

FARMAKOGENETİK/GENOMİK ARAŞTIRMALAR VE TIPTA UYGULAMALARI

Prof. Dr. A. Şükrü AYNACIOĞLU
Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı,
27310 Gaziantep.
Tel: (342) 3600753
E-mail: aynacioglu@gantep.edu.tr

İlaçlarla ilgili araştırmalarda son amaç, ilaçların insandaki yazgısını ve biyolojik sistemlerle etkileşimini öğrenmek ve hastalıklarda bu bilgilerin en uygun biçimde kullanımını sağlamak olsa gerek. Her ne denli, klinik farmakolojinin birçok alanında önemli ilerlemeler sağlanmış olsa da, ilaçlarla tedavi optimum olmaktan uzaktır. Bir ilacın standart (önerilen!) dozda uygulanması birçok hasta için terapötik etki sağlasa da, bazı hastalarda etkisizlik, hatta diğer bazılarında yan/toksik etkiler oluşturmaktadır. Dolayısıyla ilaç yanıtının bireyler arası farklılık göstermesi, klinik uygulamalarda ve ilaç geliştirilmesinde önemli bir sorundur. Bu durum, yetersiz ilaç tedavisi ya da ilaçlara bağlı istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Yetersiz ilaç tedavisi ya da toksik etkilerin ortaya çıkmasından sorumlu başlıca risk faktörleri; ilaç-ilaç etkileşimleri, hastanın yaşı, böbrek ve karaciğer fonksiyonlarının değişmesi ya da diğer hastalıkların varlığı ve yaşam şekli (sigara ve alkol tüketimi gibi)'dir. Bunlardan belki de daha önemlisi, ilaçların kinetiği ve dinamiğini değiştirebilen kalıtsal (genetik) faktörlerdir. İlaçların ve diğer kimyasal bileşiklerin metabolizmasına karışan enzimleri, ilaç transport sistemlerini, ilaç reseptörlerini ve iyon kanallarını kodlayan genlerin polimorfizmleri sonucu ilaç etkinliği değişebilmekte ve ilaçlara bağlı yan etkilerin ortaya çıkmasında rol oynayabilmektedir. Ek olarak söz konusu yapılarıdaki polimorfizmler sonucu bazı hastalıklara yakalanma riski (yatkınlık) artabilmektedir. Bir popülasyonda mutant ya da varyant genler, %1'den fazla sıklıkta bulunuyorsa, buna genetik polimorfizm adı verilir. Bu polimorfizmlerin saptanması, farmakogenetiğin temel araştırma konuları arasındadır.

Bir gen lokusunda, bir birey tarafından taşınan iki alel (genotip) DNA düzeyinde tanımlanabilmektedir. Bu genotipin, ilaçların kinetiği ya da bir reseptörün fonksiyonu üzerindeki etkileri (fenotip) ise çeşitli analitik yöntemlerle saptanabilir. Farmakogenetik alanındaki moleküler çalışmalar, esas olarak sitokrom P450 2D6 (CYP2D6)'nın karakterize edilmesi ve klonlanması ile başlamıştır. ve günümüzde çok sayıda ilaç metabolize edici enzim, ilaç reseptörleri ve çeşitli ilaç transport

sistemlerinin de içerisinde bulunduğu diğer insan genlerinin tanımlanmasıyla genişleyerek devam etmektedir.

İlaç metabolizmasına karışan polimorfik enzimlerden en iyi araştırılmış olanların başında sitokrom P-450 enzimleri (CYP2D6, 2C19, 2C9 gibi) gelmektedir (Tablo 1).

Tablo 1: Genetik polimorfizm gösteren bazı sitokrom P450 enzimler ve substratları

P450 enzimi	Substrat
CYP2C9	Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar, fenitoin, tolbutamid, varfarin, losartan
CYP2C19	Omeprazol, proguanil, diazepam, propranolol, S-mefenitoin, heksobarbital, imipramin
CYP2D6	Antiarritmikler, antihipertansifler, β - blokörler, MAOI, morfin türevleri, antipsikotikler, TAD ve ondansetron, tropisetron, deprenil, perheksilin

İlaçların yaklaşık %25'inin oksidatif metabolizmasından sorumlu sitokrom P450 enzimi, debrizokin 4-hidroksilaz (CYP2D6)'dır. CYP2D6, terapötik indeksi dar ve dolayısıyla ilaç tedavisinin yetersiz kalmasına ya da toksik reaksiyonların daha kolay ortaya çıkmasına neden olabilecek bir çok ilacın metabolizmasında rol oynamaktadır.

CYP2D6 aktivitesi bireyler arası ve toplumlar arası önemli oranda değişkenlik göstermektedir. Toplumlarda yavaş, orta, hızlı ve ultrahızlı CYP2D6 etkinliğine sahip başlıca dört grup birey ayırt edilmektedir. Avrupa toplumlarında CYP2D6 yavaş ve ultrahızlı sıklıkları yaklaşık olarak sırasıyla %7 ve %1'dir. Türklerde bu sıklıkların tam tersi yani yavaş metabolizör sıklığı %1-2 ve ultrahızlı metabolizör sıklığının %8 dolayında olduğu saptanmıştır (Aynacıoğlu ve diğ. 1999). CYP2D6 gen defekti sonucu (yavaş metabolizör), bu enzimle metabolize olan ilaçlar daha yavaş metabolize edileceğinden, ilaçların etki süreleri uzar ve advers etkiler daha kolay

ortaya çıkabilir. Ultrahızlı bireylerde ise, ilaçların terapötik dozlarda uygulanmasıyla yeterli tedavi elde edilmeyebilir ve ilaç dozunun artırılması gerekebilir.

CYP2D6 ve diğeri ilaç metabolize edici enzimler dışında, reseptör, transport proteinleri ve iyon kanalları ile henüz bilmediğimiz moleküllerdeki polimorfizmlerin de ilaç etkinliğini değıştirebilmesi ve bazı hastalıklara yatkınlığı artırabilmesi olasıdır.

Sonuç olarak ilaç metabolize eden enzimlerde, reseptörlerde, transport proteinlerinde, iyon kanallarında vs. polimorfizmler ilaç yanıtını değıştirebilmekte ve bazı hastalıklara yatkınlık konusunda bilgiler vermektedir. Gelecekte, ilaçların etkinliğı ve advers etkileri bakımından ilaç tedavisi bir dizi farmakogenetik testlerle yönlendirilecek ve izlenmesine yardımcı olacak gibi gözlenmektedir.

FARMAKOGENETİK ÇALIŞMALARDA TEMEL YÖNTEMLER

Doç. Dr. Melih Ö. Babaoğlu
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
babaoglu@hacettepe.edu.tr

Farmakogenetik, ilaca yanıt verirlilik veya toksisitenin gelişmesi bakımından bireyler veya çeşitli toplumlar arasında gözlenen farklılıkların oluşumunda genetik faktörlerin katkısını inceler. Bireyde ilaç metabolize edici enzimler, taşıyıcı proteinler ve reseptörlerin genetik varyasyonlarını göz önünde bulundurarak en uygun ilaç veya doz seçimi yapmaya olanak sağlayan farmakogenetik/farmakogenomik yaklaşım giderek daha fazla klinik ve terapötik farmakolojinin ilgi alanına girmekte ve tedavinin bireyselleştirilmesinde önem kazanmaktadır.

İnsan Genom Projesi'nin sonuçlanmasını izleyen yıllarda bilimsel ilgi daha çok genetik varyasyonların haritalarının çıkarılması üzerine yoğunlaşmaktadır. HapMap ve benzeri projelerle haplotip dağılımlarının ortaya konması farmakogenetik çalışmaların çekmektedir. İnsan genom projesi ile ortaya konan 30,000 dolayında gen üzerinde ortalama olarak her 2,000-2,500 nükleotitte bir, bireyler arasında değişikliğe neden olan tek nokta mutasyonu (SNP, single nucleotide polymorphism) olduğu öngörülmektedir. Haritası çıkarılan SNP'lerden hangilerinin farmakogenetik açıdan önemli olduğunun incelenmesi gerekir. Protein yapısını kodlayan ekzonlardaki mutasyonların yanısıra, promoter ve intronlarda bulunan çok sayıdaki genetik varyasyonun ilaç yanıtını değiştirebildiğine ilişkin örnekler giderek artmaktadır.

Geniş çapta, hızlı ve az maliyetle genotipleme yapabilecek moleküler tanı yöntemlerinin kullanılmasıyla tedavi öncesinde ilacın ve dozunun öngörülmesi ve yan etkileri azaltmak farmakogenetiğin gelecekteki amacıdır. Bu yazıda, farmakogenetik araştırmalarda sıkça yer alan genotipleme çalışmalarında kullanılan temel moleküler yöntemler hakkında uygulamaya yönelik bilgi verilecektir. Genotipleme, esas olarak genetik sinyalin çözümlenmesi işlemidir ve elektrofizyolojik deneylere benzetme yapılacak olursa sırasıyla sinyalin filtrelenerek ayrıştırılması (izolasyonu), amplifikasyonu ve içindeki bilginin tanımlanması basamaklarını içerir. Sinyalin diğer biyolojik sinyallerden **ayrıştırılması** işlemi genomik DNA'nın diğer hücre bileşenlerinden izolasyonu basamağını oluşturur. Saf DNA eldesinden sonra sinyalin **büyütülmesi (amplifikasyonu)** yani genom üzerinde incelenecek bölgenin çoğaltılması gerekir. Çoğaltma basamağında gen klonlanması gibi yöntemlere baş

vuruluyor olsa da en sık kullanılan yöntem polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dur. Bu nedenle yazıda bu reaksiyona bağlı yöntemler üzerinde durulacaktır. Genotiplemede son basamak, sinyalin **tanımlanması** yani çoğaltılmış olan gen bölgesindeki genetik bilgi ya da varyasyonun saptanmasıdır. Doğrudan dizi analizi ile gerçekleştirilebilecek bu basamak için bir çok laboratuvar uygulama kolaylığı nedeniyle restriksiyon enzimiyle kesme yöntemini tercih eder. Bazı kaynaklarda RFLP (restriction fragment length polymorphism) olarak da anılan bu yöntem yazının üçüncü bölümünde açıklanacaktır. Bu basamakların herbirinde elde edilen sinyalin **görüntülenmesi** amacıyla da basit şekliyle ürünlerin elektroforez kullanılarak bir jel içinde yürütülmesi ve uygun flüoresan boyalarla işaretlenmesi yöntemi uygulanabilir.

1. Genetik sinyalin ayrıştırılması – Genomik DNA izolasyonu

Hücreden DNA izolasyonunu sağlayan yöntemlerin çoğunun çalışma ilkesi, hücre parçalanması (lisis) sonrasında bir proteaz yardımıyla proteinlerin yıkılması ve nükleik asitlerin yüksek tuz derişimi varlığında satrifüjle çöktürülmesidir. İnsanda hücre kaynağı olarak kullanılan dokular genelde kolay ulaşılabilirliği için kan ve yanak mukozasıdır. Kan içerisindeki lökositler ve mukoza hücreleri içindeki DNA miktarı PCR analizi için fazlasıyla yeterlidir. Klasik DNA izolasyon yöntemleri ve gerekli çözeltiler konuyla ilgili kaynak kitaplarda detaylı olarak anlatılmıştır. Klasik yöntemlerin bir kısmında ekstraksiyon amacıyla fenol, kloroform ve izoamil alkol gibi insan sağlığına ve çevreye oldukça toksik organik maddeler kullanılması nedeniyle laboratuvarında çalışırken ve bu maddeleri atarken özel dikkat gerekir. Uygulamasında toksik madde kullanılmayan yeni yöntemler ve DNA'yı özel filtreler yardımıyla ayrıştıran hazır ticari ürünlerin (kit) kullanımı izolasyon maliyetini artırsa da izolasyona harcanan zamanı oldukça azaltır ve PCR yapmaya yetecek miktar ve kalitede DNA izolasyonuna olanak sağlar. Sonuçta herhangi bir yöntemle izole edilen DNA, saf su veya TE (tris-EDTA) tamponu içinde, eğer yakın zamanda kullanılacaksa 4°C'de, uzun süre saklanacaksa -20°C'de saklanabilir. Elde edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre ile incelenmelidir. 260 nm'de 1 ünite absorbans değeri 50 mikrog/ml DNA miktarına karşılık gelir. 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri birbirine oranlandığında bulunacak değerin ($A_{260/280}$) 2'ye yakın olması (1.7-1.9 aralığında) DNA izolasyonunun başarılı olduğunu gösterir. %50 DNA-%50 protein karışımının $A_{260/280}$ oranının yaklaşık 1.5 olduğu

bilindiğinden 1.7'den küçük değerlerde DNA izolasyon işlemi tekrarlanmalıdır. Çözelti içindeki fazla miktarda protein (genelde hemoglobin) PCR verimini azaltır.

2. Genetik sinyalin büyütülmesi – Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA amplifikasyonu

İncelenecek gen bölgesi DNA polimeraz enzimi kullanılarak PCR uygulamaları ile *in vitro* ortamda çok sayıda kopyalanabilir. Reaksiyonun asıl bileşenleri şunlardır: Genetik yapısı incelenecek bireyin hücrelerinden elde edilen kalıp DNA, DNA polimeraz, oligonükleotid primerler ve enzimin kopyalama işleminde kullanacağı serbest deoksiribonükleozid trifosfatlar (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)'dir. PCR çalışma ilkeleri çok sayıda kaynak kitapta detaylı olarak verilmektedir. Kısaca söz etmek gerekirse, kopyalanma işlemi DNA'nın 94-95°C'ye kadar ısıtılması ile başlar. Bu sıcaklıkta kalıp DNA'nın her iki sarmalı birbirinden ayrılır (**denatürasyon-ayrılma**) ve primerlerin iki sarmal arasında girebilmesi sağlanır. Sıcaklık aniden düşürülerek, çoğaltılacak kalıbın sens ve antisens dizilerine komplementer (tamamlayıcı) olarak tasarlanmış primerlerin hedef bölgelerini tanıması (**bağlanma-annealing**) sağlanır. Kullanılacak bağlanma sıcaklığı primerlerin Tm değerinin (çift iplikli nükleik asit moleküllerinde baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına yol açan sıcaklık derecesi) 2-4°C altında bir sıcaklık değeridir. Ortamda polimeraz varlığında 70-75°C'de her iki primer, 5'-uçlarından 3'-uçlarına doğru uzatılır (**uzama-extension**). Bu üç basamağın defalarca tekrarlanması sonrasında her bir döngü sonunda kalıp DNA iki katına çıkar. Dolayısıyla bu basamaklar 30-40 kez tekrarlanırsa (reaksiyonun tekrar veya döngü sayısı) kalıp DNA teorik olarak 2^{30} - 2^{40} kez çoğalmış olur. Böylece incelenecek bölgenin milyarlarca kez çoğaltılmasıyla PCR ürününün (amplikon) kolay analiz edilmesi olanaklı hale gelir. Yüksek sıcaklığa dayanıklı DNA polimerazların (Taq polimeraz ve benzerleri) bakterilerden elde edilmesi sayesinde her döngüde reaksiyona tekrar enzim eklenmesi gerekliliği ortadan kalkmış ve tüm basamaklar ısı döngü aygıtları (thermal cyclers) yardımıyla kolaylıkla yapılabilir hale gelmiştir. Tipik bir PCR için gerekli bileşenler ve miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Genelde 100-600 baz çifti büyüklüğündeki ürünleri elde etmek için 20-25 nükleotid uzunluğundaki primerlerle yapılan PCR işleminde her bir döngü, 94-95°C'de 30-60 saniye denatürasyon, 55-60°C'de 30-45 saniye bağlanma ve 72°C'de 45-60 saniye uzama basamaklarından oluşur (Şekil 1). Zincirleme yapılan 30-40

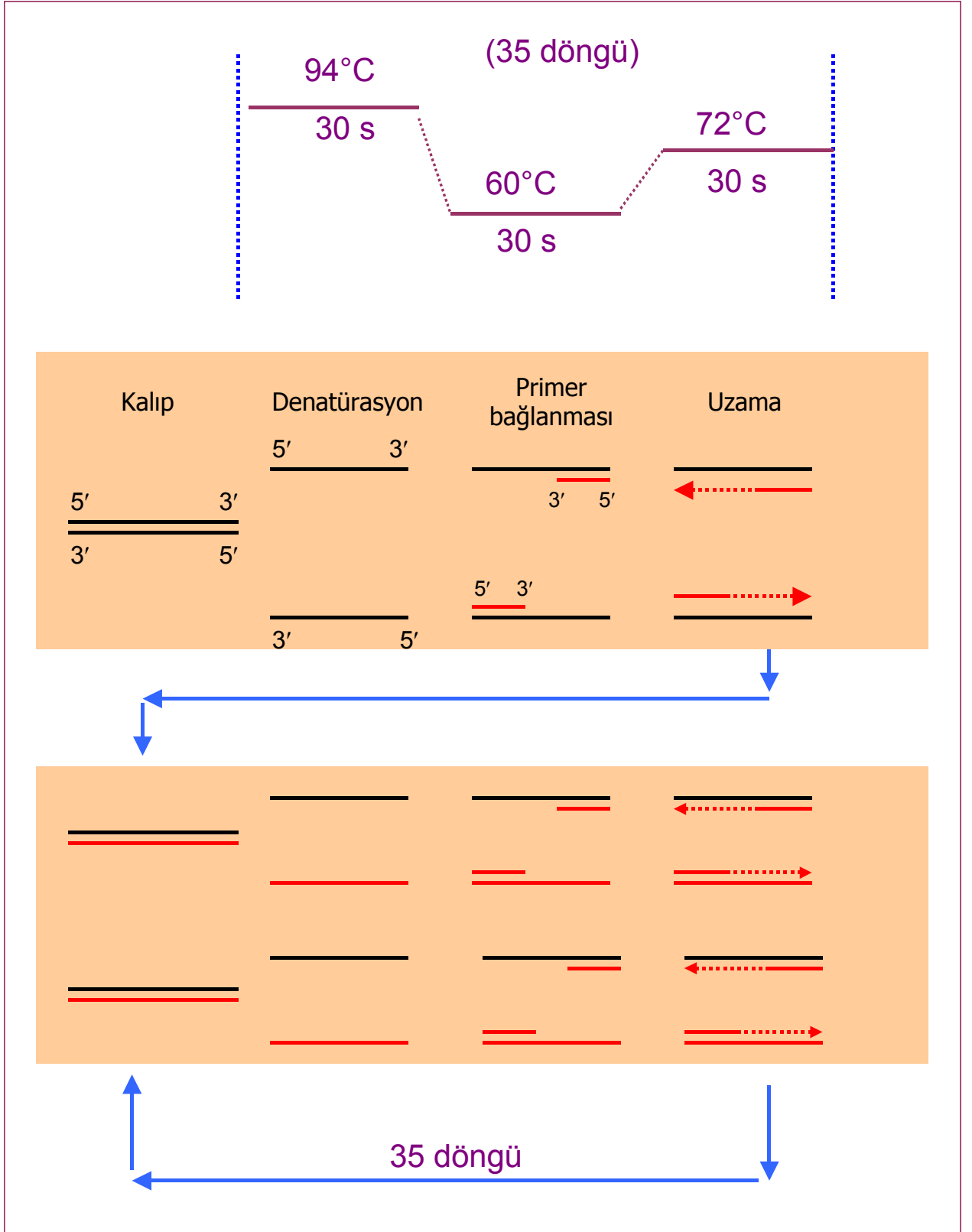
döngünün en başında bir defalığına reaksiyon tüpünün 94-95°C'de 3-5 dakika tutulması denatürasyonu artırdığı için gereklidir. Döngülerin sonunda da tüpün 72°C'de 5-10 dakika tutulması reaksiyon karışımında bulunan yarım kalmış ürünlerin uzamasına olanak sağlar.

Tablo 1: Tipik bir PCR tüpünün içeriği

Bileşen	Reaksiyon tüpündeki (50 µl) konsantrasyon
5 µl 10X Taq buffer	1X
2-10 µl MgCl ₂ (25 mM stok çözelti)	1-5 mM
5 µl dNTP karışımı (her birinden 2 mM)	200 µM (her biri)
0.5-1.25 µl Primer 1 (20 µM stok çözelti)	0.2-0.5 µM
0.5-1.25 µl Primer 2 (20 µM stok çözelti)	0.2-0.5 µM
0.25-0.50 µl Taq polimeraz	1.25-2.5 ünite
1-4 µl genomik DNA	(1-1000 ng)
Distile su (hacmi 50 µl'ye tamamlayacak miktar)	

2.1 Oligonükleotid primerler

PCR'da kullanılacak primerler, genom üzerinde sadece tek bir bölgeyi komplementer olarak tanımalıdır. Aksi halde, incelenecek gen bölgesi dışında bir başka genomik bölgenin de çoğaltılması kaçınılmazdır. Teorik olarak, 17-18 nükleotidden oluşan bir primer çifti DNA üzerinde tek bir bölgeyi tanıyacak kadar özgüldür. Yine de PCR'da çoğunlukla 20-28 nükleotid uzunluğunda primer dizinleri kullanılır. Günümüzde PCR'da kullanılacak primer çiftleri ticari firmalarca hızlı bir şekilde sentezlenmekte ve kullanıcılara ulaştırılmaktadır. PCR'dan iyi bir verim almak için çözme ve saklama aşamalarında üretici önerilerine uymak önemlidir. Primerler tasarlanırken şu özelliklere dikkat edilmesi PCR verimini artırır:



Şekil 1: Örnek bir PCR işleminde reaksiyon basamaklarının şematik gösterimi

- i) Primerde dört bazı (A, C, G ve T) içeren dNTP olabildiğince eşit ve heterojen sırada kullanılmalıdır.
- ii) Tek veya iki bazın yan yana uzun tekrarlarından kaçınılmalıdır
- iii) Bir primerin kendi içinde komplementer bazlar içermemesine dikkat edilmelidir. Bu durumda primer kendi üzerine kıvrılıp sekonder yapı oluşturur polimeraz tarafından uzatılır.
- iv) Primer çiftinin 3'-uçlarının birbirlerine komplementer olmamasına dikkat edilmelidir. Aksi halde her iki primer birbirine bağlanır (primer-dimer oluşumu) ve polimeraz bu dimerleri uzatır. Kalıp DNA'ya primer bağlanması azalacağı için PCR verimi azalır.
- v) Primerin insan genomu üzerinde yalnızca tek bir bölgeyi tanıdığından emin olunması için internet aracılığı ile (örneğin BLAST kullanarak) insan genomu üzerindeki özgüllüğünün denenmesi önerilir.

Primerler su veya TE (Tris-EDTA) tamponu içinde çözüldükten sonra -20°C'de saklanmalıdır. Hazırlanan yoğun çözeltinin birkaç ayrı tüpe bölünerek saklanması PCR'da kontaminasyonun önlenmesi için önerilir.

2.2 DNA polimeraz ve tampon çözeltisi:

PCR işleminde ısıya karşı dayanıklı olan bakteri kaynaklı DNA polimerazlar kullanılır. Bunlardan en bilineni Taq polimeraz adlı enzimdir. Taq, 70-75°C'de en hızlı çalışır ve primerlere saniyede ortalama 100 nükleotid ekler. Farklı bakterilerden elde edilmiş değişik türde ve daha pahalı enzimler (Pfu, Vent, Amplitaq, v.b.) tam doğru baz eşleşmesinin gerektiği deneylerde için kullanılabilir. Taq enziminin hata düzeltme (3'-uçtan 5'-ucuna ekzonükleaz) aktivitesi bulunmadığı için diğer enzimlere göre görece yüksek oranda (ortalama 9,000 baz çiftinde 1) hatalı baz ekleme olasılığı vardır. Ancak genotiplemede bu özellik nadiren bir soruna yol açar. Çünkü işlem, tek bir DNA molekülünden değil yüzlerce aynı molekülünden başlar. Yanlış baz eklenmiş PCR ürünü teorik olarak toplam PCR ürününün binde bir kaçını geçmez ve bu da saptanma sınırının altında kalır.

Taq polimeraz -20°C'de enzimin donmasını engellemek amacıyla %50 gliserol içeren çözeltiler içinde ve bir mikrolitresinde 5-10 ünite (Ü) olacak şekilde sağlanır. Tercih edilen polimerazın en uygun çalışacağı tampon çözelti genelde üretici firma

tarafından enzim ile birlikte kullanıcıya ulaşır. Bu tamponun içinde genelde Tris, magnezyum (Mg), çeşitli deterjanlar ve tuzlar bulunur.

Bazı üreticiler magnezyumu ayrı olarak sağlarlar. PCR verimini en çok etkileyen etmenlerden biri reaksiyon ortamındaki serbest Mg^{2+} derişimidir. Taq aktivitesi için ortamda serbest Mg^{2+} iyonu bulunması gerektiğinden ve serbest nükleotidler ortamdaki Mg^{2+} iyonuyla şelat yapabildiği için reaksiyondaki Mg derişiminin deneme yanılma ile en uygun düzeyde tutulması gereklidir.

Uygulamaya yönelik hatırlatılması gereken bir nokta Taq enziminin çok sayıda firma tarafından üretilmekte olduğu ve fiyatları arasında büyük farklılıklar bulunabildiğidir. Üretim aşamasında enzim-tampon uygunluğu tam sağlanamamış ve kalite güvencesi olmayan ürünler kullanıldığında PCR veriminin düşük kalması araştırmacı için fazla vakit kaybına neden olabilir.

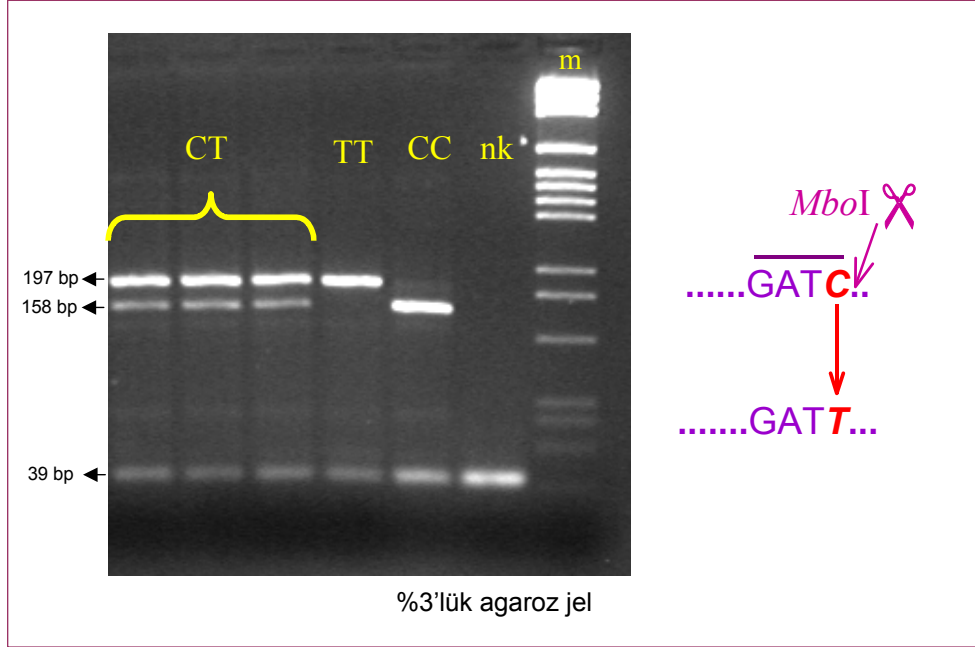
2.3 Nükleotidler:

Polimerazın kalıp DNA'yı çoğaltırken kullanacağı serbest deoksiribonükleozid trifosfatlar (dNTPler) yüksek saflıkta ayrı tüpler içinde ya da dATP, dCTP, dGTP ve dTTP bileşenlerinin eşit orandaki karışımları halinde ticari olarak sağlanır. Derişimi yüksek olan dNTP çözeltisi kullanılmadan önce seyreltilmelidir. Seyreltilmiş çözeltinin ayrı tüplere aktararak $-20^{\circ}C$ 'de saklanması kontaminasyonu önleme açısından önemlidir. PCR için dikkat edilmesi gereken önemli konulardan biri reaksiyon tüpü içerisinde her dört nükleotidden eşit derişimde bulunmasıdır. Aksi halde reaksiyon verimliliği düşebilir ve polimerazın yanlış baz ekleme olasılığı artabilir.

3. Genetik sinyalin tanımlanması – Endonükleaz kesimi ile mutasyon saptanması

PCR ile çoğaltılmış genetik sinyalin hangi şifreyi taşıdığı doğrudan dizi analizi (sekanslama) ile saptanabilir. Ancak farmakogenetik çalışmalarda amaç genelde daha önce saptanmış bir mutasyonun (çoğu kez tek nükleotid polimorfizmi "SNP") geniş toplum örneklerinde taranması ve ilaç etkisi-SNP ilişkisinin incelenmesidir. Tek nokta mutasyonlarının saptanmasında restriksiyon endonükleazların kullanılması uygulama kolaylığı, temel laboratuvar aygıtlarının yeterli olması ve görece ucuzluğundan dolayı sık tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, PCR ile çoğaltılan bölge içerisinde kalan bir noktada bulunan tek baz derişimi (örneğin 10 bireyde saptanan guaninin yerini bir başka 10 kişide timinin alması) o bölgenin spesifik bir

restriksiyon enzimi ile tanınmasını engeller. Kesim reaksiyonu sonrasında oluşan ürünlerin agaroz jel üzerinde yürütülmesinden sonra oluşan bant paterni incelenerek bireyde mutasyon olup olmadığı saptanabilir (Şekil 2).



Şekil 2. Restriksiyon enzimi *MboI* kullanılarak insanda ilaç taşıyıcı protein MDR1'i kodlayan gende (*ABCB1*) C3435T genetik varyasyonunun ve bireylerin genotiplerinin saptanması. Bireyin genomik DNA'sında 3435. pozisyonda sitozin bazı (C) bulunuyorsa 197 baz çifti (bp) uzunluğundaki PCR ürünü enzim tarafından kesilmekte, timin varlığında ise bu kesim noktası kaybolmaktadır. Kesim ürünlerinden biri olan 39 bp uzunluğundaki parça primer dimer bandı içinde gözlenmektedir nk: negatif kontrol, m: moleküler büyüklük belirteci (8 numaralı kaynaktan alınmıştır)

Ticari olarak sağlanan yüzlerce restriksiyon enzimi bulunur. Bu enzimler de Taq polimeraz gibi gliserol içeren tamponlarda ve -20°C 'de saklanmalıdır. Enzimin çalışma tamponları da enzimle birlikte genelde 10X konsantrasyonunda sağlanır. Genelde 10-20 mikrolitre PCR ürününün 1 mikrolitre (4-5 Ü) endonükleaz varlığında en az beş saat uygun sıcaklıkta inkübasyonu kesimin tamamlanması için yeterli olur. Reaksiyon tüpündeki tüm bileşenlerin (PCR ürünü, enzim, tampon çözelti ve distile su) pipet ucu yardımıyla 5-10 kez çekilerek karıştırılması kesim işlemiyle doğru genotipleme sonucu alınması açısından önemlidir.

4. Genetik sinyalin görüntülenmesi – DNA elektroforezi

Çözünmüş durumdaki yüklü moleküller bir destek doku içine (jelle) yüklenip elektrik akımı altında yürütülürse büyüklükleri, yükleri ve biçimlerine göre farklı

hızlarda hareket ederler. Elektroforez olarak bilinen bu yöntemle yukarıdaki her üç basamakta da elde edilen ürünler (genomik DNA, PCR ürünü ve endonükleaz kesim ürünü) görüntülenebilir. Moleküler uygulamalarda genelde agaroz ve poliakrilamid jeller kullanılır. Akriamid monomerleri nörotoksik olduğu için jel hazırlanırken dikkat edilmelidir. Genotiplemede çoğu durumda agaroz jel kullanımı yeterlidir. DNA izolasyonunun başarılı olup olmadığını görmeyen en basit şekli %0.8-%1'lik (100 ml sıvı içinde 0.8-1 gram) agaroz jel içinde yürütmektir. Benzer şekilde PCR ürünü alınıp alınmadığı PCR sonunda tüpten alınacak 10-20 mikrolitrelik bir örneğin %1-2'lik agaroz jel içinde yürütülmesi ile anlaşılabilir. PCR sonrası endonükleazla kesim ürünlerinin analizi ise daha yoğun hazırlanmış (%3-6'lük) agaroz jellerde yapılır. Kesim ürünleri bu yoğunlukta 1-2 saat yürütülme sonrasında birbirinden ayrılır. Agaroz ile yoğunluğu %4-6'dan daha fazla olan jel hazırlamak çok zordur. Bu nedenle ayrımı yapılacak DNA moleküllerinin boyutları küçük veya büyüklükleri birbirine çok yakın ise poliakrilamid jel kullanılmalıdır. Bu bölümde, laboratuvar uygulamalarında daha sık kullanılan agaroz jeller üzerinde durulacaktır.

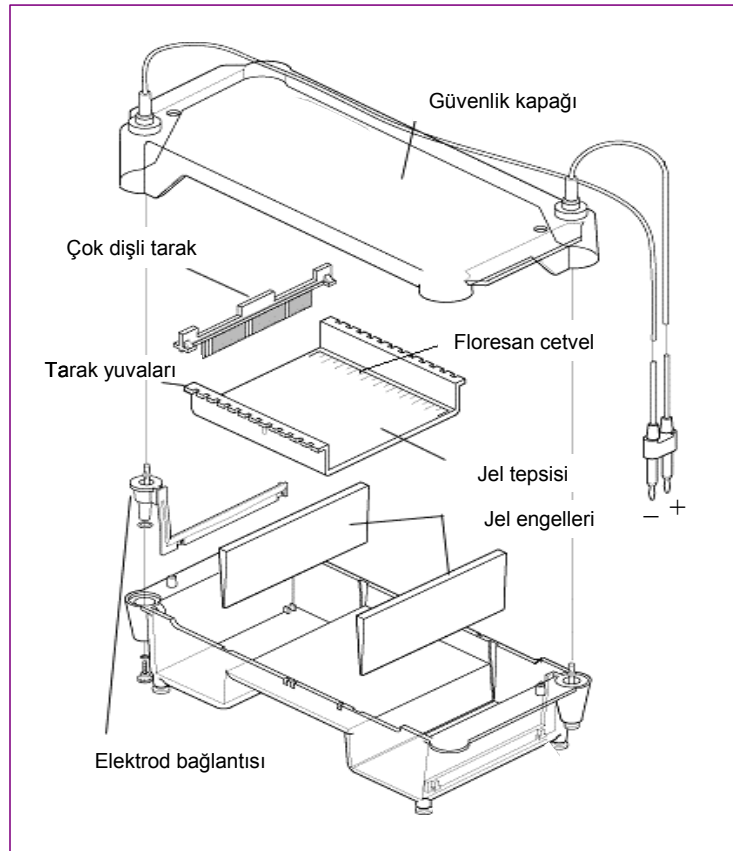
Agaroz katı halde toz olarak temin edilir. Jel hazırlanırken bir tampon çözelti içinde yüksek sıcaklıkta kaynatılarak (örneğin bir mikrodalga fırın içinde) eritilir. Hazırlanan eriyik yatay elektroforez tepsisine dökülerek yarı katı duruma geçip jel oluşturana dek soğumaya bırakılır. Eriyik jel tepsi içine dökülmeden önce örneklerin yükleneceği kuyucukların oluşması için çok dişli bir tarak tepsi üzerindeki yuvasına yerleştirilmelidir (Şekil 3). Agarozun olabildiğince saf olması jel kalitesini artırır, ancak maliyeti yükseltir. %0.5-2 aralığındaki yoğunlukta hazırlanacak jeller için saf agaroz yeterli iken %3-6 yoğunlukta hazırlanacak jellerin hazırlanmasında ise daha yüksek nitelikte olan ve bu amaçla üretilen düşük sıcaklıkta eriyen (low-melting) agaroz kullanılmalıdır.

Elektroforez tankının içine konulacak elektrolit sıvısı olarak genelde TAE (tris-asetik asit-EDTA) ve TBE (tris-borik asit-EDTA) çözeltileri kullanılır. Bu çözeltilerden 10 katlık (10X) veya 5 katlık (5X) bir stok solüsyonu hazırlayıp gerektiğinde 0.5X-1X derişimine kadar distile su ile seyreltmek daha kolaydır. 5X derişiminde TBE tamponunun içeriği Tablo 2'de verilmiştir. TBE tamponu kullanılırken dikkat edilmesi gereken bir nokta, agarozu eritmek için kullanılacak çözelti ile elektroforez tankına konulacak çözeltinin aynı olması gerekliliğidir. Farklı zamanlarda hazırlanmış çözeltiler kullanılırsa elektroforez düzgün ilerlemeyebilir.

Tablo 2. Beş kat konsantre (5X) TBE (tris-borik asit-EDTA) tamponu (pH = 8.13-8.23)

<i>Tuz</i>	<i>Miktar (g/L)</i>
Tris-baz	54
Borik asit	27.5
EDTA	3.72

Jel içinde yürütülen DNA'nın gözlenmesi veya görüntülenmesi için DNA molekülünün uygun şekilde boyanması gerekir. Bu amaç için en sık etidyum bromür (EtBr) kullanılır. EtBr DNA bazları arasında girer ve ultraviyole ışık altında flüoresan ışık yayar. Bu madde jelin içine agaroz eritilirken eklenebilir veya elektroforez sonrası jel, EtBr içeren bir solüsyonda bekletilebilir. EtBr mutajen olduğu için bu işlemler sırasında EtBr içeren buharın solunmaması ve deriye temas etmemesi için gerekli önlem alınmalıdır. Etidyum bromür ile işaretlenmiş DNA molekülleri ultraviyole ışık kaynağı olan transilüminator üzerinde gözlenebilir ve fotoğraf makinası aracılığı ile kaydedilebilir.



Şekil 3. Yatay elektroforez aparatı (resim internetten alınmıştır).

4. PCR uygulamalarında kontaminasyondan korunma

PCR işlemi güçlü bir amplifikasyon yöntemi olduğundan hedeflenen DNA molekülü dışında bir başkasının reaksiyon tüpüne az miktarda olsa bile bulaşması yanlış DNA'nın çoğaltılmasına neden olur. Genotipleme sonuçlarının hatalı olmaması için PCR sırasında kontaminasyon (veya çapraz kontaminasyon) olmadığından emin olunması gerekir. Kontaminasyon genelde ortamdaki havada aerosol halinde asılı kalan veya kullanılacak pipet ucu veya tüp üzerine daha önceki bir PCR denemesi sırasında bulaşan ampikonun yeni PCR tüpü içine (ya da daha kötüsü, kullanılacak stok çözelti tüplerinden biri içine) girmesi ile ortaya çıkar. Kontaminasyon olması araştırmacı için oldukça fazla zaman kaybına yol açar. Bu nedenle her PCR denemesinde içinde kalıp DNA hariç tüm PCR bileşenlerinin bulunduğu en az bir negatif-kontrol tüpü eklenmelidir. Kontrol tüpünde PCR ürününün görülmesi, reaksiyon bileşenlerinden biri veya birkaçı içine yabancı DNA karıştığını gösterir. Bu durumda kontaminasyon giderilene kadar genotiplemeye devam edilmemelidir. yapılmamalıdır. Kontaminasyonu önlemek veya görüldüğünde hemen kurtulmak için uygulanabilecek bazı önlemler Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3: PCR işleminde kontaminasyonu azaltma amaçlı bazı öneriler

PCR yapılacak ortamın elektroforez ve kesim yapılan ortamdaki farklı olması

Kullanılacak çalışma alanı, tüp ve pipetlerin çalışmadan önce alkol ile temizlenmesi
Reaksiyonun hava sirkülasyonlu özel bir kabin içinde yapılması ve PCR öncesinde en az 30-60 dakika ultraviyole ışık kaynağının açık bırakılması
PCR'da kullanılan pipet ve pipet uçlarının diğerlerinden ayrı tutulması, aerosol filtresi olan pipet uçlarının kullanılması

Tüm denemere negatif-kontrol tüpü eklenmesi

Deney sırasında sık eldiven değiştirilmesi, pudrasız eldiven kullanılması

PCR'da kullanılacak stok çözeltilerin hazırlanma aşamasında farklı tüplere bölünerek saklanması (böylelikle bir bileşenden şüphelenildiğinde bileşenin tümü yerine bir kısmı atılmış olacaktır)

Kalite güvencesi veren firmaların ürünlerinin kullanılması

Konuyla ilgili bazı tanımlar:

Alel: Bir genin, DNA dizilim farklılığı olan değişik biçimleri.

DNA klonlaması: Bir DNA dizisinin moleküler biyolojik yöntemlerle in vivo ya da in vitro olarak çoğaltılması.

Ekspresyon (ifade): DNA'dan RNA kodlanması sonrasında protein sentezi yapılması

Ekzon: Bir gende aminoasitleri kodlanan DNA bölgesi

Ekzonükleaz aktivitesi: Polinükleotid zinciri kesen enzimatik aktivite

Fenotipleme: Bireyin genotipinin (çevresel etmenlerin de katkısı ile) dış görünümüne veya biyokimyasal/işlevsel özelliklere ne şekilde yansıdığına belirlenmesi

Genotipleme: Bir özellik için bireyin genetik yapısının belirlenmesi

Genom: Tüm genetik bilgiyi kapsayan DNA yapısı

İntron: Ekzonlar arasında bulunan aminoasit kodlaması yapmayan DNA bölgesi

Kesim (restriksiyon) enzimi: Özgün bir DNA dizisini tanıyarak bu bölgeden DNA'yı kesen enzim

Nükleotid: Bir baz , beş karbonlu şeker ve fosfat grubundan oluşan ve nükleik asitlerin alt birimini oluşturan molekül.

Oligonükleotid: Genellikle 10-200 nükleotidden oluşan kısa nükleik asit molekülü

Promoter (körük) bölgesi: Bir genin başlangında, ilk ekzonun 5' ucunda bulunan ve ekspresyonu düzenleyen bölge

Kaynaklar:

1. Molecular Biology of the Cell - Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K ve Walter P. Garland Science, 4. Baskı, 2002.
*Serbest erişim, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/> sayfasından.
2. Recombinant DNA - Watson JD, Gilman, M, Witkowski J ve Zoller M. Scientific American Books, 1992.
3. Molecular Cloning: A Laboratory Manual - Sambrook J, Fritsch EF ve Maniatis T, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3 Cilt, 1989.
*İlgili web sitesi <http://www.molecularcloning.com/>.
4. http://www.genome.ou.edu/protocol_book/
*(University of Oklahoma Advanced Center for Genome Technology)
5. Mutation Detection - Cotton, R.G., Oxford University Press, 1997
6. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler – Temizkan G, Arda N, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, 2004.

Yazarın konu ile ilgili yayınları:

7. Babaoglu MO, Yigit S, Aynacioglu AS, Kerb R, Yurdakok M, Bozkurt A - Neonatal jaundice and bilirubin UDP-glucuronosyl transferase 1A1 gene polymorphism in Turkish patients.
Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2006 Apr;98(4):377-80.
8. Babaoglu MO, Bayar B, Aynacioglu AS, Kerb R, Abali H, Celik I, Bozkurt A - Association of the ABCB1 3435C>T polymorphism with antiemetic efficacy of 5-hydroxytryptamine type 3 antagonists.
Clin Pharmacol Ther. 2005 Dec;78(6):619-26.
9. Allabi AC, Gala JL, Horsmans Y, Babaoglu MO, Bozkurt A, Heusterspreute M, Yasar U - Functional impact of CYP2C95, CYP2C96, CYP2C98, and CYP2C911 in vivo among black Africans.
Clin Pharmacol Ther. 2004 Aug;76(2):113-8.
10. Babaoglu MO, Yasar U, Sandberg M, Eliasson E, Dahl ML, Kayaalp SO, Bozkurt A - CYP2C9 genetic variants and losartan oxidation in a Turkish population.
Eur J Clin Pharmacol. 2004 Jul;60(5):337-42.
11. Dericioglu N, Babaoglu MO, Saygi S, Bozkurt A, Yasar U - Warfarin resistance with poor CYP2C9 activity and CYP2C9*1*2 genotype.
Ann Pharmacother. 2004 May;38(5):899.
12. Babaoglu MO, Ocal T, Bayar B, Kayaalp SO, Bozkurt A - Frequency and enzyme activity of the butyrylcholinesterase K-variant in a Turkish population.
Eur J Clin Pharmacol. 2004 Feb;59(12):875-7.

GENOTİPLEME ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN İLERİ TEKNOLOJİK YÖNTEMLER

Prof. Dr. Mehmet Arikaşifoğlu
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Bilim dünyası temel olarak yaşamın nedenlerini araştırır. Neden varız? Evrim basamaklarının en yukarısındaki insan ve diğer canlıların yaşam şifresi DNA molekülünde gizlidir. Bu inanışla genetik bilimi DNA'nın yapısını, fonksiyonlarını ve hastalıklarla olan ilişkilerini araştırmaktadır. Son elli yıldaki gelişmeler : 1950 ' yıllar DNA molekülünün yapısının ortaya konması, 1970 'li yıllar Rekombinant teknolojileri ile DNA'nın çoğaltılarak analiz edilmesi, 1990'lı yıllar İnsan Genom Projesi ile DNA'nın tüm baz dizisi ve genler, 2000'li yıllar nano teknoloji ve biyoinformatik ile yüksek çözünürlükte fonksiyonel genomik bilgiye ulaşılmasıdır.

Genetik hastalıklar, 1) Kromozomal hastalıklar (Down Sendromu, Turner sendromu) 2) Tek gen hastalıkları (Frajil X ,fenilketonüri) 3) Multifaktöryel hastalıklar (konjenital kalp hastalıkları,yarık damak/dudak; tip II diyabet, koroner kalp hastalıkları, kanserler) olarak gruplandırılır. Bu hastalıkların ortaya çıkmasındaki temel neden DNA yapısının değişmesidir.

MUTASYON

DNA molekülünde meydana gelen nükleotid değişimlerine veya yeni düzenlenimlere "mutasyon" adı verilir. Mutasyon tipleri 1. Genom Mutasyonları (anöploidi) 2. Kromozom Mutasyonları (translokasyon, delesyon) 3. Gen Mutasyonlarıdır. İlk iki mutasyon sonucu kromozom hastalıklarına neden olur. Gen mutasyonları ise tek gen ve multifaktöryel hastalıklar ile birlikte görülür. Gen düzeyindeki bu mutasyonları şu şekilde sınıflandırabiliriz:

1. Nükleotid Değişimleri (Nokta Mutasyonları)
 - a. Yanlış anlamlı (missense) mutasyonlar
 - b. Anlamsız (nonsense) mutasyonlar
 - c. "RNA splicing" mutasyonları
 - d. "RNA processing" mutasyonları
 - e. Regülatör bölge mutasyonları
2. Delesyon
3. İnsersiyon

4. Duplikasyon
5. İnverson
6. Üçlü tekrar dizi mutasyonları

POLİMORFİZM

Toplumlarda normal kişilerde genomik DNA'nın tek baz çiftlik pozisyonunda farklı sekans alternatiflerinin (allel) bulunmasıdır. Toplumda % 1' den daha sık gözlenen DNA varyasyonlarıdır.

a. Protein polimorfizmi (Kan grubu antijenleri (ABO)

b. DNA polimorfizmi

İnsanlarda 4 temel SNP tipi sıklığı eşit değildir.

Tahminen 2/3'ü C ↔ T (G ↔ A) şeklindedir.

DNA polimorfizmleri; Mendel kurallarına göre aktarılır. Genlerin protein kodlayan ve kodlamayan bölgelerinde meydana gelebilir. Mutant gen içinde veya yakınında oluşan polimorfizm mutant genin gelecek kuşaklara geçişini gösterir. DNA polimorfizm tipleri: Tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP); Restriction fragment length polymorphism(RFLP); Minisatellite (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR); Microsatellite (Short Tandem Repeats, STR) Polimorfizm analizleri birçok alanda kullanılmaktadır: Adli tıp; Hastalık tanısı; Doğum öncesi (prenatal) tanı; Genetik haritalama (Linkage Analysis); Farmakogenetik (kişiye özgü tedavi); İmmunogenetik; Nutrigenetik.

MOLEKÜLER GENETİK YÖNTEMLERİN KULLANIM ALANLARI

Genlerin tanımlanması: Haritalama / Yapı / Fonksiyon; Popülasyon genetiği: Toplumların genetik yapısı ve hastalık ilişkisi; Klinik genetik : Prenatal ve postnatal tanı taşıyıcı tesbiti; Tedavi : Farmakogenetik, hücresel tedavi; Biosentez: İnsülin, interferon, v.b.

Bilinen mutasyonların analizinde: PCR ürününün agaroz veya poliakrilamid jellerde direkt analiz; PCR/RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR products); ARMS (Amplification of Refractory Mutation System); DOT BLOT ; DNA Dizi Analizi; DNA Mikroarray yöntemleri kullanılabilir. Yeni mutasyonların saptanmasında ise bu yöntemlere ilave olarak: SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism); DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis); HD (Heteroduplex

analysis);CCM (Chemical Cleavage Method);EMC (Enzyme Mismatch Cleavage);RNaz enzim analizi yer almaktadır.

BİYOİNFORMATİK

Hızlı DNA analiz yöntemleri çok çeşitli türlerin genomlarının DNA dizilerinin belirlenmesini sağlamıştır. Ancak inanılmaz bir hızla ve miktarda biriken bu verileri saklamak ve analiz etmek giderek zorlaşmıştır. Bilgisayar biliminin giderek artan ivmelenmeyle biriken bu verilerin dikkatli bir şekilde saklanması, düzenlenmesi, birleştirilmesi, kataloglanması ve kolayca erişilmesinde katkısı büyük olmuş ve biyoinformatik bilimi böylece doğmuştur.

Biyoinformatik: biyoloji, bilişim teknolojisi ve bilgisayar bilimlerini bir araya getiren bir bilim dalıdır. Günümüzde birçok biyolojik veriye aynı anda ulaşımı sağlayan, yeni verilerin kullanıcılar tarafından girişi ya da değiştirilmesi ile ilgili oldukça karmaşık altyapıya sahip veri tabanlarının oluşturulması bu bilim dalını daha kapsamlı çalışmalara yöneltmiştir. Önümüzdeki yıllarda biyoinformatik bilimindeki gelişmeler ile: yapısal bilgi, biyokimyasal işle ve evrimsel ipuçları bulunarak, hastalıkların temellerinin ortaya konmasını sağlanacaktır.

HAPLOTİP VE BAĞLANTI (LİNKAGE) ANALİZİ

Doç. Dr. Nurten Akarsu
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Gen Haritalama Laboratuvarı

DNA polimorfizimleri teriminden toplumda yaygın olarak rastlanan ve genellikle hastalık etkeni olmayan genom değişiklikleri anlaşılır. Bu polimorfik özellikler farklı görünümde karşımıza çıkarlar. Kısa ve uzun nükleotid tekrarları (STRP ve VNTR polimorfizimleri) ya da tek baz değişiklikleri (SNP) bu değişikliklere birkaç örnektir. Bu polimorfizimleri tespit etme yöntemleri birbirinden farklı olmakla birlikte gerek STRP gerekse SNP değişikliklerinin çalışılmasındaki ana amaç bireyin her bir lokalizasyonunda bir anneden diğeri ise babadan kalıtılmış olduğu eş kromozomları arasındaki farklılıkların belirlenebilmesidir. Bu durum **genotipleme** olarak adlandırılır ve genotipleme sonucunda hangi alelin hangi ebeveynden kalıtıldığı saptanabilir. Birbirine çok yakın yerleşimli birden fazla polimorfik bölgenin genotiplenmesi (**haplotip oluşturma**) ise tek bir lokalizasyonun değil ilgili kromozomun belli bir parçasının hangi ebeveynden geldiğini anlamamıza yol açacaktır. Genotip ve haplotip düzeyinde oluşan farklılıklar kromozomların kuşaklar arası kalıtımının izlenmesi için kullanılır ve bu yöntemle hastalık etkeni olan genlerin kromozom lokalizasyonlarının saptanması (hastalık geni haritalaması) mümkündür. Son yıllarda özellikle kompleks hastalıkların ve gen-gen, gen-çevre etkileşimlerinin çalışılması SNP değişikliklerinin sadece hastalıklara genetik yatkınlıkların saptanmasında bir markır olarak rol görmediğini bazı SNP 'lerin bizzat fonksiyona katıldıklarını göstermiştir. Fonksiyonel SNP değişiklikleri olarak adlandırılan bu farklılıklar özellikle ilaç metabolizması, farmakokinetik ve farmakodinamik etkiler, genetik kimliğe göre ilaç hazırlama, birey için güven aralığı tanımlama ve ilaç kombinasyonlarının genetik yapı ile etkileşimi gibi bir dizi ilginç soruyu gündeme getirmiştir.

Konu, istatistik ve veri analizi açısından da oldukça karmaşık bir yapı sergilemektedir. Karmaşıklık genetiğin kendine has ve çok hızlı gelişen terminolojisinin farmakoloji, istatistik ve hatta doğrudan genetik alanında çalışanlar tarafından tam olarak kavranamayışı ve olasılık teoremlerinin genel istatistik bilgilerimiz içinde fazlaca yer almamasından kaynaklanmaktadır. Konuyu basitleştirmek açısından başlangıçta şu soruların sorulmasında fayda vardır.

1- Çalışma fonksiyona doğrudan katıldığı düşünülen tek bir SNP değişikliğini mi hedeflemektedir?

2- Çalışma bir aday genin genetik yatkınlıktaki rolünü mü hedeflemektedir?

3- Çalışma birden fazla aday genin genetik yatkınlık üzerindeki rolünü araştırmayı mı hedeflemektedir?

4- Çalışma genom boyu analiz ile genetik yatkınlığa katılan yeni genlerin bulunmasını mı hedeflemektedir?

2-4 numaralı sorulara yönelik çalışmalarda haplotip tabanlı çalışmalar uygulanması gereklidir.

Tek bir SNP ile çalışma genellikle alel değişikliği ile araştırılan nitelik arasında anlamlı bir ilişki (asosiyasyon) olup olmadığını test etmeye yöneliktir. Toplum tabanlı vaka-kontrol desenli çalışmalar bu açıdan tercih edilir ve ilişki saptandığı zaman fonksiyonel çalışmalar ile ilgili SNP değişikliğinin fonksiyon üzerindeki etkisinin saptanmasına sıklıkla ihtiyaç duyar. Çalışmanın güvenilirliği tamamen kontrol grubunun düzgün olarak seçilmesine (özellikle aynı etnik grup) bağlıdır. İkinci önemli nokta, kontrol grubunda alel dağılımının Hardy-Weinberg denkleğine uygunluk gösterip göstermediğidir.. Toplumlarda akrabalık, göç vs gibi belli bir alelin seçilmesine yönelik bir etki olmadığı zaman kuşaklar arasında alel dağılımları rastgele tertiplenir. Bir SNP içinde Adenin → Guanin değişikliği olduğunu varsayalım. Adenin aleli frekansı “p” Guanin aleli frekansı ise “q” ile gösterildiği zaman denklik durumunda beklenen genotip frekansları “AA” genotipi için p^2 “AG” genotipi için $2pq$ ve “GG” genotipi içinse q^2 şeklinde olacaktır. Bu beklenen oranlardan sapma toplumda alellerden birisinin araştırılan nitelik ile ilişkili olup olmadığına bakılmaksızın herhangi bir nedenle seçildiğini gösterir. Bu durumda yatkınlık nedeni ile SNP değişikliğinin olası ilişkisini test etmeye imkan yoktur.

Türkiye’de özellikle etnik köken bilgileri tam alınamadığı için sağlıklı bir kontrol grubu oluşturulamamaktadır. Akraba evliliklerinin yoğun olması kontrol gruplarının Hardy-Weinberg denkiğinden sapmasına neden olmaktadır. Son olarak da anlamlı sonuca ulaşmak için gerekli olan örneklem sayısına (ideal sayı 2000 hasta 2000 kontrol) çıkabilen hemen hemen hiçbir çalışma yoktur. Yine tek bir SNP’ye ait bilgi kendisi bizzat fonksiyona katılmıyorsa içinde yer aldığı gen hakkında fazlaca bir bilgi vermeyebilir. Tüm bu nedenler göz önüne alındığında ülkemizde sıklıkla düzenlenen polimorfizm çalışmalarının güvenilirliği fevkalade düşüktür.

Çok sayıda polimorfik markır ile çalışma (haplotip analizi) : Aynı kromozom üzerinde birbirine çok yakın yerleşimli genlerin ya da polimorfik markırların mayoz sırasında parça değişimine uğraması (crossing over) ve birbirinden bağımsız olarak bir sonraki kuşağa kalıtılması çok zordur. Böylelikle birbirine yakın yerleşimli genler kuşaklar boyunca birarada kalıtılırlar ve yeni yapılanmalar (rekombinant ürünler) ortaya çıkmaz. Bu olaya **bağlantı (linkage)** adı verilir. Bu analizin uygulanabilmesi için birlikte kalıtımın birkaç kuşak boyunca test edilebileceği geniş ailelere ihtiyaç vardır. Markır aleli ile ilgilenilen niteliğin kuşaklar arası birarada kalıtımı test edildiği için her ailede aynı alel ya da aynı haplotipin gözlenmesi beklenmez. Çok sıkı bağlantı ya da **bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium; LD)** kavramında ise tüm bireylerde aynı alel ya da aynı haplotipin seçilmesi durumu aranmaktadır. Bu tip bir çalışmayı yapabilmek için aday olduğu düşünülen bir gene ve bu genin içindeki SNP dağılımının bilinmesine ihtiyaç vardır.

Toplum tabanlı vaka-kontrol tipi çalışmalarda çok sayıda markır üzerinden LD varsayımının test edilmesinde önemli bir güçlük ana ve babalar mevcut olmadığı için hangi alelin hangi ebeveynden geçtiğinin bilinmesinde yaşanan güçlüktür. Aile çalışmalarında olduğu kadar rahatlıkla haplotip oluşturulamadığı için tahmini haplotipler üzerinden en olası haplotip bulunmaya çalışılır ve daha sonra bu haplotipin ilgili nitelik ile ilişkisinin anlamlı olup olmadığı test edilir. İstatistiksel tahminlerinde Maksimum olabilirliğe dayalı algoritmalar (ExpectationMaximization (EM) algoritması), Bayesçi çıkarımlar (PHASE) gibi farklı yaklaşımlar mevcuttur. Özellikle toplumlara ait polimorfizm haplotip bloklarının ve LD haritalarının çıkarılmasına yönelik HapMap projesinden üretilen veriler bu alanda çok yardımcıdır. Toplumlara ait veriler bilindiği zaman bir grup SNP bloğu ile LD ilişkisi içinde bulunan tek bir SNP bir grup SNP haplotipini temsil edecek şekilde analizlerde kullanılabilir (etiket SNP'ler= taqSNP). LD analizleri için kullanılan farklı bilgisayar programları (örneğin HAPLOVIEW, UNPHASED vs) bu alanda kullanılan programlara örnektir. Çalışma desenini vaka-kontrol deseninden ana-baba-çocuk üçlüleri; kardeş çiftleri gibi desenlere çevirmek daha kesin haplotip oluşturmamızı sağlayarak bu soruna uygun bir çözüm getirebilir.

Gen-gen (Epistaxis) ve gen çevre ilişkileri (Quantitative Traits) : En az iki genin birbirine bağılı hareket etmesini ya da gen çevre etkileşimlerini model alan analizlerdir. Özellikle lojistik regresyon gibi daha kompleks analiz yaklaşımlarını içerir.

GENETİKTEN GENOMBİLİME GEÇİŞTE DNA MİKRODİZİNLERİ¹ İLE İFADE PROFİLLEMESİ

Doç. Dr. Hilâl Özdağ
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Genetikten Genombilime:

Genetik biliminde özellikle 20. yüzyılın son 20 yılındaki ivmesel gelişim ile hızlanan süreçte genetik biliminden genombilime geçiş yaşanmıştır. DNA molekülünün tespiti, molekülün kalıtımla ilişkilendirilmesi, yapısının keşfi ile atılan dev adımları rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkışı takip etmiştir. Genlerin lokasyon ve fonksiyonlarının tek tek ayrıştırılarak ortaya konduğu hummalı araştırmalar yaşam şifresinin çözümü yolundaki önemli ilk basamakları teşkil etmiştir.

Daha sağlıklı, daha kaliteli ve daha verimli bir hayata ulaşmak için zamanla yarışılan çağımızda diğer sahalarda olduğu gibi yaşam bilimlerinde de araştırmalarda sistematik bir stratejinin takibi esas alınmaktadır. Bu nedenle genombilime geçiş yolunda ilk aşama model organizmaların genom projelerinin başlatılması oldu. Bugüne dek yirminin üzerinde model organizmanın genom projesi tamamlanıp kataloglandı (www.ensembl.org). Bu şifre döküm işlemi sonucu ortaya çıkan verinin boyutları, bu verilerin ancak yüksek işlem hacimli teknolojilerin yardımı ile analiz edilebilecekleri gerçeğini gözler önüne serdi.

DNA Mikrodizinler:

DNA'daki yapısal yeniden düzenlenmelerin tespiti amacıyla DNA ilk olarak 1975 yılında kalıcı olarak sabit bir ortama aktarılıp "Southern Blot" tekniği ile analiz edilmiştir. Bunu takip eden yıllarda benzer bir yaklaşımla RNA ve protein molekülleri de "Northern" ve "Western Blot" teknikleri ile sabit bir ortama kalıcı olarak aktarılıp analiz edilebilir hale gelmiştir. Nükleik asitlerin elektrokimyasal özelliklerinden hareketle sabit bir ortama bağlanabildiklerinin keşfi ve genom projelerinden akan verilerin biraraya gelmesiyle DNA çiplerinden söz edilmeye başlanmıştır.

DNA çiplerinin kullanımı ile bir anda analiz edilen gen sayısı onlu rakamlardan binli rakamlara fırlamıştır. Böylelikle genom projelerinin ürettiği verilere eşgüdüm hızda sonuç verecek bu analiz yöntemi genombilim araştırmalarına ciddi bir ivme kazandırmıştır.

¹ Mikrodizin: Mikroarray

Mikrodizin teknolojisi:

Mikrodizin teknolojisi kullanılmaya başlandığı günden bu yana sürekli değişim ve gelişim göstermiştir. Mikrodizinler cam slaytlar ve ince katman camlar üzerine dizilen cDNA veya oligonükleotidlerden oluşurlar. cDNA veya oligonükleotidler robot sistemler aracılığı ile slaytlara dokundurma (spotted) veya mürekkep püskürtme (ink-jet) tekniği ile uygulanır.

Dizinde herbir gen parçasını temsil eden cDNA veya oligonükleotidin dokundurulduğu veya püskürtüldüğü alanın netliği ve kesinliği alınacak sonuçların kalitesi ile doğru oranlıdır. Bu anlamda sonuçların kalitesini arttıran diğer bir mikrodizin üretim tekniğinde ince katman camlar üzerine fotolitografi tekniği ile oligonükleotidler sentezlenir.

Genombilim araştırmalarında kullanıcılar kendi mikrodizinlerini “spotter” aracılığı ile dizdikleri mikrodizinleri kullanabilecekleri gibi çözünürlüğü her geçen gün artan ve birçok model organizmanın tüm genomunu içeren kalite kontrolden geçmiş hazır mikrodizinleri de değişik ticari şirketlerden temin edebilmektedirler.

İfade analizi ve mikrodizin teknolojisi:

Özellikle multifaktöryel ve poligenik hastalıklarda, sözkonusu hastalıkların nedenlerini ayırtmak zordur. Tek tek yapılacak genetik analiz sonuç alma sürecini tahmin edilemeyecek boyutta uzatmanın yanı sıra elde edilecek verilerin analiz ve yorumunu da güçleştirecektir. Mikrodizin teknolojisi ile hücrenin, dokunun genom boyunca ifade profilini diğer bir deyişle moleküler imzasını çıkarmak mümkün hale gelmiştir.

Değişik model organizmaların transkriptomlarını üzerinde barındıran mikrodizinleri üretiminde fotolitografi tekniğini kullanan GeneChip (www.affymetrix.com) platformunda her bir gen yaklaşık 11-20 prob ile temsil edilmektedir. Bu problemlerin herbiri 25 nükleotid uzunluğundadır. Bu çiplerin tasarımında özgül olmayan bağlanma problemini aşabilmek amacı ile herbir probun (perfect match-PM) bir hatalı çeşidi (mismatch-MM) çipe yerleştirilmektedir. Hatalı problemler 25 nükleotidlik prob dizisinin 13. noktasında hatalı bir nükleotid içerir. Bu tasarımda bugün Affymetrix'in ürettiği en kapsamlı insan transkriptom çipinde (HG_U133_Plus2) yaklaşık 1.3 milyon farklı prob bulunmaktadır. İnsan transkriptomunu 54 bin transkript ile temsil edildiği bu ve benzeri çiplerden elde edilecek olan verilerle:

İlgilenilen hastalıkta genomun ifade profili normal bireye göre nasıl değişiyor? Genomdaki hangi genler spesifik olarak bu hastalıkla ilgili? Hastalıkla ilişkilendirilen bu gen grubunun normale göre ifadenmesi nasıl değişiyor? Benzeri sorulara ek olarak biyolojik etkisi sorgulanan bir molekülün ifade profili üzerine olan etkisi değerlendirilebilir. Ancak bu değerlendirmenin sağlıklı olarak yapılabilmesi için:

1. Cevabı aranan sorunun doğru sorulması ve deneyin doğru tasarlanması,
2. Kullanılacak RNA rneklerinin yeterli kalite ve miktarda olması,
3. Deney sisteminin kalite kontrol aşamalarının dikkatle yapılması,
4. Elde edilecek verilerin hassas biyoinformatik analizden geçirilmesi gerekmektedir.

Mikrodizin verilerinin biyoinformatik analizinde ilk aşama olan n işlemede (pre-processing) değişik algoritmalar kullanılmaktadır (MAS5, dChip, RMA, GCRMA gibi). n işlemeden geçen veriler ile daha sonra araştırıcının sorusuna bağlı olarak farklı ifade olan (differentially expressed) genlerin belirlenmesi, kümeleme analizlerinin (cluster analysis) yapılması mümkün olmaktadır. Bu analizlerde yıllık lisans creti ödemek suretiyle hazır paket programlar (Gene Spring gibi) kullanılabileceği gibi herkesin kullanımına açık kod yazımlı güçlü yazılımlar da (R_ www.r-project.org) kullanmak mümkündür.