

Hastalıklara yeni bir tanı yaklaşımı: protein-çip teknolojisi

Şefik Güran (*)

Özet

Yirmibirinci yüzyılın başında artık, insan genom projesinin sonuna yaklaşılmıştır. Günümüzde insanoğlu, genom ile ilgili çok daha fazla bilgiye sahiptir. Diğer taraftan, yeni bir teknoloji olan biyoçip teknolojisi kullanıma girmiş ve rutin genom analizlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Rutin yapılan genetik ve biyokimyasal analizlerde, genellikle tek bir gen bölgesine veya tek bir proteine bakılmaktadır. Yeni kullanılmaya başlanan biyoçip teknolojisi bir anda, bir örnekte, birçok farklı bölgeye bakabilme avantajı sunmaktadır. Bu teknoloji ile kanser gibi birçok faktörün ve genin etkilendiği hastalık tablolarında tümörün protein kalıbı çıkarılabilmekte, daha özgün ve hassas kanser markırları bulunabilmektedir. **Anahtar kelimeler:** Biyoçip, kanser, mikroarray, protein-çip teknolojisi

Summary

New diagnostic approaches into diseases: protein chip technology
At the beginning of XXIst century, human genome project has been nearly completed. Today, much more is known about the human genome. On the other hand, a new technology named biochip technology has been in use in routine genome analyses. Only one gene region or protein is gener-

ally analyzed in routine analyses in genetics and biochemistry. Biochip technology allows the advantage of searching for many loci in one sample at the same time. The protein pattern of a tumor can be demonstrated by using this technology in diseases such as cancer, where several factors and genes are affected, and it is possible to find out more specific and sensitive new cancer markers with this new technology.

Key words: Biochip, cancer, microarray, protein-chip technology

Giriş

İnsanlık tarihinin en büyük ve sonuçları açısından en önemli projelerinden biri olan İnsan Genom Projesi ("Human Genome Project"), DNA'nın moleküler yapısının Watson ve Crick tarafından 1953 yılında açıklanmasından tam 50 yıl sonra bitme aşamasına gelmiştir. Elde edilen veriler, insanoğluna yeni ufuklar sunarken, birçok farklı projelerin de başlamasına neden olmuştur. Bunlar içinde, insanoğlunun ırklara bağlı özelliklerini inceleyen tek nükleotid polimorfizminin (SNP) bulunduğu proje gösterilebilir. Bu proje ile kişiye özgü tedavi protokollerinin oluşturulabileceği düşünülmektedir (1,2). Diğer taraftan, insan genom projesi ile elde edilen bilgilerin çoğu ham bilgilerdir. Bu bilgilerin kliniğe uygulanması için, yeni bazı bilgilere ihtiyaç vardır. Halen hücrede birçok molekülün nereden, hangi koşullar altında sentezlendiği bilin-

memekte ve protein moleküllerinin rolleri açıklanamamaktadır. Bu nedenle, günümüzde genomiks denilen DNA-RNA ilişkilerini açıklamaya çalışan veya proteomiks denilen RNA-protein ilişkisini açıklamaya çalışan yeni çalışma alanları ortaya çıkmıştır. Birçok hastalık; gen kontrolü ile ilgili problemler, transkripsiyon, post-transkripsiyonal modifikasyon ve translasyon sırasında oluşan değişiklikler ile oluşmaktadır. Bu nedenle, nükleik asid bazlı (DNA ve RNA) laboratuvar tetkikleri yanında, protein bazlı laboratuvar tetkiklerinin de önemi artarak sürmektedir (3).

Sıklıkla kullanılan geleneksel laboratuvar yöntemleri, genellikle tek bir gen veya proteinin araştırılmasına yöneliktir. Hastalıkların çoğunda birçok gen etkilenmekte (multigenik) ve birçok faktöre bağlı olarak hastalıklar oluşmaktadır (multifaktöriyel) (4). Bu da, birçok farklı genin ve proteinin bir arada, kolay ve efektif olarak incelenebilmesini gündeme getirmiştir. Günümüzde gelişen bilgisayar teknolojisinin biyolojiye uyarlanması ile karşımıza çıkan DNA çipleri, bize bu olanağı sağlamaktadır. Mikroarrayler ile etkilenen genlerin ekspresyonları, kanserli bir dokuda aynı anda çalışılmakta, hücre siklusunu (döngüsünü) etkileyen yüzlerce genin ekspresyonu takip edilebilmektedir (3).

Halen, tek bir kansere özgün hassas bir markır (belirteç) yoktur. Klinikte sık kullanılan prostat kanserine özgün PSA ("prostate specific antigen") ve over kan-

*GATA Tıbbi Biyoloji AD

Ayrı basım isteği: Dr. Şefik Güran, GATA Tıbbi Biyoloji AD, Etilik-06018, Ankara
E-mail: sefguran@yahoo.com

Makalenin geliş tarihi: 16.06.2004

Kabul edilme tarihi: 14.10.2004

serine özgün CA 125, düşük özgünlük ve duyarlılığa sahiptir. Bu markırların özgünlüğünü artıracak ve bir anda çok daha fazla markıra bakabilecek yeni tekniklere ihtiyaç vardır. Bu nedenle, rutin klinik hizmetlerinde kullanılacak, temel bilimsel araştırmalarda yararlanılacak protein-çip (protein array) teknolojisinin yapımı gündeme gelmiştir (5).

Protein-çip teknolojisinin tıpta ve temel bilimlerde kullanımı: Protein-çip veya protein-array teknolojisinde temel prensip, özel hazırlanmış bir lam üzerindeki protein bilgilerinin, uygun yöntemler ile bir "software" programa aktarılması ve bunların bilgisayar ekranında görünür hale getirilmesidir. Bu teknolojiye geliştirilen farklı yöntemler olsa da, temelde iki grup altında incelenebilir. Birinci grupta tek bir protein ürününe özgün olarak geliştirilen sistemler (antikor bazlı) yer almaktadır. İkinci grupta ise, tüm proteinler birden çalışmaya alınır. Bu proteinlere ait bilgiler, uygun programlar aracılığı ile işlenir ve elde edilen bilgilerin farklı hastalık tablolarında ne gibi değişiklikler gösterdiği incelenir (5).

Sadece belli bir proteini bulmaya yönelik hazırlanan protein-array yönteminde, biyolojik materyal, çoğunlukla bir idrar veya kandır. Uygun koşullarla bu örneklerden hazırlanan lamlarda, istenen proteinin varlığı, mikroarray teknolojisi ile araştırılmaktadır. Burada önemli olan, bulunmak istenen proteinlere yüksek oranda bağlanabilme özelliğine sahip olan moleküllerin elde edilmesidir. İyi bir molekül, istenen proteine bağlanabilmeli ve daha sonra yıkamadan etkilenmemelidir. Bu işlem için en uygunu antikor kullanımıdır (6). Daha sonra elde edilen veriler bir "software" program yardımı ile kullanıma hazır hale gelmektedir. Lazerin mikroarray teknolojisinde kullanılması ile geliştirilen teknoloji sayesinde, biyopsi örneklerinden hücre yüzey markırlarının profili bulunmaktadır. Falsey ve ark. hücre yüzeyinde yer alan peptid ve küçük moleküler yapıların dinamik olarak incelenebileceğini ortaya koymuşlardır (7). Özel olarak lamlara yayılan hücre hatlarında floresans bağlanması ile protein yapısı, fosfor 33 ile işaretli ATP ve spesifik protein kinazlar ile moleküllerin fos-

forillenme paterni gösterilmiştir. Lamlara bağlanan hücrelerde, adezyon molekülleri ortaya konmuştur. Tüm bu veriler birarada değerlendirildiğinde, hücre hatlarında farklı evrelerde birçok hücre membranına ait moleküllerin dinamik incelenmesi mümkün olmuştur (7).

Artan deneysel çalışmalar, kanserli olgularda markır olarak kullanılacak moleküller ile ilgili önemli ipuçlarını da vermektedir. "Multidrug resistance-associated protein 2" nin kolon, akciğer, mide, over, meme ve renal kanserlerin tedavisi aşamalarında farklı ekspresyonları, tedavi takibine ait önemli ipuçları vermektedir. Meme kanserinde siklin E'nin ekspresyonunun artması da önemli bir parametredir. Vimentinin renal hücreli kanserlerde, "insulin-like growth factor-binding protein 2" ve buna bağlanan 27 kd' luk "heat-shock" proteinlerin prostat kanserinde takibi önemlidir (8,9). Konjestif kalp yetmezliğinde, meme kanserinde ve lösemilerde uygun antikörleri bağlayan mikroarraylerin kullanımı hızla yayılabilir. Ancak, rutin kullanıma girmesi için teknolojinin ucuzlaması ve daha basit hale getirilmesi gereklidir (9).

Klinik proteomiks çalışmalarında temel amaç, farklı hastalıklara ait özgün biyomarkırların ortaya konması ve bunun tanı testi olarak kullanılmasıdır. Bu teknoloji, serum ve idrar gibi ürünlerde kolaylıkla uygulanabilir. Ancak, biyokimyasal mekanizmaların karmaşıklığı nedeni ile, bir çok hastalıkta tek bir biyolojik markır ile sonuca ulaşılamamaktadır. Bu nedenle hastalık progresyonu sırasında ortaya çıkan moleküllerin çalışılmasında, çoklu markır panellerinin veya proteomiks panellerinin çalışılması giderek daha önemli olmaktadır (10,11).

Proteomiks konusunda temel araştırmalarda kullanılan "two-dimensional electrophoresis"-2D teknolojisi önemli bir adımdır ve bu konuda bir ilktir (12). Ancak, bu teknoloji bazı teknik zorluklardan dolayı, artmış örnek sayılarında rutin olarak kullanılamamaktadır. Günümüzde, çok fazla örneğin çalışılmasına uygun olarak ELISA yöntemi vardır. Bu test, güvenilir, ucuz ve kolay uygulanabilir bir testtir. Ancak, özellikle kanserli olgularda özel markırların gösterilmesinde yetersiz kalmaktadır. Özel antikörleri tanıyacak

mikroarraylerin geliştirilmesi ile, yoğun antikör bulunan ortamda hastalıklarda artan protein miktarı (ekspresyon) gösterilebilecek ve bu yolla yeni biyomarkırlar bulunabilecektir. Burada en önemli sorun, bu proteinlere özgün olarak bağlanacak moleküllerin yapılmasıdır (9).

Geliştirilen yeni bir teknolojiye, kromatografik yüzeye proteinler bağlanmakta ve "mass spectrophotometer" ile bu proteinlerin toplam ölçümü yapılmaktadır. Burada, özel bir proteinin aranmasından çok, tüm proteinlerin bağlanma kalıbı ("pattern") incelenmekte ve farklı koşullarda, farklı parametreler elde edilmektedir. Normalde ve hasta bireylerde elde edilen farklı spektrumlar karşılaştırılarak, hastalıklarda biyomarkır olarak kullanılacak moleküllerin ipuçları elde edilmektedir. Bu yeni teknoloji-lerde, kontaminasyon gibi laboratuvar hatalarını en aza indirecek teknolojiler kullanılmakta, idrar ve serum hazırlanmasında otomatik sistemlerden yararlanılmaktadır. Elde edilen verilerin, kullanıcının kolaylıkla anlayacağı forma ulaşması için, farklı bilgisayar yazılımları üzerinde çalışılmaktadır. Bu teknolojiler, özellikle kişilere ait HIV direncinin araştırılmasında, prostat, over, mide, akciğer ve mesane kanserlerinin takibinde araştırma bazında kullanılmaktadır (8,13-15).

Bu yeni teknolojinin günümüzde ilk kullanımları, meme kanseri üzerine yapılmıştır. Meme kanseri, günümüzde kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Yaklaşık her on kadından biri, hayatının belli bir döneminde meme kanserine yakalanmaktadır. Bu nedenle, meme kanserinin tanısında rutin fizik muayene, ultrasonografi ve mamografi incelemeleri önemlidir. Ancak, tüm bu tetkikleri birçok kişiye bir tarama testi olarak yapmak zordur (15). Meme kanseri tanısında CA15.3, günümüzde en fazla kullanılan biyomarkırdır. Bu markırın sensitivitesi %23, spesifitesi ise ancak %69'dur (5).

Geliştirilen protein-çip teknolojisi ile yapılan bir çalışmada, 169 olgu incelenmiştir. Olguların 103'ü meme kanserli (evre I-III arası), 25 olgu iyi huylu (benign) meme hastalığına sahiptir. Seçilen 41 olgu ise, meme yönünden

sağlıklıdır. Çalışmada üç yeni markır elde edilmiş ve bu markırlar BC1 (4.3 kDa), BC2 (8.1 kDa) ve BC3 (8.9 kDa) olarak adlandırılmıştır. Bu üç markıra ait sensitivite %93, spesifite %91 olarak bulunmuştur. Bu örnek, bize toplumların taranmasında bu tür teknoloji ile oluşturulacak çoklu-markır (multi-marker) panellerinin sağlayacağı yararları, göz önüne sermektedir (16).

Benzer teknoloji, günümüzde sadece protein bazında değil, RNA bazında da önemli araştırmalarda kullanılmaktadır. RNA bazında yapılan çalışmalarda gen ekspresyonuna ait çalışmalar ön plana çıkmakta ve rutin genetik hizmetlerde, prenatal tanıda ve postnatal tanıda kullanılmaktadır. Artık, tüm genomda polimorfik markırlara bakılarak uniparental dizomi tespit edilebilmektedir. "Genomic imprinting"de eksprese olan bir genin, anneden ve babadan gelmesine bağlı farklı hastalık tabloları tanımlanmaktadır. Buna en iyi örnek, kromozom 15q11-13'de olan bir delesyonun anneden gelen veya babadan gelen kopyada olmasına göre Prader Willi ve Angelman sendromu gibi iki farklı hastalık tablosunun ortaya çıkmasıdır. Son çalışmalar, mikroarray yöntemleri ile gen ekspresyonundaki kaybın hangi bölgeden olduğunu ortaya koyabilmekte, rutin alanda bu analizlerin kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır (17-19).

Tüm bu bulgular, halen rutin kullanıma girmese de, proteinlerin analizinde

biyoçiplerin önemli bir rolü olacağına habercisidir. Özellikle, çoklu-markırların çalışılacağı panellerin, birçok hastalığın tanısı ve tedavi takibinde önemli ipuçları vereceği açıktır.

Kaynaklar

1. Peltonen L, Mc Kusick VA. Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science* 2001; 291: 1224-1229.
2. Güran Ş. İnsan genom projesi: dünü bugünü ve yarını. *Gülhane Tıp Dergisi* 2001; 43: 440-443.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of Cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.
4. Connor M, Ferguson-Smith M. *Essential Medical Genetics*. 5th ed, New York: Blackwell Science, 1997.
5. Chapman K. The protein chip biomarker system from ciphergen biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 82-87.
6. Kodadek T. Development of protein-detecting microarrays and related devices. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 295-300.
7. Falsey JR, Renil M, Park S, Li S, Lam KS. Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjug Chem* 2001; 12: 346-353.
8. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001; 412: 822-826.
9. Kodatek T, Reddy MM, Olivos HJ, Bachawat-Sikder K, Alluri PG. Synthetic molecules as antibody replacements. *Acc Chem Res* 2004; 37: 711-718.
10. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405: 837-846.
11. Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 242-247.
12. Moore CA, Khoury MJ, Bradley LA. From genetics to genomics using gene-based medicine to prevent disease and promote health in children. *Semin Perinatol* 2005; 29: 135-143.
13. Zhang L, Yu W, He T, et al. Contribution of human alfa defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science* 2002; 298: 995-1000.
14. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-577.
15. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1993.
16. Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 2002; 48: 1296-1304.
17. Borsting C, Sanches JJ, Morling N. Multiplex PCR, amplicon size and hybridization efficiency on the NanoChip electronic microarray. *Int J Legal Med* 2004; 118: 75-82.
18. Horsthemke B, Nazlıcan H, Husing J, et al. Somatic mosaicism for maternal uniparental disomy 15 in a girl with Prader-Willi syndrome: confirmation by cell cloning and identification of candidate downstream genes. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2723-2732.
19. Bittel DC, Kibiryeveva N, Talebizadeh Z, Butler MG. Microarray analysis of gene/transcript expression in Prader-Willi syndrome: deletion versus UPD. *J Med Genet* 2003; 40: 568-574.