

MOLEKÜLER ANALİZLER İÇİN HÜCRE ÖRNEKLEMESİNE BAŞLARKEN: LAZER YARDIMLI MİKRODİSEKSİYON VE BİR DOWN-STREAM UYGULAMASI

Dr. Hüseyin BALOĞLU, Dr. Turgut AYDIN, Dr. Şükrü YILDIRIM, Dr. Zafer KÜÇÜKODACI, Dr. İsmail YILMAZ

ÖZET: Patoloji biliminin modern uygulamalarında moleküler düzeyde bilgi ihtiyacı her geçen gün biraz daha ön plana çıkmaktadır. Tanı amaçlı biyolojik örneklerden kompleks moleküler uygulamalar ile süzülen bilgiler hızla artmaktadır. Patoloji biliminin kullandığı yöntemlerin doğru uygulamaları, hemen daima doğru örnekleme ile başlar. Kullanılan teknik mikrohibridizasyon, genomik ekspresyon paterni ya da mutasyon taraması gibi moleküler düzeyli bir inceleme ise, başlangıç örneklerindeki hedef, spesifik tek bir hücreye kadar küçülebilmektedir. Bir çok sofistik moleküler test yönteminin değeri de, test için kullanılan DNA, RNA ya da proteinin sadece hedef hücrelerden izole edilmiş, yani diğer hücrelerin kontamine etmediği pür bir materyal olup olmayışı ile yakından ilişkilidir. Bu anlamda amaca yönelik hücre örnekleme uygulamaları özellik gösterir. Bu yazıda en küçük insan hücresinin, gland, follikül, glomerül gibi fonksiyonel yapıları, rutin tanısal histo/sito-patoloji uygulamalarıyla hazırlanmış örneklerden görsel kontrol dahilinde seçerek toplama yöntemi olan lazer yardımcı mikrodiseksiyon ve bu diseksiyonla elde edilen hedef hücrelerden çıkartılan DNA'nın DOP-PCR ile amplifiye edilmesi, takiben de insitu hibridizasyon için prob-DNA hazırlaması örneklenmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: Moleküler patoloji, mikrodiseksiyon, PCR, ISH, DNA

SUMMARY: INTRODUCTION TO CELL SAMPLING FOR MOLECULAR ANALYSIS: LASER CAPTURE MICRODISSECTION AND A DOWN-STREAM APPLICATION. The need for high-level molecular knowledge in modern pathology applications is rising everyday. Related data yield very rapidly by applying complex molecular techniques to the diagnostic biologic materials. The accurate application of methods in pathology depends on optimum material sampling. If the chosen technique is a molecular level application such as micro-hybridization, genomic expression, or mutation screening, the sampling target goes as small as a single specific cell. The value of most sophisticated molecular testing methods will be limited if the input DNA, RNA or protein is not derived from pure population of target cells or is contaminated by non-target cells. In this article, the microdissection technique for even the smallest cell of the human body or the functional units such as gland, follicle and glomerulus in prepared material from the biologic material sampled for rutin cyto/histo-pathologic diagnosis under the visual control is detailed, and subsequent DNA-probe preparation for insitu hybridization following DOP-PCR amplification of extracted DNA is demonstrated.

KEY WORDS: Molecular pathology, microdissection, PCR, ISH, DNA

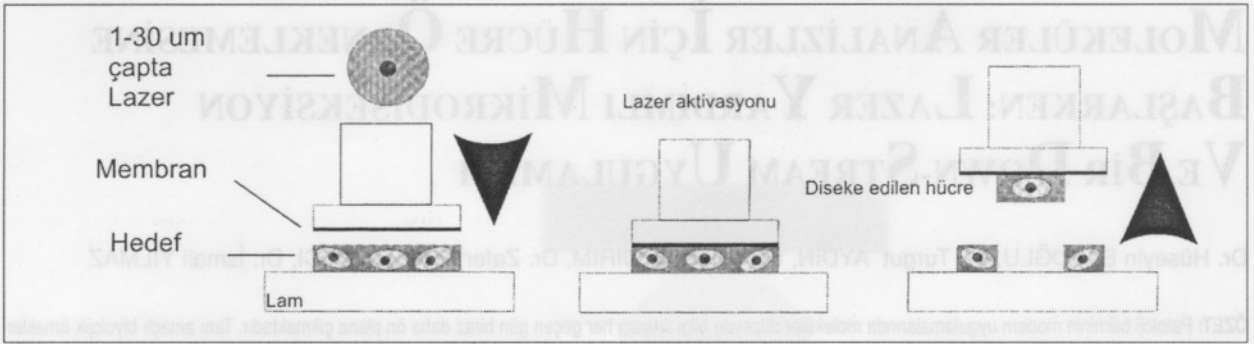
GİRİŞ

Moleküler düzeyde detay bilgisi arttıkça normal hücre gelişimi, dokuların ve sistemlerin normal yapısı (morfogenezis) ile, bunların patolojik lezyonlara değişimi (patogenezis) merak uyandırmakta ve süreçte yer alan tüm kritik genlerin ekspresyon paternleri incelenmektedir. Bu incelemeler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve modifikasyonları, mikrohibridizasyon yöntemleri ve mutasyon tarama tekniklerinde sağlanan gelişmeler sayesinde, biyopsi örneklerinden ekstrakte edilen DNA ve RNA'ya hızlı ve tekrarlanabilir olarak yapılabilmektedir. Ancak detaylı genomik analizler için, dokunun bileşeni olarak hücreler hem biyokimyasal ve fiziksel olarak çevrelerindeki diğer hücrelerden, hem de uzak kaynaklı stimuluslardan etkilendiklerinden, hedeflenen hücre(ler)in, bulunduğu ortamdan izole edilerek tek tek incelenmesi gerek şart olmuştur. Çoğu moleküler test yönteminin değeri, test için kullanılan DNA, RNA ya da proteinin sadece hedef hücrelerden izole edilmiş, yani diğer hücrelerin kontamine etmediği pür bir materyal olup olmayışı ile yakından ilişkilidir. Lazer yardımcı mikrodiseksiyon (Lazer capture microdissection-LCM) biyopsi örneklerinden hazırlanan kesitlerdeki/yaymalardaki hedef hücrelerin spesifik olarak ayrımlanarak, sonraki incelemelerde kullanılmak üzere toplanmasını sağlayan bir yöntemdir.

TEKNİK

Biyopsi örneklerinden hazırlanan preparatlardan hücre diseksiyonu ve diseke edilen hücrelerin sonraki uygu-

lamalarda kullanılabilmesini sağlayan birkaç teknik vardır. Bunlardan ilki, hazırlanan örnekteki istenmeyen kısımların ablasyonundan sonra lamda kalan kısmın mekanik olarak toplanması esasına dayanır (1,2). Bu uygulamalarda kalan kısmın preparattan toplanması işlemi kontaminasyon açısından dikkatle yapılması gereken ayrı bir mikromanüplasyondur. İkinci kategori yöntemler, uygun bir araç (pipet, iğne, bıçak, vb) kullanarak, mikroskop altında, hedef alanın manuel olarak diseksiyonu ve diseke edilen hedefin toplanması esasına dayanır (1,3). Üçüncü kategori ise LCM tekniğidir (5). LCM ilk olarak 1996 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsünde geliştirilmiştir. Bu sistemde ışık mikroskopik incelemelerin yapılabildiği bir mikroskoba entegre edilmiş lazer ışını, mikroskop alanında belirlenen hedefe yönlendirilmektedir. Hedefin üzerine yerleştirilen polimer film, üzerine lazer ışını düştüğü noktalarda hemen sıvılaşarak altındaki hedef hücrelere yapışıp solid hale geçmektedir. Membranın kesit yüzeyinden kaldırılması ile de hedef hücreler toplanmış olmaktadır (Şekil 1). Fonksiyonel bir dizayn ile entegre edilen optik mikroskop ve lazer ile yapılan mikrodiseksiyon birçok avantaj sağlamaktadır. Rutin patolojik tanı için örneklenen biyopsilerde kolaylıkla uygulanabilmektedir. Örnekler rutin doku işlemleri ile hazırlanıp, istenilen bir yöntemle boyanabilir. Gözlemci ışık mikroskop büyütmelerini kullanarak örneği inceleyebilir. Örnek içinde 1 µm'ye kadar küçük çapta hedefler seçilebilir. Yani tek hücre diseksiyonundan kompleks organel yapılarına kadar değişik boyutlu mikroskopik hedefler diseke edilebilir (Resim 1). Seçilen alan diseke edildikten sonra geride kalan doku aynı işlemde, ya da başka uygulamalarda kullanılabilir şekilde kalır (Resim 1, ABC-II). Morfolojik korelasyon işlem sonuna kadar



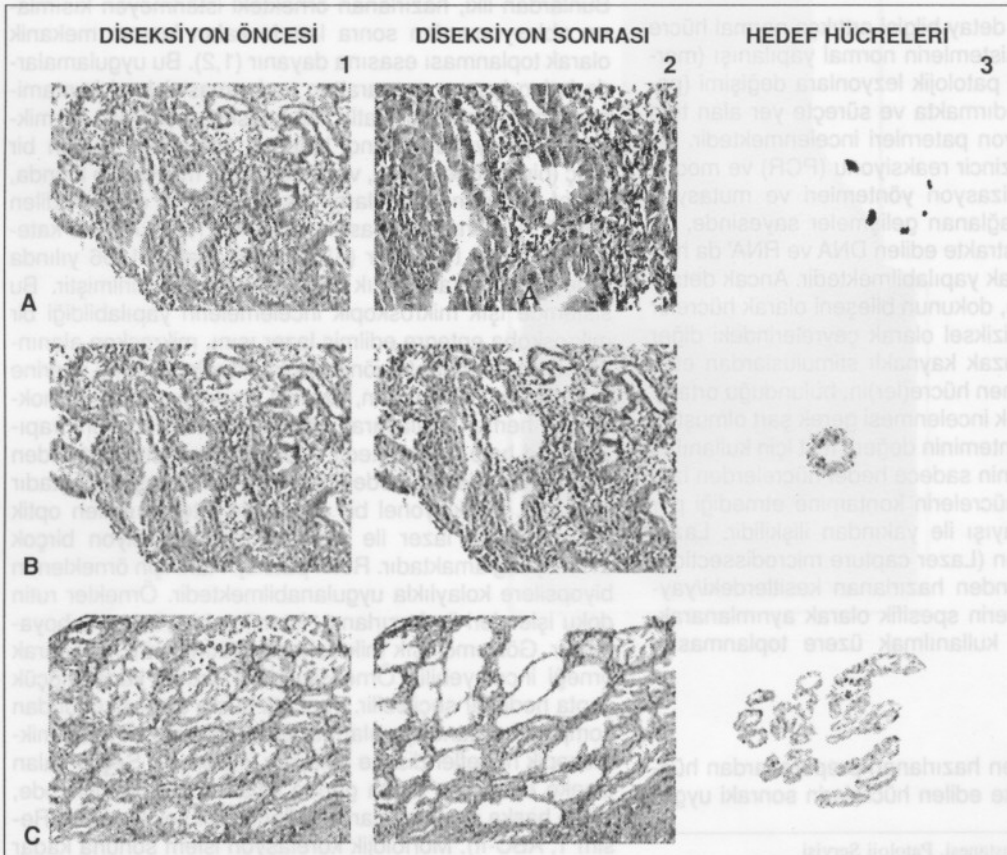
Şekil 1: Lazer yardımcı mikrodiseksiyon tekniği

sağlanır. Diseke edilen kısmın toplanması tek hamlede membranin doku yüzeyinden kaldırılması ile yapıldığından, manuel toplama yapılan yöntemlerde görülen kontaminasyon riski yoktur. Lazer membranı eritirken fotonik bir reaksiyon olduğundan ve termofilik bir membran kullanıldığından DNA, RNA ve proteine zarar verecek yükseklikte ısı oluşmaz. Diseksiyon membranındaki hücreler DNA, RNA ve protein ekstraksiyonu için kullanılacak tampon solüsyonlarına kolayca karışırlar. Diğer şartlarda membrandan kolayca ayrılıp kaybolmaz.

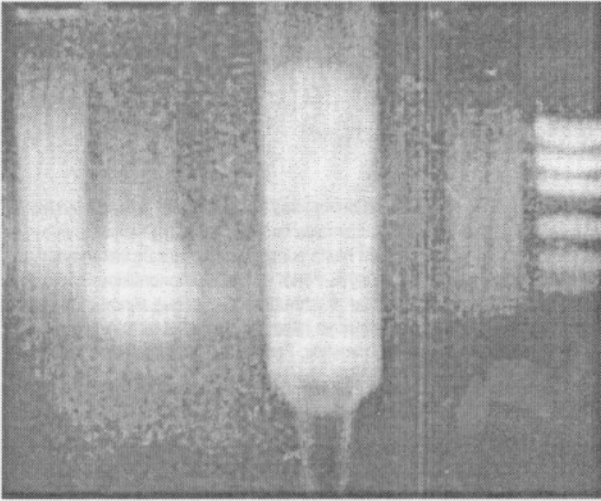
UYGULAMA

Sunulan örnek uygulamada, endometriyal lezyon spektrumundaki lezyonların arşivlenmiş parafin blokları

kullanılmıştır. Bloklardan hazırlanan 8 µm'lik kesitler, Hematoksilen Eozin yöntemi ile boyanıp lamel kapatılmadan özel bir optik düzelticiyle incelenmiştir. Hedeflenen gland yapıları/hücreler LCM ile 1-20 µm çaplı lazer demetleri ardışık kısa peryotlarla (0,1-1 saniye) aktive edilerek diseke edilmiştir (LCM-Arctus, CA, USA) (Resim 1). Membrana aktarılan hücrelerden sonraki uygulamalarda kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen genomik DNA'nın dansitesi ve püritesi saptanarak ihtiyaç duyulan DNA miktarı için kaç adet gland/hücre diseksiyonu gerekeceği optimize edilmiştir. Hedef hücrelerin sayısının çok az (örneğin 1-10 hücre) olduğu durumlarda izole edilen genomik DNA, DOP-PCR (Degenerated Oligonucleotid Primed - Polimerase Chain Reaction) tekniği ile universal olarak amplifiye edilmiş, daha sonra hibridizasyon



Resim 1: LCM'un parafin kesitlerde uygulandığı



Resim 2: LCM ile diseksiyon yapılmış hücrelerden ekstrakte edilen genomik DNA, DOP-PCR ile amplifiye edilmiş DNA'nın (1), floresan ile işaretlenmesi (2), işaretli DNA problemlerinin purifikasyonu için filtrelenmesi (3), insitu hibridizasyon için hazır floresan işaretli DNA problemleri (4).

için kullanılmak üzere nick translation tekniğiyle green spektrum floresanla işaretlenmiştir (Resim 2).

SONUÇ

Sonuç olarak, amaca yönelik hedeflenmiş hücreleri rutin sitolojik ve histolojik tanı örneklerinden selektif olarak ayrılarak DNA, RNA ve protein hedefli moleküler analizlere yönlendirmek için kolay ve ideal bir yöntem olarak lazer yardımcı mikrodiseksiyon (LCM) yöntemini kullanabilmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Shibata D, Hawes D, Li ZH, Hernandez AM, Spruck CH and Nichols PW. Specific genetic analysis of microscopic tissue after selective ultraviolet radiation fractionation and the polymerase chain reaction. Am J Pathol 1992; 141: 539-543.
- Becker I, Becker KF, Rohrl MH, Minkus G, Schutze K, Hofler H.: Single-cell mutation analysis of tumors from stained histologic slides. Lab Invest; 1996 Dec;75(6):801-7.
- Bohm M, Wieland I, Schutze K, Rubben H: Microbeam MOMENT: non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue. Am J Pathol 1997; 151: 63-67.
- Bonner R F, Emmert-Bruck M, Cole K, Phoida T, Chuaqui R, Goldstein S, Liotta LA: Laser Capture Microdissection. Science 1997; 278: 998-1001

KEY WORDS: LCM, histologic, laser, hepatocellular carcinoma.

GİRİŞ

Multistiküler dev hepatosel oluşturma yenidoğan karaciğer hastalıklarında sık görülen bir reaksiyondur. Neonatal hepatit ve diğer sistemik gelişimsel anormallikler, karaciğerin histopatolojik incelemesinde önde gelen bulgudur (1). Yenidoğan sonrası dönemdeki çocuklarda ve yetişkinlerde ise oldukça ender olarak görülür. 1982 yılında Tjelle (2) tarafından "post-natal dev hepatosel hepatit" olarak adlandırılan bu karaciğer patolojisinin etyolojisi bellemek amacıyla yapılan çalışmalarda bazı ilaçların, otoimmün mekanizmaların ve bazı virüslerin en sık etyolojik faktörler olduğu anlaşılmıştır. Anadilim Dairesinde tanımlı karaciğer hastalıkları ile ilgili dev hepatosel hepatit vakasının, bu hastalığın etyolojisi ile ilgili olarak çok önemli etyolojik faktörler üzerine de dikkat çekmek için etyolojik faktörler üzerine de dikkat çekmek amacıyla sunmuş olduk.

YAKA SUNUMU

Vaka 1

59 yaşındaki kadın hasta santral, periferik ve nöralistik şikayetleri ile özel bir kliniğe başvurmuş, yapılan tetkiklerinde karaciğer aminotransferaz (AST) 972 U/L, alanin aminotransferaz (ALT) 983 U/L, alkalik fosfataz (ALP) 281 U/L, gama glutamil transpeptidaz (GGT) 254 U/L, total bilirubin 8.8 mg/dl, direkt bilirubin 4.9 mg/dl, lak-tat dehidrogenaz 1300 U/L, HbA_{1c} (Hemoglobin A_{1c}) 5.9, total protein 7.5 g/dl, albumin 3.25 g/dl (24.9), total globulin 4.25 g/dl, a-1 globulin 0.8, a-2 globulin 2.10, b-globulin 2.15, y-globulin 2.52 idi.

* İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
** İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı