

DERLEME /REVIEW

FİZİKSEL GENOM HARİTALAMASINDA GELİŞTİRİLEN YENİ METOD: OPTİK HARİTALAMA

Muhittin ARSLANYOLU¹

ÖZ

Genom projelerinin dizi analiz yaklaşımları kısmen genom büyüklüğüyle ilişkilidir. Büyük genomlara sahip ökaryotik organizmaların bütünsel genom analizi bu sebeple oldukça güçtür. Büyüklük problemi, insan genom projesinde “önce haritala-sonra dizi analizi yap” yaklaşımıyla aşılmıştır. İnsan genomunun fiziksel haritası, elektroforez ve rekombinasyona dayanan genetik çalışmalar gibi düşük ayırma gücüne sahip yöntemlerin kullanılmasından dolayı çok uzun zaman almış ve projenin dizi analiz aşamasında güvenilirlik problemleri oluşmuştur. Günümüz genom projelerinde bu problem “optik haritalama” yöntemiyle hızlı, ucuz ve çözünürlük artışıyla çözülmüştür. Bu yöntemde, çift sarmal tek DNA molekülleri bir ucundan mikroskopik lam yüzeye bağlandıktan sonra yüzeye tamamen düz olarak yapıştırılır. Mega büyüklükteki düzleştirilmiş DNA parçaları (80-500 kbç), bir tek restriksiyon enzimiyle kesilip YOYO-1 floresan boyası ile boyanır ve tek bir sarmala ait DNA molekülüklerinin kesim desenleri optik olarak görüntülenir. Tek klonadan gelen DNA kesim iskeletlerinin her bir parçacığının büyüklüğü, baz çifti çözünürlüğünde, çeşitli bilgisayar yazılımlarının yardımıyla ölçülür ve benzer şekilde elde edilmiş diğer klonların patternleri ile hizalanarak son genom fiziksel haritası elde edilir. İnsanda hastalık yapan 4 bakteri, 2 mantar ve 4 ökaryotik genomun fiziksel haritasının çıkartılmasında bu yöntem kullanılmıştır. Son aylarda optik haritalamada otomasyona geçiş, yöntemin gelecekte insan genom bilgisinin kullanılacağı tedavilerde uygulama alanı bulabileceğini işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler : Genom projesi, Genomun fiziksel haritası, Optik genom haritalama

A NEWLY DEVELOPED METHOD IN GENOME PHYSICAL MAPPING: OPTICAL MAPPING

ABSTRACT

Approaches to whole genome sequence analysis partially depend on the size of the genome. Therefore, it is difficult to complete the whole genome analysis of eukaryotic organisms with a large genome. Problem of genomic size in human genome project is handled by ‘first physical map-later sequence’ strategy. The use of physical mapping approach based upon low resolving power of recombination based genetic and restriction mapping resulted with a longer project time. In recent genome projects, this problem has been resolved with cheap high resolution optical mapping. In this method, after the double stranded single DNA molecule is attached to a microscopic slide from one end, it is fixed on the surface in a linear line. Fixed linear mega size DNA molecules (80-500 kbp) are digested with a single restriction endonuclease and later stained with YOYO-1 fluorescent dyes, and finally optically visualized. Size of each minifragments in linear DNA molecule skeleton is measured with the help of different computer programs in a nucleotide resolution. Patterns of DNA skeletons from all clones are assembled to generate final physical map of the whole genome. Optical mapping have been used to construct physical mapping of genomes of four pathogenic bacteria, two fungi and four eukaryotes. Automation of optical mapping in recent months hints that it has the potential importance in the future to meet demands for fast genomic physical mapping needs in human treatments.

Key words: Genome projects, Genomic physical map, Optical genome mapping

¹ Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Yunusemre kampüsü, Eskişehir
Tel: 0 90 222 335 0580 dahili 5715; **E-posta:** marslanyolu@anadolu.edu.tr

1. GİRİŞ

Genom içinde yer alan, yapısal veya enzimatik görev icra edebilecek formlara dönüşebilen ve nesilden nesile aktarılan DNA dizi bölgelerine gen denir. Canlıların sahip olduğu DNA moleküllerinin tamamına ise genom denir. İnsan genom projesi, seçilmiş model organizmalar ile insanın genomunu tanımlamak üzere başlatılan uluslar arası bilim projesidir (Wolfsberg vd., 2001). İnsan genomunda yaklaşık 2.85 milyar bazçifti (bç) ve 18000-25000 gen bulunmaktadır. Dizi analizine dayalı bütünsel genom araştırmalarından bir kısmı; *E. coli* bakterisinde çoğalan ϕ X174 virüsünün genom dizisi (5386 bç) 1975'de (Sanger vd., 1977), hayvan virüsü olan SV40'ın genom dizisi (5243 bç) 1977'de (Fiers vd., 1978), insan mitokondrisinin genom dizisi (16569 bç) 1981'de ve Lambda virüs genom (48502 bp) dizi analizi ise takip eden yılda tamamlanmıştır (Sanger vd., 1982). İlk bakteri genom dizi analizi 1995 yılında *Haemophilus influenzae* ile yapılmıştır. Bu çalışmayı, 1996 yılında ilk ökaryot genom olan *Saccharomyces cerevisiae* (Cai vd., 1998) ve diğerleri izledi. Genom araştırmalarının ortaya çıkarttığı sonuç, genom büyüklüğü ile gen sayısı arasında doğrusal bir ilişki olmamasıdır (Tablo 1). Günümüzde 18 ökaryot, 230 mikrobiyal (21 arkebakteri ve 209 bakteri), 2120 viral, ve 36 viroid genom dizi analizi tamamıyla sonuçlandırılmıştır (NCBI, 2005). Tüm bu hızlı gelişmelerin günümüz biyolojik bilimlerinde çok yönlü etkileri olmuş ve Genomik, Biyoinformatik ve Proteomik gibi bir çok yeni bilim dalının doğmasına sebep olmuştur (Graves ve Haystead, 2002; Wheeler vd., 2002). Bu ilk genom projelerinin ortak sonuçları şöyle özetlenebilir;

1) tüm canlıların kullandığı DNA temelli genom alfabesi evrenseldir, 2) canlıların hayat bilgisi genoma şifrelenmiştir, 3) canlılarda ortak genom alfabesi nedeniyle genler organizmalar arasında transfer edilebilir, 4) aynı genler farklı organizmalarda da bulunur, ve 5) genom çalışmaları gelecekte hastalıkların nedenlerini daha hızlı anlaşılmasını ve dolayısıyla tedavisini kolaylaştıracaktır (Wolfsberg, 2001; Bağcı, 2002).

Bütünsel genom dizi analizleri, temelde 'tümüyle rastgele-seri-atış-dizi analizi' ve 'fiziksel harita omurgasına bağlı klondan klona rastgele-seri-atış-dizi analizi' yaklaşımlarıyla gerçekleştirilmektedir. Tümüyle rastgele-seri-atış-dizi analiz stratejisi fiziksel genom haritasına gerek duyulmadan yapılır. Bu yaklaşımda fiziksel omurga oluşturulmadığı için elde edilen dizilerin genomun tümünü temsil etmesi ve ortaya çıkan sonucun güvenilir olması, genom büyüklüğünün en az 8-15 katını kapsayacak miktarda dizi analizinin yapılmasına bağlıdır. Bu yaklaşımın dayandığı DNA dizi analiz fiyatları otomasyondan dolayı düştüğü halde dizi birleştirme ve bitirme işleminin otomasyonu oldukça zor ve zaman alıcı olduğundan biyoinformatikte uzmanlaşmış eleman ihtiyacı doğar, bu ise bu yöntemin ikinci yöneme göre bütçesinin yüksekliğini açıklamaktadır (Lim vd., 2001). Fiziksel harita omurgasına bağlı klondan klona rastgele-seri-atış-dizi analiz yaklaşımında, yüksek moleküler ağırlıklı genomik DNA'nın kısmi kesimi ilk olarak yapılır, büyüklük seçiminden sonra bu DNA parçaları genellikle Bakteri Yapay Kromozom (BYK) vektörüne klonlanır. Aktarılan DNA parçalarının BYK kütüphanesinden tek tek çekilip restriksiyon enzim kesimi gibi bir yöntem ile kesim

Tablo 1: İnsan ve çeşitli organizmaların genom büyüklüğü ile gen sayılarının karşılaştırılması

ORGANİZMA	TÜRKÇE İSMİ	GENOM (bç) BÜYÜKLÜĞÜ	GEN SAYISI	YAYIN
<i>Mycoplasma genitalium</i>	En küçük genomlu bakteri	580,073	468	1995, Science, 270,397-403
<i>Helicobacter pylori</i>	Mide Ülseri Bakterisi	1,667,867	1590	1997, Nature, 388,539-547
<i>Haemophilus influenzae</i>	Menenjit Bakterisi	1,830,138	1680	1995, Science, 269,496-512
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tüberküloz Bakterisi	4,411,529	3924	1998, Nature, 269,496-512
<i>Escherichia coli</i>	Bağırsak Bakterisi	4,639,221	4288	1997, Science, 277,1453-1474
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bira Mayası	12,500,000	5885	1997, Nature, 387 (Supl),5-105
<i>Drosophila melanogaster</i>	Meyve Sineği	120,000,000	13600	2000, Science, 287,2185-2224
<i>Yersinia pestis</i> Strain KIM	Enterobakter	4,600,000	4,198	2002, J Bacteriol. Aug;184(16):4601-11
<i>Homo sapiens</i>	İnsan	2.85 milyar	~20000-25000	2004, Nature, Oct 21;431 (7011):931-45
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Fototrofik mor bakteri	4,406,557	3919	2005, http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi?page=taxonDetail&taxon_oid=400150000

desenine bağlı bir yatay hizalama, genomun BYK tabanlı bir fiziksel haritasının oluşmasını sağlar. Genomun fiziksel haritasının verdiği sıraya göre BYK klonları ayrı ayrı rastgele kesilir, uygun büyüklükteki parçalar (1-2 ve 2-10 kb) seçilir ve alt klonlama yapılır. Kalıp DNA rastgele seçilmiş alt klonlardan saflaştırılır, sekanslama reaksiyonları oluşturularak otomatik DNA sekans aletleriyle analizleri yapılır (Zhang ve Wu, 2001). Genomu oluşturan BYK klon kümesinin nükleotid dizilerinin birleştirilmesi ile bütün genom dizisi ortaya çıkartılır. Bu projenin, dizi analiz kısmı BYK'lar arasında yapıldığı için bu BYK' dan BYK' ya rastgele-seri-atış-sekanslama olarak da adlandırılır (Venter vd., 1996). Bu yaklaşım, *Saccharomyces cerevisiae* (Cai vd., 1998) genomunun fiziksel haritalanması ve dizi analizinde kullanılmıştır. Genom projelerinde çözünürlüğü yüksek fiziksel haritaların kullanılması, kullanılmayan yaklaşımlara göre mali, süresel ve insan gücü avantajları sağlamaktadır.

2. FİZİKSEL HARİTALAMA

Genetik ve sitogenetik haritalar, fiziksel haritalamada ilk kullanılan yöntemlerden olup nükleotid dizisine dayalı fiziksel haritalara göre daha az çözünürlüğe sahiptirler. Genetik haritalama metodu, genomdaki-yeri-aranan gen ile yeri-bilinen bir genetik belirtecin (marker gen) kuşaklar arasında birlikte kalıtımının test edilmesi esasına dayanmaktadır. Diğer bir deyişle; genomda bulunan gen veya gen dışı (RFLP, SSLP, SNP) bölgelerin genom içindeki yerlerinin genetik yöntemler (çaprazlama ve aile soy ağaç incelemesi gibi) kullanılmasıyla genetik tabanlı bir genom haritası oluşturulur. Sonuç, genomda hedef genin yeri, bilinen belirteç gene göre olabilecek en olası mesafedir ve bu fiziksel açıdan (baz-çifti ölçüsüyle) ölçülebilir bir uzaklık değildir. Sitogenetik haritalar ise genlerin yerlerinin sitogenetik yöntemler (başlıca kromozom in situ hibridizasyonu) kullanılarak bulunması işlemidir. Bu yöntem, genlerin hangi kromozom bandında veya kolunda yerleştiğini kesin olarak gösterir. Fakat düşük çözünürlüklü (yaklaşık 6 Mb) olmalarından dolayı fiziksel haritalardaki gibi baz çiftine bağlı net yer belirtmezler (Bağcı, 2002). Bu iki yöntemin çözünürlüklerinin çok düşük olması, genom projeleri açısından tercih edilmemelerine neden olmuştur.

Restriksiyon enzim kesimine dayalı ilk fiziksel haritalama yöntemi elektroforetik metoda dayanmaktadır. Elektroforetik metodlar sınırlı verimlilikte DNA göçüne izin verdikleri için çözünürlüğü azaltırlar. Bu sınırlamaya rağmen elektroforetik temelli genom restriksiyon haritalama çalışmaları *E. coli* ve *S. cerevisiae*'da başarıyla kullanılmıştır. İnsan genom projesi ile 1980' lerde başlayan "önce haritala-sonra dizi analizi yap" stratejisinde ilk önce insan genomunun "klona-dayalı-fiziksel-haritası" çıkartılmıştır. Klona dayalı fiziksel haritalamada genom, kısmi-kesim metodu ile restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak 150.000 bç uzunluğunda kesilir. Bu DNA parçaları, BYK'lara yerleştirilerek BYK kütüp-

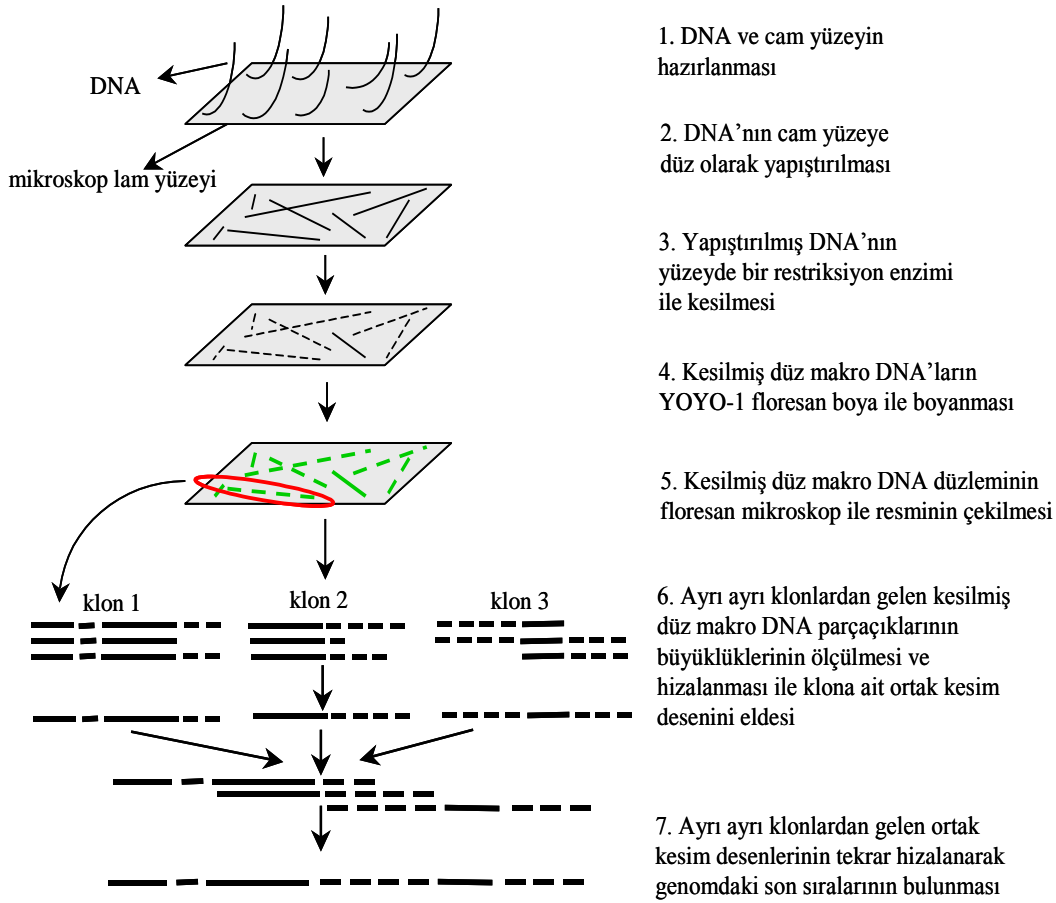
haneleri oluşturulur. Her BYK klonu, karakteristik bir restriksiyon-endonükleaz-ürün-dağılımı veya deseni (pattern) elde edilecek şekilde, seçilen restriksiyon endonükleaz enzimleri ile tamamen kesilir. Restriksiyon-endonükleaz-ürün-dağılımı agaroz jel analizi vasıtasıyla baz-çifti sayısı seviyesinde ortaya çıkartılır. Bu desenlerin karşılaştırılmasıyla klonlar arasındaki örtüşmeler açığa çıkar ve belli bir düzende sıralanırlar. Sonuç; çözünürlüğü 1 Milyon-baz (Mb)'ın altına düşmüş klona (nükleotid dizisine)-dayalı-fiziksel haritadır. Her BYK klonu restriksiyon enzimleri ile daha küçük parçalara kesilip yeniden klonlandığında ise alt-klonlar oluşur. Elde edilen alt-klonlara dizi analizi yapılır. Her alt-klonun dizileri birleştirilerek BYK klonunun sekansına ulaşılır. Genomu oluşturan BYK kümesinin nükleotid dizilerinin birleştirilmesi ile bütün genom dizisi ortaya çıkartılır. Fiziksel haritalamanın dizi analiz kısmı BYK' lar arasında yapıldığı için BYK' dan BYK' ya yaklaşım olarak da adlandırılır (Venter vd., 1996).

3. OPTİKAL FİZİKSEL HARİTALAMA

DNA dizi analiz teknolojisinde ilerlemeler olmasına karşın, seri-atış sekanslama stratejisiyle yapılan bakteriyel genom projeleri iş yükü açısından yoğun ve dolayısıyla pahalıdır. Bu strateji ayrıca bitirme işleminin son aşamasında oldukça zor olan elle müdahaleyi gerektirmektedir (Lim vd., 2001). Bu olumsuzlukların en aza indirilebileceği *E. coli* O157:H7'nin NheI ve XhoI optik haritalarının oluşturulmasıyla gösterilmiştir. Çünkü bahsedilen çalışmadaki genom haritaları yukarıda anlatılan yöntemler yerine çok-uzun-tek-sarmal DNA moleküllerinin restriksiyon kesim desenlerinden optik kullanılarak oluşturulmuştur.

Günümüzde genom projelerine omurga oluşturacak fiziksel haritalar, yukarıdaki bahsedilen klona-dayalı-fiziksel-haritalama metodunun elektroforez adımının çıkartılması ve tek DNA molekülünün restriksiyon patternlerinin floresans boyalar ile görünür hale getirilmesi, optik olarak görüntülenip ölçülmesi esasına dayanan "optik haritalama" adı verilen yöntem ile yapılmaktadır (Schwartz ve Samad, 1997). Tek DNA moleküllerin kullanıldığı optik haritalama, şu andaki fiziksel haritalama stratejilerinin bir alt grubunu oluşturur (Lee vd., 1998) ve bu yöntem aşağıdaki deneysel adımlar ile gerçekleştirilir,

- 1) BYK'dan elde edilen tek DNA molekülünün bir ucu yapışkan yüzeye bağlanır.
- 2) Geri çekilen hava-su ara yüzü tarafından yüzeye tamamen yapıştırılarak uzatılır.
- 3) Uzatılarak düzleştirilmiş DNA molekülleri restriksiyon enzimleriyle kesilir.
- 4) YOYO-I floresan boya ile boyanır
- 5) Düz bir düzlemde dizi şeklinde ortaya çıkan hizalı DNA molekülükleri görüntülenip ölçülür.



Şekil 1: Optik genom haritalamanın deneysel temel adımlarının şematik olarak gösterilmesi (Lai vd., 1999)

6) Benzer şekilde elde edilmiş diğer patternler ile hizalanır (Şekil 1).

Floresan mikroskop, tek molekül DNA diziciklerinin yüksek-çözünürlükte (Aston vd., 1999) restriksiyon kesim desenlerinin resminin çekilmesi; böylelikle, gerekli ölçümlerin yapılabilmesini sağlayarak optiğe dayalı fiziksel haritaların ortaya çıkmasında rol oynamıştır. Böyle optik haritalar, hem büyük-parça içeren klonlardan hem de genomik DNA'dan direk elde edilebilir ve genom projelerinde tercih edilen seri-atış sekanslaması için bir omurga teşkil ederler (Aston vd., 1999). Genom projelerinde böyle sıralanmış-restriksiyon-harita omurgaları; dizi doğrulaması, örtüşen (kontig) parça birleşmesinde hataları tanımlama ve son birleştirme için kullanılır. Ayrıca bu haritalar, eksik dizilerin büyüklüğünü ve yerleşimini ölçmede kullanılarak rastgele-seri-atış sekanslama adımının yetersizliklerini telafi ederler (Lim vd., 2001).

Bir tek DNA molekülünden oluşturulmuş bir restriksiyon haritasının kalitesi; mikroskopun çözünürlüğü, görüntüleme sistemi, yüzey koşulları ve restriksiyon-kesim reaksiyonunun kesim etkinliği gibi birkaç faktöre bağlıdır. Ayrı moleküllerden türetilmiş eksik haritaların topluluğundan sonlandırılmış haritalar oluşturmak amacıyla istatistiksel değerlendirmeler kullanılmıştır. Bitirilmiş harita, restriksiyon kesim bölgeleri ile ilgili akla yakın hipotezlerin test edilmesi ve veriye en uygun (olası) hipotezin seçil-

mesi ile hesaplanır. Amaç, maksimum olasılıkla verilen veri grubu ile en olası bir model bulmaktır. Her model, restriksiyon kesimlerinin, boyutlama hatalarının, yanlış optik kesimlerin ve yönelmeme, kayıp veya kırık fragmentler ile sahte moleküllerin varlığından ortaya çıkan hataların olası sayısını içermektedir (Lee vd., 1998).

3.1 Optik Haritalamanın Önemli Gelişim Evreleri

Restriksiyon enzim tabanlı klona dayalı fiziksel haritalama yaklaşımları arasında bu yöntemin gelişimi, görüntüsü-zenginleştirilmiş fluoresans mikroskopisi aracılığıyla solüsyon ortamındaki floresans ile boyanmış tek DNA moleküllerinin hareketinin ilk defa optiksel olarak bildirilmesi ile başlamıştır (Yanagida vd., 1986). İlk yöntemde, tek DNA molekülleri solüsyon ortamı yerine bir lam ve lamel arasında oluşturulmuş eriyik agaroz akışında uzatılmış ve moleküller tamamıyla gevşemeden eriyik agaroz jel yarı-katı hale getirilerek DNA düzleştirilmiş ve Yanagida ve arkadaşlarının yöntemiyle görüntülenmiştir (Cai, 1995). İkinci yaklaşımda, agaroz yerine DNA'nın yapışmasını ve gerilmesini sağlayan pozitif yüklü lizin ile kaplanmış lamel üzerine DNA molekülleri düz şekilde yapıştırılmıştır. Uzamayı arttırmak için DNA, lam lamel arasında (kapalı cam sandviç) sıkıştırılmıştır. Tespit etme koşulları, DNA'nın gerilme ve gevşeme dengesi kurularak

kontrol edilir. Kapalı cam sandviç yaklaşımını kullanarak, sıralanmış restriksiyon haritaları insan Beckwith-Wiedeman lokusu, BRCA-2 lokusu ve fare olfaktori lokusu için kullanılmıştır (Lee vd., 1998). Kapalı cam sandviç yaklaşımı, DNA yapışma özelliği geliştirilmiş yüzeye DNA moleküllerinin küçük buharlaşan damlalar içerisinde çarpmasından sonra iki cam yüzey arasında sıvı örneğin sıkıştırılması ile DNA moleküllerinin uzatılması ve tespit edilmesi şeklinde daha da geliştirilmiştir (Jing vd., 1998). Böylece, buharlaşma-sıvı akış gücü ile düzleştirilmiş moleküller, restriksiyon endonükleazların ve DNA polimeraz I gibi enzimlerin yaklaşabileceği şekilde tespit edilir. Optik restriksiyon haritalamanın DNA uzatma adımı geliştirilmiş bir motor aracılığıyla sabit olarak oluşturulan menisküse (sıvı/hava arayüzey) yardımıyla daha da geliştirilmiştir. Menisküsün geri çekilmesi esnasında sıvı yüzey gerilimi ile birleşen hareket ve buharlaşma güçleri DNA moleküllerinin açılmasını ve düzleşen moleküllerin kuruyan yüzeye yapışmasını sağlar. Bu metod, herhangi büyüklükteki DNA'yı teorik olarak düzleştirebilir çünkü yüzey gerilimi ile oluşturulmuş düzleştirme gücü DNA molekül uzunluğundan bağımsızdır ve menisküs hızı DNA'yı kırabilecek hidrodinamik güçleri en aza indirir (Yokota vd., 1997). En son geliştirilen bu uzatma yaklaşımı birbirine paralel çoklu kanal sisteminde ki sıvı akış gücüne dayanmakta olup OptiChip'in oluşturulmasında kullanılmıştır (OpGen Inc.).

İlk çalışmalarda, görüntüler fotoğraf olarak toplanmış ve harita örtüşenleri elle birleştirilmiştir (Lin vd., 1999). Görüntüler Gencol (Lim vd., 2001) bilgisayar yazılımı ile toplanmakta, haritaların birleştirilmesi Convex (Aston vd., 1999) ve Gentig (Lin vd., 1999) yazılımları ile sağlanmaktadır. Daha sonraları bu programlar tüm işlemi yapabilecek tek bir yazılımda toplanarak IP Lab Spectrum (Yokota vd., 1997) ve Optical Map Maker (OMM) (Jing vd., 1998) yazılımları olarak geliştirilmiştir. Tüm işlemlerin tamamıyla otomatik yapılabilmesi için optik haritalama yüzeyleri üzerine robotik yardımıyla tek DNA moleküllerinin yerleştirilmesi, görüntüleme ve analiz, mikroskop kontrolü, makine vizyonu ve istatistiksel analizlerin birleşik sistem şekline geliştirilmesiyle başarılmıştır (Schwartz, 1997). En son geliştirilen "Optical Mapping Cluster" sistemi, Map Plot yazılımı gibi yazılımlar vasıtasıyla iki *E. coli* suşu arasındaki en küçük farklılığı bile ayırt edebilecek hassasiyette (OpGen Inc.).

Bu çalışmalarda soğutmalı-şarj-kamerasının (cooled charged coupled device; CCD) kullanılması, YOYO-I floresan ile boyanmış tek DNA moleküllerinin büyüklük algılanması 28 kb'dan 800 bç'ye kadar düşürmüştür (Meng vd., 1995). Kapalı cam sandviç yaklaşımlarının alt ve üst çözünürlük sınırları, 60 kb çözünürlük sınırına sahip jel-tabanlı (yarıkati) yaklaşıma göre büyük bir ilerlemeyi ortaya koyar. Biyoinformatik programlar, genomun tümünü temsil eden BYK kütüphanesi klonlarından elde edilen restriksiyon enzim desenlerini karşılaştırır ve örtüşen dizileri bir araya getirerek tüm genomun fizik-

sel haritasının oluşmasında yardımcı olur (Lim vd., 2001). Restriksiyon endonükleaz kesiminin etkinliği, restriksiyon haritaları bilinen kontrol moleküllerin (Lambda faj DNA'sı) kesim aralıklarının sayılması ile değerlendirilir. Biyoinformatik işlemde, önce her bir klonun restriksiyon desenindeki doğru 100 DNA molekülü üzerinde histogram analizi ile yapılır ve bu deseni en iyi temsil eden 5-10 molekül harita oluşturulmasında kullanılmak için seçilir. Son harita, patternleri örtüşen farklı klonların restriksiyon parça büyüklüklerinin dikkate alındığı "ortalama" olarak oluşturulur.

3.2 Optik Fiziksel Haritalama Yönteminde Deneysel Adımlar

3.2.1 Organizmanın Genom BYK Kütüphanesi'nin Oluşturulması

Organizma genomu BYK Kütüphanesi'nin oluşturulması bu organizmanın genomik DNA'sının parçalamadan bir bütün halinde izolasyonu ile başlar. Genomik DNA istenen kalitede ise bu genomu seyrek kesen restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılır. Örnekler farklı-akım-alanlı-jel-elektroforezi (PFGE; Pulse Field Gel Elektroforezi) ile ayrılarak 150-200 kb büyüklüğündeki genomik DNA parçalarının bulunduğu jel bölgesi kesilerek alınır ve bu kısımdaki DNA saflaştırılır. Klonlama için hazırlanan BYK vektörü ile genomik DNA parçaları, DNA ligaz enzimiyle birbirine yapıştırılır. Elektroporasyon yöntemiyle bu *E. coli*'ye transfer edilerek BYK kütüphanesi oluşturulur (Meizhong, 2003).

3.2.2 BYK Klonlarının Optik Haritalanması

Kütüphaneden alınan her bir klonun optik haritalama yüzeylerine yapıştırılması şu aşamaları içerir; 1) lamlar DNA için yapışkan hale getirilir, 2) BYK'dan elde edilen genomik DNA, yapışkan hale getirilmiş lam yüzeye yayılır ve sıvı akışıyla DNA düzleştirilir. Her lama yapıştırma işleminde lambda faj DNA molekülleri genomik DNA ile birlikte karıştırılarak yüzeye yapıştırılır; lambda faj DNA molekülleri kesim etkinliğinin ölçümü ve büyüklük hesaplaması için bir floresan standardı olarak kullanılır, 3) yapıştırılmış DNA restriksiyon enzimi ile kesilir, 4) YOYO-I ile boyanır, 5) hassas floresan mikroskop ile görüntüler toplanır, ve 6) toplanmakta olan görüntülerin işlemi özel yazılımlar vasıtasıyla yarı otomatik olarak yapılır (Lim vd., 2001).

3.2.3 Biyoinformatik Analiz ile BYK Klonlarının Genomdaki Yerlerinin Belirlenerek Organizmanın Fiziksel Haritasının Oluşturulması

Biyoinformatik yazılımlar kullanılarak her bir klondan elde edilen restriksiyon enzim desenleri birleştirilir. Bunun için her bir klon desenine bir numara verilerek etiketlenir. Etiketlenen klonların restriksiyon enzim kesim bölgelerine bağlı olarak

örtüşen kısımları birbiriyle hizalanır ve hizalanan restriksiyon enzim patternindeki hatalar düzeltilerek, eksikler giderilir ve haritanın son hali oluşturulur (Zhongwu vd., 1999).

4. OPTİKAL FİZİKSEL HARİTALAMADA OTOMASYON

Büyük DNA parçaları, OptiChip adı verilen bir mikro-sıvı lamı üzerine yapıştırılır. OptiChip, DNA yapışmasına uygun hale getirilmiş bir cam yüzeye yerleştirilmiş birbirine paralel kanallı bir maske ile kaplanmıştır. Bu kanallar ancak bir tek DNA sarmalının sığabileceği aralıktadır. DNA molekülü, OptiChip' in kanallarından akarken, herbir DNA molekülü tek bir kanal boyunca uzatılır ve yüzeye sabitlenir. Bu sayede 0.5 – 2.5 Mbç (milyon baz çifti) büyüklüğe sahip bir DNA molekülü haritalanabilir. Oluşturulan son haritada herbir genomik DNA parçası 50'den fazla temsil edilir. Son haritanın yüksek sayıda örnekleme dayandırılması yüksek doğruluğa sahip olmasıyla sonuçlanır (OpGen, Inc., <http://www.opgen.com/default.aspx>).

Bu dizilerin görüntüleri, bilgisayarlı Optik Haritalama İstasyonu ile oluşturulur. Bu istasyon, OptiChip' i otomatik olarak tarayan bir floresans mikroskop içerir ve her alanda görüntü yakalayabilir. İstasyon, optik dayanıklılık için sabit bir tablaya monte edilmiş ve aydınlatma yüksek güçte, kesintisiz argon-ion lazer kullanımıyla sağlanmıştır (OpGen, Inc.).

5. SONUÇ VE ÖNEMİ

Günümüz genom projelerine omurga oluşturabilecek fiziksel haritalar, tek DNA molekülünün restriksiyon desenlerinin floresan boyalar ile optikçe görünür hale getirilmesi ve optik olarak görüntülenip ölçülmesi esasına dayanan optik haritalama yöntemiyle gerçekleştirilmektedir. Optik Haritalama, prokaryotik organizmalardan insana kadar çok çeşitli organizmaların fiziksel haritasının çıkartılmasında başarıyla kullanılmıştır (Tablo 1). Genomun fiziksel haritasının çıkartılması, genom projelerinin dizi analiz kısmının planlanabilmesini ve böylece proje zamanı ile bütçesinde tasarrufu sağlar. Çünkü sırası ve büyüklüğü bilinen BYK klonları ile dizi analizi kolaylıkla adım adım planlanabilmekte, ayrıca, biyoinformatik analizin BYK'lar içinde ve arasında daha küçük bölgelerin birleştirilmesinde kullanılmasından dolayı hata payı en aza indirilmiştir. Fiziksel harita, ilk önce yapıldığı için genom dizi analiz projesi esnasında veya sonunda eksik- bölge problemi ortadan kalkar. Haritalama yüzeylerine, yoğun olarak yapıştırılmış BYK klonlarının yüksek çözünürlükte optik haritaları, örtüşen klonların yüksek çözünürlükte hizalanması sekanslama için bir omurga olarak hizmet eder. Yüksek çözünürlükteki bu restriksiyon haritaları tümüyle-seri-atış sekanslama projelerinde maliyeti arttıran 'atasal fazlalık (dizi analizi yapılmak zorunda bulunan klon sayısı) miktarını' indirmektedir (Schwartz ve Samad, 1997). Bu nedenlerin yanında, geniş çaplı sekanslama projeleri için yüksek çözünürlükteki fiziksel haritaların yararlarını, ucuz ve yüksek çözünürlükte olmalarının dolayı da reddetmek zordur.

Tablo 2: Optik Haritalama yoluyla fiziksel haritaları tamamlanmış organizmalar

ORGANİZMA	SINIFI	GENOM (bç) BÜYÜKLÜĞÜ	DERGİ, SAYI VE YILI
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	bakteri	4.576,980	Genome Res. 13: 2142-2151, 2003.
<i>Yersinia pestis</i> KIM	bakteri	4,570,000	Appl Enviro Microbio. 68: 6321-6331, 2002.
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	bakteri	4,639,221	Genome Res. 11: 1584-1593, 2001.
<i>Deinococcus radiodurans</i>	bakteri	2,600,000	Science, 285: 1558-1562, 1999.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	mantar	~35,000,000	OpGen, Inc., Wisconsin – February 3, 2004
<i>Candida albicans</i>	mantar	~16,000,000	Proc Natl Acad Sci, 92: 5164-5168, 1995
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ökaryot	12,500,000	Science, 262: 110-114, 1993.
<i>Plasmodium falciparum</i>	ökaryot	23,000,000	Nature Genetics, 23: 309-313, 1999.
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Fototrofik mor bakteri	4,406,557	2005, Appl. Environ. Microbiol
<i>Homo sapiens</i> Y kromozomu, DAZ lokusu	insan	2.85 milyar	Genome Res. 10: 1421-1429, 2000.

Optik haritalama, genom sekanslama çalışmalarına büyük kolaylık sağlayabilir. İnsanda ölümcül hastalıklara neden olan mikroorganizmalara ait genomların fiziksel haritaları optik haritalama yöntemi ile hızlı bir şekilde çıkarılmıştır (Tablo 1). Sonuç olarak; optik haritalama yöntemi, İnsan Genom Projesinin eksik bölgelerinin tamamlanmasının kolaylaştırılması ve genomların hızlı parmak izlerinin çıkarılabilmesi ile insanda hastalık yapan diğer mikroorganizmaların neden olduğu öldürücü hastalıkların önlenmesi ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde rol oynayacak bir açılıma sahiptir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Biyolog Hasan Emre ÖZBEK ve Yüksek Biyolog Mehmet Taha YILDIZ'a derlemenin hazırlanması esnasında yapmış oldukları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Aston C, Mishra, B. ve Schwartz, D. C. (1999). Optical mapping and its potential for large-scale sequencing projects. *TIBTECH* 17, 297-302.
- Bağcı, H. (2002). İnsan genom projesi. *DEÜ Journal of Medical Faculty Özel Sayı*, 11-19.
- Cai, W. (1995). Ordered restriction endonuclease maps of yeast artificial chromosomes created by optical mapping on surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 5164-5168.
- Cai, W., Jing, J., Irwin, B., Ohler, L., Rose, E., Shizuya, H., Kim, U.-J., Simon, M., Anantharaman, T., Mishra, B. ve Schwartz, D. C. (1998). High-resolution restriction maps of bacterial artificial chromosomes constructed by optical mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*. 95, 3390-3395.
- Fiers, W., Contreras, R., Haegemann, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuversweyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G. ve Ysebaert, M. (1978). Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* 273, 113-120.
- Fleischmann, R.D., White, O., Clayton R.A., Kirkness E.F., Kerlavage A.R., Bult C.J., Tomb J.F., Dougherty B.A. ve Merrick, J.M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* rd. *Science* 269(5223), 496-512.
- Graves, P.R. ve Haystead, T. A. J. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 39-63.
- Zhangş H. ve Wu, C. (2001). Bac as tools for genome sequencing. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 195-209.
- Jing, J., Reed, J., Huang, J., Hu, X., Clarke, V., Edington, J., Housman, D., Anantharaman, T. S., Huff, E. J., Mishra, B., Porter, B., Shenker, A., Wolfson, E., Hiort, C., Kantor, R., Aston, C., ve Schwartz, D. C. (1998). Automated high resolution optical mapping using arrayed, fluid-fixed DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8046-8051.
- Lee, J.K., Dancik, V. ve Waterman, M. S. (1998). Estimation for restriction sites observed by optical mapping using reversible-jump markov chain monte carlo. *J. Comput. Biol.* 5, 505-515.
- Lin, J., Qi, R., Aston, C., Jing, J., Anantharaman, T. S., Mishra, B., White, O., Daly, M. J., Minton, K.W., Venter, J. C., ve Schwartz, D. C. (1999). Whole-genome shotgun optical mapping of *Deinococcus radiodurans*. *Science*, 285, 1558-1562.
- Lim, A., Dimalanta, E., Potamouisis, K. D., Yen, G., Apodoca, J., Tao, C., Lin, J., Qi, R., Skiadas, J., Ramanathan, A., Perna, N. T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Hackett, J., Blattner, F. R., Anantharaman, T. S., Mishra, B. ve Schwartz, D. C. (2001). Shotgun optical maps of the whole *Escherichia coli* O157:H7 genome. *Genome Research* 11, 1584-1593.
- Meng, X., Benson, K., Chada, K., Huff, E. ve Schwartz, D. C. (1995). Optical mapping of lambda bacteriophage clones using restriction endonucleases. *Nat. Genet.* 9, 432-438.
- Meizhong, L. ve Rod, A. W. (2003). An Improved Method for Plant BAC Library Construction. *Methods .Mol. Biol.*, 236, 3-18.
- NCBI (2005) National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>
- Sanger, F. vd. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi x174 DNA. *Nature* 265, 687-695.
- Sanger, F.vd. (1982). Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J. Mol. Biol.* 162, 729-773.
- Schwartz, D.C. ve Samad, A. (1997). Optical mapping approaches to molecular genomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 70-74.
- Venter, J.C., Smith, H.O. ve Hood, L. (1996). A new strategy for genome sequencing. *Nature* 381, 364-366.
- Wheeler, D.L., Church, D. M., Lash, A. E., Leipe, D. D., Madden, T. L., Pontius, J. U., Schuler, G. D., Schrimi, L. M., Tatusova, T. A., Wagner, L. ve Rapp, B. A. (2002). Database resources

of the national center for biotechnology information: 2002 update. *Nuc. Acids Res.* 30, 13-16.

Wolfsberg, T.G., McEntyre, J. ve Schuler, G. D. (2001). Guide to the draft human genome. *Nature* 409, 824-826.

Yanagida, M., Morikawa, K., Hiraoka, Y., Matsumoto, Y., Uemora, T. ve Okada, S. (1986). In applications of fluorescence in the biomedical sciences. Alan Liss, New York, NY., 321-345.

Yokota, H., Johnson, F., Lu, H., Robinson, R. M., Belu, A. M., Garrison, M. D., Ratner, B. D., Trask, B. J. ve Miller, D. L. (1997). A new method for straightening DNA molecules for optical restriction mapping. *Nuc. Acids Res.* 25, 1064-1070.

Zhongwu, L., Jing, J. ve Schwartz, D. C. (1999). A shotgun optical map of the entire Plasmodium falciparum genome. *Nature Genetics* 23, 309-313.



Muhittin Arslanyolu was born in Gediz, Kütahya, Turkey. He received B.S. degree in Biology from Uludağ University, Faculty of Science and Literature, Bursa, in 1989. He received not only MSc. Degree in 1995 but also Ph.D. degree in 2001, from Graduate

Program of Regulatory Biology, Cleveland State University, USA. He became as an assistant professor in 2002. His research topics focus on Molecular Biotechnology and Molecular Biology of living organisms.