



MOLEKÜLER SİTOGENETİK YÖNTEMLERLE BİTKİ GENOM ANALİZİ

Ahmet Latif Tek

Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Şanlıurfa
Sorumlu Yazar: altek2@gmail.com

Özet

Floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği, gerek uygulamadaki pratikliği gerekse genom yapısının özelliklerinin anlaşılmasındaki sıradışı katkısı bakımından moleküler sitogenetik yöntemlerin temelini oluşturmaktadır. Bitki genomlarının önemli bir kısmını genom içerisinde çok sayıda kopyası bulunan, tekrarlayan DNA elementleri oluşturmaktadır. Bu DNA dizileri, çoğunlukla kromozomların sentromerik veya telomerik bölgelerinde bulunur. Bu çalışmada, bitki genomunu oluşturan tekrarlayan DNA elementlerini kullanarak genom analizi çalışmalarında FISH'ten en etkin şekilde yararlanabilmek için tekniği oluşturan öğeler ayrıntılarıyla irdelenmiştir. Ayrıca, bu öğelerin bitki genom dinamiklerinin anlaşılmasındaki potansiyelleri keşfedilmeye çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: sitoloji, iki-renkli FISH, fiber-FISH, immüno-FISH, floresan mikroskop.

PLANT GENOME ANALYSIS WITH MOLECULAR CYTOGENETIC TOOLS

Summary

Fluorescence in situ hybridization (FISH) forms the basis of molecular cytogenetics tools on the determination of the properties of plant genome composition because of its practicality and originality. Repetitive DNA sequences constitute a significant portion of plant genomes. These sequences are mainly present at centromeric and telomeric regions of chromosomes. In this study, the components of the FISH technique were examined in detail to investigate the plant genome structure by using the repetitive DNA elements. In addition, the components of the FISH technique were evaluated for the potential of exploring the dynamics of plant genomes.

Key words: cytology, two-color FISH, fiber-FISH, immuno-FISH, fluorescence microscopy.

1. Giriş

Sitogenetik hücre içerisindeki elementleri takip ederek kalıtımın işleyişini anlamaya çalışan bir bilim dalıdır. Klasik sitogenetik dönemden, modern moleküler sitogenetik döneme geçiş kalıtımın temel unsuru olan deoksiribonükleik asit (DNA) moleküllerinin teknolojik gelişmeyle orantılı olarak görüntülenebilmesiyle iki aşamada gerçekleşmiştir. İlk adım, hücre içerisindeki kromozomların doğal yapısını bozmadan diğer bir ifadeyle, in situ şartlarda hibridizasyon yapabilme kabiliyetinin geliştirilmesiyle başlamıştır (Gall ve Pardue, 1969). Bu başlangıç asıl ivmesini prob DNA'nın radyoaktif moleküllerle işaretlenmiş/labellenmiş sentezden, floresan moleküllerle işaretlenmiş/labellenmiş senteze geçmesiyle göstermiştir (Langer-Safer ve ark., 1982). Dolayısıyla prob DNA'nın teknolojik gelişmeyle birlikte işaretlenme ve hibridizasyon sonrası görüntülenme yöntemi en önemli ilerletici faktör olmuştur.

Günümüzde moleküler sitogenetik yöntemlerin temelinde floresan in situ hibridizasyonu (FISH) bulunmaktadır. FISH'te çoğunlukla mitoz bölünmenin metafaz aşamasındaki kromozomlar görsel estetikliği ve elde edilebilme kolaylığı sebebiyle tercih edilmektedir. Bu sebeple, FISH ile kromozomlar üzerinde belirli DNA dizilerinin yeri tespit

edilebilmektedir. FISH'in hassasiyet ve spesifikliği/kesinliği, diğer bir çok kromozomları tanımlama esasına dayanan sitogenetik yöntemlere göre daha fazladır (de Jong, JH ve ark., 1999). Görüntüleme, prob DNA-sinyal arttırımındaki teknolojik gelişmelerle birlikte moleküler rekombinant DNA teknolojilerinin de entegre edilmesiyle uygulanan FISH tekniği sitogenetik çalışmalara modern bir perspektif kazandırmıştır (Figueroa ve Bass, 2010). Çok kısa zamanda FISH genom analizi çalışmalarında büyük etkilere sahip olmaya başlamıştır. Bu etkiler içerisinde, çok hızlı bir teknik olması ve hızlı sonuç göstermesi, hibridizasyon ve hibridizasyonu tespit etme etkinliğinin yüksek olması, boyutsal çözünürlüğünün fazla olması, kısa sürede çok sayıda hücrenin analizine imkan sağlaması gibi özellikleri öne çıkmaktadır (de Jong, JH ve ark., 1999; Jiang ve Gill, 2006).

2. Bitki genom kompozisyonu

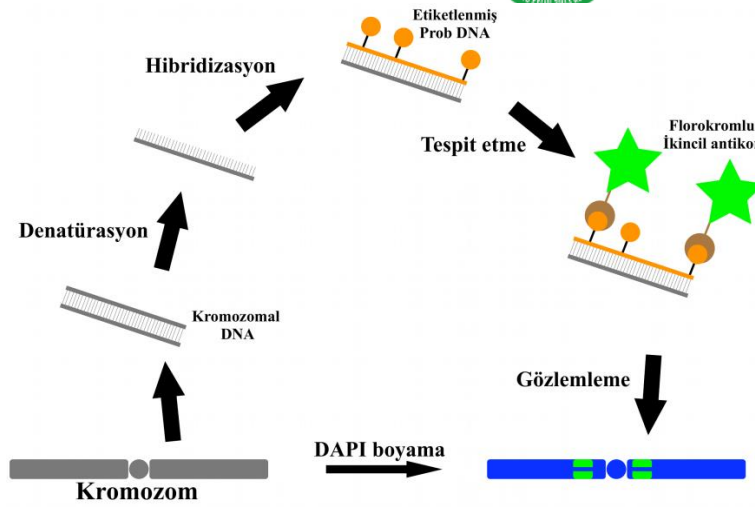
Bir organizmanın eşey hücrelerindeki kalıtım materyali olan DNA'nın tamamına, diğer bir ifadeyle somatik hücrelerindeki DNA'nın yarısına genom denir. Genomik DNA hücre içerisinde kromozomlar formunda organize olmakta ve paketlenmektedir. Her türün kromozom sayısı o türe özgüdür ve değişmez. Dolayısıyla, bir türün kromozom yapısının anlaşılması, o türün genom yapısında anlaşılmasına imkan sağlamaktadır.

En basit şekliyle, haploid bir genomdaki DNA'yı kopya sayısını göre iki gruba ayırabiliriz. Bir kopya halinde bulunan DNA parçalarına 'tek-kopya DNA dizileri' ve birden fazla kopyası olan DNA parçalarına ise 'tekrarlayan DNA dizileri' denir. Genom içerisinde çok sayıda kopyası bulunan tekrarlayan DNA dizileri bitki genomlarının önemli bir bölümünü oluşturur. Birim uzunluğu bir kaç nükleotitten başlayarak, bir kaç bin nükleotide kadar ulaşabilir. Tekrarlayan DNA elementleri sitolojik olarak belirli bir kromozomun belirli bir bölgesinde olabildiği gibi, birden fazla kromozomun sınırlı sayıda bölgesinde veya tüm kromozoma dağılmış olarakta bulunabilir.

Sentromerik tekrarlayan DNA'lar, telomerik tekrarlar, transpozonlar, ribozomal genler bu gruba örnek olarak verilebilir. Bu elementler gösterdikleri yüksek polimorfizmden dolayı bir çok bitki genomunun yapısal özelliklerinin anlaşılmasında kullanılmıştır (de Jong, JH ve ark., 1999; Jiang ve Gill, 2006). Sentromerik ve telomerik DNA dizilerinin kromozomlar üzerindeki dağılışlarının anlaşılması genom yapısının dinamiklerini anlamada yol gösterici olabilmektedir (Tek ve Jiang, 2004). Birçok organizmanın genom kompozisyonunu anlamak için gerçekleştirilen moleküler sitogenetik çalışmaların FISH sonuçları çoğu zaman o genom için referans çalışma olmaktadır.

3. FISH tekniğinin temel prensipleri

Burada FISH tekniği genel bir yaklaşımla tanıtım amacıyla kısaca açıklanmıştır. Eğer ihtiyaç duyulursa, ayrıntılarının teknik olarak tüm yönleriyle tarif edildiği çalışmalarda mevcuttur (Pinkel , 1999). FISH tekniği, bir çok bakımdan Southern yöntemine benzerlik gösterir. Her iki yönteminde esası, DNA:DNA hibridizasyonuna dayanır. Yalnız FISH tekniğinde hücre veya kromozomun doğal yapısı mümkün olduğunca bozulmadan muhafaza edilirken, prob DNA ve diğer antikor-florokrom tespit moleküllerinin nüfuzuna imkan sağlanmalıdır. Şematik olarak teknikteki önemli aşamalar aşağıda gösterilmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Tek-renkli FISH tekniğinin genel şematik açılımı. Metafaz kromozomal DNA'sı denatüre edilerek tek iplikçikli forma getirilir. Modifiye nükleotitlerle etiketlenen prob DNA, kromozomun ilgili bölgesine hibridize olur. İkincil antikor-florokrom molekülleri prob DNA'ya bağlanır. Prob DNA'nın bağlandığı hibridizasyon bölgeleri floresan mikroskopa gözlemlenir.

Plazmid DNA, enzimatik reaksiyonlarla prob olarak sentezlenebilir. Üzerinde çalışılan iki plazmid DNA, modifiye edilmiş biotin-dUTP veya digoxigenin-dUTP nükleotitleriyle etiketlenebilir (Çizelge 1). Bu nükleotitlerle işaretlenen DNA, denatüre edilip tek iplikçikli hale getirilir ve prob olarak kullanıma hazırdır.

Hedef olarak kullanılan kromozomlar karakteristik morfolojilerini bozmadan mikroskopik cam üzerinde sabitlenir. Kromozomal DNA denatüre edilerek tek iplikçikli forma dönüştürülür (Şekil 1). Prob DNA kromozom üzerine yerleştirilir ve bir lamel ile kapatılarak DNA:DNA hibridizasyonunun meydana gelmesi sağlanır. Akabinde, spesifik olarak bağlanmamış fazla prob DNA'ları tampon solusyonda yıkanarak uzaklaştırılır. Geriye sadece spesifik hedef DNA:prob DNA hibrit molekülleri kaldıktan sonra prob tespitine geçilir (Şekil 1). Hibrit DNA moleküllerinin tespit ve gözlenmesinde kullanılan florokromlu ikincil antikorlar çizelge 1'de gösterilmiştir. Etikete özgü ikincil antikorla bağlanan florokrom molekülleri floresan mikroskop üzerinde yeşil ya da kırmızı renklere gözlemlenir.

Çizelge 1. FISH'te plazmid DNA'nın etiketlenmesi, florokromlu ikincil antikor bağlanması ve kromozomların boyanmasında kullanılan moleküllerin çözümü ve birbirleriyle renk ilişkisi.

DNA elementi	Kaynak	Etiketleme	Florokromlu ikincil antikor	FISH'teki rengi
prob DNA 1	plazmid DNA	biotin-dUTP	streptavidin-conjugated Alexa Fluor 488	yeşil
prob DNA 2	plazmid DNA	digoxigenin-dUTP	anti-digoxigenin-conjugated Rhodamine	kırmızı
kromozom	meristematik bitki dokusu	DAPI	-	mavi

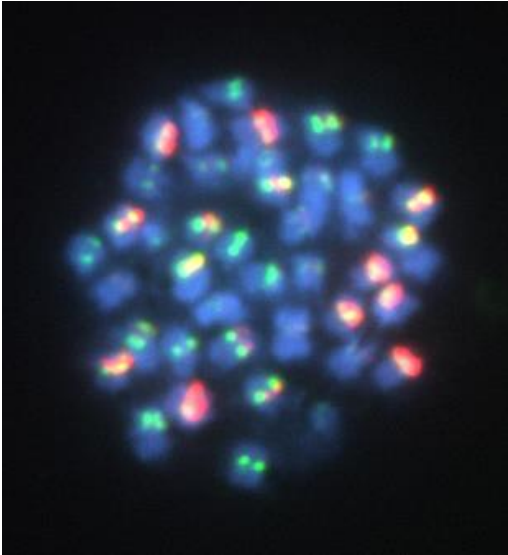
4. Farklı FISH yöntemleriyle bitki genom analizi

Genel olarak FISH tekniğinin temel prensipleri yukarıda kısaca açıklanmıştır. Tekniği oluşturan bu unsurlardaki değişiklikler ve uygulamadaki esneklikler, sitogenetik olarak bitki genomlarını farklı çözünürlükte ve ayrıntıda analiz edilebilme imkanı sağlamaktadır (Speicher ve Carter, 2005; Jiang ve Gill, 2006). Burada sadece en yaygın kullanılan ve en fazla bilinen iki-renkli FISH, Fiber-FISH ve immüno-FISH üzerinde durulacaktır.

4.1. İki-renkli FISH

Bir ya da iki farklı prob DNA kullanılmasına göre bir-renkli veya iki-renkli FISH olarak tanımlanır. İki-renkli FISH analizinde iki farklı prob DNA'sı iki farklı modifiye nükleotitle işaretlenebilir (Çizelge 1). Bu problemlerin bir arada aynı metafaz kromozomları üzerinde hibridize olması sağlanır. Böylelikle birbirinden bağımsız iki farklı DNA'nın aynı kromozom seti üzerindeki dağılımı ve lokalizasyonu tespit edilebilir. Böylesi bir analizle başka hiç bir yöntemle tespit edilemeyecek organizasyon ve ilişkiyi belirleme imkanı ortaya çıkmaktadır.

Ayrıntıları çizelge 1'de gösterildiği gibi iki farklı sentromerik plazmid DNA'sı, prob olarak işaretlenmiş ve DAPI ile boyanmış soya metafaz kromozomları üzerinde hibridize edilmiştir (Şekil 2). Bazı soya sentromerleri yeşil renkli proba hibridize olurken, diğerleri ise kırmızı renkteki proba boyanmıştır. Eğer bir sentromerik bölgede her iki probta birbirine çok yakın ise bu bölgeler, Şekil 2'de sarı renkte görülmektedir. Böylece, soya kromozomlarının sentromerik bölgelerinde bulunan iki farklı tekrarlayan DNA dizisinin tespiti ve bunun FISH



ile gösterimi, soyanın genom özelliklerini ve eski bir poliploid olarak genom dinamiklerini kavramada yol gösterici olabilmektedir (Tek ve ark., 2010).

Şekil 2. İki-renkli FISH ile soya metafaz kromozomları üzerinde sitogenetik haritalama. Biotin ve digoxigenin taşıyan nükleotitlerle işaretlenmiş iki prob DNA, kırmızı ve yeşil renkte görülmektedir. FISH iki farklı prob DNA'nın mavi renkli soya kromozomlarının sentromerik bölgelerinde bulunduğunu göstermektedir.

4.2. Fiber-FISH

Yüksek moleküler ağırlıktaki genomik DNA fiberlerinin slayt üzerinde nazıkçe uzatılmasıyla gerçekleştirilen bir FISH yöntemidir (Fransz ve ark., 1996). DNA fiberleri proteinlerden uzaklaştırılarak uzatıldığından dolayı yüksek çözünürlükte bir haritalama yapılabilir. Ortalama olarak 3 kb/ μ m olacak şekilde uzatılan DNA fibrilleri, bir kaç kilobaz ile başlayıp, bir kaç megabaz DNA'ya kadar ölçülebilmektedir (Jiang ve Gill, 2006). Bu sebeple Fiber-FISH uzun DNA moleküllerinin analizi veya geniş genetik lokusların karakterizasyonunda kullanılabilir (Tek ve Jiang, 2004; Tek ve ark., 2005).

4. 3. İmmüno-FISH

İmmüno-FISH yöntemi hem immünofloresan hem de FISH'in ardın sıra/birbirini takiben aynı materyal üzerinde uygulanmasına imkan sağlar. İmmünoboyama da denilen immünofloresan yöntemi için ilk şart, bir poliklonal antikorun geliştirilmiş olmasıdır. Poliklonal antikorlar, üzerinde çalışılan veya ilgi duyulan proteini spesifik olarak tanır ve immünolojik olarak bağlanabilir. Dolayısıyla, poliklonal antikorlar sadece bir proteinin hücre içerisindeki yerinin tespiti için değil, aynı zamanda bu proteinle ilişkili DNA gibi diğer başka molekülleri analiz etmek için de ideal araçlardır.

Kromozomu oluşturan yapısal proteinlerine karşı geliştirilen antikorlarla, bu yapısal proteinlerin hücre içerisindeki yerleri tespit edilebilir. Ökaryotik bir hücrenin kromozomlarındaki sentromerik bölgelerinde sentromerik histon H3 (kısaca CENH3) isimli özel bir histon H3 proteini bulunmaktadır. Bu proteinin soya homologuna karşı geliştirilen bir poliklonal antikor, immünoboyamayla baklagil kromozomları üzerinde sentromer bölgelerini tespit etmek için kullanılmıştır (Tek ve ark., 2010; Tek ve ark., 2011).

İmmünoboyama ve FISH'in aynı hücre üzerinde birlikte test edilmesi, belirli bir DNA dizisini temas halinde olduğu proteinle fonksiyonel olarak ilişkilendirmesine fırsat sağlar (Jiang ve Gill, 2006). Belirli bir DNA tekrarının sentromerik olup olmadığını karar vermek için, bu DNA elementinin sentromerik CENH3 proteiniyle sarmalandığını göstermektedir. İmmüno-FISH yardımıyla, fasulye CENH3 proteini birbirinden bağımsız iki farklı DNA elementine ilişkilendirilmiştir (Iwata ve ark., 2013). Bunun sonucunda, fasulye işlevsel sentromer bölgelerini 100 bazlık CentPv1 ve 110 bazlık CentPv2 DNA elementlerinin oluşturduğu gösterilmiştir (Iwata ve ark., 2013). Ayrıntılı DNA dizi analizi, bu iki DNA elementinin birbirinden bağımsız fakat kromozoma-özü homojenizasyon gösterdiğine işaret etmiştir.

5. Sonuç ve genel değerlendirmeler

Şüphesiz ki, FISH ile ilgili en son gelişmeler ve uygulama bulduğu farklı alanlar ve teknikteki modifikasyonlar burada açıklananlarla sınırlı değildir. Örneğin, interfaz hücre çekirdeğinin üç boyutlu dinamiklerini gösteren 3D-FISH, 1-3 kb'lık hedefleri tespit edebilen Tyr-FISH ve poliploid genomları kromozom boyutunda ayırabilen genomik in situ hibridizasyonu (GISH) gibi uygulamaları aktaran güncel çalışmalarda mevcuttur (Speicher ve Carter, 2005; Jiang ve Gill, 2006).

Sıradışı bakış açısı sebebiyle FISH, DNA'nın dizi bilgisiyle kromozom biyolojisi arasındaki ilişkinin anlaşılmasında son derece aydınlatıcıdır. Bu ilişki, özellikle immünofloresan ve FISH ile birleştirildiğinde, gen ekspresyonunun kontrolü ile kromatin yapısının özelliklerini birleştirebilir. FISH destekli çalışmaların yardımıyla bitki genomlarının kromozom sayısı, poliploid özellikleri gibi yapısal unsurları kısa sürede etkin olarak aydınlatılabilmektedir. Böylece, yakın ve uzak akraba bitki türlerinin genomlarını oluşturan bir proteine kodlayan veya kodlamayan, evrimsel olarak durağan ve dinamik unsurlar ortaya çıkartılabilecektir. Bu unsurlarda değişiklikliğe sebep olan mekanizmaların anlaşılması kolaylaşacaktır. Sonunda, bu mekanizmaların anlaşılmasıyla hem temel hem de uygulamalı bitki bilimlerinde yeni keşiflerin önü açılacaktır.

6. Not: Şekil 2'de sunulan FISH resmi, Japonya Okayama Üniversitesi'nden Prof. Dr. Kiyotaka Nagaki'nin laboratuvarında üretilmiştir. Bu çalışma hiçbir yerde yayınlanmamıştır.

8. Kaynaklar

Figuroa DM, Bass HW (2010). A historical and modern perspective on plant cytogenetics. *Brief Funct Genomics* 9:95-102.



- Fransz PF, Alonso-Blanco C, Liharska TB, Peeters AJ, Zabel P, de Jong JH (1996). High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence in situ hybridization to extended DNA fibres. *Plant J* 9:421-430.
- Gall JG, Pardue ML (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63:378-383.
- Iwata A, Tek AL, Richard MM, Abernathy B, Fonsêca A, Schmutz J, Chen NW, Thareau V, Magdelenat G, Li Y, ve ark. (2013). Identification and characterization of functional centromeres of common bean. *Plant J* doi: 10.1111/tpj.12269.
- Jiang J, Gill BS (2006). Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057-1068.
- de Jong, JH, Fransz P, Zabel P (1999). High resolution FISH in plants - techniques and applications. *Trends Plant Sci* 4:258-263.
- Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC (1982). Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:4381-4385.
- Pinkel DP (1999) Fluorescence in situ hybridization, in *Introduction to fluorescence in situ hybridization: principles and clinical applications* (Andreeff MA ve Pinkel DP eds) pp 3-32, Wiley-Liss Inc.
- Speicher MR, Carter NP (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 6:782-792.
- Tek AL, Jiang J (2004). The centromeric regions of potato chromosomes contain megabase-sized tandem arrays of telomere-similar sequence. *Chromosoma* 113:77-83.
- Tek AL, Kashihara K, Murata M, Nagaki K (2010). Functional centromeres in soybean include two distinct tandem repeats and a retrotransposon. *Chromosome Res* 18:337-347.
- Tek AL, Kashihara K, Murata M, Nagaki K (2011). Functional centromeres in *Astragalus sinicus* include a compact centromere-specific histone H3 and a 20-bp tandem repeat. *Chromosome Res* 19:969-978.
- Tek AL, Song J, Macas J, Jiang J (2005). Sobo, a recently amplified satellite repeat of potato, and its implications for the origin of tandemly repeated sequences. *Genetics* 170:1231-1238.