

Sayımsal Gerçek Zamanlı-Polimer Zincir Reaksiyonu ve Hematolojik Gen Anlatım Analizleri

QUANTITATIVE REAL TIME-POLYMERASE CHAIN REACTION AND GENE EXPRESSION ANALYSIS IN HAEMATOLOGY: A REVIEW

Dr. Hakan SAVLI,^a Dr. Özden HATIRNAZ^b

^aTıbbi Biyoloji AD, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, KOCAELİ

^bGenetik AD, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi DETAE (DeneySEL Tıp Araştırma Enstitüsü), İSTANBUL

Özet

Moleküler tekniklerdeki son gelişmeler sayesinde elde edilen örneklerdeki genomik değişiklikleri hızlı ve doğru bir biçimde ölçebilme olanağı doğmuştur. DNA ve RNA'dan sayısal veya niteliğe yönelik olarak elde edilen yeni belirteçler morfolojik kullanıma girmiş; medikal tanıda son kararın konulmasına doğru uzanan bir yapıya bürünmüştür. Gerek DNA gerekse de RNA'ya yönelik sayımsal çalışmalar biyolojide ve biyomedikal araştırmalarda geniş bir biçimde kullanılmaktadır. İnsan Genom Projesi'nin uygulandığı çağımızda, hücrelerdeki gen anlatımının sayımına yönelik çalışmalar, gen anlatım kalıplarının saptanmasında çok yüksek düzeyde öneme kavuşmuştur. 'Gerçek zamanlı sayımsal polimer zincir reaksiyonu' son yıllarda ortaya çıkan ve biyolojik enstrümanların rutin kullanımıyla duyarlılık, tekrarlanabilirlik ve kolay kullanımın sağlandığı bir teknolojidir. Bu teknoloji nükleik asitlerin sayımıyla; mutasyon saptaması, genotipleme, şimerizm analizleri yapabilen yaratıcı bir yöntemdir. Birden fazla kullanım özelliğine sahip olan bu yöntem, yaşam bilimleri ve moleküler tıpta 'Gerçek zamanlı sayımsal polimer zincir reaksiyonu' kullanımının büyük önemini açıkça sergilemektedir. Bu yazıda bu yöntemin ayrıntıları gözden geçirilmiş ve hematolojik alanda kullanımı taranmıştır.

Anahtar Kelimeler: Polimer zincir reaksiyonu, hematoloji, gen anlatımı

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2004, 24:653-660

Abstract

Recent advances in molecular techniques have provided the opportunity to assess genomic alterations comprehensively and rapidly in acquired samples. New markers derived from qualitative and quantitative DNA and RNA have served to extend morphologic interpretations and have thus been increasingly integrated into the final medical diagnosis. DNA and RNA quantifications are widely used in biological and biomedical research. In the era of the Human Genome Project, quantitation of gene expression by cells is of paramount importance in the investigation of gene patterns. Quantitative real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) technology has recently reached a level of sensitivity, accuracy and practical ease that supports its use as a routine bioinstrumentation for gene level measurement. It has evolved into the state-of-the-art technique for the quantification of nucleic acids for mutation detection, genotyping and chimerism analysis. The extremely versatile technique of quantitative RT-PCR has had an enormous impact on the life sciences and molecular medicine. In this article, details of this method are reviewed and its haematological usage is examined.

Key Words: Polymerase chain reaction, hematology, gene expression

Sayımsal 'Gerçek Zamanlı-Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)' Nedir?

Floresan ışığa tekniklerinin kullanıma girmesiyle kinetik RT-PZR'de bir devrim yaşanmaktadır. Sayımsal RT-PZR, bilinen

PZR teknolojisinin geliştirilmiş bir biçimidir denilebilir. Son yıllarda bilimsel gündeme heyecan veren bu gelişim sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek mümkün olmaktadır. Üstelik süregelen PZR reaksiyonunu ekranda izleyerek gerçek zamanlı "Real Time (RT)" olarak reaksiyonun gidişine müdahale etmek ve PZR döngülerinin sayısı ile oynayabilmek de mümkündür. Birçok adlandırmayla anılan bu teknolojiye floresan okuma yapması nedeniyle yabancı yayınlarda Floresan Sayımsal RT-PZR,

Geliş Tarihi/Received: 17.11.2003 Kabul Tarihi/Accepted: 05.04.2004

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr.Hakan SAVLI
ODTÜ Sitesi 327 Sokak No:27
Karakusunlar, Balgat, ANKARA
hakansavli@yahoo.com

Copyright © 2004 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2004, 24

Sayımsal-kinetik PZR gibi çeşitli adlar altında rastlamak mümkündür. Biz bu yazımızda sayımsal RT-PZR deyişini kullanacağız.

Sayımsal RT-PZR'nin Kullanım Alanı Nedir?

Yapılan birçok yayından anlaşılmaktadır ki mRNA anlatım düzeylerinin saptanmasından DNA kopya numaralarının sayımına, allelik ayrışmalardan viral titrasyonların ölçümüne dek genişleyen uygulama alanıyla, bu teknoloji bilimsel çalışmalarda ana akımlardan biri haline gelmektedir.¹ Fakat bugün için en çok uygulanan kullanım alanı gen anlatım analizleridir.

Gen anlatımının analizi yaşama ait büyüme, farklılaşma ya da patolojik sapmaların saptanması için çok önemlidir. Sayımsal RT-PZR yöntemiyle spesifik genlerin transkripsiyon düzeylerinin saptanması gen anlatımını ölçme amacıyla kullanılan yeni bir yaklaşımdır. Bu sayede tümör hücrelerinin ilaç dirençlerinden kemoterapi taramalarına ve tümör evrelerinin moleküler saptanmasına kadar uzanan birçok farklı alanda gen anlatımını sayısal bir değer olarak ölçmek mümkün olmaktadır.²⁻⁴

Gen anlatımını ölçmek amacıyla RNA'dan çevrilen cDNA'nın yani başka bir deyişle 'transkripsiyonun' sayımı için geçmişte kullanılan çeşitli metotlar vardı. Bugün de kullanımda olan bu yöntemler içinde 'Northern Blotting' analizleri ayrıca mRNA'nın boyutlarıyla ilgili bilgi vermesiyle dikkat çekmektedir. Bir diğer yöntem olan 'RNA'se Protection Assay' ise özellikle transkripsiyonun başlangıç ve sonlanış noktalarının haritalanması için kullanılmaktadır. Çok etkileyici olan ve bilimsel gündemi işgal eden "microarray" (mikrodizilim) teknolojisi ise maddi yükünün büyük olmasına karşın, gerçek zamanlı olarak binlerce sekansı aynı anda analiz etme avantajı vermektedir. Tüm bu tekniklerin getirdiği avantajlarına rağmen sayımsal RT-PZR'e karşı göreceli olarak düşük duyarlılıkta kalmaları transkripsiyon sayımında ilk tercih olarak bu teknolojiyi ön plana çıkarmaktadır. Gen anlatımını ölçmede son 20 yıldır kullanılan klasik RT-PZR'de duyarlılık alanını arttırmak için "iki basamaklı"

hatta "üç basamaklı-nested" RT-PZR yaklaşımı da kullanılmakta fakat buna bağlı olarak da reaksiyonun spesifikliğindeki azalmadan yakınılmaktadır.^{5,6} Sonuç olarak sayımsal RT-PZR'nin son yıllarda konvansiyonel ve modern birçok yöntemle karşı yıldızı giderek parlamaktadır. 'Gelecek dönem, genetik camiasının sayımsal RT-PZR teknolojisinin standardizasyonu ve mikroarray teknolojisiyle olan koordinasyonu uğraşacağı bir dönem olacak' denilmektedir.⁷

Güncel Kullanımda En Sık Karşılaşılan Sayımsal RT-PZR Sistemleri Nelerdir?

Bugün için yaygın olarak kullanımda olan üç ayrı sistem piyasada mevcuttur. Bunlardan ilki olan ABI Prism 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, USA) 96 delikli bir termal ısıtıcı içerir ve 500 nm-660 nm floresan aralığını ölçebilme kapasitesindedir. Genelde 2 saatlik bir ölçüm zamanı içinde sonuç verebilme ve fazla sayıda örneği aynı anda analiz edebilme özelliğine karşın tam olarak "RT" yöntemi olduğunu söylemek zordur çünkü RT-PZR analizi ancak amplifikasyon süreci sonunda yapılabilmektedir. Fakat örneğin LightCycler (Roche Molecular Biochemicals-Mannheim, Germany)'da kullanılan kırılğan cam tüplere göre ince duvarlı plastik tüpler kullanılması da bir başka avantajdır. Sistem bu tüplere eklenmiş bir kamera yardımıyla floresanı algılamaktadır. Piyasada yaygın olarak kullanılan ikinci yöntem LightCycler, sıcak hava akımıyla ısınan bir kapalı sistemdir. Performans olarak hem duyarlılığı hem özgüllüğü ABI Prism 7700 sistemine eşit olarak bildirilmiştir.⁸

LightCycler 20 dk.'ya kadar inebilen RT-PZR olanağına karşın yalnızca 32 reaksiyon gerçekleştirebilen bir sistemdir. Üç foto saptama ucuyla farklı dalga boylarına yayılabilen bir görsellik avantajı vardır ve PZR döngülerinin her biri sonunda ekrana bilgi yansımalarıyla tam bir "RT" yöntemidir.

Sisteme daha sonradan katılan BioRad Instruments'ın i-cycler adlı yöntemiye bir 'thermal-cycler' cihazını optik bir modüle bağlayan, hem ABI 7700 hem de LightCycler'dan daha geniş bir dalga boyunda saptama yapabile

avantajına sahiptir. Ayrıca dört ayrı floresan bildircisiyle alternatif RT-PZR seçeneklerine imkan sağlar. Üstelik 96 örneği ABI 7700'deki gibi gerçek zamanlı değil ardışık olarak tarayabilme imkanı da sağlamaktadır. Her üç cihaz da kullanıcılarının elinde başarıyla uygulanmaktadır.

Ayrıca kullanımda SmartCycler, Rotor-gene gibi başka markalarda olup her geçen gün bunlara yenileri de eklenmektedir.

Sayımsal RT-PZR Yöntemi Nasıl Uygulanır?

Örneklerin hazırlanması

Kantitasyondaki ana hedef, gen anlatımının ölçülmesi olduğunda sayımsal PZR yöntemi, mRNA üzerinden gerçekleştirilir. RNA, her türlü dokudan elde edilmekle birlikte hematolojide kullanımı en kolay materyaller kan ya da kemik iliğidir. Kan/kemik iliği materyalinden beyaz hücreler ayrıştırılır. Daha sonra çeşitli yöntemlerle total RNA elde edilir. Total RNA elde edilirken kullanılan yöntemlerde genellikle DNA bulaşığı saptanır. İki farklı örnek arasında gözlenen farklı değerler, örneklerin DNA bulaşıklık seviyeleri arasındaki farklılıktan kaynaklanabilir. Bu nedenle elde edilen total RNA örnekleri DNase enzimi ile muamele edilerek DNA bulaşımı giderilmelidir. DNase enziminin cDNA sentezi öncesi ortamdan uzaklaştırılması da reaksiyon özgüllüğü açısından önemlidir. Elde edilen RNA'nın kalitesi agaroz jel elektroforezi ile konsantrasyonu ise UV spektrofotometresiyle tespit edilebilir. Kantitasyonun başarılı olması kullanılan en çok RNA'nın kalitesine bağlıdır.

Kantitasyon işlemi genellikle DNase enzimi ile işlemiş 1 µg total RNA üzerinden sentezlenen cDNA ile gerçekleştirilir. cDNA sentezi için Ters Transkriptaz PZR yöntemi kullanılır. Bu yöntemde özgün primerler ve 'Revers Transkriptaz' enzimi kullanılarak total RNA'dan cDNA elde edilir.

PZR aşaması

Kantitasyonda anlatım miktarı belirlenmek istenen örnekler, içerdiği cDNA miktarı bilinen standartlarla PZR sonunda karşılaştırılır. Bu

standartlar genellikle 10'lu dilüsyonlar halinde hazırlanır ve amplifikasyonları, her dokuda aynı düzeyde anlatıma girdiği bilinen genlerle ('housekeeping gen'ler) gerçekleştirilir. Dış kontrol olarak da adlandırılan bu standart örneklerin eşik değerine girdikleri döngü PZR aleti tarafından saptanır. Bu döngü, ortam kirliliğinden kaynaklanan floresan sinyalinin üstünde bir floresan sinyalin alındığı döngüdür. Reaksiyon sonunda, standartların eşik değerleri belirlenerek bir eğri oluşturulur. Miktarları bilinmeyen örneklerin bu eğriyi kestiği döngüler belirlenerek miktar sayımı yapılabilir.

Eğer yapılacak olan göreceli gen sayımı ise, çalışılacak her örnek için iki farklı karışım hazırlanır. Karışımlardan ilki "house keeping gen" adı verilen anlatımı sabit gen primerlerini içerirken, ikincisi anlatımı ölçülecek gene ait primerleri içerir. Yani tüm örnekler hem incelenen genle hem de 'housekeeping gen'le amplifiye edilir. Bu ikinci örnek iç kontrol olarak da adlandırılmaktadır. PZR sonunda araştırılan genin değeri, iç kontrol genin değerine oranlanarak ölçülür ve normalize edilir.

Kişisel deneylerimizde yararlandığımız SYBR Green I boyası floresan ışığı saptamak için en sık kullanılan boyadır.⁹⁻¹¹ SYBR Green I dışında işaretli problemlerden de yararlanılabilir. Bu daha masraflı bir yaklaşımdır. SYBR Green I, çift iplikli DNA'ya bağlanır. Ortamdaki çift iplikli DNA sayısı arttıkça, yani amplifiye olan cDNA miktarı arttıkça elde edilen floresan miktarı da artacaktır.

PZR sonucu elde edilen ürünlerin gerçek PZR ürünü olup olmadığı "erime eğrisi" yöntemi ile kontrol edilmelidir. Erime ısısı (T_m), bir amplifikasyon ürünü genin %50'sinin denatüre olduğu sıcaklık değeridir ve bu değer genin dizisine ve %GC oranına bağlı olarak farklılık gösterir. Erime eğrisi yöntemi de bu özellikten yararlanarak, PZR sonunda elde edilen amplifikasyon eğrilerinin gen ürünü mü yoksa primer dimer ya da ortam kirliliğine bağlı bir eğri olup olmadığını belirler.

Sayımsal RT-PZR Uygulamasında Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar Nelerdir?

Sayımsal RT-PZR uygulamaları tekniğin aşırı duyarlılığından dolayı aynı zamanda çok risklidir. Elde edilen sonuçları güvenilir kılabilmek için gerek kendi deneyimlerimizden gerek başka uygulamalardan sonuçlar çıkardık.⁹⁻¹¹ Şu düzenlemelerin yapılması önemlidir.

a) Hedef bölge uzunluklarının düzenlenmesi: ABI Prism 7700 ile 400 bp'e kadar varan kopyalar elde edilebildiği bildirilmesine karşın RT-PZR'de optimal hedef uzunluğunun 100 bp'den daha kısa olması hedeflenir ve 80 bp civarına düşmesi arzu edilir.¹² Bunun nedeni, 92-95°C arasına düşen denatürasyon aralığını gerek primer gerek problarla yakalayabilme arzudur.

b) Primer düzenlenmesi: İyi düzenlenmiş primerler doğru bölgelere bağlanarak amplifikasyon ya da genomik DNA kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları önleyebilir. İdeal bir amplifikasyon için, primer seçimi Tm sonucuna bakılarak yapılmalıdır ve primer boyları birbirine yakın olmalıdır. Genomda hedeflenenden başka bölgelere uyumlu olup olmadığının türler arasında da kontrol edilmesi önemlidir. Bu nedenle primer düzenlenmesi için hazırlanmış çeşitli bilgisayar programları kullanılmaktadır ki bunların bir bölümünü sistem üretici firmalar da sağlamaktadır. Genel olarak tek zincirli primerler 15-20 baz uzunluğunda ve G/C içerikleri arasındaki fark %20-%70 arasında olmalıdır. Tm dereceleri 1-2°C'den fazla olmamalı ve maksimum Tm 58-60°C olmalıdır.

Primerler konsantrasyon olarak genelde 50-200 nM arasında ortamda bulunur ve daha fazla ya da daha düşük konsantrasyonlar nonspesifik ürünler veya hedef kopya sayısında göreceli düşüklükle analizlerde zorluğa yol açabilir. Ayrıca 3' ucundaki son 5 bazda G-C bazlarının sayısını bir ya da ikiden fazla olmayacak şekilde biçimlendirmek de faydalıdır. Böylece DNA polimerazın non-spesifik uzantılandırılmalarının

önüne geçilebilir.

c) Sayımsal RT-PZR'de eşik değerlerin ve dış standart eğrilerinin düzenlenmesi: Floresan bazlı RT-PZR'de eşikler, doğru ve yenilenebilir kantifikasyon yapmada en önemli noktalardır.¹³ RT-PZR'de floresan değerler her döngü sonunda ölçülerek kopyalanıp ürün miktarı hakkında bilgi edinilmektedir. Fakat başlangıçtaki ortam kirliliğinin yarattığı sinyal karmaşasını devredışı bırakarak ölçmek için eşik noktasının tayini çok önemlidir.

Bir diğer önemli nokta da standart eğrilerinin doğru düzenlenmesidir. Bu amaçla 'göreceli' ya da 'saf' kantifikasyon yaklaşımlarından birini seçmek mümkündür. Başlangıç ve dolayısıyla sonuç miktarını bildiğimiz standartlar çeşitli seyreltiler halinde reaksiyona konulur. Amplifikasyon sonucu ortaya çıkan matematik eğri sayesinde diğer ürünlerimizin de matematik kantifikasyonu mümkün olacaktır.

'Göreceli kantifikasyon'da bilinen bir amplikonun varlığında bir nükleik asidin kalibratör olarak kullanılışı söz konusudur. Elde edilen sonuç bu bilinen amplikonla kıyaslanarak hesaplanır. Başka bir deyişle hedef genin eşik değerini aşan kopyaları kalibratör genin eşik değerini aşan kopyalarıyla deney sonunda kıyaslanır. 'Saf kantifikasyon'daysa hücre tam sayısı ölçülmektedir ve bu nedenle saf standart eğri konsantrasyonlarının ölçümü her bir amplikonun içerdiği hücre sayısını anlamak için önemlidir.

d) Sayımsal RT-PZR sonuçlarının normalizasyonu: RT-PZR'de mRNA kantifikasyonuna ait yanlışlıklar başlangıç materyaline ait küçük farklılıkların amplifikasyon üründe katlanarak yansımından da kaynaklanabilir. Bu durum özellikle farklı bireylerden alınan örneklerle başlanan reaksiyonlarda izlenir. Bir iç kontrol kullanılarak bu başlangıç farklılıklarını standardize etmek ve elde edilen sonucun normalizasyonu bu yüzden çok faydalıdır. İdeal bir iç kontrol (ya da genel tanımıyla internal standart) farklı doku ve organizmalarda belli bir biçimde anlatıma girmeli ve terapilerden

etkilenmemelidir. Bu amaçla kullanılan 'housekeeping gen'ler ökaryotlarda çok çeşitli olmakla birlikte en ünlüleri GAPDH, β actin ve rRNA'dırlar. Oysa özellikle hematolojide bu genlerin kararlı davranışları hakkında önemli kuşku oluşmuştur. GAPDH yıllardır önerilmekle birlikte buna ciddi itirazlar da gelmiştir.^{14,15} β actin ise daha eski ve çok kullanılmış bir internal standarttır.¹⁶ Ama β actin'in mRNA'sının kolaylıkla bulaşık DNA'yı da amplifiye ettiği bildirilmiştir.¹⁷ Ribozomal RNA'lar ise özellikle insan çalışmalarında daha güvenilir olmakla birlikte biyolojik faktörlerden etkilenebildiği de rapor edilmiştir.^{18,19} Son zamanlarda özellikle hematolojide $\beta 2$ mikroglobulin ve ABL genleri üzerinde bir uzlaşmaya varılmış ve internal housekeeping kullanımında yalnızca bu genlerin kullanılması biçiminde bir ortak düşünceye ulaşılabilmektedir.²⁰

Sayımsal RT-PZR

Teknolojisinin Hematolojide Kullanımı

Özellikle son 2 yılda hematolojide bir patlama biçiminde genişleyen hematolojik gen kantifikasyonlarını birkaç başlık altında sınıflandırmak gerekirse:

Minimal rezidüel hastalıklar

Sayımsal RT-PZR yardımıyla minimal rezidüel hastalıklarla bağlantılı özgün gen düzeylerinin saptanması lösemi kliniklerine büyük bir katkı sağlayacak potansiyelindedir. Bu amaçla düzeyleri saptanan BCR/ABL, AML1/MTG8, PML/RARalpha, CBFbeta/MYH11, TEL/AML1, E2A/PBX1, MLL/AF4, MLL/AF9 gibi birçok gen mevcuttur.

Farklı merkezlerde yapılan birçok gene ait düzey saptama çalışmasını bir ağ üzerinden ilişkilendirerek yöntemin standardizasyonu ve tedavi protokollerinin güncellenmesi amaçlanmaktadır.²¹ Sayımsal RT-PZR'le ilgili karşılaştırmalı çalışmalar gerek klasik RT-PZR gerek FISH yöntemine göre minimal rezidüel hastalık takibinde bu teknolojinin üstünlüğünü kanıtlamaktadır.²² Özellikle kronik miyelositik

lösemilerde minimal rezidüel hastalık takibinde p210 ve p190 proteinlerini kodlayan mRNA BCR/ABL düzeylerinin bu yöntemle kantifikasyonu %100 spesiflik ve %0.0001 düzeylerine varan duyarlılık alanı içinde mümkün olabilmektedir.²³⁻²⁵ BCR/ABL düzeylerinin bu yöntemle takibindeki yararlar AML'de de tanımlanmıştır.²⁶ Allojenik kemik iliği transplantasyonu hastalarda da remisyon izlemede rutin kemik iliği takip işlemlerinde bu yüzden göz dolduran bir teknolojidir.²⁷ Minimal rezidüel hastalık takibinde AML1/ETO t(8;21)(q22;q22) füzyonuna denk gelen bileşik ürünün saptanması söz konusu olmaktadır.²⁸ Sayımsal RT-PZR kullanımı, ALL'ye ait minimal rezidüel hastalık takibinde de dikkat çekicidir.²⁹

PML/RARalpha

Akut promiyelositik lösemi (APL) 15. kromozomdaki (PML) ve 17. kromozomdaki (RARalpha) genleri arasında bir translokasyonla karakterizedir. Sayımsal RT-PZR yardımıyla, bu füzyona ait mRNA'sının saptanması APL'nin tanısında (ATRA ve Arsenik gibi tedavi edici ajanlara olan yanıtın ölçülmesinde, minimal rezidüel hastalık takibinde ve relapsların belirlenmesinde güvenli ve hızlı bir yardımcıdır.^{30,31} Ayrıca APL hastalarının prognozunda ve risk ölçümünde faydalılığını gösteren çok geniş ölçekli çalışmalar da bulunmaktadır.³²

Wilms tümör geni (WT1)

WT1 geninin kantifikasyonu birçok ekip tarafından başarıyla uygulanmıştır.^{33,34} Özellikle AML'de anlatımı izlenen bir pan-lösemik belirteç olarak anılmaktadır ve KML'de terapiye yanıt ölçümünde de kantifiye edilmektedir.^{35,36} Çalışmalar sonucunda bu genin anlatımının AML'de çok düşük düzeylerde izlenmesinin iyi prognoz belirtisi olduğu anlaşılmaktadır.³⁷ MDS'ye ait risk ölçümünde güvenli bir belirteç olarak anılmaktadır.³⁶

Apoptozis

Sayımsal RT-PZR yardımıyla apoptozis

kantifikasyonu da apoptozisin şu ana dek proteinden saptanıyor olmasına karşı getirilen önemli bir gelişmedir. Gerek bcl2, bax, dapk1, myc, bad, WT1, mcl1 gibi genlere ait ekspresyon analizleri gerek başka ekiplerce yapılan RNA Y1 (hY1) gen kantifikasyonu bu amaçla uygulanan başarılı çalışmalardandır.³⁸

İmmünglobulin (Ig) ve T-cell reseptör (TCR) genleri

Rutine yönelik uygulamalar içinde özellikle ALL takibinde klonal spesifik Ig ve TCR genine ait uygulamalar dikkati çekmektedir ve rutindeki uygulamasıyla sonuçların doğruluğundaki korelasyondan övgüyle söz edilmektedir.³⁹ Özellikle konvansiyonel PZR işlemlerine göre PZR sonrası basamakların olmaması ve tanısal duyarlılık nedeniyle sayımsal PZR bir tercih sebebidir.⁴⁰ Yine benzer şekilde Ig ağır zincir CDRIII bölgelerinin kantifikasyonu ile B hücreli-KLL takibinde çok elverişli bir yöntem kavuşulduğu söylenmektedir.⁴¹ Bu ölçümlerin 5 x 10 normal hücre arasında tek bir tümör hücreyi bile saptayabilmek relapslarda çok erken tanı olanağı verdiği söylenmektedir.^{4,42}

Sayımsal PZR yöntemiyle hematolojide incelenen diğer genler

Yöntemin hızlı gelişimi nedeniyle bu genlerin tümünü sıralamak olanaksızdır. Ancak bazı ilgi çeken çalışmalara değinmek gerekirse; AML'de mutasyon taramasına örnek olarak bu hastalarda %7 oranında izlenen "CCAAT/enhancer binding protein (CEBPA)" genine yönelik taramalar gösterilebilir ki bu teknoloji sayesinde iyi-risk atfedilen bir AML alt grubunun takibi mümkün olacaktır denilmektedir.⁴³ Lösemideki kritik rolü yeni tanımlanmış olan HOX genine ait anlatım analizleri de dikkat çekmektedir. Bu gen grubu muhtemelen önümüzdeki dönemde çok çalışılan ve incelenen bir grup olacaktır.⁴⁴

"Multidrug resistance protein 1 (MDR1)" geni AML'deki tedavi şemalarını önemli ölçüde etkileyen bir moleküldür ve başarıyla kantifikasyonunun prognostik önemi büyüktür.⁴⁵ CDK molekülleri ve özellikle cyclin D1 gibi hücre siklusunda önemli rol oynayan moleküllerin

düzeylerinin ölçülmesi kanserleşme mekanizmaları açısından da önemlidir.⁴⁶ Ayrıca çeşitli hematopoetik malignansilerde lymphotoxin beta gibi genlerin kantifikasyonu tanı ve tedavide hızlı-etkin-güvenilir sonuçlara gidilmektedir.⁴⁷

İnfant AML olgularında sık izlenen MLL genine ait yeniden düzenlenmelerin de bu yöntemle tayini tedaviye yönelik yeni katkılar sağlamaktadır.⁴⁸

Sonuç

Sayımsal RT-PZR yeni bir teknoloji olmasına rağmen getirdiği üstünlükler nedeniyle kullanımı hızla yaygınlaşmaktadır. Mutasyon ve translokasyonların tanısına hız ve yüksek duyarlılık getirmektedir. Gen anlatım analizinde kullanılan ilk seçenek haline gelmesi dikkat çekicidir. Hematolojide güvenle kullanılacak 'housekeeping gen'lerinin tanımlanmış olması ve son yıllarda edinilen zengin deneyim önemli bir avantajdır.

KAYNAKLAR

1. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002;30(6):503-12.
2. Ramachandran C, Melnick SJ. Multidrug resistance in human tumors-molecular diagnosis and clinical significance. *Mol Diagn* 1999;4(2):81-94.
3. Desjardin LE, Perkins MD, Wolski K, et al. Measurement of sputum Mycobacterium tuberculosis messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(1):203-10.
4. Bustin SA, Dorudi S. Molecular assessment of tumour stage and disease recurrence using PCR-based assays. *Mol Med Today* 1998;4(9):389-96.
5. Funaki NO, Tanaka J, Itami A, et al. Detection of colorectal carcinoma cells in circulating peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction targeting cytokeratin-20 mRNA. *Life Sci* 1997;60(9):643-52.
6. Funaki NO, Tanaka J, Ohshio G, Onodera H, Maetani S, Imamura M. Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* 1998; 77(8):1327-32.
7. Jaeger U, Kainz B. Monitoring minimal residual disease in AML: The right time for real time. *Ann Hematol* 2003; 82(3):139-47
8. Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA, Landt O, Siegert W. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clin Chem* 1999;45(11):1932-7.
9. Savlı H, Aalto Y, Nagy B, Knuutila S, Pakkala S. Gene expression analysis of 1,25(OH)2D3 dependent

- differentiation of HL-60 cells-a cDNA array study. *Br J Haematol* 2002;118:1065-72.
10. Savli H, Karadenizli A, Kolayli F, Gundes S, Ozbek U, Vahaboglu H. Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *J Med Microbiol* 2003;52:403-8.
 11. Esen N, Savli H. Stimulated microglia supernatants induced over-expression of neuronal nitric oxide gene in astrocytes. *Intern J Neurosci* 2003;113:1069-79.
 12. Bustin SA, Gyselman VG, Williams NS, Dorudi S. Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 1999;79(11-12):1813-20.
 13. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993;11(9):1026-30.
 14. Edwards DR, Denhardt DT. A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. *Exp Cell Res* 1985;157(1):127-43.
 15. Oliveira JG, Prados RZ, Guedes AC, Ferreira PC, Kroon EG. The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is inappropriate as internal control in comparative studies between skin tissue and cultured skin fibroblasts using Northern blot analysis. *Arch Dermatol Res* 1999;291(12):659-61.
 16. Kreuzer KA, Lass U, Landt O, et al. Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. *Clin Chem* 1999;45(2):297-300.
 17. Desprez PY, Poujol D, Saez S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, E.C. 1.2.1.12.) gene expression in two malignant human mammary epithelial cell lines: BT-20 and MCF-7. Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25-(OH)2D3). *Cancer Lett* 1992;64(3):219-24.
 18. Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259(3):523-6.
 19. Spanakis E. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res* 1993;21(16):3809-19.
 20. Lion T. Current recommendations for positive controls in RT-PCR assays. *Leukemia* 2001;15:1033-7.
 21. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17(6):1013-34.
 22. Kim YJ, Kim DW, Lee S, et al. Comprehensive comparison of FISH, RT-PCR, and RQ-PCR for monitoring the BCR-ABL gene after hematopoietic stem cell transplantation in CML. *Eur J Haematol* 2002;68(5):272-80.
 23. Jones CD, Yeung C, Zehnder JL. Comprehensive validation of a real-time quantitative bcr-abl assay for clinical laboratory use. *Am J Clin Pathol* 2003;120(1):42-8.
 24. Elmaagacli AH, Beelen DW, Opalka B, Seeber S, Schaefer UW. The amount of BCR-ABL fusion transcripts detected by the real-time quantitative polymerase chain reaction method in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia correlates with the disease stage. *Ann Hematol* 2000;79(8):424-31.
 25. Wang L, Pearson K, Pillitteri L, Ferguson JE, Clark RE. Serial monitoring of BCR-ABL by peripheral blood real-time polymerase chain reaction predicts the marrow cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2002;118(3):771-7.
 26. Nashed AL, Rao KW, Gulley ML. Clinical applications of BCR-ABL molecular testing in acute leukemia. *J Mol Diagn* 2003;5(2):63-72.
 27. Lee S, Kim DW, Cho B, et al. Risk factors for adults with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia in remission treated with allogeneic bone marrow transplantation: The potential of real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 2003;120(1):145-53.
 28. Viehmann S, Teigler-Schlegel A, Bruch J, Langebrake C, Reinhardt D, Harbott J. Monitoring of minimal residual disease (MRD) by real-time quantitative reverse transcription PCR (RQ-RT-PCR) in childhood acute myeloid leukemia with AML1/ETO rearrangement. *Leukemia* 2003;17(6):1130-6.
 29. Eckert C, Landt O, Taube T, et al. Potential of LightCycler technology for quantification of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000;14(2):316-23.
 30. Jurcic JG. Monitoring PML-RARalpha in acute promyelocytic leukemia. *Curr Oncol Rep* 2003;5(5):391-8.
 31. Choppa PC, Gomez J, Vall HG, Owens M, Rappaport H, Lopategui JR. A novel method for the detection, quantitation, and breakpoint cluster region determination of t(15;17) fusion transcripts using a one-step real-time multiplex RT-PCR. *Am J Clin Pathol* 2003;119(1):137-44.
 32. Gallagher RE, Yeap BY, Bi W, et al. Quantitative real-time RT-PCR analysis of PML-RAR alpha mRNA in acute promyelocytic leukemia: Assessment of prognostic significance in adult patients from intergroup protocol 0129. *Blood* 2003;101(7):2521-8.
 33. Van Dijk JP, Knops GH, Van De Locht LT, et al. Abnormal WT1 expression in the CD34-negative compartment in myelodysplastic bone marrow. *Br J Haematol* 2002;118(4):1027-33.
 34. Dumur CI, Dechsukhum C, Wilkinson DS, Garrett CT, Ware JL, Ferreira-Gonzalez A. Analytical validation of a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction quantitation of different transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Anal Biochem* 2002;309(1):127-36.

35. Menssen HD, Siehl JM, Thiel E. Wilms tumor gene (WT1) expression as a panleukemic marker. *Int J Hematol* 2002;76(2):103-9.
36. Cilloni D, Saglio G. Usefulness of quantitative assessment of Wilms tumor suppressor gene expression in chronic myeloid leukemia patients undergoing imatinib therapy. *Semin Hematol* 2003;40(2 Suppl 2):37-41.
37. Trka J, Kalinova M, Hrusak O, et al. Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: Prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia* 2002;16(7):1381-9.
38. Asselbergs FA, Widmer R. Rapid detection of apoptosis through real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction measurement of the small cytoplasmic RNA Y1. *Anal Biochem* 2003;318(2):221-9.
39. Li AH, Forestier E, Rosenquist R, Roos G. Minimal residual disease quantification in childhood acute lymphoblastic leukemia by real-time polymerase chain reaction using the SYBR green dye. *Exp Hematol* 2002;30(10):1170.
40. Nakao M, Janssen JW, Flohr T, Bartram CR. Rapid and reliable quantification of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using rearranged immunoglobulin and T-cell receptor loci by LightCycler technology. *Cancer Res* 2000;60(12):3281-9.
41. Pfitzner T, Engert A, Wittor H, et al. A real-time PCR assay for the quantification of residual malignant cells in B cell chronic lymphatic leukemia. *Leukemia* 2000;14(4):754-66.
42. Donovan JW, Ladetto M, Zou G, et al. Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;95(8):2651-8.
43. Van Waalwijk Van Doorn, Khosravani SB, Erpelinck C, et al. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J* 2003;4(1):31-40.
44. Thompson A, Quinn MF, Grimwade D, et al. Global down-regulation of HOX gene expression in PML-RARalpha + acute promyelocytic leukemia identified by small-array real-time PCR. *Blood* 2003;101(4):1558-65.
45. Olesen LH, Norgaard JM, Pallisgaard N, Bukh A, Hokland P. Validation and clinical implication of a quantitative real-time PCR determination of MDR1 gene expression: Comparison with semi-quantitative PCR in 101 patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2003;70(5):296-303.
46. Specht K, Kremer M, Muller U, et al. Identification of cyclin D1 mRNA overexpression in B-cell neoplasias by real-time reverse transcription-PCR of microdissected paraffin sections. *Clin Cancer Res* 2002;8(9):2902-11.
47. Nagy B, Ferrer A, Larramendy ML, et al. Lymphotoxin b expression is high in chronic lymphocytic leukemia but low in small lymphocytic lymphoma: Quantitative real-time RT-PCR analysis on hematologic malignancies. *Haematologica* 2003;88(6):654-8.
48. Ishii E, Kawasaki H, Isoyama K, Eguchi-Ishimae M, Eguchi M. Recent advances in the treatment of infant acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003;44(5):741-8.