

Göğüs Hastalıklarında Araştırmalara Genetik Yaklaşım: Genetik Yöntemler

A Genetic Approach to Pulmonary Disease Research: Genetic Techniques

Ayşe Gül Zamani

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

Özet
Abstract

Son yıllarda ülkemizde ve dünyada en hızlı gelişmekte olan bilim dallarından birisi genetikdir. Nisan 2004'te Watson ve Crick'in DNA'nın yapısını aydınlatmasının 50. yılı kutlandı. İnsan genom projesi (HUGO) 2003 yılında tamamlandı. Genom diziliminin açığa çıkması hastalıkların patogenezi ve prognozunu aydınlatmak için bir veri tabanı oluşturdu. Moleküler teknolojideki hızlı ilerleyiş bir çok yöntemin birden kullanılmasını sağladı. Bu nedenle laboratuvar çalışmaları gerektiren genetik araştırmalar planlanırken doğru genetik yöntemlerin seçilmesi gerekir. Bu makalede göğüs hastalıklarında yapılması planlanan genetik araştırmalarda kullanılabilecek genetik yöntemler gözden geçirilmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Genetik, sitogenetik, moleküler genetik teknikler

In recent years, genetics has become the most rapidly developing science in Turkey, as well as the world. The 50th anniversary of the lightening of the structure of DNA by Watson and Crick was celebrated in April 2004. The Human Genome Project (HUGO) was completed in 2003. Publication of the sequence of the human genome created a database that has helped to elucidate the pathogenesis and prognosis of diseases. Moreover, rapid progress in molecular technology has led to many methods being used at the same time. As a result, while planning to perform genetic research, which requires laboratory studies, in clinical settings, genetic methods should be chosen correctly. In this article, genetic methods that can be used while genetic research is planned in chest diseases are reviewed.

KEY WORDS: Genetics, cytogenetics, molecular genetic techniques

İnsan genom projesinin tamamlanması ile genomun yapısı hakkındaki bilgilerimiz, genomu analiz etme ve bu bilgileri kullanma kapasitemiz giderek artmaktadır. Genomda mutasyonların görülme aralığı tek nükleotid değişikliklerinden, tüm kromozom değişikliklerine uzanır. Mikroskopik ve submikroskopik olarak ortaya çıkan genomik dengesizliği farklı duyarlılığı olan çeşitli metodlarla göstermek mümkündür (Şekil 1) [1]. Nokta mutasyonları Sanger dizi analizi metodu ile ortaya konmaktadır. Kromozomal anöplodiler ve büyük yeniden düzenlenmeler klasik sitogenetik yöntemlerin ortaya koyduğu anomalilerdir. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) moleküler teknoloji ve sitogenetik tekniklerin birleştirilmesiyle klasik sitogenetik yöntemlerden daha detaylı bilgiye ulaşmamızı sağlar. Genlerin kopya sayılarındaki değişiklikleri saptamaya yönelik diğer teknikler ise moleküler genetik yöntemlerdir [1].

Klinik branşlarda genetik bir araştırma yapılmak istenildiğinde karşılaşılan ilk sorun yöntem seçiminde yaşanmaktadır. Genetik araştırmalara yönelik en uygun laboratuvar yönteminin seçilmesi, doğru örnekleme yapılması ve sonuçların yorumlanması gereklidir. Konuya pratik bir yaklaşım getirebilmek amacıyla, bu bölümde göğüs hastalıklarında yapılması planlanan genetik araştırmalarda kullanılabilecek genetik yöntemler gözden geçirilmiştir.

I. Kromozomal anomalilere yönelik değerlendirme sağlayan sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemler

Sitogenetik, genetik materyali hücresel düzeyde inceleyen bilim dalıdır. Kromozomların işlev ve morfolojileri mitotik/mayotik metafaz sürecinde değerlendirilir. Amaç, kromozomlar halinde paketlenmiş DNA'da meydana gelen yapısal (translokasyon, delesyon, insersiyon, inversiyon, duplikasyon vb.), sayısal (anöplodi, poliplodi vb.) değişiklikleri ve köken farklılıklarını (kimerizm, mozaizm, vb.) saptamak, elde edilen sonuçla fenotip ile genotip arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir [2,3].

Göğüs hastalıklarında tanı ve araştırma amaçlı kullanılabilecek başlıca sitogenetik ve moleküler sitogenetik teknikler şunlardır: sitogenetik bantlama yöntemleri (karyotipleme), FISH, spektral karyotipleme (SKY), karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (comparative genomic hybridization) (CGH).

1. Sitogenetik Bantlama yöntemleri:

Kromozomal evreye girmiş olan DNA metafazda iken hücre siklusu kimyasal ajanlar yardımıyla durdurulur ve kromozomlar elde edilir. Çeşitli boyalar kullanılarak yapılan farklı bantlama yöntemleri ile kromozomlar değerlendirilir.

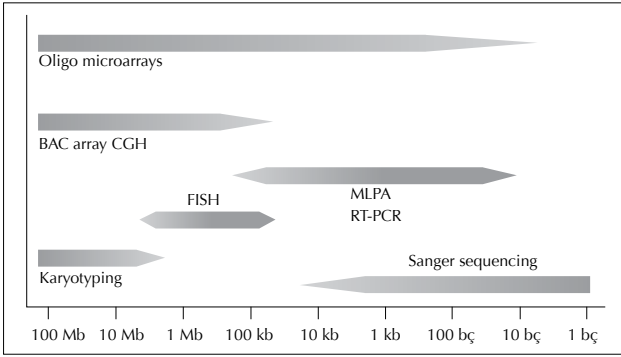
Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Ayşe Gül Zamani, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi,

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Konya, Türkiye Tel: +90 332 223 66 52 E-posta: agzamani@yahoo.com

©Telif Hakkı 2013 Türk Toraks Derneği - Makale metnine www.toraks.dergisi.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2013 by Turkish Thoracic Society - Available online at www.toraks.dergisi.org





Şekil 1. Çeşitli yöntemlerle saptanabilen genetik değişikliklerin boyutu (log scale). Genetik değişikliklerin boyutları megabaz (mb), kilobaz (kb), baz çifti (bç) olarak gösterilmiştir

*1 numaralı kaynaktan modifiye edilerek hazırlanmıştır

Karyotipleme için en çok kullanılan Giemsa bandlama (G bandlama) yöntemidir. Enine açık ve koyu bandlar elde edilir. G bandlama ile 400-700 arasında band değerlendirilir ve genom taranarak 10Mb boyutundaki değişiklikler tespit edilir. Hücreleri senkronize ederek, maksimum sayıda mitoz biriktirmek ve daha uzun bandlara sahip olan kromozomlar elde etmek amacıyla uygulanan HRB (high resolution banding, yüksek rezolüsyonlu bandlama) ile de kromozomlar daha detaylı olarak değerlendirilir. Diğer sık kullanılan bandlama teknikleri: Floresans bandlama (Q banding), Reverse bandlama (R-Banding), C-bandlama (C-Banding), NOR (nucleolar-organizing regions)-bandlama yöntemleridir [3-5]. Klasik bandlama yöntemleri oldukça basit ve uygulamada fiyatı uygun yöntemlerdir. Bu nedenle, in situ hibridizasyon yöntemleri uygulanmadan önce modern sitogenetik analizlerin temel çalışması olarak uygulanırlar.

2. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH)

FISH genomda istenilen hedef DNA bölgesinin floresan veren DNA problemleri ile boyanarak "in situ" olarak gözlenmesine imkan tanıyan moleküler sitogenetik bir yöntemdir. Yöntemin temelinde, hedeflenen DNA bölgesine komplementer florokromlarla (floresans veren moleküller) işaretlenmiş olan tek iplikçikli (oligonükleotid) DNA dizileri kullanılır. Bu florokromlarla işaretli DNA dizilerine "prob" denir. Morfolojik olarak korunmuş kromozom preparasyonlarına, fikse edilmiş hücrelere ya da doku kesitlerine uygulanabilmektedir. İnterfaz hücre çekirdeğinin ve metafaz kromozomlarının değerlendirilmesini sağlar [6,7].

Bu yöntemde ilk basamak FISH yönteminin uygulanacağı kromozomları veya interfaz hücrelerini elde etmektir. Kromozomlar akciğer hücre kültürlerinden, bronkoalveoler (BAL) sıvısından ve plevra sıvısından, interfaz hücreleri de yine BAL ve plevra sıvısı ve bronkoskopik fırçalama materyalinden elde edilmiş olabilir. Biyopsi materyali veya parafin bloklardan elde edilen hücreler de FISH için kullanılabilir [7].

Hedef kromozom ya da kromozom bölgesine ve amaca bağlı olarak kullanılan çeşitli problemler vardır:

a) Tüm Kromozom Boyama Problemleri (Whole Chromosome Painting Prob): kromozom ya da kromozom kollarının tanımlanması için kullanılan problemlerdir.

b) Sentromer Spesifik Problemler: sentromer yakınındaki alfa satelit bölgesine özgü problemlerdir.

c) Lokus Spesifik Problemler: delesyon ya da duplikasyonları, füzon genleri tespit etmek ve gen lokalizasyonunu belirlemek için kullanılan belli bir gen/lokus bölgesine özgü problemlerdir. Tümör genetiğinde sıklıkla kullanılırlar.

d) Telomerik Problemler: kromozomların terminal bölgelerini tanımlayan problemlerdir. Hücre yaşlanması (senescence), kromozomal yeniden düzenlenmeler ve delesyonların araştırılmasında kullanılır. Her kromozoma özgü telomerik prob bulunmaktadır [6,7].

Sayısal ve yapısal anomalilerin, mikrodelesyon sendromlarının, kriptik translokasyonların, marker kromozomların tanımlanmasında, tümör gelişiminde ortaya çıkan sitogenetik anomalilerin tanımlanmasında ve gen haritalamada kullanılan bir tekniktir [3,6,7].

3. Spektral Karyotipleme (SKY)

Tekniğin esası her biri 5 florokromun farklı kombinasyonlarıyla hazırlanmış 24 farklı kromozom boyama probu ile 24 kromozomun eş zamanlı hibridizasyonu ve tek bir filtreye sahip floresans mikroskobu ile analizine dayanır. Otuz bir farklı hedefi ayırt edebilmek mümkündür. Eş zamanlı olarak bir metafaz plağında yer alan tüm kromozomların farklı renklerde görüntülenmesine imkan tanır. Işınım emisyonlarının ölçülmesi hibridizasyonun değerlendirilmesine olanak sağlar. Kromozomlar kendine ait farklı karakteristik bir dalga boyunda veya floresansta izlenir. SKY ile 1,5 Mb'nin altındaki parça değişimleri bile saptanabilir [3,8]. Kansere neden olan genomik değişikliklerin standart bandlama yöntemlerinden daha iyi anlaşılmasını sağlar. Yeniden düzenlenmeler kolaylıkla tanımlanır. İlişkili kromozomlar saptanır. Bandlama tekniklerine üstünlüğü, çok küçük boyutlardaki anomalilerin daha kolay tanınabilmesine olanak vermesidir [9].

4. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (comparative genomic hybridization) (CGH):

FISH'de dahil olmak üzere klasik sitogenetik yöntemlerin, kanser sitogenetiğinde karşılaşılan yapısal anomalileri doğru olarak tanımlamada yetersiz kalması yeni yöntem arayışlarını beraberinde getirdi. Sitogenetik ve moleküler genetik tekniklerin birlikte kullanıldığı CGH bu sorunun çözülmesini sağladı. Kallioniemi ve ark. tarafından uygulamaya sokulan bu teknikte esas amaç DNA kopya sayısındaki artışı veya eksilmeleri ortaya koymaktır [10,11].

Yöntem, iki farklı florokrom ile işaretlenmiş kontrol ve test DNA'larının anomali içermeyen normal metafaz plağı üzerinde hibridize edilmesi esasına dayanır. Bu iki florokromun yoğunluğunun oranı sağlıklı hücre ile değerlendirilen hücrenin kopya sayısı farklılıklarını gösterir. Genomdaki dengesiz materyalin daha ayrıntılı ve doğru analizi ve özellikle dengeli görünen bir genomda yer alan belirgin olmayan sapmaları göstermek için kullanılır. Ayrıca gen amplifikasyonunun kromozomal lokalizasyonunun saptanması amacıyla da kullanılır. Yöntem ile hasta DNA'sındaki kromozomal kayıp (loss) veya belli bir bölgenin amplifikasyonu (gain) gösterilir. Metaplazik değişiklikler de saptanır [12]. Duyarlılığı metafaz kromozomunun çözünürlüğü ile sınırlıdır. Bu yöntem mikroarray teknolojisini geliştirmesini sağlayan temel yöntem olmuştur. Mikroarray teknolojisinden daha sonra bahsedilecektir.

II. DNA düzeyindeki anomalilerin değerlendirilmesini sağlayan moleküler genetik yöntemler (mutasyon ve polimorfizm)

Restriksiyon enzimlerin kullanıma girmesi pek çok canlının genomunun araştırılabilmesini sağlayan teknolojik ve metodolojik uygulama araçlarını günlük uygulamaya sokmuştur. İnsan Genom Projesi (HUGO) kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda, insan genomunun yaklaşık olarak 33000 gene sahip olduğu anlaşılmış ve bunların büyük çoğunluğunun özellikleri belirlenmiştir. Günümüzde klinikte konulan hastalık tanıları, moleküler tanı ile desteklenmektedir [13-15]. Ayrıca, ilaç etkinliğinde genotip-fenotip ilişkisi giderek önem kazanmakta ve kullanılan ilaçlardan en az zararlı, en etkin şekilde yararlanma olanakları araştırılmaktadır. Aşağıda genetik araştırmalarda kullanılan temel moleküler genetik yöntemlerden bahsedilecektir.

1. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction) (PZR)

Hücre içinde doğal olarak gerçekleşen DNA replikasyonunun tüp içinde taklit edilmesiyle istenilen bir bölgenin çok fazla sayıda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir [16]. Yaklaşık 30 jenerasyon (siklus) sonra seçilmiş bir DNA dizisinin aşağı yukarı bir milyar katını kopyalar [17]. Çok az miktardaki örnekten spesifik bir gen bölgesini çoğaltmak, tanıya yönelik incelemeler ve araştırma yapmak için yeterli genetik materyal sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Primerlerden biri hedef bölgenin 5'→3' yönündeki zincirinin, diğeri 3'→5' yönündeki zincirinin başlangıç bölgesine komplementerdir [6,18]. Ortamda çoğaltılacak olan kalıp DNA örneği, çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucunda yer alan DNA dizilerini özgül olarak tanıyıp bağlanacak primerler, bu primerlere bağlanıp sentez yapacak olan ısıya dayanıklı "Taq" polimeraz enzimi, sentez işlemine kullanılacak deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP'ler; dATP, dTTP, dGTP, dCTP), gerekli pH ve iyon (Mg^{+2}) koşullarını sağlayan tampon karışımı bulunmalıdır (Şekil 2) [19].

PZR ile DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (primer hibridizasyonu, annealing), enzimatik DNA sentezi (polimerizasyon, uzama) döngüsünün 25-40 kere tekrarlanması sonucu tek bir DNA fragmanı 2^n sayıda çoğaltılır (n =döngü sayısı). Her döngü basamağı farklı ısılarda gerçekleşir; sırasıyla birinci basamak 94°C-98°C; ikinci basamak 37°C-65°C; üçüncü basamak 72°C. Bütün işlem 1-2 saat içerisinde tamamlanır (Şekil 2) [19].

İlgili DNA bölgesi PZR ile çoğaltıldıktan sonra bu bölgedeki mutasyonlar değişik metodlar ile analiz edilebilir: PZR ürünlerinin agaroz veya poliakrilamid jel ile analizi, PZR/RFLP, SSCP (single strand conformational polymorphism), ARMS (amplification refractory mutation system), DNA dizi analizi, microarray analizi vb. [6,18]. PZR tekniği moleküler araştırmalarda bir ön işlem halini almaktadır. PZR'nin kullanım alanları şunlardır; onkogenез araştırmaları, prob oluşturulması/klonlama/gen ekspresyon araştırmaları, DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulması, bilinmeyen dizilerin tayini, RFLP (restriction fragment length polymorphism) analizi, DNA protein interaksiyonunun araştırılması (footprinting), kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı (mutasyon analizi), prenatal tanı, klinik örneklerde patojen organizmaların saptanması, adli tıp (DNA

parmak izi araştırması vb.), tarihsel değeri olan DNA'nın incelenmesi, *in vitro* fertilizasyon yapılan tek hücrede pre-implantasyon tanısı [19].

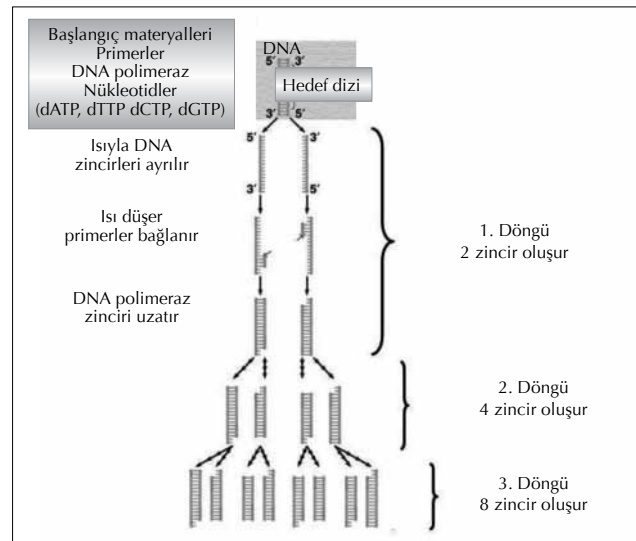
2. Gerçek zamanlı PZR (real-time quantitative PCR)

Bu yöntemle klasik PZR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PZR'de reaksiyon esnasında oluşan ürün miktarı kendisi ile eşdeğer olarak artan floresans boyası ve probun oluştuğu sinyal ile birlikte izlenir. Üzerinde çalışılan örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısındaki artışı sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme (gen ekspresyonu) en çok kullanıldığı alanlardır [20,21]. Bunun yanı sıra, nokta mutasyonlarının belirlenmesinde, DNA hasarının ölçümünde, "single nucleotide polymorphisms" (SNP) analizlerinde, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanılmaktadır [20,21].

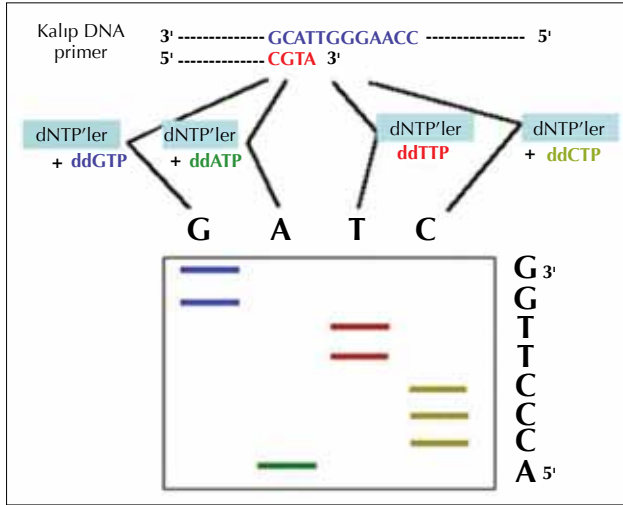
Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltılmasında kullanılan "SYBR-Green I" yöntemi basit olan ama çok iyi işleyen bir metottur [21]. Yalnız "SYBR-Green I" reaksiyonu ortamında herhangi bir çift zincirli DNA bulunduğu floresan ışığı yapabilir. Bunun sebebi primer-dimer oluşumu da olabilir. Bundan başka çoğaltılmak istenen DNA parçası özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında güvenilir bir şekilde kullanılan floresan işaretli problemlerle uygulanan teknikler mevcuttur. Bu tekniklerde kullanılan problemler; hidroliz probu (TaqMan" prob), moleküler boncuk probu (Molecular beacon), "Light-up" prob, hibridizasyon problemleri ve "Scorpion" primerlerdir [21].

3. Kesim fragmentleri uzunluk polimorfizmleri (Restriction fragment length polymorphisms (RFLP))

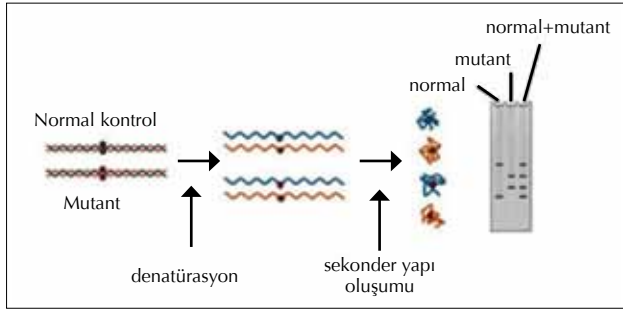
DNA kesim enzimleri belli dizilimleri özgül olarak tanıyıp keser. DNA'da ortaya çıkan dizilim değişimleri belli kesim enzimlerine ait yeni kesim bölgeleri ortaya çıkarır ya da daha önceden var olan kesim bölgeleri kaybolur. Araştırılan DNA belli enzimlerle kesilip jelde yürütüldükten sonra referans DNA'ya göre değerlendirilir. Elde edilen farklı fragment uzunlukları bize bilgi verir. Belirli kesim enzimlerinin kesme noktalarında ortaya çıkan değişimlerden oluşan RFLP'ler tek nükleotid polimorfizmi SNP olarak bilinir [6,13]. RFLP analizi mutasyonların ve polimorfizmlerin



Şekil 2. PZR amplifikasyonu için başlangıç materyali ve çoğaltım döngüleri



Şekil 3. Sanger zincir sonlandırma yöntemi ile sekans diziliminin sematize şekli



Şekil 4. SSCP yönteminin çalışma prensibi

araştırılmasında, genom haritalamasında kullanılan bir yöntemdir.

4. DNA Dizi Analizi (Sequencing)

Dizi analizi yöntemi rekombinan Taq polimerazların geliştirilmesiyle PZR ile yapılabilir hale gelmiştir. Otomatik dizi analiz sistemleri zincir sonlandırma yöntemi (Sanger yöntemi) esas alınarak geliştirilmiştir. Sanger dizi analizinde DNA polimerazı inhibe etmek için nükleotidlerin kimyasal analogları kullanılır. Bu analoglar dideoksinükleozidtrifosfatlar (ddNTP)'dir. Klasik dNTP'lerden deoksiriboz şekerin 3' karbonunda hidroksil grubu bulunmamasıyla ayrılırlar. Uzayan/sentezlenen DNA zincirine eklenen ddNTP'lerde 3' hidroksil grubunun olmaması nedeniyle, ardından gelen dNTP'lerle fosfodiester bağı oluşturamaz. Doğal olarak DNA zincirinin daha fazla uzaması imkansız hale gelir ve zincir sonlanır. Sonuçta sentez sonrası farklı uzunlukta DNA parçaları ortaya çıkar. Dört farklı enzimatik reaksiyonda, dört farklı ddNTP kullanılarak (A, C, G, T için) birer reaksiyon elde edilir. Ürünler poliakrilamid jel veya kapiller elektroforezde yürütülerek radyoizotop ya da floroforlar görüntülenir (Şekil 3). Reaksiyon sonrasında kapiller denilen ince borucuklara elektrokinetik enjeksiyon sistemiyle çalışan cihazlarda fragmanlar, kısıdan uzuna doğru ayrılırlar. Sonlandıkları noktada her bir fragmanda dört çeşit dideoksinükleozitten birine ait floresan boya bulunmaktadır. Kapillerden geçerken cihazın lazer sistemi floresan boyaları uyatarak, her birinin kendine özgü dalga boyunda ışımaya başlamasını sağlar. Cihaza entegre bir kamera sistemiyle bu ışınlar kaydedilir. Görüntü otomatik görüntüleme aletine

aktarılarak analiz edilir [6,18,19,22]. Hem normal hem de mutant genlerin analizi için kullanılır.

5. Tek zincir doğrulama polimorfizmi (SSCP; single strand conformational polymorphism)

Bilinen ve bilinmeyen mutasyonları taramada kullanılan bir yöntemdir. SSCP ile 150-200 nükleotidlik PZR ürünleri incelenebilir. Mutasyonu araştırılacak gen bölgesi amaca bağlı olarak intronları veya sadece eksonları içerecek şekilde PZR'de çoğaltıldıktan sonra denatüre edici özelliği olan poliakrilamid jelde elektroforez edilir. Bu elektroforez işlemi esnasında DNA tek iplikli forma geçer. Tek zincirli nükleik asitler baz kompozisyonuna bağlı olarak yeni sekonder bir yapı kazanır [23]. Tek bir nükleotid değişikliği bu yapıyı bozar. Mutasyonlu bölgenin elektrik yükü değişmiş olduğu için normal ve mutant iplikler jel ortamında farklı motilite gösterirler (Şekil 4). Jel "cybergreen" boyama ile boyanır. Otoradyogramda farklı bantların görülmesi ile mutasyon varlığı anlaşılır [18,23]. Bu testin mutasyon saptama duyarlılığı %80 civarındadır. Güvenilirliği az olan bir ön mutasyon tarama tekniğidir [6,18].

6. Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE; denature gradient gel electrophoresis)

DGGE ile en fazla 1000 baz çifti (bç) büyüklükteki DNA analiz edilebilir. Mutasyon taşıyan DNA parçasının erime sıcaklığı değişir. Normal ve mutant allellerin erime profilleri farklılık gösterir. Bu nedenle homodupleksler ve heterodupleksler denatüre edici jelde farklı göç ederler. Özel bir elektroforez aleti gerektirir. Elektroforez koşulları iyi optimize edildiğinde ve PZR primerlerinden oluşan dizilerin eklenmesiyle, hem "sense" hem de "antisense" dizilerde heteroduplekslerin oluşturulması sonucunda nokta mutasyonları %100'e yakın yüksek hassasiyetle saptanabilir [23].

7. ARMS (Amplified Refractory Mutation System)

PZR tabanlı bir mutasyon tarama yöntemidir. Dizilimi ve mutasyonu bilinen bir gen bölgesinin üç farklı primer ile (common/normal/mutant) amplifiye edildikten sonra elde edilen ürünler jel elektroforezinde kontrol edilir [18].

8. Mikrodizilim (Mikroarray) tekniği

DNA mikroarray; tek bir çip üzerinde tüm genomun DNA ve ekspresyon ürünlerinin (RNA ve protein) incelenmesi yöntemidir. Yöntem işaretlenerek sabitlenmiş tek zincir DNA molekülleri ile çalışır [23]. Moleküler biyolojik ve robotik tekniklerin bir arada kullanımı sonucunda, cam matriks üzerinde her biri spesifik bir geni temsil eden sentetik oligonükleotidler, cDNA'lar, BAC (bacterial artificial chromosome), PAC (P1-derived artificial chromosome) ve kozmitler, PZR ürünleri gibi binlerce DNA parçasının yapılandırılarak dizilmesi ile elde edilen çip'ler farklı renkte florokromlarla işaretlenmiş test ve referans DNA örnekleri içeren hibridizasyon solüsyonu ile hibridize edilir. Hibridizasyon sonrası florokromların tarayıcıdan elde edilen görüntüsü bilgisayar ortamına aktarılarak çeşitli biyoinformatik analiz programları ile değerlendirilir (Şekil 5) [23,24].

Tekniğin kullanım alanları; kanser araştırmaları (tümör sınıflandırması, risk ve prognoz belirlenmesi), gen ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin belirlenmesi, normal ve patolojik durumlarda gen ekspresyon farklılıklarının incelenmesi, DNA'daki mutasyon ve polimorfizmlerin (SNP analizleri) tespiti, ilaç geliştirme çalışmaları, genomik kazanım ve



Şekil 5. Mikroarray yöntemin aşamaları

kayıpların belirlenmesi, gen haritalaması çalışmaları, epigenetik modifikasyonlara yönelik çalışmalardır [13,19].

Sonuç olarak, teknoloji çok hızla gelişmekte ve ilerlemektedir. HUGO ile insanın tüm genomik dizilimi ortaya konmuştur. Yakın gelecekte, tek çipe indirilmiş bir inceleme yöntemiyle, bireylerin genetik hastalıklarının tanısı ve sağlık açısından taşıdıkları kişisel risklerin bilinmesi mümkün olacaktır. Bu durum araştırmalarda, tanı koymada ve tedavide yeni bir tıp anlayışının ortaya çıkacağına işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

- Shen J, Wu BL. Microarray-based genomic DNA profiling technologies in clinical molecular diagnostics. *Clin Chem* 2009;55:659-69. [CrossRef]
- Bozkurt G, Tabakçioğlu K. Psikiyatrik genetik araştırmalarda kullanılabilecek genetik yöntemler:III. Psikiyatri ve sitogenetik. *3P Dergisi* 2004;12:20-30.
- Wegner RD. Diagnostic cytogenetics. Berlin: Springer-Verlag; 1999.
- Verma SM, Babu A. Human chromosomes manual of basic techniques. New York: Pergamon Press; 1989.
- Zamani AG. Genetik tanı yöntemleri. İç:Toraks Derneği 10.Yıllık Kongresi, Kurs kitabı, Antalya 2007:143-61.
- Nussbaum LR, Malnes RR, Willard HF, Boerkoel CF. Thompson and Thompson. Tıbbi Genetik. 6. baskı, Ankara: Güneş Kitabevi; 2005.
- Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. The AGT cytogenetics laboratory manual. 3rd ed. Washington: Lippincott-Raven; 1997.
- Schröck E, Du Manoir S, Veldman T, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273:494-7. [CrossRef]
- Lee C, Gisselson D, Jin C, et al. Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am J Hum Genet* 2001;68:1043-7. [CrossRef]
- Kallioniemi A, Kallioniemi O, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818-21. [CrossRef]
- Özon YH. Komperatif genomik hibridizasyon tekniğinin prenatal tanıda uygulanması [Doktora Tezi]. Osmangazi Üniv. Tıp Fak., Tıbbi Genetik AD; Eskişehir, 2000.
- Bryndorf T, Kirchoff M, Rose H, et al. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet* 1995;57:1211-20.
- Pehlivan S. Tıpta moleküler genetik tanı. *Gaziantep Üniv Tıp Fak Derg* 2007;1:17-21.
- Zamani AG, Kutlu R, Durakbaşı-Dursun HG, et al. Y chromosome microdeletions in Turkish infertile men. *Ind J Hum Genet* 2006;12:66-71. [CrossRef]
- Zamani A, Zamani AG. Akciğer hastalıkları genetiği. *Sendrom* 1999;11:104-9.
- Mullis KB. The unusual origin of polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262:56-65. [CrossRef]
- Arı Ş. DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması. İç: Temizkan G, Arda N, ed. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008:101-20.
- Lüleyap HÜ. Moleküler genetiğin esasları. 1.baskı. Adana: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008.
- Akar N. Klinik moleküler patolojiye giriş. Ankara: Antıp AŞ Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar; 1999.
- Kubista M, Andrade JM, Bergtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125. [CrossRef]
- Günel T. Gen anlatımının kantitatif analizi "Real-Time PCR". *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007;27:763-7.
- Yürür Kutlay N, Tükün A. Akciğer hastalıklarına moleküler yaklaşım. İç: Zamani A, ed. Göğüs hastalıklarında tanı yöntemleri-III özel sayısı. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2006;2:81-8.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridisation: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20:399-407. [CrossRef]
- Yürter HE. Gen ekspresyon analizinde mikroarray teknolojisinin kullanımı. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi Özel Sayısı* 2002;41-7.