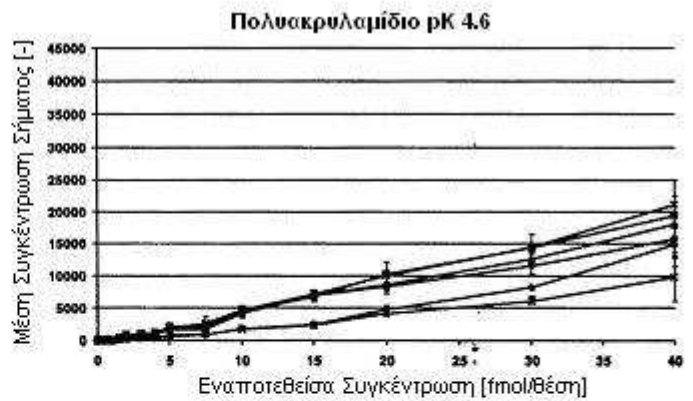
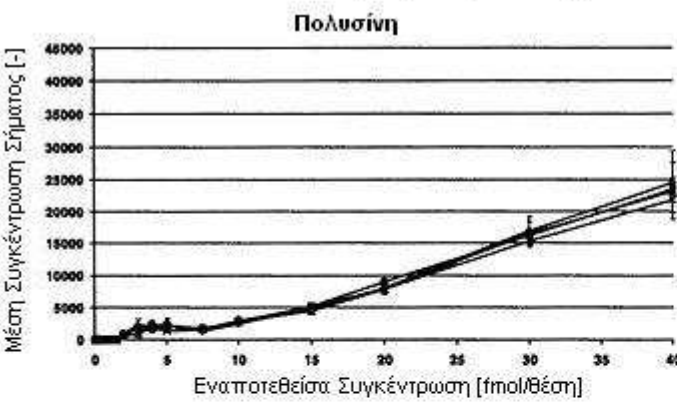
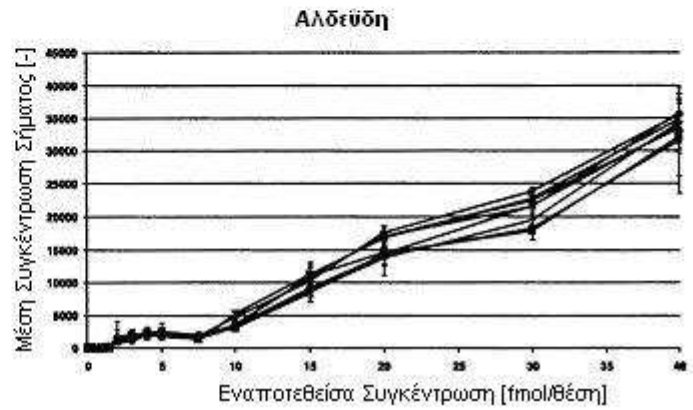
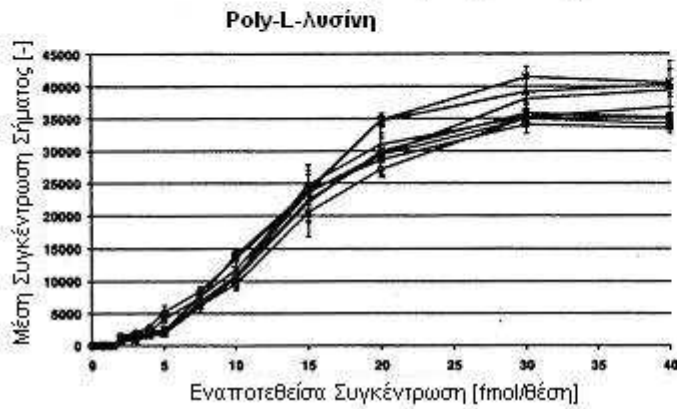
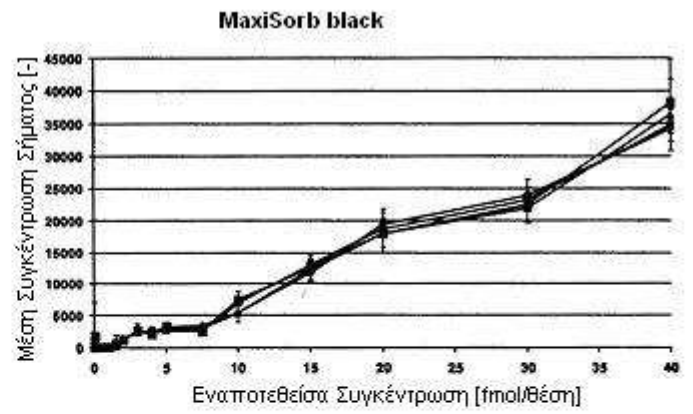
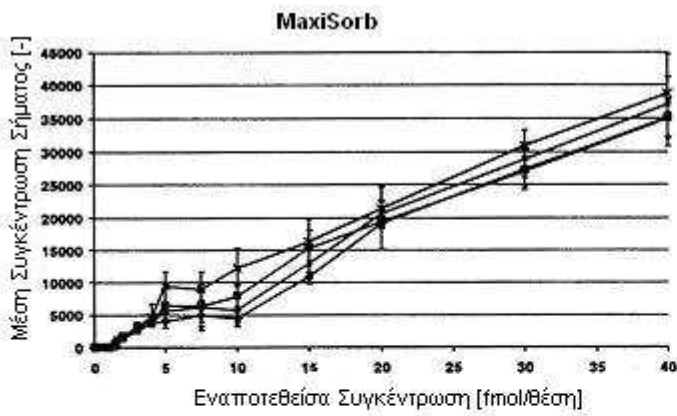
Παλιότερα, οι μεμβράνες PVDF (polyvinylidene fluoride, πολυβινύλια φθοριωμένα) αποτελούσαν το υπόστρωμα επιλογής για τις πρωτεϊνικές μακροσυστοιχίες υψηλής πυκνότητας και μικροσυστοιχίες. Ωστόσο, η απαίτηση για ακόμα μεγαλύτερες πυκνότητες συστοιχιών και μικρότερους όγκους δείγματος οδήγησε στη μεταφορά των μεθόδων και αρχών των μικροσυστοιχιών DNA στα πρωτεϊνικά chips. Σήμερα υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες πλακών μικροσυστοιχιών : επιφάνειες καλυμμένες με πηκτική, όπως το πολυακρυλαμίδιο ή η αγαρόζη και επιφάνειες από πλαστικό ή τροποποιημένο γυαλί χωρίς επίστρωση πηκτικής, όπως η αλδεΐδη, η poly-L-λυσίνη ή πλάκες επιστρωμένες με νικέλιο.

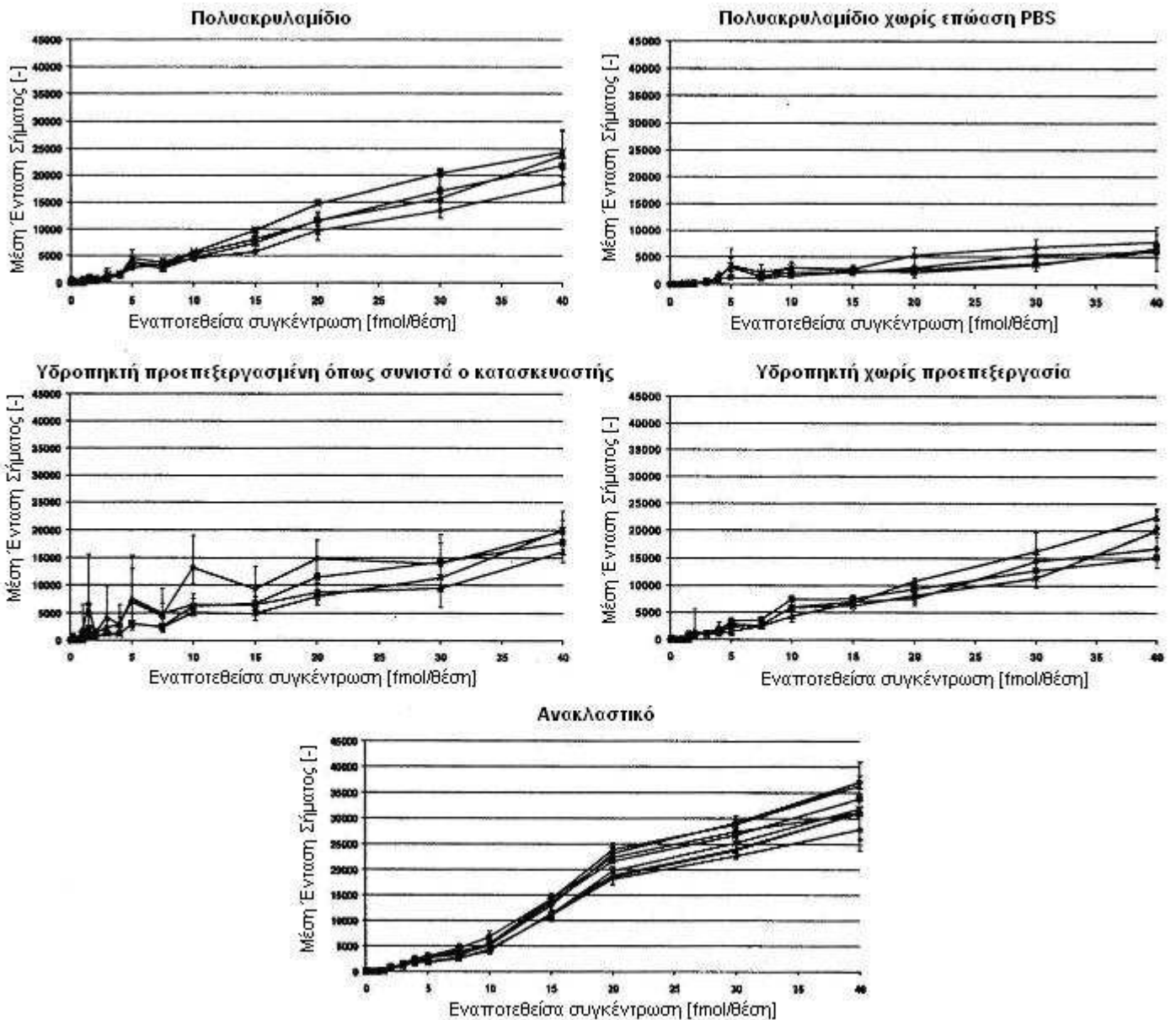
Μετά από συγκριτική μελέτη για την εύρεση της καταλληλότερης επιφάνειας στις πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν πλάκες από πλαστικό, επιστρωμένες με πηκτική και χημικά τροποποιημένες γυάλινες πλάκες χωρίς επίστρωση πηκτικής, προέκυψαν τα παρακάτω: Γυάλινες πλάκες με χημικές τροποποιήσεις όπως poly-L-λυσίνη και ομάδες αλδεΐδης, που προκαλούν την πρόσδεση πρωτεϊνών και αντισωμάτων μέσω ηλεκτροστατικών και ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων είναι εύκολες στην παρασκευή και τον χειρισμό και έχουν μεγάλη αντοχή. Και οι τρεις επιστρώσεις έχουν πολύ καλές αναλογίες σήματος-θορύβου και διαπεδιακούς συντελεστές μεταβλητότητας από 12% (πολυλυσίνη, polylsine) έως 20% (poly-L-λυσίνη). Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν σχετικά με την ομοιογένεια του σήματος. Ωστόσο, ένα μειονέκτημα αυτού των πλακών αυτού του τύπου είναι ότι το μέσο όριο ανίχνευσης είναι 2000amol/θέση, ενώ άλλες πλάκες έχουν μέσα όρια ανίχνευσης 1313amol/θέση. Εναλλακτικά, η χωρίς επίστρωση πηκτικής πλαστική πλάκα που αποτελείται από μαύρο MaxiSorb πολυμερές έχει ένα μέσο όριο ανίχνευσης 1500amol/θέση. Όμως οι μέσοι συντελεστές μεταβλητότητας και για τις διαφανείς και για τις μαύρες πλάκες είναι στην περιοχή 15-32%. Η τελική πλάκα μικροσυστοιχίας αυτής της ομάδας είναι η Ανακλαστική πλάκα μικροσυστοιχίας, που παρέχει μια επιφάνεια που μοιάζει με καθρέφτη. Η σάρωση των πλακών αυτών με το ίδιο όφελος όπως και στις άλλες πλάκες ανέβασε και την ένταση του σήματος και τη μη ειδική πρόσδεση. Συνεπώς, μία ρύθμιση μικρότερου κέρδους απέδωσε καλύτερα αποτελέσματα. Αν και το όριο ανίχνευσης είναι μόνο 2000 amol/θέση, η πλάκα αυτή επέδειξε πολύ καλά αποτελέσματα σε ό,τι αφορά την ενδοπεδιακή (intrafield) και διαπεδιακή (interfield) μεταβλητότητα και απέδωσε εντάσεις σήματος που μπορούν να συγκριθούν με άλλες επιφάνειες που σαρώθηκαν με μεγαλύτερο κέρδος.

Η ομάδα των πλακών με επίστρωση πηκτικής αποτελείται από πηκτές πολυακρυλαμιδίου, που εγχύονται πάνω σε μία αντικειμενοφόρο γυάλινη πλάκα και συγκρατούν τα αντισώματα με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η ομάδα των πλακών με επίστρωση πηκτικής μπορεί να χωριστεί στις εμπορικές, αυτόματα κατασκευαζόμενες πλάκες υδροπηκτικής και στις χειρωνακτικά φτιαγμένες πλάκες πολυακρυλαμιδίου. Οι πλάκες υδροπηκτικής αποδίδουν καλύτερα όταν

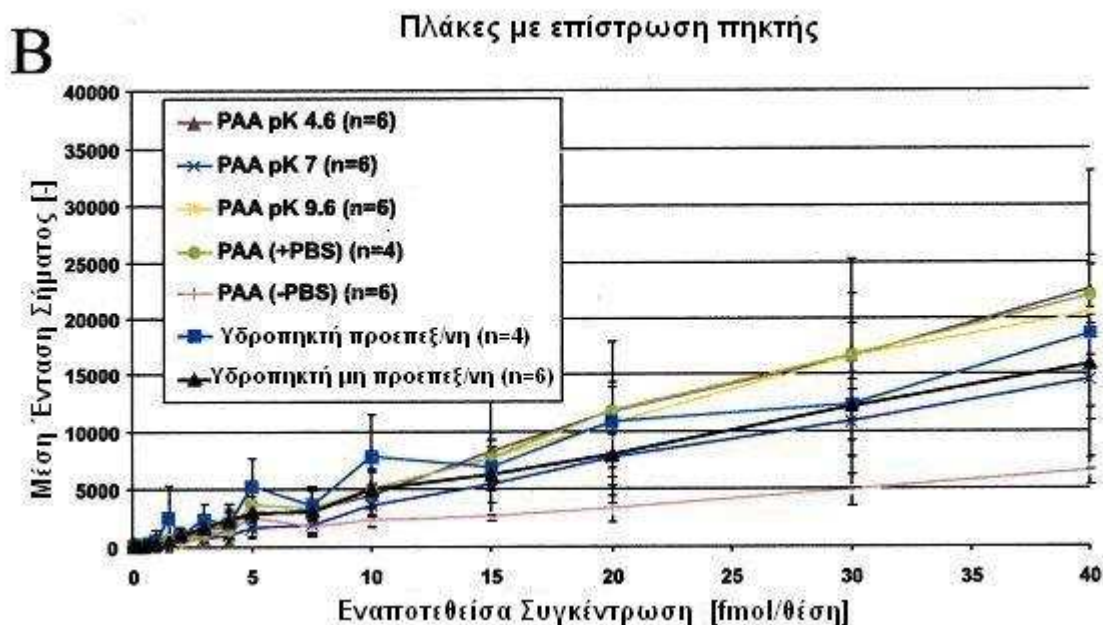
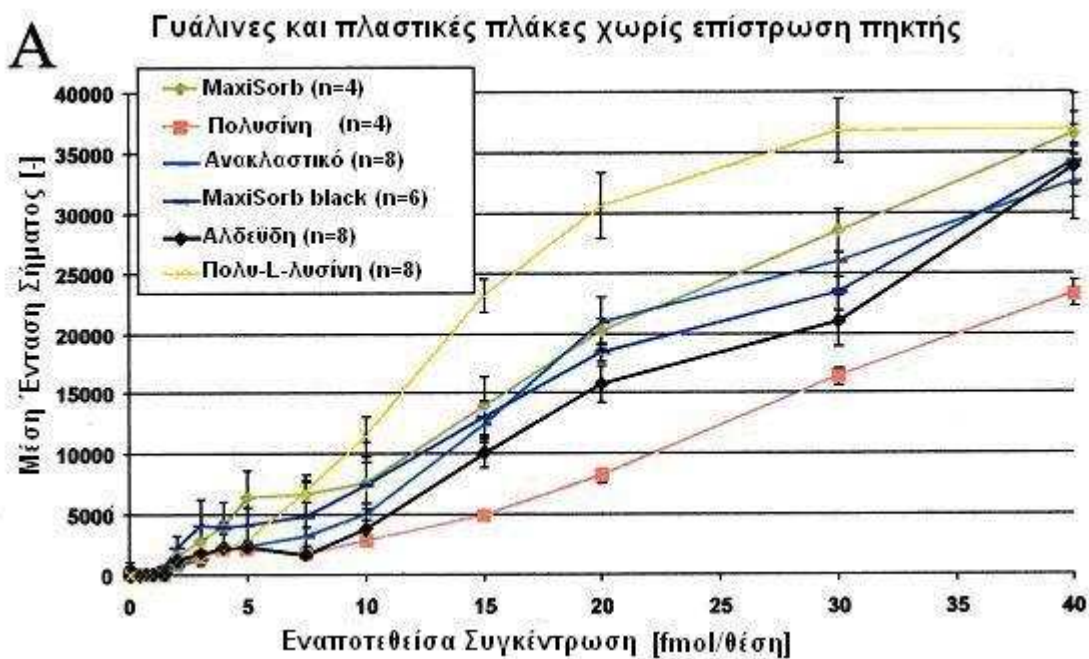
χρησιμοποιούνται συστοιχίες αντισωμάτων από πλευράς ορίου ανίχνευσης, αλλά επέδειξαν μεγαλύτερες μεταβλητότητες από τις πλάκες χωρίς επίστρωση πηκτής. Η προεργασία των πλακών υδροπηκτής όπως συνιστάται από τον κατασκευαστή αποδίδει καλύτερα όρια ανίχνευσης, αλλά δίνει μεγαλύτερους συντελεστές μεταβλητότητας. Οι χειρωνακτικά κατασκευασμένες πλάκες πολυακρυλαμιδίου προ επώασης με PBS έδωσαν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης 1875 απολ/θέση σε σύγκριση με τις ακατέργαστες πλάκες και επέδειξαν πιο αξιόπιστα και καλύτερα αναπαραγώγιμα αποτελέσματα με συντελεστές μεταβλητότητας 14% και 15% για ενδοπεδιακή και διαπεδιακή ανάλυση αντίστοιχα.

Η έρευνα για τις συνθήκες αποθήκευσης των μικροσυστοιχιών με ακινητοποιημένα αντισώματα έδειξε ασήμαντες απώλειες της έντασης του σήματος με το πέρασμα του χρόνου για όλες τις επιφάνειες χωρίς επίστρωση πηκτής και σε δοκιμασμένες συνθήκες. Ωστόσο, οι πλάκες με επίστρωση πηκτής που αποθηκεύτηκαν σε ξηρό περιβάλλον στους 4 °C απεκάλυψαν μεγαλύτερες εντάσεις σήματος σε σύγκριση μ' αυτές σε διάλυμα (blocking solution) στους 4 °C. Αυτό μπορεί να προκληθεί από διάχυση των επικαλυμμένων αντισωμάτων στο blocking solution κι έτσι ευνοεί συνθήκες αποθήκευσης σε ξηρό περιβάλλον. Όλες οι εξεταζόμενες πλάκες επέδειξαν μια απρόσμενη αύξηση απόδοσης μετά από 2 βδομάδες και κυρίως οι μικροσυστοιχίες MaxiSorb (black), όπου ο κορεσμός στην ένταση του σήματος ελήφθη μόλις μετά από 2 βδομάδες αποθήκευσης.





Εικόνα 34. Γραφικές παραστάσεις που δείχνουν τις μέσες εντάσεις σήματος (σχετικές μονάδες) έναντι ολικής συγκέντρωσης πολυκλωνικών αντι-ινωδογόνων αντισωμάτων εφαρμοσμένων ανά θέση για 11 διαφορετικά υλικά μικροσυστοιχιών. Το κάθε σημείο αναπαριστά τη μέση ένταση σήματος εκ των τεσσάρων μετρηθέντων. Οι κατακόρυφες γραμμές πριστούν το ελάχιστο και το μέγιστο σήμα των τεσσάρων. Επιπροσθέτως, για δύο chips με επίστρωση πηκτής, δοκιμάστηκε η επίδραση της προεπεξεργασίας της επιφάνειας. Η προεπεξεργασία για τις πλάκες υδροπηκτικής περιλαμβάνει ένα στάδιο έκπλυσης με νερό και περιγράφεται στον οδηγό πρωτοκόλλου που προμηθεύεται με τις πλάκες. Η προεπεξεργασία των πλακών πολυακρυλαμιδίου περιλαμβάνει την παράλειψη του σταδίου της επώασης με PBS πριν την εναπόθεση.



Εικόνα 35. Σύγκριση διαφορετικών υλικών μικροσυστοιχιών που έχουν εναποτεθεί με πολυκλωνικά αντι-ινωδογόνα αντισώματα. Κάθε σημείο δεδομένων παριστά τη μέση ένταση σήματος των τεσσάρων μετρήσεων του κάθε τύπου πλάκας έναντι της τοποθετημένης συγκέντρωσης πολύκλωνων αντι-ινωδογόνων αντισωμάτων με κατακόρυφες ευθείες σταθερής απόκλισης σφάλματος (standard deviation error bars). (A) Γραφική παράσταση των πλακών χωρίς επίστρωση πηκτής και (B) γραφική παράσταση πλακών με επίστρωση πηκτής.

Επίστρωση/Επιφάνεια μικροσυστοιχίας	Μέσος ενδοπεδικός συντελεστής μεταβλητότητας	Μέσος διαπεδικός συντελεστής μεταβλητότητας	Όριο ανίχνευσης (amol/θέση)
Poly-L-λυσίνη	11%	20%	2000
Πολυσίνη	16%	12%	2000
Αλδεΐδη	17%	14%	2000
Maxi Sorb (διάφανο)	21%	16%	2000
Maxi Sorb (μαύρο)	15%	32%	1500
Ανακλαστικό	11%	14%	2000
Πολυακρυλαμίδιο pK 4.6	14%	60%	3333
Πολυακρυλαμίδιο pK 7.0	11%	49%	3333
Πολυακρυλαμίδιο pK 9.6	15%	27%	2583
Πολυακρυλαμίδιο pK χωρίς επώαση PBS	31%	28%	3167
Πολυακρυλαμίδιο pK με επώαση PBS	14%	15%	1875
Υδροπηκτική (προεπεξεργασμένο)	37%	37%	1313
Υδροπηκτική (χωρίς προεπεξεργασία)	22%	38%	1625

Πίνακας 6. Μέσος ενδοπεδικός και διαπεδικός συντελεστής μεταβλητότητας και όριο ανίχνευσης για 11 επιφάνειες πλακών και 2 πρωτόκολλα παρασκευής.

Σύμφωνα λοιπόν με την παραπάνω έρευνα, δεν βρέθηκε μία επίστρωση μικροσυστοιχιών που να ήταν η πιο κατάλληλη για όλες τις περιοχές έρευνας. Ωστόσο, οι σημαντικές ποιότητες των επιφανειών σε ό,τι αφορά το όριο ανίχνευσης τον συντελεστή μεταβλητότητας και την σταθερότητα κατά την αποθήκευση ήταν ευδιάκριτες. Γι' αυτό και προβλέπεται ότι στο μέλλον οι επιστρώσεις των μικροσυστοιχιών θα επιλέγονται σύμφωνα με το προς διεξαγωγή πείραμα και τα είδη των προς ακινητοποίηση αντισωμάτων. Από την ίδια έρευνα προέκυψε και το ότι δεν είναι όλα τα αντισώματα κατάλληλα για χρήση σε όλες τις μικροσυστοιχίες, γι' αυτό και πριν την χρήση τους, θα πρέπει να δοκιμάζονται για την καταλληλότητά τους.

Οι εφαρμογές των συστοιχιών αντισωμάτων περιλαμβάνουν τη διαγνωστική και τη μελέτη του προφίλ της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, για παράδειγμα στα κυτταρικά λύματα. Για κάθε ειδική εφαρμογή, η βέλτιστη συγκέντρωση αντισώματος που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να προσδιοριστεί. Για σχετική και ποσοτική μέτρηση κάποιων ταυτόχρονων αλληλεπιδράσεων αντισώματος-αντιγόνου, κάθε αντίσωμα πρέπει να εναποτίθεται στην ίδια περιοχή συγκέντρωσης. Η περιοχή αυτή θα πρέπει να είναι όσο γίνεται χαμηλή για να μειωθεί η κατανάλωση του αντιδραστηρίου ώστε να μη γίνονται μεγάλες δαπάνες και να διατηρεί καθαρά και αναπαραγώγιμα σήματα, με χαμηλούς συντελεστές μεταβλητότητας.[14]

#### Συγκριτική μελέτη χρησιμοποιούμενων-νέων υλικών επιφανειών

Οι επιδόσεις των μικροσυστοιχιών πρωτεϊνών και αντισωμάτων εξαρτώνται από ποικίλους παράγοντες, ένας εκ των οποίων είναι η χρήση μιας κατάλληλης επιφάνειας μικροσυστοιχίας για την ακινητοποίηση δειγμάτων είτε πρωτεϊνών είτε αντισωμάτων.

Οι περισσότερες συμβατικές επιφάνειες chip μικροσυστοιχιών όπως οι επιστρωμένες με poly-L-λυσίνη πλάκες έχουν προσαρμοστεί από την τεχνολογία των DNA chips. Επειδή το φορτίο της επιφάνειας των πρωτεϊνών είναι μεταβλητό, σε αντίθεση με το DNA, που μπορεί να ακινητοποιηθεί απλά με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του σκελετού φωσφορικών με ένα θετικά φορτισμένο υποστηρικτικό υλικό, έχουν γίνει περαιτέρω προσπάθειες για να τροποποιηθούν αυτά τα υλικά ώστε να ανταποκρίνονται στις πιο σύνθετες απαιτήσεις των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών. Για παράδειγμα, οι σφαιρικές πρωτεΐνες στην φυσική τους κατάσταση συνήθως επιδεικνύουν μια εξωτερικά υδρόφιλη επιφάνεια κι ένα υδρόφοβο εσωτερικό. Η ακινητοποίηση σε μια υδρόφοβη επιφάνεια μπορεί να αποσταθεροποιήσει τη δομή και να την αναστρέψει, καθιστώντας έτσι την πρωτεΐνη ανενεργή. Ωστόσο, η μελέτη του προφίλ των χαρακτηριστικών πρόσδεσης ενός αντισώματος από τέτοιες μικροσυστοιχίες αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών είναι χρήσιμη, καθώς πολλά αντισώματα αναγνωρίζουν γραμμικούς επιτόπους των αποδιατεταγμένων αντιγόνων. Οι μικροσυστοιχίες αντισωμάτων, αντιθέτως, απαιτούν τα αντισώματα να παραμείνουν ενεργά κατά την παρουσία τους στην επιφάνεια ώστε να προσδέσουν τη σημασμένη αναλυόμενη ουσία ειδικά. Συνεπώς, το ακινητοποιούμενο υλικό πρέπει να διατηρεί την ενεργό κατάσταση του αντισώματος, ακόμα και σε παρατεταμένες περιόδους αποθήκευσης.

Άλλες χημείες επιφανειών έχουν εφαρμοστεί για να επιτευχθεί μια ομογενής και ειδική κατακράτηση των πρωτεϊνών και αντισωμάτων με ομοιοπολική προσκόλληση και εξειδικευμένες ομάδες επιφάνειας. Έχουν γίνει ορισμένες προσπάθειες για τη μείωση της αποσταθεροποιητικής επιφάνειας επαφής με ακινητοποίηση μέσω ετικετών συγγένειας ή με βιοτινυλίωση των μορίων δέσμευσης και της ακινητοποίησής τους σε υποστηρικτικά υλικά επιστρωμένα με στρεπταβιδίνη. Ωστόσο, σε εξέταση υψηλής ρυθμοαπόδοσης είναι προτιμότερο να υπάρχει μια γενικά πιο εφαρμόσιμη και ενός σταδίου διαδικασία με την χρήση βελτιστοποιημένων επιφανειών για την πρωτεϊνική ακινητοποίηση.

Μια νέα γενιά χημειών επιφάνειας έχει εισάγει επιφάνειες που δεν χρειάζονται (blocking) αντιδραστήριο για να μειώσουν την μη ειδική πρόσδεση και που εμποδίζουν την άμεση επαφή μεταξύ πρωτεΐνης και επιφάνειας μέσω της εισαγωγής ενός λειτουργικού στρώματος πολύ(αιθυλενογλυκόλης)(PEG). Άλλες χημείες βελτιστοποιούν την παρουσίαση της πρωτεΐνης αυξάνοντας την πυκνότητα των προσβάσιμων λειτουργικών ομάδων με χρήση δενδριμερών. Ωστόσο και οι δύο χημείες βασίζονται στην ομοιοπολική σύζευξη των πρωτεϊνών με εποξειδικές ομάδες.

Οι επιστρώσεις μικροσυστοιχιών που επιδεικνύουν καλά χαρακτηριστικά σε σχέση με την χρήση τους στην τεχνολογία μικροσυστοιχιών αντισωμάτων μπορούν να εφαρμοστούν στην ανάλυση πιο σύνθετων αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης πρωτεϊνών, στις οποίες η φυσική διαμόρφωση του ακινητοποιημένου προσδέματος είναι ιδιαίτερης σημασίας.

Κατόπιν έρευνας για την αποκάλυψη νέων υποστηρικτικών υλικών μικροσυστοιχιών ανώτερων χαρακτηριστικών σε σύγκριση με τις επιστρώσεις μικροσυστοιχιών προσφάτων

δημοσιεύσεων αποκαλύφθηκαν δύο ομάδες επιφανειών, που παρουσιάζουν παρόμοια ένταση σήματος έναντι της σχέσης των εναποτιθέμενων συγκεντρώσεων. Αυτή με τις υψηλότερες εντάσεις σήματος περιλαμβάνει και τις ομοιοπολικά προσδεμένες επιφάνειες, όπως οι πλάκες epoxy-PEG, οι εποξειδικές πλάκες και οι πλάκες δενδριμερών, καθώς και οι μη ομοιοπολικά προσδεμένες επιφάνειες όπως οι πλάκες με σιλάνιο. Η ομάδα με γενικά χαμηλότερες εντάσεις σήματος περιλαμβάνει μόνο μη ομοιοπολικά προσδεμένες επιφάνειες, που προσδένουν πρωτεΐνες με ηλεκτροστατικές ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, όπως οι πλάκες αμίνης, οι πλάκες poly-L-λυσίνης και οι ενεργοποιημένες πλάκες πολυστυρένιου.

Τα όρια ανίχνευσης όλων των πλακών σε σχέση με την χρήση τους στην τεχνολογία πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών επιτρέπει έναν διαχωρισμό όλων των επιφανειών σε τρεις ομάδες. Σχετικά υψηλά όρια ανίχνευσης παρατηρήθηκαν με ενεργοποιημένες πλάκες πολυστυρένιου, με όρια ανίχνευσης περίπου 190 amol/θέση. Σχετικά χαμηλά όρια ανίχνευσης λήφθηκαν από αμινικές πλάκες και πλάκες δενδριμερούς με ανίχνευση 63 amol/θέση. Όλες οι άλλες πλάκες επιδεικνύουν παρόμοια όρια ανίχνευσης περίπου 94 amol/θέση.

Η έρευνα της έντασης του σήματος έναντι της σχέσης συγκέντρωσης για επιστρώσεις μικροσυστοιχιών αντισωμάτων δεν έδειξε ευδιάκριτες ομάδες όπως έγινε με τις πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες. Οι περισσότερες επικαλύψεις επέδειξαν μια γραμμική σχέση μεταξύ έντασης σήματος και συγκέντρωσης και μόνο οι πλάκες δενδριμερούς παρουσίασαν σαφή κορεσμό εντάσεως του σήματος πάνω από 1880 amol/θέση. Λίγες επιφάνειες, όπως οι εποξειδικές, epoxy-PEG και πλάκες αμίνης παρουσιάζουν κορεσμό πάνω από μια συγκέντρωση 3770 amol/θέση.

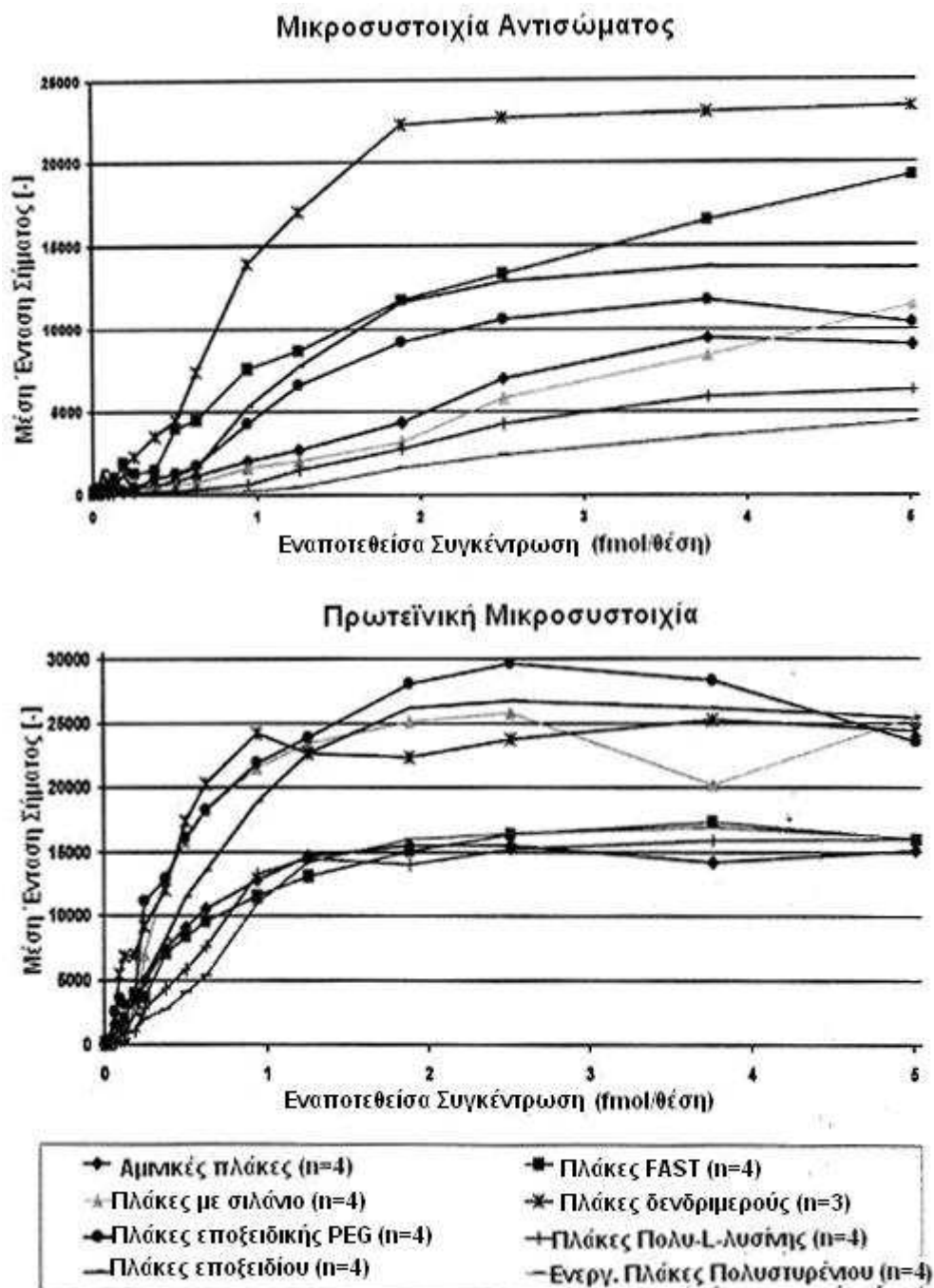
Τα όρια ανίχνευσης των μικροσυστοιχιών αντισωμάτων, παρόμοια με τις επιδόσεις στο διάγραμμα σήματος-συγκέντρωσης, μάλλον ποικίλουν. Μια ομαδοποίηση των ορίων ανίχνευσης όπως γίνεται με τις πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες είναι αδύνατη. Ωστόσο, παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν σε σχέση με το ενεργοποιημένο πολυστυρένιο, που επιδεικνύει πολύ υψηλά όρια ανίχνευσης, ενώ οι πλάκες αμίνης, όπως και οι πλάκες δενδριμερούς, δείχνουν πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης. Γενικά, τα όρια ανίχνευσης των μικροσυστοιχιών αντισωμάτων είναι υψηλότερα σε σχέση με αυτά των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών.

Οι μέσοι συντελεστές μεταβλητότητας ποικίλουν μεταξύ 22% και 38%. Σχετικά χαμηλές μεταβλητότητες λαμβάνονται με πλάκες δενδριμερούς και epoxy-PEG, ενώ οι πλάκες με σιλάνιο επιδεικνύουν μάλλον υψηλό RSD (κανονική απόκλιση/μέσος όρος)(Standard deviation/Mean). Οι RSDs των μικροσυστοιχιών αντισωμάτων είναι υψηλότερα σε σύγκριση με τις πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες. Μόνο οι πλάκες δενδριμερούς, εποξειδίου, με σιλάνιο και FAST και δεν παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις του μέσου συντελεστή μεταβλητότητας μεταξύ των δύο τύπων εφαρμογών.

Η τεχνολογία των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών παρουσιάζει δυσκολία στην λήψη ταυτόσημων εντάσεων σημάτων κατά την επανάληψη των πειραμάτων. Λόγους γι' αυτό αποτελούν οι διαφορετικές αποτελεσματικότητες στην φθορίζουσα σήμανση όπως και οι



διαφορές στην ποιότητα μεταξύ διαφορετικών παρτίδων χειρωνακτικά επιστρωμένων με poly-L-λυσίνη πλακών. Αυτό απαιτεί τη χρήση ταυτόσημων αντιδραστηρίων, όπως και τον διαδοχικό χειρισμό διαφορετικών επιφανειών μέσα από μια συγκριτική μελέτη.



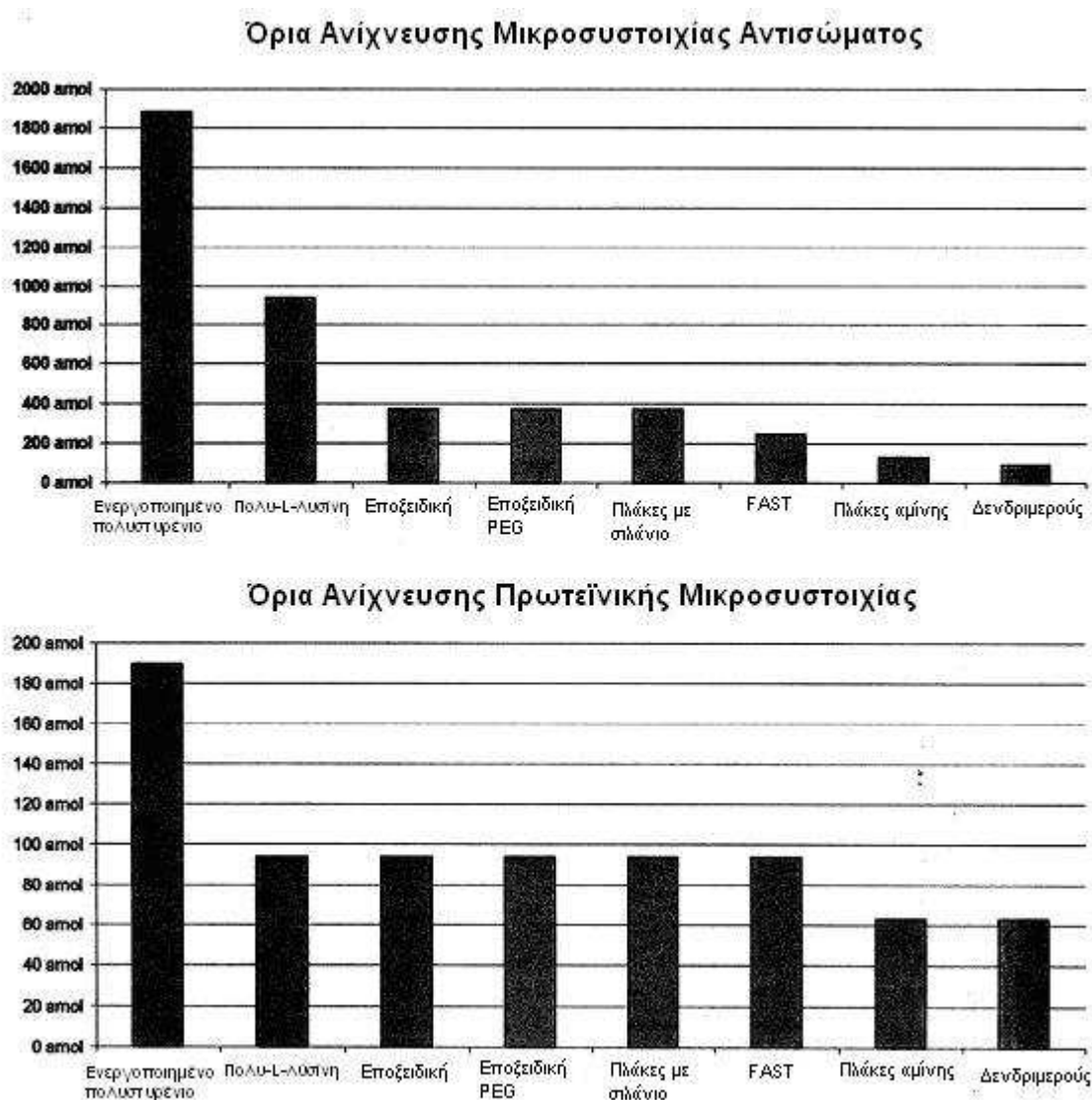
Εικόνα 36. Γραφικές παραστάσεις που δείχνουν τις μέσες εντάσεις σήματος (σχετικές μονάδες) έναντι απόλυτων ποσών εναποτιθέμενου προσδέματος ανά θέση για οχτώ διαφορετικά υλικά μικροσυστοιχιών. Κάθε σημείο παριστά τη μέση ένταση σήματος όλων των θέσεων σε μια ειδική συγκέντρωση. Ο αριθμός των δοκιμασμένων chips σημειώνεται στα γραφήματα.

## RSD%

	Chips αντισωμάτων	Πρωτεϊνικά chips	Μέσος όρος
--	-------------------	------------------	------------

	Chips αντισωμάτων	Πρωτεϊνικά chips	Μέσος όρος
Πλάκες δενδριμερούς	24	21	22
Πλάκες εποξειδικής PEG	24	25	24
Πλάκες poly-L-λυσίνης	35	16	26
Πλάκες αμίνης	41	21	31
Πλάκες FAST	32	30	31
Πλάκες ενεργοποιημένου πολυστυρενίου	41	26	33
Εποξειδικές πλάκες	43	24	34
Πλάκες με σιλάνιο	35	40	38

Πίνακας 7. RSDs



Εικόνα 37. Διάγραμμα που παρουσιάζει τα όρια ανίχνευσης οχτώ διαφορετικών υλικών επιφανειών για μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών και αντισωμάτων και ορίστηκε ως ελάχιστο στάδιο συγκέντρωσης στο οποίο η μέση τιμή των εντάσεων σημάτων βρίσκεται πάνω από το κατώφλι (cut off) που χρησιμοποιήθηκε στον υπολογισμό του συντελεστή μεταβλητότητας.

Το γεγονός ότι οι πλάκες poly-L-λυσίνης παρουσιάζουν το δεύτερο μεγαλύτερο όριο ανίχνευσης στις μικροσυστοιχίες αντισωμάτων καθώς και σχετικά χαμηλό λόγο σήματος-συγκέντρωσης, μπορεί να μας οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι οι περισσότερες επιφάνειες που παρουσιάζονται στη μελέτη αυτή είναι ανώτερες από εκείνες της προηγούμενης μελέτης.

Αν και είναι δύσκολο να προβλέψουμε την καταλληλότητα των επιστρώσεων των μικροσυστοιχιών για την τεχνολογία μικροσυστοιχιών πρωτεϊνών και αντισωμάτων, με την χρήση μίας πρωτεΐνης και ενός αντισώματος, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ υποδεικνύουν επιστρώσεις που προσφέρουν εξαιρετικές ποιότητες στην αντίστοιχη περιοχή εφαρμογής τους. Όπως είναι αναμενόμενο, δεν μπόρεσε να βρεθεί μία επιφάνεια για τις εφαρμογές και των μικροσυστοιχιών αντισωμάτων και για τις πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες. Για ποσοτικές μετρήσεις πρωτεϊνών σε σύνθετα δείγματα οι πλάκες δενδριμερούς παρουσιάζουν μια εξαιρετική αναλογία σήματος-συγκέντρωσης. Για την ποσοτική μέτρηση των αντισωμάτων, οι εποξειδικές PEG πλάκες αποτελούν την επίστρωση επιφάνειας επιλογής. Για πειράματα που απαιτούν την ανίχνευση πρωτεϊνών και αντισωμάτων σε πολύ χαμηλή ποσότητα και οι πλάκες αμίνης και οι πλάκες δενδριμερούς ταιριάζουν πολύ καλά. Ωστόσο, οι πλάκες FAST επιδεικνύουν επίσης πολύ καλά όρια ανίχνευσης στην τεχνολογία των μικροσυστοιχιών αντισωμάτων.[15]

### Υλικά sol-gel

Οι πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες αποτελούν μια δυναμική αναδυόμενη τεχνολογία με εκτεταμένες βιοϊατρικές εφαρμογές. Ωστόσο, η ανάπτυξη βελτιστοποιημένων, οικονομικών υλικών επιφάνειας, ικανών να διατηρούν την δραστηριότητα των προσκολλημένων πρωτεϊνών αποτελεί μια πρόκληση.

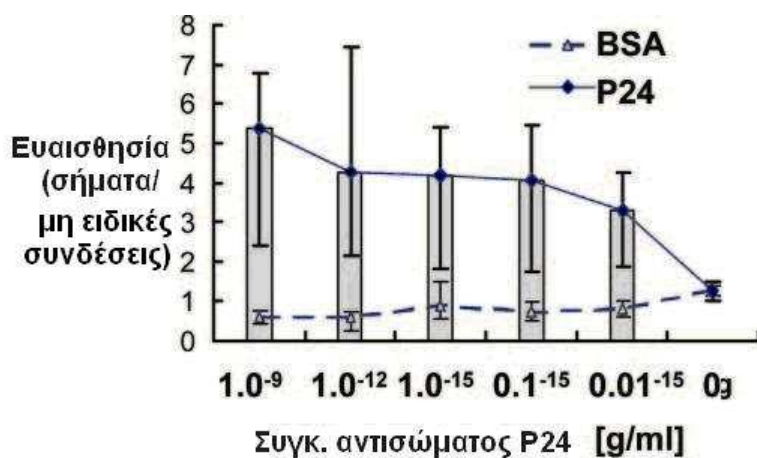
Προκειμένου να ανταγωνιστεί η τεχνολογία των πρωτεϊνικών chips τα πιο συνήθη πρωτόκολλα (π.χ. ELISA), τα υποστηρικτικά υλικά πρέπει να είναι εύκολα στον χειρισμό και την αποθήκευση, κατάλληλα για μαζική παραγωγή, ικανά να αποδίδουν αποτελέσματα υψηλής ποιότητας και αναπαραγωγίσιμα.

Τα sol-gel υλικά, τα γυαλιά πυριτίου που έχουν συντεθεί σε θερμοκρασία δωματίου, έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για χρήση στην δέσμευση των πρωτεϊνών και δείχνουν να διατηρούν την πρωτεϊνική δραστηριότητα για μήνες ή και παραπάνω. Η ακινητοποίηση πρωτεϊνών εντός των προερχόμενων από sol-gel υλικών αποτελεί μια πιθανότητα για χρήση σε πρωτεϊνικά chips επειδή τα υλικά αυτά δεν απαιτούν δεσμευμένους παράγοντες συγγένειας ή ανασυνδυσασμένες πρωτεΐνες με ετικέτα, επιτρέποντας έτσι την δέσμευση μιας ευρείας ποικιλίας πρωτεϊνών στην φυσική τους κατάσταση. Η χρήση ποικίλων πυριτικών ή πρόσθετων μπορεί να επιτρέψει την βελτιστοποίηση των υλικών για καλύτερη βιοσυμβατότητα και δραστηριότητα των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών. Επιπλέον, τα

προερχόμενα από sol-gel υλικά είναι σχετικά οικονομικά και συμβατά με σχεδόν κάθε υποστηρικτικό υπόστρωμα των chips, γεγονός που καθιστά τη μαζική παραγωγή και την χωρίς προβλήματα ενσωμάτωση με την τρέχουσα τεχνολογία εφικτή. Παρά τα πλεονεκτήματα αυτά όμως η ανάπτυξη των προερχόμενων από sol-gel πρωτεϊνικών chips για ιατρικές εφαρμογές ήταν ανεπιτυχής.

Η ανάπτυξη των βασισμένων σε sol-gel πρωτεϊνικών chips έχει ως στόχο την βελτιστοποίηση των παρακάτω παραγόντων : (1) το μέγεθος της νανοπορώδους δομής της μήτρας του sol-gel πρέπει να ταιριάζει στο μέγεθος του ενθυλακωμένου βιομορίου, (2) ο χρόνος του σχηματισμού πηκτής πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος ώστε να γίνεται η διαδικασία της εναπόθεσης πριν τον σχηματισμό της πηκτής, (3) η πρόσφυση της θέσης στην επιφάνεια του υποστηρικτικού υλικού πρέπει να είναι αρκετά ισχυρή ώστε να αντέχει τις πλύσεις, (4) ένα ουδέτερο pH του sol-gel είναι απαραίτητο για τη μέγιστη πρωτεϊνική δραστηριότητα και (5) η μορφολογία της κάθε θέσης πρέπει να είναι ομοιόμορφη, γεγονός ουσιώδες για την αυτοματοποιημένη ανάλυση εικόνας σε υπολογιστή.

Προκειμένου να παραχθεί η καλύτερη διαμόρφωση για το νέο τρισδιάστατο sol-gel chip με βέλτιστες φυσικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της ισχυρής πρόσφυσης θέσης και των καλών πρωτεϊνικών δραστηριοτήτων, πρέπει να χρησιμοποιηθούν μοναδικές μέθοδοι ελέγχου και επιλογής.[16]



Εικόνα 38. Ευαισθησία των sol-gel πρωτεϊνικών chips. (a) Δοκιμασίες ευαισθησίας για τις αλληλεπιδράσεις αντιγόνου (p24)-αντισώματος. Τα πειράματα εκτελέστηκαν τουλάχιστον τρεις φορές. (b) Δοκιμασίες ευαισθησίας για τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης (κυκλίνηT)-πρωτεΐνης (Cdk9).

## Επιφάνειες νανοσωματιδίων

Η μικροδιάταξη των βιολογικών μορίων πάνω σε στερεή επιφάνεια αποτελεί ουσιώδη τεχνική σε πολλούς τομείς που αφορούν την προσκόλληση βιομορίων ανάμεσα σε καθορισμένες περιοχές πάνω σε μια στερεή επιφάνεια ενώ εμποδίζουν μη ειδική πρόσφυση σε άλλες περιοχές. Η τροποποίηση της επιφάνειας κανονικά γίνεται με τη ρίψη ενός διαλύματος πάνω στην επιφάνεια ή με εμβάπτιση της επιφάνειας πάνω στο διάλυμα. Αυτές οι μέθοδοι είναι παθητικές και γι' αυτό λιγότερο επαρκείς. Επιπλέον, το ποσό των βιομορίων που μπορούν να προσκολληθούν σε μια επίπεδη επιφάνεια είναι περιορισμένο. Αυτό οδηγεί στην πρόταση της χρήσης μιας μη επίπεδης μικροδομής που μπορεί να παράσχει περισσότερο χώρο για τις προς προσκόλληση πρωτεΐνες και να αυξήσει έτσι την ευαισθησία της ανίχνευσης. Οι επίπεδες επιφάνειες μπορούν να τροποποιηθούν με χάραξη για να αυξηθεί η περιοχή της επιφάνειας αλλά μπορεί να μην είναι εύκολη η δημιουργία ομοιόμορφων σωματιδίων στοιχείων με μέγεθος μικρότερο του ενός μικρού (submicron). Η χρήση βασισμένων σε σφαιρίδια υλικών θα μπορούσε να αποτελέσει μια βιώσιμη εναλλακτική καθώς αυτά έχουν μεγάλες δραστικές περιοχές επιφάνειας και η επιφάνειά τους μπορεί να τροποποιηθεί σε διάλυμα.

Οι καμπυλωτές επιφάνειες των νανοσωματιδίων παρέχουν περισσότερο χώρο για την προσκόλληση των πρωτεϊνών σε σύγκριση με μια επίπεδη επιφάνεια. Επιπλέον, η χρήση των νανοσωματιδίων ως υποστρώματος για την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών εισάγει μια πιο ευέλικτη στρατηγική για την πραγματοποίηση επιφανειακής τροποποίησης σε διάλυμα, στην οποία η αποτελεσματικότητα χημικής αντίδρασης είναι συνήθως μεγαλύτερη από ότι σ' ένα μεγάλο επίπεδο υπόστρωμα. Κάποια μηχανικά μέσα, όπως η ανάδευση και το vortex μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιωθούν οι χημικές αντιδράσεις.[18]

Νανοδομημένοι φλοιοί σωματιδίων με κατασκευασμένες με κατά βούληση τρόπο επιφάνειες συγγένειας χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή μικροδομημένων επιφανειών συγγένειας μέσω της μικροεναπόθεσης των σωματιδίων για τον σχηματισμό πυκνά στοιβαγμένων άμορφων στιβάδων νανοσωματιδίων. Αυτές οι στιβάδες παρείχαν μια μεγάλη δραστική επιφάνεια για την ειδική πρόσδεση πρωτεϊνικών προσδεμάτων από υδατικό διάλυμα. Για τον σκοπό αυτό συντέθηκαν βιολειτουργικοί φλοιοί σωματιδίων που περιλάμβαναν έναν πυρήνα πυριτίου με μια διάμετρο 100 νμ κι ένα οργανικό φλοιό πάχους λίγων νμ.

Η ακινητοποίηση νανοσωματιδίων πάνω σε στερεά υποστρώματα ενδιαφέρει τις διαγνωστικές και τις βασισμένες σε chips αναλυτικές τεχνολογίες, λόγω της τεράστιας επαύξησης της επιφάνειας που επιτυγχάνεται. Μια ποικιλία τεχνικών έχουν εφαρμοστεί για τη δομημένη συνάθροιση νανοσωματιδίων σε επιφάνειες. Τέτοιες προσεγγίσεις επιτρέπουν στις βιοαναλυτικές επιφάνειες να λαμβάνονται κατά βούληση μέσω της τροποποίησης των οργανικών επιφανειών των νανοσωματιδίων (με δυνητικά απεριόριστο αριθμό τρόπων). Έτσι,

το πεδίο-προκλήση της παραγωγής των πρωτεϊνικών biochips αποτελεί εστία για την έρευνα των λειτουργικών πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών. Η ακινητοποίηση των νανοσωματιδίων πάνω σε μια επίπεδη επιφάνεια αυξάνει την περιοχή της επιφάνειας ανά επιφανειακό αποτύπωμα. Έτσι, ακινητοποιημένα νανοσωματίδια επιστρωμένα με ειδικά μόρια δέσμησης θα μπορούσαν να παράσχουν μια επαυξημένη επιφάνεια υποδοχέα. Αυτό θα μπορούσε να μεταθέσει την ισορροπία προς τον σχηματισμό του συμπλέγματος υποδοχέα-προσδέματος και θα είχε έτσι ως αποτέλεσμα μεγαλύτερο ποσό προσδεμένης αναλυόμενης ουσίας για μια δεδομένη συγκέντρωση αναλυόμενων ουσιών σε ένα δείγμα ανιχνευτή. Επιπλέον, ο αυξανόμενος αριθμός των μορίων-υποδοχέων θα παρείχε μια ιδιαίτερα ευαίσθητη επιφάνεια αισθητήρα, που θα ανίχνευε διαφορές σε συγκεντρώσεις αναλυόμενων ουσιών ακόμα και για πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις των τελευταίων. [19]

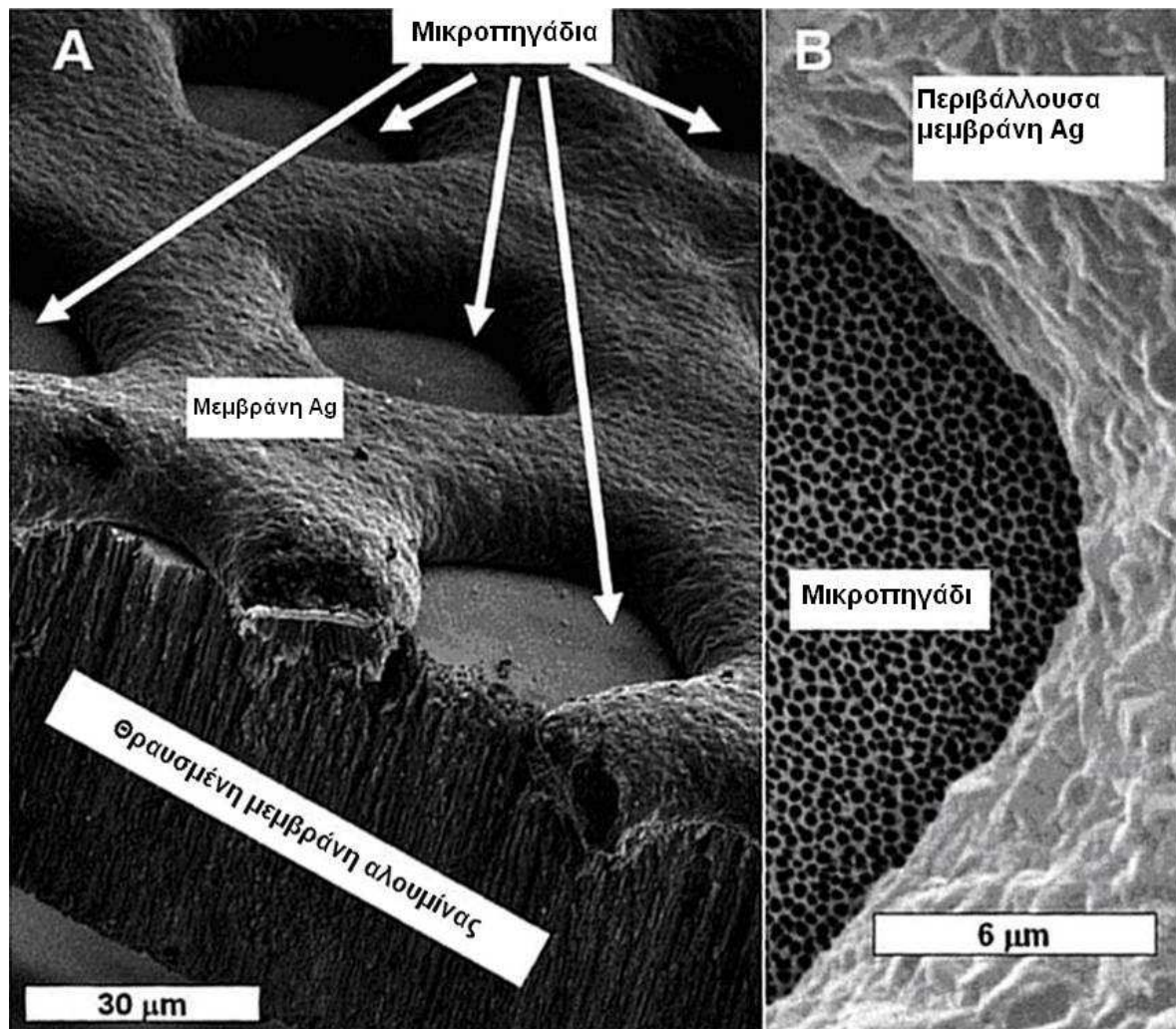
### Πορώδη υλικά επιφανειών

Ενώ το γυαλί είναι το πιο κοινό υπόστρωμα για τις μικροσυστοιχίες, η δυνατότητα πρόσδεσής του είναι περιορισμένη επειδή η γυάλινη επιφάνεια είναι επίπεδη. Ένας τρόπος για να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός είναι η ανάπτυξη συστοιχιών βασισμένων σε πορώδη υλικά. Τέτοιες τρισδιάστατες συστοιχίες μπορούν να παράσχουν μεγαλύτερη ευαισθησία γιατί και τα μόρια δέσμησης και το είδος της αναλυόμενης ουσίας που προσδένονται ακινητοποιούνται σ' όλο το πάχος του πορώδους υλικού.

Τα τρισδιάστατα υποστρώματα θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα επωφελή για τις πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες. Αυτό επειδή η ενισχυμένη δυνατότητα πρόσδεσης του τρισδιάστατου συστήματος παρέχει ευρεία δυναμική περιοχή ανίχνευσης και αυτό είναι ουσιώδες γιατί οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών αναλυόμενων ουσιών στο δείγμα μπορούν να ποικίλουν μέχρι και κατά 10 τάξεις μεγέθους. Μια πιο ευρεία δυναμική περιοχή είναι δυνατή με το τρισδιάστατο σύστημα επειδή η ενισχυμένη περιοχή της επιφάνειας που είναι διαθέσιμη για πρόσδεση της αναλυόμενης ουσίας (σε σχέση με ένα σύστημα δύο διαστάσεων) σημαίνει ότι ο κορεσμός της συσκευής λαμβάνει χώρα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της αναλυόμενης ουσίας σε σχέση με ένα ανάλογο σύστημα δύο διαστάσεων. Επιπλέον, το νερό που κατακρατείται μέσα στους πόρους ενός πορώδους υποστρώματος ελαχιστοποιεί την πιθανότητα της λόγω ξήρανσης αποδιάταξης των πρωτεϊνικών αναλυόμενων ουσιών.

Ένας αριθμός διαφορετικών υλικών έχει χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία τρισδιάστατων πρωτεϊνικών συστοιχιών συμπεριλαμβανομένης της νιτροκυτταρίνης, (polyvinylidene difluoride), επιστρώσεων πηκτής πολυακρυλαμίδιου, μεμβρανών αγαρόζης, νανοπηγαδιών πολύ(διμεθυλοσιλοξάνιου) και πορώδους πυριτίου. Ωστόσο, συχνά παρατηρούνται προβλήματα όπως η περιορισμένη πυκνότητα θέσεων, υψηλό σήμα μη ειδικής πρόσδεσης (π.χ. φθορισμός) και μεγάλοι χρόνοι έκπλυσης. Για τους λόγους αυτούς υπάρχει σημαντικό

ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων γενεών τρισδιάστατων διατάξεων συστοιχιών αισθητήρων. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί πρόσφατα ότι οι μεμβράνες νανοπορώδους αλουμίνας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τρισδιάστατα υποστηρικτικά υλικά για συστοιχίες γονιδίων. Η κατασκευή διατάξεων από τρισδιάστατα μικροπηγαδάκια βασισμένα σε νανοπορώδεις μεμβράνες, περιβαλλόμενα από μεταλλικό άργυρο παρουσιάζονται στην εικόνα 39.



Εικόνα 39. Εικόνες συστοιχίας μικροπηγαδιών. (Α) Φαίνεται η θραυσμένη άκρη της μεμβράνης αλουμίνας, τα ξεχωριστά μικροπηγαδάκια και η περιβάλλουσα μεμβράνη Ag. (Β) Φαίνεται μια μεγέθυνση της επιφάνειας ενός μικροπηγαδιού και τμήμα της περιβάλλουσας μεμβράνης Ag.

Επειδή τα μικροπηγαδάκια βασίζονται σε νανοπορώδη μεμβράνη, τα είδη αναλυόμενων ουσιών ακινητοποιούνται σε τρεις διαστάσεις μέσα στα πηγαδάκια. Αυτός ο τρισδιάστατος χαρακτήρας παρέχει συστοιχίες με δυνατότητες πρόσδεσης που μπορεί να είναι κατά τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες από αυτές μιας επίπεδης γυάλινης επιφάνειας, που αποτελεί το πιο κοινό υλικό που χρησιμοποιείται στην τεχνολογία των μικροσυστοιχιών. Επιπλέον, για έναν διαφορετικό τύπο τρισδιάστατης συστοιχίας, η πορώδης δομή θα επιτρέψει στη

συστοιχία να λειτουργήσει με ρέοντα τρόπο, που βελτιώνει και την ταχύτητα και την ευαισθησία της δοκιμασίας.

Ο περιβάλλον μεταλλικός Ag γύρω από τα πηγαδάκια δείχνει πολύ χαμηλή ένταση φθορισμού κι αυτό έχει ως αποτέλεσμα μικροσυστοιχίες με άριστες αναλογίες σήματος-μη ειδικής πρόσδεσης. Επιπλέον, τα όρια Ag μεταξύ των μικροπηγαδιών ελαχιστοποιούν τον κίνδυνο διασταυρωτής μόλυνσης των μικροπηγαδιών κατά τη διάρκεια της δημιουργίας της εναπόθεσης. Οι νανοίνες του Ag που εναποτίθενται μέσα στους πόρους κάτω από τη μεμβράνη Ag παρέχουν ενισχυμένη μηχανική ισχύ σε σχέση με συστοιχίες που βασίζονται μόνο στη μεμβράνη αλουμίνης. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα μέταλλα εκτός του Ag.[20]

Τα chips μικροπηγαδιών/νανοπηγαδιών γενικά είναι συμβατά με τον συνήθη εξοπλισμό μικροσυστοιχιών και ανίχνευσης, ωστόσο η ευθυγράμμιση είναι απαραίτητη. Η μέθοδος αυτή είναι εναλλακτική για δοκιμασίες βασισμένες σε διαλύματα και αντιδράσεις πολλαπλών συστατικών. Επίσης αυτά τα chips είναι σχετικά οικονομικά. Οι μικροσυστοιχίες μικροπηγαδιών επιτρέπουν σε μικρούς όγκους διαφορετικών αναλυόμενων ουσιών να είναι πυκνά τοποθετημένες πάνω σε ένα μόνο chip, ενώ παραμένουν φυσικά απομονωμένες κατά τη διάρκεια των επόμενων διαδικασιών κατεργασίας, ενώ στα νανοπηγαδάκια ανίχνευσης, τα μόρια δέσμευσης μπορούν εύκολα να ανακτηθούν. Το μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι για τη φόρτωση των νανοπηγαδιών σε μεγάλη πυκνότητα απαιτείται ειδικός εξοπλισμός.[2]



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ

Μια οικονομική και γρήγορη μελέτη του προφίλ του πρωτεώματος θα επιτάχυνε την ταυτοποίηση των φαρμάκων-στόχων και των δεικτών νόσου. Ωστόσο, ενώ η τεχνολογία των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών έχει επιδείξει με μεγάλη επιτυχία την χρησιμότητά της στην ανάλυση ευρείας κλίμακας της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και στην διερεύνηση της ενζυμικής δραστηριότητας, η απόδοση των μικροσυστοιχιών αντισωμάτων στη μελέτη του πρωτεϊνικού προφίλ είναι λιγότερο παραγωγική.

Είναι πολύ δύσκολο να συγκρίνουμε την απόδοση των ποικίλων συστημάτων, λόγω των πολλών πειραματικών διαφορών. Επίσης, η πολυπλοκότητα των πρωτεϊνικών δειγμάτων διαφέρει, με τις μικροτομές καρκινικών κυττάρων να είναι πιο δύσκολο να αναλυθούν σε σχέση με τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες. Σε κάθε περίπτωση όμως, ολοκληρωμένες αναλύσεις όπως αυτές που γίνονται σήμερα σε επίπεδο μεταγραφημάτων είναι ακόμα μακριά από την επίτευξή τους και θα χρειαστούν πολυεπιστημονική προσπάθεια για την καθιέρωσή τους, γεγονός τυπικό για την έρευνα του πρωτεώματος σαν σύνολο.

Επιπρόσθετα στην εφαρμογή των μικροσυστοιχιών αντισωμάτων στον χαρακτηρισμό των επιπέδων πρωτεΐνης, υπάρχουν πολλές άλλες δυνατές εφαρμογές. Ένα παράδειγμα είναι η διερεύνηση των αντιγόνων στην επιφάνεια του κυττάρου. Αυτός ο τύπος συστοιχίας αντισωμάτων επιτρέπει έναν γρήγορο και ευαίσθητο προσδιορισμό του ανοσοφαινότυπου που θα μπορούσε να εκτελεστεί σε μια κλινική πρακτική. Επίσης, συστοιχίες ζώντων κυττάρων θα μπορούσαν να παραχθούν με τον τρόπο αυτό, επιτρέποντας την *in situ* διερεύνηση ποικίλων βιοχημικών παραμέτρων.

Οι πολλαπλοί ανοσοπροσδιορισμοί μέχρι στιγμής αποτελούν τις πιο κοινές χρήσεις των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών. Επειδή οι ανοσοπροσδιορισμοί στηρίζονται στην ακινητοποίηση πλήρως λειτουργικών πρωτεϊνών, τα μαθήματα που θα πάρουμε από την βελτιστοποίηση αυτών των συστημάτων θα καθοδηγήσουν τον σχεδιασμό πιο σύνθετων μικρο-αναλυτικών κατασκευών για τον παράλληλο χαρακτηρισμό των ενζυμικών και δραστηριοτήτων και της πρόσδεσης των πρωτεϊνών.

Πέρα από την ακαδημαϊκή έρευνα υπάρχουν και αρκετές εταιρίες που είναι ενεργές στον τομέα αυτό. Υπάρχουν επίσης πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη ανασυνδυασμένων αντισωμάτων, αφισωμάτων, ή απταμερών για την χρήση τους ως μόρια-αισθητήρες, δραστηριότητες στις οποίες είναι εμπλεκόμενες πολλές εταιρίες. Ομάδες από εντελώς διαφορετικά πεδία, με διαφορετική εμπειρία έχουν επιδείξει προόδους στον σχεδιασμό μικροκατασκευών, στην χημεία των επιφανειών, στην χημεία βιοσύζευξης και στην ανάπτυξη μικροδοκιμασιών. Ταυτόχρονα έχουν αναδυθεί κάποιες δημιουργικές βιολογικές εφαρμογές αυτής της νέας τεχνολογίας. Κάποιες εφαρμογές είναι ιδιαίτερα ισχυρές ώστε να μπορούν να διεξαχθούν χρησιμοποιώντας απλά πρωτόκολλα και έτοιμα αντιδραστήρια, ενώ άλλες απαιτούν σύνθετη χημεία και σχεδιασμό συσκευών. Τα πιο ποσοτικά και ευαίσθητα

συστήματα θα επωφεληθούν από στενότερες συνεργασίες μεταξύ των επιστημόνων σ' αυτούς τους διαφορετικούς κλάδους, ώστε οι καλύτερες κατασκευές, επιφάνειες και πειραματικά πρωτόκολλα να εφαρμόζονται στα σημαντικότερα βιολογικά και ιατρικά προβλήματα.

Το ερώτημα που εγείρεται λοιπόν είναι εάν η ακαδημαϊκή έρευνα μπορεί να ακολουθήσει τους ρυθμούς των εξελίξεων της βιομηχανίας. Κάποιοι πιστεύουν ότι η βιομηχανία θα είναι υπεύθυνη για τις μεγάλες εξελίξεις στην περιοχή αυτή στο εγγύς μέλλον. Ωστόσο, ο τομέας αυτός είναι πολυποικίλος και σύνθετος και η τεχνολογία είναι ακόμα σε πρώιμα της στάδια, γεγονός που όχι μόνο δίνει στους ακαδημαϊκούς ερευνητές μια καλή ευκαιρία για επιτυχημένες συνεισφορές αλλά απαιτεί και την ενεργό συμμετοχή τους.

Οι μελλοντικές εξελίξεις στις πρωτεϊνικές συστοιχίες κείνται σε πολλές περιοχές παραγωγής chips, συμπεριλαμβανόμενης της περιοχής της πρωτεϊνικής προσκόλλησης, των μεθόδων ανίχνευσης, και της τυποποίησης. Η τελευταία αποτελεί κοινό θέμα για όλες τις τεχνολογίες υψηλής ρυθμοαπόδοσης : η παρουσία και ανάπτυξη πολλών εναλλακτικών μορφών και συνθηκών οδηγεί αναπόφευκτα σε προβλήματα στην σύγκριση των αποτελεσμάτων. Θα πρέπει να καθιερωθούν σε διεθνές επίπεδο πρότυπα για πρωτεϊνικές συστοιχίες και ένα πλαίσιο για την εφαρμογή τους.

Σήμερα υπάρχουν μικρές μόνο ενδείξεις για τα σχετικά κόστη των νέων τεχνολογιών που μας προσφέρονται εμπορικά. Αν και η διαγνωστική θα ωθούσε την τεχνολογία, δεν είναι ξεκάθαρο το αν οι εταιρίες θα είναι ιδιαίτερα πρόθυμες να αναπτύξουν οικονομικότερες μικροσκοπικοποιημένες εναλλακτικές τεχνολογίες.

Οι πρωτεΐνες διεξάγουν τις περισσότερες λειτουργίες που κωδικοποιούνται από τα γονίδιά μας και γι' αυτό οι μελέτες των πρωτεϊνικών συστοιχιών θα οδηγήσουν σε νέες εξελίξεις και ανακαλύψεις στη μοριακή βιολογία και τον σχεδιασμό φαρμάκων.

Αν και μια μεγάλη ποικιλομορφία τεχνολογιών έχουν δημιουργηθεί για πρωτεϊνικές συστοιχίες, πρέπει να γίνει κάποια επιλογή προκειμένου να τυποποιηθούν και να εφαρμοστούν κάποιες από τις τεχνικές, ώστε να επιτραπεί σύγκριση και δυνατότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων, γεγονός πολύ σημαντικό για τη δέουσα πρόοδο της έρευνας. Η βιοπληροφορική και η γονιδιωματική έχουν προετοιμάσει τον δρόμο για νέες εξελίξεις στην πρωτεωμική. Με την χρήση μεθόδων υψηλής ρυθμοαπόδοσης όπως τα πρωτεϊνικά chips, οι ερευνητές ίσως τελικά να καταφέρουν να δουν τη γενικότερη εικόνα αντί να εστιάζουν σε ένα ή δύο γονίδια κάθε φορά. Επιπλέον, ακόμα κι αν τα κόστη των πρωτεϊνικών chips ανέρχονται σε χιλιάδες δολάρια, η τιμή ενός αντισώματος είναι ακόμα της τάξεως των εκατοντάδων. Πέραν αυτού, η ανάλυση χιλιάδων πρωτεϊνών θα πάρει μέρες αντί για χρόνια ή δεκαετίες. Η διαθεσιμότητα της πλήρους αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος θα ωθήσει την εφαρμογή της τεχνολογίας των πρωτεϊνικών chips σε ανάλυση όλου του ανθρώπινου πρωτεώματος και θα επιτρέψει στην πρωτεωμική να φτάσει τα μεγάλα επιτεύγματα της γονιδιωματικής.[8] [9] [10]

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hall David A., Ptacek Jason, Snyder Michael (2007) **Protein microarray technology**, στο περιοδικό "Mechanisms of Ageing and Development" 128: 161-167, Elsevier Ireland Ltd.
2. **Types of Protein Microarray and Antibody Chips**, <http://www.molecularstation.com/protein-microarrays/protein-chip-types/>
3. Barry Richard, Soloviev Mikhail (2004) **Quantitative protein profiling using antibody arrays**, στο περιοδικό "Proteomics" 4: 3717-3726, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
4. Tomizaki Kin-ya, Usui Kenji, Mihara Hisakazu (2005) **Protein-Detecting Microarrays: Current Accomplishments and Requirements**, στο περιοδικό "ChemBioChem" 6: 782-799, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
5. **Protein Microarray Capture Molecules and Their Limitations**, <http://www.molecularstation.com/protein-microarrays/protein-chip-capture/>
6. **Antibody Microarray Limitations**, <http://www.molecularstation.com/protein-microarrays/antibody-microarray-limitations/>
7. Kodadek Thomas (19/1/2001) **Protein Microarrays: prospects and problems**, στο περιοδικό "Chemistry & Biology" 8: 105-115, Elsevier Science Ltd.
8. Kusnezow Wlad, Hoheisel Jörg D. (12/2002) **Antibody Microarrays: Promises and Problems**, στο περιοδικό "Bio Techniques" 33:14-23
9. Wilson David S., Nock Steffen (2001) **Functional protein microarrays**, στο περιοδικό "Current Opinion in Chemical Biology" 6: 81-85

10. **Future Directions of Protein Chips**, <http://www.molecularstation.com/protein-microarrays/future-directions/>
11. Cretich Marina, Damin Francesco, Pirri Giovanna, Chiari Marcella (2006) **Protein and peptide arrays: Recent trends and new directions**, στο περιοδικό "Biomolecular Engineering" 23: 77-88
12. Bertone Paul, Snyder Michael (2005) **Advances in functional protein microarray technology**, στο περιοδικό "FEBS Journal" 272: 5400-5411
13. Wacker Ron, Schröder Hendrik, Niemeyer Christof M. (2004) **Performance of antibody microarrays fabricated by either DNA-directed immobilization, direct spotting, or streptavidin-biotin attachment: a comparative study**, στο περιοδικό "Analytical Biochemistry" 330: 281-287
14. Angenendt Philipp, Glökler Jörn, Murphy Derek, Lehrach Hans, Cahill Dolores J. (2002) **Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials**, στο περιοδικό "Analytical Biochemistry" 309: 253-260
15. Angenendt Philipp, Glökler Jörn, Murphy Derek, Lehrach Hans, Cahill Dolores J. (2003) **Next generation of protein microarray support materials: Evaluation for protein and antibody and antibody microarray applications**, στο περιοδικό "Journal of Chromatography A" 1009: 97-104
16. Soyoun Kim, Youngdeuk Kim, Philseok Kim, Jeongmin Ha, Kyunyoung Kim, Mijin Sohn, Jin-San Yoo, Jungeun Lee, Jung-ah Kwon, Kap No Lee (1/11/2006) **Improved Sensitivity and Physical Properties of Sol-Gel Protein Chips Using Large-Scale Material Screening and Selection**, στο περιοδικό "Analytical Chemistry" Vol. 78, No. 21: 7392-7396, American Chemical Society
17. Schaeferling Michael, Schiller Stefan, Paul Hubert, Kruschina Margit, Pavlickova Petra, Meerkamp Mark, Giammasi Chiara, Kambhampati Dev (2002) **Application of self-assembly techniques in the design of biocompatible protein microarray**

**surfaces**, στο περιοδικό "Electrophoresis" 23: 3097-3105, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

18. Wang Chun, Zhang Yong, Seng Ho Soon, Ngo Low Lee (2006) **Nanoparticle-assisted micropatterning of active proteins on solid substrate**, στο περιοδικό "Biosensors and Bioelectronics" 21: 1638-1643, Elsevier B.V.
19. Borchers Kirsten, Weber Achim, Brunner Herwig, Tovar Günter E.M. (11/2005) **Microstructured layers of spherical biofunctional core-shell nanoparticles provide enlarged reactive surfaces for protein microarrays**, στο περιοδικό "Analytical and Bioanalytical Chemistry" 383(5): 738-746
20. Kang Myungchan, Trofin Lacramioara, Mota Miguel O., Martin Charles R. (2005) **Protein Capture in Silica Nanotube Membrane 3-D Microwell Arrays**, στο περιοδικό "Analytical Chemistry" 77: 6243-6249, American Chemical Society
21. Müller Hans-Joachim, Röder Thomas (2006) **Microarrays** (The experimenter series), Elsevier Inc.
22. **Biochip**, <http://en.wikipedia.org/wiki/Biochip>
23. **Protein microarray**, [http://en.wikipedia.org/wiki/Protein\\_microarray](http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_microarray)