

Molecular pathology – Moleküler patoloji

Melek Ergin

Department of Pathology, Çukurova University, Faculty of Medicine, Adana, Turkey.

Accepted for publication on 10 December 2004

In the past decades, molecular biology has found major applications in pathology, particularly in oncologic pathology. "Molecular pathology" can be broadly defined as the use of genetic data, in addition to the standard pathological parameters, to optimize diagnosis and to indicate treatment and prognosis. Currently, molecular pathology will eventually become a part of routine practice. This review will discuss the techniques used in molecular pathology and then give examples of those used in the practice.

Moleküler biyoloji, son dekalarda patolojide, özellikle onkolojik patolojide ana temel bilimlerden biri haline gelmiştir. Son zamanlarda moleküler patoloji rutin bir parçası haline gelmeye başlamıştır. "Moleküler patoloji"; tanıyı optimize etmek, tedaviyi ve prognozu belirlemek için standart patolojik parametrelere ek olarak, genetik verilerin kullanımı olarak tanımlanabilir. Burada moleküler patolojide kullanılan teknikler tartışılacak ve pratik uygulamada nasıl kullanıldığı gözden geçirilecektir.

Giriş

Moleküler tekniklerin esas avantajlarından biri hastalığın fenotipini değerlendirmeksizin doku analizine ve tanıya ulaşmayı sağlayan, güçlü teknikler olmasıdır. Çünkü RNA veya DNA düzeyindeki anormallikleri tespit ettiği için sensitif ve spesifiktirler. Artık şimdilerde bir çok hastalığın doğuştan (konjenital) veya sonradan kazanılmış olsun, genetik bir temeli vardır. Dolayısı ile bu teknikler, neoplastik hastalıkların, enfeksiyöz hastalıkların, kalıtsal hastalıkların tanımlanmasında ve kimlik tayini gibi bir çok alanda kullanılırlar.

Moleküler tanı laboratuvarlarının yapısı

Moleküler tanı laboratuvarlarında diğer laboratuvarlarda olması gerekenler yanı sıra ayrıca özel bazı şartlar vardır. Bunlar;

- 1) **Teknik Eleman:** Moleküler biyolojide deneyimli ve moleküler biyoloji zorlukları ile baş edebilecek bir eleman olmalıdır.

- 2) **Örnek Bankası:** Bir çok klinik durumda önceki ve sonraki örneklerin karşılaştırılmalı incelenmesi gerekmektedir. Bunu kolaylaştırmak için materyallerin saklanması sağlamak gerekli olabilir.

- 3) **Spesifik (özgün) aletler:**

- a. Derin dondurucu (-20°C, -70°C)
- b. Vorteks (Karıştırıcı)
- c. Mikrosantrifüj (soğutmalı)
- d. Spektrofotometre
- e. Elektroforez cihazı
- f. Ultraviole transilluminator
- g. Karanlık oda
- h. Laminar flow
- i. Thermocycler (PCR cihazı)
- j. DNA sekans aleti
- k. Bilgisayar ve özel programlar

Bu cihazların bazıları çalışma akışına bağlı olarak kesin gereklidir.

- 4) **Özel Laboratuvar:** Kontaminasyonun engellenmesi için preamplifikasyon ve

postamplifikasyon alanlarının fizik olarak ayrı yerlerde olması gereklidir.

DNA ve RNA eldesi (izolasyonu)

DNA ve RNA izolasyonu, önceleri taze veya donmuş, fiske olmamış dokulardan elde ediliyordu. Daha sonraları DNA formalin-fikse ve parafin dokulardan, RNA ise tam kan veya cam slayttan elde edilebilir hale gelmiştir. Aslında artık DNA ve RNA tek bir hücreden elde edilip, analiz yapılabilmektedir.

DNA eldesi RNA'ya göre daha basittir. Proteinaz K DNA'yı kromatinden serbestleştirmek ve DNAaz enzimlerini yıkmak için kullanılır. Elde edilen DNA konsantrasyonu 260 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülüp kullanılır. DNA+ 4°C'de 1 yıl, -20°C'de daha uzun yıllar saklanabilir.

RNA eldesi daha karmaşıktır. En önemli problem endojen ve eksojen RNAaz enziminin uzaklaştırılmasıdır. Endojen RNAaz dokuda bulunur, eksojen RNAaz kaynağı ise çalışan kişinin derisidir. Guanidium isothiocyanate (GITC) RNA eldesi için kullanılan en iyi maddedir. RNA da 260 nm'de ölçülebilir. DNA'dan farklı olarak daha düşük derecelerde saklanmalıdır, -20°C'de 1 ay, -70°C daha uzun süre için saklanabilir.

Analiz için DNA'nın hazırlanması

Digestion (Parçalama)

Elde edilen DNA yüksek moleküler ağırlığa sahip olduğundan, analiz için bazı ileri işlemler gereklidir. Bu DNA'yı küçük parçalara ayırıp analizi kolaylaştıran "restriction endonuclease" denen enzimlerdir (RE). RE'ler bakterilerden elde edilirler ve DNA'yı belli bölgelerden 4-10 baz çifti uzunlukta parçalara ayırır.

Denatürasyon

DNA daima çift sarmallıdır. A-T, G-C ile bağlanır. Ancak analiz için tek sıralı zincir gereklidir. Çünkü bu tek sıralı zincirin karşısına eşleşmesi ve çift sarmallı zincir oluşturması için ortama konulan nükleotidlerin bağlanması gerekmektedir. DNA ayrılıp tek sıralı zincir haline gelmesi için genellikle ısı kullanılır. Isının derecesi moleküldeki GC içeriğine bağlıdır, çünkü G ile C birbirine daha güçlü bağlanırlar.

Prob veya primer

Prob veya primer hedef diziyi tamamlayan ve spesifik bir DNA veya RNA bölgesini tespit etmek için kullanılan nükleotid dizisidir. Bu dizi birkaç baz çifti veya binlerce baz çifti olabilir. Primerler genellikle daha kısırdırlar (15-20 nükleotid).

DNA analizi

DNA analizinin birkaç yolu vardır.

Slot-and Dot-Blot Hibridizasyon

DNA örneği herhangi ön işlem yapmaksızın membrana direkt olarak bağlanır, fakat örneğin denatüre edilmesi gerekir.

Southern Blot

Aslında slot ve dot-blot tekniğine benzer. Fakat daha öncesinde "restriction" enzimleri ile parçalanma ve agaroz jel elektroforez ile DNA parçalarının boyutlarına göre ayrılması sağlanır. Agaroz jel nitroselüloz bir membran ile yüz yüze getirilerek, jeldeki DNA parçalarının difüzyon yolu ile membrana geçmesi sağlanır. Membran prob ile muameleye hazırdır. Aranan moleküle ait prob kullanılarak örneğin bunu içerip içermediğine bakılır. Membran hibridizasyon işlemlerinden sonra prob ile muamele edilir. Problar radyoaktif madde ile işaretlidir. Membrandaki ürünler x-ray filme aktarılır, aranan hedef DNA o örnekte mevcut ise x-ray filmde band görülür.

Diğer Yöntemler

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) tek baz mutasyonlarını saptamak için kullanılır. Variable number of tandem repeats (VNTR) minisatellit DNA sekansları (dizileri) denilen ve çok kez tekrarlayan kısa DNA dizilerinden oluşur. Bu minisatellit DNA dizilerinin gen regülasyonunda rol oynadığına inanılır. VNTR'ların minisatellitlerinden daha küçük olanlarına son zamanlarda mikrosatellitler denir.

RNA analizi

Northern blot, southern blot tekniğinin RNA için uygulanıdır, fakat birkaç basamak farklıdır. Örneğin restriksiyon enzimi kullanılmaz. Denatürasyon ısı yerine, formaldehit veya formamid

ile yapılır. RNA da bir membrana aktarılır, ancak northern blot mRNA miktarını ölçer.

Protein analizi

Protein taze dokudan elde edilerek poliakrilamid jelde analiz edilir. Proteinler molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar. Proteinler yine bir membrana transfer edilir ve aranan hedef proteine ait antikor ile membran muamele edilir. Bu yöntem western blot tekniğidir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (pcr)

PCR hedef DNA veya RNA dizisinin çoğaltılarak gösterilmesi esasına dayanır. Teknik denatürasyon, yapışma ("annealing") ve uzama ("extension") basamaklarının tekrar eden sikluslarından oluşur. Bu sırada kullanılan özel primer dizileri hedef DNA'nın çoğaltılmasını sağlar. Denatürasyon 94°C'de 30-90 saniye, yapışma 55°C'de 30-120 sn. ve uzama 72°C'de 60-180 sn arasındadır. Ancak yapışma derecesi her primerdeki G-C oranına göre değişir. Denatürasyon sırasında DNA tek sarmallı hale geçer. Hedef DNA bölgesi eldeki örnekte varsa Taq polimeraz enzimi ortama konan nükleotidler primerlerin uygun geldiği yerlere bağlar ve bu işlem ortalama 30 siklus devam eder. 30 siklus 2³⁰ kopya üretir. Amplifiye (çoğaltılmış) ürün etidium bromid ile boyalı elektroforetik jelde görülebilir.

PCR karışımı için kullanılan malzemeler şunlardır; Hedef DNA, primerler, dNTP'ler (serbest nükleotidler), Taq polimeraz, "buffer" (magnezyum içeren), mineral oil, albumin/ jelatin.

Primerler dizayn edilirken bazı noktalara dikkat etmek gerekir. Primerler genellikle 15-30 baz çifti uzunluğundadır. G+C:A+T oranı %50 olmalıdır (%40-%60). Primerin 3 ucunda komplementer (tamamlayıcı) nükleotid olmamalı, olursa primer hedef DNA yerine iki primer birbirine bağlanır ve primer dimeri denilen jelde görülen bantlar oluşur.

PCR'nin southern blot ve northern blot analizine bazı üstünlükleri vardır. Onlara göre daha hızlıdır, radyoaktif madde kullanılmaz, ürün etidium bromid ile direkt görülebilir. DNA analizi için taze doku gerektirmez. Çok düşük konsantrasyondaki DNA miktarı ile bile analiz yapılabilir. Major dezavantajı kontaminasyonun kolay olmasıdır. Bu nedenle preamplifikasyon ve postamplifikasyon alanlarının

ayrı olması gereklidir. Amplifiye olan ürün kesinlikle ilk alana girmemelidir.

PCR birkaç şekilde modifiye edilerek de kullanıma girmiştir:

- "Reverse transcription" PCR (RT-PCR)
- "Nested" PCR
- in situ PCR
- "Competitive" PCR
- "Single-cell" PCR gibi.

RT-PCR: RNA ile yapılan tekniktir. "Reverse transcriptas" enzimi kullanılarak RNA'dan cDNA sentezlenir ve bu PCR için şablon olur. RT-PCR özellikle RNA viruslerin araştırılmasında, kromozomal translokasyonların saptanmasında uygundur. RNA izolasyonu ideal olarak taze dokudan yapılırken bazı durumlarda arşiv materyali de kullanılabilir.

Nested PCR: İki ardışık PCR reaksiyonundan oluşur. İkinci reaksiyonda ilk primerler veya farklı primer seti kullanılır. İlk PCR ürünü 2. PCR'ın hedef DNA'sını oluşturur. Bu teknik sensitivite ve spesiviteyi artırır.

Competitive PCR. Anormal genin kopya sayısını semikantitatif olarak saptamak için veya bazı tümörlerde minimal rezidüel hastalığı tespit etmek için kullanılır.

in situ hibridizasyon (ISH) / floresan in situ hibridizasyon (FISH)

Hedef DNA veya RNA'nın direk görülmesine olanak sağlarlar. ISH daha çok enfeksiyöz hastalıkların tanısında, FISH ise kromozomal translokasyonlar, delesyon, monosomi ve trizomi gibi yapısal ve sayısal kromozomal anomalilerin saptanmasında kullanılır.

Mutasyonel analiz

Mutasyon, gende oluşan ve proteinin fenotip ve fonksiyonunda değişikliğe yol açan baz değişikliğidir. Mutasyonlar genetik olarak geçer veya sonradan kazanılabilir. Mutasyonları tespit etmek için kullanılan çeşitli yöntemler vardır.

Direk Sekans Analizi: Tek baz mutasyonlarını tespit etmek için kullanılan standart bir metodur.

Single Stranded Conformation Polymorphism (SSCP): Mutasyon için basit ve ilk adım tarama testidir. Restriksiyon enzimi ile parçalama sonrasında veya PCR ile amplifiye edilen DNA'nın

denatürasyonu sonrası jelde görüntülenmesi esasına dayanır.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): Tek mutasyon içeren 1 kilobaz uzunluğundan daha kısa DNA zincirlerini ayırabilmek için kullanılır. Ure veya formamid ile DNA denatüre edilir ve mutasyon olan zincir jelde daha yavaş hareket ettiği için normalden ayırt edilebilir.

Diğer Yöntemler: ASO problema ve “Mismatch” ayrılma

Moleküler tekniklerin uygulama alanları

Neoplazi

Bir çok malignensi genetik değişiklikler sonucunda ortaya çıkar. Kazanılmış mutasyonlar genellikle hücre büyümesi, çoğalması ve değişiminde rol oynayan genleri etkilerler. Bu teknikler daha çok hematolojik malignensilerde kullanılırsa da diğer tümörler için de kullanım alanı vardır.

Hematolojik malignensiler

Moleküler teknikler hematolojik malignensilerde çok sık kullanılan yöntemlerdir.

Antijen receptor gen yeniden düzenlenmesi (rearrangement): Her T ve B hücrenin yüzeyinde farklı antijen bulunur. Dolayısı ile normal lenfoid dokuda ve reaktif olaylarda lenfositler poliklonaldır, yani bir çok klondan köken almışlardır. Malign lenfomada ise T veya B lenfositler bir klondan çoğalırlar, yani lezyon monoklonaldır. Bu yöntemle T hücre yüzeyindeki T hücre reseptörlerinde yeni düzenlenme olup olmadığına veya B hücre yüzeyindeki immunglobulin reseptörlerinde yeni düzenlenme olup olmadığına bakılır. Bu yolla lezyonun monoklonal mı (malign mi) yoksa poliklonal mı (benign mi) olduğu saptanır.

PCR ve Southern-Blot tekniği bu amaç için kullanılır. PCR kolay ve hızlı olması ve parafin dokudan yapılabilmesi nedeniyle daha yaygın kullanılır ama southern-blot tekniği ise PCR’a göre daha sensitiftir. PCR ile klonaliteyi tespit etmek için 100 000 neoplastik hücre gerekli iken southern-blot ile 25-50 hücre yeterlidir.

Moleküler Sitogenetik: Bir çok hematolojik malignensilerde spesifik sitogenetik anomalilere rastlanır. Bu anomalilerin saptanma amacı; tanı

koymak için, evreleme amaçlı gizli hastalığı tespit etmek için, tedavi sonrası cevabı değerlendirmek ve relapsı değerlendirmek için yapılabilir. Bu anomaliler üç yolla saptanır:

1- Southern-blot analizi: Örneğin Burkitt lenfomadaki c-myc aşırı ekspresyonu

2- Northern-Blot analizi: AML-M3’deki pml-rara [t(15;17)] translokasyonu

3- PCR, RT-PCR

Onkogenik Viruslerin Saptanması: Epstein Barr virusü endemik Burkitt lenfoma, Hodgkin lenfoma, HTLV-1 ise erişkin T hücreli lösemi/lenfoma etiyolojisinde rol oynarlar. Bu virusler southern blot, PCR, in situ hibridizasyon gibi yöntemlerle gösterilebilir.

Non-hematolojik malignensiler

Hematolojik malignensiler dışında özellikle kolon kansinomlarında, ailesel meme tümörlerinde, çocukluk çağında görülen Wilms tümöründe bazı sitogenetik anomaliler kansinogeneze rol oynarlar. Ailesel meme tümörlerinde BRCA-1 ve BRCA-2 mutasyonları ailesel olguların saptanmasında kullanılabilir. Bir çok tümörde, apoptoziste rol oynayan p53 geninde mutasyon saptanmıştır. Mutasyon nedeni ile apoptozis engellendiği için tümörde aşırı çoğalma ortaya çıkar.

Enfeksiyöz hastalıklar

Moleküler testlerin enfeksiyöz hastalık alanında kullanımı; hastalık tanısı, epidemiyolojik çalışma ve bilinmeyen enfeksiyöz ajanların tanınması içindir

Tanı: CMV, hepatit virusleri, HIV ve HPV gibi enfeksiyon ajanları moleküler tekniklerle gösterilebilir. Bu amaçla en çok PCR ve in situ hibridizasyon kullanılır.

Epidemiyoloji: Moleküler metodlar hastalığın epidemiyolojik sorulara cevap verirler. Dirençli suşları, rezervuar kaynaklarını, bulaşma yollarını saptamak için bu teknikler kullanılabilir.

Yeni Organizmaların Tanımlanması: Bu teknikler sayesinde Rochalimaea henselae bakterisinin basiller anjiomatozisin etkeni olduğu gösterilmiştir.

Kalıtsal hastalıklar

Kalıtsal hastalıklarda moleküler teknikler; hastalık tanısı, taşıyıcı tespit etmek için ve prenatal tanı için

kullanılır. Bu kalıtsal hastalıklardan bazıları Duchenne tipi kas hastalığı, hemofili A ve B, talasemiler, orak hücreli anemidir. RFLP yöntemi en çok kullanılan moleküler tekniktir.

Kimlik tespiti

Kimlik tespiti transplant için, adli patoloji, babalık testi için kullanılır

Transplantasyon: Doku antijen uygunluğu, immunsupresif hastalarda hayatı tehdit eden enfeksiyonların hızlı tespit edilmesi, rekurrent hastalığın takibinde kullanılır. Bu amaçla kullanılan PCR-RFLP yöntemi ve sekans analizidir.

Adli Patoloji: DNA'nın oldukça polimorfik yapısı bir bireyin genotipini belirlemek için avantaj sağlar. Genotipik çalışmalar variable number of tandem repeats (VNTR) denilen teknikle analiz edilir. Kimlik tespiti bu yolla yapılabilir. Bu metod için çok az miktarda örnek gereklidir (kan, meni veya tek bir saç kılı gibi).

Kaynaklar

1. Medeiros LJ, Carr J. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. Arch Pathol Lab Med 1999; 123: 1189-1207.
2. Herrington CS. Demystified ... in situ hybridization. Mol Pathol. 1998;51:8-13.
3. Remick DG, Kunkel SL, Holbrook EA, Hanson CA. Theory and applications of the polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol. 1990 93(4 Suppl 1):S49-54.
4. Markham AF The polymerase chain reaction: a tool for molecular medicine BMJ 1993; 306:441-6.