

DNA Mikroarray Teknolojisi ve Uygulama Alanları

Ayşegül Yoltaş¹, İsmail Karaboz²

Giriş

1869'da Miescher'in DNA izolasyonunu gerçekleştirmesi, 1975'de southern blotting ve hibridizasyon ve 1985'de ise PCR teknolojisinin keşfinden itibaren moleküler mikrobiyolojik çalışmalar dikkate değer bir değişim göstermektedir (1). Son 10 yıl içerisinde tüm yayınlar tek bir gen ya da bir operonun sekuens analizi konusunda yoğunlaşmışken artık tek bir yayının tüm bir genomun sekuens analizini yaptığı günlere gelinmiştir (2).

DNA mikroarray, hücre ve dokulardaki gen ekspresyonu profillerindeki global değişikliklerin incelenmesinde kullanılan yeni ve güçlü bir teknolojidir. Transkripsiyonun genomik bir ölçekte değerlendirilmesi, düzenli bir mozaik şeklinde tüm genomu, ya oligonükleotid (oligonükleotid mikroarray'leri) ya da bireysel genleri temsil eden PCR ürünleri (cDNA mikroarrayleri) koleksiyonu olarak barındıran cam slaytlar ve ince katman camlar ile yani DNA mikroarray teknolojisi ile sağlanmıştır (3). Bir mikroorganizmanın tüm genleri "tırnak" boyutunda olan bir alanda mikroarraylenebilir ve binlerce genin ekspresyon seviyeleri tek bir deneyde simultane olarak çalışılabilir (4).

Otomatize ve minyatürize olması ile öne çıkan bu teknoloji, çeşitli spesifik genlerin (Örn. enfeksiyöz bir ajan ile ilişkili olan genler) ya da gen polimorfizminin araştırılması ve ekspresyon analizinde kullanılmaktadır. Arrayler polimorfizm analizinin yanında mutasyon analizi, evolüsyoner çalışmalar ve sekans analizlerinde, potansiyel terapötik ajanların tespiti, geliştirilmesi, optimizasyonu ve klinik değerlendirmelerinde de kullanılabilir. Ayrıca mikroarray verilerinin bilişimsel olarak analizi bilinen ya da bilinmeyen genlerin mRNA modellerine bakılarak sınıflandırılmasını da sağlamaktadır (3, 4).

DNA mikroarray teknolojisi, birçok genin aktivitesinin aynı zamanda izlenebilmesi; hızlı bir yöntem olması; hasta ve sağlıklı hücrelerdeki genlerin aktivitelerinin karşılaştırılmasını sağlaması ve hastalıkları alt-gruplar halinde kategorize edebilme gibi avantajlarının yanı sıra, tek bir seferde çok fazla veri analizi yapıldığından, tüm sonuçların analizinin zaman alması; sonuçların yorumlamak için çok kompleks olabilmesi; sonuçların yeterince kantitatif olmaması ve oldukça pahalı bir teknoloji olması gibi bazı dezavantajlara da sahiptir (5).

¹ Dok. Öğr., ² Prof.Dr., Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. Yazışmadan Sorumlu Yazarın E-Posta Adresi: ismail.karaboz@ege.edu.tr

DNA Mikroarray Analizindeki Basamaklar

Tekrar tanımlamak gerekirse DNA mikroarrayler üzerine belirli pozisyonlarda binlerce farklı gen sekanslarının immobilize edildiği ya da bağlandığı küçük katı desteklerdir. Bu destekler genellikle cam mikroskop slaytlarıdır (lam) fakat silikon çip ya da naylon membranlar da olabilirler. DNA direkt olarak slayt üzerine spotlanır ya da gerçek anlamda sentezlenir (6).

Ticari mikroarrayler genellikle yüksek kapasite elde etmek için çalışırlar. Şu an için kullanılan en geniş mikroarrayler yaklaşık olarak 40.000 geni temsil eden elemanlardan oluşmaktadır. Buna karşılık in-house mikroarrayler spesifik soruları hedef aldıklarından limitli sayıda gen içermektedirler (7).

İyi belirlenmiş hedef sekanslarına sahip in-house mikroarrayler araştırmalarda etkili sonuçlar verirler. İyi tasarlanmış ve üretilmiş mikroarrayler etkin ve çoğaltılabilir mikroarray sonuçlarının kritik başlangıç noktasıdır (7). DNA mikroarraylerin dizaynı ve uygulanmasındaki temel basamaklar substrat seçimi, DNA tipi (genomik DNA, cDNA, EST klonları, cRNA, bakteriyel koloni), çip üretimi, hedef hazırlanması, scanning ve veri analizidir (8).

DNA mikroarraylerinin oluşturulduğu spotlar kısa oligonükleotidlerden (20 ± 25 bp), belirli gen sequenslerinden (500 ± 2000 bp) ya da cDNA'lardan oluşabilir. Bu nedenle DNA komponentlerinin kaynağı değişebilmektedir. Örneğin Incyte (Palo Alto, CA, ABD) ve AlphaGene (Woburn, MA, ABD) gibi firmalar kendi oluşturdukları tam boy cDNA koleksiyonlarındaki klonları kullanmaktadırlar (17)

Çip Hazırlığı

Substrat

Daha önce de belirtildiği gibi mikroarrayde destek materyali olarak silika ya da cam lamalar ya da membranlar kullanılmaktadır (6, 8, 9).

Cam substratların kullanıldığı arrayler iki tipe ayrılabilir. Affimetrix arrayleri için kendi ürettiği cam çipleri kullanırken pek çok araştırmacı mikroskop lamaları kullanmaktadır. Cam-bazlı arraylerde kalıcı biçimde çoğaltılabilir mikroarray ekspresyon verilerinin elde edilmesinde, cam substratın hazırlanışı ve kalitesi çok büyük önem taşımaktadır. Her ne kadar standart mikroskop lamaları DNA arraylerinde kullanılabilse de, DNA hedeflerinin bağlanmasını kolaylaştırmak için spotlama öncesi bir hazırlığa tabi tutulmaları gerekmektedir (17). Cam lamalar (slaytlar) nükleik asitle elektrostatik etkileşimlerinin artırılması için silil (reaktif aldehit), aminosilan, lizin ve poli-L-lizin ile kaplanırlar. Ayrıca bağlanma yeteğini artırmak için Amerika'da bulunan Grace Biolabs 'Oncyte' adını verdikleri nitroselüloz kaplı lameller üretmiştir (7, 17). Silikon oksit bazlı yüzeyler için çipin bir organosilan ile kaplanması gerekmektedir. Bu silan oligonükleotid üzerindeki ya da oligonükleotid sentezi için uygun olan bir linker üzerindeki bir grup ile reaksiyona girebilecek özellikte olmalıdır (12). Silanol cam yüzeyler ise hidroliz/yoğunlaşma basamakları ile cama kovalent olarak bağlanan (3-aminopropil) triethoksilan ile kaplanabilir (13).

Kaplama işlemi laboratuvarda kolaylıkla yapılabilir fakat pek çok araştırmada Sigma ya da TeleChem International gibi firmaların hazırladığı ticari olarak üretilmiş kaplanmış slaytlar tercih edilmektedir. Ayrıca laboratuvarda hazırlanan slaytlar her ne kadar daha ucuz olsa da standart mikroskop lamelleri yüksek ve düzensiz otoflorese sahip olabilirler ve sonuç olarak slaytın bazı kısımlarındaki spotlardaki floresens daha yüksek görünebilir (17).

Kaplaması yapılmış cam slaytlar yüksek sıcaklıklarda stabil, dayanıklı ve porsuz olmaları ile avantaj sağlarlar. Membranlar ise çoklu kullanım ve radyoaktif hedeflere hidridizasyon avantajlarına sahiptir. DNA ve proteinlere geri dönüşümsüz olarak bağlanmayı sağlayan ve mikroporöz polimerik yüzeylere sahip olan FAST slaytlar 0.03-2 nL/spot barındırabilmektedirler (8, 14). DNA solüsyonu slaytlara çoklu pin'i olan bir spotter kullanımı ile spotlanırlar. 0.1 mm'lik bir alana 10^4 DNA örneği spotlanabilir ve bu spotlar 0.1 mm'lik aralıklarla yerleştirilirler (8).

Çip Fabrikasyonu

Çipler cDNA çipleri ve oligonükleotid çipler olmak üzere iki kategoride incelenir (8, 11).

Pek çok laboratuvar Stanford Üniversitesinde Pat Brown ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve 'geleneksel mikroarray metodu' olarak addedilen cDNA metodunu kullanmaktadır. Bu yöntemde DNA elemanlarının *in situ* sentezlenmesinden ziyade hazırlanan klonlar yüksek hızlı robot teknolojisi kullanılarak destek ortamına aktarılır. Tipik olarak işlemin ilk basamağı bir cDNA klon kütüphanesinin PCR ile 96 kuyucuklu plaklarda çoğaltılmasıdır (17). cDNA çipler istenilen cDNA deposunun saflaştırılmış PCR ürününün (genellikle 500 ve 2000 bp) ya da Expressed Sequenced Tagged (EST) klonların membran ve poli-L- lizin kaplı cam slaytlara immobilize edilmesi ile hazırlanır. EST'ler yaygın olarak bir genin tanılanması ve haritalanması için kullanılan küçük cDNA sequensleridir. Hedef seçimi başlangıç materyalinin miktarına ve problemlerin array slaytlarındaki düzenlenişine göre yapılır (8). Mikroarrayi yoğun olarak kullanan ilk laboratuvarlar cDNA klon depolarını cam slaytlara spotlamışlardır. 300 bp'den uzun cDNA'ların kullanımı bazı avantaj ve dezavantajlara sahiptir. En büyük avantajı hibridizasyonun güçlü olmasıdır. Böylece bazı bireylerde oluşabilecek nokta mutasyonları ve küçük çaplı delesyonlar hibridizasyon sonucu üzerine etki edemezler. Bu özellik cDNA'ların kullanımını bazı genlerinde küçük farklılıklar olabilecek hasta kümelerini içeren çalışmalar için oldukça yararlı hale getirir. cDNA kullanımının diğer bir avantajı nispeten daha hesaplı olmalarıdır. Tek bir mini-prep ya da PCR reaksiyonu binlerce mikroarray için yetecek kadar saf DNA oluşturabilir. Uzun olmaları nedeniyle spotlanmış cDNA'lar alternatif RNA splicing yoluyla ya da alternatif promotor kullanımı yoluyla oluşturulabilen farklı versiyonlar gibi tüm transkriptleri algılama eğilimindedir. Başlıca dezavantajlardan biri saf cDNA depoları ya da PCR ürünlerini bir araya getirmek için gerekli masraf ve zamandır. Ticari tedarikçilerden alınan cDNA'larda PCR amplifikasyonu ile karışabilecek farklı plasmid kontaminasyonuna uğramış ya da yanlış bir biçimde tanılanmış klonlar gibi problemler çıkabilmektedir. Ayrıca cDNA'lar tekrarlı sequensler içerebilir ve yakından bağlantılı transkriptlerle (gen aileleri) hibridize olabilirler ve bu nedenle pek çok uygulama için yeterli spesifite sağlanamayabilir.

cDNA'lar boyut ve G-C içeriği bakımından çeşitli olduklarından tümünün eşit şekilde hibridize olduğunun ya da aynı ölçüde artalan sinyal verdiğini garanti etmek zordur (11).

Oligonükleotid arraylerde çipler önceden hazırlanmış oligonükleotid problemleri substrat üzerine *in situ* sentezi ile hazırlanır. cDNA arrayler RNA ekspresyon analizlerinde tercih edilirken oligonükleotid arrayler ilaveten sequens analizinde kullanılırlar. Oligonükleotid mikroarray cDNA çiplere göre bazı avantajlara sahiptir. Örneğin kontaminasyon riski daha azdır ve örnek hazırlama aşaması daha kısa sürdüğünden daha az zamana ihtiyaç duyulur. Ayrıca ekstra stabilite ve spesifite sağlarlar ve genomun daha yüksek seviyede kapsanmasına izin verirler (8). Cam slayt tipi mikroarraylerin en sık kullanılan türü de cDNA yerine belirli oligonükleotidlerin kullanıldığı mikroarraylerdir. Oligonükleotidler eğer doğru şekilde tasarlanırlarsa cDNA'ların kullanımında karşılaşılan G-C içeriği ve spesifite problemlerini ortadan kaldırılabirler. Ticari tedarikçilerden belirli oligonükleotidlerin ısmarlanması ile yanlış tanılama ya da etiketleme ile ilgili problemler büyük ölçüde engellenebilir. Fakat yine de kişinin tedarikçinin bu oligonükleotidleri doğru şekilde sentezleyip saflaştırdığından ve doğru oligonükleotidleri sağladığından emin olunmalıdır. Oligonükleotid kullanımındaki ana dezavantajlar 10,000 ya da daha fazla oligonükleotid satın alınmasının maliyetinin yüksekliği ve yüksek biyoinformatik destek ihtiyacıdır. Oligonükleotidlerin nasıl tasarlandığına bağlı olarak onlarda da cDNA'larda görülebilecek spesifite problemleri görülebilir. Günümüzde ticari firmalar istenilen oligonükleotidlerin çoğunu sağlayabildiklerinden oligonükleotidlere dayalı mikroarray uygulamaları oldukça basitleşmiş olsa da maliyeti çok yüksek olduğundan kullanımları sınırlıdır (11).

Ticari bir firma olan Affimetrix metodunda kısa nükleotid problemleri (25 bp) *in situ* sentezlenir ve GeneChip prob arrayler oluşturulur. Bu yöntemde katı fazlı kimyasal sentezi yarı iletken endüstrisinde kullanılan fabrikasyon teknikleri ile birleştirilerek silikon mikroçipler üretilir. Bu yöntem silikon mikroçip üretmek amacıyla katı-faz kimyasal sentez ile yarı-iletken endüstrisinde kullanılan fabrikasyon tekniklerini kaynaştıran ışık-güdümlü bir kimyasal sentez prosesi ile gerçekleştirilir. Bu proseste (Şekil 2), cam çip selektif olarak yüksek yoğunluklu bir civa lambası kullanılarak fotolitografik bir maskeden geçirilir. Sonuç olarak ışıkla muamele edilen kısımlarda koruyucu grup uzaklaştırılmış olur. Çipin nükleosid solüsyonunda inkübasyonu aktif bölgelerdeki terminal nükleotidlerin kimyasal eşleşmesine izin verir. Daha sonra yeni maske uygulanır ve bu işlem istenilen uzunlukta oligonükleotid (20 – 25 bp) üretilene kadar tekrarlanır (17).

DNA örneği içeren çip üç farklı teknik ile hazırlanabilir. Bunlar fotolitografi, inkjet baskı ve mekanik mikrosptlamadır.

Yukarıda da anlatıldığı gibi Affymetrix metodunda kullanılan fotolitografi tekniğinde DNA spot başına 0.01 mm²'lik bir yoğunluk oluşturacak şekilde bir yarı-iletkenin baskı tablası üzerine sentezlenir ve uygun biçimde korunmuş bağlayıcıların katı bir desteğe bağlanmasını içerir. Işık, foto-koruyucu grubun uzaklaştırılması amacıyla, özel bir alana fotolitografik bir maskeden yansıtılır. Koruyucu grubun uzaklaştırılması sonrasında yapı taşlarının (aminoasit ya da nükleik asit; her biri foto-labil koruma grubu veren) ilk seti tüm yüzeye tabi tutulur ve bazı konumlarda kimyasal eşleşme gerçekleşir. Bu teknikte 4ⁿ polinükleotid seti sadece 4 × n kimyasal basamak ile

sentezlenebilir. Fakat bu yaklaşım kayda değer miktarda kısa DNA molekülü ile sonuçlanan eşleşme reaksiyonu nedeniyle verimsizdir (8).

Inkjet baskı teknolojisi (örn. non-contact spotlama metodları) bir fotolitografik maske uygulaması yerine yüzeydeki spesifik bölgelere küçük fosforamidit solüsyonu damlacıklarının damlatılması ile oluşturulur. Bu yaklaşım dsDNA immobilizasyonunda ve mikroarray moleküllerinin geliştirilmesi için protein immobilizasyonunda yararlı bir metottur. Mekanik mikrosptlama destek matriksi ile DNA yüklü bir spotlama iğnesi arasındaki fiziksel temas dayanır. Robotlara dayalı kontrol sistemleri ve çok katlı baskı başlıkları ile kontakt baskıda otomasyon sağlanmıştır (8, 15). Bunlara ek olarak iyi bir çipin fabrikasyonu baskı cihazının karakteristiklerine ve spot yoğunluğu ve morfolojisi gibi çeşitli spotlama şartlarına bağlıdır (8).

Oligonükleotid ya da cDNA çip üreticileri için kimyasal nanobaskı adı verilen masrafsız bir prosedür geliştirilmiştir. Kısa, tek iplikçikli bir uzantıya sahip kısa gövdeye sahip bir ilmek oligonükleotid probu, poröz yapıdaki üç boyutlu bir substrat olan HydroGel'e immobilize edilir. Bu teknik DNA mikroarraylerine yeni bir format kazandırmıştır. Bu yaklaşımlar konvansiyonel tek iplikçikli problemlere göre spesifite ve stabilite artışı ve probun hedef için daha kullanılır oluşu gibi avantajlara sahiptir.

Örnek Hazırlanması ve Etiketleme

cDNA mikroarraylerinde ilk olarak arzu edilen örnekten izole edilen RNA reverse transkriptaz ile hedef cDNA'ya çevrilir ve radyoaktif ya da floresen markörler ile işaretlenir. En sık kullanılan floresen markörler Alexafluor, Phoerytrin ve cyanin boyalarıdır. Cyanin boyalarından olan cy3 ve cy5 eksitasyon ve emisyon spektrumlarındaki geniş ayırım ile yüksek fotostabiliteye sahiptirler ve bu nedenle en çok kullanılan floresen markörlerdir (8, 12, 16). Bu floroforlar farklı dalga boylarında ışık yayarlar ve uygun lazerle eksitasyon sonrası kırmızı (cy5) ve yeşil (cy3) olarak görünürler. Antisense RNA hazırlığında RNA ya da mRNA cDNA'ya çevrilir ve bu cDNA'nın ikinci ipliği antisense RNA ya da cDNA'ya transkribe edilir. Hedef moleküllerin etiketlenmesi raportör boyaların çoğaltılmış ürüne direkt katılımı ile amplifikasyon esnasında taşınabilir. Etiketleme metodları simultane amplifikasyon ve cDNA ya da cRNA etiketlenmesinden biyotin-streptavidin konjugatları ile sekonder etiketlemeye kadar çeşitlendirilebilir.

Hibridizasyon

Etiketlenmiş hedef, hibridizasyonun sağlanması için bir array ile inkübe edilir. Eğer hedefte prob ile komplementer sequensler bulunuyorsa hedef array ile hibridize olur. Hibridizasyonun sağlanması için hedef konsantrasyonu, sıcaklık, tampon ve tuz konsantrasyonu optimize edilmelidir. Hibridizasyon mismatchi delesyon ya da insersiyon içeren problemlere göre daha güçlü olacağından hibridizasyon prob ve hedefin doğru bir biçimde eşleşme göstermesine bağlıdır. Günümüzde hibridizasyon kinetiğini artıran dinamik bir DNA kaynağına izin veren etiketli bir örnekle kaplanmış paramanyetik boncukların kullanımıyla daha etkin hibridizasyon problemleri geliştirilmiştir.

Scanning

Çip, işaretlenmiş hedef DNA ve problemlerin hibridizasyonu sonucu oluşan floresan sinyalleri toplayan kimyasal işlemcilerle bağlantılı olan komponentler, diyotlar ve transistörlerden oluşan bir scanning cihazı ile okunur. Mikroarray scannerlar örneğin floresans yoğunluğunu gösteren bir piksel matrisinden oluşan görüntüler oluştururlar. Scannerler ile birleşik olan software programı bireysel spotların ve ölçülen spotun yoğunluğunun belirlenmesini sağlar.

Genel olarak confocal tip ve charge coupled cihazlar (CCD) olmak üzere iki tip array scanner bulunmaktadır. GenePix4000A scanner, scanarray ve Agilent scannerlar gibi confocal ya da lazer tip scannerlar eksitasyon kaynağı olarak lazer ve dedektör olarak fotomultiplier tüpler (PMT) kullanılırlar. Bunlar görünür alandaki floresans yoğunluklarını tespit edebilirler. Lazer tip scannerlar slaytın küçük bir kısmını (100 μm^2) tarayabilirler ve imajın geri kalanı optiklerin hareket ettirilmesi ile sağlanır. CCD scannerlar ise belirli lazer hatları gibi limitli olmayan beyaz ışık kaynakları kullanılırlar. CCD'ler ayrıca substratın tümünü (1 mm^2) tarayabildiklerinden optik hareketini bertaraf ederler. Böylece karmaşık enstrümantasyon kullanımı ve masraflar azalmış olur. Tarama için bir optik disk ve okuyucu temelli yeni bir konsept geliştirilmiştir. Farklı hücre popülasyonlarından gelen mRNA ya da farklı şekilde işlem görmüş örnekler array iki farklı dalga boyunda tarandığından farklı renkler veren cy3 ve cy5 boyaalarının kullanımıyla saptanabilirler. Bu da array üzerinde sunulmuş olan her genin transkript seviyelerinin oranının ölçülmesini sağlar.

Veri Analizi

Mikroarray çalışmaları gen ekspresyon modelleri üzerine oldukça geniş (genom genişliğinde) olan veriler sağlarlar. Her ne kadar bu teknik pek çok biyolojik bağlamda potansiyel olarak kullanılabilse de verilerin bu kadar geniş olması veri analizinde bazı problemler yaratmaktadır. Verilerin miktarı ve kompleksliği biyoinformatik ve biyoistatistiksel analizlerin de dahil olduğu bir çok hesaba dayalı genomik yaklaşıma ihtiyaç duymakta ve bu yaklaşımlar sonuçların yorumlanmasında büyük öneme sahiptir.

DNA mikroarray çalışmalarında mRNA seviyelerinin ölçümlerini etkileyerek direkt karşılaştırma yapmayı zorlaştıran slayt heterojenitesi, spotlama varyasyonları, arkaplan sinyalleri gibi pek çok değişken vardır. Normalizasyon bu varyasyonları minimize eden ve karşılaştırma için ortak bir baz oluşturan bir süreçtir. Bu amaçla kullanılan üç teknik bulunmaktadır. Bunlar toplam yoğunluk normalizasyonu, regresyon normalizasyonu ve oran istatistikleri kullanarak normalizasyondur.

Toplam Yoğunluk Normalizasyonu

Normalizasyon faktörü karşılaştırmalı gen ekspresyonu analizi için bir arrayde kullanılan tüm elemanlar için cy3 ve cy5 kanallarının toplam ortalama katlanma farklılıklarına (örneğin cDNA arraylerindeki iki renk hibridizasyonu) dayanır

Regresyon Normalizasyonu

Regresyon normalizasyonu bir dağılım plotunda düz, çapraz bir çizgi boyunca dağılmış, birbiriyle yakından alakalı genlerin ekspresyonu yapıldığında kullanılmaktadır. Normalizasyon katlanma farklılıklarının lineer olmadığı LOWESS (LOcally WEighted Scatter plot Smoothing) gibi regresyon teknikleri kullanılarak en uygun eğimden hesaplanır.

Oran İstatistiği Kullanılarak Normalizasyon

Bu metot house keeping genlerin deneyler esnasında profillerinde bir değişiklik olmadığını ileri sürer. Normalizasyon faktörü farklı şekillerde ifade edilen genlerin verilerinin normalizasyonunu sağlamak için house keeping genlerin verilerinden hesaplanır.

Kümeleme (Clustering)

Clustering benzer ekspresyon kalıbına sahip genlerin bilişimsel cihazlar kullanarak tek bir grupta toplanmasını sağlar. Gen ekspresyonu verilerindeki modellerin tanımlanmasında çeşitli clustering teknikleri kullanılmaktadır ve analiz için çeşitli software programları mevcuttur. Clustering teknikleri bölücü (divisive) ve agglomeratif olarak ikiye ayrılabilir. Bölücü metodlar tüm elemanların tek bir cluster'da toplanması ile başlayıp sonra kademeli olarak daha küçük clusterlara bölünmesi şeklindedir. Agglomeratif teknikler ise tek üyeli clusterlardan başlar ve onları kademeli olarak birleştirir.

Sıra Düzenli Clustering

Sıra düzenli clustering basit, sıklıkla kullanılan ve sonuçları kolaylıkla gözlenebilen bir tekniktir. Ekspresyon modellerine dayalı olarak genler arasındaki uzaklıkların hesaplandığı ve yakın genleri bir küme oluşturacak şekilde birbiriyle birleştiren agglomeratif bir tekniktir. Bu küçük clusterlar arasındaki uzaklık yeni bir küme oluşturmak için hesaplanır. Sıra düzenli clustering metodunun kümeler oluşturulurken aralarındaki mesafelerin hesaplanma kurallarındaki farklılıklara dayanan çeşitli varyasyonları da bulunmaktadır.

Self Bağlanma Clustering

İki cluster arasındaki uzaklık bir kümenin iki üyesi arasındaki minimum uzaklık olarak hesaplanır. Bu metod gevşek kümeler oluşturma eğilimindedir çünkü kümeler sadece eğer iki üye birbirine yakın ise birleşebilirler.

Tam Bağlanma Clustering

İki cluster arasındaki uzaklık bağlantılı kümelerin üyeleri arasındaki maksimum uzaklık olarak hesaplanır. Bu metot oldukça kompakt ve sıklıkla benzer boyutlu kümeler oluşturma eğilimindedir.

Ortalama Bağlanma Clustering

Clusterlar arasındaki uzaklık ortalama değerler kullanılarak ağırlıksız çift grup metoduyla hesaplanır. Ortalama uzaklık bir kümede bulunan her noktanın diğer kümelerde bulunan tüm diğer noktalara uzaklağından hesaplanır. En düşük ortalama uzaklağa sahip iki küme yeni bir küme oluşturmak amacıyla birleştirilir.

Sıra düzenli clustering metotlarının potansiyel problemlerinden biri kümenin boyut bakımından büyümesiyle kümeyi temsil eden ekspresyon vektörlerinin küme içindeki genleri artık temsil edememesi riskidir. Bunlardan kaçınmanın yollarından biri verileri benzer ekspresyon modellerine sahip gruplara ayırmak için self-organize haritalar ya da fc-means gibi bölücü clustering yaklaşımlarının kullanılmasıdır.

k-Means Clustering

Bu tipteki bir clusteringde objeler, internal olarak benzer fakat eksternal olarak birbirine benzemeyen kümeler olarak paylaştırılırlar. Bu yöntem kavamsal olarak kolaydır fakat sayısal hesaplamalar açısından yoğun olabilir.

Self Organize Haritalar

Bir self-organize harita (SOM) bölücü kümeleme yaklaşımlarına dayalı bir ağdır. SOM kümeleme genleri ekspresyon modeli benzerliklerine göre grup serilerine ayırır. Her grup için tesadüfi vektörler yapılandırılır ve bir gen en yakınıdaki vektöre bağlanır.

Mikroarray Teknolojisinin Uygulama Alanları

DNA mikroarray teknolojisi bir genomdaki gen kopyalarının tanılanmasında, mutasyon ve bir nükleotid polimorfizminin belirlenmesinde, yeni ilaçların bulunmasında ve geliştirilmesinde geleneksel moleküler yaklaşımlara üstünlük sağlamaktadır ve hastalıklar için tanılayıcı bir aygıt olarak kullanılmaktadır (8). Mikroarray teknolojisi en sık olarak gen ekspresyonu analizi, genetik ve mutasyon analizleri, çevresel araştırmalar, antimikrobiyal gen analizi gibi uygulamalarda kullanılmaktadır.

Gen Ekspresyonu Analizi

Yeni genlerin, yeni fonksiyonel ve hücreli ilişkilerin ve yeni metabolik yol izlerinin belirlenmesi için ekspresyon modelleri incelenmelidir. DNA çipleri bakteriler, mayalar,

bitkiler ve insanlar dahil olmak üzere pek çok organizmadaki farklı genlerin ekspresyon seviyelerinin izlenmesi için kullanılmaktadır.

Bu konu ile ilgili olarak DNA çip kullanılarak nöropsikiyatri hastalarından alınan beyin dokusu örneğindeki RNA ekspresyonu hasta olmayan bir bireyle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar mekanizmanın, toksisitenin ve hasta bireylerin kullandığı ilaçların etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır (8).

DNA mikroarray tekniği kullanılarak periodontal ligament ve diş etinden türevlenen domuz epitelyum hücrelerinde farklı şekillerde eksprese olan genlerin profili çıkarılmaya çalışılmıştır (21).

Saccharomyces cerevisiae protoplastlarının rejenerasyonu esnasındaki global transkripsiyon profili 6388 genin ekspresyonu DNA mikroarray ile ölçülmüş ve ekspresyon kinetiği ile bu genler 25 kümeye ayrılmıştır (23). Mayalardan *C. elegans*'ta bulunan sensör ışın genlerinin tanılanması için tüm genomun ekspresyon profili kullanılmış ve bu çalışmada da mikroarraylerden yararlanılmıştır (27).

2007 yılında *Salmonella* strainlerinin moleküler karakterizasyonu bir oligonükleotid multiprob mikroarray ile gerçekleştirilmiştir (63).

Mikroarray teknolojisinin kullanıldığı diğer bir gen ekspresyon çalışması *E. coli*'deki metabolik yol-izlerinin belirlenmesidir (19). *E. coli*'de yapılan çalışmalar bununla kalmamaktadır. İki komponentli sistemle ilgili olarak *E. coli* mutant K-12'de (iki komponentli sistemden sorumlu genler yok edilmiş) fenotipik mikroarrayler kullanılmıştır. Başka bir çalışmada kimyasal gen ekspresyonu profili ile çeşitli kimyasalların toksik etkileri araştırılmıştır (25). Bunların yanı sıra *E. coli*'deki hidrojen peroksit, asetat ve propiyonat, 4,5-dihidroksi 2-siklopenten-1-one ve response regülatör Evg A da mikroarrayler ile çalışılmıştır (8). Yine *E. coli*'de mikroarraylerin kullanıldığı bir çalışmada *E.coli*'de *Vitreoscilla* hemoglobini ekspresyonunun gen ekspresyonu profili çalışılmıştır (20).

Bu teknoloji ayrıca farklı şartlar altında gen ekspresyon modelinin analizi ile RNA polimeraz için promotor bölgeleri ve operon yapısının karakterizasyonu için de kullanılır. *S. aureus* ve *L. monocytogenes*'deki *a* faktörleri regülonları, *B. subtilis*'teki regülon sistem ve *S. pneumoniae*'deki kompetans regülonları farklı gen ekspresyon seviyeleri için ve aynı mikroorganizmanın farklı büyüme sıcaklıklarındaki gen ekspresyonu da çalışılmıştır (8, 29). *Listeria* genusu üyeleri olan *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* ve *L. grayi*'de karşılaştırmalı ve fonksiyonel genomik araştırmalarında da yine mikroarray teknolojisinden yararlanılmıştır (26). Bunun dışında streptomisine maruz bırakılan *Yersinia pestis* hücrelerinin global gen ekspresyonu da mikroarray kullanımı ile araştırılmıştır (28). DNA Mikroarray teknolojisi ile gen ekspresyon profili çıkarılan diğer bir mikroorganizma da *Mycobacterium tuberculosis*'dir (30).

Başka bir çalışmada kemoradyasyon sonrasında bir tümördeki erken gen ekspresyonu değişimleri saptanmaya çalışılmış, bu amaçla servikte yassı hücreli karsinom görülen 12 kanser hastasından kemoradyasyondan 48 saat sonra servikal kanser numuleri alınmış ve bunlar üzerinde mikroarray çalışması yapılmıştır (22).

Mikroarrayin egzersiz fizyolojisinde RNA ekspresyonu analizinde kullanıma potansiyeli bulunmaktadır. Bu tarz bir analiz egzersiz esnasındaki immün fonksiyonların ve stres yanıtlarının kompleks moleküler mekanizmasının açığa çıkarılmasında kullanılabilir. Enflamatuvar hastalıklar, romatoid artrit gibi hastalıklar ile ilişkili genler cDNA mikroarrayleri kullanılarak çalışılmaktadır (8).

Diğer bir çalışmada beyin dokusundan alınan postmortem prefrontal kortekslere major depresyon için DNA mikroarray analizi yapılmıştır. Major depresyon hastaları ve kontrol grubunun gen ekspresyon modelleri karşılaştırılmış ve major depresyonda 99 genin farklı şekilde eksprese olduğu görülmüştür (24).

Zekâ geriliğinin genom profili (53), ülseratif kolit (UC) ve Crohn hastalığındaki (CD) doku gen ekspresyonu profili (54) de DNA mikroarray teknolojisi vastasıyla çalışılmaktadır (53).

Genetik ve Mutasyon Analizleri

Çipler tek bir baz çiftindeki bir değişikliği saptayabilecek kadar hassas olduklarından genetik mutasyonlar, viral genomlar ve onkogenezdeki varyasyonlar ya da gen polimorfizmi analizinde etkili cihazlardır.

M. tuberculosis, *M. bovis* ve BCG daughter strainler arasındaki genom farkları; *H. pylori* ve *M. tuberculosis* arasındaki genom farklılıkları DNA mikroarrayler kullanılarak araştırılmıştır. Bu çalışmalar virulens faktör tanımlanması, moleküler filogeni analizi, tanısal cihazların geliştirilmesi ve aşıların geliştirilmesi için yararlı bilgiler sağlar (8).

Gazi üniversitesinde yapılan bir çalışmada DNA mikroarrayler kullanılarak gaucher hastalarında görülen 10 genel mutasyonun hızlı taraması yapılmıştır (32). Göğüs kanseri ile ilişkili olan BRCA-1 geni oligonükleotid mikroarrayler kullanılarak analiz edilmiştir (8).

Mayalarda 11 gende bulunan delesyon mutasyonları oligonükleotid arrayler kullanılarak çalışılmıştır. Tanılama delesyon içeren strainin, belirli büyüme koşulları altında tüm delesyon strainleri için bir tanılayıcı olarak kullanılan 20 baz sekanslık bir etiket ile işaretlenmesi ile gerçekleştirilmiştir (8).

Çoklu-ilaç dirençli *P. aeruginosa*'da enfeksiyon idaresi hızlı ve güvenli tekniklere ihtiyaç duymaktadır. Bu amaçla birkaç virulens faktör ve antibiyotik resistansının genotiplendirilmesi için bir DNA mikroarray geliştirilmiştir. Array akış regülatörleri olan *mexR*, *nfxB*, *mexT*, *gyrase gyrA* ve *parC*; plazmid kodlayan *vim*, *imp*, *oxa*, *aph*, *aac* ve *aad* genleri; virulans ile ilgili olan *mucA*, *exoU*, *exoT* ve *exoS* genleri için mutasyonlar açısından çalışılmıştır (33).

Enterokoklarda glikopeptid resistansı, mutasyon ve delesyonları taşıyabilecek farklı genetik elemanlar tarafından sağlanmaktadır. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada oligonükleotid DNA mikroarrayler glikopeptid resistant enterokokların tiplendirilmesi için kullanılmıştır. Oligonükleotid DNA mikroarrayler enterokok glikopeptid resistansı gen kümelerinin hedeflenmesi ile üretilmiştir. 42 gen için selektif olan 105 prob hazırlanmıştır (31).

Neisseria gonorrhoeae'nin siprofloksasin direncinden sorumlu iki geninde bulunan beş mutasyon, mikroarray teknolojisi ile çalışılmış ve sonuç olarak mikroarraylerin nokta mutasyonlarını yakalama becerisinin patojenlerin karakterizasyonu ve tanısında çok yararlı olduğu açığa çıkmıştır (50).

Mikroarrayler SNP ile genetik bağlantı çalışmalarında da kullanılan çok yönlü cihazlardır. Oligonükleotid mikroarrayler SNP markörlerinin genomik DNA sequensleri arasından tespiti için kullanılırlar. Elde edilen markörler kataloglanır ve ilgilenilen alanın tespiti için bir ana array oluşumunda kullanılacak şekilde tasarlanırlar (8). Mutasyonlar, tekli nükleotid polimorfizmlerinin paralel tanılanmasında minisequencing ya da allel-spesifik primer elongasyonu gibi teknik yaklaşımların masrafı ve zaman kaybı gibi dezavantajlarının üstesinden gelinmesi oligonükleotid mikroarrayler ile sağlanmıştır (55).

Yüksek yoğunluklu oligonükleotid arrayleri gen haritası çıkarmakta da kullanılır. Şempanze, goril ve orangutan sequenslerinde %98,5 - % 99,2'lik bir nükleotid benzerliği belirlenmiştir (8). SNP ile ilişkili olan nöroblastoma hastalarındaki klinik sonucun tahmininde de mikroarrayler kullanılmıştır (70).

Çevresel Araştırmalar

DNA mikroarray teknolojileri bakterilerin genomik DNA-DNA benzerliklerine, populasyon genetiklerine ve çevredeki fonksiyonel genlerin çeşitliliğine dayalı olarak genotipleme ve tanılamada da kullanılabilir. Ayrıca çevresel genomik bir kütüphane analizi için etkili bir yaklaşım sağlamak amacıyla metagenomik kütüphane karakterizasyonu için de kullanılabilir. Birçok klonun hızlı karakterizasyonu ve henüz tanılanmamış mikroorganizma türlerine karşılık gelen klonların identifikasyonu da bu teknolojinin ilgi alanları arasındadır (8).

Geleneksel mikrobiyal su kalitesi test metotları direkt patojen tespit kapasitesi ve düşük iş kapasitesi gibi teknik sınırlara sahiptir. Mikroarray teknolojisi çevresel patojen aranmasında umut verici bir alternatif olarak görülmektedir. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada belediyeye ait atık sudaki bakteriyel patojenler bir oligonükleotid mikroarray ile tespit edilmiştir. Bu array ile 38 tür, 4 genus ve bir patojen familyasının tespiti yapılabilmektedir. Tespiti yapılan bakteriyel patojenler arasında *Aeromonas hydrophila*, patojen *E. coli* strainleri, *Arcobacter butzleri*, *Bacillus anthracis*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella* spp., *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae* ve *Yersinia enterocolitica* bulunmaktadır (65).

Toprak mikroorganizmalarının çoğunluğu kültüre edilememektedir. Bu nedenle toprakta bulunan canlı mikroorganizmaların analizi içim moleküler biyolojik metotlara başvurulmaktadır. Bu metotlardan biri de DNA mikroarraylerdir. Bu teknoloji ile toprakta bulunan ve kültüre edilemeyen nitrifikasyon, metanogenez ve denitrifikasyon mikroorganizmaları çalışılabilir (69).

2003'te karışık mikrobiyal komünitelerdeki bakteriyel metabolik genlerin ekspresyonunun izlenmesi için bir mikroarray geliştirilmiştir. Bu çalışmada atık su örneğinde *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas diterpeniphila*, *Nocardia coralina* gibi mikroorganizmaların tespiti amaçlanmıştır (71). Mikrobiyal komünitelerle ilgili bir diğer çalışmada *Shewanella*, *Rhodopseudomonas* ve *Nitrosomonas* türleri ile çalışılmıştır (72).

Sülfat indirgeyen yeni bir mikrobiyal komünite tanılanmasında bu teknoloji kullanılmış; *Pyrococcus furiosus*'da yeni bir sülfür indirgeyen enzim kompleksi tanılanmış; toluen ve etilbenzen indirgeyen bir mikroflora çalışılmış ve naftalen indirgeyen genlerin analizi 1662 prob içeren bir array ile gerçekleştirilmiştir (8).

Başka bir çalışmada denitrifikasyonda görev alan nirS genlerinin belirlenmesi ve ölçümü için 70-mer oligonükleotid mikroarray geliştirilmiştir.

Tanılayıcı Araçlar Olarak Mikroarrayler

Patojenlerin tanılanmasında zahmetli, zaman alıcı ve masraflı olan geleneksel metotlar kullanılmaktadır. Buna ek olarak bazı patojenler pek çok seçici ortamda büyüyemediğinden tanılama için moleküler yaklaşımlar gerekmektedir. Patojen spesifik DNA ya da RNA'nın çoğaltılmış bir nükleik asit ürünü ile direkt olarak tayini de bu teknikler arasındadır. Mikroarrayler bu metotların dezavantajlarının alt edilebilmesi için tanılayıcı cihazlar olarak kullanılırlar (8). Ayrıca moleküler tanıda artık biyosensör ve mikroarraylerin birlikte kullanıldığı multidisipliner yaklaşımlar dikkat çekmeye başlamıştır (57).

Mikroarray teknolojisi kullanılarak adenovirüsler, *Campylobacter* ve *Corynebacterium* türleri (8), vankomisin-dirençli *Enterococcus* strainleri ve diğer *Enterococcus sp.* (50, 56), gerek üriner sistem gerekse diğer vücut sistemlerindeki patojen *E. coli* strainleri (41), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* strainleri (58), *Staphylococcus aureus* (56) ve balık patojenleri gibi pek çok mikroorganizma tanılanmıştır. Nozokomiyal patojenler olan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* de DNA mikroarrayler ile tanılanan mikroorganizmalardandır (51).

Siyanobakteriyel toksisite, su kalitesi ve halk sağlığı için büyük bir tehdittir. Kompleks örneklerdeki toksik siyanobakteri genotiplerinin tespiti ve tanısında DNA mikroarray teknolojisi kullanılmıştır (52).

2005 yılında biyolojik savaş için önemli bir mikroorganizma olan *Bacillus anthracis*'in tanılanması için bir oligonükleotid mikroarray geliştirilmiştir. Bu mikroarray 16S rRNA genlerinin çeşitli bölgeleri ile hibridize olacak şekilde tasarlanmış uzun oligonükleotidlerden (50 – 70-mer) oluşmaktadır (42).

Mycobacterium enfeksiyonları halk sağlığında önemli bir sorundur. Bu nedenle 34 farklı *Mycobacterium* türünün tanılanması için real-time PCR ve DNA mikroarray'in kombine olarak kullanıldığı bir çalışma yapılmıştır. Bu sistem ile bu 34 tür doğru ve hızlı bir şekilde tanılanmıştır. Elde edilen sonuçlar bu iki teknolojinin bir arada kullanımının farklı *mycobacterium* türlerinin karışık enfeksiyon ya da kontaminasyonların da identifikasyonu avantajı ile hızlı identifikasyonu için umut verici olduğunu göstermiştir (46).

Bunların yanı sıra *E. coli*'nin virulans tiplendirmesi (44), *S. aureus*'un hızlı bir şekilde tanılanması, virulans analizi ve dirençlilik profili (45) de mikroarraylerin kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. Tüm bu çalışmalar mikroarray tekniğinin bakteriyel izolatların taranması ve tanılanmasında hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu kanıtlamaktadır.

Spesifik antiviral ilaç ihtiyacının son yıllarda artması, araştırmacıları viral tanılamların hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılabilmesi için DNA-mikroarrayleri kullanma yoluna itmiştir (37). Herpesvirus tanısı ve teşhisi (68); viral orijinli solunum enfeksiyonlarının teşhisi ve viruslerin tanısı (39); SARS etkeni olan SARS coronavirus (SARS-CoV)'un tanılanması ve genotiplendirilmesi (40) gibi için kullanılmıştır. Servikal kanserin ana etkeni olan insan papillomavirus (HPV) da mikroarrayler ile çalışılan organizmalar arasındadır. Hastalardan alınan 511 örneğin 349'u HPV pozitif olarak saptanmıştır ve elde edilen sonuçlar PCR ve DNA-sequencing metodları ile elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir (38, 66).

Antimikrobiyal Genlerin Tanısı

Antimikrobiyal dirençlilik testi, klinik ve çevresel bakterilerin karakterize edilmesinde çok değerli bir metottur. Mikroarray teknolojisi, birçok antibiyotik direnç geninin göreceli olarak düşük masraflı metotlarla taranmasını sağlayabilir.

Mycobacterium tuberculosis'in rifampin dirençli strainleri, *rpoB* genindeki nokta mutasyonları ve rifampin dirençliliği ile ilgili diğer gen düzenlenmelerinin tespiti ile tanılanmıştır. Bunun için bakteriyel kolonilerden elde edilen ve PCR ile çoğaltılan genetik materyal floresan olarak işaretlenmiş ve array'e hibridize edilmiştir. Böylece 53 rifampin-dirençli ve 15 rifampin-duyarlı *M. tuberculosis* straininin doğru bir şekilde tanılanması yapılmıştır. Bu işlem PCR amplifikasyonundan sonra sadece 1.5 saat sürmüştür (47, 48). Yine *Mycobacterium tuberculosis*'de isoniazid direnç geninde tekli nükleotid polimorfizmi çalışılmıştır (8).

Mikroarray kullanılarak çeşitli tetrasiklin (tet) direnç geni taranmıştır. 2007'de *B. anthracis* ve mikroarrayleri bir araya getiren bir çalışma yapılmış ve bu çalışmada *Bacillus anthracis* ve *Bacillus cereus*'un vankomisin, rifampin, doksisisiklin, siprofloksasin direncinde görev alan on gen için bir PCR amplifikasyonu geliştirilmiştir. Bu PCR ürünleri enzimatik olarak etiketlenmiş ve daha sonra bir oligonükleotid DNA mikroarray çalışması ile direnç genleri olan *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *vanA* ve *vanB* tanılanmıştır. Bu deneme sonucunda mikrobiyal deteksiyon mikroarrayler yardımı ile 4 saat gibi kısa bir sürede gerçekleştirilmiştir (43). Aynı şekilde hızlı ve duyarlı bir şekilde antibiyotik dirençli *Staphylococcus aureus* strainlerinin belirlenmesi için bir oligonükleotid mikroarray yapılmıştır. Array klinik ve terapötik olarak önemli olan 10 antibiyotik direnç geni ve mutasyonları (*mecA*, *aacA-aphD*, *tetK*, *tetM*, *vat(A)*, *vat(B)*, *vat(C)*, *erm(A)*, *erm(C)*, *gria*-mutasyon) oligonükleotid problemleri ve çeşitli kontrol problemleri ile donanımlıdır (59).

Bu konu ile ilgili bir diğer çalışmada 12 *Salmonella* ve 7 *E. coli* izolatında 25 virulans ve 23 antimikrobiyal direnç geninin aranması için bir DNA mikroarray geliştirilmiştir (60). Başka bir çalışmada ise *amp^R* direnç geninin identifikasyonu ile *E. coli* O157:H7 ve patojen olmayan *E. coli* K12 straininin (K12 straini *amp^R* direnç genine sahip değildir) ayrımı yapılmıştır (61). Glikopeptid dirençli enterokoklar için de 42 gen için spesifik toplam 105 prob içeren bir oligonükleotid DNA mikroarray geliştirilmiştir (64).

Candida albicans'ın Flucanazol dirençli ve duyarlı strainlerinin araştırılmasında da mikroarray teknolojisi kullanılmıştır (8). Adamantase-dirençli influenza tanısı için bir mikroarray ile yapılan bir çalışmada kullanılan antiviral direnç çipinin (AVR-Chip) dirençliliği sağlayan mutasyonları %95 oranında saptayabildiği açığa çıkarılmıştır (58).

Diğer Potansiyel Uygulama Alanları

DNA çipleri ve mikroarrayler proteomik çalışmaları, protein-nükleik asit, protein-protein interaksyonları, protein fonksiyonlarının biyokimyasal analiz ve ilaç geliştirme gibi uygulamalar için modifiye edilmektedir. Klinik immunoassay tanılayıcılarında rastlanan zorlukların ortadan kaldırılması için antikor mikroarrayleri geliştirilmiştir (65). Bunların yanı sıra mikroarrayler hastalık direnci, soğuk ve kıtlık yanıtları ve bitkilerdeki ürün getirisinin moleküler mekanizmalarının araştırılmasında kullanılabilir. Beyin, plasenta ve dalaktaki gen ekspresyon profilinin karşılaştırılması cDNA mikroarray sistemleri ile gerçekleştirilmiştir. Mikroarray teknolojisi yavru gelişimi, hastalık direnci, beslenme, fertilité ve üretim oranlarının moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında oldukça güçlü cihazlardır. (8).

Sonuç

DNA mikroarray teknolojisinin biyomoleküllerin yapı ve görevlerindeki gizemler için kesin bir çözüm sağlayabileceği düşünülmektedir, böylece mikroarrayler moleküler biyolojik araştırmalarda ani bir artış sağlamışlardır. Mikroarray teknolojileri SNP analizi, diyagnostikler, mutasyon analizi, gen ekspresyonunun karakterizasyonunda çok büyük bir role sahip olduğundan PCR kadar güçlü bir teknoloji olma yolunda hızla ilerlemektedir. Fakat hala bu tekniğin tam güç olarak kullanılabilmesini sağlayacak bilgilerde geniş boşluklar bulunmaktadır (8).

Kaynaklar

1. Colowick, S.P., Kapan, O.N., 1980, Methods in Enzymology - Volume 68; Recombinant DNA, Academic Press.
2. Lucchini, S., Thompson, A., Hinton, J.C.D., 2001, Microarrays for microbiologists, Microbiology, 147, 1403-1414.
3. Bednar, M., 2000, DNA Microarray Technology and Application, Med Sci Monit, 6(4): 796-800.
4. Choi, S. 2004. DNA Chips and Microarray Analysis, Handbook of fungal biotechnology. Marcel Dekker, Inc. (D. Arora, Ed)
5. Sassanfar, S., Walker, G., 2003, DNA Microarray Technology. What Is It and How Is It Useful, MIT, Biology Science Outreach.
6. NCBI, 2004, Microarrays: Chipping Away at the Mysteries of Science and Medicine, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>.

7. Li, X., Gu, W., Mohan, S., Baylink, D.J., 2002, DNA Microarrays: Their Use and Misuse, *Microcirculation*, 9, 13-22.
8. Kumar, A., Goel, G., Fehrenbach, E., Puniya, A. K., Singh, K., 2005, Microarrays: The Technology, Analysis and Application, *Eng. Life Sci.* 5, No. 3.
9. Pasquarelli, A., 2006, Biochips: Technologies and applications, 5th. Brazilian Materials Research Society Meeting (Oct. 8-12, 2006, Florianopolis, Brasil).
10. Ehrenreich, A., 2006, DNA Microarray Technology For The Microbiologist: An Overview, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 73:255–273
11. Ness, S.A., 2007, Microarray analysis: basic strategies for successful experiments, *Mol Biotechnol.*, 36:205–219.
12. Pirrung, M.C., 2002, How to Make a DNA Chip, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 1276 - 1289.
13. Winssinger, N., Pianowski, Z., Debaene, F., 2007, Probing Biology with Small Molecule Microarrays (SMM), *Top Curr Chem*, 278: 311–342.
14. Stillman, B.A., Tonkinson, J. L., 2000, FAST Slides: A Novel Surface For Microarrays, *Biotechniques*, 29, 630-635.
15. Hegde, P., Qi, R., Abernathy, K., Gay, C., 2000, A Concise Guide To Cdna Microarray Analysis, *Biotechniques*, 29, 548-556.
16. Wiltgen, M., Tilz, G.P., 2007, Dna Microarray Analysis: Principles And Clinical Impact, *Hematology*, 12:4, 271–287.
17. Rockett, J.C., Dix, D.J., 2000, Dna Arrays: Technology, Options And Toxicological Applications, *Xenobiotica*, 30:2, 155 – 177.
18. Stekel, D., 2003, Microarrays: Making Them and Using Them, Cambridge University Press 0521819822 - Microarray Bioinformatics.
19. Oh, M.K., Liao, J.C., 2001, Gene expression profiling by DNA microarrays and metabolic fluxes in *Escherichia coli*, *Biotechnol Prog.* 16, 278-286.
20. Roos, V., Andersson, C.I.J., Bülow, L., 2004, Gene expression profiling of *Escherichia coli* expressing double *Vitreoscilla* haemoglobin, *Journal of Biotechnology*, 114:1-2, 107-120.
21. Kurashige, Y., Saitoh, M., Nishimura M., Noro, D., Kaku, T., Igarashi, S., Takuma, T., Arakawa, T., Inoue T., Abiko, T., 2008, Profiling of differentially expressed genes in porcine epithelial cells derived from periodontal ligament and gingiva by DNA microarray, *Archives of Oral Biology*, 53:5, 437-442
22. Klopp, A.H., Jhingran, A., Ramdas, L., Story, M.D., Broadus, R.R., Lu, K.H, Eifel, P.J., Buchholz, T.A., 2008, Gene Expression Changes in Cervical Squamous Cell Carcinoma After Initiation of Chemoradiation and Correlation With Clinical Outcome, *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 71:1, 226–236.
23. Castillo, L., Martínez, A.I., Gelis, S., Ruiz-Herrera, J., Valentín E., Sentandreu, R., 2008, Genomic Response Programs of *Saccharomyces cerevisiae* Following Protoplasting and Regeneration, *Fungal Genetics and Biology*, 45:3, 253–265.
24. Tochigi, M., Iwamoto, K., Bundo, M., Sasaki, T., Kato, N., Kato, T., 2008, Gene Expression Profiling of Major Depression and Suicide in the Prefrontal Cortex of Postmortem Brains, *Neuroscience Research*, 60:2, 184-191.

25. Kim, B.C., Gu, M.B., 2007, Discrimination of Toxic Impacts of Various Chemicals Using Chemical–Gene Expression Profiling of *Escherichia coli* DNA Microarray Process Biochemistry, 42:3, Pages 392-400
26. Hain, T., Steinweg, C., Chakraborty, T., 2006, Comparative and Functional Genomics of *Listeria* spp., Journal of Biotechnology 126:1, 37-51 Aspects of Prokaryotic Genome Research.
27. Portman, D.S., Emmons, S.W., 2004, Identification of *C. elegans* Sensory Ray Genes Using Whole-Genome Expression Profiling, Developmental Biology, 270:2, 499-512.
28. Qiu, J., Zhou, D., Han, Y., Zhang, L., Tong, Z., Song, Y., Dai, E., Li, B., Wang, J., Guo, Z., Zhai, J., Du, Z., Wang X., Yang, R., 2005, Global Gene Expression Profile of *Yersinia pestis* Induced by Streptomycin, FEMS Microbiology Letters, 243:2, 15, 489-496.
29. Pandya, U., Allen, C.A., Watson, D.A., Niesel, D.W., 2005, Global Profiling Of *Streptococcus pneumoniae* Gene Expression at Different Growth Temperatures, Gene, 360: 1, 45-54.
30. Rachman, H., Strong, M., Schaible, U., Schuchhardt, J., Hagens, K., Mollenkopf, H., Eisenberg, D., Kaufmann, S.H.E., 2006, *Mycobacterium tuberculosis* Gene Expression Profiling Within The Context of Protein Networks, Microbes and Infection, 8: 3, 747-757.
31. Del Grosso, C.M., Pantosti, A., Giordano A., Pozzi, G., 2008, Detection of Genetic Elements Carrying Glycopeptide Resistance Clusters in *Enterococcus* by DNA Microarrays, Molecular and Cellular Probes, 22: 3, 162-167
32. Ezgu, F., Hasanoglu, A., Okur, I., Biberoglu, G., Tumer, L., Eminoglu T., Dogan, H., 2008, Rapid Screening of 10 Common Mutations in Turkish Gaucher Patients Using Electronic DNA Microarray, Blood Cells, Molecules, and Diseases 40: 2, 246-247.
33. Weile, J., Schmid, R.D., Bachmann, T.T., Susa, M., Knabbe, C., 2007, DNA Microarray for Genotyping Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 59: 3, 325-338.
34. Strommenger, B., Schmidt, C., Werner, G., Roessle-Lorch, B., Bachmann, T.T., Witte, W., 2007, DNA Microarray for the Detection of Therapeutically Relevant Antibiotic Resistance Determinants in Clinical Isolates Of *Staphylococcus aureus*, Molecular And Cellular Probes, 21: 3, 161-170.
35. Antwerpen, M.H., Schellhase, M., Ehrentreich-Förster, E., Bier, F., Witte, W., Nübel, U., 2007, DNA Microarray for Detection of Antibiotic Resistance Determinants in *Bacillus anthracis* and Closely Related *Bacillus cereus*, Molecular and Cellular Probes, 21: 2, 152-160.
36. Dufva, M., Petersen, J., Stoltenborg, M., Birgens, H., Christensen, C.B.V., 2006, Detection of Mutations Using Microarrays of Poly(C)10–Poly(T)10 Modified DNA Probes Immobilized on Agarose Films, Analytical Biochemistry, 352:2, 188-197.
37. Quan, P.L., Briese, T., Palacios G., Lipkin, W.I., 2008, Rapid sequence-based diagnosis of viral infection, Antiviral Research, 79:1, 1-5

38. Koidl, C., Bozic, M., Hadzisejdic, I., Grahovac, M., Grahovac, B., Kranewitter, W., Marth, E., Kessler, H.H., 2008, Comparison of molecular assays for detection and typing of human papillomavirus, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Article in Press, Corrected Proof.
39. Leruez-Ville, M., 2007, Diagnosis of viral respiratory infections, *Archives de Pédiatrie*, 14:4, 404–409.
40. Long, W., Xiao, H., Gu, X., Zhang, Q., Yang, H., Zhao, G., Liu, J., 2004, A universal microarray for detection of SARS coronavirus, *Journal of Virological Methods*, 121:1, 57–63.
41. Yu, X., Susa, M., Weile, J., Knabbe, C., Schmid R.D., Bachmann, T.T., 2007, Rapid and sensitive detection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* from urine samples using a genotyping DNA microarray, *International Journal of Medical Microbiology*, 297:6, 417–429.
42. Burton, J.E., Oshota, O.J., North, E., Hudson, M.J., Polyanskaya, N., Brehm, J., Lloyd, G., Silman, N.J., 2005, Development of a multipathogen oligonucleotide microarray for detection of *Bacillus anthracis*, *Molecular and Cellular Probes*, 19:5, 349–357.
43. Antwerpen, M.H., Schellhase, M., Ehrentreich-Förster. E., Bier, F., Witte, W., Nübel, U., 2007, DNA microarray for detection of antibiotic resistance determinants in *Bacillus anthracis* and closely related *Bacillus cereus*, *Molecular and Cellular Probes*, 21: 2, 152–160.
44. Ijperen, C. , Kuhnert, P., Frey J., Clewley, J. P., 2002, Virulence typing of *Escherichia coli* using microarrays, *Molecular and Cellular Probes*, 16: 5, 371–378.
45. Palka-Santini, M., Pützfeld, S., Cleven, B.E.E., Krönke, M., Krut, O., 2007, Rapid identification, virulence analysis and resistance profiling of *Staphylococcus aureus* by gene segment-based DNA microarrays: Application to blood culture post-processing, *Journal of Microbiological Methods*, 68: 3, 468–477.
46. Tobler, N.E., Pfunder, M., Herzog, K., Frey J.E., Altwegg, M., 2006, Rapid detection and species identification of *Mycobacterium* spp. using real-time PCR and DNA-Microarray, *Journal of Microbiological Methods*, 66: 1, 116-124
47. Yue, J., Shi, W., Xie, J., Li, Y., Zeng, E., Liang L., Wang, H., 2004, Detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a specialized oligonucleotide microarray, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48:1, 47-54.
48. Butcher, P.D., 2004, Microarrays for *Mycobacterium tuberculosis* , *Tuberculosis*, e 84: 3-4, 131-137.
49. Lehner, A., Loy, A., Behr, T., Gaenge, H., Ludwig, W., Wagner, M. Schleifer, K., 2005, Oligonucleotide Microarray for Identification of *Enterococcus* species, *FEMS Microbiology Letters*, 246:1, 133-142.
50. Booth, S.A., Drebot, M.A., Martin, I.E., Lai-King Ng., 2003, Design of oligonucleotide arrays to detect point mutations: molecular typing of antibiotic resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* and hantavirus infected deer mice, *Molecular and Cellular Probes*, 17: 2-3, 77-84.

51. Keum, K.C., Yoo, S.M., Lee, S.Y., Chang, K.H., Yoo, N.C., Yoo, W.M., Kim, M., Choi, J.Y., Kim J.S., Lee, G., 2006, DNA microarray-based detection of nosocomial pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, *Molecular and Cellular Probes*, 20 1, 42-50.
52. Pearson L.A., Neilan, B.A., 2008, The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk, *Current Opinion in Biotechnology*, Article in Press, Corrected Proof
53. de Vries, B., Pfundt, R., Leisink, M., Koolen, D.A., Vissers, L., Janssen, I.M., van Reijmersdal, S., Nillesen, W.M., Huys, E., de Leeuw, N., Smeets, D., Sistermans, E.A., Feuth, T., van Ravenswaaij-Arts, C.M.A., van Kessel, A.D., Schoenmakers, E.F., Brunner H.G., Veltman, J.A, 2005, Diagnostic Genome Profiling in Mental Retardation, *The American Journal of Human Genetics*, 77: 4, 606–616.
54. Lawrance, I. C., Fiocchi, C., Chakravarti, S., 2000, Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) tissue gene expression profiling by DNA microarray techniques: Diagnostic and therapeutic implications, *Digestive and Liver Disease*, 32, Supplement 1, A30
55. Huber, M., Losert, D., Hiller, R., Harwanegg, C., Mueller, M.W., Schmidt, W.M., 2001, Detection of Single Base Alterations in Genomic DNA by Solid Phase Polymerase Chain Reaction on Oligonucleotide Microarrays, *Analytical Biochemistry*, 299 1, 24–30.
56. Barken, K.B., Haagensen, J.A.J., Tolker-Nielsen, T., 2007, Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections, *Clinica Chimica Acta*, 384:1-2, 1-11.
57. Cloarec, J.P., Chevolut, Y., Laurenceau, E., Phaner-Goutorbe, M., Souteyrand, E., 2008, A multidisciplinary approach for molecular diagnostics based on biosensors and microarrays, *ITBM-RBM*, Article in Press, Corrected Proof.
58. Townsend, M.B., Smagala, J.A., Dawson, E.D., Deyde, V., Gubareva, L., Klimov, A.I., Kuchta R.D., Rowlen, K.L., 2008, Detection of adamantane-resistant influenza on a microarray, *Journal of Clinical Virology*, Article in Press, Corrected Proof
59. Strommenger, B., Schmidt, C., Werner, G., Roessle-Lorch, B., Bachmann T.T., Witte, W., 2007, DNA microarray for the detection of therapeutically relevant antibiotic resistance determinants in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Molecular and Cellular Probes*, 21: 3, 161–170.
60. Chen, S., Zhao, S., McDermott, P.F., Schroeder, C., White, D.G., Meng, J., 2005, A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*, *Molecular and Cellular Probes*, 19: 3, 195–201.
61. Wu, C.F., Valdes, J.J., Bentley, W.E., Sekowski, J.W., 2003, DNA microarray for discrimination between pathogenic 0157:H7 EDL933 and non-pathogenic *Escherichia coli* strains, *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 1, 1-8.
62. Malorny, B., Bunge, C., Guerra, B., Prietz, S., Helmuth, R., 2007, Molecular characterisation of *Salmonella* strains by an oligonucleotide multiprobe microarray, *Molecular and Cellular Probes*, 21: 1, 56–65.
63. Cassone, M., Del Grosso, M., Pantosti, A., Giordano, A., Pozzi, G., 2008, Detection of genetic elements carrying glycopeptide resistance clusters in *Enterococcus* by DNA microarrays, *Molecular and Cellular Probes*, 22: 3, 162–167.

64. Pavlickova, P., Schneider, E.M., Hug, H., 2004, Advances in recombinant antibody microarrays, *Clinica Chimica Acta*, 343, 17-35.
65. Lee, D.L., Lauder, H., Cruwys, H., Falletta, P., Beaudette, L.A., 2008, Development And Application Of An Oligonucleotide Microarray And Real-Time Quantitative PCR For Detection Of Wastewater Bacterial Pathogens, *Science Of The Total Environment* , Article In Pres.
66. Lia, Y., Wangb, Y., Jiaa, C., Maa, Y., Lana, Y., Wang, S., 2008, Detection of human papillomavirus genotypes with liquid bead microarray in cervical lesions of northern Chinese patients, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 182, 12 – 17.
67. Bauer, P.B., Ludwig, W., Schleifer, K., 2008, A novel DNA microarray design for accurate and straightforward identification of *Escherichia coli* safety and laboratory strains, *Systematic and Applied Microbiology*, 31, 50–61.
68. Jaaskelainen, A.J., Piiparinen, H., Lappalainen, M., Vaheri, A., 2008, Improved multiplex-PCR and microarray for herpesvirus detection from CSF, *Journal of Clinical Virology*, Article in Press.
69. Saleh-Lakha, S., Miller, M., Campbell, R.G., Schneider, K., Elahimanesh, P., Hart, M.M., Trevors, J.T., 2005, Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges, *Journal of Microbiological Methods*, 63, 1 – 19.
70. Hiyama, E., Yamaoka, H., Kamimatsuse, A., Onitake, Y., Hiyama, K., Nishiyama, M., Sueda, T., 2006, Single nucleotide polymorphism array analysis to predict clinical outcome in neuroblastoma patients, *Journal of Pediatric Surgery*, 41: 12, 2032-2036.
71. Philip Dennis, P., Edwards, E.A., Liss, S.N., Fulthorpe, R., 2003, Monitoring Gene Expression in Mixed Microbial Communities by Using DNA Microarrays, *Applied And Environmental Microbiology*, 69:2, 769–778.
72. Liyou Wu, L., Liu, X., Schadt, C.W., Zhou, J., 2006, Microarray-Based Analysis of Subnanogram Quantities of Microbial Community DNAs by Using Whole-Community Genome Amplification, *Applied And Environmental Microbiology*, 72:7, 4931–4941 .