

Gen Anlatımı Analiz Yöntemlerine Genel Bakış

An Overview of Gene Expression Analysis Methods

Evrin Kömürcü - Bayrak, Nihan Erginel - Ünaltuna
Genetik AD, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.

ÖZET

Çeşitli doku veya hücre serilerinde gözlenen biyolojik ve fizyopatolojik durumlar gen anlatımındaki kalitatif ve kantitatif farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Gen anlatım analizlerinde kullanılan çeşitli yaklaşımlar ve teknikler mevcuttur. Bu yöntemler dizileme temelli, PZR temelli, hibridizasyon temelli ve kombine yöntemler olarak analizleri ile çok sayıda genin biyolojik ve patolojik olaylardaki transkripsiyonel yanıtları hızlı olarak araştırılabilmektedir. Karşılaştırmalı gen anlatım analizi yöntemleri arasında çıkartılmış hibridizasyon kütüphanesi yöntemi, araştırılan doku veya hücre hatlarında farklı olarak ifade edilen genlerin belirlenmesi ve izolasyonunda uygulanan güçlü yaklaşımlardan birisidir. Ancak, farklı anlatımlı genleri belirlemede her tekniğin çeşitli üstünlükleri veya sınırlılıkları mevcuttur. Sonuç olarak bu makalenin konusu, gen ekspresyon analizi yöntemleri ve tekniklerin birbirleri ile karşılaştırılmasıdır.

ABSTRACT

The biological and pathophysiological conditions in several tissues or cell lines cause qualitative and quantitative differences in gene expression. There are several approaches and techniques used in gene expression analysis. These techniques include sequencing-based, PCR-based, hybridization-based and combined techniques. Recent technological developments in large-scale expression analysis have made it possible to rapidly assess many genes for their transcriptional responses in biological and pathological events. Subtractive hybridization library (SHL) technique among comparative gene expression analysis is one of the powerful approaches for identifying and isolating genes that are differentially expressed in defined tissues or cell lines. However, each technique has various strengths and weaknesses for determination of differentially expressed genes. Finally, the gene expression analysis techniques and the comparison of these techniques with each other is the topic of this review.

Giriş

Yaşam bilimleri araştırmacılarının moleküler tanı, işlevsel genomik, ilaç hedefi keşfi ve farmakogenomik alanlarında başarıya ulaşmasında, aynı anda çok sayıda farklı ifade edilen genin analiz edilebilmesi önem taşımaktadır. Günümüzde, hücre ve dokularda ifade edilen genlerdeki farklılıkların anlaşılması için geliştirilmiş birçok farklı teknolojik platform mevcuttur. Araştırılan genlerin normal ile hastalıklı doku arasında ifade düzeylerinin karşılaştırılması, hastalık patogenezinin anlaşılmasına ilişkin önemli ipuçları vermektedir.

Sonuçta hastalık ile ilişkili gen ifade düzeylerindeki değişimlerin belirlenmesi, ileride yeni tedavi ve teşhislerin tanımlanmasına imkan verecektir.

Yüksek ökaryotlarda biyolojik gelişim, hücresel büyüme ve organogenez farklı gen anlatımları ile meydana gelmektedir. Son dönemdeki teknolojik ilerlemeler, biyolojik ve patolojik durumlarla ilgili transkripsiyonel cevaplardan sorumlu binlerce genin hızla değerlendirilmesine imkan vermektedir (1). İşlevsel genomik alanında yapılan çalışmalarda iki temel yaklaşım vardır. Birincisi, RNA düzeyinde yapılan çalışmalarda, gen anlatımı analiz yöntemleri kullanılmakta olup, ikinci olarak proteom araştırmalarında kullanılan kütle spektrometri ("mass spectrometry") dizilemesi, iki boyutlu jel elektroforezi ("Two-Dimensional Gel Electrophoresis") ve protein array gibi yöntemler kullanılmaktadır. RNA düzeyindeki gen anlatımı analiz yöntemleri genel olarak dört gruba ayrılabilir (Tablo 1) (2). Bu yöntemler, kodlanan proteinin fonksiyonu hakkında tek başına yeterli olmasa da, gen anlatım paternindeki

farklılıkların belirlenmesini sağlayarak biyolojik süreç hakkında bilgi verici olabilmektedir.

Tablo 1: Gen Anlatımı Analiz Yöntemleri

1-Dizileme Temelli Yöntemler

EST (“expressed sequence tags”) dizileme
SAGE (“serial analysis of gene expression”)
MPSS (“massively parallel signature sequencing”)

2-PZR temelli teknikler

Gerçek-zamanlı kantitatif PZR
DD (“Differential display”)

3-Hibridizasyon temelli teknikler

DNA mikroarray
Dot/Northern blot tekniği
Nükleaz koruma analizi
Ayrırcı plak hibridizasyonu
İn Situ Hibridizasyon

4- Hibridizasyon ve PZR kombinasyonundan oluşan teknikler

RDA (“Representational difference” analizi)
ESD (“Equalization of cDNAs, Subtractive hybridization and Differential display” yöntemlerinin baş harfleri)
SHL (“subtractive” hibridizasyon kütüphanesi)

Farklı gen anlatımlarının tanımlanmasında kullanılan yaklaşımlar geniş bir çeşitliliğe sahiptir.

1. Dizileme Temelli Yöntemler

1.1. EST (“expressed sequence tags”) Dizileme

Bu yaklaşımda, dokuya özgü gen anlatımının belirlenmesi amacıyla, dokuya ait tüm mRNA’lardan sentezlenen cDNA’lar (komplementer DNA) için oluşturulan kütüphanelerin dizileme analizi yapılmaktadır (3). Böylece tüm dizileme sonuçlarına bakılarak araştırılan dokuda hangi genin eksprese edildiği ve ne kadar sıklıkla bulunduğu belirlenebilmektedir. Geniş skalalı EST dizilemeleri ile, EST’lerin sıklığı transkriptin miktarını yansıtacak şekilde saptanabilmektedir. Çeşitli kuruluşlar tarafından yapılmış büyük cDNA dizileme projeleri sayesinde pek çok EST ve bunların gen anlatım seviyeleri belirlenmiştir (4, 5). Biyoinformatik analizlerde, EST’ler kullanılarak, çeşitli hastalıklarda artmış anlatımlı yeni genleri tanımlamak mümkün olabilmektedir. Ayrıca bir EST dizisi, dokuların veya hücrelerin patolojik dönemlerinde ve farklı gelişim dönemlerinde ilgili olduğu varsayılan genin anlatım profillerinin belirlenmesinde kullanılabilir. Örneğin bir çalışmada, kardiyak hipertrofi ile ilişkili olduğu düşünülen genlerin, normal ve hasta dokuda sıklıkla görülen EST’lerle benzerlikleri özel yazılımlar kullanılarak kıyaslanmıştır (6). Başka bir çalışmada da, kalbin anatomik özelliklerinin belirlenmesinde, kalp odacıkları ve septumda farklı eksprese edilen genlerin transkripsiyonel

profilleri karşılaştırmalı analizler ile incelenmiştir (7). Literatürde benzer yaklaşımın kullanıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır.

1.2. SAGE (“Serial Analysis of Gene Expression”)

Bu teknik, 1995 yılında Velculescu ve ark. tarafından transkript miktarını belirlemeyebilmek için geliştirilmiş DNA dizilemeye dayalı bir yöntemdir (8). Bir hücrede gen anlatımı olan her mRNA için oligonükleotid etiketleri (yaklaşık 10 baz boyunda) kullanılmakta ve bir seri işlemde sonra klonlanıp dizilenerek her bir ürün değerlendirilmektedir (9). Böylece her bir etiketli ürün bir mRNA’ya karşılık gelmekte ve etiketlerin sayısı da mRNA’nın miktarını vermektedir. Bu yöntem, dizisi bilinen genler için uygulanabilmektedir ve etiketlerin birbirleri ile benzeşmemesi önem taşımaktadır. İki farklı kaynaktan elde edilen gen anlatım verilerinin karşılaştırılmasına göre farklı eksprese edilen genlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. www.ncbi.nlm.nih.gov sitesinde GEO tarayıcısında çeşitli SAGE kütüphaneleri listelenmektedir. SAGE tekniğinin kullanımı ile ilgili çalışmalar çoğunlukla kanser üzerine olup CGAP (“Cancer Genome Anatomy Project”) web sayfasında veri arşivi bulunmaktadır. Ayrıca henüz bir veribankası mevcut olmasada pek çok kardiyovasküler biyolojide SAGE çalışması mevcuttur (9).

1.3. MPSS (“massively parallel signature sequencing”)

Büyük çaplı paralel işaret dizilemesi (MPSS; “massively parallel signature sequencing”) yöntemi, diğer boncuk-tabanlı işlemlerden tamamen farklı bir mikrobocuk teknolojisidir. Bu yöntemde diğerleri gibi bir doku veya hücredeki tüm genlerin anlatımı analiz edilmekte ve mRNA moleküllerinin sayısının tüm sayı içerisindeki oranına göre anlatım sıklığı belirlenmektedir. MPSS ile mRNA’ların sayımı bir örneğin her mRNA’sını belirleme esasına dayanmaktadır. Bunun için her mRNA’dan sentezlenen cDNA’da poli(A) kuyruğunun yukarı kısmında belirli bir enzim kesim bölgesi kullanılarak 17-20 bazlık diziler oluşturulur. Bu kısa diziler bir mRNA’nın belirlenmesinde işaret (etiket) olarak kullanılmaktadır. Böylece herhangi bir gen için anlatım seviyesi belirlenirken bu işaretlerin toplam sayısı hesaplanmaktadır. Bir örneğin mRNA’ları için MPSS işaretleri, Megaklon teknolojisi kullanılarak mikrobocuklar üzerine klonlanmış çift iplikli cDNA parçacıklarının dizilenmesi ile oluşturulmaktadır. MPSS işaret dizileri, mevcut genomik diziler ve EST databankalarındaki veriler ile karşılaştırılarak bilinen genlerin dizileri ile birleştirilmektedir (10, 11).

2. PZR Temelli Yöntemler

2.1. Gerçek Zamanlı-Kantitatif PZR (“RT-QPCR”)

Gerçek zamanlı kantitatif PZR ile ilgili ilk çalışma 1993 yılında Higuchi ve ark. tarafından yapılmıştır (12) ve günümüze kadar hızla çeşitlenerek gelişmiştir (13).

Bu yöntemde, mRNA’dan ters transkripsiyon ile elde edilen cDNA, florokromlu bir prob varlığında araştırılan gene özgü primerler kullanılarak PZR ile amplifiye edilmekte ve

oluşan sinyal PZR işlemi esnasında ölçülmektedir. Bu yöntemde çeşitli örneklerden izole edilen RNA'ların tam olarak karşılaştırılabilmesi için, test probunun floresansı referans proba (18S rRNA, GAPDH vb.) karşı normalizasyonu yapılmaktadır. RT-QPCR ile ilgili çok çeşitli problemler (TaqMan problemleri, SYBR Green I vb.) ve cihaz sistemleri (ABI7900, Lightcycler, ICycler vb.) mevcut olup genel uygulamalarında mRNA anlatım çalışmaları haricinde, DNA kopya sayısının ölçümünde, allelik ayırımında, mikroarray verilerinin doğrulanmasında da kullanılmaktadır (14). RT-QPCR'ın sonuçları rölatif ve standart-eğri kantitasyonu olarak adlandırılan iki analitik yöntem ile analiz edilmektedir. Ancak analizinde, önemli sınırlamalar ve potansiyel güçlükler olabilmektedir (13, 14). Bu yöntemin önemli avantajları da bulunmaktadır. Hassas bir yöntemdir (<5 kopya), geniş bir dinamik aralığın üzerinde (7-8 log10) kantitasyonu sağlar ve yüksek doğruluğa (<2 standart sapma) sahiptir. Ayrıca, az miktardaki total RNA'dan iyi sonuçlar elde edilebilmekte ve PZR sonrası ek işlemlere gerek duyulmamaktadır (1, 15). Ticari olarak otomatize cihazlar kullanılabilmesine rağmen, bu yöntem araştırılan gen açısından sınırlı bir kapasiteye sahiptir. Deney başına bir kaç düzineden fazla uygulanmasına uygun değildir. Ancak RT-QPCR, gen anlatımlarının mikroarray analizleri ile bütünleştirilebilir. RT-QPCR, çok sayıdaki RNA örneğinde birkaç prob kullanılarak uygulanabilirken mikroarrayler, az sayıdaki RNA örneğinde çok sayıda prob kullanılarak uygulanmaktadır (1).

2.2. DD ("Differential Display")

"Differential Display" (DD) veya RNA "fingerprinting", iki veya daha fazla örnek arasında farklı eksprese edilen genlerin tanımlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemde, mRNA'dan elde edilen cDNA, bir set rastgele seçilmiş primerler ile amplifiye edilmekte ve PCR ürünleri, jel elektroforezi ile incelenmektedir. Jel üzerindeki bantların yoğunluğuna göre transkriptlerin miktarı belirlenmekte ve örnekler karşılaştırılmaktadır. Farklı eksprese olmuş geni tanımlamak için, DNA bandı jelden kesilir, klonlanır ve dizilenir (16). Bu yöntem ile kardiyovasküler hastalıklı hayvan modellerinde (17, 18), insan kardiyomiyopatik dokularında (19) ve kardiyak gelişim döneminde (20) farklı eksprese olan genler tanımlanmıştır.

3. Hibridizasyon temelli teknikler

Tüm hibridizasyon yöntemlerinde, nükleik asit dizilerinin komplementerlik esasına dayalı olarak özgün problemler ile hedef molekülü tanımlanmaktadır (21). Problemler, kısa oligonükleotidler, DNA parçacıkları, PCR ürünleri veya in vitro RNA transkriptleri olabilmektedir. Hibridizasyonun duyarlılığı, reaksiyon koşullarının katılığına ve hibrid kompleksinin kararlılığına bağlıdır. Hibrid kararlılığı, hibrid kompleksinin erime noktası (Tm) ile direkt ilişkilidir. Tm değeri, hibridize olan dizinin baz dizilimi ve uzunluğuna, tuz yoğunluğuna, formamid varlığı veya yokluğuna ve hibridize olan nükleik asidin türüne (DNA:DNA, DNA:RNA, RNA:RNA) bağlıdır (21).

Gen anlatım analizinde kullanılan çok çeşitli hibridizasyon temelli yöntem bulunmaktadır.

3.1. DNA Mikroarrayleri

DNA Mikroarrayler, yüksek-yoğunluklu gen arrayleridir ve tek bir deneyde binlerce genin anlatım profillerinin incelenmesine olanak vermektedir. cDNA arrayleri ve oligonükleotid arrayleri olarak iki tipi mevcuttur. Gen çipleri olarak farklı dizayn edilmelerine karşılık, prensipte her ikisinde geniş-skala gen anlatım analizlerinde kullanılmaktadır (22). Bunun dışında mikroarrayler ayrıca genetik bağlantı veya ilişkilendirme çalışmalarında da kullanılmaktadır.

Gen anlatım çalışmalarında kullanılan array setleri 60,000 ve üzeri gen ve EST içerebilmektedir. Ancak sadece dizisi bilinen genlerin anlatım analizi yapılabilmektedir. Bu yöntem ile dizisi bilinmeyen genlerin keşfi ve anlatımlarının belirlenmesi mümkün olmamaktadır. Ancak, tüm genom dizisinin biliniyor olması yöntemin bu kısıtlılığını azaltmaktadır. Tüm genom anlatım analizlerine imkan veren arraylerin pahalılığı, yaygın olarak kullanılmasına engel olmaktadır (1). Ancak, çok çeşitli tüm-genom anlatım çalışmaları mevcuttur ve bu durum, klinik uygulamalarda rutin kullanıma imkan vermiştir (23). Gen çipleri ile elde edilmiş pek çok veri, www.ncbi.nlm.nih.gov sitesinde geniş kapsamlı gen anlatım (GEO, "gene expression omnibus") tarayıcısında araştırılabilir. Ayrıca, mikroarray teknolojileri kullanılarak yapılan CardioGenomiks (www.cardiogenomics.org) ve PhysGen (<http://pga.mcw.edu>) projeleri gibi geniş kardiyovasküler genomiks projeleri mevcuttur. Kardiyovasküler hastalıklarla ilgili çeşitli mikroarray çalışmaları bulunmaktadır (10, 24). Ancak, farklı çalışmalardan elde edilmiş mikroarray verilerinin karşılaştırılması ve biyoinformatik analizleri, farklı platformların kullanımı ve farklı çalışma dizaynı nedeni ile kolay olmamaktadır (24).

3.2. Dot Blot ve Northern Blot Analizi

Dot veya slot blotlama, sıklıkla kullanılan yüklü naylon membran gibi solid destek üzerinde nükleik asitlerin immobilizasyonunun yapıldığı tekniklerdir. Araştırılan hedef diziye özgün problemler ile, immobilize edilmiş örneklerin hibridizasyonu sonucu belirlenebilmektedir. Hedef dizinin miktarı, konsantrasyonu bilinen standartlarla test örneklerinin sinyal yoğunlukları kıyaslanarak ölçülebilmektedir. Membran üzerine örneklerin uygulamasında, örnek yükleme aparatı olan vakum cihazları kullanılmaktadır. Cihazlarda örnek yüklenen kısımlar, yuvarlak (dot) veya eliptik (slot) yapıda olabilir. Sonuçlar, densitometrik tarama, direkt fosfor-resimleme veya luminometri (kemiluminesans problemler kullanıldığında) ile analiz edilebilmektedir (25).

Northern blotlama, total RNA veya mRNA'nın, denatüre jelde yürütülmesi ardından bir membrana aktarılıp immobilizasyonunun yapılması ve sonuçta araştırılan RNA'nın göreceli pozisyonlarının incelenebildiği bir tekniktir. İlgili

mRNA'ya özgü işaretli bir prob ile hibridizasyonun ardından Northern blot sonucu elde edilir. Probun deteksiyonundan sonra oluşan sinyale göre hedef RNA'nın yoğunluğu ve boyutu tanımlanabilir. RNA dizilerin görüntülenmesinde kullanılan bu teknik, Alwine ve ark. tarafından 1977 yılında "Northern" olarak isimlendirilerek yayınlanmıştır (26).

3.3. Nükleaz Koruma Analizi ve Ayırıcı Plak Hibridizasyonu

Nükleaz koruma analizi, araştırılan mRNA'nın dizisi ile dizisi bilinen işaretlenmiş cDNA'ların hibrid oluşturduktan sonra tek ipliğe özgü nükleaz ile RNA degradasyonu ve jel elektroforezinden oluşmaktadır. Ayırıcı plak hibridizasyonu ise klonlanan cDNA'ların gen anlatımına özgü farklılıkların tanımlanmasını sağlar. Bu teknikler, sadece bilinen genlerin anlatım paternlerinin araştırılmasına olanak vermektedir (27).

3.4. İn Situ Hibridizasyon

İnsan hastalıklarına sebep olan gen anlatım farklılıklarından kaynaklanan morfolojik değişimleri saptamada kullanılan in situ hibridizasyon (ISH) tekniği, hücre sel biyolojinin anlaşılmasında önemli rol oynamaktadır. Doku kesitlerinde nükleik asid dizilerinin tespit edilmesi için geliştirilen bu yöntem, klinik veri ile morfolojik değişimlerin karşılaştırılarak gen anlatımı hakkında bilgi edinilmesini sağlamaktadır.

Nükleik asidlerin ISH analizi ilk kez 1969 yılında tanımlanmıştır (28). ISH tekniği, doku içinde hücre bütünlüğünü koruyan gen anlatım ürünlerinin görüntülenmesi ve in situ olarak gen dizilerinin lokalize edilerek sonuçların, anatomik olarak ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Nükleik asid problemleri ve onların hedefleri arasındaki hibridizasyon, genom düzeyinde yapısal değişiklikler için yapıyor ise DNA-ISH, özgün transkriptlerin anlatım seviyelerindeki değişiklikler için ise RNA-ISH olarak adlandırılmaktadır (28).

Kromojenik ISH (KISH)'da tiramid sinyal çoğaltımı, in situ-PCR ve in situ ters transkripsiyon gibi teknikler ile nadir mRNA'ları saptamada duyarlılık artırılabilir. ISH çeşitli hücre tiplerine (smear, hücre pelleti vb.) ve doku kesitlerine (donmuş, parafin, yarıncı ve ultraince plastik kesitler) uygulanabilmektedir. İn situ hibridizasyonda uygulama yöntemleri çeşitlilik göstermektedir ve tercih edilen yöntemlere göre duyarlılık değişmektedir. Riboproteinlerin, cDNA ve sentetik oligomerlere göre, radyoaktif işaretleme, biotin/digoksinazine göre ve donuk kesit alma, parafinden kesit almaya göre göreceli olarak daha fazla duyarlılığa sahip olduğu belirtilmektedir (29).

3.5. Doku Mikroarrayleri

Doku mikroarrayleri, patoloji alanında yapılmış bir yeniliktir. Yüzlerce doku örneği üzerinde, hedef gen anlatımlarının incelenmesine olanak veren ve 1998 yılında Kononen ve ark.'nın öncüsü olduğu yüksek-verimli bir yaklaşım

olarak dizayn edilmiştir (30). Doku arrayleri çok çeşitlidir, otopsi materyalleri, parafin blokları veya formalin-fiksli donör biyopsilerini içeren araştırma amaçlı doku bankalarından veya patoloji arşivlerinden oluşturulabilmektedir (31, 32). Bu yöntem, işlevsel genomik araştırma teknikleri ile gen ürünlerinin tanımlanmasında ve araştırılan genin in situ anlatımının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ancak, laboratuvar içi kalite kontrol, kontrol standartlarının geliştirilmesi ve doku-temelli tanımlar için kimyasalların optimizasyon uygulamalarında, duplika edilmiş doku örneklerinin pek çok sefer kullanılmasıyla fazla efor sarfedilebilmektedir. Buna rağmen bu yöntem, çok sayıda klinik örnek üzerinde, çoklu gen ve protein anlatımını tayin edilebilmekte, tek bir doku kesiti, tüm-yüzey ve geleneksel patolojik inceleme yöntemine göre zaman ve kimyasal sarfi açısından çok daha etkin olduğu belirtilmektedir (31).

4. Hibridizasyon ve PZR kombinasyonundan oluşan teknikler

4.1. RDA ("Representational Difference" Analizi)

cDNA'nın "Representational Difference" Analizi (RDA), aday genlerin sayısını azaltmak için alternatif bir yaklaşımdır. cDNA-RDA tekniği, çıkartılmış hibridizasyon basamağının PZR amplifikasyonundan oluşan, 2 kompleks genom arasındaki genomik DNA (2) veya mRNA (33) farklılıkların izolasyonunda kullanılan bir yöntemdir.

4.2. ESD yöntemi

ESD tekniği 1996 yılında tanımlanmış, cDNA'ların enzim kesimiyle eşitlenmesi, "Subtractive" hibridizasyon ve "Differential display" tekniklerinin baş harflerine göre adlandırılmıştır. Bu yöntem adını aldığı tekniklerin kombinasyonundan oluşmaktadır ve jel sisteminde oluşan yanlış pozitiflikleri elimine ederek güvenilirliğini kanıtlamıştır (34).

4.3. Çıkartılmış ("Subtractive") Hibridizasyon Kütüphanesi Tekniği

Hücre sel büyüme ve farklılaşmada rol alan ve farklı gen anlatımı olan hedeflerin belirlenmesinde çıkartılmış hibridizasyon teknikleri ("subtractive hybridization library", "subtractive cDNA cloning" veya "suppression subtractive hybridization" vb.) günümüze kadar pek çok çalışmada kullanılmıştır. Bu yöntem, birbirine çok benzeyen iki DNA (genomik veya komplementer) örneği arasında, farklı DNA moleküllerinin ayrımını sağlayabilecek hassasiyettir. Farklı ekspresyon edilen genlerin tanımlanması ve klonlanmasında ilk yaklaşımlar çıkartılmış ("subtractive") hibridizasyon esasına dayanmaktadır. Bir mRNA havuzu ile farklı orjinli başka bir mRNA havuzu arasında hibridizasyon esasına dayanan çıkartılmış cDNA kütüphanelerinin gelişmesiyle gen ekspresyon paternlerinin analizinde önemli bilgiler elde edilmiştir.

4.3.1. Tanım ve kullanıldığı çalışmalar

Çıkartılmış cDNA kütüphaneleri, doku veya hücre dizilerinde (diğer doku veya hücre dizilerinden) farklı olarak

ekspres edilen genlerin izolasyonu ve tanımlanmasında, güçlü bir yaklaşım sağlar. Bu yöntemle, kanserli dokulardaki farklı ekspresyonlara sahip olan genler ayırt edilebildiği gibi (35-37), insan blastositlerine özgü transkriptlerin incelenmesi sonucunda, insan preimplantasyon gelişimi hakkında da bilgiler edinilmiştir (38). Ayrıca genetik hastalıklara yol açan germline mutasyonların veya kanser gelişimine neden olan somatik mutasyonların, benzer iki genom arasında farklılığa neden olduğu belirlenmiştir. Bu yöntemin bir varyasyonu, Duchenne musküler distrofili (DMD) kişilerde delesyona uğramış DMD lokusunun fragmanlarının klonlanmasında kullanılmıştır (39). Ayrıca iki DNA popülasyonu arasındaki farklılıkların tanımlanmasında ilk geliştirilen yöntemde, Y kromozomundaki gen dizilerini klonlanması için kullanılmıştır (40). Literatürde bu tekniğin kullanıldığı çok çeşitli çalışma mevcuttur.

Çıkartılmış hibridizasyon tekniği hızlı, etkili ve hassas bir yöntem olup özellikle nadir görülen transkriptlerin meydana çıkarılmasında güçlü bir yaklaşım sağlamaktadır.

4.3.2. Uygulamasındaki Farklılıklar

Çıkartılmış hibridizasyon tekniğinin uygulamasında çeşitli farklılıklar mevcuttur. Yapılan çalışmaya ve mevcut olanaklara göre en uygun yöntem belirlenmelidir.

Karşılaştırma yapılacak kaynaklar, genomik DNA veya mRNA olabilmektedir. İki genomik DNA popülasyonu, çıkarılmış hibridizasyon tekniği ile karşılaştırılabilmektedir. Ancak çoğunlukla doku veya hücre dizilerine ait iki farklı mRNA popülasyonu arasında karşılaştırma yapılarak farklı anlatımlı genler belirlenmiştir.

Çıkartılmış hibridizasyon esnasında farklı gen anlatımına sahip nükleik asitleri diğerlerinden ayırmak için farklı sistemler kullanılmaktadır. Bunlar, hidroksiapatit (42) ve avidin-biotin kromotografisi (43), paramagnetik boncuklar (Dynabeads-

oligo(dT)₂₅) (44) veya solid substratlar (Oligo(dT)₃₀-lateks) (35) olabilir.

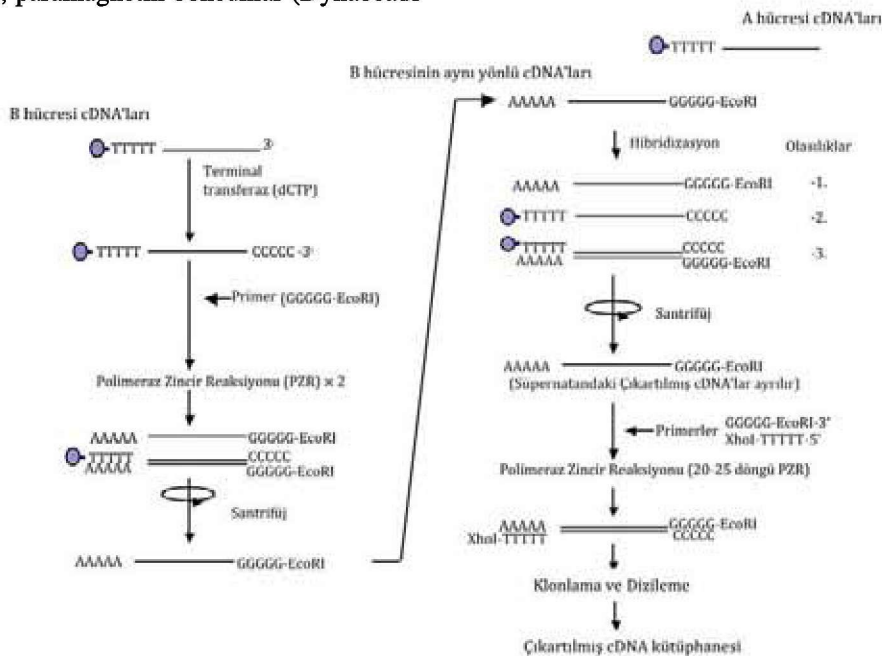
4.3.3. Oligo(dT)₃₀-lateks Kullanılarak Yapılan Çıkartılmış cDNA Hibridizasyon Kütüphanesinin Basamakları:

Nonpolar polistiren-lateks partiküllerinin özelliği, 1,1 m çapında olması ve yüzeye kovalent bağlanmaya eğilimli oligo(dT)₃₀-oligonükleotidlerini taşımasıdır. Oligo(dT)₃₀-lateks partiküllerinin mRNA ile hibridizasyon oranının çok yüksek olması nedeniyle, çıkarılmış hibridizasyon kütüphanesi yönteminde total RNA'dan mRNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılabilmektedir. Bu partiküllerin yoğunluğu yaklaşık suyunkine eşit olduğundan istikrarlı bir forma sahip olan süspansiyon, santrifüj sonucu kolayca küçük bir pellet şeklinde çöktürülebilmektedir.

Çıkartılmış hibridizasyon kütüphanesi yönteminin temel aşamaları şunlardır:

- Oligo(dT)₃₀-lateks ile mRNA'ların saflaştırılması ve cDNA sentezi
- 2 döngü PZR ile aynı yönlü DNA'nın sentezi
- İki farklı kaynaktan elde edilen cDNA'ların hibridizasyonu
- PZR ile çıkarılmış DNA'nın amplifikasyonu ve klonlanması
- cDNA klonlarının karakterizasyonu

A ve B doku/hücre arasında yapılan B hücre kaynağında farklı gen anlatımı olan transkriptlerin seçilerek klonlanması ve bir cDNA kütüphanesinin oluşturulmasında kullanılan bu yöntemin basamakları Şekil 1'de şematik olarak verilmektedir.



5. Yöntem Karşılaştırmaları

Gen anlatım analiz yöntemlerinin birbirlerine göre üstünlükleri veya sınırlılıkları mevcuttur. Ancak kullanılacak yöntemin seçimi, genellikle çalışmanın amacına ve bütçesine göre olmaktadır.

Dizileme temelli yöntemler arasında EST dizileme yaklaşımında, gelişmiş dizileme teknolojilerine rağmen elde edilen verilerin fazla olması ve analizlerindeki güçlükler nedeni ile dokuya özgü farklı gen anlatımının belirlenmesi kolay olmamaktadır. Ancak daha önce bahsedildiği gibi bir dokuda ifade edilen tüm transkriptlerin belirlenmesi mümkün olduğundan bir genin biyoinformatik incelemeleri için bilgi vericidir. MSPP yönteminin ise diğer dizileme temelli yöntemlere göre bazı avantajları mevcuttur. Direkt EST dizilemesinden farkı, cDNA klonlarından bir kütüphane oluşturulması ardından DNA'nın saflaştırılması ve dizilenmesi gerektirmemesidir. Bu yöntemde en az bir milyon kısa cDNA molekülü aynı anda boncuklar üzerine klonlanarak dizilenmektedir. Bu durum zaman, çaba ve maliyet kaybını azaltmaktadır. SAGE yöntemindeki 10-14 bazlık etiketlere göre burada 17-20 bazlık işaretler mevcuttur. Bu durumun belli bir oranda özgünlüğü arttırdığı belirtilmektedir. Diğer yandan mikroarray platformlarında homolog genlerin yanlış hibridizasyon ihtimali bulunmaktadır ancak MPSS'de 3'-translasyonu olmayan bölgelerin incelenmesi nedeniyle genellikle farklı gen aileleri ayırt edilebilmektedir (10, 11). Ayrıca SAGE analizinde sadece bilinen genler araştırılabilmektedir (27).

PZR temelli yöntemlerde RT-QPCR yönteminin avantaj ve dezavantajları ilgili kısımda kısaca açıklanmıştır. Bu yöntemde sadece dizisi bilinen genlerin anlatım düzeyleri belirlenebilmekte ve doku/hücreler arasındaki düzey farkları karşılaştırılabilmektedir. DD yöntemi ise, yaygın olarak kullanılmaya rağmen, sistematik ve geniş-skallı gen anlatım profillemesi için uygun değildir. Ayrıca jelden ürünün kesilerek klonlama aşamasında problemler gözlenebilmektedir.

Gen anlatım analizi yöntemleri arasında sadece Northern analizi, mRNA'nın boyutu hakkında bilgi vermektedir. Fakat yöntemin çok aşamalı (RNA'nın membrana transferi, membranda RNA'nın kovalent bağlanması, bloklama, hibridizasyon, yıkama basamakları) ve bu süreçte ribonükleaz kontaminasyon ihtimalinin varlığı, analizin hassasiyetinde kayıba neden olabilmektedir. Dolayısıyla, iyi optimize edilmiş sistemlerin kurulması önem taşımaktadır (45).

Çıkarılmış hibridizasyon kütüphanesi yönteminde, nadir anlatımı olan genlerin zenginleştirilmesi (1000 kat civarında) ve sık anlatımlı cDNA'ların ise hibridizasyon esnasında dengelemesi mümkün olmaktadır (46). Bu yöntemin başarı oranları çeşitli çalışmalarda %84-94 oranında saptanmıştır (47-49). Ancak, bir çalışmada kütüphanedeki klonların %20'sinden azı araştırılabildiğinden ve adaylardan sadece

%2'sinin doğrulama analizleri sonucunda farklı olarak gen anlatımına sahip oldukları rapor edilmiştir. Ancak bu durumun karşılaştırılması yapılan hücre/doku tiplerine bağlı olabileceği belirtilmektedir (50). Sonuçta bu yöntemin kullanıldığı çalışmalarda yeni ve bilinmeyen pek çok gen keşfedilmiştir.

Tablo 2'de gen anlatım profillemesi için kullanılan bazı yöntemlerin karşılaştırmalı özeti verilmektedir (1). Ancak gen anlatım analizi için RNA'nın kalitesi ve elde edildiği materyalin tipi (taze, donmuş, parafin blok vb.) analizlerde büyük önem taşımaktadır (51).

Tablo 2: Gen anlatım profillemesinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması

Yöntem	Gen Keşfi	Gen Kapsamı	Duyarlılık	İş Gücü	Deney Maliyeti
EST Dizileme	Evet	Az	Az	Orta	Az ¹
SAGE	Evet	Orta	Az	Orta	Az ¹
RT-QPCR	Hayır	Az	Yüksek	Az	Orta
Differential Display	Evet	Az	Yüksek	Orta	Az
cDNA mikroarray	Evet ²	Yüksek	Orta	Yüksek ³	Yüksek
Oligo mikroarray	Hayır	Yüksek	Orta	Az ¹	Yüksek ⁴

¹dizileme kapasitesi uygun ise,

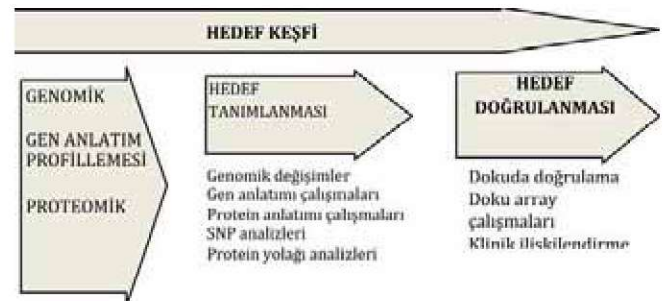
²cDNA kütüphanelerinde bilinmeyen genler var ise,

³arraylerin üretimi dahil ise,

⁴hazır arrayler kullanılıyorsa.

6. Farklı Gen Anlatım Analizlerinin Önemi

Günümüzde gelişim ve farklılaşma mekanizmalarının anlaşılması için uygulanan farklı gen anlatım çalışmaları, kompleks biyolojik süreçlerin anlaşılmasını ve çeşitli hastalıkların tedavisinde yeni hedeflerin belirlenmesini sağlamaktadır. Yüksek teknolojiler sayesinde bu konuda pek çok veri elde edilmiştir. Tüm bu bilgiler ışığında keşfedilen biobelirteçler, Şekil 2'de özetlendiği gibi bir yol izlenerek doğrulandıktan sonra klinikte yeni tanı ve tedavilerin gelişimine katkı sağlayacaktır (52).



Şekil 2: Yapısal genomik, gen anlatım profillemesi ve proteomiksten hastalıklar için tanısal, prognostik ve öngördürücü hedef belirteçlerin keşfi

Sonuç

Günümüze kadar çok çeşitli gen anlatım analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Son dönemdeki teknolojik ilerlemeler büyük ölçekli gen ifade analizlerinin yapılmasına imkan vermektedir. Özellikle hücre/dokuya özgün farklı ifade edilen genlerin belirlenmesinde ve keşfinde çıkartılmış hibridizasyon

kütüphanesi gibi yöntemler, pahalı ve yüksek teknolojik cihaz gerektirmedikinden tercih edilebilir. Ancak her bir gen anlatım analiz yöntemi çeşitli üstünlüklere ve sınırlılıklara sahiptir. Sonuç olarak uygulanacak yöntemin seçiminde bütçe, laboratuvar koşulları ve planlanan çalışmanın amacı önem taşımaktadır.

Kaynaklar

- 1- Stanton LW. Methods to profile gene expression. *Trends Cardiovascular Medicine* 2001; 11: 49-54.
- 2- Hess J, Laumen H, Wirth T. Application of differential cDNA screening techniques to the identification of unique gene expression in tumours and lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 1998; 10:125-130.
- 3- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, ve ark. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 1991; 252: 1651-1656.
- 4- Kodzius R, Matsumura Y, Kasukawa T, Shimokawa K, Fukuda S, Shiraki T, Nakamura M, Arakawa T, Sasaki D, Kawai J, Harbers M, Carninci P, Hayashizaki Y. Absolute expression values for mouse transcripts: re-annotation of the READ expression database by the use of CAGE and EST sequence tags. *FEBS Letters* 2004; 559, 22-6.
- 5- Hill DP, Begley DA, Finger JH, Hayamizu TF, McCright IJ, Smith CM, Beal JS, Corbani LE, Blake JA, Eppig JT, Kadin JA, Richardson JE, Ringwald M. The mouse Gene Expression Database (GXD): updates and enhancements. *Nucleic Acids Research* 2004; 32, D568-71.
- 6- Hwang DM, Dempsey AA, Lee C, Liew C. Identification of differentially expressed genes in cardiac hypertrophy by analysis of expressed sequence tags. *Genomics* 2000; 66, 1-14.
- 7- Tabibiazar R, Wagner RA, Liao A, Quertermous T. Transcriptional profiling of the heart reveals chamber-specific gene expression patterns. *Circulation Research* 2003; 93: 1193-201.
- 8- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995; 270: 484-487.
- 9- Ye SQ, Lavoie T, Cusher D, Zhang LQ. Microarray, SAGE and their applications to cardiovascular disease. *Cell Research* 2002; 12: 105-115.
- 10- Reinartz J, Bruyns E, Lin JZ, Burcham T, Brenner S, Bowen B, Kramer M, Woychik R. Massively parallel signature sequencing (MPSS) as a tool for in-depth quantitative gene expression profiling in all organisms. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2002; 1: 95-104.
- 11- Meyers BC, Tej SS, Vu TH, Haudenschild CD, Agrawal V, Edberg SB, Ghazal H, Decola S. The use of MPSS for whole-genome transcriptional analysis in Arabidopsis. *Genome Res*. 2004; 14 :1641-53.
- 12- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; 11: 1026.
- 13- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects Medicine* 2006; 27: 95-125.
- 14- Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 2002; 30: 503-512.
- 15- Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 2002; 8: 257-260.
- 16- Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992; 257: 967-971.
- 17- Khare S, Kumar U, Sasi R, Puebla L, Calderon L, Lemstrom K, Hayry P, Patel AY. Differential regulation of somatostatin receptor types 1-5 in rat aorta after angioplasty. *The FASEB Journal* 1999; 13: 387-394.
- 18- Yang D, Yu J, Luo Z, Carthy CM, Wilson JE, Liu Z, McManus BM. Viral myocarditis: identification of five differentially expressed genes in coxsackievirus B3-infected mouse heart. *Circulation Research* 1999; 84: 704-712.
- 19- Tyagi SC, Kumar S, Voelker DJ, Reddy HK, Janicki JS, Curtis JJ. Differential gene expression of extracellular matrix components in dilated cardiomyopathy. *Journal of Cellular Biochemistry* 1996; 63: 185-98.
- 20- Pak BJ, Pang SC. Developmental regulation of the translational repressor NAT1 during cardiac development. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1999; 31: 1717-1724.
- 21- Kessler C. Nonradioactive analysis of biomolecules. (). Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2nd ed., 2000.
- 22- Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays- a technology review. *Nature Cell Biology* 2001; 3: E190-E195.
- 23- Medeiros F, Rigl CT, Anderson GG, Becker SH, Halling KC. Tissue handling for genome-wide expression analysis: a review of the issues, evidence, and opportunities. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2007; 131: 1805-1816.
- 24- Nanni L, Romualdi C, Maseri A, Lanfranchi G. Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2006; 41: 934-948.
- 25- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning a*

Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd ed., 2001.

26- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977; 74: 5350-4.

27- Kozian DH, Kirschbaum BJ. Comparative gene-expression analysis. *Trends in Biotechnology* 1999; 17: 73-78.

28- Jin L, Lloyd RV. In situ hybridization: methods and applications. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 1997; 11: 2-9.

29- Wilcox JN. In situ hybridization, DVA-Concepts in molecular medicine, Course outline. Emory University., 1996. Erişim 05.09.2008, <http://www.emory.edu/WILCOX/DVApart1.html>.

30- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine* 1998; 4: 844-847.

31- Kumar B, de Silva M, Venter DJ, Armes JE. Tissue microarray: a practical guide. *Pathology* 2004; 36: 295-300.

32- Henshall S. Tissue Microarray. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2003; 8: 347-358.

33- Hubark M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 5640-5648.

34- Suzuki Y, Sato N, Tohyama M, Wanaka A, Takagi T. Efficient isolation of differentially expressed genes by means of a newly established method, 'ESD'. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 797-799.

35- Hara E, T. Kato E, Nakada S, Sekiya S, Oda K. Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 7097-7104.

36- Kuang WW, Thompson DA, Hoch RV, Weigel RJ. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 1116-1123.

37- Stubbs AP, Abel PD, Golding M, Bhangal G, Wang C, Waxman JU, Stamp GWH, Lalani E. Differentially expressed genes in hormone refractory prostate cancer. *Am J Pathol* 1999; 154: 1335-1343.

38- Morozov G, Verlinsky O, Rechitsky S, Ivakhnenko V, Goltsman E, Gindilis V, Strom C, Kuliev A, Verlinsky Y. Construction and analysis of subtraction complementary DNA libraries from human preimplantation embryos. *J Ass Repr Genet* 1999; 16: 212-215.

39- Wieland I, Bolger G, Asouline G, Wigler M. A method for difference cloning: Gene amplification following subtractive hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2720-2724.

40- Lamar EE, Palmer E. Y-encoded, species-specific DNA in mice: evidence that the Y chromosome exists in two polymorphic forms in inbred strains. *Cell* 1984; 37: 171-177.

41- Winer J, Jung CKS, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 1999; 270: 41-49.

42- Timblin C, Battey J, Kuehl WM. Application for PCR technology to subtractive cDNA cloning: identification of genes expressed specifically in murine plasmacytoma cells. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 1587-1593.

43- Wieland I, Bolger G, Asouline G, Wigler M. A method for difference cloning: Gene amplification following subtractive hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2720-2724.

44- Meszaros M, Morton DB. Subtractive hybridization strategy using paramagnetic oligo(dT) beads and PCR. *BioTechniques* 1996; 20: 413-419.

45- van Miltenburg, R., Rüger, B., Grünwald-Janho, S., Leons, M., Schröder, C. *The DIG System User's Guide for Filter Hybridization*. Germany: Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, 1995.

46- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6025-6030.

47- von Stein OD, Thies WG, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2598-602.

48- Zhang H, Zhou L, Yang R, Sheng Y, Sun W, Kong X, Cao K. Identification of differentially expressed genes in human heart with ventricular septal defect using suppression subtractive hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342:135-44.

49- Liang G, Zhang XD, Wang LJ, Sha YS, Zhang JC, Miao SY, Zong SD, Wang LF, Koide SS. Identification of differentially expressed genes of primary spermatocyte against round spermatid isolated from human testis using the laser capture microdissection technique. *Cell Res* 2004; 14:507-12.

50- Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, Lukyanov KA, and Lukyanov SA. Mirror orientation selection (MOS) a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:E90.

51- Medeiros F, Rigl CT, Anderson GG, Becker SH, Halling KC. Tissue handling for genome-wide expression analysis: a review of the issues, evidence, and opportunities. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2007; 131: 1805-1816.

52- Ross JS, Ginburg GS. The integration of molecular diagnostics with therapeutics: implications for drug development and pathology practice. *American Journal of Clinical Pathology* 2003; 119: 26-36.