

DNA CHIP TEKNOLOJİSİ VE MİKOLOJİDE UYGULAMA ALANLARI

Mehmet Ali SARAÇLI

Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Mikoloji Bilim Dalı, Ankara, (masaracli@gata.edu.tr)

Mikroarray nedir?

Genellikle cam, naylon membran veya silikon yapıdaki katı yüzeyler üzerinde minyatürize alanlara yerleştirilmiş milyonlarca birbirine denk tek iplikli DNA parçacıkları (prob), antikor veya epitopik belirteçler aracılığıyla bir genomda depolanmış olan bilgilerin hibridizasyon gibi özgün kimyasal bağlanma temeline dayanan bir prensiple incelenmesi tekniğidir. Uygulanan yöntem ve amaç farklılıkları olmakla birlikte, "microchip", "DNA chip" ve "DNA array" gibi tanımlamalar da benzer uygulamaları ifade etmek için kullanılırlar. Bununla birlikte, *insitu* oligonükleotit sentezi tekniği ile üretilmiş olan yüksek yoğunluklu mikroarray platformları çip olarak ifade edilirken, "DNA array" terimi özellikle cam lamlar üzerinde hazırlanan daha küçük kapasiteli platformlar için tercih edilir. Genel olarak mikroarray teknolojisinin en önemli özelliği, küçük bir alanda çok sayıda genomik incelemenin yapılmasına olanak sağlamasıdır. Bu tekniğin en heyecan verici yanı ise, yakın bir gelecekte küçük bir okuyucu cihaz aracılığı ile hasta başında çok sayıda hastalık/etken arasında ayırıcı tanı yapılmasına veya tedavi sonucunun değerlendirilebilmesine olanak sağlayacak olmasıdır (1, 2).

Mikroarray yönteminin kullanım amaçları nelerdir?

Mikroarray yöntemi temel olarak iki hedefe yönelik olarak uygulanmaktadır

- 1) Gen ekspresyon düzeyinin ve düzey farklılıklarının ölçülmesi. Mikrobiyolojik açıdan bakıldığında; besiyeri bileşimi ve sıcaklık gibi çeşitli çevresel faktörlerin gen ekspresyonu üzerine olan etkilerinin belirlenmesi, virülan ve avirülan suşlar arasında eksprese edilen/ edilmeyen genler açısından farklılıkların ortaya konması, antibiyotik direnç mekanizmalarının aydınlatılmasında farklı genlerin ekspresyon düzeylerinde artma ya da azalma şeklinde ortaya çıkan değişikliklerin gösterilmesi gibi uygulamalar dikkati çekmektedir.
- 2) Genom baz dizisinin ve genomlar arası dizi farklılıklarının ortaya konması. Bu uygulama alanının da iki farklı açılımı vardır:
 - a. "Tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotid polymorphism)" gibi teknikler ile mutasyon analizleri. Bu amacı gerçekleştirmek için, bir gende olabilecek tüm farklı mutasyon ihtimalleri tek bir çip üzerinde test edilir.
 - b. Bazı önemli gen bölgelerindeki baz dizilerinin "resequencing" olarak adlandırılan bir teknikle çok kısa bir süre içerisinde yeniden dizinlenmesidir (2).

Standart bir mikroarray deneyinin basamakları nelerdir?

Tipik bir genomik mikroarray çalışmasının beş temel basamağı vardır

1. Hedef DNA/cDNA dizilerine komplementer diziler içeren oligonükleotitler yani problemlerin immobilize edildiği mikroarray platformunun hazırlanması veya ticari olarak temin edilmesi
2. İncelenecek numuneden floresan ile işaretlenmiş cDNA/DNA/cRNA'nın hazırlanması
3. İşaretlenmiş cDNA/DNA/cRNA ile mikroarray platformunun hibridizasyon solüsyonu içerisinde karşılaştırılması

4. Yıkama sonrasında platform yüzeyinde hibridizasyonun varlığının lazer teknolojisi kullanan bir tarayıcı veya okuyucu aracılığıyla analiz edilmesi ve görüntünün bir bilgisayarda depolanması
5. Depolanan görüntünün bir yazılım aracılığıyla değerlendirilmesi ile mikroarray platformu üzerindeki hangi noktalarda hibridizasyon olup olmadığının ve niceliksel olarak düzeyinin (koyu mavi-yeşil-sarı-kırmızı renk yelpazesinde) değerlendirilmesi ve yorumlanması.

Postgenomik mikroarray analizlerinin genomik olanlardan tek farkı, nükleik asitler arasında test edilen hibridizasyon reaksiyonu yerine, benzer incelemenin antikorlar ile özgün epitopik determinantlar arasında gerçekleştiriliyor olmasıdır (1).

Mikroarray üretim teknikleri

Mikroarray platformları temelde üç ana yöntemle üretilirler. Fotolitografik maskeleme olarak ifade edilen birinci yöntemde oligonükleotid prob sentezi doğrudan mikroarray yüzeyinde önceden tasarlanmış noktalarda insitu olarak gerçekleştirilir. Diğer iki yöntemde ise oligonükleotid problemler başka bir yerde önceden sentezlendikten sonra mikroarray yüzeyindeki tasarlanmış mikroskobik noktalara bağlanırlar. Birbirine benzeyen bu iki yöntemde ise problemlerin yüzeye bağlanması ya küçük uç açıklığı bulunan enjektörlerle püskürtme tekniği kullanılarak (inkjet teknolojisi) ya da platform yüzeyine temas eden kanalcıklar aracılığıyla gerçekleştirilebilir (1). Bu üç ana yöntem dışında farklı teknolojiler de geliştirilmektedir. Ancak, tüm yöntemler hibridizasyon esasına göre çalışmaktadırlar.

1) Fotolitografik maskeleme yöntemi

İlk kez 1991 yılında Stephen Fodor ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve daha sonra Affimetrix firması tarafından ticari olarak sunulmuş bu yöntemde oligonükleotid sentezi insitu olarak cam yüzey üzerinde gerçekleştirilmektedir. Önce mikroarray hazırlanacak olan ve genellikle camdan üretilmiş malzemenin ters yüzü polimide ile kaplanır. Polimide, okuma işlemi sırasında oluşabilecek ve hatalı okumaya neden olacak zemin yansımalarını önler. Daha sonra, ilk nükleotidin bağlanması ile başlayacak ve diğer nükleotidlerin eklenmesi ile sürece geçileceği yüzey silan ile kaplanır. Silan molekülleri kendi aralarında oluşan çapraz bağlar sayesinde üzerinde sentezlenecek olan ve genellikle 25 nükleotitten oluşan oligo zincirinin (prob) yüzeyde sağlam bir şekilde tutunmuş olarak kalmasını sağlar. Daha sonra yüzeydeki tüm hidroksil uçlar ışıktan korunmuş ve nükleotid bağlanmasına izin vermeyen bir molekül (linker) ile kapatılır. Bu molekül, özgün noktalarda açıklıkları olan bir maske üzerinde UV ışığına maruz bırakılarak sadece bu açıklık bölgelerindeki ışığa hassas engel ortadan kaldırılır ve eklenen nükleotidin bağlanması gerçekleştirilir. Eklenen nükleotid hem apikalinde ışığa hassas olan ve nükleotid bağlanmasına izin vermeyen bir engele sahiptir, hem de fosfatlanmış halde olduğundan dolayı yan zincir oluşumuna izin vermez. İkinci kez maskeleme işlemine geçildiğinde ise platform bu sefer farklı bölgelerde açıklıkları olan maske üzerinden UV ışığına maruz bırakılır. Böylece korunması kaldırılan bölgelere farklı bir nükleotid eklenerek zincir uzaması sürdürülür. Herhangi bir nükleotidin yanlışlıkla eklenmemesi durumunda, hatalı baz dizisine sahip bir oligonun (proben) üretilmesini önlemek için her ara basamakta açık kalan uçlar bir ajanla kapatılarak sadece o oligo zinciri için sentez durdurulur. Ancak bu engelleme, her bir noktada aynı oligonun milyonlarca kopyası sentezlenmekte olduğundan bir eksiklik nedeni oluşturmaz. Fotolitografik maskeleme yönteminin en önemli avantajları hız, özgüllük ve tekrarlanabilirliktir. Buna karşın önemli dezavantajları ise nispeten daha yüksek olan maliyeti ve profillerinin daha az elastiki olmasıdır (3).

2) Yüzey temaslı spotlama yöntemi

İlk kez Patricia Brown ve arkadaşları tarafından Stanford üniversitesinde 1995 yılında tanımlanmış bir tekniktir. Önceden hazırlanmış oligonükleotid problemler, kimyasal olarak değiştirilmiş

cam yüzeyler üzerinde tasarlanmış noktalara kusursuz bir şekilde kontrol edilen robotik kolların ucundaki mikro kanallar aracılığıyla veya daha küçük kapasiteli platformlarda manuel olarak temas ettirilir. Cam yüzeyler poly (L-lysine) ve benzeri kimyasallarla değişikliğe uğrattılır ve DNA molekülünün kovalent veya kovalent olmayan bir şekilde yüzeye tutturulması sağlanmış olur. Yöntem fotolitografik tekniğe göre daha elastiki ve ekonomiktir. Bununla birlikte, dezavantajları ise ön hazırlık aşamasında gerekli olan yoğun emek ve spotlama cihazlarının kapasitelerinde artışa paralel olarak yükselen maliyetidir (2).

3) Püskürtme yöntemi

Bu yöntemde de önceden hazırlanmış oligonükleotit prob lar, kimyasal olarak değiştirilmiş cam yüzeyler üzerinde tasarlanmış noktalara robotik kollar aracılığı ile yerleştirilirler. Ancak, yüzey temaslı spotlama yönteminden tek farkı prob lar tutturulacağı cam yüzeye "inkjet" adı verilen bir teknikle temas etmeksizin ince bir uçtan püskürtülür. Böylece üretim serileri arasında farklılıklar göstermeyen ve tek tip noktalama sağlayan yüksek kaliteli mikroarray-lerin üretilmesi sağlanmış olur (4).

Bazı önemli ticari mikroarray sistemleri

1) Affymetrix GeneChip® Microarray Technology: Affimetrix firması tarafından uygulamaya sokulmuş bir yöntemdir. Bu teknolojinin uygulama alanına girdiği 1994 yılında her bir hibridizasyon noktası 100 x 100 mikron boyutlarında iken, 2005 yılında 5 x 5 mikron boyuta inilmiş, böylece yaklaşık olarak 1.28 cm x 1.28 cm boyutlarındaki bir yüzey alanı içerisinde yaklaşık 400 kat daha fazla sayıda deney (yaklaşık 6.5 milyon farklı noktada hibridizasyon aracılığıyla 500 bine ulaşan deney) gerçekleştirilebilmiştir. Her bir noktada birbiri ile denk milyonlarca prob bir arada bulunmaktadır. Problar genellikle 25 nükleotit uzunluğundadır ve özgün DNA veya RNA dizisini yakalamak için tasarlanmıştır. 25 nükleotitlik prob uzunluğu yeterli düzeyde özgünlük sağlarken, duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği arttırmak amacıyla ekspresyon çalışmalarında 22, genotiplendirme çalışmalarında ise 40 prob aynı anda farklı noktalarda test edilir. Spesifik olmayan bağlanmalardan oluşabilecek yanlış pozitif değerlendirmeleri engellemek amacıyla bazı problemlerin orta kısmında bilerek uygunsuz bölgeler tasarlanır. RNA mikroarray çalışmalarında, RNA molekülü dış ortam şartlarına dayanıksız olduğundan önce reverse transkripsiyonla cDNA'ya çevirilir. Daha sonra *invitro* transkripsiyonla yeniden RNA (cRNA) oluşturulur. Ancak bu sırada ortama konulan urasil nükleotitler biyotinlenmiştir. Elde edilen biyotinlenmiş cRNA hibridizasyon öncesi daha küçük parçalara ayrıldıktan sonra hibridizasyon fırınında özgün prob ile hibridize edilir. Yıkama sonrasında ortama konan floresan boyalar biyotin molekülüne bağlanırlar. Lazer okuyucular ile taranan çip hibridizasyon oluşumunun varlığı açısından değerlendirilir (5).

2) NanoChip® Electronic Microarray: Nanogen firması tarafından geliştirilmiş bu sistemde, özgün DNA/RNA dizisinin mikroarray platformu üzerinde bağlanacakları ve kendileri için önceden tasarlanmış streptavidinle kaplanmış noktalara pozitif elektrik akımı uygulanır. Böylece negatif yüklü ve biyotinlenmiş olan DNA/RNA molekülleri daha hızlı ve yönlendirilmiş bir şekilde streptavidin kaplanmış bu noktalara göç ederler. Prob veya örneklerin özgün noktalara bağlanmasını takiben uygulanan potansiyel farkı kaldırılarak kırmızı/yeşil floresan boya ile işaretlenmiş test materyali/prob reaksiyona sokulur. Özgün bağlanmanın gerçekleşip gerçekleşmediği lazer okuyucular ile değerlendirilir. Eğer bütün noktalar aynı deneyde kullanılmamışsa platform yıkanarak tüm noktalar bitene kadar tekrar tekrar kullanılabilir (6).

3) Agilent Technologies: Agilent Technologies tarafından geliştirilmiş yöntemde, cam mikroarray platformu üretiminde püskürtme (inkjet) teknolojisi ile üretilmiş mikroarray formatı kullanılmaktadır. Ekspresyon analizlerinde incelenecek örnekteki mRNA, öncelikle T7

RNA polimeraz kullanılarak cDNA'ya çevrilir. Daha sonra aynı enzimin farklı aktiviteleri aracılığı ile cDNA'dan sırasıyla çift iplikli DNA ve en sonunda Cy3-CTP veya Cy5-CTP varlığında da işaretlenmiş cRNA elde edilir. Elde edilen işaretli cRNA mikroarray platformu üzerindeki özgün problemler ile hibridizasyona sokulur. Hibridizasyonun varlığı tarayıcılar ile araştırılır (7).

4) Illumina Bead Array Technology: Tuft üniversitesinde (ABD) Prof. David Walt ve arkadaşları tarafından ilk kez tasarlanan Bead Array sistemi Illumina Inc. tarafından geliştirilerek kullanıma sunulmuştur. Sistem 25 nükleotitten oluşan özgün nükleotit dizileri (prob) ile kaplanmış olan 3 mikrometre çapındaki silika küreciklerin (bead) fiberoptik lif ucunda asit aşındırması yolu ile oluşturulmuş yuvalara rastgele yerleştirilmesi esasına dayanır. Fiberoptik lifin diğer ucu floresans esaslı bir okuyucuya bağlanır. Yaklaşık olarak 50 bin fiberoptik lifin birleştirilmesinden doğan demetin çapı ise 1.4 mm kadardır. Toplam 96 demet (8x12) ise bir platformu oluştururlar. Güvenilirliği arttırmak için her bir özgün dizinin (veya küreciğin) aynı demet üzerinde 20-30 kez test edilmesi durumunda 50 bin lif içeren bir demetle 1600 civarında farklı hibridizasyon deneyinin 1.4 mm'lik bir çap içerisinde test edilmesi mümkün olmaktadır. Tekniğin en önemli basamağı rastgele yerleştirilmiş olan küreciklerin, dolayısı ile problemlerin hangi noktalarda yerleştiğinin belirlenmesidir. "Decoding" olarak adlandırılan bu işlem farklı floresan boya kombinasyonlarının kullanıldığı sekiz ardışık hibridizasyon/dehibridizasyon basamakları aracılığı ile gerçekleştirilir. Testin değerlendirilmesi fiberoptik liflerden gönderilen UV ışığı ile uyarım ve açığa çıkan floresansın saptanması ile gerçekleşir. Okuma FAM ve Cy3 renk kanallarından gerçekleştirilir. Her bir platformun organizasyonu barkodlu olarak çip üzerinde kayıtlıdır. Sistemin kurulum maliyeti 2007 itibari ile vergiler hariç 320 bin USD' dir (8).

Mikroarray teknolojisinin mikolojide uygulama alanları

Mikroarray teknolojisinin uygulama alanları mikrobiyolojik disiplinler arasında benzerlikler göstermektedir. Temel uygulama alanlarını üç ana başlık altında özetleyebiliriz:

1. Gen ekspresyon profilinin ortaya konması yoluyla patogenez, hücre biyolojisi ve antifungal direnç mekanizmalarının incelenmesi (9).
2. Patojen mantarların cins/tür düzeyinde tanımlanması (10).
3. Mikozlar sırasında konakta ortaya çıkan yanıtın değerlendirilmesi (11).

Kaynaklar

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html> (Erişim tarihi: Mart 2007)
2. <http://www.lshrm.ac.uk/itd/grf/microarrayoverview.htm> (Erişim tarihi: Mart 2007)
3. http://www.affymetrix.com/corporate/outreach/lesson_plan/downloads/manufacturing_teacher_notes.pdf (Erişim tarihi: Mart 2007)
4. <http://www.chem.agilent.com/cfusion/faq/faq2.cfm?subsection=39§ion=6&faq=685&lang=en> (Erişim tarihi: Mart 2007)
5. http://www.affymetrix.com/corporate/outreach/lesson_plan/downloads/chip_function_teacher_notes.pdf (Erişim tarihi: Mart 2007)
6. <http://www.nanogen.com/technologies/microarray/> (Erişim tarihi: Mart 2007)
7. <http://www.chem.agilent.com/cfusion/faq/faq.cfm?section=6&subsection=0&lang=en> (Erişim tarihi: Mart 2007)
8. Gunderson KL, Kruglyak S, Graige MS, et al. Decoding randomly ordered DNA arrays. *Genome Res* 2004; 14: 870-877.
9. Garaizar J, Brena S, Bikandi J, Rementeria A, Ponton J. Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 2006; 6:987-998.
10. Huang A, Li JW, Shen ZQ, Wang XW, Jin M. High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3299-3305.
11. Shiraki Y, Ishibashi Y, Hiruma M, Nishikawa A, Ikeda S. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *J Med Microbiol* 2006; 55 (Pt 9):1175-1185.