

Moleküler Biyolojide Yeni Ufuklar: Biyochip Teknolojisi

NEW HORIZON ON MOLECULAR BIOLOGY: BIOCHIP TECHNOLOGY

Şefik GÜRAN*, Cengiz YAKICIER**

* Doç.Dr., GATA, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD,

**Dr., GATA, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, ANKARA

Özet

Biyochip (Biochip) teknolojisi günümüzde biyoloji ile bilgisayar teknolojisini birleştiren önemli bir teknolojidir. Bu teknolojinin farklı örneklerde DNA mutasyonlarının bulunması, gen ekspresyonu düzeylerinin ve anormal proteinlerin belirlenmesinde önemli kullanım alanı vardır. Gelecekte hekimler tarafından daha tedavi planlanmadan hastanın genetik profili bu teknoloji ile bulunacak ve tedavi protokolü oluşturulacaktır. Yine bu teknolojinin adli tıp, ilaç endüstrisi, prenatal tanı, mikrobiyoloji ve kanserde önemli kullanım alanları olacaktır. Yeni gelişen bu teknolojinin rutin klinik hizmetlerinde ve araştırma alanlarında sıklıkla kullanılacağı bilinmektedir. Bu alanda ülkemizin söz sahibi olabilmesi için kendi teknolojimizi geliştirmek ve gelişmiş ülkeler arasına girmek zorundayız.

Anahtar Kelimeler: Biyochip teknolojisi DNA çipleri,
DNA array

T Klin Tıp Bilimleri 2003, 23:416-419

Summary

The biochip technology has a role in collaboration of biology and computer technology. In this technology biochips are used as a device in DNA seeking of mutations, gene expression levels and protein abnormalities in various samples easily. It is obvious that clinicians will use this technology to determine genetic profile of the patients in planning the treatment. It is also a powerful tool in forensic science, drug industry, prenatal diagnosis, microbiology and cancer. As a new developing technique it will have a huge impact in clinical science and research area. To have a word to say in biochip technology we have to develop our technology construct our own place among first world countries.

Key Words: Biochip technology, DNA chips,
DNA array

T Klin J Med Sci 2003, 23:416-419

Biyochip veya mikroçip teknolojisi modern tıptaki en önemli gelişmelerden biridir. Son 15-20 yıl içinde geliştirilen bu teknolojiye bilgisayar teknolojisi ile biyoloji buluşmuştur. Bu teknik ile gelecekte moleküler biyoloji laboratuvarlarında kullanılan elektroforezler, jel hazırlama ünitleri vs. ortadan kalkacak, analizlerin çoğunluğunun mikroçipler üzerinde gerçekleştirileceği bir döneme girilecektir (1). Mutasyon analizlerinin, gen ekspresyonunun ve proteininin aynı anda incelenmesine olanak sağlayan bu teknoloji birçok genin olaya katıldığı olaylarda klasik yöntemlere göre çok avantajlıdır. Bu nedenle ileride geniş bir uygulama alanı bulabilecektir (2,3). Yazımızda bu teknolojinin kullanım alanları, bu teknoloji ile günümüzde yapılanlar, gelecekte bu

teknolojiden beklentiler ortaya konmuştur. Teknolojinin geliştirilmesinde ve kullanılmasında ülkemizin koşulları göz önüne alındığında ne tür politikalar üretilmesi gerekliliği tartışılmıştır.

Genel Tanım

Biyochipler, biyolojik örneklerde incelenmek istenen, binlerce oligonükleotid parçasının dizilmiş olduğu minik, katı destek yüzeyleridir. Kullanılacak materyale göre adlandırılırlar; DNA veya RNA çipleri. Protein çiplerinde değişik antikorlar yüklenmekte ve bu yöntemle farklı antijenlerin tanınması yapılabilmektedir (4). Floresans veya radyoaktivite ile işaretlenen DNA, RNA veya proteinlerin bir solüsyon içinde çip üzerindeki problemler ile hibridize olması ile oluşan sinyaller bir bilgisayar

programı aracılığı ile değerlendirilmekte, belli bir dizideki mutasyon, farklı birçok genin ekspresyon düzeyi veya solüsyonda herhangi bir mikroorganizmaya ait DNA'nın olup olmadığı rahatlıkla tespit edilebilmektedir (4,5). Gelecekte bu teknoloji hastalıklara yatkınlıkta (predisposition) önemli olan gen polimorfizmlerini bulmada, hastalık tablosunun ilerlemesi evrelerinde (progression) etkilenen genlerin aktivitelerinin düzenlenmesinde ve daha etkili tedavi protokollerinin oluşturulmasında rol alacaktır (5). Hastalık genlerinin haritalanması, yeni genlerin bulunması, bilinen bir genin dizi analizinin yapılması, gen ekspresyon düzeyinin belirlenmesi ve genlerin moleküler profilinin ortaya konması çalışmaları bu teknoloji sayesinde çok daha büyük bir hızla gerçekleştirilebilecektir. Farmakoloji ve toksikoloji alanlarında gen düzeyinde ekspresyonların tespiti, genetik hastalıkların tanınması, halk sağlığında koruma, ilk tanı evresinde tıbbi tanı konması rahatlıkla yapılabilecektir (1).

Çalışma Prensipleri

Biyocip teknolojisinin temeli moleküler hibridizasyondur. Bu teknikle hazırlanan bir gen dizisinin (prob) araştırmak istenilen örnekte (DNA, RNA veya protein) komplementlerinin olup olmasının bulunması esasına dayanır. Günümüzde moleküler biyoloji ve genetik laboratuvarlarında sık uygulanan "Southern Blot" (DNA yı incelemeye yönelik metod), "Northern Blot" (RNA yı incelemeye yönelik metod) ve "Western Blot" (Protein incelemeye yönelik metod) gibi yöntemlerle aynı prensiplere dayalı olarak çalışılan yöntemlerdir. Yeni teknolojinin önemli bir avantajı klasik teknikler ile sadece bir yada birkaç genin analizi yapılırken, biyoçiplerin yardımı ile aynı anda binlerce hatta genomdaki tüm genlerin ekspresyon düzeyleri incelenebilmektedir. Bir çok genin mutasyon analizi yapılabilmekte, bütün genomu kapsayan binlerce belirteç-"marker" eşzamanlı olarak analiz edilebilmektedir (4,5,6).

Biyocip Tekniği

Çipler değişik teknikler kullanılarak üretilebilirler. En sık kullanılan metod; RNA ya komplementer olarak hazırlanan DNA moleküller-

rinin (cDNA) robotlar aracılığı ile koordinatları belli olacak şekilde katı bir yüzey üzerine (cam, naylon hibridizasyon kağıdı gibi) kimyasal olarak işlenmesidir. Diğer bir metotta bu komplementer DNA molekülleri yerine oligonükleotidlerin (20-25 bp. lik DNA parçacıkları) kullanılmasıdır. Bu yöntemde oligonükleotidler direk olarak çipler üzerinde sentez edilmektedir. Bu metotta aynı gen için çok sayıda oligonükleotidin kullanılması ve sonuçların birlikte değerlendirilmesi testin güvenilirliği açısından önemlidir. İncelenecek örnek (kan, beyin omurilik sıvısı, tümör gibi değişik dokulardan elde edilen DNA veya RNA molekülleri) floresans veya radyoaktif olarak işaretlendikten sonra amaca uygun çipler ile hibridizasyona bırakılır. Hibridizasyondan sonra etkili bir yıkama prosedürü ile hibridize olmayan işaretli moleküller çip üzerinden uzaklaştırılır. Biyoçip üzerinde kalan aktivite özgün olup uygun bir detektör sayesinde kaydedilir. Sinyallerin büyüklüğü ve lokalizasyonu bilgisayar yardımı ile değerlendirilerek sonuca gidilir (1, 6, 7). Bu teknolojiye problemlerin dizaynı ve hazırlanması en önemli basamaktır. Tüm bunlar moleküler biyolojiyi, istatistiği ve bilgisayarı iyi bilen uzmanlar ile gerçekleştirilmektedir. Gelişen teknoloji ile ana cihazlar daha basit ve ucuz hale getirilirken, araştırılacak her farklı konu için ayrı çip hazırlanması gerekmektedir. Bu da özellikle laboratuvarları, çip üretici firmaya karşı bağımlı hale getirmektedir. Mikroçipler ile ilgili bir diğer önemli problem halen hatalı pozitif ve hatalı negatif sonuçlar ile ilgili sorunların tümü ile çözülememesidir. Bu konu daha iyi düzenlenen çip kombinasyonları ile çözülmeye çalışılmaktadır (8,9).

Çiplerin Uygulama Alanları

Bu teknoloji gerek değişik klinik testlerin gerçekleştirilmesinde gerekse temel biyolojik araştırmalarda geniş uygulama alanları bulmaktadır. Teknoloji hastalıklara yol açan genlere ait mutasyonların tanımlanmasına (FMF, thalasemia gibi), hastalıklarda etkin mikroorganizmalar veya bu mikroorganizmaların genomunun ne değerinde olduğunun bulunmasına olanak sağlayarak (HBV, HCV gibi) hastalıkların kesin tanısının konmasına yardımcı olmaktadır (5,6,7). Gen ekspresyonunu gös-

teren çipler hastalıkların moleküler bazda sınıflandırılabilirliği gösterilmiştir. Klinikte sınıflandırılması zor olan B-hücreli lenfomalarda bu teknoloji ile yeni B hücreli lenfoma alt tipleri ortaya çıkarılmıştır (10). Teknolojinin her alanda kullanılabilir olması ve birçok bölgeyi aynı anda farklı yönleri ile analiz yapabilme avantajı her geçen gün farklı alanlardaki kullanımını arttırmaktadır. Bir çok farklı faktörün ve birçok farklı genin olaya katıldığı kanser olgularında hem gen hem protein düzeyinde biyoçip uygulamaları günümüzde büyük önem kazanmıştır (11). Örneğin farklı kanser tiplerinde etkilendiği bilinen 3p14.2 de yer alan FHIT tümör baskılayıcı geni ve bu bölgeden sentezlenen proteini çip yöntemi ile hastalarda aynı anda araştırılabilmektedir (12). Bu gelişme aynı zamanda moleküler yapıya göre prognoz belirlenmesi ve uygun tedavi rejiminin seçilmesi açısından da klinikte çalışan hekime yardımcı olmaktadır (13). Gelecekte bu teknoloji adli olaylarda daha yaygın kullanılacaktır. Olay yerinden alınan örneklerin (sperm, saç kılı, kan) bir test tüpü içinde DNA profili çıkarılacak, elde edilen sonuçlar anında merkez bilgisayarlarındaki sonuçlar ile karşılaştırılarak olay yerinde suçlu ile ilgili bilgilere ulaşılabilecektir (14). Hastalıklarda rol oynayan genlerin bulunması için yapılan pozisyonel klonlama bu teknik ile çok daha kolaylaşacak, bu metodda kullanılan yüzlerce işaretleyici (marker) bir çip üzerine yerleştirilerek günümüz otomatik dizi analizi cihazlarından çok daha hızlı olarak dizi analizi yapılabilecektir (15). Biyoçip teknolojisi ile kişiye özel tedavi yaklaşımları da yapılabilecektir. Hastalığa yatkınlığı olan bir kişinin öncelikle DNA genotipinin ortaya çıkartılması istenecek, ardından tedavi şemasını oluşturmak için kullanılacak ilaçları metabolize edecek enzimlerin genetik profili çıkarılacaktır. Tüm bu bulgular ile en iyi tedavi protokolünü seçmek mümkün olacaktır (16). Bu konuda en büyük yardımcımız insan genomundaki tek nokta polimorfizmlerinin ortaya konmasıdır (SNP-Single nucleotide polymorphism). Tek nokta polimorfizmleri genomda her 1000-2000 bazda bir bulunan, bir pozisyonunda farklı nükleotidlerin bulunması durumudur (7,17). Halen geniş bir araştırmacı grubu tarafın-

dan oluşturulan bir konsorsiyum insan genomunda yer alan tek nokta polimorfizmlerini-“SNPs” hızla ortaya çıkarmaktadır (16, 18). Ancak burada önemli bir problem ülkemizde yaşayan insanlarımızın gen yapısı ve polimorfizmi halen tam olarak ortaya konulmamış olmasıdır. Günümüzde tek nokta polimorfizmini çalışan grupları destekleyen kuruluşların başında büyük ilaç firmaları gelmektedir. Ülkemiz insanına ait gen yapısının hala ortaya tümü ile konmamış olması, polimorfizmlerin bilinmemesi ya coğrafi olarak bize yakın toplumlara ait bilgilerin kullanılmasını gerekli kılacak ya da bu tür çalışmaların dış kaynaklı firmalar tarafından yapılmasını gerektirecektir Bu da ya teknolojiye yeterince yararlanamama problemini oluşturacak ya da bu teknolojinin bize ulaşacak maliyetini yükseltecektir (19). Bu nedenle toplumumuza ait genetik bilgilerin tümü ile ortaya konması bizim öncelikli görevimiz olmalıdır.

Biyochip teknolojisi halen çok pahalıdır. Zaman içinde bu teknolojinin ucuzlaması söz konusudur. Ancak unutulmamalıdır ki ucuzlama sık rastlanan, rutinde kullanımı fazla olan hastalıklar için (Örneğin meme kanserinde BRCA I gen mutasyonlarının araştırılması gibi) olabilecektir (20). Ülkemizde yüksek oranda akraba evlilikleri bilinen bir gerçektir. Bu durum özellikle otozomal resesif hastalıkların yurdumuzda yüksek oranda gözlenmesine neden olmaktadır. Bu nadir rastlanan genetik hastalıklara ait tanıların konmasında kullanılacak biyoçiplerin fiyatları düşük olamayacaktır.

Tüm bu nedenlerle uygun kullanım alanları olmadıkça ülkemiz için bu teknolojinin transferinde dikkatli olunması gerekmektedir. Özellikle maliyeti karşılamayacak projelerin üretilmesinden kaçınılmalıdır. Geleceğin teknolojisi olan gen teknolojisine, temel bilimlerde önemli araştırmaları yapabilen, bilgisayar donanım ve yazılım teknolojisine sahip, kendine ait ilaç ve tıbbi cihaz firmaları olan ülkeler sahip olabilecek ve teknoloji transferi ile büyük paralar kazanabilecektir. Bu yarışta geri kalmamak için elimizdeki kısıtlı olanakları verimli olarak kullanabileceğimiz projelerin üretilmesine gerek vardır. Bu teknolojinin uygulandığı “teknoloji parkları” açmak, buralarda üniversitelerimiz ile üretimi yapacak kuruluşları bir araya getirmek en

başta düşünülecek bir model olabilir. Üniversite-
rimizde bu alanlar ile ilgili kişilerin yetiştirilmesini
sağlamak, ihtiyaç olacak yeni bölümler açmak
(biyoinformatik “biocomputing” gibi alanlarda),
buradan yetişen kişilerin bu teknolojilerin uygula-
nacağı yerlerde çalışmalarının sağlamak öncelikli
amaç olmalıdır. Aktarılan kaynakların verimli kul-
lanılıp kullanılmadığının denetlenmesi ve hazırla-
nacak bir “master plana” bağlı olarak bunların
düzenlenmesi düşünülebilir. Bu alanda özellikle
ülkemizde sık görülen Talasemi veya FMF gibi
hastalıkların tanısında yararlı olabilecek tarama
programları geliştirilip bunları ülkemizde yaygın
olarak kullanmak ilk hedef olabilir. Geliştirilen
yeni ve ucuz teknolojileri komşu ülkelere başla-
yarak tüm dünyaya pazarlamak da önemli bir eko-
nomik girdi sağlayacak, yapılacak yeni çalışmalara
kaynak oluşturabilecektir.

“Teknolojiyi transfer eden değil, teknoloji üre-
ten bir ülke” olmamız yönünde atılacak öncelikli
adımların içinde bulunduğumuz yüzyıla ait en ö-
nemli gelişmelerin olacağı düşünülen gen teknolo-
jisi alanında olması ülkemiz açısından önemlidir.
Bu nedenle oluşturulacak yeni bilim politikalarına
ve bu alana yönelecek kişilerin teşvik edilmesine
ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Cheng J, Sheldon EL, Wu L, Uribe A, Gerrue LO, Carrino J, Heller MJ, O’Connell JP. Preparation and hybridization analysis of DNA / RNA from E. Coli on Microfabricated bioelectronic chips. *Nature Biotechnology* 1998; 16: 541-6.
2. Sreekumar A, Chinnaiyon AM. Using protein microarrays to study cancer. *Biotechniques*, 2002 Suppl 1 46-53.
3. Ruano JM, Glidle A, Cleary A, Wolmdey A, Aitchison JS, Cooper JM. Design and fabrication of a silica on silicon integrated optical biochip as a fluorescence microarray. *Biosens Bioelectron* 2003, 18 (2-3), 175-84.
4. Rudert F. Genomics and proteomics tools for the clinic. *Curr Opin Mol Ther.* 2000; 2(6): 633-42.
5. Vo-Dinh T. DNA Chips: technology and applications. *Clinical Laboratory International* 2001; 45(6): 12-15.
6. Bertuci F, Loriod B, Tagett R, Granjeaud S, Birnbaum D, Nguyen C, Houllatte R. Puce a ADN: Technologie et applications. *Bull Cancer* 2001; 88(3): 243-52.

7. Gerhold D, Rushmore T, Caskey TC: DNA Chips: promising toys have become powerful tools. *TIBS* 2002; 24: 168-73.
8. Barsky V, Perov A, Takalov J, Chudinov A, Kreindlin E, Sharox A, Katova E, Mirzabekov A. Fluorescence data analysis on gel based biochips. *J. Biomol. Screen* 2002; 7: 247-57.
9. Kim TE, Park SW, Cho NY, Chai SY, Yong TS, Nahm BH, Lee J, Nah G. Quantitative measurement of serum allergen-specific Ig E on protein chip. *Exp. Mol. Med.* 2003; 34: 152-8.
10. T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Staudt LM, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403(6769); 503-11.
11. Sreekuvar A, Chinnuiyon AM. Using protein microarrays to study cancer. *Biotechniques* 2002, Suppl 11 46-53.
12. Askari MD, Miller H, Von-Dihn T. Simultaneous detection of the tumor suppressor FHIT gene and protein using the multifunctional biochip. *Cancer Detect. Prev.* 2002, 26 (5) 331-42.
13. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, Gaasenbeek M, Angelo M, Reich M, Pinkus GS, Ray TS, Koval MA, Last KW, Norton A, Lister TA, Mesirov J, Neuberger DS, Lander ES, Aster JC, Golub TR. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med.* 2002; 1: 68-74.
14. Sinko G. Crime Stopper, *Populer Science* 1999; 1-7.
15. Winston J. Releasing the potential of genetic screening: *Clinical Laboratory International*, 2002; 26 (3): 4.
16. Liljedahl U, Syvanen AC: SNP genotyping. current methods and practical applications. *Clinical Laboratory International* 2002; 26(3): 6-7, 2002.
17. Mullikin SC, Hunt SE, Cole GC, Martimore BJ, Rice CM, Burton J, Matthews LH. An SNP map of human chromosome 22, *Nature* 2000; 407(6803): 123-48.
18. Güran Ş. İnsan genom projesi: Dünyü bugünü ve yarını, *Gülhane Tıp Dergisi* 2001; 43(4); 440-3.
19. Kim JH. Bioinformatics and genomics medicine. *Genet Med.* 2002; 4 (6 Suppl1): 62 S-65S.
20. Lacroix M, Zammata N, Remsele J, Leclercq G. A low density DNA microarray for analysis of markers in breast cancer.

Geliş Tarihi: 22.07.2002

Yazışma Adresi: Dr.Şefik GÜRAN
GATA Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD
ANKARA