

MICROARRAY TEKNOLOJİSİ

Bilgisayar teknolojisinin moleküler biyolojiye paralel olarak hızla gelişmesi , iki disiplini birbirine yaklaştırmıştır. Böylece ,biyoteknolojinin kavramsal olarak ulaşabileceği son noktalardan biri olan gen çip (microarray) ortaya çıkmıştır. Microarray tekniğinin ilk girişimleri Shalon ve Schena tarafından gerçekleştirilmiştir.

Moleküler biyolojideki geleneksel metotlarda genellikle “bir deneyde bir gen” ilkesi geçerlidir. Bu demektir ki gen fonksiyonlarının “bütün resmini” görmek geleneksel yöntemlerle zordur. Gen çip teknolojisinin büyük bir ilgi ile karşılanmasının sebebi , bütün genomun basit bir çip üzerinde görüntülenmesini vaat etmesi ve bu sayede bilim adamlarının aynı anda binlerce genin birbirleriyle olan etkileşimlerini görmesine olanak tanınmasıdır.

DNA microarray'i cam, plastik veya silikon çip gibi katı bir yüzeye tutturularak sıralı bir şekilde (array) oluşturulmuş mikroskobik DNA spotlarıdır. Bir microarray'de bu spotlardan onbinlerce bulunabilir. Yüzeye tutturulan bu DNA parçaları (genellikle 20-100 nükleotid uzunluğunda) **prob** olarak tanımlanmıştır. Microarray teknolojisi , DNA'nın bir substrata bağlanıp bilinen bir gen ya da fragment ile prob hazırlanması şeklinde tanımlanabilecek “Southern Blotting” tekniğinden türetilmiştir. Bu yeni teknikte membran yerine camın kullanılması , radyoaktivitenin yerini fluoresan işaretlerin alması ve bağlanmayı sağlayacak yöntemlerin hassaslaşmasıyla çalışmaların verimi ve elde edilen bilgilerin miktarı artmıştır.

Microarray'ler nasıl üretilir ve nasıl çalışır?

Microarray'lerin üretiminde çeşitli yöntemler kullanılabilir: cam lamalar üzerine ince uçlu iğnelerle baskı, önceden hazırlanmış maskelerle fotolitografi , dinamik mikroayna cihazlarıyla fotolitografi , ink-jet baskı , mikroelektrod array'lerinde elektrokimya gibi...

Temel olarak çiplerin hazırlanması iki şekilde yapılabilir:

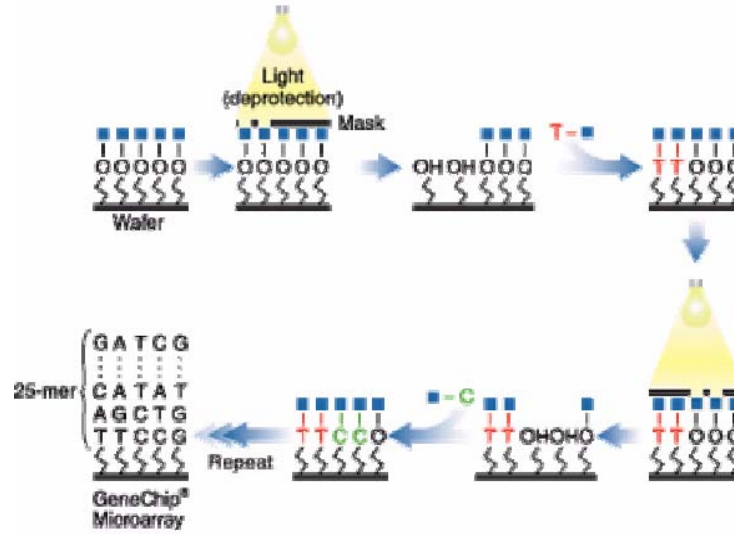
- Çip üzerinde oligonükleotid sentezi (*On-chip oligonucleotide synthesis*):

DNA ya da gen parçaları direkt olarak cam maddenin üzerinde sentez edilir. Genellikle fotolitografi yöntemi kullanılır. (Bknz. Şekil1 ve 2)

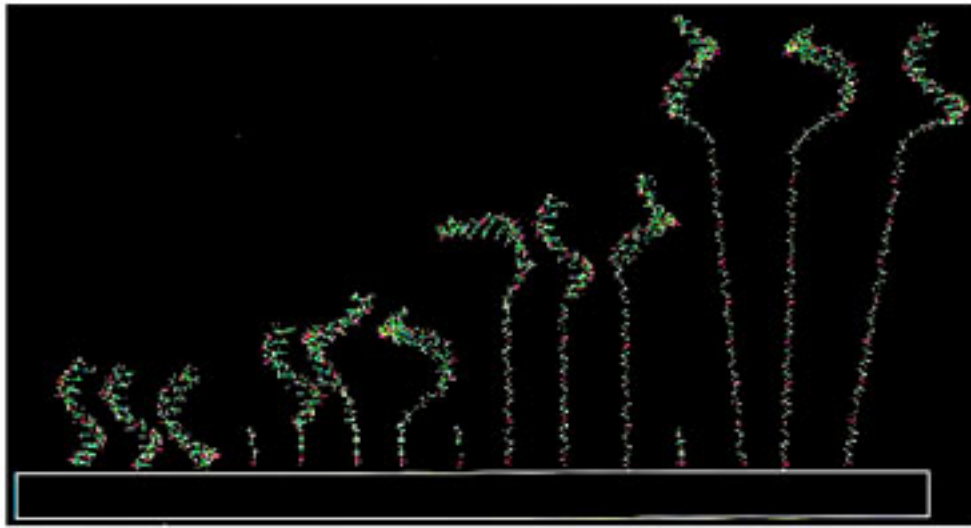
- DNA'nın direkt olarak yüzeye bırakılması (*Direct DNA deposition*):

Bu teknikte genomik DNA'nın parçaları fiziksel olarak cam yüzeydeki yerlerine bırakılır.Yöntem Stanford Üniversitesi'nden Pat Brown'un laboratuvarında tasarlanmıştır. (Bknz. Şekil 3)

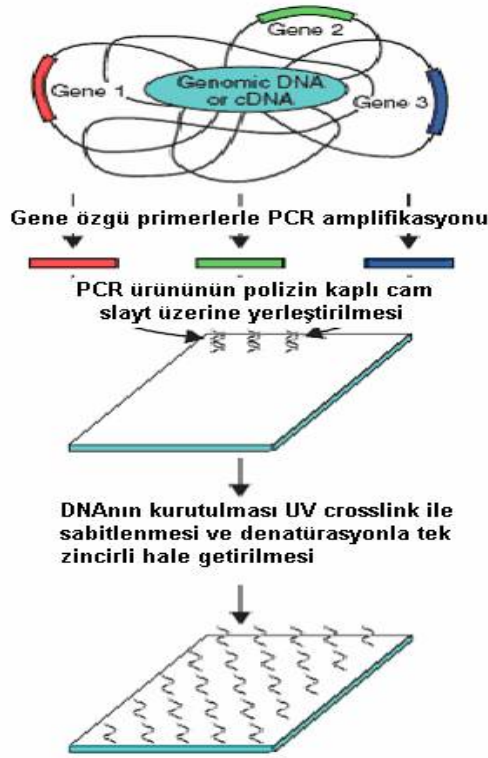
Microarray'ler çeşitli firmalarca ticari amaçla üretilmektedir. Bununla birlikte, başta Stanford Üniversitesi olmak üzere , birçok üniversite laboratuvarı kendi çipini hazırlamaktadır. (Microarray üretimi ile ilgili teknik ayrıntılara Stanford Üniversitesi Moleküler ve Genetik Tıp Merkezi'nin internet sitesinden ulaşılabilir: <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/>)



Şekil 1. Fotolitografi yönteminde , probun yüzeyini normal şartlar altında ışığı geçirmeyen bir madde (maske) kaplar. Hibridizasyondan sonra UV ışığı altında hibridize olan bölgeler bu maddeyi delerek kendilerini belli ederler , hibridize olmayan bölgeler ise karanlıkta kalır.



Şekil 2. Fotolitografi yöntemiyle çip üzerinde oligonükleotid sentezi.



Şekil 3. Stanford çiplerinin DNA fragmentleri; genlerin PCR amplifikasyonu ile elde edilip, cam film üzerine robotic spotting yöntemiyle kusursuz bir şekilde yerleştirilmesiyle elde edilir. PCR ürünleri cam film üzerine yaklaşık 2 cm² bir alana noktacıklar halinde yerleştirilir. Her bir PCR ürününün yerleştirildiği bölge ve içerdiği DNA dizisi kesin olarak bellidir. Daha sonra slayt üzerindeki DNA' lar kurutulur (100° C de 2 sn), sabitlenir (UV cross-linking), ve denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir (95° C de 2 dk). Hazırlanan çipler, işaretlenmiş cDNA fragmentleriyle bağlanmak üzere kullanılırlar.

Gen array deneyleri tipik olarak farklı doku ya da koşullardaki ya da bir uygulamadan sonraki gen ekspresyon düzeyini tayin etme amacıyla kullanılır. Bu amaçla öncelikle çalışılan konuya göre farklı dokular, koşullar ya da zamanlar baz alınarak RNA izolasyonu yapılır. Bu RNA örnekleri seyraltılarak her bir örneğin eşit yoğunlukta olması sağlanır.

Kural olarak, asıl RNA populasyonundaki her mRNA molekülü için bu molekülün komplementer olan tek iplikli işaretlenmiş bir cDNA hazırlanır. Belli bir mRNA'nın yoğunluğu arttıkça cDNA miktarı da artar.

Problar , genellikle, işaretli nükleotidlerin varlığında mRNA'nın tek iplikli cDNA'ya reverse transkripsiyonu ile üretilir. Bu nedenle, işaretli prob, aslında mRNA populasyonunu temsil eden bir cDNA molekülleri populasyonudur. Tek iplikli bir prob oluşturmak için RNA, mRNA'daki polyA ucuna komplementer olan oligo dT primerleri, reverse transkriptaz ve işaretlenmiş nükleotidler içeren bir reaksiyon karışımına konur. Genellikle işaretlenmiş nükleotidler Cy3 (yeşil) ve Cy5 (kırmızı) gibi floresan işaretlerle ya da kimyasal luminescent saptama ile saptanabilen digoksijenin (DIG) ile etiketlenmiştir. Ele alınan bir klondaki hibridizasyon miktarı , ilgili gen için bulunan mRNA miktarına karşılık gelir.

Gen array'i deneyleri bazen "revers northrens" olarak da adlandırılır. Northern blot'da , RNA bir filtre üzerine bir prob yardımıyla blot edilir ve burada amaç belli bir mRNA türünü ayrı bir bant ya da spot olarak tespit etmektir. Gen array hibridizasyonunda ise cDNA'lar bir filtre ya da lam üzerine spotlanır ve bir mRNA popülasyonundan elde edilen bir prob yardımıyla hibridize edilir. Bu tip çalışmalar için cDNA'lar genellikle bir EST çalışması ile elde edilir.

Array'lerde yaklaşık 500.000 kadar spot bulunabilmektedir. Her geçen gün çalışılan konulara özgü array formatları dizayn edilmektedir.

Her bir probun işaret ile inkorporasyonu ölçülür ve hepsinin yoğunluğunu eşitlemek için seyreltilirler. Genellikle, denenecek her bir prob için birer kopya filtre ya da microarray hazırlanır. Problar her array ile ayrı ayrı hibridize edilir.

Filtre array'ler prob ile inkube edilir ve Southern ya da northern blotting'deki gibi yıkanır. Cam microarray'ler için hibridizasyon bir coverslip altında yapılır ve lamlar yıkama solusyonuna batırılarak yıkanır. Ticari array'ler hibridizasyon, yıkama ve tespitin yapılmış olduğu kasetler içerisinde satılır.

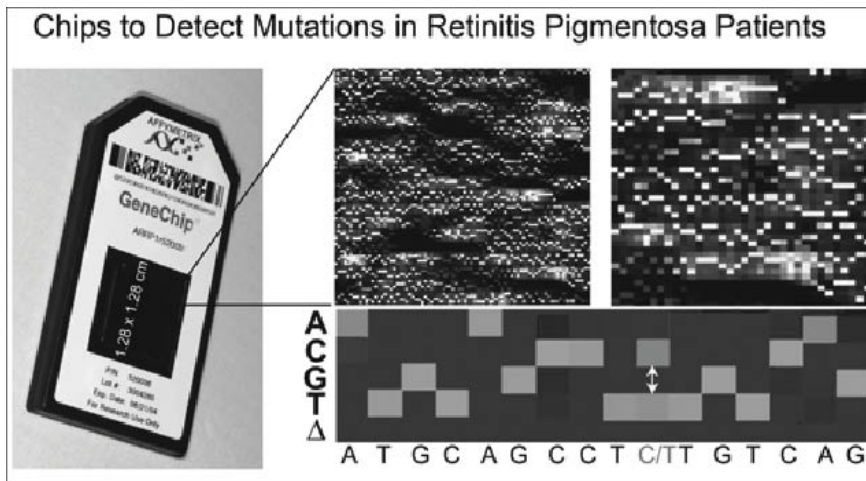
Hibridize edilmiş prob DIG işaretleme için kimyasal luminesens , microarray'ler için de doğrudan UV floresans ile tespit edilir. Her spotun sıra yoğunluğu bir CCD kamera ile ölçülür ve veri bir TIF görüntüsü olarak elde edilir.

Microarray tipleri

1. Oligonükleotid microarray'leri

Oligonükleotid microarray'lerinde problar sekansı bilinen ya da tahmin edilen mRNA'lara uygun olacak şekilde dizayn edilir. Bu tip dizaynların bazılarını ticari olarak erişmek mümkündür (Affymetrix, GE Healthcare gibi firmalar aracılığıyla) (Bknz. Şekil 4) . Bu microarray'ler gen ifadesinin kesin değeri ile ilgili tahminler verir; o nedenle, iki durumun karşılaştırılmasında iki ayrı microarray kullanmak gerekir.

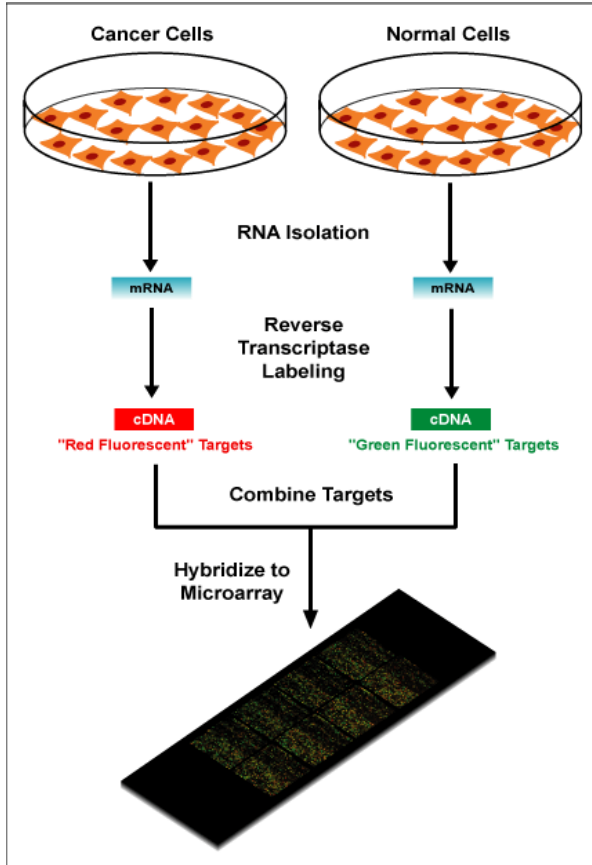
Array'deki her bir geni temsil etmek üzere genellikle 25-70 nükleotid uzunluğunda oligonükleotidler kullanılır. Daha küçük boyutlarda prob bağlama etkinliği daha düşük olmaktadır. Bununla birlikte, küçük oligonükleotidlerin özgüllüğü daha fazladır. 70 nükleotidden daha uzun olanlarda ise sinyalde çok küçük bir artış olmaktadır. Oligonükleotidler her seferinde yeniden sentezlendiği için cDNA'larda olduğu gibi başka sekanslardan kontaminasyon söz konusu değildir.



Şekil 4.

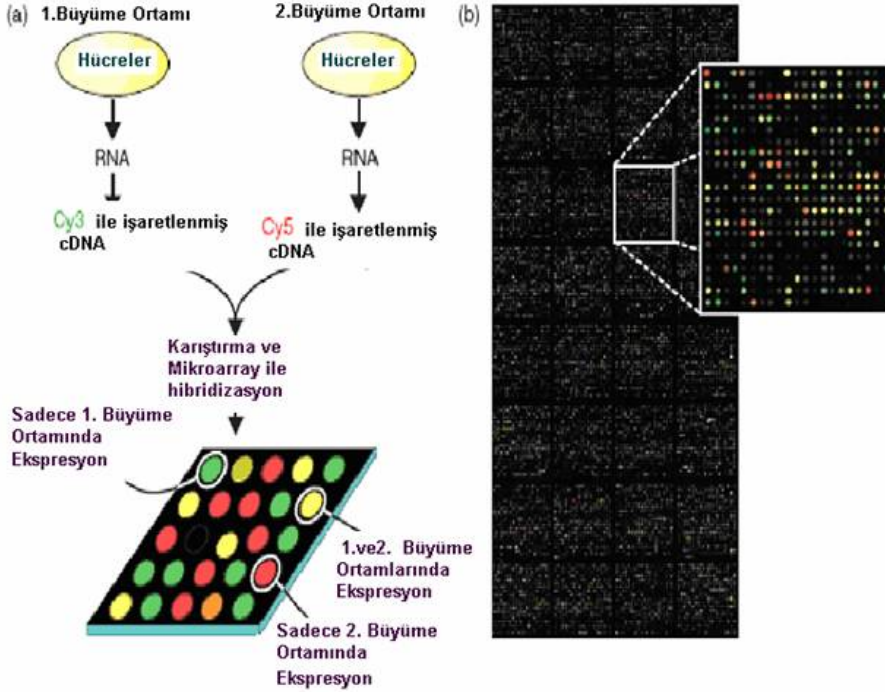
2. Spotlu microarray'ler

Spotlu microarray'lerde problemler oligonükleotid . cDNA veya mRNA'lara karşılık gelen PCR ürünlerinin küçük parçaları olabilir. Bu tip array'lerde genellikle iki farklı boya ile işaretlenmiş, karşılaştırılacak iki örnekten (örneğin hasta ve kontrol) gelen cDNA ile hibridize edilmiştir. Örnekler karıştırılıp tek bir microarray'e hibridize edilebilir; lazer ile taranması sonucunda up-regulated ve down-regulated genler bir seferde görülebilir (Bknz. Şekil 5). Dezavantajı gen ifadesi düzeyinin kesin olarak gözlenememesidir ; ama bu yöntemle deneyin maliyeti azalır.



Şekil 5. Spotlu microarray

Tipik bir microarray çalışmasına örnek olarak Stanford Üniversitesi'nden P.Brown'un çalışması gösterilebilir: Bu çalışmada cDNA problemleri galaktozlu ve glukozlu ortamlarda yetiştirilen maya hücrelerinden elde edilmiştir. Farklı problemlerden gelen sinyalleri birbirinden ayırmak için farklı floresans özellikteki etiketlerle (Cy3 ve Cy5) işaretlenmişlerdir. Array biri Cy3 diğeri Cy5 olmak üzere iki kez lazerle taranmış; böylece iki boyanın oranının ve dolayısıyla iki farklı yetiştirme ortamındaki transcript oranının saptanabileceği iki parçadan oluşan bir görüntü elde edilmiştir. Pseudocolor görüntülerinde, array'de galaktoz varlığında daha güçlü ifade edilen genleri temsil eden spotlar yeşil, glukoz varlığında daha güçlü şekilde ifade edilen genleri temsil eden spotlar ise kırmızı , her iki koşulda da ifade edilen genler ise sarı renk ile gösterilmiştir (Bknz. Şekil6).



Şekil 6.

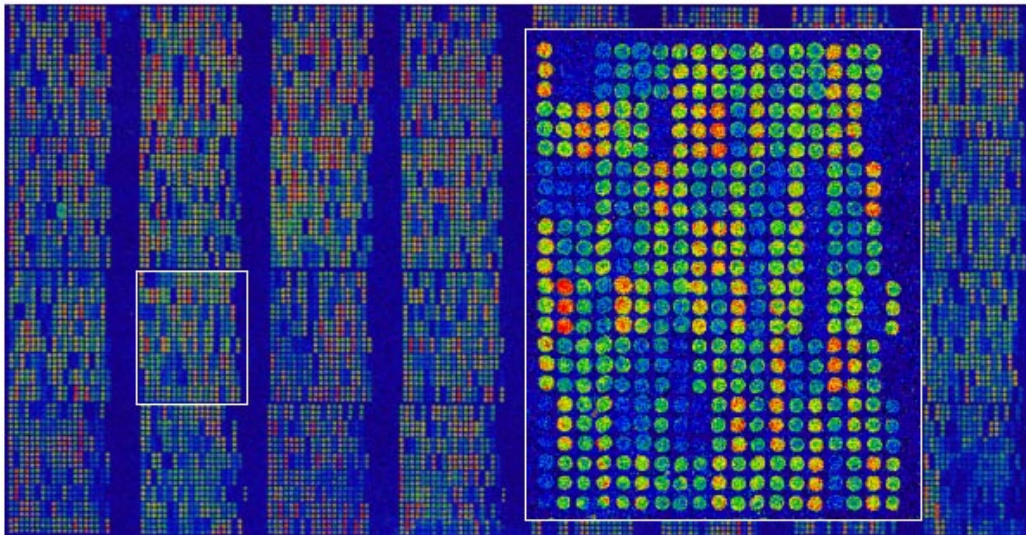
3. Genotip microarray'leri

DNA microarray'leri aynı zamanda belli bir pozisyondaki bir genom dizisini okumada da kullanılabilir.

SNP microarray'ler bireylerde ve populasyonlarda genetik varyasyonu belirlemek için kullanılan özel bir çeşit DNA microarray tipidir. Genetik çeşitlilikten ve genetik hastalıklara yatkınlıktan sorumlu olduğu düşünülen tek nükleotid polimorfizmlerini (single nucleotide polymorphisms –SNP) belirlemede kısa nükleotid array'leri kullanılabilir. Genel olarak genotip belirleme olarak adlandırılan bu tip microarray uygulamaları adli tıp çalışmalarında, hastalıklara genetik yatkınlığın hızlı bir şekilde bulunması çalışmalarında ya da DNA temelli ilaç adaylarının tanımlanmasında kullanılabilir (Bknz. Şekil 7).

SNP microarray'leri ayrıca kansere neden olan somatic mutasyonların , özellikle de heterozigosite kaybının ya da DNA bölgelerinin artan ya da kaybedilen (delesyon) profillerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır.

Yeniden sekaslama array'li bireylerdeki genom kısımlarının dizisini çıkarmak için geliştirilmiş bir başka array çeşididir. Bu array tekniği bireylerdeki germline mutasyonları veya kanserdeki somatic mutasyonları belirlemede kullanılabilir.



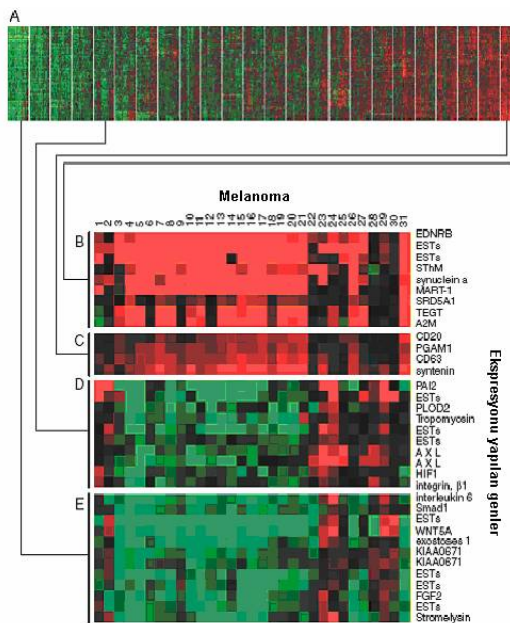
Şekil 7.

Microarray'lerin kullanım alanları

1. Gen ifade profillerinin çıkarılması
2. Polimorfizm analizleri
3. Mutasyon analizleri
4. DNA dizi analizi
5. Erimisel çalışmalar
6. Potansiyel terapötik ajanların bulunması, geliştirilmesi, optimizasyonu ve klinik değerlendirmesi

Microarray tekniğinin en göze çarpan kullanım alanı gen ifadesindeki farklılıkların ölçülmesidir. Genomik DNA'dan transkripsiyona uğrayan genlerin tamamına transkriptom veya gen ekspresyon profili adı verilmektedir. Bir hücrenin fenotipi ve fonksiyonu transkriptomu tarafından belirlenir. Genom hücreden hücreye sabit olmasına karşın gen ekspresyon profili hücrenin içinde bulunduğu koşullara göre hızla değişebilen bir yapıdır. Çeşitli koşullarda genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimler takip edilerek bu genlerin kodladığı proteinlerin fonksiyonları hakkında önemli ip uçlar elde edilebilir. Mikroarrayler çeşitli fizyolojik veya patolojik süreçlerde gen ekspresyon paternlerindeki değişimi izlemek için kullanılmaktadır.

DNA mikroarray kanser hücrelerindeki gen ekspresyon farklılaşmasının karakterize edilmesinde oldukça kapsamlı bir şekilde kullanılır. Örneğin, insan akciğer epitelyum hücreleri tarafından ekspresyonu yapılan yaklaşık 5500 gen, akciğer kanserli doku genleri ile karşılaştırılabilmektedir. Böylece kanserleşme sürecinde rol oynayan gen takımları hakkında bilgi edinmek mümkündür. Kanser tedavisindeki bir diğer önemli rolü, gen ekspresyon durumlarına göre kanserleşen hücrelerin sınıflandırılabilmesidir. Örneğin; önceden tespit edilemeyen malignant melanoma hücrelerinin alt tipleri, ekspresyon paternleri ile belirlenebilmektedir (Bknz. Şekil 8). Bu alt tipleri önceden belirleyebilmek diğer yöntemlerle mümkün değildir. Benzer bir analiz akciğer kanser hücrelerinin gen ekspresyon karşılaştırması ile yapılmaktadır.



Şekil 8.

Microarray teknolojisinin avantajları

Gen ifadesi modellerinin genel bir görüntüsünü elde etmeyi mümkün kılar. Belli bir hücre türünün belirli bir ortam için gen ifadesi profili belirlenip , bu profil farklı hücre tipleri ve farklı çevre koşullarındaki gen ifadesi profilleriyle bu yöntemle karşılaştırılabilir.

Kısa sürede ve oldukça pratik olarak birkaç bin genin analizini yapmak mümkündür. Otomasyona dayalı bir sistem olduğu için insan kaynaklı hataların ortaya çıkma ihtimali oldukça düşüktür.

Microarray teknolojisinin dezavantajları

Microarray'lerin bilimin hizmetine sunulması büyük bir heyecan yaratmış olmasına rağmen bazı problemleri de beraberinde getirmiştir. Tüm deney düzeneği nükleik asit hibridizasyon yöntemine bağlıdır ve yüksek oranda benzerlik gösteren DNA dizileri problem yaratabilir. Bu nedenle mikroarray'den elde edilen veriler klasik gen ekspresyon analiz yöntemleriyle doğrulanmalıdır.

Ayrıca tüm microarray deneylerinin aynı hassasiyette olayışı ,ekspresyondaki küçük değişikliklerin analizde fark edilemeyecek boyutta olması ,birbirinden farklı çipler kullanılarak yapılan deneylerin birbiriyle karşılaştırılmasında yaşanan zorluklar, optimizasyon ve standardizasyon sorunları ve herhangi bir deneyden elde edilen sonuçları her yönüyle değerlendirebilecek biyoinformatik programların henüz geliştirilememiş olması karşılaşılan sorunlardan birkaçıdır. Bu tür sorunları çözebilmek için Microarray Gene Expression Data Society gibi bazı yeni kuruluşlar oluşturulmaktadır. Bunun yanı sıra microarray çalışmalarıyla elde edilen sonuçların geçerliliği, tekrarlanabilirliği ve günlük hayatta uygulanabilirliği konusunda çalışmalar hızla devam etmektedir.

Kaynaklar

1. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science. Oct 20; 270 (5235): 467-70.
2. <http://www.gene-chips.com/>
3. <http://www.affymetrix.com/>
4. <http://www.bio.davidson.edu/Courses/genomics/chip/chip.html>
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>
6. <http://genome-www5.stanford.edu/>
7. <http://www.microarraystation.com/>