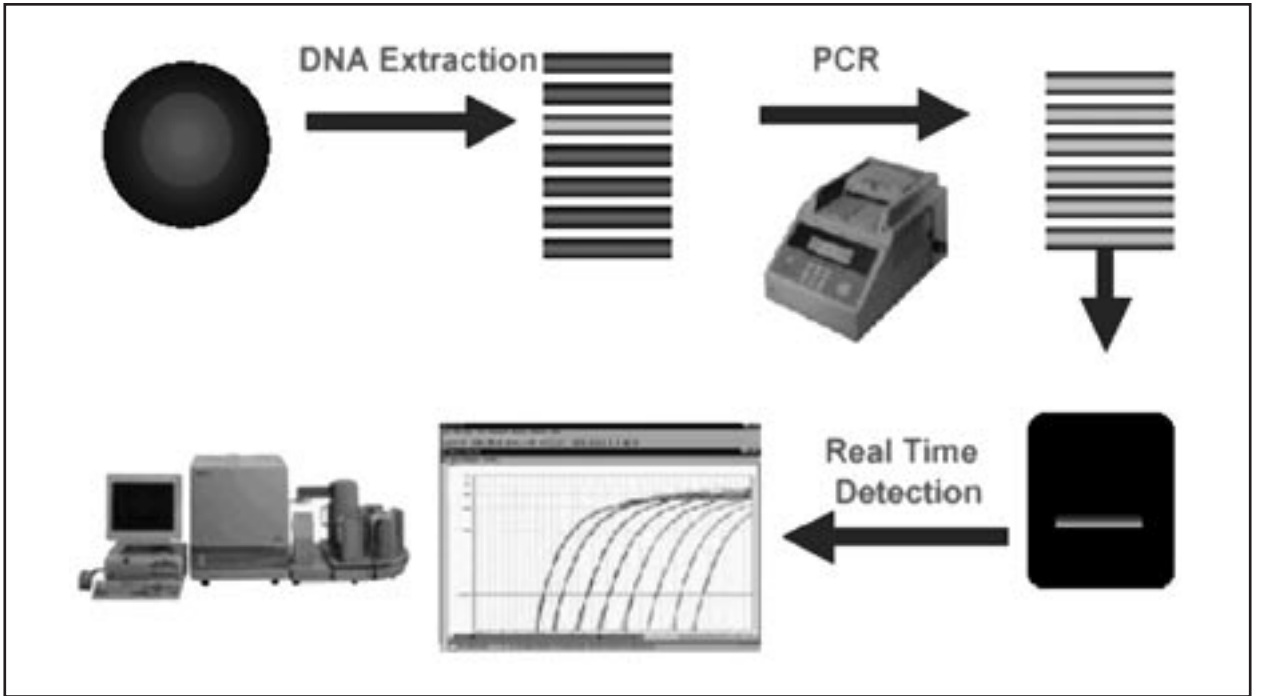


Hematoloji’de Real Time PCR

Dr. Müge AYDIN-SAYITOĞLU

İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul



“Real Time PCR” Nedir?

1988 yılında “thermus aquaticus” bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte polimeraz zincir reaksiyonları için (PCR) otomatize termal siklus cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. Floresan ışımaya tekniklerinin de kullanıma girmesiyle kinetik revers transkriptaz-PCR (RT-PCR)’da bir devrim yaşanmaktadır. Bu sayede tümör hücrelerinin ilaç dirençlerinden kemoterapi taramalarına ve tümör evrelerinin moleküler saptanmasına kadar uzanan bir çok farklı alanda gen anlatımını sayısal bir değer olarak ölçmek mümkün olmaktadır.

Bu gelişim sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek ‘Real Time’ (eşzamanlı) olarak reaksiyonun gidişine müdahale etmek ve PCR döngülerinin sayısı ile oynayabilmek de mümkündür. Birçok adlandırmayla anılan bu teknolojiye floresan okuma yapması nedeniyle yabancı yayınlarda Floresan Kantitatif RT-PCR, Kantitatif-kinetik PCR gibi çeşitli adlar altında rastlamak mümkündür.

Bugün piyasada yaygın olarak kullanılan 3 sistem mevcut;

- ABI Prism 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, USA) 96 delikli bir termal ısıtıcı içerir ve 500nm-660nm 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 “eş-zamanlı” yöntemi olduğunu söylemek zordur çünkü RT-PCR analizi ancak amplifikasyon süreci sonunda yapılabilmektedir. Fakat örneğin Light Cycler’da (Roche Molecular Biochemicals-Mannheim, Germany) kullanılan kırılğan cam tüplere göre ince duvarlı plastik tüpler kullanılması da bir başka avantajdır. Sistem bu tüplere konuşlandırılmış bir kamera yardımıyla floresanı algılamaktadır.
- Light Cycler, sıcak hava akımıyla ısınan bir kapalı sistemdir. Performans olarak hem duyarlılığı hem özgüllüğü ABI 7700 sistemine eşit olarak bildirilmiştir. Yirmi dakikaya kadar inebilen RT-PCR 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 gerçek bir “eş-zamanlı” yöntemidir.
- BioRad Instruments’ın “i-cycler” adlı yöntemiye bir thermal-cycler cihazını optik bir modüle bağlayan, hem ABI 7700 hem de Light Cycler’dan daha geniş bir dalga boyunda saptama yapabilme avantajına sahiptir. Ayrıca dört ayrı floresan bildircisiyle alternatif RT-PCR seçeneklerine imkan sağlar. Üstelik 96 örneği ABI 7700 deki gibi eş zamanlı değil ardışık olarak tarayabilme imkanı da sağlamaktadır.

Real Time-PCR’da kullanılan prob sistemleri ve boyalar

- Özgül Floresan İşaretli Problar
 - FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
 - Taqman
 - Molecular Beacons
 - Scorpion Primerleri
 - Hibridizasyon Probları
- Özgül Olmayan Floresan İşaretli Problar
 - Syber Green I
 - Etidyum Bromid

“Real Time PCR” Genel Kullanım Alanları

1. Gen ekspresyonunun kantitasyonu (**Giulietti, 2001**)
2. Viral kantitasyon (**Niesters, 2001; Mengelle, 2003**)
3. Patojenlerin tespiti (**Uhl, 2002; Mackay, 2004; Perandin, 2004**) CMV (**Kearns, 2001a; Kearns, 2001b; Kearns, 2002; Mengelle, 2003**), meningokok infeksiyonları (**Bryant, 2004**), “Streptococcus pneumoniae” penisillin duyarlılığı (**Kearns, 2002**), Mycobacterium tuberculosis ve dirençli suşlarının tespiti (**Kraus, 2001; Torres, 2003; Cleary, 2003; Hazbon, 2004**).
4. DNA hasarı (mikrosatellit instabilitesi) tespiti (**Dietmaier, 2001**)
5. Metilasyon tespiti (**Trinh, 2001; Cottrell, 2004; Lehmann & Kreipe, 2004**)
6. KİT sonrası kimerizmin izlenmesi (**Elmaagacli, 2002; Alizadeh, 2002; Thiede, 2004**)
7. KİT sonrası MRD izlenmesi (**Elmaagacli, 2002; Cilloni, 2002; Sarris, 2002; Gabert, 2003; Van der Velden, 2003**)
17. Genotipleme -melting-curve analizi (**Donohoe, 2000; Lyon, 2001; Waterfall & Cobb, 2002; Bennett, 2003; Wittwer, 2003**) spesifik prob/“beacon”(Tapp, 2000; Mhlanga, 2001; Solinas, 2001; Song, 2002; Gupta, 2004)
22. Anne kanından izole edilen tek hücrede prenatal tanı (**Hahn, 2000; Bischoff, 2002; Bischoff, 2003; Bischoff, 2002; Hwa, 2004**)
23. Hemoglobinopatilerin prenatal tanısı (**Kanavakis, 1997; Vrettou, 2003; Vrettou, 2004**)

“Real Time” PCR avantajları

1. Konvansiyonel PCR “plato fazında” yani son noktada değerlendirilebilir, real time PCR esnasında “ekponansiyel büyüme fazında” data gözlemlenebilir.
2. Floresan sinyalin gücü doğrudan çoğaltılan ürün miktarı ile orantılıdır.
3. Konvansiyonel ölçümlerden 1000 kat daha az RNA ile çalışılabilir.
4. PCR sonrası elektroforez gerektirmez.
5. İki kat artmış değişimi belirleyebilme hassasiyetindedir.

“Real Time PCR” Hematolojide Kullanımı

A. İşaretli Problar ve “Melting Curve Analizi” Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Venöz tromboza yatkınlıkta en sık karşılaşılan koagülasyon anomalisi APC direncidir. Fatör IV Leiden mutasyonu da APC direncine neden olur. Genetik çalışmalar populasyonda %85-95 bireyin APC direnci taşıdığını göstermiştir. APC direnci ya da Faktör V mutasyonu taşıyan bireylerin diğer yaygın trombofili ile örtüşen fenotiplerine de bakılmalıdır. Faktör II (G20210A) populasyonda %1-2 sıklıkta bulunur. MTHFR C677T polimorfik varyantı ailesel tromboemboli ve hiperhomosisteinemiye yatkınlık enlerinden bir diğeridir. “Real time PCR” ile işaretli problar kullanarak ve “melting curve” analizi ile çok kısa bir süre içinde Faktör V, Faktör II ve MTHFR C677T mutasyonlarının tespiti mümkündür.

Hemoglobinopatilerde gözlenen yaygın B-globin mutasyonlarının (HbS, Hb G (kodon 6)ve Hb E (kodon 26)) farklı problar kullanılarak, tek reaksiyon tüpü içinde (multipleks) tespiti mümkündür. “Real time PCR” rutinde kullanılan HPLC ve izoelektrik fokus yöntemlerine alternatif bir uygulamadır. Aynı şekilde hemokromatoz mutasyonlarının (C282Y ve H63D) tespitinde en sık kullanılan PCR-restriksiyon enzim analizine alternatif bir teknolojidir.

ALL ve AML tedavisinde karşılaşılan toksisite, ilaca direnç ve duyarlılık kavramlarına açıklık getirmek amacıyla, bu ilaçları metabolize eden enzimlerdeki polimorfizmlerin, dolayısı ile enzim aktivitelerinin araştırılması için “real time PCR” hızlı bir tarama yöntemidir. TPMT ve CYP2D6 enzim varyantlarının bu teknikle araştırılması mümkündür.

B. Gen Ekspresyon Çalışmaları

Kantitatif “real time PCR” yardımıyla minimal rezidüel hastalıklarla bağlantılı özgün gen düzeylerinin saptanması kliniklere büyük katkı sağlayacak potansiyeldedir. Bu amaçla düzeyleri ekspresyon düzeyleri saptanan BCR/ABL, AML1/MTG8, PML/RARalpha, CBFbeta/MYH11, TEL/AML1, E2A/PBX1, MLL/AF4, MLL/AF9 gibi bir çok gen mevcuttur. Kantitatif “real time PCR” ile ilgili kar-

şılaştırmalı çalışmalar gerek klasik RT-PCR gerek FISH yöntemine göre minimal rezidüel hastalık takibinde bu teknolojinin üstünlüğünü kanıtlamaktadır. Özellikle Kronik Myelositik 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. Allojenik kemik iliği transplantasyonu hastalarda da remisyon izlemede rutin kemik iliği takip işlemlerinde tercih edilmesi gereken bir teknolojidir. Akut promyelositik lösemi (APL)’nin tanısında da t(15;17) füzyon genine ait mRNA’nın saptanması (ATRA ve arsenik gibi tedavi edici ajanlara olan yanıtın ölçülmesinde, minimal rezidüel hastalık takibinde ve relapsların belirlenmesinde güvenli ve hızlı bir yardımcıdır.

AML ‘de WT1 gen ekspresyon anlatımı bir pan-lösemik belirteç olarak anılmaktadır ve KML’de terapiye yanıt ölçümünde de kantifiye edilmektedir. Çalışmalar sonucunda bu genin anlatımının AML’de çok düşük düzeylerde izlenmesinin iyi prognoz belirtisi olduğu anlaşılmaktadır. MDS’ye ait risk ölçümünde de güvenli bir belirteç olarak anılmaktadır.

Kantitatif “real time PCR” yardımıyla apoptozis kantifikasyonu da apoptozisin şu ana dek proteinden saptanıyor olmasına karşı getirilen önemli bir gelişmedir. *bcl2*, *bax*, *dapkl*, *myc*, *bad*, *wt1*, *mcl1* gibi genlere ait ekspresyon analizleri ve RNA Y1 (hY1) gen kantifikasyonu bu amaçla uygulanan başarılı çalışmalardandır.

Rutine yönelik uygulamalar içinde özellikle ALL takibinde klona spesifik immunoglobulin (Ig) ve T-cell receptor (TCR) genine ait uygulamalar dikkati çekmektedir. Özellikle konvasiyonel PCR işlemlerine göre PCR sonrası basamakların olmaması ve tanısız duyarlılık nedeniyle kantitatif PCR bir tercih sebebidir. Benzer şekilde immunoglobulin ağır CDRII ave CDRIII bölgelerini kantifikasyonu ile B hücreli-KLL takibinde de kullanılabilir. Bu ölçümlerin 5x10 normal hücre arasında tek bir tümör hücrelerini bile saptayabilmek relapslarda çok erken tanı olanağı verdiği söylenmektedir.