

Hematoloji’de Mikroarray Kullanımı

Dr. Cemaliye BOYLU-AKYERLİ

Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ankara

Mikroarray’ler (mikroçipler, mikrodizilimler), birçok biyolojik sistemde olduğu gibi, hematolojide de yüksek çıktılı gen ifade incelemeleri için rutin araç olmaya yönelik bir teknolojidir. Bu yöntemle, aynı anda pek çok genin ifadesi ile ilgili bilgi almak mümkündür.

Çok sayıda DNA molekülünün lamalar ya da naylon membranlar üzerine noktalanması ile mikroarray’ler oluşturulur. Kullanım alanları, gen ifade profillerinin araştırılması, mutasyon taraması ve analizi, genotipleme (örneğin; ökaryot, mikroorganizma, virüs), genlerin ve klonların haritalanması, mikrodelyasyon ve kromozomal aberasyonların tespiti olarak sıralanabilir. Mikroarray’lerin en önemli avantajları, aynı anda birçok gen ile ilgili bilgi alınması, hızlı sonuç elde edilmesi, az sayıda deney yapılması, güvenilir olması ve sistem kurulduktan sonra ucuz olmasıdır.

cDNA mikroarray sisteminde ilk basamak noktalanacak DNA’nın hazırlanması ve cam lamalar üzerine robotik olarak yerleştirilmesi, kısaca çip sentezidir. Öncelikle tanımlanmış cDNA kütüphanesine gerek duyulur. İlgili geni içeren bakterinin çoğaltılması, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kalıbının hazırlanması, özgün primerlerle PCR yapılması ve bu PCR’ların pürifikasyonu, noktalamak için cDNA’ların ve lamaların (poly L-lysine kaplama) hazırlanması söz konusudur. Daha sonra hasta ve kontrol örneklerinden RNA izole edilip çoğaltılır. Prob (tanımlayıcı) hazırlanması için farklı floresan boyalar (Cy3/Cy5) kullanılarak kontrol ve hasta örneklerinden işaretli cDNA sentezlenir. Hibridizasyon (melezleme) sonrasında çipler yıkanır ve uygun tarayıcılarla taranır. Son olarak, mikroarray’lerin en zor ve en önemli kısmı

olan veri analizi yapılır. Elbette, el emeği göz nuru olan bu sistemi kurmak ve kullanmak çok kolay değildir. Günümüzde ticari olan mikroarray’ler (Affymetrix) mevcuttur. Oligonükleotid mikroarray’ler olarak bilinen bu sistemde hasta örneğinden elde edilen RNA kontrol örnekle karşılaştırılmaya gerek duyulmadan tek başına kullanılır. Biotin işaretli cDNA sentezlendikten sonra küçük parçalara ayrılır. Hibridizasyonun ardından streptavidin-PE ile boyanan mikroarray laser tarayıcısı ile tarandıktan sonra bilgisayarda veri analizi için incelemeye alınır.

Hematolojik malignitelerin tanısı ve hastaların uygun tedavisi için çeşitli kromozomal translokasyonlar uzun zamandır kullanılmaktadır. Mikroarray’ler bu alanda yeni bir sayfa açmıştır. Moleküler tanının doğru olarak yapılmasında yaygın olarak kullanılmaya adaydılar. Aynı zamanda, tümör gelişiminde hangi genlerin ve biyolojik olayların sorumlu olabileceğini gösterebilmektedirler.

Mikroarray’ler kullanılarak yapılan gen ifade profili çalışmaları, hematolojik malignitelerin altında yatan bazı olayları anlamamıza yardımcı olmuştur. İlk çalışmalardan birinde, ‘Gen ifade profilleri ile kanser sınıflandırılması yapılabilir mi?’ sorusuna cevap aranmıştır. Sonuç olarak, ön bilgi olmadan akut miyelositer lösemi (AML) ve akut lenfositik lösemi (ALL) sınıflandırılmıştır (1). Aynı zamanda yeni hastalarda sınıf tahmini doğru olarak yapılabilmektedir. Diğer bir çalışmada aynı yöntem kullanılarak moleküler olarak farklı iki tip DLBCL (Diffuse large B-cell lymphoma) tanımlanmıştır (2). Hastaların tedaviye cevabının farklı olması, tümörlerde moleküler farklılık olabileceğini düşündürmüştür. Bulunan farklılıklar,

tümör gelişiminin hızını, tedaviye cevabı ve tümörün farklılaşmış durumunu yansıtmaktadır. Bu sonuçlar klinik olarak da anlamlı bulunmuştur. Başka bir grup farklı tedavi almış DLBCL hastalarının tümörlerini incelemiştir (3). Tedaviye yanıt veren hastalar ile ölen hastalar karşılaştırıldığında gen ifade farklılıkları gözlenmiştir. Bu model klinik olarak farklı risk grubundaki hastaların ayırt edilmesinde de kullanılabilir. Shipp ve arkadaşları (3) çok farklı beş yıllık sağ kalım yüzdelere (%70-%12) sahip 58 DLBCL hastasını 13-gen modeline göre iki sınıfa ayırabilmiştir. Aynı model Alizadeh ve arkadaşlarının (2) yaptığı çalışmadaki hastalara uygulandığında aynı sonuçlar alınsa da, iki çalışma arasında bazı karışıklıklar söz konusu olmuştur. Alizadeh ve arkadaşlarının grubu yaptıkları başka bir çalışmada iki farklı deneysel platformdan (cDNA mikroarray (2) ve Affymetrix (3)) kaynaklanan sorunu çözmüşlerdir (4). Ohmine ve arkadaşları kronik, akselere ve blastik dönemdeki kronik miyelositer lösemi (KML) hastalarını incelemişler ve farklı dönemlere ait aday moleküler işaretleyiciler tanımlamışlardır (5). Böylece mikroarray'ler hastalığın ilerlemesine sebep olan moleküler olayları çözebilmemizde çok etkili olmuştur. Diğer önemli bir çalışmada, kemik iliği plazma hücreleri kullanılarak multiple miyeloma (MM) ve sağlıklı kişilerin gen ifade profilleri incelenmiştir (6). Grup analizi sonucu 120 yeni aday genin normal ve malign hücreleri ayırt ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda MM'nin dört alt grubu tanımlanmıştır. Bazı translokasyonlarla gen ifade profilleri arasında bir ilişki olduğu da ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak mikroarray'lerle yeni aday MM genleri tanımlanmış ve genlere bağlı sınıflandırma yapmak mümkün olmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda, aynı strateji ile cDNA (7) ve oligonükleotid (8) mikroarray'leri kullanılarak normal ve malign örnekler karşılaştırılmıştır. MM hakkında daha detaylı bilgi edinmemizin yanında, tedavi için yeni hedefler ön görülmüştür. Bizim grubumuzun yaptığı çalışma, klinik olarak yüksek ve düşük riskli KML gruplarını belirleyen genlerin tanımlanmasında mikroarray incelemesinin yararlı bir araç olduğunu göstermektedir (9,10). Tanı sırasında Hasford skorlaması ile yüksek, orta ve düşük riskli olarak sınıflandırılmış 67 KML hastasının periferik kanında gen ifadeleri çalışılmıştır.

Öncelikle, cDNA mikroarray'leri kullanılarak iki yüksek ve iki düşük riskli hasta karşılaştırılmış ve ifade düzeyleri farklı olan 83 adet gen tespit edilmiştir. Daha sonra, bu genlerden bazıları seçilerek yarı-nicel ve gerçek-zamanlı ters yazımlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yapılmış ve sonuçların cDNA mikroarray'leri ile benzer olduğu gösterilmiştir. Örneğin, *IFITM1* (interferon induced transmembrane protein 1) geni düşük risk grubunda daha fazla ifade edilmektedir. Bu sonuç, düşük riskli hastaların interferon alfa tedavisine neden daha iyi yanıt verdiğini açıklamaya yardımcı olmuştur. Ayrıca bazı genlerin ifade profillerinin artması veya azalması sağ kalımla ilişkili bulunmuştur. Sonuçlarımız, gen ifade profillerinin risk gruplarının tanımlanmasında kullanılabilirliğini göstermektedir. Ayrıca klinik bir skorlama ile gen profili arasındaki anlamlı ilişki, KML hücre kinetiğini daha iyi anlamamızı sağlayacaktır.

Özetleyecek olursak, hematolojik malignitelerin ön bilgi olmadan sınıflandırılmasında, yeni alt grupların belirlenmesinde, hastalığın tanısının doğru olarak yapılmasında, tedaviye cevabın ve hastalığın ilerlemesinin önceden belirlenmesinde ve en önemlisi tedavi için yeni hedeflerin bulunmasında mikroarray'ler büyük önem taşımaktadır (11). Bazı teknik sorunlar aşılmamış olsa da, hematolojide mikroarray'lerle farklı yaklaşımlar kullanılarak önemli çalışmalar yapılmıştır. Ancak, yeni çalışmaların çeşitli hematolojik malignitelere özgü mikroarray'lerin oluşturulması ve geliştirilmesi için yönlendirilmesi gerekmektedir. Şüphesiz, pahalı olan bu teknoloji, daha basit ve daha ucuz sistemlerin oluşturulmasında öncü olacaktır.

Kaynaklar

1. Golub TR ve ark. (1999) Science 286: 531-537
2. Alizadeh AA ve ark. (2000) Nature 403: 503-511
3. Shipp MA ve ark. (2002) Nature Medicine 8: 68-74
4. Wright G ve ark. (2003) PNAS 100: 9991-9996
5. Ohmine K ve ark. (2001) Oncogene 20: 8249-8257
6. Zhan F ve ark. (2002) Blood 99: 1745-1757
7. Claudio JO ve ark. (2002) Blood 100: 2175-2186
8. De Vos J ve ark. (2002) Oncogene 21: 6848-6857
9. Akyerli CB ve ark. (2002) Blood 100: 365a
10. Akyerli CB ve ark. (2005) Leukemia Research 29: 283-286
11. Margalit O ve ark. (2005) Blood Reviews (baskıda)