

DERLEME

Mikroarray Teknolojisi

Salih Haldun BAL^{1,2}, Ferah BUDAK³

¹ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dr. Raşit DURUSOY Kan Merkezi, Bursa.

² Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji Bilim Dalı, Bursa.

³ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji Bilim Dalı, Bursa.

ÖZET

Mikroarray teknolojisi, mikroskop lamı gibi cam, plastik veya silikondan yapılmış katı bir yüzey üzerine cDNA, protein gibi yapıların sabitlenmesi ile elde edilen mikroarraylerin kullanıldığı bir yöntemdir. Yüzeve sabitlenen yapının türüne göre DNA mikroarray ve protein mikroarray isimlerini alır. Yüksek verimli teknoloji olarak kabul edilen bu yöntem ile bir deneyde çok büyük miktarda veri elde edilebilir. Örneğin DNA mikroarray ile tek bir deneyde insan genomunun tamamı analiz edilebilir. Elde edilen büyük miktardaki verinin değerlendirilebilmesi için biyoinformatik desteğe ve yüksek istatistiksel yöntemlere gerek duyulur. Bugün bazı kısıtlılıkları bulunsa da, gelecekte paha biçilmez bir değere sahip olacaktır. Bu derlemenin amacı gelişmekte olan bu yöneme dikkat çekmektir.

Anahtar Kelimeler: Mikroarray. Mikroçip. DNA mikroarray. Protein mikroarray.

Microarray Technology

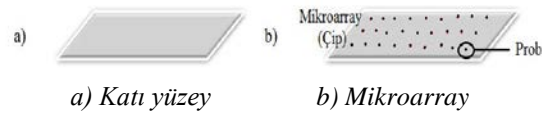
ABSTRACT

Microarray technology is a method which uses a slide made of glass, plastic or silicon. Structures like cDNA, protein etc are spotted onto this slide. Microarray is divided into two groups as DNA microarray and protein microarray according to the variety of the spotted structure. This method that is accepted as a high throughput method provide large amount of data. For example, human genome can be analyzed with only one examination via DNA microarray. Because of huge amount of data, microarray technology needs a powerful bioinformatic support and advanced statistical methods. Nowadays, despite some limitation of microarray that cause some difficulties, in the near future, it will become an indispensable and invaluable method. The purpose of this review is to draw attention to this developing method.

Key Words: Microarray. Microchip. DNA microarray. Protein microarray.

Mikroskop lamı gibi cam, plastik veya silikondan katı bir yüzey üzerine (Şekil-1a) spesifikliği bilinen yapıların (DNA, protein vb) sabitlenmesi (Şekil-1b) ile elde edilen mikroarraylerin (çip) kullanıldığı test yöntemine mikroarray teknolojisi denmektedir. Kullanılan çipin üzerinde bulunan farklı spesifiklikteki binlerce noktanın her birine prob adı verilmektedir (Şekil-1b). Her prob kendi içinde homologdur ve her probda bu homolog yapılardan belirli miktarda (DNA, protein) bulunmaktadır. Ancak, probların her biri birbirinden farklıdır. Farklı spesifiklikte binlerce probun oluşturduğu bir mikroarrayin her probunun neye spesifik olduğu bilinir. Probu üzerindeki yapıların proba sabitlenmesi işlemine spotlama (yazdırma) denmekte-

dir. Probu üzerine spotlanan yapının türüne göre de "DNA Mikroarray" ya da "Protein Mikroarray" den söz edilir.



Şekil 1:
Mikroarray

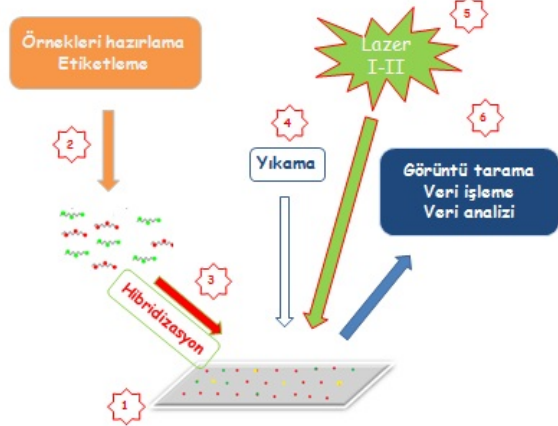
I. DNA Mikroarray

90'lı yılların ortalarında geliştirilmeye başlanan¹, günümüzde hücre ve dokulardaki gen ekspresyonlarının topluca incelenmesine olanak sağlayan yeni ve güçlü bir teknolojidir. Transkripsiyonun genomik bir ölçekte değerlendirilmesi, bir mozaik şeklinde tüm genomu barındıran DNA mikroarray teknolojisi ile sağlanabilmiştir². Bir mikroorganizmanın tüm genleri mikroskop lamı ölçeğinde bir alana spotlanabilir ve binlerce genin ekspresyon seviyeleri tek bir deneyde

Geliş Tarihi: 19.09.2012
Kabul Tarihi: 31.10.2012

Dr. Salih Haldun BAL
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Dr. Raşit DURUSOY Kan Merkezi, Bursa
Tel: 0 224 295 37 21
e-posta: haldun@uludag.edu.tr

eş zamanlı olarak çalışılabilir¹. Bu sayıdaki genin çalışılması için küçük bir örnek hacminin yeterli olması nedeniyle yüksek verimli teknoloji olarak da kabul edilir. DNA Mikroarray teknolojisi, genlerin ve gen polimorfizmlerinin araştırılması, ekspresyon analizleri, mutasyon analizleri, evrimsel çalışmalar, sekans analizleri, potansiyel terapötik ajanların geliştirilmesi, genlerin sınıflandırılması gibi birçok alanda kullanılabilir³. DNA Mikroarray analizi aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır⁴⁻⁵ (Şekil-2):

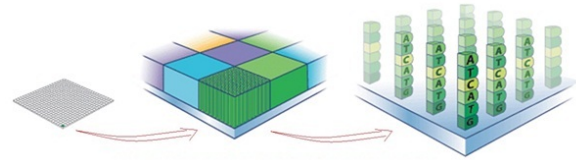


Şekil 2:
DNA mikroarray işlem basamakları

1. Mikroarray'in hazırlanması
2. Test edilecek örneklerin hazırlanıp etiketlenmesi
3. Hibridizasyon
4. Yıkama
5. Etiketlerin uyarılması
6. Görüntü tarama / Veri işleme-analizi

1. Çipin hazırlanması: Mikroarrayde destek malzemesi olarak genellikle cam, plastik silikon vb katı yüzeyler kullanılır. Bu katı yüzeyler, elektrostatik etkileşimi artırarak nükleik asitlerin bağlanmasını kolaylaştırmak amacıyla spotlama öncesi bir işlemde geçirilerek⁶ lizin, aminosilan, organosilan gibi maddeler ile kaplanır. Bu işlem ile nükleik asitlerin katı yüzey (slayt) üzerine immobilizasyonunun sağlanmaktadır. Spotlama için hazır hale getirilen slaytlara nükleik asitler spotlanarak çipler oluşturulur. DNA mikroarray çipleri *cDNA (komplementer DNA) çipler* ve *oligonükleotid çipler* olmak üzere ikiye ayrılır. *cDNA çipler*, cDNA klon kütüphanesinden elde edilmiş 500-2000 baz çifti (bç) uzunluğundaki cDNA'ların veya Expressed Sequenced Tagged (EST) klonlarının özel yazıcılar aracılığıyla (çoklu uçlu mekanik yazıcılar, ink-jet yazıcılar vb) slaytlara spotlanması ile oluşturulur. *Oligonükleotid arrayler*, slayt üzerinde fotolitografik olarak *in situ* sentezlenmektedir⁷ ve doğal olarak yüzeye yazdırma aşamasına gerek kalmamaktadır. cDNA çipler daha çok ekspresyon analizleri için kullanılırken oligonükleotid mikroarrayler ekspresyon analizlerinin yanı sıra sekans analizle-

rinde de kullanılabilir⁵. cDNA çipler, güçlü hibridizasyon sağlamaları, daha ucuz olmaları ve transkriptlerin farklı varyasyonlarını algılayabilme gibi avantajların yanı sıra, oluşturulmaları için gerekli zamanın uzunluğu ve tekrarlayan sekanslar nedeniyle spesifiklik sorunları gibi dezavantajlara sahiptir⁵. Daha fazla stabilite ve spesifiklik sağlayan oligonükleotid mikroarraylerin kısa bir hazırlık aşamasının olması ve kontaminasyon riskinin daha az olması gibi avantajlarının yanı sıra, yüksek maliyeti ve satın alınan oligonükleotidlerle ilgili standardizasyon sorunları gibi dezavantajları bulunmaktadır⁵. Çipler hangi yolla elde edilirse edilsin, sonuçta her probunda çok sayıda homolog DNA'nın bulunduğu, farklı problemlerin farklı DNA zincirlerini içerdiği bir platform elde edilmiş olur (Şekil-3) ve uygun şekilde hazırlanmış örnekler ile hibridizasyona hazırır.

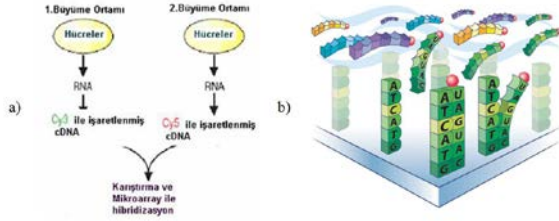


(<http://dnaandgenome.blogspot.com/2010/09/dna-microarray.html> adresinden alınarak düzenlemiştir)

Şekil 3:
DNA mikroarrayin görünümü

2. Örneklerin Hazırlanması ve Etiketlenmesi: DNA mikroarray yönteminde örnek hazırlanması önemli bir aşamadır ve çalışma için her iki durum örneğinden izole edilen hedef mRNA'lar, revers transkriptaz aracılığı ile cDNA'ya çevrilir³. Elde edilen cDNA'lar radyoaktif veya floresan belirteçler ile etiketlenir. Radyoaktif işaretleme için genellikle ³³P gibi radyoizotoplar kullanılırken floresan işaretleme için Aleksafior, Fitoeritrin, Siyanin (Cy3, Cy5) gibi siyanin boya-ları kullanılır⁸. Bunlardan yeşil renk veren Cy3 ve kırmızı renk veren Cy5 çeşitli avantajları nedeniyle en sık kullanılan boyalardır^{5,9-10}. Etiketleme, hedeflerin amplifikasyonu sırasında boya-ların amplifiye edilen ürünlere doğrudan birleştirilmesiyle gerçekleştirilir⁵.
3. Hibridizasyon: Etiketlenen cDNA'lardan oluşan karışım hibridizasyonun sağlanması için mikroarray üzerine inkübe edilir (Şekil-4a). Örnekte mikroarray problemleri ile komplementer dizinler bulunuyorsa bu süreç sonunda problemlere hibridize olurlar (Şekil-4b). Ancak, ideal bir hibridizasyon için hedef, prob ve tampon konsantrasyonları, sıcaklık, süre, probun spesifik aktivitesi gibi değişkenlerin optimize edilmesi gerekmektedir^{3,5,11}.
4. Yıkama: Hibridizasyon aşaması sonrası ortamda bulunan ve prob ile bağlanmamış dizinler, non-spesifik sinyal odakları gibi yapıların uzaklaştırılması için yıkama işlemi gereklidir. Reaksiyonun doğru değerlendirilebilmesi için önemli bir aşamadır.

Mikroarray Teknolojisi

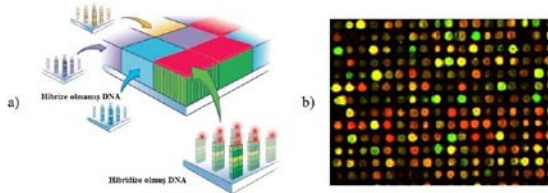


- Örneklerin hazırlanması ve karıştırılması
(http://www.genetiklab.com/altsayfa.php?giris_ID=5&tablo=tbl_yontemler adresinden alınarak düzenlemiştir)
- Hibridizasyon
(<http://cswww.essex.ac.uk/staff/W.Langdon/genchip/> adresinden alınarak düzenlemiştir)

Şekil 4:

Örneklerin hazırlanması, karıştırılması ve hibridizasyon

5. Etiketlerin uyarılması: Örnekteki dizinler ile hibridize olmuş, yıkama işlemi ile bağlı olmayan materyalden temizlenmiş mikroarrayde hibridizasyonun görünür hale getirildiği aşamadır. Amaç mikroarraye hibridize olan dizinlerin görünür veya değerlendirilebilir hale getirilmesidir (Şekil-5a). Süreç, kullanılan etiketin niteliğine ve tarayıcıların türüne uygun uyarı kaynakları kullanılarak gerçekleştirilir. Örneğin, konfokal tarayıcılar için uyarı kaynağı olarak lazer kullanmak gerekmektedir³.



- Etiketlerin uyarılması
(<http://dnaandgenome.blogspot.com/2010/09/dnamicroarray.html> adresinden alınarak düzenlemiştir)
- Floresans
(<http://palmer-dna-technology-wikis.wikispaces.com/Ashley+Vance>)

Şekil 5:

Etiketlerin uyarılması ve floresans

6. Görüntü Tarama / Veri İşleme-Analizi: Mikroarray üzerindeki floresan ya da radyoaktif sinyalin toplandığı aşamadır. Bu işlem için, mikroarray spotlarındaki ışık yoğunluğunu ölçen konfokal veya charge coupled device (CCD) gibi floresan sinyal dedektörleri^{3,5,11} ya da radyoaktif sinyaller için phosphorimager dedektörler kullanılır¹¹. Tüm dedektörler özel bir bilgisayara, yazılım programı ile bağlantılıdır ve dedektörlerden gelen çok sayıdaki veri bu yazılımlar tarafından değerlendirilir¹¹.

Dedektörlerin kendi aralarında bazı avantaj ve dezavantajları vardır^{3,5} ve seçimleri sırasında bu özellikler dikkate alınmalıdır. Tarama sırasında dedektörler, hibridize olmuş örneklerin oluşturduğu her mikroarray probundaki sinyal yoğunluğunu belirler. Tarama sonuçları yazılım aracılığıyla işlenerek anlamlı veriler haline getirilir. Eğer, örnek içerisindeki Cy3 ile işaretli olan dizinler, hedef probdaki cDNA'ya hibridize olduysa o prob yeşil renk, Cy5 ile işaretli olan dizinler hibridize oldu ise o prob kırmızı renk yayacak, eğer hem Cy3 hem de Cy5 işaretli dizinler eşit miktarda hibridize olduysa prob sarı renk yayacaktır (Şekil-5b). Bir çipin üzerinde binlerce prob bulunabileceği ve bir mikroarray aracılığıyla genom ölçekli geniş veriler sağlanabileceği düşünüldüğünde, elde edilecek verilerin çokluğu ve karmaşıklığı kolayca tahmin edilebilir. Ayrıca katı yüzey çeşitliliği, spotlama değişkenlikleri, arka plan sinyalleri gibi birçok değişken de sonuçları etkileyebilmektedir. Bu nedenle, verilerin işlenmesi ve analizi bu teknoloji için çok önemlidir. Bu kadar kapsamlı ve karmaşık veriler bütünü, güçlü bir biyoinformatik desteğe ve istatistiksel analiz yeteneğine gerek duymaktadır⁵. Tarayıcılardan gelen bilgiler ancak bu destek sayesinde anlamlı veriler haline getirilebilmektedir. Verilerin işlenmesi ve analizi, normalizasyon, filtreleme, kümeleme, pattern tanımlama gibi çeşitli süreçleri içermektedir^{3,11,12}.

DNA mikroarray teknolojisi geniş bir kullanım alanına sahiptir. Genom profilinin belirlenmesi¹³, gen ekspresyon analizleri¹⁴, mutasyon analizleri¹⁵, dizi analizleri¹⁶⁻¹⁷, çevresel araştırmalar¹⁸, hastalıkların alt tiplerine ayrılması¹⁹, tanı^{15,20} ve prognoz tahmin aracı olarak²¹ birçok alanda kullanılabilmektedir. Örnekleri çoğaltmak, farklı konulara bu teknolojiyi uyarlamak mümkündür. Ancak, bu denli kullanım çeşitliliği sağlayan teknoloji verdiği sonuçlar açısından semi kantitatif kabul edilmektedir. Aynı anda, büyük bir hızla, karşılaştırmalı çalışmalara olanak vermek gibi avantajlara sahip bu yüksek verimli teknoloji, pahalılığı, sonuçlarının kompleksitesi nedeniyle güçlü bir biyoinformatik desteğe gereksinim duyması gibi dezavantajlara sahiptir. Daha önemlisi, hibridizasyon (yetersiz veya çapraz hibridizasyon vb) ve etiketlemede yaşanan sorunlar, farklı çiplerin eş hassasiyette olmaması, farklı çiplerle elde edilen sonuçların henüz karşılaştırmamıyor olması, optimizasyon ve standardizasyon sorunları mikroarray sonuçlarının semikantitatif olarak kabul edilmesine neden olmaktadır. Bu nedenlerle mikroarray teknolojisiyle elde edilen sonuçların geleneksel yöntemler ile doğrulanması gerekmektedir. Ancak, gelecek yıllar bu teknolojinin geliştirilerek çok daha etkin kullanılmasını sağlayacaktır.

II. Protein Mikroarray

2000'li yılların başında geliştirilen²² protein mikroarraylerde, DNA mikroarrayden farklı olarak, spotlanan

yapıları proteinler oluşturmaktadır. Bu nokta, protein mikroarraylerin DNA mikroarraylere göre sahip olduğu zorlukların temelini oluşturmaktadır. Bu zorluklar mikroarrayin hazırlanması ve sinyal oluşturma-amplifikasyon aşamalarını kapsamaktadır. İyi bir protein çip yüzeyinin her zaman istendiği gibi oluşturulamaması, proteinlerin kolayca üretilmemesi ve çip yüzeyine kolaylıkla immobilize edilememesi, immobilize edilen proteinlerin denatüre olabilmeleri, çip yüzeyine spesifik olmayan bağlanmalar ve sinyal amplifikasyonundaki güçlükler bu zorlukların başlıcalarıdır²³⁻²⁴. Bu bölümde, protein mikroarrayin zorluklarını aşmak amacıyla geliştirilen ve DNA mikroarraye göre farklılıklarını oluşturan noktalara değinilecektir.

Protein mikroarrayin hazırlanması: Proteinler, üç boyutlu yapıları, yükleri, hidrofobisiteri, kolayca çoğaltılmamaları, belirli ısı ve tampon çözeltilerde kolaylıkla denatüre olabilmeleri gibi özellikleriyle, DNA'lardan fiziksel ve biyokimyasal olarak farklılıklar göstermektedir²³⁻²⁴. Bu nedenle, protein mikroarraylerde katı yüzeyin yapısı kritik öneme sahiptir. Proteinler için en uygun çipi oluştururken dikkat edilmesi gereken noktalardan ilki slayt yüzeyi seçimi ve yüzeyin kimyasal yapısıdır. İdeal bir yüzey, proteinlerin fonksiyonlarını korumalı, çipte oluşacak sinyalin kalitesini bozacak şekilde arka plan sinyalleri oluşturmamalı, yüksek protein bağlama kapasitesi ve uzun raf ömrü sağlamalıdır²⁴. Etkin bir yüzey elde etmek için cam, plastik gibi malzemelerden yapılmış katı yüzeyler poli vinilidin florür (PVDF), nitroselüloz, altın, polistren, nikel, epoksi, aldehit, dekstran gibi maddeler ile kaplanır²³⁻²⁴. Bu yüzeylerden her birinin, yumuşak bir yüzey oluşturmaları, yatay saçılma izin vermeleri, yüksek arka plan sinyali oluşturmaları gibi bazı avantaj ve dezavantajları vardır²³⁻²⁴. Üç boyutlu matriks arrayin geliştirilmesi²⁵⁻²⁶, cam slaytların bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ile kaplanması gibi çok sayıda uygulama ile bu sorunlar aşılmaya çalışılsa da, henüz bu sorunların tam olarak üstesinden gelinebilmiştir. Protein mikroarray için bir diğer zorluk, çip üzerine spotlanacak proteinlerin elde edilmesidir. Rekombinasyon ve Cell-Free Protein Array bu proteinlerin elde edilmesi için yararlanılabilecek iki yoldur²⁴. Günümüzde rekombinasyon aracılı protein kütüphaneleri sıklıkla, ekspresyon vektörlerinde ORF'lar (Open Reading Frame) aracılığıyla²⁷ ve *E. coli* λ fajı aracılığıyla²⁸ oluşturulmaktadır. Ancak, bu protokoller hem maliyetli, hem de yoğun işgücü gerektiren protokollerdir. Bunların yanında, insan gibi çok sayıda geni bulunan yüksek ökaryotların proteomlarının ORF'lar aracılığı ile fabrikasyonu, çok zor olmanın yanı sıra çok daha pahalıdır²⁴. Ayrıca, rekombinan üretilen proteinlerin slayt yüzeyine yazdırılmaları, immobilize edilmeleri gerekmektedir ve bu noktada sorunlar ile karşılaşılabilir. Rekombinasyonun bu zorluklarını aşmak için Cell-Free Protein Array geliştirilmiştir. Bir transkripsiyon/translasyon

sistemi olan bu yöntem, istenen proteinleri spesifik cDNA'larını kullanılarak in vitro sentezlemeye olanak verir. Sentez için, istenen proteinin DNA kalıbı ve bir hücrenin transkripsiyon/translasyon için gerekli kaba materyali yeterlidir²⁹. Hücre ekstraktı olarak en sık *E. coli*, buğday tohumu, tavşan retikülositi kullanılmaktadır. Ayrıca, hibridomalar, hipertermofiller, memeli ve insan hücreleri de kullanılabilir³⁰. Cell-Free Protein Array'in, "in situ" yöntem, "Nano-well array format" ve "DNA array to protein array (DAPA)" türleri bulunmaktadır. Cell-Free Protein Array'lerin birbirlerine göre üstün ve zayıf oldukları noktalar bulunmaktadır³⁰⁻³¹. Rekombinasyon ile elde edilen proteinlerin ise ek bazı zorlukları da bulunmaktadır. Bu proteinlerin slayt üzerine yazdırılması ve immobilize edilmesi gerekmektedir. Yazdırma işlemi özel yazıcılar aracılığıyla (çoklu uçlu mekanik yazıcılar, ink-jet yazıcılar vb) gerçekleştirilmektedir³²⁻³⁴. Bu slaytların protein mikroarray olarak kullanılabilmesi için, üzerindeki proteinlerin stabil olması, aktivite kaybetmemesi gerekmektedir. Bu stabiliteyi sağlamak için geliştirilen yöntemlere, immobilizasyon yöntemleri adı verilmektedir. Evrensel bir immobilizasyon yöntemi, spotlanan protein yapısını bozmamalı, yüksek bir bağlanma kapasitesi sağlamalı ve hedeflenen protein hedeflenen noktaya immobilize edilebilmelidir. Immobilizasyon için nonkovalent adsorbsiyon, kovalent bağlanma ve afinite yakalama gibi yöntemler kullanılmaktadır²⁴. Bunlardan "nonkovalent adsorbsiyon", protein yapıyı zedelemeyen yüksek bir protein bağlanma kapasitesi sağlasa da, test etkinliği, doğruluğu, tekrarlanabilirliği açısından çeşitlilikler göstermekte²⁴ ve uygun olmayan bölgelere, beklenmeyen yoğunlukta immobilizasyona neden olabilmektedir²³. Proteinlerin, reaktif rezidüleri aracılığıyla (lizin, sistin vb), aldehit, epoksi gibi reaktif esterler ile kaplanmış çip yüzeyine kovalent olarak bağlanmasını sağlayan "kovalent bağlanma" yöntemi²², proteinlerin yüzeye güçlü biçimde bağlanmasını sağlasa da, kimyasal gruplardaki değişiklikler nedeniyle proteinlerin spesifik ligandlarına bağlanmalarında ve aktivitelerinde değişimlere neden olabilmektedir (Şekil-6a). Bu iki yöntemin sınırlılıklarını aşmak amacıyla geliştirilen "afinite yakalama" yöntemi, hedef proteine bağlanmış afinite etiketlerinin, daha önceden slayt yüzeyine yerleştirilmiş spesifik liganda bağlanması temeline dayanmaktadır (Şekil-6b). Bu yöntem, protein yapıda minimal hasar, daha standart oryantasyon, çip üzerinde daha iyi korunmuş bir protein yapısı ve daha yüksek bir protein aktivitesi sağlamaktadır²⁴. Ancak, bütün sınırlılıkların üstesinden gelebilen bir immobilizasyon yöntemi henüz geliştirilememiştir.

Özetle, çipleri oluşturacak slaytlar farklı yapılarda olabilmekte, çiplere spotlanacak proteinler değişik şekillerde elde edilebilmekte, farklı yollar ile çip üzerine spotlanmakta ve immobilize edilebilmektedir. Çipin hazırlanması aşamasına ait bu basamakların optimizasyonları, yüzeylere ve reaksiyon koşullarına

Mikroarray Teknolojisi

yönelik tüm durumların optimize ve standardize edilmesini sağlayacaktır.



- Kovalent bağlanma (Kaynak (36)'dan alınarak düzenlenmiştir)
- Afinitive yakalama (Kaynak (36)'dan alınmıştır)

Şekil 6:

İmmobilizasyon yöntemleri

Sinyal oluşturma-amplifikasyon: Protein mikroarray teknolojisinde, yüzey ve reaksiyon koşullarına yönelik tüm durumların optimizasyonu kadar, hibridizasyon sonrası yeterli sinyalin oluşturulması, amplifikasyonu ve tanımlanması da önem arz etmektedir²⁴. Bu amaçla çeşitli tarama-saptama sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemlerin etkinliği, duyarlılıkları, tarama limitleri, çözünürlükleri gibi bazı unsurlara bağlıdır³⁵. Oluşan sinyalin saptanmasını sağlayan, etiket bağımlı - bağımsız tarama yöntemleri bulunmaktadır.

Etiket bağımlı tarama yöntemleri, DNA mikroarraydekine benzer şekilde floresan boyalar, radyoizotoplar gibi etiketlerle test edilecek örneklerin işaretlendiği türdür. Radyoizotoplar ve floresan etiketler dışında, inorganik QDs (Quantum Dots), altın nanopartiküller, ultrasensitif biyobarkodlar gibi etiket bağımlı yöntemler geliştirilmiştir³⁵. Etiket bağımlı yöntemlerin, kullanım kolaylığı, reaktiflerin kolay bulunabilmesi ve kompleks araç-gereç gerektirmemesi gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak, her probdaki reaksiyon şiddetinin DNA mikroarraydeki kadar şiddetli olmaması, proteinlerin yüzey özellikleri gereği etiketlemede yaşanan sorunlar, etiketleme sürecinin fazla zamanışgücü gerektirmesi, toksisite ve işaretleyici maddelerin interferansı gibi bir takım dezavantajları vardır³⁵.

Etiket bağımsız tarama yöntemi, araştırılan proteinlerin sahip olduğu özellikler üzerinden taramanın yapıldığı bir tarama biçimi olup, biyomoleküler etkileşimlerin kinetiğini Real-Time araştırmaya izin vermektedir^{24,35}. Hedef proteine bağlanmış küçük molekülleri yakalayabilme ve yüksek ayırıştırma gücüne sahiptir. Bu konuda, SELDI-TOF (Surface-enhanced laser desorption/ionization-Time Of Flight), SPR (Surface Plasmon Resonance) ve AFM (Atomic Force Microscopy) gibi teknolojiler geliştirilmiştir³⁵. SELDI-TOF yönteminde, protein arraye hibridize olmuş proteinler lazer aracılığıyla iyonize edilir. Her probdan iyonize olan moleküller bir elektrik alan sayesinde hareket özelliği kazanarak, havasız ve içi boş bir tüp içerisinde, molekül yapısına göre değişen hızlarda, dedektöre doğru hareket ederler (Time-Of Flight). Bu moleküllerin dedektöre ulaşma hız ve zamanları birbirlerinden farklıdır. Problara bağlı proteinlerden spesifik şekilde iyonize olan moleküllerin dedektör tarafından algı-

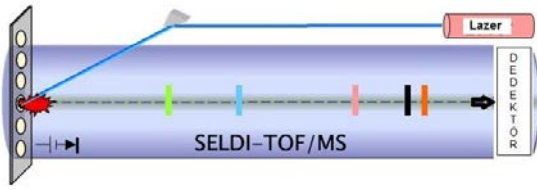
lanma zamanlarından, o proba bağlanan proteinin spesifik parmak izi çıkartılmış olur. Oluşturulan parmak izleri her protein için spesifiktir (Şekil-7a). SPR, polarize ışığın metal yüzeyden yansımalarının dedektörlerce saptanması temeline dayalı bir yöntemdir. Altın gibi bir metal ile kaplanmış slayttan oluşturulmuş çipe alttan polarize ışık gönderilir ve yansıma açısı belirlenir. Problemlerde bağlanma yokken ışık hep aynı açı ile yansır. Ancak, herhangi birinde bağlanma olur ise o probun oluşturduğu yansıma açısı değişir. Yansıma açısındaki sapmanın dedektör tarafından belirlenmesi, o probdaki spesifik bir bağlanmanın kanıtı olur (Şekil-7b). AFM, çip yüzeyindeki topolojik değişiklikleri saptama temeline dayanan bir yöntemdir. Baş kısmında sivri bir uç bulunan manivelanın baş kısmından yansıyan ışık bir dedektör tarafından saptanır. Çip üzerinde dolaşan uç, hibridize bir proteine rastlarsa hareket eder. Hareket eden maniveladan yansıyan ışığın açısı değişir. Işığı farklı açıda yansıtan probu belirleyen dedektör o probdaki spesifik bağlanmayı dolayısıyla da proteini belirlemiş olur (Şekil-7c). Çipin tüm problemlerinin spesifikliğini iyi bilen sistem mikroarray teknolojisi, hibridizasyon gerçekleştirildiğinde, problemlerdeki hibridize proteinleri belirleyerek, test örneği içerisindeki proteinlerin analizini sağlamaktadır.

Protein mikroarrayler sinyal amplifikasyonu-tarama konularındaki eksiklikler ve çip hazırlığı aşamasında karşılaşılan zorluklar aşıldığında daha iyi standardize edilmiş bir yöntem haline gelecek, kullanım alanları genişleyecektir. Bu yöntem kullanım alanlarına göre analitik, fonksiyonel ve ters faz mikroarray olarak sınıflandırılmaktadır³⁶.

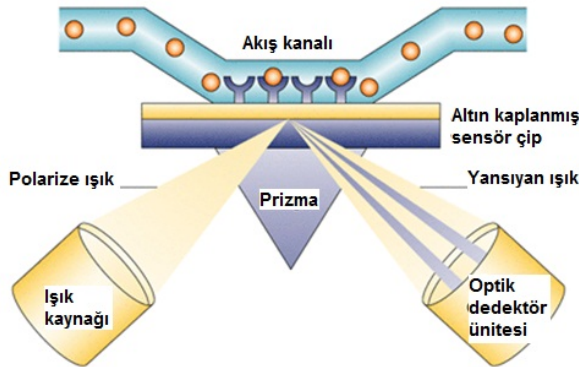
Analitik mikroarray, bir protein karışımı içerisindeki proteinlerin bağlanma afiniteleri, spesifiteleri ve ekspresyon seviyelerini belirlemede kullanılır. Bu teknikte slayt üzerine antikor, aptamer gibi yakalayıcılar spotlanır. En sık kullanılan analitik mikroarray olan antikor mikroarrayler³⁷ daha çok farklı ekspresyon profillerini belirlemek ve klinik tanı için kullanılır.

Fonksiyonel mikroarray, proteinlerin fonksiyonlarını değerlendirmeyi amaçlandığı için tam boyutlu protein ya da protein domain içeren problemleriyle analitik mikroarrayden ayrılır³⁶. Tüm proteomun biyokimyasal aktivitesinin tek bir çalışmada ölçülmesine olanak sağlamanın yanı sıra³⁶, protein-protein, protein-DNA, protein-fosfolipit gibi protein etkileşimlerinin araştırılmasında²⁷ ve klinik tanı/prognoz takibinde önemli yararlar sağlayabilecek biyobelirteçlerin tanımlanmasında kullanılabilir²⁴.

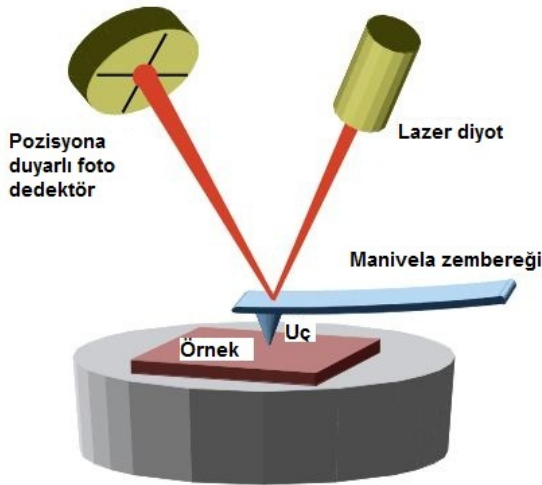
Ters faz mikroarray, hedeflenen dokulardan izole edilen hücrelerin eritilmesiyle elde edilen proteinlerin nitroselüloz slayta spotlanması ile oluşturulan çiplerin kullanıldığı arraydir. Hastalık gibi çeşitli durumlarda değişiklik gösteren proteinlerin ve post-translasyonel modifikasyonların saptanmasında kullanılabilir³⁸.



- a) SELDI-TOF: Surface-enhanced laser desorption/ionization-Time Of Flight
(<http://eng.claudiusregaud.fr/Research/Technology-Platforms/Proteomics> adresinden alınarak düzenlemiştir)



- b) SPR: Surface Plasmon Resonance (Kaynak (39)'dan alınarak düzenlemiştir)



- c) AFM: Atomic Force Microscopy
(<http://www3.physik.uni-greifswald.de/method/afm/eafm.htm> adresinden alınarak düzenlemiştir)

Şekil 7:
Etiket bağımsız tarama yöntemleri

Mikroarray teknolojisi, hibridizasyon ve etiketlemede yaşanan sorunlar, farklı çiplerin eş hassasiyette olması, farklı çiplerle elde edilen sonuçların henüz karşılaştırılamıyor olması, optimizasyon ve standardizasyon sorunları nedeniyle semikantitatif olarak kabul

edilmektedir ve elde edilen sonuçların geleneksel yöntemler ile doğrulanması gerekmektedir. Bu teknolojinin bahsedilen noktalardaki sorunları aşıldığı zaman çok daha yaygın ve etkin kullanılacağı öngörülebilir ve son zamanlarda sorunları aşmak adına geliştirilen yenilikler, gelecek açısından umut veren gelişmeler olarak kabul edilmelidir.

Kaynaklar

1. Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 1995; 270: 467-70.
2. Bednar M. DNA microarray technology and application. Med Sci Monit 2000; 6: 796-800.
3. Yoltaş A and Karaboz İ. DNA Mikroarray Teknolojisi ve Uygulama Alanları. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR 2010; 8: 01-19.
4. Başaran E, Aras S and Cansaran-Duman D. Genomik, proteomik metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. Türk Hijyen ve Besinsel Biyoloji Dergisi 2010; 67: 85-96.
5. Kumar A, Goel G, Fehrenbach E, et al. Microarrays: The Technology Analysis and Application. Engineering in Life Sciences 2005; 5: 215-22.
6. Rockett JC and Dix DJ. DNA arrays: technology, options and toxicological applications. Xenobiotica 2000; 30: 155-77.
7. Southern E, Mir K and Shchepinov M. Molecular interactions on microarrays. Nat Genet 1999; 21: 5-9.
8. Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, et al. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. J Histochem Cytochem 1999; 47: 1179-88.
9. Pirrung MC. How to make a DNA chip. Angew Chem Int Ed Engl 2002; 41: 1276-89.
10. Wiltgen M and Tilz GP. DNA microarray analysis: principles and clinical impact. Hematology 2007; 12: 271-87.
11. Burgess JK. Gene expression studies using microarrays. Clin Exp Pharmacol Physiol 2001; 28: 321-8.
12. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, et al. Expression profiling using cDNA microarrays. Nat Genet 1999; 21: 10-4.
13. de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. Am J Hum Genet 2005; 77: 606-16.
14. Kicic A, Hallstrand TS, Sutanto EN, et al. Decreased fibronectin production significantly contributes to dysregulated repair of asthmatic epithelium. Am J Respir Crit Care Med 2010; 181: 889-98.
15. Booth SA, Drebot MA, Martin IE, et al. Design of oligonucleotide arrays to detect point mutations: molecular typing of antibiotic resistant strains of Neisseria gonorrhoeae and hantavirus infected deer mice. Mol Cell Probes 2003; 17: 77-84.
16. Chervitz SA, Aravind L, Sherlock G, et al. Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: orthology and divergence. Science 1998; 282: 2022-8.
17. Hayward RE, Derisi JL, Alifadhli S, et al. Shotgun DNA microarrays and stage-specific gene expression in Plasmodium falciparum malaria. Mol Microbiol 2000; 35: 6-14.
18. Saleh-Lakha S, Miller M, Campbell RG, et al. Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. J Microbiol Methods 2005; 63: 1-19.

Mikroarray Teknolojisi

19. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-11.
20. Bull TM, Coldren CD, Moore M, et al. Gene microarray analysis of peripheral blood cells in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 911-9.
21. Hiyama E, Yamaoka H, Kamimatsuse A, et al. Single nucleotide polymorphism array analysis to predict clinical outcome in neuroblastoma patients. *J Pediatr Surg* 2006; 41: 2032-6.
22. MacBeath G and Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 2000; 289: 1760-3.
23. Panelli MC and Marincola MM. Cancer Biometrics. In: Lotze M and Thomson A (eds). *Measuring Immunity Basic Science and Clinical Practise*. Great Britain: Elsevier; 2005. page 666-96.
24. Hu S, Xie Z, Qian J, et al. Functional protein microarray technology. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2011; 3: 255-68.
25. Guschin D, Yershov G, Zaslavsky A, et al. Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips. *Anal Biochem* 1997; 250: 203-11.
26. Afanassiev V, Hanemann V and Wolf S. Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E66.
27. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 2001; 293: 2101-5.
28. Phizicky E, Bastiaens PI, Zhu H, et al. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 2003; 422: 208-15.
29. Katzen F, Chang G and Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol* 2005; 23: 150-6.
30. He M, Stoevesandt O and Taussig MJ. In situ synthesis of protein arrays. *Curr Opin Biotechnol* 2008; 19: 4-9.
31. He M, Stoevesandt O, Palmer EA, et al. Printing protein arrays from DNA arrays. *Nat Methods* 2008; 5: 175-7.
32. Roda A, Guardigli M, Russo C, et al. Protein microdeposition using a conventional ink-jet printer. *Biotechniques* 2000; 28: 492-6.
33. Dufva M. Fabrication of high quality microarrays. *Biomol Eng* 2005; 22: 173-84.
34. Hartmann M, Sjudahl J, Stjernstrom M, et al. Non-contact protein microarray fabrication using a procedure based on liquid bridge formation. *Anal Bioanal Chem* 2009; 393: 591-8.
35. Chandra H, Reddy PJ and Srivastava S. Protein microarrays and novel detection platforms. *Expert Rev Proteomics* 2011; 8: 61-79.
36. Hall DA, Ptacek J and Snyder M. Protein microarray technology. *Mech Ageing Dev* 2007; 128: 161-7.
37. Bertone P and Snyder M. Advances in functional protein microarray technology. *FEBS J* 2005; 272: 5400-11.
38. Speer R, Wulfskuhle JD, Liotta LA, et al. Reverse-phase protein microarrays for tissue-based analysis. *Curr Opin Mol Ther* 2005; 7: 240-5.
39. Cooper MA. Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 515-28.

