
OD GENOMU K PROTEOMU – VYUŽITÍ PROTEINOVÝCH ČIPŮ V ONKOLOGII

FROM GENOME TO PROTEOME – USING OF PROTEIN MICROARRAYS IN ONCOLOGY

MALČÍKOVÁ J., TICHÝ B., KOTAŠKOVÁ J., MAYER J., POSPÍŠILOVÁ Š.

CENTRUM MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A GENOVÉ TERAPIE, INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ
KLINIKA, FN BRNO

Souhrn

Rychlý rozvoj genomických technologií v posledních letech napomohl k lepšímu pochopení změn, které probíhají v rakovinné buňce na úrovni genomu. Skutečnými vykonavateli buněčných funkcí jsou však proteiny kódované genomem. Přímá analýza souboru proteinů buňky - proteomu - má proto velký význam pro pochopení procesu karcinogeneze a také v diagnostice. Celkový buněčný proteom v klinických vzorcích studuje klinická proteomika, jejímž cílem je identifikovat a charakterizovat proteiny zapojené do vzniku a vývoje onemocnění. V onkologii se tato nová disciplína zaměřuje na identifikaci proteinů, které by mohly sloužit jako biomarkery onemocnění pro včasnou diagnosu, a také na studium vlivu terapeutik a nalezení nových terapeutických cílů. Rakovina je značně heterogenní a proměnlivé onemocnění a pro její výzkum i diagnostiku je zapotřebí zavedení vysokokapacitních proteomických přístupů. Proteinové čipy tyto požadavky splňují, neboť umožňují paralelní stanovení mnoha parametrů v minimálním množství vzorku v rámci jediného experimentu. Tato technologie je využitelná nejen pro identifikaci a kvantifikaci proteinů, ale i pro jejich funkční analýzu.

Klíčová slova: proteinové čipy, proteomika, biomarkery, rakovina

Summary

Rapid development of genomic technologies allowed better understanding of changes in cancer cell genome. However, proteins coded by genes execute biological functions predominantly. Hence, direct analysis of collections of proteins i.e. proteome, is of great importance to understanding of carcinogenesis and also for diagnostics. The entire proteome in biological samples is analysed by clinical proteomics that aims to identify and characterise the disease related proteins. The purpose of this novel discipline in oncology is to identify new molecular biomarkers useful in early diagnosis and drug discovery. As cancer being a heterogeneous and dynamic disease, new high-throughput and large-scale technologies are required. Therefore protein microarrays represent a powerful tool in cancer research and diagnosis allowing simultaneous determination of a large number of parameters from a minute amount of sample within a single experiment. Assay systems based on this technology are used for identification and quantification of proteins as well as for the study of protein functions.

Keywords: protein microarrays, proteomics, biomarkers, cancer

Úvod

Primární příčinou vzniku nádorů jsou ve většině případů změny v genomu – genové mutace a chromozómové a genomové aberace. Genom, jakožto soubor všech genů buňky, je však pouze maticí, podle níž se syntetizují proteiny. Soubor všech proteinů v daném biologickém systému v konkrétním okamžiku se nazývá proteom. Právě proteiny realizují většinu buněčných funkcí. Modifikace v proteomu pozměňují signální dráhy a mohou vést k narušení klíčových buněčných procesů jako jsou proliferace, diferenciace, přežívání, apoptóza, metabolické a imunitní procesy (1). V případě, že změny v signálních drahách poskytují buňce selektivní růstovou výhodu, jsou pak vlastní příčinou nádorového bujení (2). Proto identifikace genetických událostí vedoucích k onemocnění vyžaduje také následné pochopení změn v proteomu. Navíc v proteinovém složení se dynamicky odráží momentální změny stavu buněk, proto monitorování proteomu v čase umožňuje určit průběh onemocnění a také reakci na léčbu.

Moderní genomické přístupy v čele s DNA čipy umožňují v jediném experimentu analyzovat celý transkriptom, tj. genovou expresi na úrovni mRNA. Mohou tak určit vztah mezi aktivitou genu a maligním onemocněním. Je však známo, že korelace mezi mRNA expresí a hladinou odpovídajícího proteinu není absolutní (3, 4), a to z důvodu rozdílné kontroly rychlosti syntézy proteinů a také odlišné rychlosti degradace jak mRNA, tak proteinů. Genomické techniky také neumožňují monitorovat, zda je exprimovaný protein funkční. Funkci proteinů ovlivňují interakce s jinými proteiny, či dalšími molekulami a také řada posttranslačních modifikací: například proces přenosu signálu v buňce je přednostně řízen fosforylací proteinů. Proto v současnosti vzniká potřeba zavádění nových přístupů zaměřených přímo na detekci patologických změn v proteinovém spektru.

Studium buněčného proteomu je komplikováno právě jeho značnou komplexitou. Pokud uvažujeme, že naše genetická informace obsahuje 40 000 genů, pak díky posttranskripčním a posttranslačním modifikacím může buňka obsahovat až milion i více proteinů a mnoho z nich může hrát roli ve vývoji onemocnění. Pro analýzu celkových změn v proteinové expresi je tedy třeba zavedení moderních vysokokapacitních metod. Řešení mohou poskytnout proteinové čipy (protein arrays), které umožňují paralelní sledování širokého spektra proteinů současně. V současné době jsou již využívány nejen pro identifikaci a kvantifikaci proteinů v minimálním množství vzorku, ale také pro studium funkčnosti proteinů na základě jejich interakcí s partnerskými molekulami (5).

Princip technologie

Zjednodušeně řečeno jsou proteinové čipy stovky až tisíce proteinů imobilizovaných ve formě mikrospotů na pevném povrchu. Povrchem mohou být membrány (polystyrenové, PVDF - polyvinyliden fluorid, nitrocelulosové), ovšem v současné době se stále více využívá standardních mikroskopických sklíček – skleněných s chemicky modifikovaným povrchem (poly-lysin, aldehydické skupiny) nebo potažených membránou. Nejčastější detekční metodou je fluorescence, ale může být využito i chemiluminiscence nebo radioaktivity (6). Alternativou k těmto planárním čipům jsou systémy založené na mikrosférách pro měření menšího množství analytů. Mikrosféry jsou kulovité částice přibližně o velikosti lymfocytu (průměr ~ 10 µm) vyrobené např. z polystyrenu nebo latexu. Tyto částice jsou „kódovány“ rozdílnými barvami nebo velikostmi a na nich jsou navázány sondy specifické pro stanovené proteiny. S použitím např. flow cytometrie jsou rozdílně kódované mikrosféry rozpoznávány a proteiny ve vzorku jsou takto identifikovány a kvantifikovány. Množství stanovených proteinů je ovšem limitováno počtem druhů mikrosfér (7).

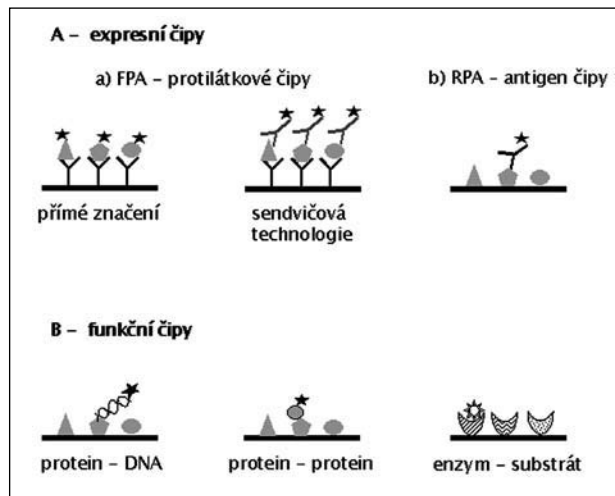
Základy pro vývoj proteinových čipů položil Roger Ekins na

konci 80. let (8). Prokázal, že analýza na principu vazby protilátka-antigen, miniaturizovaná ve formě mikrospotů protilátek na pevném povrchu, může dosáhnout vysoké citlivosti. Systém, který využívá malého množství vázané protilátky a malého objemu vzorku je citlivější než systém se stonásobně větším objemem materiálu, neboť přesto, že množství navázané molekuly je velmi nízké, v rámci mikrospotu lze dosáhnout vysoké hustoty. Při stanovení analytů jako například thyroideální stimulující hormon (TSH) nebo HBsAg dosáhl Ekins se svými spolupracovníky citlivosti řádově ve femtomolech (odpovídá 106 molekulám na ml). Zároveň je možné stanovení množství analytu ve vzorku, neboť množství vázaného analytu přímo odráží jeho koncentraci.

Typy proteinových čipů

Z hlediska použití lze proteinové čipy rozdělit na expresní (analytické) a funkční. Expresní čipy jsou používány pro stanovení přítomnosti a koncentrace proteinů v komplexních vzorcích a mají velký potenciál pro tzv. proteinové profilování, tj. monitorování proteinové exprese ve velkém měřítku (large-scale přístup). Pomocí funkčních proteinových čipů detekujeme interakce proteinů s jinými proteiny, peptidy, nízkomolekulárními látkami, oligosacharidy či DNA.

V případě expresních proteinových čipů existují dva základní formáty, které se liší způsobem aplikace vzorku: přímý (FPA – forward phase arrays) – na povrchu čipu jsou imobilizovány sondy, každý spot obsahuje jeden typ sondy. Čip je inkubován se vzorkem a proteiny jsou ze vzorku sondami vyvazovány. U zpětného formátu (RPA – reverse phase arrays) jsou stovky různých vzorků imobilizovány na povrchu čipu ve formě spotů. Čip je potom inkubován se značenými sondami (6). Nejčastějším typem sond jsou protilátky, pokud jsou imobilizovány na čipu, hovoříme o protilátkových čípech. V případě zpětného formátu, kdy jsou imobilizovány vzorky obsahující proteinové antigeny, jedná se o antigen čipy. (Obr. 1)



Obrázek 1.: Typy proteinových čipů A – expresní čipy. a – FPA (Forward Phase Arrays) u protilátkových čipů jsou na pevný povrch vázány protilátky a ty jsou inkubovány se vzorkem. Proteiny mohou být značeny přímo, nebo se provádí detekce pomocí sekundární značené protilátky – sendvičová technologie. b – RPA (Reverse Phase Arrays) analyzované proteiny jsou naspotovány na čip a jsou detekovány pomocí značených protilátek. B – funkční čipy – na čipu jsou vázány proteiny ve funkční konformaci a je tak umožněno studium jejich interakcí s DNA, jinými proteiny či dalšími molekulami a také studium enzymové aktivity.

Expresní čipy

Protilátkové čipy (FPA)

Nejběžnějším typem přímých analytických čipů jsou protilátkové čipy, kdy je na pevném povrchu vázáno velké množství protilátek a tyto jsou potom inkubovány se vzorkem. Proteiny ve vzorku mohou být značeny přímo nebo se pro detekci pou-

žívá tzv. sendvičová metoda – detekce pomocí značené sekundární protilátky. Použití sekundární protilátky značně zvyšuje citlivost a specifitu analýzy, ovšem vyžaduje dvě specifické protilátky pro daný protein.

Přímé značení proteinů ve vzorku sice umožňuje nižší citlivost detekce – řádově ng/ml, ale jeho výhodou je možnost dvoubarevného značení (9). Podobně jako u DNA čipů porovnáváme expresi mRNA ve dvou vzorcích, můžeme pomocí protilátkových čipů srovnávat hladiny proteinů v různých tkáních (např. zdravá vs. nádorová tkáň). Proteiny ze dvou různých zdrojů jsou barveny dvěma různými fluorescenčními barvami, smíchány ve stejném poměru a inkubovány na čipu. Čip je poté skenován fluorescenčním readem na dvou různých kanálech se specifickou vlnovou délkou pro daný fluorofor. Poměr fluorescence dvou fluoroforů potom odpovídá relativní koncentraci proteinu ve srovnávaných vzorcích (Obr. 2). Poprvé s touto technikou vystoupil Haab se svými spolupracovníky v roce 2001 (9). Spotovali 115 komerčně dostupných protilátek a testovali jejich reaktivitu s příslušnými značenými antigeny připravenými v různých poměrech koncentrací. Při interpretaci výsledků je však třeba brát v úvahu, že silný signál může vzniknout nejen v důsledku vysoké koncentrace stanoveného proteinu ve vzorku, ale také může být důsledkem vazby multiproteinového komplexu, který vzniká pouze v jednom z porovnávaných vzorků. Získané výsledky by proto měly být ověřeny nezávislou metodou. Přesto do dneška již mnoho výzkumných skupin prokázalo obecnou využitelnost tohoto přístupu a proteinové čipy byly použity i v mnoha pracích zaměřených na onkologický výzkum. Sreekumar se svými spolupracovníky (10) použili čipy se 146 různými protilátkami ke sledování změn proteinových hladin u buněk karcinomu tlustého střeva po léčbě ionizujícím zářením a potvrdili radiací indukované zvýšení exprese u několika regulátorů apoptózy. Pro srovnání exprese proteinů u maligní a sousedící normální tkáně u pacientek s primárním nádorem prsu bylo použito protilátkového čipu s 378 protilátkami a bylo nalezeno několik proteinů, jejichž změněná exprese obě tkáně odlišovala (11). Podobně byly studovány sérové proteiny u pacientů s nádory močového měchýře a zdravých kontrol (12). Protilátkové čipy byly také využity pro analýzu exprese CD antigenů u různých leukemických buněk. Čip s naspotovanými anti-CD protilátkami byl inkubován přímo s buněčnou suspenzí a byly takto odlišeny normální leukocyty periferní krve a buňky různých leukémií: chronická lymfatická leukémie, vlasatobuněčná leukémie, akutní myeloidní leukémie, T-buněčná akutní lymfoblastická leukémie a lymfom buněk plášťové zóny. Výhodou tohoto přístupu je, že nevyžaduje barvení, navázané buňky jsou detekovány mikroskopicky a navíc mohou být dále charakterizovány různými fluorescenčně značenými protilátkami (13,14,15). Tento typ čipů, kdy se používají přímo živé buňky se někdy označuje také jako buněčné čipy (viz níže). Pro zvýšení citlivosti detekce se používá sendvičové technologie. Tento přístup byl například využit pro kvantifikaci 150 různých cytokinů a ostatních složek séra a u více než poloviny takto analyzovaných proteinů se podařilo dosáhnout citlivosti řádově v pg/ml (16). Huang a spolupracovníci zase detekovali změny v expresi cytokinů v lidských glioblastomových buňkách po léčbě tumor nekrotickým faktorem alfa (TNF α) (17). K detekci menšího počtu komponent, např. v séru pacientů, je vhodné využít sendvičové technologie v kombinaci s mikrosférami. Byly již využity pro detekci cytokinů, protilátek, metabolických markerů, kináz, ale i širokého spektra patogenů včetně virů, toxinů a bakteriálních spor (7, 18, 19, 20). V současné době jsou již komerčně dostupné sady až sta rozdílně barevně značených mikrosfér a při jejich použití se dosahuje podobné spolehlivosti, citlivosti a přesnosti jako při využití standardní ELISA techniky.

Antigen čipy (RPA)

Jiným typem proteinových čipů jsou tzv. reverse-phase arrays (RPA), čili antigen čipy, kdy jsou na čip imobilizovány přímo

studované vzorky (buněčné nebo tkáňové lyzáty). Přítomnost jednotlivých proteinů (antigenů) je stanovována pomocí specifických značených protilátek. Takto byly například srovnávány hladiny proteinů u 60 lidských nádorových linií. Lyzáty z buněčných linií byly spotovány vždy 10krát v různých ředěních a proteiny byly detekovány pomocí 52 myších monoklonálních protilátek. Byly takto nalezeny dva potenciální markery odlišující nádory tlustého střeva od nádorů vaječníku, které jsou v některých případech histologicky špatně rozlišitelné (21). Tato skupina také srovnávala výsledky z proteinového profilování s výsledky DNA čipů a prokázala poměrně vysokou korelaci mezi hladinou mRNA a buněčnými strukturními proteiny, ovšem v případě nestrukturních proteinů žádná korelace prokázána nebyla (22). Pro studium karcinogeneze je velmi vhodná kombinace RPA s laserovou mikrodisekcí (LCM – laser capture microdissection), protože umožňuje sledovat proměnlivý stav buněčného proteomu ve vybraných buněčných subpopulacích v mikroprostředí nádoru a vysledovat takto změny v signálních drahách vedoucí ke vzniku a progresi nádoru. Tuto technologii použil Grubb se svými spolupracovníky (23) pro studium změn při progresi karcinomu prostaty. Srovnávali fosforylační status klíčových regulátorů buněčné signalizace v raných epiteliálních lézích, prostatickém stromatu a extracelulární matrix. Popsali změny v aktivaci drah při progresi normálního epitelu do invazivního karcinomu a také rozdíl mezi pacienty.

Nevýhodou RPA přístupu je poměrně nízká koncentrace studovaných proteinů (např. kináz nebo jiných signálních molekul) v mikrospotu. Řešením pro zvýšení citlivosti detekce je pre-fractionace. Toho bylo využito při studiu autoreaktivity protilátek v séru pacientů proti nádorovým proteinům. Lyzáty buněčných linií adenokarcinomu tlustého střeva byly rozděleny pomocí dvourozměrné kapalinové chromatografie a teprve jednotlivé frakce byly spotovány. Čipy byly inkubovány se sérem nově diagnostikovaných pacientů s karcinomem tlustého střeva, plic a zdravých kontrol. Mezi těmito skupinami byly prokázány rozdíly v autoreaktivitě (24). Výhodou této metodiky je možnost další analýzy a případné identifikace reaktivních autoantigenů s využitím hmotnostní spektrometrie.

Další formáty expresních proteinových čipů

SELDI

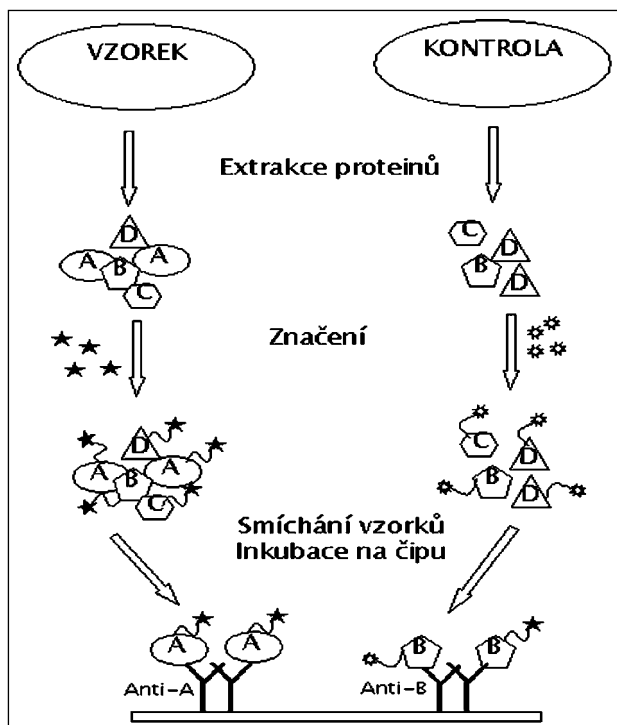
Alternativním přístupem založeným na nespecifických interakcích je technologie SELDI (surface enhanced laser desorption and ionisation). Spočívá v inkubaci buněčných extraktů na makrospacech adsorpčního povrchu s různou povrchovou úpravou (hydrofobní, hydrofilní, kation/anion výměnné a další). Nespecificky navázané proteiny jsou potom analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie (25). Tato metodika má sice nižší citlivost, ale je velmi vhodná pro rychlé vyhledávání neznámých proteinových biomarkerů.

Buněčné čipy

V současné době byly čipové technologie rozšířeny i na celé buňky. Buněčné čipy mohou být také ve formátu přímém nebo zpětném. Příkladem přímého přístupu je např. čip pro detekci CD antigenů na živých buňkách - viz výše (13, 14, 15). Při zpětném přístupu se např. využívá růstu buněk přímo na povrchu čipu s naspotovanými různými cDNA, buňky jsou schopny během růstu přijmout tuto DNA a dostaneme potom čip se spoty buněk exprimujících různé cizorodé proteiny, jejichž vlastnosti mohou být studovány přímo v buněčném kontextu (26).

Tkáňové čipy

Na čipu mohou být také imobilizovány přímo vzorky tkání, např. bioptických. Výhodou je možnost paralelního screeningu velkého množství tkáňových vzorků standardními analytickými metodami jako imunohistochemie nebo fluorescenční in situ hybridizace současně (27).



Obr. 2 Expresní protilátkové čipy - princip dvoubarevného značení proteinů - Ze studovaného vzorku a příslušné kontroly jsou vyzolovány proteiny, ty jsou nabarveny dvěma rozdílnými barvičkami (flouorofory), smíchány ve stejném poměru a inkubovány na jednom čipu. Pomocí dvoubarevné detekce jsou identifikovány přímo rozdíly v proteinové expresi mezi vzorkem a kontrolou.

Čipy pro funkční studie

Proteinové čipy jsou v poslední době využívány také pro studium funkce proteinů, a to prostřednictvím jejich interakce s jinými molekulami. Funkční čipy již byly použity pro studium interakcí s jinými proteiny, DNA, RNA, oligosacharidy, nízkomolekulárními látkami včetně terapeutik a také ke studiu enzymatické aktivity. Pro tyto aplikace je nezbytné uchovat proteiny ve funkčním stavu, čili ve správné konformaci. V současné době jsou již dostupné technologie pro imobilizaci funkčních proteinů. Jedna z prvních čipových funkčních analýz byla navržena pro studium kvasinkových proteinů, a to pro určení substrátové specifity kvasinkových kináz (28). Stejná výzkumná skupina také vytvořila funkční čip, obsahující téměř celý proteom kvasinky (5800 proteinů) a testovala na něm interakce s kalmodulinem a také s fosfolipidy (29). Funkční čipy byly také již využity při studiu řady lidských proteinů. Boutell a spolupracovníci představili čip s naspotovanými 50 variantami nádorového supre-

soru p53. Protein p53 je mutován asi u poloviny maligních onemocnění a různé mutace mohou mít na nádorové buňky různý vliv. Jelikož je p53 transkripční faktor, je tento čip vhodný zejména pro studium vlivu mutací na vazbu k DNA, ale také k jiným proteinům, které ovlivňují jeho aktivitu (30). K pochopení protein-proteinových interakcí v signalizačních procesech přispívají data získaná pomocí doménových čipů s naspotovanými různými proteinovými doménami (31, 32). Pomocí čipů lze také stanovovat enzymatickou aktivitu proteinů. Klíčovými molekulami v buněčných procesech jsou kinázy, které fosforylují proteiny signálních drah a ovlivňují tak jejich funkci. Změny v jejich aktivitě jsou tedy často příčinou nádorového bujení. Pro určení fosforylační aktivity různých kináz a také stanovení vlivu jejich inhibitorů bylo využito peptidových čipů (33). Čipy s naspotovanými malými molekulami byly navrženy pro identifikaci inhibitorů kaspáz, které hrají zásadní úlohu v procesech spouštění apoptózy (34, 35). Takovéto čipy s malými organickými molekulami („chemické knihovny“) jsou vhodné pro sledování interakcí ligand-receptor, což má přínos pro vyhledávání vhodných léků interagujících se specifickými proteiny. V současnosti je terapie většinou zaměřena na jednotlivé molekuly, ovšem vysokokapacitní proteomické techniky umožňují nalezení nových terapeutických cílů. A tak v budoucnosti bude možné zaměřit terapii proti více cílům narušené signální dráhy současně. Pomocí takového kombinované terapie lze potenciálně dosáhnout vyšší účinnosti za současného snížení toxicity léčby (36).

Závěry a budoucnost proteinových čipů

Hlavní výhody proteinových čipů spočívají v možnosti testování tisíců proteinů současně a také v nenáročnosti na množství materiálu, což má význam zejména tam, kde je k dispozici jen malý objem vzorku, např. při vyhledávání více nádorových markerů v minimálním množství bioptického materiálu. Navíc kromě identifikace a kvantifikace studovaných proteinů umožňuje i jejich funkční analýzu. Proto tato technologie najde v budoucnosti využití nejen v základním výzkumu, ale i v klinické proteomice. Nové proteomické přístupy se uplatní v individuální péči o pacienta na několika úrovních: včasná detekce choroby pomocí expresních proteinových profilů, diagnóza s využitím proteinových markerů jako doplňku ke standardním vyšetřovacím metodám, individualizovaný výběr léčby na míru jednotlivým pacientům, sledování účinnosti a toxicity léčby v čase a eventuální změny v léčbě na základě detekovaných změn v proteinovém profilu konkrétního pacienta. V neposlední řadě informace o proteinech zapojených do patogeneze nemoci poskytnou potenciál k nalezení nových terapeutických cílů.

Poděkování: Tato práce je podporována granty IGA MZČR 8448-3/2005, MŠMT 1K04017, NF Elpida Nukleus

Literatura

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57-70.
2. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):375-9.
3. Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*. 1997 Mar-Apr;18(3-4):533-7.
4. Le Naour F, Hohenkirk L, Grolleau A, et al. 2001. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J. Biol. Chem*. 276:17920-17931.
5. Zhu H, Snyder M. Protein chip technology. *Curr Opin Chem Biol*. 2003 Feb;7(1):55-63.

6. Poetz O, Schwenk JM, Kramer S, et al. Protein microarrays: catching the proteome. *Mech Ageing Dev*. 2005 Jan;126(1):161-70.
7. Bellisario R, Colinas RJ, Pass KA. Simultaneous measurement of antibodies to three HIV-1 antigens in newborn dried blood-spot specimens using a multiplexed microsphere-based immunoassay. *Early Hum Dev*. 2001 Aug;64(1):21-5.
8. Ekins RP. Multi-analyte immunoassay. *J Pharm Biomed Anal*. 1989;7(2):155-68.
9. Haab BB, Dunham MJ, Brown PO. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol*. 2001;2(2):RESEARCH0004.
10. Sreekumar A, Nyati MK, Varambally S, et al. Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. *Cancer Res*. 2001 Oct 15;61(20):7585-93.

11. Hudelist G, Pacher-Zavisin M, Singer CF, et al. Use of high-throughput protein array for profiling of differentially expressed proteins in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Aug;86(3):281-91.
12. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Haab BB, Cordon-Cardo C. Profiling bladder cancer using targeted antibody arrays. *Am J Pathol.* 2006 Jan;168(1):93-103.
13. Belov L, de la Vega O, dos Remedios CG, et al. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer Res.* 2001 Jun 1;61(11):4483-9.
14. Belov L, Huang P, Barber N, et al. Identification of repertoires of surface antigens on leukemias using an antibody microarray. *Proteomics.* 2003 Nov;3(11):2147-54.
15. Belov L, Huang P, Chrisp JS, et al. Screening microarrays of novel monoclonal antibodies for binding to T-, B- and myeloid leukaemia cells. *J Immunol Methods.* 2005 Oct 20;305(1):10-9.
16. Shao W, Zhou Z, Laroche I, et al. Optimization of Rolling-Circle Amplified Protein Microarrays for Multiplexed Protein Profiling. *J Biomed Biotechnol.* 2003 (5):299-307.
17. Huang RP, Huang R, Fan Y, Lin Y. Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system. *Anal Biochem.* 2001 Jul 1;294(1):55-62.
18. Chen R, Lowe L, Wilson JD, et al. Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clin Chem.* 1999 Sep;45(9):1693-1694.
19. McBride MT, Gammon S, Pitesky M, et al. Multiplexed liquid arrays for simultaneous detection of simulants of biological warfare agents. *Anal Chem.* 2003 Apr 15;75(8):1924-30.
20. McBride MT, Masquelier D, Hindson BJ, et al., Autonomous detection of aerosolized *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*. *Anal Chem.* 2003 Oct 15;75(20):5293-9.
21. Nishizuka S, Chen ST, Gwadry FG, et al. Diagnostic markers that distinguish colon and ovarian adenocarcinomas: identification by genomic, proteomic, and tissue array profiling. *Cancer Res.* 2003 Sep 1;63(17):5243-50.
22. Nishizuka S, Charboneau L, Young L, et al. Proteomic profiling of the NCI-60 cancer cell lines using new high-density reverse-phase lysate microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Nov 25;100(24):14229-34.
23. Grubb RL, Calvert VS, Wulkuhle JD, et al. Signal pathway profiling of prostate cancer using reverse phase protein arrays. *Proteomics.* 2003 Nov;3(11):2142-6.
24. Nam MJ, Madoz-Gurpide J, Wang H, et al. Molecular profiling of the immune response in colon cancer using protein microarrays: occurrence of auto-antibodies to ubiquitin C-terminal hydrolase L3. *Proteomics.* 2003 Nov;3(11):2108-15.
25. Davies H, Lomas L, Austen B. Profiling of amyloid beta peptide variants using SELDI Protein Chip arrays. *Biotechniques.* 1999 Dec;27(6):1258-61.
26. Ziauddin J, Sabatini DM. Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature.* 2001 May 3;411(6833):107-10.
27. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet.* 2001 Apr;10(7):657-62.
28. Zhu H, Klemic JF, Chang S, et al. Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet.* 2000 Nov;26(3):283-9.
29. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 2001 293(5537):2101-5.
30. Boutell JM, Hart DJ, Godber BL, et al. Functional protein microarrays for parallel characterisation of p53 mutants. *Proteomics.* 2004 4(7):1950-8.
31. Liu MY, Cai S, Espejo A, et al. 14-3-3 interacts with the tumor suppressor tuberlin at Akt phosphorylation site(s). *Cancer Res.* 2002 Nov 15;62(22):6475-80.
32. Newman JR, Keating AE. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science.* 2003 Jun 27;300(5628):2097-101.
33. Houseman BT, Huh JH, Kron SJ, Mrksich M. Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nat Biotechnol.* 2002 20(3):270-4.
34. Gosalia DN, Diamond SL. Printing chemical libraries on microarrays for fluid phase nanoliter reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 22;100(15):8721-6.
35. Winssinger N, Ficarro S, Schultz PG, Harris JL. Profiling protein function with small molecule microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 20;99(17):11139-44.
36. Normanno N, Campiglio M, De LA, et al. Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth. *Ann Oncol.* 2002 Jan;13(1):65-72.