

Hücre Tipine Özgü Analiz : *Arabidopsis thaliana* Yapraklarında Floresans ile Aktive Edilmiş Hücrelerin Toplanması Yönteminin Kullanımı

Cell-type specific analysis: The use of fluorescence-activated cell sorting (FACS) in *Arabidopsis thaliana* leaves

Nihal Gören Sağlam (ORCID ID: 0000-0003-1255-5188)

İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilimdalı, Süleymaniye, İstanbul

Öz

Gen aktivitesinin hücreye özgü çözümü özel gelişimsel olayların anlaşılmasında kritik bir rol oynamaktadır. Bunun yanında, genomik seviyede böyle yüksek çözünürlüklü verilerin elde edilmesi spesifik hücrelerin izole edilmesini gerektirdiği için oldukça zordur. Aynı organ ya da dokunun komşu hücrelerinden spesifik hücrelerin izole edilebilmesi için en etkili yöntem FACS (Fluorescence-activated cell sorting=Floresans tarafından aktive edilmiş hücrelerin ayrılması) yöntemidir. İzole edilen hücreler genomik analizler için kullanılabilir. Bu derlemede GFP (Green fluorescent protein=Yeşil floresans protein) ile işaretlenmiş transgenik *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin yapraklarında FACS uygulaması hakkında bilgi verilmiş olacaktır.

Anahtar Kelimeler: FACS, GFP, *Arabidopsis thaliana*, gen aktivitesi

Abstract

Cell-specific resolution of gene activity is critical to understand specific developmental events. However, such high resolution data have been difficult to obtain at a genomic level because specific types of cell need to be isolated. One of the most efficient method to isolate specific cells from neighboring cells in the same organ or tissue is FACS. The isolated cells can be used for genomic analysis. In this review, it will be given information about FACS in transgenic *Arabidopsis thaliana* leaves which are labelled with GFP.

Keywords: FACS, GFP, *Arabidopsis thaliana*, gene activity

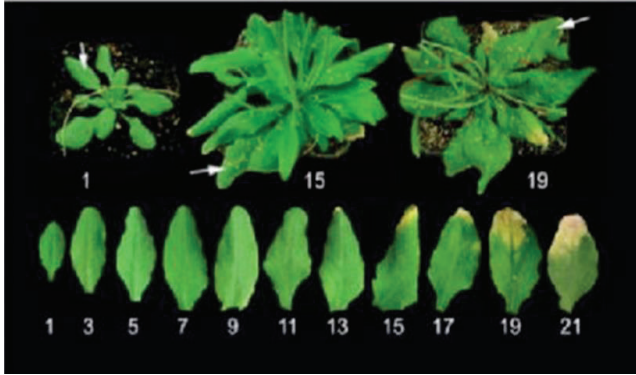
I. GİRİŞ

Bitkiler gibi çok hücreli organizmalar farklı fonksiyonları yerine getirebilmek için son derece özelleşmiş hücrelere sahiptirler. Örneğin yapraklar birçok farklı hücre tipinden oluşmuş kompleks bir organdır. Aynı zamanda büyüyen bir yaprak gelişimin farklı safhalarındaki hücreleri içermektedir (petiyol oluşumu ile başlayıp, genişlemenin durması ve senesense maruz kalma gibi) (Şekil 1). Yaprığı oluşturan hücrelerin, hücre tipine göre farklı gelişimsel aşamalarda olması genomik çalışmaların yapılmasında zorluklar oluşturmaktadır. Elde edilen verilerin analizinde farklı gelişimsel aşamalarda hücrelerden gelen sinyaller kafa karışıklığına neden olmakta ve hatalı sonuçların oluşma riski artmaktadır. Bu

durumun bertaraf edilebilmesi için hücreye özgü gen anlamına olanak sağlayacak değişik metodların geliştirilmesi zorunluluğu doğmuştur. Özellikle RNA amplifikasyon tekniklerindeki gelişmeler çok küçük miktarlardaki RNA'nın analiz edilmesini mümkün kılmıştır [1]. Bir diğer aşılması gereken problem ise tek hücre analizinin etkili olabilmesi için bitki dokusundan hedef hücrenin kusursuz bir şekilde çıkarılabilmesidir. Bitki hücrelerinin geniş vakuol ve hücre duvarına sahip olması bu işlemi zorlaştırmaktadır. Bunun yanında, son yıllarda yeni tekniklerin geliştirilmesi ile tek hücre seviyesindeki gen anlatımı çalışmaları artmıştır [2]. Hücre tipine özgü analiz yöntemi olarak adlandırılan bu metodlar;

- Lazer tarafından tutulmuş hücrelerin mikrodiseksiyonu =Laser capture microdissection (LCM)
- Çevrilen ribozom afinite saflaştırılması=Translating ribosome affinity purification (TRAP)
- Çekirdeksel izolasyon=Nuclear isolation
- Floresans ile aktive edilmiş hücrelerin toplanması=Florescence-activated cell sorting (FACS) dır.

Bu yöntemlerin özelliklerini gösteren özet bilgiler Tablo 1 de verilmiştir.



Şekil 1: Farklı gelişimsel aşamalarda *Arabidopsis thaliana* bitkisinin 7. yaprağının görünümü (<http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/lifesci/people/1/vbuchanan-wollaston/systems>)

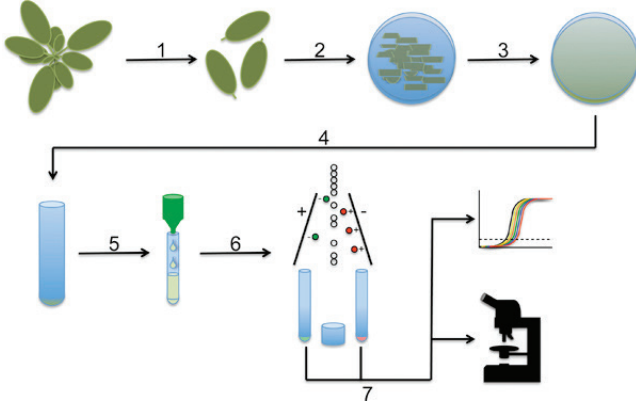
1.1 Floresans tarafından aktive edilmiş hücrelerin ayrılması (Fluorescence-activated cell sorting =FACS)

Floresans tarafından aktive edilmiş hücrelerin ayrılması (Fluorescence-activated cell sorting=FACS) karışık bir hücre popülasyonunun floresans özelliklerini temel alarak ayrılmasına ve analiz edilmesine izin veren bir çeşit flow sitometri tekniğidir [4]. Aynı organ ya da dokunun komşu hücrelerinden spesifik hücrelerin izole edilebilmesi için en etkili yöntem FACS yöntemidir. Bu metod lazer mikrodiseksiyon (Laser capture microdissection=LCM) yöntemine alternatif olarak geliştirilmiş yüksek verimlilikte transkript analizine izin veren bir yöntemdir. FACS da floresans işaretçinin anlatımının olduğu transgenik hatlar kullanılmaktadır ve LCM ye oranla daha az zaman alan bir yöntemdir. Bitkilerde hücre toplanmasında ki ilk anahtar gelişme hücre gruplarındaki floroforların anlatımının olduğu transgenik bitkilerin elde edilebilirliğinin artmasıdır. Bitkilerde, GFP hatlarının bulunabilirliğinden dolayı, baskın olarak GFP kullanımı olsada herhangi bir florofor da FACS için bitkileri işaretlemeye kullanılabilir [5]. Bitki hücrelerinde FACS uygulamasını kolaylaştırmak için ikinci anahtar öge koruyucu hücre duvarı varlığının üstesinden gelmektir. Bu amaçla protoplast oluşturmak için, bitki köklerindeki hücreleri ayırmada hücre duvarını parçalayıcı hidrolitik enzimler kullanılarak metodlar geliştirilmiştir

Tablo 1: Hücre tipine özgü analiz metodlarının karşılaştırılmalı özeti [3]

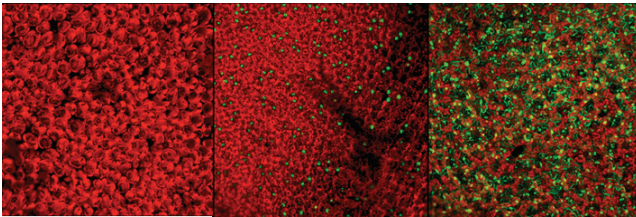
Yöntem	İzole edilecek hedef	İzolasyon metodu	Profili çıkarılacak hedef	Özellikler	Kısıtlamalar
Lazer Mikrodiseksiyon	Doku kesitlerinden hücreler	Histolojik doku kesitlerinden lazer yardımı ile hücrelerin alınması	Hücrelerin içindeki tüm mRNAlar	Hücreler kesitteki görünüm ve lokasyonlarına göre seçilir, tek genetik hat gerektirmez	Elde edilen hedef hücrelerin sayısı sınırlı olduğu için RNA amplifikasyonuna ihtiyaç duyar, özel cihazlar gereklidir
Floresans ile aktive edilmiş hücrelerin toplanması	Floresans ile işaretlenmiş protoplastlar	Dokuların parçalanmasını takiben flow sitometri temelli protoplast izolasyonu	Hücrelerin içindeki tüm mRNAlar	Anlatımı olmuş floresans proteinler esas alınarak hücrelerin toplanması, kimyasal ve mekanik protoplast izolasyonunu içerir	Protoplast izolasyonu ve hücre toplama transkripsiyon profilini olumsuz etkiler. Elde edilen hedef hücrelerin sayısının sınırlı olması nedeniyle RNA amplifikasyonuna ihtiyaç duyar, bitkilerin yoğun genetik manipülasyonuna ihtiyaç duyar, hücre-spesifik promotörlere ihtiyaç duyar
Çevrilen ribozom afinite saflaştırılması	Afinite-etiketli poliribozomlar	İlgili mRNAlar ile birlikte etiketli poliribozomal kompleksin immüno-saflaştırılması	Çevirisi olmuş mRNAlar	Çevrilen (translating) mRNA profili için polizomların hücre-spesifik saflaştırılması, nispeten hedef mRNA'nın yüksek verimi, nispeten düşük maliyet	Bitkilerin yoğun genetik manipülasyonuna ihtiyaç duyar, hücre-spesifik promotörlere ihtiyaç duyar
Çekirdeksel izolasyon	Floresans işaretli ya da afinite-etiketli nukleuslar	Çekirdeksel izolasyon ve floresans ile aktive edilmiş toplamaya dayalı zenginleştirme ya da afinite-temelli saflaştırma	Çekirdeksel mRNAlar	Hücreye özel olarak işaretli nukleusların izolasyonu, protoplast izolasyonuna ihtiyaç duymaz	Sitoplazmik mRNAlar belirlenemez, bitkilerin yoğun genetik manipülasyonuna ihtiyaç duyar, hücre-spesifik promotörlere ihtiyaç duyar, nukleusların toplanması için özel ekipmanlar gereklidir.

[6]. Üçüncü önemli kısım ise genom seviyesinde analiz için, az miktardaki izole edilmiş hücre tiplerinden elde edilen küçük miktardaki RNA'nın miktarının artırılmasıdır. Bunun için de RNA miktar artırıcı kitler (amplifikasyon kitleri) bulunmaktadır [4]. Bu derlemede FACS ile ilgili detaylı bilgi GFP (Green fluorescent protein) ile işaretlenmiş transgenik *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin yapraklarında FACS uygulaması örneği üzerinden verilecektir.



Şekil 2: Arabidopsis yapraklarında hücre tipine özgü analiz yönteminin şematik gösterimi [7]

1. Bir GFP (Green fluorescent protein =Yeşil floresan protein) anlatımı olan *Arabidopsis* hattından alınan yapraklar kullanılır. Bunun için GFP anlatımı olan transgenik hatların yapraklarından alınan kesitler konfokal mikroskop altında incelenir ve GFP anlatımının yaprağın hangi hücrelerinde olduğu tespit edilir. Bu inceleme sonucunda seçilen bitkilerin yaprakları hasat edilir.



Şekil 3: Konfokal mikroskop altında GFP (+) hücrelerin görünümü [8]

2. Yapraklar 1 mm olacak şekilde hızlıca kesilir, protoplast izolasyonu yapılacak çözeltiliye alınır ve vakum yapılır.
3. Örnekler 3-4 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edilir.
4. Protoplast solusyonu 70 µm çapındaki elekten süzülür ve santrifüj edilir.

5. Protoplastlar resuspanse edilir ve 50 µm çapındaki filtreden süzülerek toplama tüpüne alınır.
6. GFP (+) ve GFP (-) canlı protoplastlar FACS cihazı yardımı ile ayrılır.
7. Elde edilen protoplastlar qPCR, NGS ve mikroarray teknikleri kullanılarak analiz edilebilirler.

II. SONUÇ

FACS, bitki büyümesini ve gelişimini hücresel seviyede çalışmaya olanak sağlayan çok güçlü bir tekniktir. Yapılan çalışmalar protoplast izolasyonu ve FACS uygulaması ile genomik çalışmalar için kullanılacak hedef hücrelerin yeterli saflıkta ve miktarda elde edilebileceğini göstermektedir [8]. Ayrıca bu hücreler ile yapılacak genomik analizler tüm bir organı kullanarak yapılan analizlerden daha net sonuçlar elde edilmesine de olanak sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- [1] Hertzberg, M., Sievertzon, M., Aspeborg, H., Nilsson, P., Sandberg, G., & Lundeberg, J. (2001). cDNA microarray analysis of small plant tissue samples using a cDNA tag target amplification protocol. *The Plant Journal*, 25(5), 585-591.
- [2] Lee, J. Y., Levesque, M., & Benfey, P. N. (2005). High-throughput RNA isolation technologies. New tools for high-resolution gene expression profiling in plant systems. *Plant physiology*, 138(2), 585-590.
- [3] Wang, Y., & Jiao, Y. (2011). Advances in plant cell type-specific genome-wide studies of gene expression. *Frontiers in Biology*, 6(5), 384-389.
- [4] Carter, A. D., Bonyadi, R., & Gifford, M. L. (2013). The use of fluorescence-activated cell sorting in studying plant development and environmental responses. *The International journal of developmental biology*, 57, 545-552.
- [5] Birnbaum, K., Shasha, D. E., Wang, J. Y., Jung, J. W., Lambert, G. M., Galbraith, D. W., & Benfey, P. N. (2003). A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science*, 302(5652), 1956-1960.
- [6] Birnbaum, K., Jung, J. W., Wang, J. Y., Lambert, G. M., Hirst, J. A., Galbraith, D. W., & Benfey, P. N. (2005). Cell type-specific expression profiling in plants via cell sorting of protoplasts from fluorescent reporter lines. *Nature methods*, 2(8), 615-619.
- [7] Grönlund, J. T., Eyres, A., Kumar, S., Buchanan-Wollaston, V., & Gifford, M. L. (2012). Cell specific analysis of Arabidopsis leaves using fluorescence activated cell sorting. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (68).
- [8] Gören Sağlam, N. (2017). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. yapraklarında GUS ve GFP raportör genleri kullanılarak senesens ile ilişkili genlerin analizi. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 18(2), 175-183.