

ÜCD Güncelleme Serileri

Nisan 2020 • Cilt: 9 • Sayı: 2

“Moleküler Tıp” Özel Sayısı

Sayı Editörü:

Dr. Fehmi NARTER

Yazarlar:

Dr. H. Arzu ERGEN

Dr. Merve Nur ATAŞ

Dr. Metin Yusuf GELMEZ

Dr. Günnur DENİZ

Dr. Mehmet Tolgahan HAKAN

Dr. İlhan YAYLIM

Dr. Elif Sinem İPLİK

Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU

Dr. Özlem KURNAZ GÖMLEKSİZ

Dr. A. Begüm CEVİZ

Dr. Hülya YILMAZ AYDOĞAN

Dr. Elif ULU

Dr. Canan CACINA

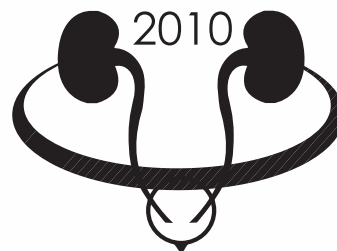
Dr. Şeyda ERCAN

Dr. Barış ERTUĞRUL

Dr. Özlem KÜÇÜKHÜSEYİN

Dr. Dilara SÖNMEZ

Dr. Hilal FINDIK KIYAN



Ürolojik
Cerrahi
Derneği



Onursal Editör:

Dr. Serdar TEKGÜL

Editör:

Dr. Rasin ÖZYAVUZ

Editör Yardımcıları:

Dr. Ahmet CİHAN

Dr. M.Berkan DURAN

Sayı Editörü :

Dr. Fehmi NARTER

Yayımlayan:

Ürolojik Cerrahi Derneği

Sorumluluk:

Bilimsel içeriğin sorumluluğu yazarlara aittir.

*Dr. Abdullah GEDİK
Dr. Ahmet Adil ESEN
Dr. Ahmet ERÖZENCİ
Dr. Ahmet METİN
Dr. Ahmet ŞAHİN
Dr. Ali ERGEN
Dr. Ali GÖKALP
Dr. Ali GÜNEŞ
Dr. Ali TEKİN
Dr. Aydın MUNGAN
Dr. Ayhan KARABULUT
Dr. Bedrettin SEÇKİN
Dr. Cavit CAN
Dr. Ceyhun ÖZYURT
Dr. Cenk Yücel BİLEN
Dr. Cüneyt ÖZKÜRKÇÜGİL
Dr. Çağ ÇAL
Dr. Erim ERDEM
Dr. Feridun ŞENGÖR
Dr. Ferruh ZORLU
Dr. Hakan GEMALMAZ
Dr. Hakan ÖZKARDEŞ
Dr. Haluk ÖZEN
Dr. Hamit ERSOY
Dr. Hayrettin ŞAHİN
Dr. İbrahim CÜREKLİBATUR
Dr. Kaan AYDOS
Dr. Kadir Emre AKKUŞ*

*Dr. Kamil ÇAM
Dr. Levent EMİR
Dr. Levent TÜRKERİ
Dr. M. Bülent ALICI
Dr. M.Zafer SINIK
Dr. Mehmet Bülent ÇETİNEL
Dr. Mesut GÜRDAL
Dr. Nihat SATAR
Dr. Oktay DEMİRKESEN
Dr. Önder KAYIGİL
Dr. Reşit TOKUÇ
Dr. Rüknettın ASLAN
Dr. Şaban SARIKAYA
Dr. Serdar TEKGÜL
Dr. Sinan Sözen
Dr. Sümer BALTACI
Dr. Tahir TURAN
Dr. Tarık ESEN
Dr. Tufan TARCAN
Dr. Turgut ALKIBAY
Dr. Uğur ALTUĞ
Dr. Uğur KUYUMCUOĞLU
Dr. Üstünol KARAOĞLAN
Dr. Zühtü TANSUĞ
Dr. Veli YALÇIN
Dr. Yaşar BEDÜK
Dr. Zafer AYBEK*

İçindekiler

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ELISA Tekniğine Genel Bakış..... | 5 |
| Akan Hücre Ölçer ve Kullanım Alanları..... | 9 |
| Ürolojik Çalışmalarda HPLC'nin Yeri ve Kromatografi..... | 15 |
| Hücre Kültürü Temel Teknikleri..... | 21 |
| “Northern Blotlama” ve “Southern Blotlama” Teknikleri | 25 |
| “Western Blot” Analizi ve Kullanım Alanları..... | 29 |
| Polimeraz Zincir Reaksiyonu | 37 |
| Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-time PCR” | 43 |
| Genomdaki Tek Baz Değişikliklerinin PCR-Tabanlı Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi Tekniği ile Tayini..... | 49 |
| Ürolojik Kanselerde Epigenetik Mekanizmalar ve Yöntemler..... | 55 |
| Rekombinant DNA Teknolojisinin Tıpta Kullanımı; Moleküler Cerrahi..... | 67 |
| Sorular | 76 |



ELISA Tekniğine Genel Bakış

Dr.H.Arzu ERGEN ve Dr.Merve Nur ATAŞ

İmmünoassay; bir antikor veya antijenin biyo-tanım maddesi olarak kullanılmasıyla, bir çözeltideki belirli analitlerin varlığını veya konsantrasyonunu ölçen oldukça spesifik bir biyoanalitik yöntemdir ⁽¹⁾. İmmünoassay yöntemlerinin bir temeli olarak, 1960 yılında Rosalyn Yalow ve Solomon Berson ⁽²⁾ tarafından, radyoaktif sinyale bağlı bir antikor aracılığı ile plazmadaki insülin seviyesi ölçülmüştür. Ancak sağlık açısından oluşturduğu riskler nedeniyle radyoaktivite içermeyen yöntemler araştırılmaya başlanmıştır. Enzim-substrat birlikteliğinin ölçülebilir renk değişimleri oluşturması, belirli analitleri tespit edebilen antikorlara bağlanan enzim-substrat kombinasyonlarının da geliştirilmesine yol açmıştır ⁽³⁾. Enzim temelli immünoassay yöntemlerinin ilk kantitatif uygulamaları 1971 yılında birbirinden bağımsız iki araştırmacı grup tarafından ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) adı verilen teknik kullanılarak immunglobulin G ve insan koryonik gonadotropin seviyeleri ölçülmüştür ^(4,5).

ELISA, sıvı bir numune içerisindeki proteinler, peptidler veya hormonlar gibi biyolojik moleküllerin, antijen-antikor etkileşimine dayanarak tespit edilmesini sağlayan immunoloji temelli bir yöntemdir ⁽⁶⁾. Antijenlerin yapısında bulunan epitoplar, antikorların spesifik olarak bağlanmasını sağlar ve bu yöntemin temelini oluşturur. Bu bağlanma kovalent olmayan bağlarla gerçekleşir ve geri dönüşümlüdür. Ancak antijen-antikor etkileşimi sırasında birbirine benzeyen gruplar arasında istenmeyen çapraz reaksiyonlar gerçekleşebilir, bu durum testlerde karşılaşılan en büyük problemlerden biridir.

Varlığı veya miktarı ölçülmek istenen, antijen veya antikor, genellikle katı faz olarak nitelendirilen 96 kuyucuklu polisistren platelerin kuyucuklarına sabitlenir. Sabitlenen analitlere, antikor veya antijen eklen-

mesiyle kompleks oluşturulması sağlanır. Antikor, ya doğrudan enzim ile etkileşir yada ortama ikincil bir enzim ile bağlanmış antikor eklenir. Daha sonra bir substratın eklenmesi, enzim-substrat etkileşimi ile görünür bir renk değişimine neden olur ve numunedeki ölçülmek istenen analitin varlığını gösterir. Bu yöntemde sıklıkla; Horseradish Peroksidaz (HRP), Alkalen Fosfataz (ALP) ve b galaktozidaz enzimleri kullanılır. Bu enzimlere bağlanan spesifik substratlar görünür renk değişimini sağlar. Renk değişiminin şiddeti, enzim işaretli reaktiflerin, dolayısıyla katı faza bağlanan antijen veya antikorun miktarını belirler. Reaksiyonun gerçekleştiği 96 kuyucuklu plateler farklı dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçülerek kantitatif tayini sağlanır ⁽⁷⁾.

ELISA yöntemi keşfedildiğinden bu yana uygulama alanları genişletilmiştir, İnsan koryonik gonadotropin (HCG) ve östrojen gibi hormonların tespitinde, HIV, hepatit B, ve sıtmanın teşhisi gibi klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır ⁽⁸⁾. ELISA yöntemleri, uygulama şekillerine göre: Direkt ELISA, İndirekt ELISA, Sandviç ELISA ve Yarışmalı (Kompetitif) ELISA olmak üzere dört farklı kategoriye ayrılır.

Direkt ELISA

Direkt ELISA, bir antijen ve antijene spesifik olarak bağlanan konjugattan oluşan ELISA yöntemlerinin en basit şeklidir ⁽³⁾. Konjugat, enzim ile işaretlenmiş antikordur. 96 kuyucuklu katı fazın her bir kuyucuğu varlığı ve miktarı ölçülmek istenen antijen ile kaplanır. Kuyu yüzeyindeki antijenlerin bağlanmadığı diğer bölgeleri doyurmak için bloklayıcı tampon çözelti (Blocking Buffer) kullanılır. Belirli bir süreden sonra katı faza bağlanmayan antijenlerin ve diğer moleküllerin ortamdan uzaklaştırılması için çeşitli solüsyonlar ile her bir kuyucuk yıkama yapılır. Katı faza sabitlenmiş antijenlerin tespiti için enzim ile işaretlenmiş antijene spesifik antikor eklenir. Belirli bir süre sonra antijenlerine bağlanmayan antikorların ortamdan uzaklaştırılması amacıyla yıkama yapılır. Daha sonra ortama antikora bağlı halde

bulunan enzime spesifik substrat eklenerek enzim-substrat etkileşiminin görünür renk oluşturması beklenir. Renk oluşumu uygun dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçülür ⁽⁹⁾.

Direkt ELISA, diğer ELISA yöntemlerine göre daha hızlı uygulanabilir ve uygulamada sekonder antikor kullanılmadığından, sekonder antikorun katı faza sabitlenmiş antijen ile oluşturabileceği çapraz reaksiyonlar gözlenmez. Ancak diğer yöntemlere göre duyarlılığı düşüktür ⁽¹⁰⁾. ELISA yöntemlerinin temelini oluşturur ancak düşük duyarlılığı nedeniyle klinik kullanımda tercih edilmez.

İndirekt ELISA

İndirekt ELISA yönteminde Direkt ELISA'dan farklı olarak iki farklı antikor kullanılır. Birincisi primer antikor olarak adlandırılır ve katı faza sabitlenen antijenlere spesifiktir. İkincisi sekonder antikordur ve enzim işaretli olup primer antikora bağlanır ⁽¹⁰⁾. Bu yöntemde saptanmak istenen molekül, serum veya herhangi bir çözelti içerisindeki antikorlardır.

96 kuyucuklu sabit faz antijen ile kaplanır. Blok tampon çözelti ile bağlanmamış bölgeler doyurularak bloke edilir. Daha sonra ortama test edilmek istenen örnek eklenir ve bu örnek içerisinde bulunan primer antikorların yüzeyde bulunan antijenler ile bağlanması sağlanır. Belirli bir süreden sonra bağlanmayan primer antikorların ortamdan uzaklaştırılması için yıkama yapılır. Primer antikora spesifik, enzim ile işaretlenmiş sekonder antikor kuyucuklara eklenir. Belirli bir süreden sonra bağlanmayan sekonder antikorların ortamdan uzaklaştırılması için yıkama işlemi tekrarlanır. Kullanılan enzimin substratı ortama eklenerek renk oluşumu gözlenir ve spektrofotometrik olarak tayin edilir. Bu yöntemde sekonder antikora bağlı bulunan enzim genellikle HRP'dir ve enzim-substrat etkileşimi ortama kemiluminesan substrat (ECL) eklenerek gözlenir. Diğer bir seçenekte ise primer antikora bağlanan biotin ve sekonder antikora bağlanan streptavidin molekülleri kullanılır. Streptavidin molekülü biotine

güçlü bir şekilde bağlanır. Her iki durumda da substratlar, kuyucukların içinde bulunan antikor miktarına doğrudan karşılık gelen ölçülebilir bir renk değişimi oluştururlar⁽¹¹⁾. Sekonder antikorun kullanılması İndirekt ELISA'yı Direkt ELISA'dan daha duyarlı hale getirir. Ancak sekonder antikordan kaynaklanan çapraz reaksiyonlar istenmeyen sinyal üretimlerine yol açabilir.

Sandviç ELISA

Sandviç ELISA tekniği bir örnek içerisindeki spesifik antijenlerin saptanması amacıyla kullanılır. Yakalama antikoru, primer antikor ve sekonder antikor olmak üzere üç farklı antikor kullanılır. Diğer tekniklerden farklı olarak katı faz yakalama antikoru (capture antibody) ile kaplıdır. Spesifik olmayan bağlanma bölgeleri blok tampon çözelti ile bloke edilir. Antikor kaplı katı faza içerisinde saptanmak istenen antijeni bulduran örnek eklenir ve yakalama antikoru ile bağlanması sağlanır. Daha sonra bu antijene spesifik başka bir antikor olan primer antikor eklenir ve antijenin iki antikora birden (yakalama antikoru ve primer antikor) spesifik olarak bağlanması sağlanır. Yıkama işlemlerinden sonra ortama primer antikora bağlanan, enzim ile işaretli sekonder antikor eklenir. Bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması için yıkama işlemleri yapılır. Ortama enzime spesifik substrat eklenerek spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk değişimi oluşması sağlanır⁽¹²⁾.

Sandviç ELISA tekniğinde, araştırılmak istenen antijene spesifik iki antikor kulla-

nıldığından duyarlılığı oldukça yüksektir. Ancak bir antijenin iki epitopuna aynı anda bağlanabilen antikor elde etmek zor olabilir. Bununla birlikte araştırılmak istenen antijen, iki farklı antikoru bağlayabilmesi için yeterince büyük olmalıdır. Bu nedenle Sandviç ELISA, proteinler ve polipeptidler gibi makromoleküler antijenlerin tayininde kullanılmaktadır⁽¹³⁾.

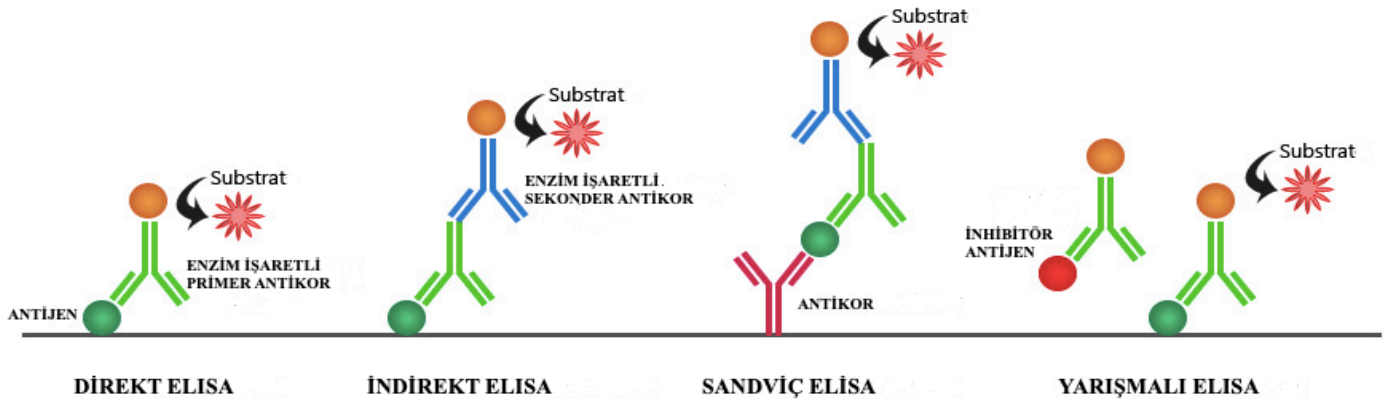
Yarışmalı ELISA

Yarışmalı ELISA, diğer üç ELISA yöntemlerine göre daha karmaşıktır ve farklı olarak inhibitör antijen kullanılır. İlk olarak enzim ile işaretli olmayan primer antikor araştırılmak istenen antijeni içeren numune ile bekletilerek antijen-antikor kompleksi oluşturulması sağlanır. Örnekte ne kadar çok antijen varsa o kadar antijen-antikor kompleksi oluşur. Oluşan kompleksler önceden antijen ile kaplanmış olan katı faza eklenir. Kompleks oluşturmayan primer antikorlar katı faza sabitlenmiş antijenler ile antijen-antikor kompleksi oluşturur. Primer antikorlar, numune içerisindeki antijene ne kadar çok bağlanırsa katı faza sabitlenmiş antijenlere bağlanacak olan primer antikor sayısı azalmış olur. Bu durumda numune içerisindeki antijen ile katı faza sabitlenmiş antijen arasında primer antikora bağlanmak için rekabet oluşur. Numune eklendikten belirli bir süre sonra bağlanmamış olan antikorların uzaklaştırılması için yıkama işlemleri yapılır ve blok tampon çözelti ile bloke edilir. Bu yıkama işleminde, daha önce

numune içerisinde kompleks oluşturmuş olan antijen ve primer antikorlar katı faza bağlanmayacağından uzaklaştırılmış olur. Daha sonra ortama enzim ile işaretlenmiş sekonder antikor eklenir ve kuyucuklarda bulunan primer antikor ile kompleks oluşturur. Son olarak ortama substrat eklenerek renk değişimi oluşturulur. Ancak bu yöntemde araştırılmak istenen antijen ve primer antikor kompleksi katı faza bağlanmadığından renk değişimi, araştırılmak istenen antijen varlığı ile ters orantılıdır^(3,14).

Duyarlılığı çok yüksek bir yöntemdir. Araştırılacak olan antijen çok küçük yapılı ise sandviç ELISA ile her iki antikorun birden bağlanması zor olacağından yarışmalı ELISA ile araştırılması daha uygun olacaktır. ELISA tekniği günümüzde araştırılmak istenen moleküle özel olarak üretilen ticari kitler ile uygulanır. Yapılan deneyin standardizasyonu için pozitif ve negatif kontroller kullanılır. Pozitif kontrol antijen veya antikor içeren solüsyonlardır. Negatif kontroller ise antikor yada antijen içermeyen solüsyonlardır. Bu kontroller aynı zamanda deney sonuçlarının değerlendirilmesinde de kullanılır.

ELISA yöntemleri daha önce anlatıldığı üzere uygulama şekilleri açısından farklılık gösterir. Ayrıca bu yöntemlerin birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Bu farklılıklar ve avantajlar Şekil.1 ve Tablo.1'de gösterilmiştir.



Şekil.1: ELISA yöntemleri.

Tablo 1: ELISA yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları.

| Yöntem | Avantajlar | Dezavantajlar |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Direkt ELISA | <ul style="list-style-type: none"> Hızlı Sekonder antikorların oluşturduğu çapraz reaksiyonlar gözlenmez | <ul style="list-style-type: none"> Duyarlılığı düşük Yüksek background Sadece primer antikor kullanıldığından sinyal amplifikasyonu gözlenmez |
| İndirekt ELISA | <ul style="list-style-type: none"> Primer ve sekonder antikor kullanıldığından sinyal amplifikasyonu gözlenir. | <ul style="list-style-type: none"> Direkt ELISA'ya göre daha kompleks Sekonder antikordan kaynaklı çapraz reaksiyonlar gözlenebilir. |
| Sandviç ELISA | <ul style="list-style-type: none"> Yüksek duyarlılık Tek bir antijene iki farklı antikor bağlandığından özgüllüğü yüksek | <ul style="list-style-type: none"> Antijenin iki farklı antikoru bağlayabilmesi için yeterinde büyük olması gerekir. Bir antijenin iki epitopuna aynı anda bağlanabilen antikorlar üretmek zordur. |
| Yarışmalı ELISA | <ul style="list-style-type: none"> Yüksek duyarlılık Düşük konsantrasyonlarda küçük boyutlarda antijenleri bile tespit edebilir. | <ul style="list-style-type: none"> Diğer yöntemlere göre daha kompleks İnhibitör antijene ihtiyaç vardır. |

ELISA Yöntemlerinin Klinikte Kullanımı

ELISA yöntemi, önceleri basit bir uygulaması olan düşük duyarlılıklı bir yöntem olarak keşfedilse de yıllar içerisinde duyarlılığı çok yüksek, küçük boyutlu moleküllerin düşük konsantrasyonlarda bile tayinini yapabilen bir yöntem haline gelmiştir. ELISA yöntemlerindeki bu gelişme klinik olarak kullanımının yaygınlaşmasına neden olmuştur.

ELISA, HIV ve Hepatit C tanısında anahtar yöntemdir. HIV antijenleri ile kaplanmış test çubuğuna kan numunesi yerleştirilir ve numunedeki HIV antikorlarının bu antijenlere bağlanması sağlanır. Çubuk enzim ile işaretli sekonder antikor ile muamele edilir ve enzimin substratı eklenir. Renk değişimi pozitif bir sonucu temsil eder. Benzer şekilde hepatit C antikorlarının tespiti ve influenza virüsünün tespitinde serolojik yöntemlerden biri olan ELISA yöntemi kullanılır^(15,16).

Hemofili A hastalarında koagülasyon faktörlerinden faktör VIII ve IX'e karşı antikorları saptamak için ELISA testleri uygulanır⁽¹⁷⁾.

Son yıllarda, Romatoid artrit ve inflamatuar bağırsak hastalarında kullanılan anti-tümör nekroz faktör (anti-TNF) ile tedavi edilmektedir. Hem ilaç hem de ilaç karşıtı antikorların serumdaki seviyelerinin izlenmesi için yarışmalı ELISA yöntemi geliştirilmiştir⁽¹⁸⁾.

ELISA yöntemlerinin yüksek duyarlılığı sayesinde çok düşük konsantrasyonlardaki gıda ve ilaç allerjenlerinin tespitinde yaygın olarak kullanılır⁽¹⁹⁾.

ELISA yöntemlerinin geliştirilmesi ile yüksek duyarlılık, düşük maliyet, optimizasyon ve kullanım kolaylığı sayesinde son yıllarda kanser biyobelirteçlerinin tespitinde elektrokimyasal ELISA yöntemleri büyük ilgi görmektedir. Bu gelişmeler, hastalığın erken evrelerinde vücut sıvılarında düşük konsantrasyonlarda bulunan kanser biyobelirteçlerinin tespitini mümkün kılmıştır⁽²⁰⁾.

Kaynaklar

- Ju H, Lai G, Yan F. Introduction. In: Immunosensing for Detection of Protein Biomarkers. Elsevier; 2017. p. 1–30.
- Yalow RS, Berson SA. Immunoassay Of Endogenous Plasma Insulin In Man. J Clin Invest [Internet]. 1960 Jul 1 [cited 2019 Nov 13];39(7):1157–75.
- Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): The basics. Br J Hosp Med. 2016;77(7):C98–101.
- Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 1971;8(9):871–4.
- Van Weemen AH, Schuurs AHWM. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. FEBS Lett. 1971 Jun 24;15(3):232–6.
- Ford PJ. Immunological techniques: ELISA, flow cytometry, and immunohistochemistry. Methods Mol Biol. 2010;666:327–43.

- Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. J Invest Dermatol. 2013;133(9):1–3.
- Drijvers JM, Awan IM, Perugino CA, Rosenberg IM, Pillai S. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: The Application of ELISA in Clinical Research. In: Basic Science Methods for Clinical Researchers. Elsevier Inc.; 2017. p. 119–33.
- Lin A V. Direct ELISA. Methods Mol Biol [Internet]. 2015 [cited 2019 Nov 14];1318:61–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26160564>
- Konstantinou GN. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In: Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.; 2017. p. 79–94.
- Lin A V. Indirect ELISA. Methods Mol Biol. 2015;1318:51–9.
- Kohl TO, Ascoli CA. Immunometric antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Cold Spring Harb Protoc. 2017 Jun 1;2017(6):450–7.
- Qu H, Wang X, Qu B, Kong H, Zhang Y, Shan W, et al. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for naringin. Anal Chim Acta. 2016;903:149–55.
- Vashist SK, Luong JHT. Enzyme-Linked Immunoassays. In: Handbook of Immunoassay Technologies [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2019 Nov 21]. p. 97–127. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128117620000050>
- Protto JP, Plasschaert S, Sartor F, Walckiers D. Biological Testing For HIV, Hepatitis B And C Infections. Epidemiology Unit, Scientific Institute of Public Health, April 2004; Brussels (Belgium) IPH/EPI Reports N° 2004 - 011



16. Dziabowska K, Czaczyk E, Nidzworski D. Detection methods of human and animal influenza virus—current trends. Vol. 8, Biosensors. MDPI AG; 2018.
17. Miller CH. Laboratory testing for factor VIII and IX inhibitors in haemophilia: A review. Vol. 24, Haemophilia. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 186–97.
18. Hock BD, Stamp LK, Hayman MW, Keating PE, Helms ETJ, Barclay ML. Development of an ELISA-Based Competitive Binding Assay for the Analysis of Drug Concentration and Antidrug Antibody Levels in Patients Receiving Adalimumab or Infliximab. *Ther Drug Monit.* 2016;38(1):32–41.
19. Weng X, Gaur G, Neethirajan S. Rapid detection of food allergens by microfluidics ELISA-based optical sensor. *Biosensors.* 2016;6(2).
20. Arya SK, Estrela P. Recent advances in enhancement strategies for electrochemical ELISA-based immunoassays for cancer biomarker detection. Vol. 18, *Sensors (Switzerland)*. MDPI AG; 2018.

Akan Hücre Ölçer ve Kullanım Alanları

Dr. Metin Yusuf GELMEZ ve
Dr. Günnur DENİZ

Flow sitometri ya da daha yaygın kullanılan adıyla “akan hücre ölçer”, 1950’li yıllardan itibaren hem rutin hem de araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde özellikle immünoloji, hematoloji, onkoloji, mikrobiyoloji, organ nakil merkezleri, biyokimya ve patoloji gibi birçok farklı disiplin alanında kullanılmaktadır ^(1,2).

Akan hücre ölçer cihazının çalışma prensibi, floresan işaretli antikor ya da boyalar ile işaretlenmiş süspansiyon içindeki hücrelerin lazer ışık önünden tek tek geçerken yaydıkları sinyallerin fotodedektörler aracılığı ile toplanarak işlenmesi ve analiz edilmesi prensibine dayanmaktadır ^(2,3,4). Akan hücre ölçer ile hücrelerin sayısı, dağılımları, çoğalma kapasiteleri, sitokin içerikleri, fonksiyonları gibi birçok temel hücre özelliği hakkında bilgi edinmek mümkündür. Bu özellikleri sayesinde sistem birçok hastalığın tanı ve tedavisinde rutin olarak kullanılmaktadır.

Tarihçe

İlk keşfinden günümüze hem immünoloji hem de lazer ve elektronik sistemlerdeki gelişmeler akan hücre ölçer sistemlerinin laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur.

Moldovan 1934 yılında kapiller tüp içinde akış halindeki eritrositlerin fotoelektrik yöntemle saptanmasını sağlayan bir cihaz, 1949 yılında ise Wallace Coulter otomatik kan sayım cihazlarının öncüsü olan ilk hücre sayım cihazını geliştirmiştir. Crosland-Taylor 1953 yılında yüksek hızla akan bir sıvının içine verilen eritrositlerin sıvı içinde hizalandıklarını keşfederek akan hücre ölçer sistemlerinde kullanılan hidrodinamik odaklanmanın temelini atmışlardır. 1965 yılında Mac Fulwyler hızla akan bir sıvının yüksek frekansta belli aralıklar ile vibrasyonu sonrası uniform

damlacıklara ayrılabilirdiğini göstererek hücre ayırma cihazlarının temelini atmıştır. Wolfgang Göhde 1968 yılında floresan boyalar kullanılarak ölçüm yapan floresan temelli ilk akan hücre ölçeri geliştirmiştir ^(3,5). Paul Mullaney hücrelerin hacim, ışık saçılımı ve floresansını ölçen multiparametrik ilk akan hücre ölçeri geliştirmiştir. 1972 yılında floresan temelli ilk hücre ayırma cihazı (FACS-fluorescence-activated cell sorting) geliştirilmiştir ⁽⁶⁾.

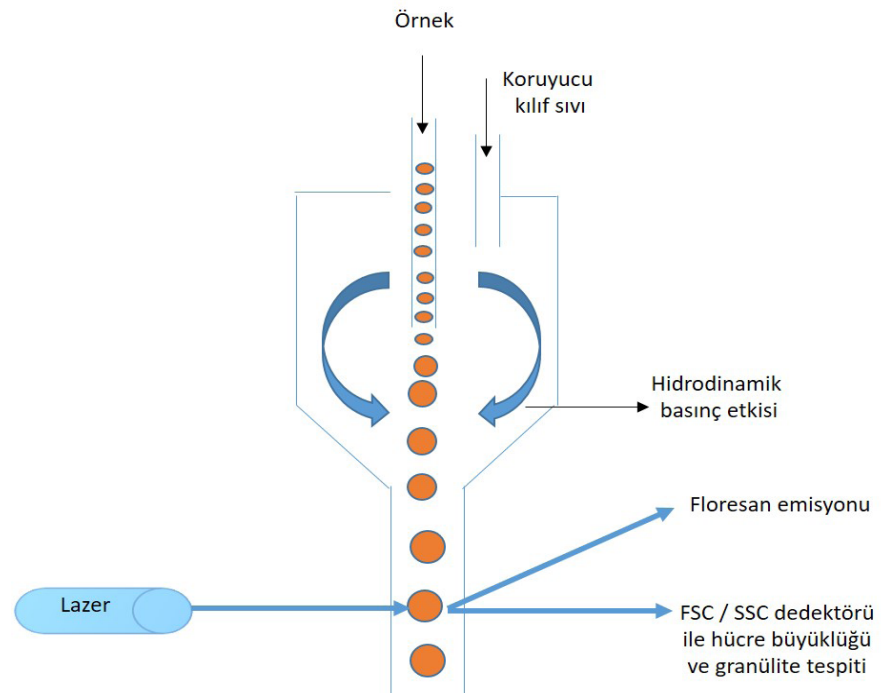
Günümüzde birçok ticari firmanın geliştirdiği farklı özelliklerde akan hücre ölçer sistemleri bulunmaktadır. Akan hücre ölçer teknolojisindeki ilerlemeler, günümüzde 5 lazer ve 25 floresan filtreli cihazların geliştirilmesine ve tek bir hücreye ait 25 farklı parametrenin eş zamanlı değerlendirilmesine olanak sağlamıştır.

Ülkemizde ilk olarak 1980’li yılların sonunda kullanılmaya başlayan akan hücre ölçer sistemleri, şu an birçok merkez ve laboratuvar tarafından rutin ve araştırma amaçlı kullanılmaktadır.

Çalışma Prensibi

Akan hücre ölçer; süspansiyon hale getirilmiş hücrelerin bir akış kanalı boyunca ilerlerken lazer ışık önünden tek tek geçişlerini sağlayan sıvı sistem; ışık enerjisinin oluşmasını ve sonrasında toplanmasını sağlayan lazer ışını, filtreler ve sinyal dedektörlerinden oluşan optik sistem ve optik sinyallerden gelen verilerin aktarımını sağlayan elektronik sistemden oluşmaktadır. Bazı akan hücre ölçerlerde ayrıca hücre ayırma (cell sorting) özelliği bulunmaktadır ^(7,8).

Süspansiyon içinde floresan ile işaretlenmiş hücreler hava basıncı ile fosfat tamponlu saline (PBS), flow sheet gibi koruyucu kılıf sıvı (tampon çözelti) içinden geçirilir. Hızlı sıvı akışı yüksek basınç oluşturarak hücrelerin cam veya kuartzdan yapılmış akış kabine (flow cell) getirilmesini sağlar. Flow cell süspansiyon içindeki hücrelerin lazer kaynak önünden tek bir sıra halinde geçmesini sağlar (Şekil 1). Lazer ışık, hücrelerdeki floresan boyalara çarparak aktive olmalarını ve yayılım yapmalarına neden olur. Bu yayılım filtreler ve dedektörler aracılığı ile tespit edilip, elektrik sinyallerine çevrilerek amplifiye edilir ve sonuçlar bilgisayara iletilir ⁽⁷⁾.



Şekil 1: Lazer ışık önünden hücrelerin tek tek geçişi

Akan hücre ölçer sadece floresan boyalardan gelen sinyaller hakkında değil aynı zamanda hücrelerin büyüklük ve granülitesini hakkında da bilgi vermektedir. Hücreye çarpıp, hücre içinden 90° açıyla yansıyan ışınların ölçülmesi ile hücrelerin granülitesini (Side Scatter-SSC) ve hücrenin yüzeyinden aynı yöne doğru 20° açı ile yansıyan ışınların ölçülmesi ile hücrenin büyüklüğü (Forward Scatter-FSC) hakkında veri elde etmemizi sağlar (Şekil 2) ^(9,10).

Bazı akan hücre ölçerler hücreleri fiziksel veya floresan işaretlerine göre karışık bir hücre popülasyonu içinden ayırabilme (cell sorting) özelliğine sahiptir. Hücre saflaştırma için manyetik bazlı antikolar gibi farklı yöntemler olmasına karşın akan hücre ölçer yüksek saflık ve verimlilikle hücrelerin ayrılmasını sağlar. Bu sayede kemik iliği, kan gibi birçok örnekte kök hücre, doğal öldürücü (natural killer; NK) hücre, B hücre gibi spesifik hücrelerin diğer hücreler içinden ayrılarak çalışması sağlanır. Böylece diğer hücrelerin etkisi dışlanarak spesifik hücre grubunun özelliği incelenebilmektedir.

Hücre ayırımının temel prensibi şu şekildedir. Lazer ışık önünden geçen hücreler ultrasonik vibrasyona maruz kalır. Bunun etkisiyle akış içindeki sıvı damlacıklara ayrılır ve her bir damlacık tek bir hücre içerir. Süspansiyon içinden ayrılması istenilen hücreler, büyüklük ve floresans özelliklerine göre belirlenir. Böylece spesifik hücreleri içeren damlacıklar elektrik akımı

verilerek elektrik yüklü damlacıklar haline getirilir. Diğer hücreleri içeren damlacıklar ise yüksüz olarak kalırlar. Yüklü damlacıklar saptırma plaklarına geldiğinde elektriksel alandan geçirilerek, yüklerine göre ayrılır ^(11,12). Bu sayede 4 farklı hücre grubunu süspansiyon içindeki diğer hücrelerden ayırabilme mümkündür ⁽⁴⁾. Bu cihazların bir diğer özelliği, kültür plağı içinde her bir kuyuya istenilen sayıda ve özellikte hücreyi koyabilmesidir.

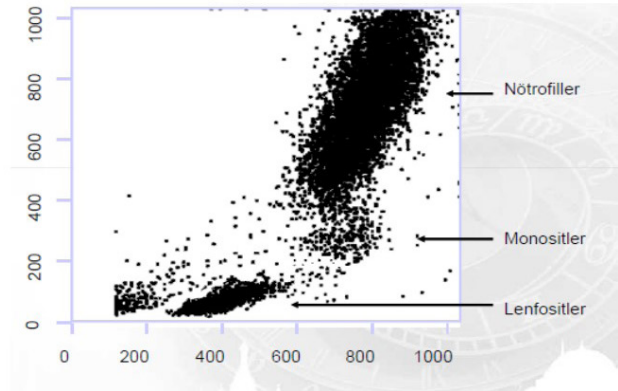
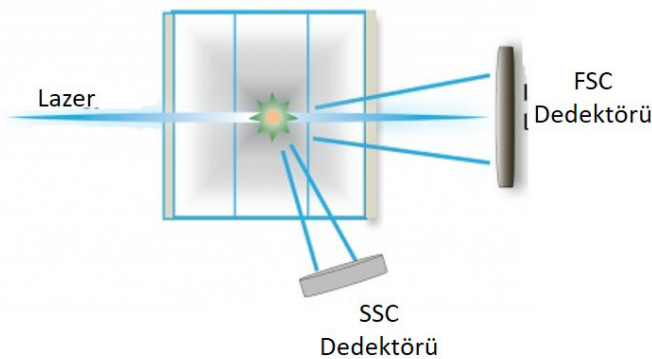
Akan hücre ölçer cihazlarında en çok 488 nm mavi lazer, 405 nm violet lazer, 640 nm kırmızı lazer, 355 nm ultraviyole lazer ve 532 nm yeşil lazer kullanılmaktadır. Her floresan boya belli bir dalga boyunda aktive olmakta ve yine belli bir dalga boyunda yayılım yapmaktadır. Bu nedenle akan hücre ölçer ile çalışma yapılmadan önce cihazın lazer kapasitelerini ve hangi filtrelere sahip olduğunun bilinmesi önemlidir.

Kullanım Alanları

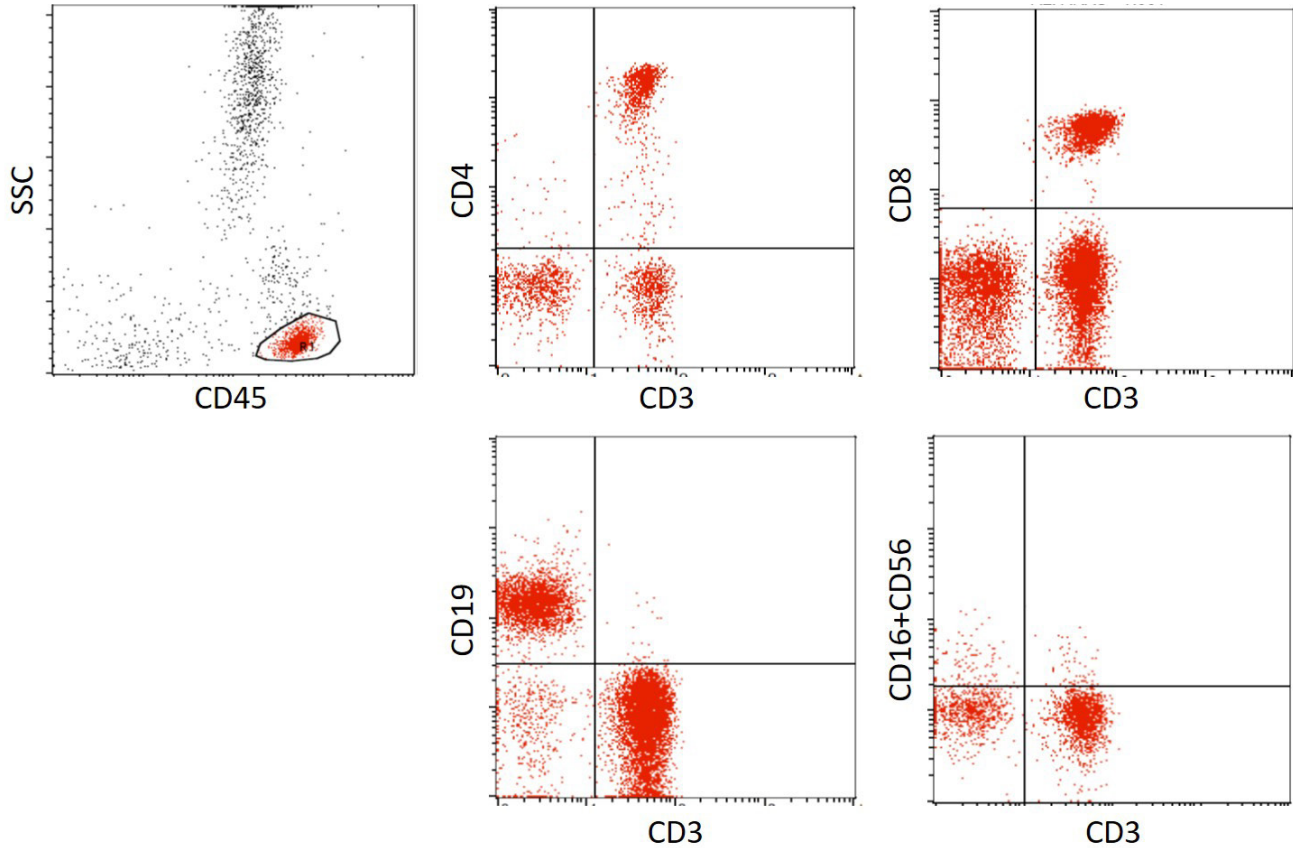
Akan hücre ölçer; yaygın kullanımı, geniş monoklonal antikor çeşitliliği ve standardizasyon protokolleri ile immünofenotiplemeye oldukça güvenilir bir tarama testidir. Çok sayıda hücrenin kısa sürede analiz edilebilmesi, genel hücre popülasyonu içinde hücre alt grup özelliklerinin tespit edilebilmesi, lenfosit alt grup analizleri, lösemi ve lenfoma tayini, kromozom analizi, apoptoz tayini, proliferasyon ölçümü, hücre sitokin üretimi ve sitotoksitesi gibi

birçok konuda araştırma imkânı sunması akan hücre ölçerinin en önemli avantajlarıdır ⁽¹³⁻¹⁶⁾. Kan, kemik iliği, kordon kanı, beyin omurilik sıvısı (BOS), plevra sıvısı gibi birçok örnek süspansiyon halinde olması sebebiyle çalışmalarda kullanılabilir. Ayrıca fikse edilmiş dokulardaki hücreler süspansiyon haline getirilerek çalışmalarda kullanılabilir. Başkalaşım kümesi (cluster of differentiation; CD) hücre yüzeyindeki moleküllerin tanımlanması ve sınıflandırılması için kullanılan bir protokoldür ⁽¹⁷⁾. CD moleküllerine özgü antikolar kullanılarak hücre tiplerini akan hücre ölçer ile ayırt edilebilir. Basit immünofenotipleme testi ile $CD3^+T$ lenfosit, $CD3^+CD4^+$ yardımcı T lenfosit, $CD3^+CD8^+$ sitotoksik T lenfosit, $CD19^+$ B lenfosit, $CD3^+CD16^+CD56^+$ NK hücre dağılımları belirlenebilmektedir. Özellikle primer immün yetersizlik (PIY) hastalarında ve İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) enfeksiyonlarının takibinde $CD4/CD8$ oranının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Akan hücre ölçer ile basit immünofenotipleme örneği (Şekil 3)'de gösterilmiştir.

$CD45RA$ ve $CCR7$ yüzey belirteçleri kullanılarak hem $CD4^+$ hem de $CD8^+$ T lenfositlerinde naif, santral hafıza ve efektör hafıza hücre alt grupları, IgD , $CD27$, $CD38$, $CD138$ yüzey belirteçleri kullanılarak B lenfositlerde naif, hafıza, plazma hücre alt grupları analiz edilebilmektedir ⁽¹⁸⁾.



Şekil 2: Lazer ışık önünden geçen hücreden yansıyan ışınların SSC ve FSC dedektörleri ile tespiti ve SSC/FSC dot plot grafiğinde hücrelerin yerleşimleri.



Şekil 3: İmmünofenotipleme ile SSC/CD45 grafiğinde lenfositlerin kapılanması ve lenfositler içinde CD3+ (T lenfosit), CD3+CD4+ (yardımcı T lenfosit), CD3+CD8+ (sitotoksik T lenfosit), CD19+ (B lenfosit) ve CD3-CD16+CD56+ (NK) hücrelerini gösteren örnek dot-plot grafikleri.

Akan hücre ölçer ile T, B ve NK hücre alt gruplarının dağılımlarının yanı sıra işlevlerini de tespit etmek mümkündür. Periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) izole edilip kültür ortamında uyarılarak hücre dağılımlarındaki veya hücre yüzey/içi antijenlerin ekspresyonlarındaki değişim, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17 gibi çeşitli sitokinlerin hücre içi düzeyleri analiz edilebilmektedir. Kanser ve virüsle enfekte hücrelere karşı yanıtta rol alan NK hücrelerinin fonksiyonları, K-562 hücre hatları ile kültüre edilmesi ile saptanabilmektedir. MHC sınıf 1 ekspresyon etmeyen K-562 hücreleri lösemik hücre hattıdır ve NK hücrelerinin doğal hedefidir. Karboksiflorescein suksinimidil ester (CFSE) ile işaretlenmiş K-562 hücreleri NK hücre ile kültüre edildikten sonra ölü hücreleri belirleyebilmek için ortama Propidium İyodür (PI) boyası eklenir. Canlı K-562 hücreleri CFSE ile yeşil floresan ışığa yaparken, ölü K-562 hücreleri PI boyanarak kırmızı flore-

san verir. Ölü K-562 yüzdesi saptanarak NK hücrelerinin sitotoksik kapasiteleri analiz edilebilir. NK sitotoksitesini ölçmek için kullanılan bir diğer yöntemde CD107a düzeyinin analiz edilmesidir. NK hücrelerinde degranülasyon gerçekleştiğinde sekretuar lizozomlar ortama salınır. Bu sırada lizozom bağlı membran proteini (CD107a) hücre yüzeyine taşınır. CD107a düzeyi ölçülerek NK sitotoksitesini analiz edilmektedir⁽³⁾.

Periferik kandan izole edilen nötrofiller *Escherichia coli*, Phorbol-12-Myristate-13 Acetate (PMA), N-formil-metionin-lösin-fenilalanin (FMLP) gibi çeşitli maddeler ile uyarılarak oksidatif patlama, kemotaksis ve fagositoz yanıtları ölçülebilir. Bu fonksiyonların tespitinde Dihydrorhodamine 123 (DHR) boyası kullanılır. DHR fagosit mitokondrisine yerleşerek uyarım sonrası oksijen radikalleri ve peroksinitritin etkisi ile güçlü floresan özelliği olan rhodamine

indirgenen bir boyadır. Rhodamine 488 nm'de ışığa yapar. Bu ışımının tespiti ile nötrofil fonksiyonu analiz edilir. DHR ile işaretlenen nötrofillerin *E. coli* uyarımı ile fagositoz, PMA uyarımı ile oksidatif patlama ve FMLP uyarım ile kemotaksis fonksiyonları analiz edilebilir⁽¹⁹⁾.

Hücre proliferasyonu çalışmalarında CFSE yaygın olarak kullanılan bir boyadır. CFSE hücre zarından geçerek, hücre içi makromoleküllerin serbest amino gruplarına kovalan bağlarla bağlanma özelliğine sahiptir. Her mitoz bölünme sonrası CFSE yavru hücrelere eşit şekilde dağılır. CFSE ile boyanmış PKMH'lerin çeşitli antijen veya mitojenler ile 5-6 gün boyunca uyarılması sonucu, her mitoz bölünme sonrası yavru hücrelerdeki CFSE miktarı azalır. Böylece hücrelerin kaç kez bölünmeye girdiği gözlenerek proliferasyon kapasiteleri hakkında bilgi edinilir⁽²⁰⁾. Proliferasyon çalışmaları tümör biyolojisinde tümör



hücrelerinin ikiye katlanma süresinin tespiti, biyomoleküllerin hücre döngüleri üzerindeki etkileri ve regülatör T hücre gibi farklı hücrelerin immün sistemin diğer hücreleri üzerindeki baskılayıcı etkilerini araştırmada kullanılmaktadır.

Apoptoz sırasında ortaya çıkan değişiklikler akan hücre ölçer ile analizler edilebilmektedir. Hoechst 33342 ve PI gibi boyalar ile plazma membran geçirgenliğindeki değişiklikler; Annexin V bağlanması veya F-actin kaybı ile hücre yüzeyindeki değişiklikler; Rhodamine 123, PI ve JC-1 boyları ile mitokondri ve lizozomdaki değişiklikler; TUNEL yöntemi ile DNA fragmentasyonu gösterilebilmektedir. Ayrıca kaspaz aktivasyonu ve hücre içi kalsiyum değişikliklerinin ölçümü de yapılabilmektedir. Apoptozisin farklı evrelerinin tespit edilmesine olanak sağlayan birbirinden farklı bu yöntemler ile birçok kimyasal ve biyolojik ajanın hücre fonksiyonu üzerine etkisi analiz edilebilmektedir.

DNA'ya bağlanan floresan boyalar kullanılarak, hücre döngüsü ve DNA ploidi çalışmaları yapılmakta ve hücrelerin hangi bölünme fazında ne oranda kaldıkları analiz edilmektedir. Hücrelerin çoğalma hızları hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Özellikle hematoloji ve onkoloji hastalarında tedaviye verilen yanıtın izlenmesinde kullanılmaktadır.

Son yıllarda akan hücre ölçerin hematoloji alanında kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Lösemik hücrelerin tiplendirilmesi, hematolojik malignitelerin tanısı, sınıflandırılması, hematopoetik kök hücre sayımı, çoklu ilaç direnci ve trombosit çalışmaları rutin laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır⁽²¹⁾. Ayrıca çeşitli lösemi türlerinde tedavi sırasında rezidüel lösemi olup olmadığı, lösemiye ait klinik bulgu olmadığı halde tedaviden kaçan ve relapslara neden olan hücrelerin varlığının tespitine yönelik minimal rezidüel hastalık (MRD) tayininde kullanılmaktadır.

Son yıllarda Floresan in-situ hibridizasyon (FISH) ve akan hücre ölçer tekniklerinin birleştirilmesi ile Flow-FISH tekniği geliştirilmiştir. Bir genin mRNA'sına spesifik floresan probalar ve proteinine özgü floresan işaretli

antikorlar kullanılarak aynı moleküle özgü mRNA ve protein düzeylerinin eş zamanlı olarak analiz edebilmesi mümkün hale gelmiştir. RT-PCR çalışmalarında house-keeping gen kullanılarak yapılan delta CT analizi ile rölatif gen ekspresyon düzeyi saptanabilmektedir. Akan hücre ölçer ile mRNA ekspresyon çalışmalarının en büyük dezavantajı, hücrede o genin mRNA ekspresyonu olup olmadığı hakkında bilgi verirken, mRNA yoğunluğu hakkında bilgi vermemesidir. Kromozomların sentromer ve telomer bölgelerine özgü FISH problemleri kullanılarak hücrelerde monozomi, trizomi ve telomer uzunluğu çalışmaları yapılabilmektedir⁽²¹⁾.

Serum, plazma, kültür sıvısı gibi birçok biyolojik materyalde floresan işaretli mikroboncuklar kullanılarak sitokin düzeyleri analiz edilebilir. Bu sayede eş zamanlı olarak tek tüpte birden çok sitokin kısa sürede ve daha düşük maliyetle analiz edilebilmesi sağlanmaktadır. İlaç düzeyleri, trombosit çalışmaları, sinyal iletim yolları, mikrobiyal ekoloji gibi daha birçok farklı alanda akan hücre ölçer kullanılmaktadır. İmmünoloji, mikrobiyoloji, hematoloji gibi disiplinlerin dışında farmakoloji, üroloji gibi tıbbın diğer alanlarında da akan hücre ölçer kullanılmaktadır. Mesane tümörlerinde DNA ploidi çalışmaları, BCG ile indükleme sonrası immün sistem aktivitesinin ölçülmesi, bu hastaların periferik kanlarındaki immün sistem hücrelerinin sayısı ve fonksiyonlarının incelenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. İmmün kontrol nokta (immune check point) moleküllerinin keşfi ve günümüzde bu moleküllere özgü inhibitör ajanların tedavide kullanımı, mesane tümörlerinde bu moleküllerin ekspresyon düzeylerinin ve inhibitörler ile tedavi sonrası immün sistem hücre fonksiyonlarındaki değişikliklerin araştırılmasında kullanımı söz konusudur.

Sonuç

Floresan işaretli antikorlar kullanılarak, süspanse edilmiş hücrelerin kısa sürede, yüksek duyarlılıkta ve tek hücre düzeyinde analiz edilmesine olanak sağlayan akan hücre ölçer, hücrelerin sayısı, fonksiyon, DNA

içeriği, sitokin düzeyi, mRNA ekspresyonu gibi birçok konuda veri elde edilmesini sağlar. İmmünoloji alanındaki ilerlemeler, kullanım alanlarının genişliği akan hücre ölçer sistemlerinin önümüzdeki yıllarda ilerleyen teknoloji ile birlikte gelişeceğini ve kullanımının artacağını göstermektedir. Lam üzerinde sabitlenmiş hücrelerin incelenmesine olanak sağlayan lazer taramalı hücre ölçer sistemleri; lazer önünden geçen hücrelerin aynı zamanda kamera sistemi ile görüntüsünün alınabildiği görüntülü akan hücre ölçerler; doku kesitlerinde analiz imkanı sağlayan iki fotonlu doku hücre ölçer; kütle spektrofotometrenin entegre edildiği akan hücre ölçer sistemleri akan hücre ölçer teknolojisindeki yeni gelişmelerdir. Bu gelişmeler ışığında araştırma ve rutin laboratuvarlarda kullanımının daha da yaygınlaşacağı görülmektedir.

Kaynaklar

1. Taneli F. Flow sitometri Tekniği ve Klinik laboratuvarlarda Kullanımı. Türk Klinik Biyokimya Dergisi. 2007; 5(2): 75-82.
2. Betters DM, Use of flow cytometry in clinical practice. Journal of the Advanced Practitioner in Oncology. 2015; 6(5): 435-440.
3. Deniz G, Yanıkkaya-Demirel G. Akan Hücre Ölçer. İstanbul 2017.
4. Karaboz İ, Kayar E, Akar S. Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi. 2008; 6(2):1-18.
5. Han Y, Gu Y, Zhang AC, Lo HY. Review: Imaging Technologies for Flow Cytometry. Lab Chip. 2016, 16(24): 4639-4647.
6. Silveria GF. Evolution of Flow Cytometry Technology. Journal of Microbial&Biochemical Technology. 2015; 7(4): 213-216.
7. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. Journal of Current Protocols in Immunology. 2018, 120(5): 1-11.
8. Doan M, Vorobjev I, Rees P, Filby A, Wolkenhauer O, Goldfeld AE, et al. Trends in Biotechnology. 2018; 36(7): 649-652.
9. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow Cytometry: basic principles and applications. 2017; 37(2): 163-176.
10. Vembadi A, Menachery A, Qasaimeh MA. Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2019; 7(147): 1-20.

11. Henel G, Schmitz JL. Basic Theory and Clinical Applications of Flow Cytometry. *Labmedicine*. 2007; 38(7): 428-436.
12. Cossariza A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European Journal of Immunology*. 2017; 47(10): 1584-1797.
13. Çınar S, Erten G, Cetin E, Gazioglu S, Küçüksezer UC, Gürol AO, Yanıkkaya-Demirel G, Deniz G. “XV. Uygulamalı Flow Sitometri Eğitiminin Değerlendirilmesi. *Deneysel Tıp Dergisi*. 2010; 1(1): 19-24.
14. Mutlu E, Gültekin M. Akım Sitometride Veri Analizi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2015; 45(4): 155-159.
15. Çınar S, Gelmez MY, Barış S, Karakoç-Aydiner E, Ozen A, Aktürk H, Barlan I, Camcıoğlu Y, Deniz G. Hiperimmünoglobulin M Sendromunun Akan Hücre Ölçer ile Değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Immunology*. 2015; 3(3): 64-70.
16. Kanev MO, Göklap-Muranlı F.D. Flow sitometri ve kullanım alanları. *SAÜ Fen Bil Dergisi*. 2016; 20(1): 33-338.
17. Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, et al. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *Journal of Immunology*. 2015; 195(10): 4555-4563.
18. Camcıoğlu Y, Deniz G, Badur S. Primer İmmün Yetersizlikler. 1. Baskı. İstanbul: Selen Yayıncılık, 2020
19. Çiçekkökü D, Ögülür İ, Karakoç-Aydiner E, Barış S, Kıyıkım A, Özen A, Barlan I. Dihidrorhodamin Testi ile Oksidatif Patlama: Sağlıklı Kontrollerde Referans Değerleri. *Turkish Journal of Immunology*. 2015; 3(2): 49-53.
20. Azarsiz E, Karaca N, Ergun B, Durmuscan M, Kutukculer N, Aksu G. In vitro T lymphocyte proliferation by carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester method is helpful in diagnosing and managing primary immunodeficiencies. *J Clin Lab Anal*. 2018; 32(1): 10.1002/jcla.22216.
21. Böttcher S. Flow Cytometric MRD Detection in Selected Mature B-Cell Malignancies. *Methods in Molecular Biology*. 2019; 1956: 157-197.
22. Arrigucci R, Bushkin Y, Radford F, Lakehal K, Vir P, Pine R, et al. FISH-Flow, a protocol for the concurrent detection of mRNA and protein in single cells using fluorescence in situ hybridization and flow cytometry *Nature Protocols*. 2017; 12(6): 1245-1260.



Ürolojik Çalışmalarda HPLC'nin Yeri ve Kromatografi

Dr. Mehmet Tolgahan HAKAN ve
Dr. İlhan YAYLIM

Klinik analizler hastalık gelişiminin önlenmesi, doğru teşhisin konulması ve etkin tedavi rejiminin ve güvenilirliğinin artırılması amacıyla tam kan, serum, plazma, idrar, dışkı ve dokular gibi çok sayıda biyolojik materyallerin test edilmesini içerir. Bu biyolojik materyaller lipitler, peptitler, proteinler ve küçük moleküller gibi çok sayıda ve çeşitli analitlerden oluşur. Biyolojik materyallerin analizi ile ilgili biyobelirteçlerin varlığı/yokluğu ve/veya konsantrasyonu belirlenebilir ve böylelikle teşhis, tedaviyi optimize etmek ve etkinliğini arttırmak, yan etkileri en aza indirmek için terapötik ilaçların izlemesi sağlanabilir. Biyobelirteç analizlerinin önemli bir bölümünü metabolomik, proteomik, lipidomik gibi hedeflenmiş ve hedeflenmemiş analiz yöntemlerini uygulayan omik bilimleri oluşturur. Hedeflenmemiş yaklaşımlar, gelecekte klinik amaçlı teşhislerde kullanılacak hedefli izlemeye yönelik biyobelirteçleri tanımlamak amacıyla hasta ve sağlıklı bireylerden alınan numunelerin belirli moleküllerce karşılaştırılması, hastalığa özgü biyokimyasal profilin tanımlanması prensibine dayanmaktadır. Hedefli analizlerde ise toksikoloji laboratuvarlarında olduğu gibi terapötiklerin veya ilacın kötüye kullanımı sonucu bağımlılığa dönüşen (amfetaminler, opioidler ve psikoaktif vb.) maddelerin analizinde kullanılır^(1,2).

Ürolojik malignitelerin de dahil olduğu birçok kanserde biyobelirteçleri tanımlanmasında kullanılan en az invaziv yöntemlerden “sıvı biyopsi” (kan, idrar, tükürük ve seminal plazma vb) kullanımı, son yıllarda en çok çalışılan konulardandır⁽³⁾. Özellikle sıvı biyopsiler primer ve metastatik tümörlü hastanın anlık durumu ile ilgili bilgi sunması nedeni ile hedeflenen kişileştirilmiş tıp

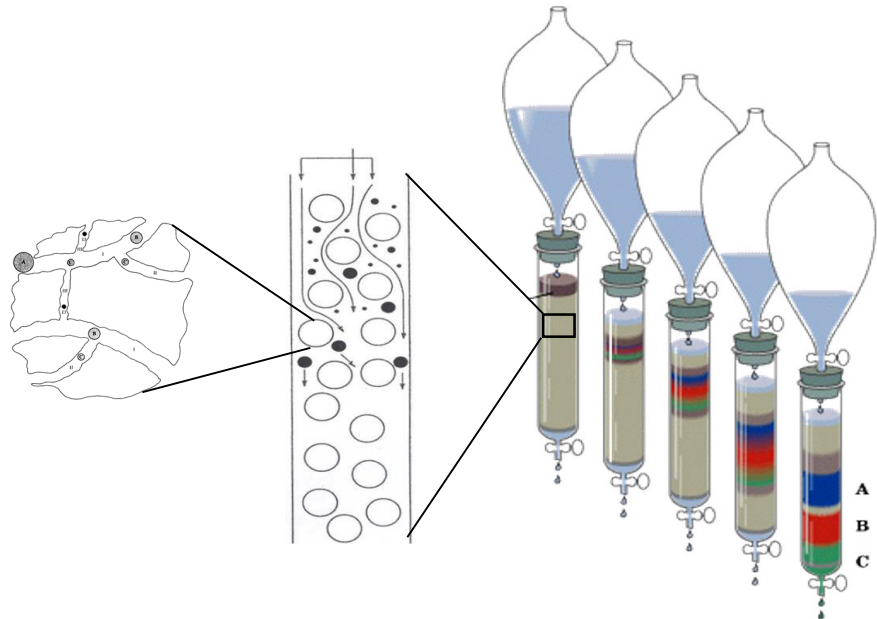
çalışmaları için de oldukça değerlidir. Bunun dışında idrar örnekleri üzerinde yapılan çalışmalar da ürolojik hastalıklar yanı sıra birçok hastalığın tanı, tedavi ve takibinde önemli veriler sunabilmektedir. Dolaşımdaki moleküllerin moleküler profili ve mekanizmaya olan katkılarının belirlenmesi, tanımlanan biyobelirtecin klinik testlere başarılı bir şekilde girebilmesi için ilk basamaktır⁽³⁾. İçerisinde birçok molekül içeren biyolojik örneklerin analizi ve ayrımı için kullanılan önemli yöntemlerden biri de kromatografidir.

Bu derlemede kromatografinin tanım, sınıflandırma, uygulama yöntemlerinden kısaca bahsettikten sonra ürolojik çalışmalarda da sıklıkla kullanılan sıvı kromatografisinin tanımı ve kullanım alanları, hakkında bilgiler sunulacaktır.

Kromatografi

Kromatografi, 1906'da ilk olarak Rus bir botanikçi olan Mikhail Tswett bir çalışmasında klorofil ayırımında kullanmıştır⁽⁴⁾. İlk modern kromatografi cihazı ise 1965'te

Csaba Horvath tarafından Yale Üniversitesi'nde geliştirilmiştir. Yunanca kökenli bir kelime olan kromatografi, chroma (renk) ve graphein (yazmak) sözcüklerinin bileşimi olan “renk yazımı” anlamına gelmektedir⁽⁴⁾. Günümüzde kromatografi, incelenecek karışımın durağan (sabit) faz olarak seçilen katı veya sıvı bir fazın yüzeyine veya içine uygulamasının ardından, sıvı veya gaz olan hareketli (mobil) bir faz aracılığıyla hareket ederken birbirinden ayrılmaları temeline dayanan bir yöntemdir⁽³⁻⁵⁾. Çeşitli özellik farklılıkları sebebiyle (molekül güyüklüğü, moleküler ağırlığı iyon yükü vb.) moleküllerin tutunacağı ve ayrımın gerçekleşeceği sabit faz jel ya da içi özel olarak doldurulmuş kolon olabilmektedir. Kromatografik sistemdeki sabit fazda, moleküllerin tutunma (adsorpsiyon), dağılma (partisyon), iyon değişimi, affinite veya ağırlıklarındaki farklılıklar nedeni ile sabit faz ile etkileşim hız ve düzeyleri farklı olacağı için sabit fazdan çıkışları da yani ayrılma hızları da farklıdır ve bu da bir karışımındaki moleküllerin bir birinden ayrılmasına olanak tanır⁽⁵⁾.

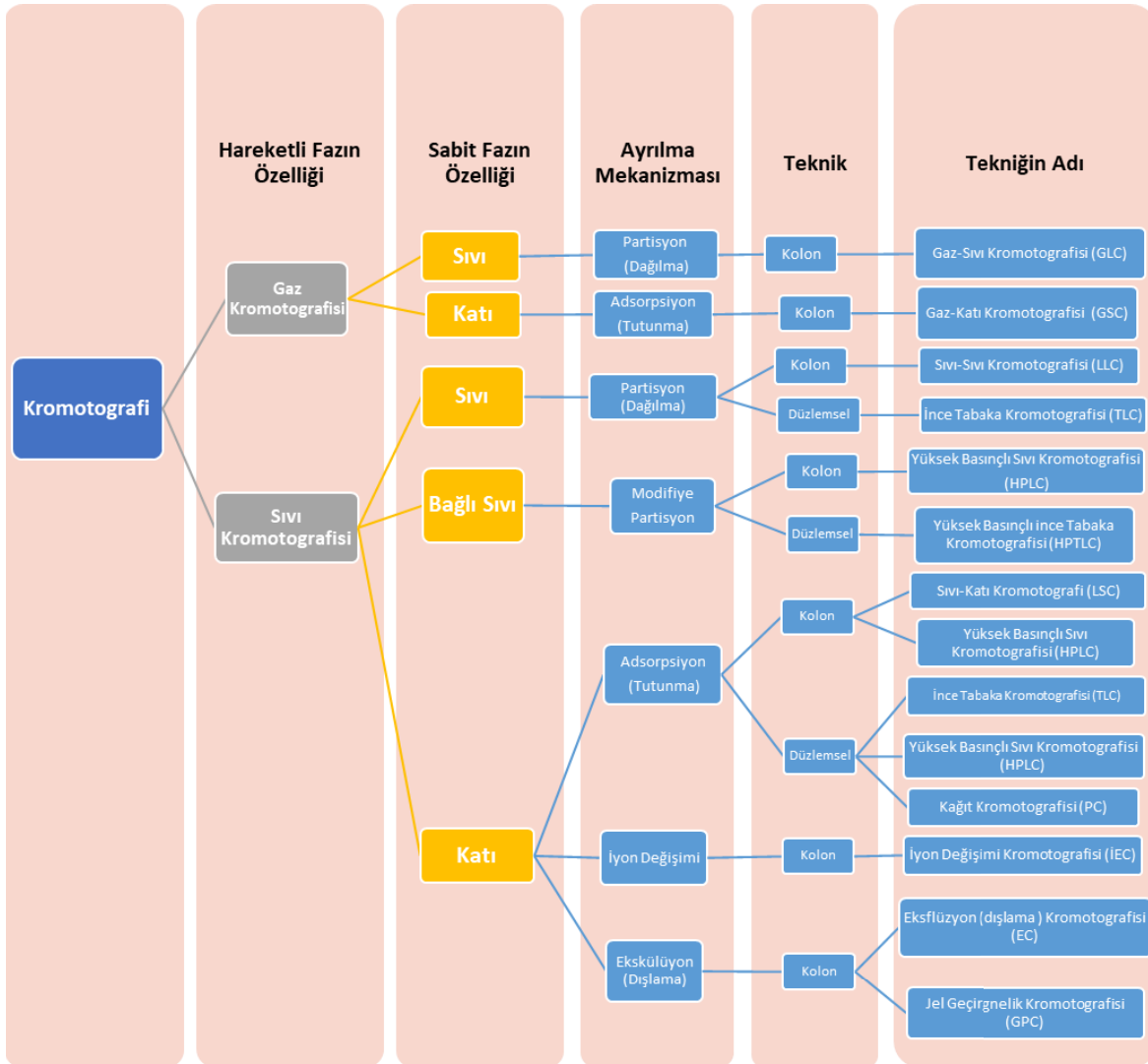


Şekil 1: Kromatografik ayırım örneği

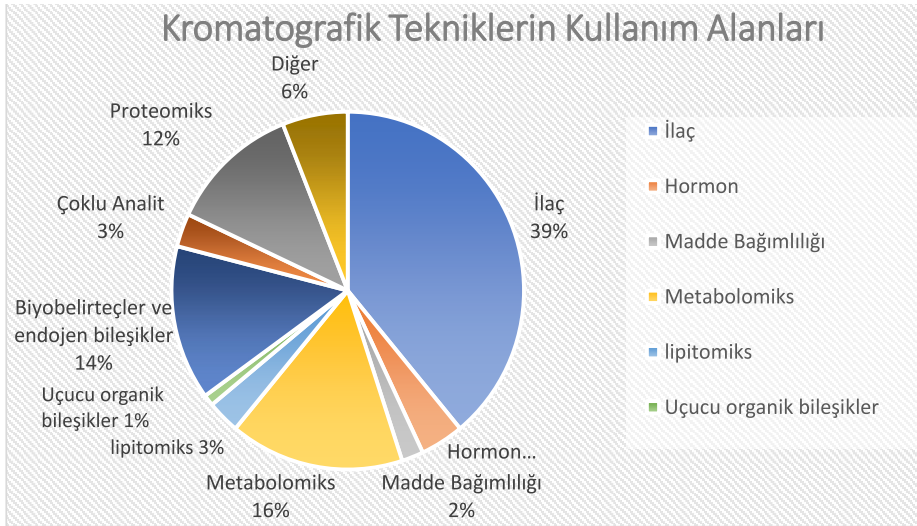
Kromatografi çalışmalarında, metot belirleme ve buna bağlı olarak mobil faz ve sabit faz seçimi ve analizi yapılacak moleküllerin alıkonma aşamaları etkin rol oynayan temel faktörlerdir⁽⁴⁾. Çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip bir çözücü olan mobil faz, numuneyi sabit faz boyunca taşımaktadır. Bunun yanı sıra içerisinde taşınan maddeyi iyi çözmeli ve madde ile istenmeyen etkileşime girmeyecek özellikte olmalıdır. **Mobil faz** seçiminde detektörün özelliklerine, sabit fazın türüne ve analizi yapılacak biyolojik materyalin özelliklerine dikkat edilmelidir. Sabit fazda ise mobil fazla gelen numunenin etkileşime girdiği ve

bir miktar alıkonuldukları fazdır. **Sabit faz** kullanılan tekniğin çeşidine göre çok farklı materyalden, yine farklı ebatlarda tasarlanmış olabilir. Son olarak **alıkonma** işlemi sabit fazda gerçekleşen numunenin içeriğindeki bazı maddelerin belli oranda tutulması sonucu yavaşlaması ile diğer maddelere oranla sabit fazı daha geç terk etmesidir⁽⁴⁾. Belirli analitik koşullar altında her madde kendine özgü alıkonma süresi (RT) bulunmaktadır. Bu süre ve sinyal büyüklüğü temel alınarak maddelerin karışım içindeki nitel ve nicel analizleri sağlanabilmektedir⁽⁴⁾.

Kromatografik teknikler faz tiplerine (sıvı/gaz), ayrılma mekanizmalarına (adsorpsiyon/partisyon/ekslüzyon/iyon değişimi kromatografisi) ve uygulama biçimlerine (düzlemsel/kolon) göre sınıflandırılabilirler. Sınıflandırmalar ve kromatografi tiplerine göre tekniklerin isimlendirilmesi Şekil 2'de verilmiştir. Kromatografik teknikler proteomiks, ilaç, metabolomiks ve biyobeliteç keşfi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Şekil 3)¹. Bu teknikler arasından ürolojik hastalıkların araştırmasında sıklıkla kullanılan yöntemler Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik yöntemlerdir.



Şekil 2: Kromatografi tekniklerinin özelliklerine göre sınıflandırılması⁽⁵⁾



Şekil 3: 2013-2017 tarihleri arasında kromatografinin en çok çalışıldığı alanlar⁽¹⁾.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

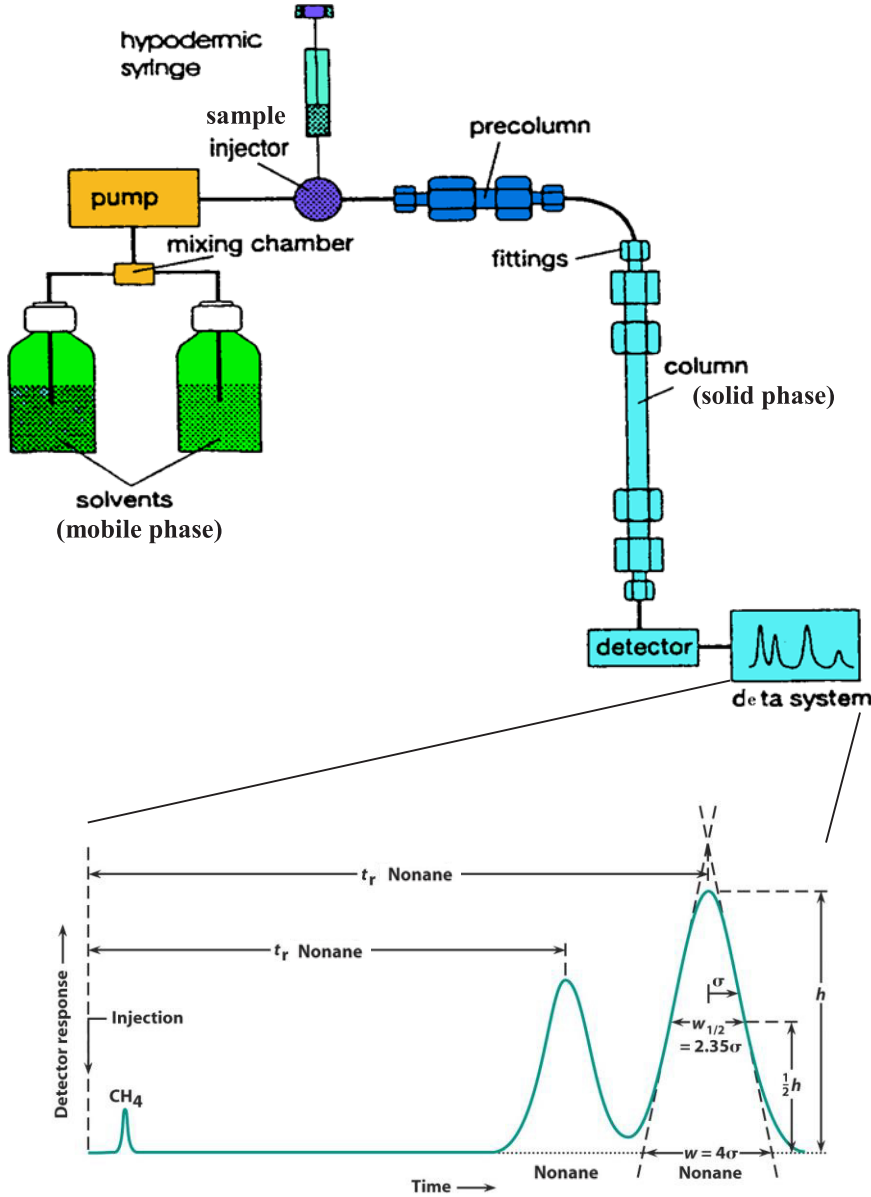
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi, uçucu olmayan bileşenlerin ayrılmasında günümüzde en sık tercih edilen kromatografik yöntemlerindedir. Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir sabit faz ile fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Bu etkileşimler sayesinde kolonu değişik zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tesbit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Sık tercih edilmesinin nedenlerinden biride toksikoloji, endokrinoloji, steroid hormonları ve vitamin analizleri için kullanılan immünoassay analizlerinde ortaya çıkan problemleri çözmektir⁽¹⁾. HPLC analizlerinin spesifikliği, duyarlılığı, analiz süresinin kısalığı ve yüksek verimi ile “omic” bilimlerinin ve referans yöntemlerin gelişmesinde tercih edilen yöntemlerdendir^(1,6). HPLC yöntemi, çözücü bir sıvı içinde çözülmüş örneğin sabit fazın olduğu kolonlara enjekte edilmesinin ardından, bir pompa yardımıyla hareketli olan çözücü bir fazın kolondan geçirilerek sabit fazla yarışması

sonucu ayrılan bileşenlerin tanımlanmasına dayanır. Tanımlama karışımın içeriğine ve araştırılacak moleküle bağlı olarak (nükleik asitler, karbohidratlar, amino asitler, proteinler, ilaçlar, antibiyotikler, steroidler, çeşitli inorganik bileşikler vb.) farklı detektörlerle gerçekleştirilebilmektedir⁽⁴⁾. HPLC cihazı temelde çözücü ve taşıyıcı olan mobil faz, enjektör, pompa, kolon, dedektör ve verileri kaydediciden oluşur⁽⁴⁾ (Şekil 4).

HPLC çalışmalarında analizi yapılacak molekül ve analiz metoduna özgü mobil faz hazırlanması gerekmektedir. Mobil faz ilgili örneği kolona ve dedektöre taşıma görevinin yanı sıra analiti hem iyi çözecek hem de analit molekülleri ile istenilmeyen reaksiyonlara girmeyecek özellikte olmalıdır. Bu nedenle çözücü mobil faz genellikle alkollü (metanol, etanol, izopropanol, etanol/izopropanol 50/50, metanol/izopropanol 50/50) bir karışım olarak hazırlanmaktadır. Organik çözücünün elüsyon gücünü artırmak için alkolün yansıra deney koşullarına ve hedef moleküle uygun olarak alkan veya asetonitrilde kullanılabilir⁽⁷⁾. Bu kimyasalların karışım oranları yine metoda uygun olarak seçilmez. Bu konuda daha önce HPLC çalışmaları yapılmış moleküllerin analizi yapılacaksa literatür taraması ile bu bilgiye ulaşılabilir ya da aksi durumda kullanılacak metod için mobil faz optimizasyon çalışmaları yapılabilir. Mobil faz hazırlığında karışımların hazırlanacağı şişeler dahi

çözücünün polaritesi nedeni ile önemli olup cam veya paslanmaz çelik olmalıdır. Mobil fazın şişe kalitesi, içeriği ve saflığı numuneyi etkilemesi sebebiyle hatalara neden olabilmektedir⁽⁴⁾. Gerekli bileşenlere ve uygun koşullara sahip olan mobil faz, son olarak sıvı karışımındaki kabarcık oluşumunun önlenmesi adına mümkünse ultrasonik banyoda bir süre bekletilmelidir. Mobil fazın kolondan geçmesi esansında içeriğindeki eriyik gazların bulunması, pik genişlemesi veya moleküllerin kolondan çıkış zamanını değiştirmek gibi problemlere neden olacaktır. Ultra sonifikasyon (diğer eriyik gazların çıkarılma yöntemleri; solventlerin ısı muamele yapılması veya helyum gazı verilmesi vb) bu eriyik gazların giderilmesi için en yaygın yöntemlerden biridir⁽⁴⁾. Sıvı kromatografik yöntemlerde, tek bir mobil faz ile analizin yapılamadığı durumlar da vardır. Bu tip analizlerde iki ya da daha fazla türde birbirinden farklı özellik ve karışımlardaki mobil fazların aynı anda ya da belirli zaman aralıklarıyla metoda dahil edilmeleri gerekebilmektedir (ör.: ilk 10 dk A mobil fazı sonraki analiz sürelerinde B mobil fazı gibi). Bu tip analizlere gradiyent analizler, metodda tek bir mobil faz türünün kullanıldığı analizlere ise izokritik analiz adı verilmektedir. Metodun izokritik mi yoksa gradiyent bi olacağı analizi yapılacak molekül ya da karışımların özellikleri belirlemektedir. Tek bir mobil faz ile ayırma yapılamayan karışım örnekleri için ayırmanın daha iyi yapılabilmesi adına gradiyent analizler gerekmektedir.

Sıvı kromatografinin en önemli öğelerinden biri olan pompanın da uygulanacak metod ile uyumlu olması gerekmektedir. Kromatografi sisteminde pompa, numune ve faz karışımının enjeksiyonundan sonra kolon ve dedektör boyunca belli bir akış ile geçmesini sağlamaktadır. İyi bir pompa sistemi sağladığı akışı doğru ve tekrarlanabilir şekilde gerçekleştirebilmeli aynı zamanda yüksek basınç altında çalışabilirken basınç dalgalanmalarının az olmasını sağlayabilmelidir⁴. Ayrıca analizde kullanılacak gradiyent ya da izokritik mobil faz akışına uygun olacak bir pompa sahip olmak da metodun uygulanmasında önemli bir husustur.



Şekil 4: Temel bir HPLC sistemi

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminde, sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun, tanecik yapısının, kolon çapının ve uzunluğunun büyük önemi vardır. HPLC yönteminin geliştirilmesinde analitlerin ayrılması üzerine büyük etkisi olan ögesi kolonlardır⁽⁸⁾. Kolon iç yüzey malzeme farklılıkları daha çok numunenin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin ile uygulanacak yöntem doğrultusunda tercih edilen

mobil faza ve analizi yapılacak moleküle göre seçilmektedir⁽⁴⁾. Analiz yapılacak moleküllerin birbirinden ayrılması için kullanılan kolonların, bu moleküller ile kimyasal ya da fiziksel olarak etkileşebilmesi ve kolon içerisinde kalıcı olarak tutunmadan mobil faz ile kolondan ayrılarak detektöre iletilmesi metodun başarısı için oldukça önemlidir. Bu sebeple analiz için kullanılacak kolonun seçimine özen gösterilmelidir. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi

için basınç uygulanması gerekir. Seçilecek kolonun HPLC uygulamasında kullanılacak akış hızı ve dolayısıyla oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir. Birçok analitik kolonun iç çapı 2-5 mm aralığında değişmektedir.

HPLC kolonlar genel olarak hidrofobik sabit faz ile kaplı olan küre şeklindeki silika jel (polimer veya alümina) paketlerinden oluşur. Silikanın genel olarak tercih edilen matris olma nedenleri, porların istenilen boyutlarda ve tutarlı olarak üretilebilmesi ve basınç uygulandığında sıkışmamasıdır. Ayrıca silikalar kimyasal çözücülerin çoğuna ve çok düşük pH'lara dahi dayanıklıdır. Silika kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeniyle verimliliği de arttırmaktadır⁽⁸⁾. Kolon iç çapı 2-5 mm civarında farklılık göstermekle birlikte çap arttıkça akış hızı artmaktadır ancak duyarlılık azalmaktadır⁽⁹⁾. Duyarlılığı etkileyen bir diğer faktör ise kolon uzunluğudur. 30-300 mm aralığında olabilen kolonlar, uzunluk arttıkça bileşenlerin ayrımı daha iyi olup duyarlılık artsa da harcanan mobil faz miktarı da artmaktadır. Doğru bir analiz için oldukça önemli olan kolon seçiminde geliştirilen uluslararası standart ölçü birimlerine göre kolon uzunluğu ve çapı, partikül büyüklüğü mm, poroz yüzey çapı Ångström cinsinden verilmelidir. Bu özellikleri sabit faz türü ve firma adı izlemektedir^(10,11). Kolon sistemi, kolonun sabit ısıda tutulması sağlıklı bir analiz için önemli olduğundan kolon fırını tarafından desteklenmelidir. İki tip kolon fırını vardır birincisi hava sirkülasyonu ikincisi ise blok ısıtıcıdır. Moleküllerin kolondan çıkma sürelerine bağlı olarak yapılan tanımlama ve miktarı detektörlerce gerçekleştirilir. Kaydedici yardımı ile çıkış süresi ve miktarı kromatogram adı verilen bir grafik oluşturur. Kullanım amacına göre Kütle Dedektörü (Mass dedektor-MS), Floresans Dedektörü (Fluorescence dedektor-FLD), Ultraviyole/Görünür Bölge Dedektörü (Ultraviyole/Visible Dedektor-UV/VIS) ve Elektrokimyasal Dedektör (Electrochemical dedektor-ECD) gibi çok farklı dedektörler bulunmaktadır^(12,4). Analiz metodunda yer alacak dedektörün seçimi de yine dedektörün sağladığı dalga

boyu ile analizi yapılacak moleküllerin etkileşime dayanmaktadır. Örneğin, UV dalga boyundaki ışıkta görünen moleküller için UV Dedektör (yöntem HPLC-UV olarak isimlendirilmekte), Floresans bölgedeki dalga boyunda görünür olanlar için de Floresans Dedektörler kullanılmalıdır (yöntem HPLC-FD olarak isimlendirilmekte). Bu dedektörlerin daha spesifik ve hassas ölçüm yaptıkları çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olup günümüzde en gelişmiş sıvı kromatografik yöntemlerde Kütle Dedektörleri kullanılmaktadır (yöntem LC/MS olarak isimlendirilmektedir).

Sıvı Kromatografi Çalışmaları

HPLC'nin kullanım alanları incelendiğinde genel olarak ilaçların etkili ve minimum yan etkili dozlarının belirlenmesi analizinde, hastalıkların teşhis, tanı ve prognozuna yönelik biyobelirteçlerin keşfinde, metabolomik ve proteomik araştırmalarında kullanılır⁽¹⁾.

Ürolojik kanserlerden renal hücreli karsinom (RCC) metabolomik çalışmalarında son yıllarda en çok tercih edilen metabolik hastalıklardan biridir. Özellikle non-invaziv olarak idrara yansıyan metabolik durum hastalığının ilerlemesinde evreler arasındaki farklılıkları tanımlamak, ölçmek ve anlamak için biyobelirteçlerin keşfinde önemli bir strateji olarak değerlendirilmektedir⁽¹³⁾. RCC hastalarının idrarlarında çalışılan ve LC-MS ve GC-MS kullanılan bir metabolomik çalışmada kinolinat, 4-hidroksibenzoat ve gentisat ifadelerinin farklılık gösterdiği keşfedilmiştir⁽¹⁴⁾. 2012'de böbrek kanserinde yapılan metabolomik çalışmada ise bazı asikarnitin türlerinin kanser hastalarının genelinde artmış olduğu gözlemlenmesine dayanarak, idrarda asikarniti seviyelerinin kanserin durumu ve derecesi hakkında önemli ipuçların sahip olabileceğini bildirmişlerdir⁽¹⁵⁾.

HPLC yöntemi ile ilaç etki mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışmada, flovastatin, statin ailesine ait olan kolesterol düşürücü bir ilaç, HMG-CoA redüktazın (HMGCR) hız sınırlayıcı enzimini bloke ederek kanser hücrelerinde apoptozu tetiklediği bildirilmiştir¹⁶. Farklı prostat kanseri hücre

hatlarına uygulanan flovastatin sonrası canlılık ve apoptoz deneyleri yapılmış, ek olarak taze fare prostat dokularından flovastatin seviyelerinin HPLC analizini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonrası hiçbir apoptotik tetiklenme gözlemlenmemekle birlikte sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein 2'nin (SREBP2) upregülasyonu sonucu kanser hücre ölümlerinin engellendiği öne sürülmüştür⁽¹⁷⁾.

Prostat kanserinde yeni bir Gleson skoru (GS) biyobelirtecinin keşfi için yapılan proteomik çalışmada, 18 erkeğin (negatif biyopsi [n = 6], GS 6 PCA [n = 6] veya GS 8-9 PCA [n = 6]) idrarlarında hücre dışı veziküllerde bulunan 3528 protein ve LC-MS / MS ile çalışılmış ve bunlardan 11 tanesi seçilmiştir. 11 protein daha sonra aynı 18 hasta ile 11 kontrol bireyinde doğrulandıktan sonra bu proteinlerden yağ asidi bağlayıcı protein 5 (FABP5) kanser grubunda negatif gruba göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma hücre dışı veziküler proteinlerden FABP5'in yüksek GS PCA'li hastaları için biyobelirteç olarak öne sürmüşlerdir⁽¹⁸⁾.

Kaynaklar

1. Kočová Vlčková, H. *et al.* Current state of bioanalytical chromatography in clinical analysis. *Analyst* vol. 143 1305–1325 (2018).
2. Denoroy, L., Zimmer, L., Renaud, B. & Parrot, S. Ultra high performance liquid chromatography as a tool for the discovery and the analysis of biomarkers of diseases: A review. *J. Chromatogr. B* 927, 37–53 (2013).
3. Di Meo, A., Bartlett, J., Cheng, Y., Pasic, M. D. & Yousef, G. M. Liquid biopsy: A step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Molecular Cancer* vol. 16 (2017).
4. Eser, B. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *J. Heal. Serv. Educ.* 2, 51–57 (2018).
5. Yılmaz, S., Öztürk Sezgin, M. & Dağıstanlı, F. *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri Genomik ve Proteomik Analizler*. (Nobel Tıp Kitabevleri, 2018).
6. Salvagno, G. L., Danese, E. & Lippi, G. Preanalytical variables for liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of human blood specimens. *Clinical Biochemistry* vol. 50 582–586 (2017).

7. Speybrouck, D., Corens, D. & Argoullon, J.-M. Screening Strategy for Chiral and Achiral Separations in Supercritical Fluid Chromatography Mode. *Curr. Top. Med. Chem.* 12, 1250–1263 (2012).
8. Gupta, V., Deep, A., Jain, K., Gill, N. S. & Gupta, K. *Development and validation of HPLC method-a review. Int. Res J Pharm. App Sci* vol. 2 www.irjpas.com (2012).
9. Miller, J. M. Chromatography. in *digital Encyclopedia of Applied Physics* 1055–1102 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009). doi:10.1002/3527600434.eap064.pub2.
10. Aguilar, M. I. HPLC of peptides and proteins: basic theory and methodology. *Methods Mol. Biol.* 251, 3–8 (2004).
11. Practical HPLC Method Development, 2nd Edition | Wiley. <https://www.wiley.com/en-us/Practical+HPLC+Method+Development%2C+2nd+Edition-p-9780471007036>.
12. (PDF) BASIC SKILLS TRAINING GUIDE -HPLC method development and validation- an overview. https://www.researchgate.net/publication/256561891_BASIC_SKILLS_TRAINING_GUIDE_-HPLC_method_development_and_validation_-an_overview.
13. Liu, X. *et al.* Urine Metabolomics for Renal Cell Carcinoma (RCC) Prediction: Tryptophan Metabolism as an Important Pathway in RCC. *Front. Oncol.* 9, 663 (2019).
14. Kim, K. *et al.* Urine metabolomic analysis identifies potential biomarkers and pathogenic pathways in kidney cancer. *Omi. A J. Integr. Biol.* 15, 293–303 (2011).
15. Ganti, S. *et al.* Urinary acylcarnitines are altered in human kidney cancer. *Int. J. Cancer* 130, 2791–2800 (2012).
16. Clendening, J. W. & Penn, L. Z. Targeting tumor cell metabolism with statins. *Oncogene* vol. 31 4967–4978 (2012).
17. Longo, J. *et al.* An actionable sterol-regulated feedback loop modulates statin sensitivity in prostate cancer. *Mol. Metab.* 25, 119–130 (2019).
18. Fujita, K. *et al.* Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles from high Gleason score prostate cancer. *Sci. Rep.* 7, (2017).
19. Jacyna, J. *et al.* Urinary metabolomic signature of muscle-invasive bladder cancer: A multiplatform approach. *Talanta* 202, 572–579 (2019).



Hücre Kültürü Temel Teknikleri

**Dr. Elif Sinem İPLİK ve
Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU**

Hücre kültürü, prokaryotik, ökaryotik veya bitki hücrelerinin kontrollü koşullar altında büyüme sürecine verilen isimdir. 1885 yılından beri günümüzdeki bilimsel gelişmeler doğrultusunda yeni tekniklerin geliştirilmeye devam ettiği, bazı araştırmalar için ön çalışma niteliğinde, bazı araştırmalar için de temel çalışma niteliğinde tercih edilen uygulamalar barındırmaktadır.

Tarihsel sürece bakıldığında; ilk çalışma 1885 yılında Roux tarafından embriyonik civciv hücrelerinin vücut dışında serum çözeltisi içinde canlı kalmaları üzerinedir. 1952 yılında Gey ve arkadaşları insan serviks kanser hücrelerinden bir hücre hattı elde ettiler. Bu hat daha sonra HeLa adıyla tanınmıştır⁽¹⁻³⁾.

HeLa hücre hattının ardından günümüz teknolojileri ile bir çok kanserli ve/veya sağlıklı dokudan izole edilen ve ticari olarak temin edilebilecek hücre hattı bankaları oluşturulmuştur. Bilimsel çalışmalar için oldukça avantaja sahip hücre kültürü çalışmaları in vivo çalışmalara alt yapı niteliği taşımakta ve araştırmacının kurabileceği hipotezler için ön çalışma bulgularının elde edilebileceği temel teknikler barındırmaktadır.

Hücre kültürü tekniklerinin kullanım alanı genel olarak; temel hücre biyolojisi ve hücreler üzerindeki ilaç etkileşimlerinin araştırılması gibi model sistemler, ilaç toksisite testleri, çeşitli kimyasalların ve/veya bitkisel ajanların gerek sağlıklı gerek kanser hücreleri üzerinde etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarında, aşı üretimi dahil biyoteknolojik yöntemlerin araştırılması, ticari protein üretimi gibi geniş bir araştırma yelpazesi sunmaktadır.

Adherent ve Süspense Hücre Kavramı

Hücreler beslenme ortamlarında büyüme özelliklerine göre ikiye ayrılır; adherent ve

süspense hücre kültürü^(4,5). Çoğunlukla solid dokulardan izole edilen adherent hücreler büyüme ortamlarında yüzeye tutunarak gelişim gösterirler. Bu tutunma hücrelerin adhezyon (tutunma) molekülleri ile gerçekleşir.

Kan ve kemik iliğinden izole edilen hücreler büyüme ortamına alındıklarında herhangi bir yüzeye yapışma ihtiyacı duymadan büyüme gösterirler. Buldukları beslenme ortamında süspense halde (dağınık) bulunurlar. Bu tip hücreler de süspense hücreler olarak adlandırılır.

Laboratuvar şartlarında bilimsel çalışmada kullanılan hücrenin karakterinin bilinmesi, uygulanacak olan beslenme, pasajlama, dondurma gibi temel teknikleri etkileyeceğinden oldukça önemlidir.

Hücre Kültüründe Çalışılan Hücrelerin Morfolojik Özellikleri

Hücreler şekil ve görünüşlerine göre 3 ayrı tipte morfolojik özellik gösterir; fibroblastik (fibroblast benzeri) hücre, epiteliyal hücre, lenfoblast benzeri hücre^(4,6).

- Fibroblastik hücreler; bipolar veya multipolar, uzamış forma sahip olup yüzeye tutunarak büyürler. Mikroskop altında incelendiğinde uzun iplikleri andıran bir görüntüye sahiptir.
- Epiteliyal hücreler; poligonol şekilde ve çokgen, kare, dikdörtgen gibi geometrik ebatları andıran bir morfoloji sergiler ve yüzeye tutunarak büyürler.
- Lenfoblast hücreler; yuvarlak küreler şeklinde süspense halde büyürler. Mikroskop altında incelendiğinde üzüm tanelerini andıran bir görüntüye sahiptir.

Laboratuvarda kullanılan hücrenin morfolojik karakterine hakim olmak kontaminasyon riskini takip etmek açısından önemlidir. Aynı anda farklı çalışmaların yer aldığı bir inkübatör kullanım düzeninde morfolojileri farklı hücrelerle çalışırken çapraz kontaminasyon dediğimiz farklı hücrelerin birbiri ile kontamine olması durumu mikroskop altında ayır edilebilir. Ancak yine aynı inkübatörde aynı morfolojije sahip ayrı hücre hatları ile çalışılıyorsa

görsel olarak aynı tipte görüneceklerinden çapraz kontaminasyon ayır edilemez.

Aseptik Teknikler ve Çalışma Ortamı

Hücre kültürü çalışmalarında, laboratuvar ortamında canlı dokular ve/veya canlı dokulardan izole edilen hücreler ile çalışılması, toksik olabilecek solüsyonların, mutajenik bileşiklerin veya spesifik ajanların kullanılması gerek çalışmanın güvenliği gerekse araştırmacının güvenliği açısından aseptik tekniklerin uygulanmasını zorunlu kılmaktadır^(7,8). Bu nedenle çalışırken hücrelerin kontamine olması dışında uygulamayı yapan kişi için de laboratuvar kazaları meydana gelebilir; kimyasal maddelerin dökülmesi, sıringa ve bistüri kesi kazaları, enfeksiyöz aerosollerin inhalasyonu gibi. Bir hücre kültürü laboratuvarında uygulamayı yapan personelin güvenliği ve araştırmacının steril koşullarda edebilmesi (kontaminasyon riskini en aza indirmek) için dikkat edilmesi gereken en önemli davranış standart mikrobiyolojik tekniklerin ciddiye alınarak davranış modeli olarak benimsenmesidir^(7,8).

Hücre kültürü çalışmalarında yaşabilecek büyük problemlerden biri mikroorganizma kontaminasyonudur. Bakteri, mikoplazma, maya ve mantar sporları kişi, hava, çalışma yüzeyi, solüsyonlar ve diğer bir çok kaynakla taşınabilir. Bu kontaminantlardan kaçınmak ve riski en aza indirmek için aseptik teknikler kullanılmalıdır. Aksi takdirde kontrol altına alınamayacak bir kontaminasyon haline gelmesi tüm laboratuvarı enfekte edecek kadar büyük olabilir⁽⁸⁾.

Hücre Kültürü Uygulamalarında Besiyeri ve Fizyolojik Faktörler

Hücre kültürü uygulamalarında temel teknikler standart olup bazı koşulların zorunlu olarak kontrol altında tutulması gerekmektedir. Zorunlu olarak kontrol edilmesi gereken bu konular; hücrelerin sağlıklı bir ortamda büyümelerini sağlayacak olan hücrenin ihtiyacını karşılayacak olan besiyeri, optimum sıcaklık, pH, O₂ ve CO₂ yoğunluğudur^(4,9,10).



Besiyerleri, hücrelerin normal metabolik faaliyetlerini sürdürmeleri ve sağlıklı büyümelerinin sağlanması için gerekli olan karbonhidratı aminoasit, vitamin, mineraller gibi besleyici mikroçevreyi oluşturan solüsyonlardır. Laboratuvar ortamında hücrelerin çoğaltılabilmesi için optimum pH, optimum sıcaklık ve nemin sağlanması çok önemlidir. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki iyonlarla gerekli ozmolarite ve pH'ı da sağlarlar^(4,9,10). Araştırmada kullanılan hücrenin karakteristik özelliklerine, adaptasyon kabiliyetine ve hücre kaynağı organizmanın türüne göre farklılık gösterir. Hücreler farklı besiyerlerinde farklı davranabilirler. Bu yüzden çalışmanın amacına göre araştırmada kullanılan hücre tipine göre hücrenin besiyeri ihtiyaçlarının belirlenmesi gerekir⁽¹¹⁾. Hücre çeşidine ve araştırma konusundaki uygulamalara göre hücrelerin beslenme ortamlarına %10 oranında serum çözültisi eklenmelidir. Serum, hücrelerin tutunma ve çoğalmalarına yardımcı hormonlar, enzimler, büyüme faktörleri, matris proteinleri içeren zengin bir protein çözültisidir⁽¹¹⁻¹⁵⁾. Yetişkin sığır, fetal sığır, dana, at ve insan serumlarından hazırlanan çeşitli serumlar bulunmaktadır. Bunlar arasında en sık ve yaygın kullanılan serum; fetal sığır serumudur (Fetal Bovin Serum FBS). İçerikleri tam olarak paylaşılmayan bu serumlar hücreler üzerinde farklı etkiler gösterebileceğinden bu dezavantajı elemine etme yolu olarak bazı laboratuvarlar serum kullanmamayı tercih etmektedir^(14,15). Araştırmacı çalışmasında serum kullanımı ve serumun türü (köken alınan canlı) ile ilişkili herhangi bir dezavantaj yaşamak istemiyorsa tutunma ve büyüme faktörleri ile besiyerini serumsuz olarak zenginleştirebilir^(4,15). Bu da araştırmacıyı her hücre ve hücreye özel besiyeri için optimizasyon çalışmasına itecektir. Bir diğer çözüm yolu da tek tip serum seçilerek hücre kültürü laboratuvarı için standardize edilmesidir. Besiyeri içine kontaminasyona karşı sınırlı süre etkili olsa da (hücre büyüme koşulu olan 37°C'de stabiliteyi bozulabileceğinden) deneysel parametreleri etkilemeyecekse antibiyotik çözültileri de

eklenmektedir. Bu antibiyotikler arasında sıklıkla kullanılanlar gentamisin (5-10 mg/ml) ve penicilin-streptomisindir (10 mg/ml). Hücrelerin büyüme ve çalışma koşulları için uygun sıcaklık, hücrelerin izole edildiği dokunun vücut içi sıcaklığı ile bağlantıdır. Bu bağlamda araştırmalarda sıcakkanlı hayvan dokularından elde edilen hücrelerle çalışırken uygun sıcaklık koşulu 37°C'dir. Yüksek sıcaklık hücreler üzerinde olumsuz etkinin yanısıra düşük sıcaklık koşulları da ortamdaki CO₂ çözünürlüğünü arttırarak pH değişimine neden olur. Sonucunda da hücreler üzerinde büyüme ve gelişme baskılanmaktadır⁽⁹⁾. CO₂ ve HCO₃⁻ dengede tutularak besiyerinde pH sabitlenmesi yapılmaktadır. Hücreler için optimum pH7,2 - 7,4 olduğundan bu aralıkların aşağı ve/veya yukarı oynaması yine hücreler üzerinde olumsuz etki yaratacağından inkübatörün CO₂ koşullarının ve besiyerinin pH'sının ara ara kontrol edilmesi gerekmektedir^(9,11,14). Uygun şartların sağlanması ve kontrollerinin düzenli olarak yapılması gerek laboratuvarında yürütülen araştırmanın akıbeti gerekse stoklanan hücrelerin ileriki zamanda kullanılacak olan araştırmaların akıbeti için oldukça önem arz etmektedir.

Temel Teknikler; Hücre Çözme, Besiyeri Değiştirme (Beslenme), Alt Kültürleme (Pasajlama) ve Hücre Dondurma

Hücre kültürü çalışmalarında düzenli olarak sırasıyla hücre çözme, besiyeri değiştirme (beslenme), alt kültürleme (pasajlama) ve hücre dondurma olmak üzere dört temel işlem uygulanmaktadır⁽⁴⁾. Hücre kültürüyle ilgili bütün işlemler, steril oda içerisinde gerçekleştirilir. Çalışmaya başlamadan ve bitirdikten sonra laminar kabinin ve kabin içine konacak her maddenin %70 EtOH alkol ile temizlenmesi gerekmektedir. Çalışmalar bittiğinde kabin ve oda UV verilme sureti ile steril edilmelidir.

Hücre Çözme

Ticari olarak satın alınmış veya laboratuvarında stoklanmış hücrelerin çalışmaya dahil olan deneylere başlamadan önceki

ilk adımıdır. Hücreler sağlıklı dondurma koşullarının ardından stoklandıkları alandan (azot tankı, -196 °C dondurucu, -80°C dondurucu vb.) alınarak çözme protokolü kullanılarak çözülür ve 37°C'de inkübatörde büyümeye bırakılır. Bu aşamada ilk kural kullanılacak hücrenin kryotüpü saklama koşulundan alınarak kademeli olarak ısı değişimine geçmesi için 1-2 saat ara ısılarda (-80°C, -40°C, -20°C gibi) bekletilmesidir. Ardından kullanılacak hücreye uygun besiyeri optimize edilen oranlarda serum ve antibiyotik ilavesi yapılarak 37°C su banyosunda ortalama 10-15 dk bekletilerek ısıtılır. Hücrenin kryotüpü kapak kısmı su içine batmayacak/değmeyecek şekilde tutularak yaklaşık 90-120sn içinde çözülmesi beklenir. Çözülen kryotüpte hücrenin besiyeri ortamına %5-%10 oranında kryoprotektan olarak eklenmiş dimetilsülfoksit (DMSO) ve doldurulurken belirlenmiş sayıda (10⁶ hücre/ml) hücre yer almaktadır. DMSO'nun toksik etkisini azaltmak amacı ile falkonlara hücre besiyeri eklenir ve üzerine çözünen kryotüp içeriği pipetlenir. Falkonlar hücre tipine göre değişmekle birlikte yaklaşık 1000-1800 rpm devirde 5-7 dk sürede santrifüj edilir. Pellet ve supernatant kısım ayrılarak hücre sayılır ve hücreler uygun görülen boyuttaki flaskalara (büyüme ortamı) aktarılır besiyeri içinde büyütülür. Bu işlem artık hücre çözmenin ardından hücre ekimi adımıdır.

Besiyeri Değiştirme (Beslenme)

Besiyeri değiştirme basamağının, hücre kültürü temel tekniklerinde rutin olarak uygulanan ve hücrelerin sağlıklı olarak büyütülmesi, stoklanması için hücre ile çalışılan süre boyunca düzenli yapılması gerekmektedir. Hücreler, uygun koşullar altında (37°C CO₂'li inkübatörde), flaskalarda (büyüme ortamı) yeterli büyüklüğe ve yoğunluğa ulaşana kadar büyütülürler. Bu süre boyunca hücreler besiyeri ortamından gerekli besinleri alarak metabolik faaliyetlerini sürdürür, bölünürler ve pasajlanacak aşamaya gelirler. Ancak hücrenin karakter özelliklerine bağlı

olarak bu yoğunluğa ulaşıp pasajlanacak hale gelmeleri için gerekli süre 24-72 saat aralığında değişkenlik göstermez. Bu süre içinde besiyeri ortamının pH'sı değişmeye başlar. pH değişimi hücrelerin büyümeleri üzerinde olumsuz etki yaratacağı için beslenme ortamının tazelenmesi ile kontrol altında tutulur. Hücrelerin tutunma özelliklerini kazanmadan bir diğer deyişle erken besiyeri değişimine gidilmemesi gerekmektedir. Aksi takdirde henüz tutunmamış canlı hücreler değiştirilecek olan besiyeri ile birlikte ortamdan uzaklaştırılmış olur. Bunun kontrol altına alınması için mikroskop takibinin düzenli yapılması ve hücrenin morfolojisi takip edilmelidir.

Düzenli ve gerekli aralıklarla besiyeri değişimi, hücrelerin sağlıklı koşullar altında büyümesine ve aynı zamanda büyüyemeyen ve tutunamayan hücrelerin besiyeri değişimi sırasında elenerek uzaklaştırılması açısından da oldukça önemlidir. Dolayısı ile hücrelerin besiyeri değiştirme sıklığı pH değişimi, flask içerisindeki hücrelerin konsantrasyonu, karakteristik özellikleri ve morfolojik şekillerinin takibi yapılarak gerçekleştirilmelidir.

Alt Kültürleme (Pasajlama)

Hücreler karakteristik özelliklerine bağlı olarak kendilerine özgü bir hızda bölünerek sayılarını ikiye katlarlar. Bu ikiye katlanma zamanı (doubling time) genellikle 24 saattir. Sağlıklı hücreler, belirli bir inkübasyon süresi sonunda, buldukları kabın içerisine tutunarak kabın alanını kaplayacak yoğunluğa ulaşırlar. Bu yoğunluk yeniden bölünecek hücrelerin tutunacak yüzeyi kalmadığını ve hücrelerin buldukları flaktan kaldırılarak yeni büyüme ortamlarına alınması gerektiğini göstermektedir.

Adherent hücrelerin alt kültür işlemi için ortamın uzaklaştırılması ve hücrelerin Tripsin-EDTA ile ayrıştırılmasını gerektirir. Hücrelerin birbirine ve kültür tabanına tutunmasına hücre üzerindeki glikoproteinler, Ca²⁺ ve diğer iyonlar aracılık eder. Hücre ve serum kaynaklı diğer proteinler ve proteoglikanlar

hücre ve kültür tabanı ile etkileşip hücre adhezyonunu kolaylaştırırlar. Alt kültürme işleminde tutunan hücrelerin kaldırılması hücre adhezyon ve ekstraselüler matriks proteininin bozunmasını gerektirir. Bu sebep ile, uygulamanın sertliği hücre türüne bağlıdır ve yüksek canlılık sağlayan en verimli protokol seçilmelidir. Optimize edilen miktarda ve inkübasyon süresinde Tripsin-EDTA, eski ortamından arındırılmış ve dPBS ile muamele edilmiş flaskların içine uygulanır ve akvitesini maximum seviyede göstermesi beklenir. Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler, serumun enzimin inaktivasyonunu sağlama özelliğinden faydalanılarak, serumlu besiyeri ile kabın içerisinden alınır ve santrifüj edilir. Pellet ve süpernatant ayrılarak hücreler sayılır ve yeni büyüme ortamlarına istenilen sayıda aktarılır ve pasaj etiketleme yapılır. Süspanse hücrelerde tutunma, yapışarak büyüme gibi bir özellik bulunmadığından bir diğer deyişle hücreler besiyeri içinde süspanse ve dağınık halde bulunduğundan alt kültürme işleminde Tripsin-EDTA uygulanmamaktadır. Hücreler flask içerisinden besiyeri ortamı ile birlikte alınarak direk olarak santrifüj edilir. Pellet ve süpernatant ayrılır ve hücreler yeni büyüme ortamlarına aktarılır.

Hücre Dondurma

Hücreler kültür koleksiyonu oluşturmak, yeni araştırmalarda kullanılmak, aynı araştırma içinde ek deneysel metotların uygulanabilmesi gibi çeşitli sebepler ile dondurularak saklanmaktadır. Bu aşamada hücre içi metabolik aktivitenin yavaşlaması, durması gerekmektedir. Yaklaşık -79°C'de metabolik aktivite yavaşlar ve -196°C'de minimum düzeye iner. Bu bilgi ışığında stoklanacak hücrenin, soğutma hızı ve derecesinin kademeli olarak ayarlanması termal şok ve hücre hasarının önlenmesi açısından önemlidir. Bu bağlamda uzun süreli ve en sağlıklı stoklama işlemi için tercih edilen -196°C azot tankları olmalıdır. Kademeli olarak yapılacak dondurma ve stoklama işleminin bir diğer önemi de hücre içi ve hücre dışı sıvıların donarken dengesiz kristalleşmesinin önüne geçer-

ek hücre membran yapısına ve hücre içine verilecek zarardan kaçınılmasıdır. Bu sebep ile hücreler, dondurma ve çözündürme işlemlerinde maksimum verim için kryoprotektan denilen bağlayıcı, koruyucu kimyasal ajanlar ile kristalizasyon hızını yavaşlatarak ozmatik basınç hasarına neden olmadan dondurulur. Kryoprotektanlar hücre membranından geçebilme özelliklerine göre ikiye ayrılırlar; hücre membranından geçebilen (permeating) ve hücre membranından geçemeyen (non-permeating). DMSO, gliserol, etilen glikol (EG), 1,2 propanediol, 2,3 bütanediol, propilen glikol vb. bazı alkoller hücre membranından geçebilen, hücre içine nüfuz edebilen ajanlar olarak sayılabilir. Hücre membranından geçemeyen ajanlar için ise glikoz, sükroz, trehaloz, polivinil alkol (PVA), polivinil pirrolidon (PVP) vb. bazı polimerler örnek verilebilir. Son yıllarda kombine kryoprotektanların kullanılması üzerine çalışmalar da yapılmaktadır ⁽¹⁵⁾.

Hücre Kültürü Temel Teknikleri Genel Bakış

Geçmişten günümüze, deneysel çalışmaların vizyonu ve deneysel çalışmalarda kullanılan yöntemler gelişen teknoloji ile birlikte artmaktadır. Hücre kültürünün de tarihsel sürecine baktığımızda bugün biyoteknolojik yöntemlerle iç içe in-vitro ve in-vivo çalışmalar ile aşı ve ilaç, teşhis ve tedavi, toksisite ve biyoyarlanım gibi ana başlık altında çalışma yapmak mümkün. Bu avantajın yanı sıra ticari olarak erişilebilen sağlıklı ve kanserli hücre hatları çeşitliliği de artmaktadır. Örneğin, Kim ve arkadaşları 2019 yılında mesane kanseri hücre hattı ile yaptıkları çalışmada üç boyutlu bir biyoçevre oluşturarak tümörün karakteristik özelliklerini oluşturmuş ve mesane kanseri-ilaç ilişkili çalışmalarda kullanılabileceğini önermiştir ⁽¹⁶⁾. İdrar yolu sistemi üretral hücrelerin doku yenilenmesi ve yara iyileşmelerini derleyen bir çalışmada çeşitli izolasyon teknikleri, kültür metotları tartışılmış ve gelişen teknolojiye uyum sağlayan doku yenilenme tekniklerine de yer verilmiştir ⁽¹⁷⁾.



Hücre kültüründe temel tekniklerin bilinmesi ve uygulanması, hastalığın mekanizması, patolojisi gibi önemli konuların cerrahi ve klinik bilgi ile birleştirilmesi ile yeni tekniklerin oluşturulabilmesi ve uygulanabilirliğinin araştırılmasında büyük önem taşımaktadır.

Kaynaklar

1. De Ridder L, Mareel M. Morphology and 125I-concentration of embryonic chick thyroids cultured in an atmosphere of oxygen. *Cell Biol Int Rep.* 1978;2:189-94.
2. Gartler SM. Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines. *Nature* 1968;217(5130):750-1.
3. Harrison RG. Observations on the living developing nerve fibers. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1907;4:140-3.
4. Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol.* 2017;16(2):99-117.
5. Stulberg, C. S., L. L. Coriell, A. J. Kniazeff, and J. E. Shannon. 1970. The animal cell culture collection. *In Vitro* 5: 1-16.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (Eds.). Isolating cells and growing them in culture. In: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, 2002.
7. Markovic O, Markovic N. Cell cross-contamination in cell cultures: the silent and neglected danger. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998;34(1):1-8.
8. Nardone RM. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action. *Cell Biol Toxicol* 2007;23(6):367-72.
9. Koçaklı ZG, Akıllıoğlu K, Doğan A. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü *Archives Medical Review Journal* 2015; 24(3):390-401
10. Butler M, Christie A. Adaptation of mammalian cells to non-ammonogenic media. *Cytotechnology.* 1994;15:87-94.
11. Eisenblatter T, Psathaki K, Nitz T, Galla H, Wegener J. Cell culture media: selection and standardization. In: Lehr CM, ed. *Cell Culture Models of Biological Barriers In-Vitro Test Systems for Drug Absorption and Delivery.* London: Taylor & Francis; 2002:20-40.
12. Forte TM, Bell-Quint JJ, Cheng F. Lipoproteins of fetal and newborn calves and adult steer: a study of developmental changes. *Lipids.* 1981;16:240-245
13. Freshney RI. Defined media and supplements. In: Freshney RI, ed. *Culture of Animal Cells.* Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 2010:99-114.
14. Van der Valk J, Brunner D, De Smet K, et al. Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro.* 2010;24:1053-1063.
15. Halle P, Tournilhac O, Knopinska-Posluszny W, et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80 degrees C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. *Transfusion.* 2001;41(5):667-673.
16. Kim MJ, Chi BH, Yoo JJ, Ju YM, Whang YM, Chang IH. Structure establishment of three-dimensional (3D) cell culture printing model for bladder cancer. *PLoS One.* 2019;14(10):e0223689.
17. Zhang Y, Atala A. Urothelial cell culture. *Methods Mol Biol.* 2013;1037:27-43.

“Northern Blotlama” ve “Southern Blotlama” Teknikleri

Dr. Özlem KURNAZ GÖMLEKSİZ

HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİ

In vitro şartlarda bir genom içindeki belli bir gen parçasını veya belli bir DNA dizisini tespit etmek amacıyla kullanılan hibridizasyon yöntemi için DNA dizisinin komplementeri olan problar kullanılır. Prob radyoaktif veya kimyasal madde ile işaretlenmiş tek iplik şeklindeki nükleik asit parçasıdır. In vitro nükleik hibridizasyon işlemleri DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNA hibridleri oluşturabilir. Hibridizasyon işaretini almak için otoradyografi tekniği uygulanıp hibridizasyonun gerçekleştiği bölgede röntgen filmi üzerinde bir iz (leke, blot) ortaya çıkar. Bu teknik Blotlama olarak da isimlendirilmektedir.

NORTHERN ve SOUTHERN BLOTLAMA TEKNİKLERİ

Modern moleküler biyolojinin temel taşlarından biri olan blotlama, bir örnek içindeki spesifik biyomoleküllerin varlığını tanımlamak için güçlü ve hassas bir tekniktir. Southern, Northern ve Western Blotlama gibi bu yöntemler, RNA, DNA ve proteinler gibi farklı makromolekül tipleri için geçerlidir. Her teknik, molekülün boyutu ve katı desteğe bağlanma kabiliyeti gibi faktörlere bağlıdır. Tekniklerin son aşamasında, prob kullanarak ilgili molekül tespit edilmektedir.

Blotlamanın alt tipleri, aranmakta olan hedef molekül tarafından ayırt edilir. Geliştirilen bu tekniklerden ilki, onu belirli DNA dizilerini tespit etmek için geliştiren Dr. Edwin Southern adıyla anılan Southern Blotlamadır⁽¹⁾. Daha sonra yöntem, diğer hedef molekülleri tespit etmek için modifiye edilmiştir. Bu tekniklerin isimlendirilmesi Dr. Southern isminden yola çıkılarak RNA molekülünün tespiti için Northern Blotlama, proteinlerin tespiti için ise Western Blotlama olarak yapılmıştır.

Blotlama teknikleri moleküler biyoloji boyunca yaygındır. Prensipinde, bir jelde gözenekli bir selüloz nitrat veya naylon membran filtresine ayrılmış DNA, RNA veya proteinlerin kılcal veya elektroforetik transferini (blotlama) içerirler⁽²⁾.

SOUTHERN BLOTLAMA

Belirli bir dizinin DNA fragmanlarını tespit etmek için geliştirilen ilk hibridizasyon tekniğidir. Bu teknik, tüm insan genomunun bir restriksiyon enzimi ile kesilmesiyle üretilen son derece karmaşık fragmanlar karışımında tek bir spesifik restriksiyon fragmanını saptayabilir. Farklı boyutlardaki DNA fragmanlarını ayırmak için jel elektroforezi yöntemi kullanılır. Nötr pH civarında, DNA molekülleri büyük bir negatif yük taşır ve bu nedenle jel elektroforezi sırasında pozitif elektroda doğru hareket eder. Jel matrisi rastgele difüzyonu kısıtladığından, aynı uzunluktaki moleküller farklı bantlar olarak birlikte hareket eder. Daha küçük moleküller jel matrisinde daha büyük moleküllerden daha kolay hareket eder. Yaklaşık 200 bp ile 20 kb'den daha büyük DNA molekülleri, agaroz jeller üzerinde elektroforetik olarak ve daha küçük DNA molekülleri (yaklaşık 10 ila 2000 bp) poliakrilamid jeller üzerinde ayrılabilir⁽³⁾. Bütün bir genomdan gelen DNA bir restriksiyon enzimi ile kesildiğinde, üretilen DNA parçaları o kadar karmaşıktır ki jel elektroforezinden sonra bile, hemen hemen aynı uzunlukta birçok farklı parça mevcuttur ve jel üzerinde ayrı bir bant olarak herhangi bir belirli DNA fragmanını çözmek mümkün değildir. Bununla birlikte, jel üzerinde bir bant olarak göç eden belirli bir parçayı, belirli bir DNA probuna hibritleme ile tanımlamak mümkündür. Bu amaçla jelde bulunan restriksiyon parçaları alkali ile denatüre edilir ve kurutma yoluyla bir nitroselüloz filtre veya naylon membran üzerine aktarılır. Bu prosedür, jeldeki fragmanların dağılımını korur ve filtrenin üzerinde jelin bir kopyasını oluşturur. Filtre daha sonra hibridizasyon koşulları altında genellikle klonlanmış bir restriksiyon parçasından üretilen spesifik işaretli bir DNA probu ile inkübe edilir.

Proba komplementer (tamamlayıcı) olan DNA restriksiyon fragmanı, proba hibridize olur ve filtre üzerindeki konumu, otoradyografi (radyoaktif olarak işaretlenmiş prob için) veya floresan görüntüleme (floresan olarak etiketlenmiş prob için) ile açığa çıkarılabilir (Şekil 1)⁽³⁾. Southern blotlama, DNA fragmanlarının elektroforez jelden bir membran desteğine aktarılmasıdır. DNA fragmanlarının hareketsizleştirilmesine yol açan bu işlemle membranda, jelin bantlama paterninin yarı-kalıcı bir kopyası oluşturulur. DNA hareketsizleştirildikten sonra, etiketlenmiş bir proba hibridizasyon analizine tabi tutulur. Bu teknikte, agaroz jeldeki DNA'nın yukarı doğru bir naylon veya nitroselüloz membran üzerine blotlanmasını ve daha sonra UV ışınlanması (naylon için) veya fırınlanma (nitroselüloz için) ile immobilizasyonu söz konusudur. DNA fragmanlarının aktarımında alternatif bir protokol olarak pozitif yüklü naylon membranlar ve alkali tampon da kullanılır. İkinci bir alternatif protokolda ise, farklı bir transfer-paketleme (transfer-stack) kurulumuna dayanan bir transfer yöntemi kullanılır. Temel protokolda jelin üzerine membran yerleştirilirken, alternatif protokolda jel membran üzerine yerleştirilir; yani membran altta olmalıdır ve aşağı doğru kapiller transfer söz konusudur. Jelde bulunan DNA'nın, üstüne yerleştirilen membrana geleneksel yöntemle aktarımında bazı dezavantajlar vardır. Jel ağırlıklı filtre kâğıtları ve üzerine serilmiş kâğıt havlular tarafından ezilebilir. Bu durum kurutma işlemini yavaşlatır ve aktarılabilen DNA miktarını azaltabilir. Dolayısıyla, ikinci alternatif protokolda tarif edilen aşağı doğru kapiller transfer yöntemi daha hızlıdır ve daha eksiksiz bir transfer ile sonuçlanabilir⁽⁴⁾.

Southern blotlama tekniğinde jel kendisi ile tam olarak aynı boyutta kesilmiş filtre üzerine yerleştirildikten sonra 3MM kromatografi kâğıtları ve jel ile aynı boyutta bir kâğıt havlu tabakası ile kaplanır. Bu tertibat daha sonra elektroforez tankında tampon içine batırılmış çok daha uzun bir 3MM kromatografi kâğıdı üzerine yerleştirilir. Yığının üstüne düz bir cam

şişe gibi bir ağırlık yerleştirilir. Yaklaşık bir saat boyunca tampon, tanktaki jelden filtreye ve üstteki havlu yığınının kadar çekilir. Denatüre edilmiş tek iplikçikli DNA, tampon akışı ile birlikte taşınır ve filtreye bağlanır. Teknik, jeldeki parçalanmış DNA paterninin membran üzerinde mükemmel bir şekilde yeniden kopyalanması için jelin çok düzgün bir şekilde kapiller akışını gerektirir. Ayrıca sandviçin herhangi bir katmanı arasında kabarcık oluşmamasına dikkat edilmelidir. Günümüzde bu işlem için genellikle daha hızlı ve genellikle daha tekrarlanabilir olduğundan "elektroblotlama" kullanılmaktadır. Bu teknikle, filtre kağıdı-agaroz-jel-membran filtre-filtre kağıdı sandviç iki plastik ağ plakası arasına kenetlenir ve tüm tertibat elektroforez tamponu ile dolu bir elektroblotlama tankına yerleştirilir. Terminallere bir voltaj uygulandığında, DNA jelden elektroforezle taşınır ve membrana bağlanır⁽²⁾.

NORTHERN BLOTLAMA

Klonlanmış bir geni karakterize etmenin en temel yollarından biri, bir organizmada genin ne zaman ve nerede ifade edildiğini belirlemektir. Belirli bir genin ekspresyon ürünü olan mRNA Northern blotlama ile test edilebilir⁽²⁾.

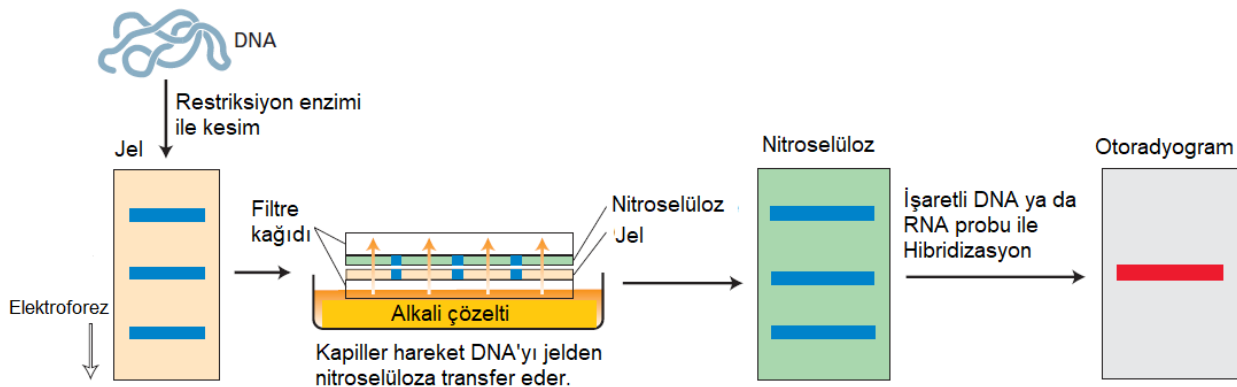
Moleküler biyolojide önemli tekniklerden biri olan Northern blotlama'nın amacı be-

lirli bir haberci RNA'nın (mRNA) ölçümüdür. mRNA'nın rölatif ekspresyon seviyeleri hakkında bilgi sağlayan en eski gen ekspresyon analiz yöntemi olan Northern blotlama⁽⁵⁾ mRNA'nın moleküler boyutunu ve miktarını analiz etmek için halen yaygın olarak kullanılan bir prosedürdür⁽⁶⁾.

mRNA'yı ölçmenin iki ana nedeni vardır: Birincisi, hangi dokuların belirli bir geni ifade ettiğini belirlemektir ve bu, kodlanmış proteinin fizyolojik fonksiyonunun bir göstergesini verebilir. Örneğin, son zamanlarda tarif edilen ob (obez) geni, beyaz yağ dokusunda eksprese edilen leptin yağ depolarının büyüklüğünün bir göstergesidir. mRNA'yı ölçmenin ikinci temel nedeni ise, belirli bir genin, besinsel, hormonal veya çevresel ekspresyonunu düzenleyen faktörleri belirlemektir⁽⁷⁾.

Bu prosedür kültür hücrelerinden, doku örneklerinden RNA izolasyonu gerektirir. Northern blot analizi için RNA denatüre edilir⁽⁸⁾. Bir RNA örneği, genellikle toplam hücre RNA, baz çiftleri arasındaki hidrojen bağlarını bozan ve tüm RNA moleküllerinin katlanmamış, doğrusal bir konformasyona sahip olmasını sağlayan formaldehit gibi bir ajanla muamele yoluyla denatüre edilir⁽²⁾. Denatüre edici agaroz jel üzerine yüklenir ve RNA'lar jel elektroforezi ile boyutlarına göre ayrılır. Elektroforezden sonra RNA, difüzyon blotlama veya elektroblotlama yoluyla

jelden bir naylon membrana aktarılır. RNA'yı jelden membrana aktarmak için difüzyon blotlama kullanılırsa, genellikle transfer tamponu yüksek molariteli bir tuz çözeltisidir, böylece yüklü nükleik asitler tuzla jele ve membrana hareket eder⁽⁸⁾. Denatüre RNA'lar nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra Southern blotlamada olduğu gibi, filtre daha sonra ilgilenilen gene komplementer olan işaretli bir DNA probuna maruz bırakılır; son olarak, işaretli membran otoradyografiye tabi tutulur. Northern Blottan bir numunedeki spesifik bir RNA miktarı tahmin edilebildiğinden, prosedür farklı koşullar altında hücrelerdeki belirli bir mRNA miktarlarını karşılaştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır⁽²⁾. RNA'nın Northern blotlama analizi üç aşamada gerçekleştirilir. İlk adımda denatüre edilen RNA, denatüre edici agaroz jel elektroforezinde yürütülerek RNA türleri ayrılır. RNA daha sonra -jelde bulunanla aynı dağılımı koruyacak şekilde- bir naylon membrana aktarılır. RNA'yı membrana bağladıktan sonra, ilgilenilen gene tamamlayıcı olan bir radyoaktif işaretli prob hareketsiz hale getirilmiş RNA ile hibridize edilir. Spesifik olarak bağlı olmayan problemler daha sonra yıkanır. Prob ile ilgili RNA'ya spesifik olarak bağlanan katı membran daha sonra kurutulur, bantlar açığa çıkarılır ve analiz edilir⁽⁹⁾.



Şekil 1: Southern blotlama, restriksiyon fragmanlarının karmaşık olarak bulunduğu bir karışımda spesifik bir DNA fragmanını tespit edebilir. Diyagram, jeldeki üç farklı restriksiyon fragmanını göstermektedir, ancak prosedür milyonlarca DNA fragmanının olduğu bir karışıma uygulanabilir. Sadece işaretli bir proba hibritlenen fragmanlar otoradyogramda bir sinyal verecektir. Northern blotlama adı verilen benzer bir teknikle aynı mantıkla bir karışım içindeki spesifik mRNA'lar saptanabilmektedir⁽³⁾.

Northern blotlama, esasen Southern blotlama ile aynı işlemdir, ancak agaroz jelinin RNA'da oluşan ikincil yapıları sınırlamak için formaldehit ile hazırlanması önemli bir farktır. RNA moleküllerinin boyutlandırılması için bir RNA moleküler ağırlık belirleyici (marker) gerekecektir. Bu teknikte, tüm reaktiflerin RNAaz ile kontamine olmamasını sağlamak özellikle önemlidir ve jel tanklarının yalnızca RNA jelleri çalıştırmak için ayrılması tavsiye edilir⁽²⁾.

Northern blotlama, RNA moleküllerinin boyuta bağlı ayrılmasında kullandığından, bu teknik sadece RNA'nın miktarını değil, aynı zamanda ilgili transkriptin boyutlarını da belirleyebilir. Bu nedenle, genlerin varyant transkriptlerini tespit etmek için de çok elverişli bir yoldur⁽⁹⁾.

UYGULAMA ALANLARI

Southern blotlama, moleküler biyolojinin farklı yönleri için uygulanır. Bu tekniğin RFLP haritalaması, adli araştırmalar, gen ekspresyonunda DNA metilasyonu, genetik bozukluklarda mutasyona uğramış genlerin tespiti, DNA parmak izi gibi moleküler biyoloji analizlerinde kullanımı uygundur. Ayrıca genetik hastalıkları incelemek için de kullanılmaktadır. İnsan genomunun analizi için genomik DNA, organizmanın nükleus içeren herhangi bir hücresinden ekstrakte edilebilir. Fraksiyonlara ayrılmış DNA örneklerinden blotlama hazırlandıktan sonra, anormal sekansların varlığı veya normal nükleik asit sekanslarının yokluğu spesifik problemlere hibridizasyon ile doğrulanabilir. Değişen büyüklükteki bantlar veya eksik bantlar, bir genin yapısal sapmalarını gösterebilir. Öte yandan, restriksiyon fragmanlarının boyutundaki değişiklik, mutlaka patojenik bir etkiye sahip olmayan genetik polimorfizmlerden (örn., restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgelerindeki değişimler) kaynaklanabilir. Polimorfizmler mendel ilkelerine göre kalıtılır. Bunlar, genom içindeki belirli bölgeler için belirteç (marker) olarak kullanılabilen restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmlerine (RFLP) neden olur. Dolayısıyla bağlantı analizleri için kullanılabilirler⁽⁴⁾.

Southern Blotlama hassasiyeti, tek kopyalı genleri, yani genom başına sadece bir kopyası bulunan genleri tespit etmek için yeterlidir. Tıbbi uygulamalar için, yöntemin gücü, insan genomik DNA'sının birincil yapısının küçük bir bölümünü analiz etme yeteneğine dayanmaktadır⁽¹⁰⁾.

Fujiwera ve ark.nın yüzeysel papiller geçişli hücre karsinomundan (TCC) türetilmiş bir mesane kanseri hücre hattında (KYBTDS) 9q32-q33 kromozomu üzerinde şüpheli homozigot delesyonun detaylı moleküler analizlerini gerçekleştirdikleri çalışmada, delesyon bölgesini sitogenetik olarak ve moleküler düzeyde çift renkli floresans insitu hibridizasyon (FISH) analizleri ile tanımlamışlar ve Southern blotlama tekniği ile bulguları doğrulamışlardır⁽¹¹⁾. Bir başka çalışmada ise, mesanenin, üreterin ve böbrek pelvisinin 27 transizyonel hücre karsinomunda ve karşılık gelen kanserli olmayan dokularda satellit 2 ve 3'teki DNA metilasyon durumu Southern blotlama yoluyla incelenmiştir. 6 mikrosatellit belirteci (D9S775, D9S925, D9S304, D9S303, D9S283 ve D9S747) kullanarak kromozom 9'un allelik durumu belirlenmiştir⁽¹²⁾.

Northern blotlama, hibridize mRNA'nın saptanması ve miktarının belirlenmesi, RNA parçalanması, RNA yarılanma ömrünün değerlendirilmesi, RNA kırılmasının (splicing) saptanması, gen ekspresyonunun incelenmesi gibi konularda önemli bir araçtır.

İnsan mesane kanseri hücrelerinde urokinaz-tip plazminojen aktivatör (u-PA) gen ekspresyonu Northern blot tekniği ile gösterilmiştir. Bu çalışmada, RNA örnekleri mesane kanseri hücrelerinden izole edilmiş, sonrasında formamid - agaroz jelde ayrılmış ve u-PA ekspresyonu için analiz edilecek naylon zarlara aktarılmıştır. Northern blot analizinde u-PA mRNA'ya özgü floresanla işaretli cDNA ile problemlenmiştir. Yükleme etkinliği için, bloğun GAPDH mRNA ile hibritlenen cDNA ile yeniden kopyalanmasıyla kontrol edilmiş ve bu deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir⁽¹³⁾. İrer ve ark.nın prostat kanserinde STAMP2 (six transmembrane protein

of prostate 2) geninin RNA ekspresyon profilinin androjenlerle ilişkisini araştırdıkları çalışmada androjen uygulanmış ve uygulanmamış prostat kanseri lenf nodu (LNCaP) hücrelerinden, androjen reseptörü içermeyen DU145 hücrelerinden ve STAMP2 transfekte edilmiş COS-7 hücrelerinden elde ettikleri RNA moleküllerinden STAMP2 ekspresyonları Northern Blotlama yöntemleri ile gösterilmiştir. Bu araştırmada LNCaP hücrelerinde STAMP2 geninin RNA ekspresyonunun androjenlerle düzenlendiği ve androjen uygulama süresi arttıkça ekspresyon düzeyinin arttığı, androjen reseptörü içermeyen DU145 hücrelerinde STAMP2 ekspresyonunun olmadığı saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda STAMP2 geni, prostat kanseri patogenezi ve prostat kanserinin androjen bağımlı evreden androjen bağımsız evreye geçişinde önemli bir role sahip olabileceği önerilmiştir⁽¹⁴⁾.

Tseng-Rogenski ve ark. insan ürotelyal dokusunda yaptıkları in vitro çalışmalarında Northern blotlama ile 15-Hidroksiprostaglandin dehidrojenaz mRNA ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir⁽¹⁵⁾.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) bir karışımındaki belirli bir sekansın varlığını tespit etmek için daha yaygın olarak kullanılmasına rağmen, Southern blotlama, PZR ile tek bir reaksiyonda amplifiye edilemeyecek kadar uzak genomik sekanslar arasındaki ilişkiyi yeniden yapılandırmak için elverişlidir⁽⁴⁾. DNA mikroarray analizleri, gerçek zamanlı kantitatif PZR (RT-qPCR) uygulamaları gen ekspresyon analizlerinde güncel olarak tercih edilse de, özellikle gen ekspresyon düzeylerinin doğrulanmasında Northern Blotlama kullanılabilir.

Sonuç olarak, moleküler biyolojide yeni teknolojiler güncel olarak uygulanıp çokça tercih edilmektedir. Bu güncel yaklaşımlara rağmen Southern ve Northern Blotlama teknikleri bulguların doğrulanması için de ayrıca tercih edilmektedir. Southern ve Northern Blotlama teknikleri halen kullanılmaya devam etmekte ve geçerliliğini sürdürmektedir.



Kaynaklar

1. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975;98(3):503-17.
2. Robson RL. (2020). Genetic and molecular biological approaches for the study of metals in biology, *Practical Approaches to Biological Inorganic Chemistry (Second Edition)*. Elsevier.
3. Lodish, HF (2016). *Molecular Cell Biology*. New York: WH Freeman and Co.
4. Brown T. Southern Blotting. *Current Protocol in Immunology*. 1993; 6 (1)
5. Saraswathy N and Ramalingam P. (2011). *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*. Woodhead Publishing
6. J. Eberwine, Y. Sugimoto. (2001). Northern Blotting, in *Encyclopedia of Genetics*.
7. Trayhurn P. Northern blotting. *Proceedings of the Nutrition Society* 1996. 55:583-589.
8. Eberwine J, Sugimoto Y. (2001). Northern Blotting. *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier
9. He SL, Green R. 2013 *Laboratory Methods in Enzymology: RNA*, in *Methods in Enzymology*. Elsevier
10. Hildebrandt F, Igarashi P. (1999). *Techniques in Molecular Medicine*. Berlin: Springer-Verlag.
11. Fujiwara H, Emi M, Ohgaki HNK, Imoto I, Akimoto M, Ogawa O, Habuchi T. Definition of a 1-Mb homozygous deletion at 9q32-q33 in a human bladder-cancer cell line. *J Hum Genet* (2001) 46:372-377.
12. Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S. DNA Hypomethylation On Pericentromeric Satellite Regions Significantly Correlates With Loss Of Heterozygosity On Chromosome 9 In Urothelial Carcinomas. *Journal of Urology, Investigative Urology* 2005, 173 (1): 243-246
13. Evans CP, Stapp EC, Dall'Era MA, Juarez J, Yang JC. Regulation of u-PA gene expression in human prostate cancer. *Cancer Genetics* 2001, 94 (3); 390-395.
14. İrer B, Demir Ö, Kefi A, Aslan G. Prostat Kanseriinde Six Transmembrane Protein of Prostate 2 Gen Ekspresyonunun ve Hücre İçi Lokalizasyonunun Belirlenmesi. *Bulletin of Urooncology* 2017;16:112-118
15. Tseng-Rogenski S, Lee IL, Gebhardt D, Fischer SM, Wood C, Park JM, Liebert M. Loss of 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase Expression Disrupts Urothelial Differentiation. *Basic Science*. 2008. 71(2); 346-350.

“Western Blot” Analizi ve Kullanım Alanları

**Dr. A.Begüm CEVİZ ve
Dr. Hülya YILMAZ AYDOĞAN**

Western Blotlama günümüzde protein analizinde kullanılan rutin bir tekniktir. Bu yöntemde antikor-antijen etkileşiminin spesifitesi kompleks protein karışımında hedef proteinin tanımlanmasını mümkün kılmaktadır. Western blotlama protein hakkında kalitatif ve semikantitatif bilgi vermektedir.

“Blotlama” terimi biyolojik örneklerin jel-den membrana transferlerini ve ardından membran yüzeyindeki deteksiyonlarını içeren süreci tanımlamaktadır. **Western blotlamada** spesifik olarak antijeni tanımlamak amaçlı bir antikor kullanıldığı için aynı zamanda “**İmmunblotlama**” olarak da adlandırılır. Western blotlama, sellüler veya doku ekstraktlarında DNA'nın saptanmasında aynı yaklaşımı kullanan Southern Blotlama tekniğinden sonra adlandırılmıştır⁽¹⁾. Southern Blotlama ilk olarak 1975 yılında tanımlanmış, Western blotlama ise 1979'da Towbin tarafından geliştirilmiştir⁽²⁾.



Şekil 1: Western Blotlama Seti

Western Blotlama tekniği; kanser biyolojisi ve patolojisi ile ilgili araştırmalarda, mikrobiyoloji, immunoloji, protein biyokimyası ve doku çalışmalarında antikorların test edilmesinde, proteinlerin saptanmasında, proteinlerin moleküler ağırlıkları hakkında fikir sahibi olunmasında, protein fosforilasyonundaki değişimlerin ve lipid modifikasyonlarının saptanmasında ve protein ekspresyonundaki değişimlerin

saptanmasında kullanılmaktadır. Bu teknik; örneklerin hazırlanması ve protein kantifikasyonu, örneklerin jelle yüklenmesi ve elektroforetik seperasyonu, membrana transfer- blotlama, nonspesifik antikor bağlama bölgelerinin bloke edilmesi (bloklama), antikorla inkübasyon ve deteksiyon aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 1).

I. PROTEİN ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI VE PROTEİN KANTİFİKASYONU

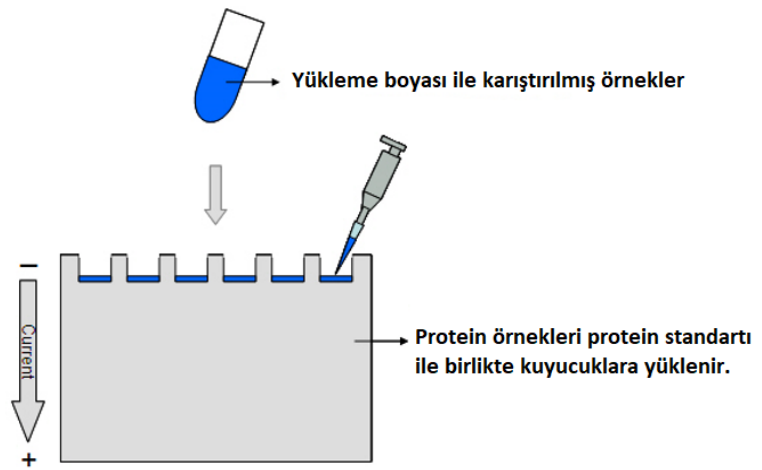
Western Blotlamada ilk aşama doku veya hücre lizatının hazırlanmasıdır. Hücre ve dokularda numune hazırlarken proteinlerin parçalanmış olması gerekir. Bu aşamada uygun tamponları ve çalışma koşullarını seçmek, deneyin başarısını sağlamada kilit adımlardır. Örnek hazırlama aşamasında lizis tamponlar (NP-40, RIPA, vb.) ile hücrenin parçalanmasına fiziksel olarak yardımcı olması için sonikatörler ya da homojenizatörler kullanılmaktadır⁽³⁾. Parçalanmış hücrelerden salınan proteaz ve fosfatazların total protein miktarını düşürmemesi için fosfataz ve proteaz inhibitörleri lizis tamponuna taze olarak eklenmelidir. Bu prosedür mümkün olduğunca soğuk ortamda gerçekleştirilir ve ardından Lowry, Bradford ve bisinkhonik asit (BCA) gibi farklı yöntemlerle proteinlerin miktar tayini yapılır. Bu kolorimetrik analizler, bazı amino asitlerin farklı reaktiflere reaksiyon

göstermesiyle renk değişikliği oluşması prensibine dayanır⁽⁴⁾.

Örnekler hazırlandıktan sonra proteinlerin primer yapılarına ulaşmaları için 5-10 dakika 95°C'de denatüre edilirler. Yükleme boyası olan Laemmli tamponu ile karıştırılan örnekler kuyulara yüklenir (Şekil 2). Laemmli tamponu belirli oranlarda sodyum dodesil sülfat (SDS), 2-merkaptoetanol, gliserol, bromofenol mavisi, ve Tris-HCl içermektedir. Laemmli tamponu içeriğinde bulunan SDS proteinleri negatif yüklü hale getiren bir deterjandır. 2- merkaptoetanol disülfid bağlarını kırarken, gliserol kuyulara yüklenen örneklere yoğunluk getirir ve kuyunun dibine çökmesini sağlar. Bromofenol mavisi ise örneklerin jeldeki yürümesini görmemizi sağlayan ve reaktif olmayan bir boyadır⁽⁵⁾.

II. PROTEİNLERİN ELEKTROFORETİK SEPARASYONU

Jel elektroforezi, protein veya DNA gibi yüklü molekülleri jelde elektrik akıma maruz bırakarak fiziksel özelliklerine göre ayıran bir tekniktir. Elektroforez jelleri matris içinden elektrik akımı iletimi sağlayan tamponlarda formüle edilir. Solüsyon bir arada kaset olarak adlandırılan cam veya plastik iki tabaka (plate) arasındaki ince boşluğa dökülür. Jel polimerize olur olmaz kaset cihaz içine, genellikle dikey olarak monte edilir. Böylece karşı kenarları (üst



Şekil 2: Elektroforetik olarak ayrılacak olan protein karışımının poliakrilamid jelle yüklenmesi

ve alt) sırasıyla katot ve anot elektrot ihtiva eden tampon odası ile temas halinde olacak şekilde yerleştirilir. Proteinler kuyulara yüklenip akım uygulandığında, protein matriksi (levha) boyunca akım tarafından çekilir ve matriksin eleme özelliği sayesinde ayrılır (Şekil 3) ⁽⁶⁾.

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), kompleks bir örnek karışımında bireysel proteinleri karakterize etmek için yada tek bir örnek içinde yer alan çok sayıda proteini incelemek için kullanılır.

PAGE, Western Blotlama ile kombine olduğunda bir proteinin kütlesi, yükü, saflığı veya varlığı hakkında bilgi sağlayan güçlü bir analitik araçtır. Çeşitli PAGE formları bulunmaktadır ve bunlar proteinler hakkında farklı tipte bilgi sağlamaktadır. Aynı zamanda "Doğal PAGE" olarak da adlandırılan "denatüre edici olmayan PAGE" proteinleri kütle-yük oranlarına göre ayırır ⁽⁷⁾. En yaygın kullanılan elektroforez tekniği olan Denatüre edici ve indirgeyici "SDS-PAGE" proteinleri esas olarak moleküler ağırlıklarına göre ayırır ⁽⁸⁾. İki boyutlu "2D" PAGE ise proteinleri; birinci boyutta izoelektrik noktasına göre, ikinci boyutta kütlelerine göre ayıran gelişmiş bir elektroforez tekniğidir.

PAGE tekniğinde kullanılan Akrlamid, proteinleri büyüklüğüne göre ayırmak için elektroforetik jellerin hazırlanmasında kullanılan bir maddedir. Bisakrilamid (BIS) ile karıştırılan akrilamid ortamına polimerize edici ajan amonyum persülfat (APS) eklen-

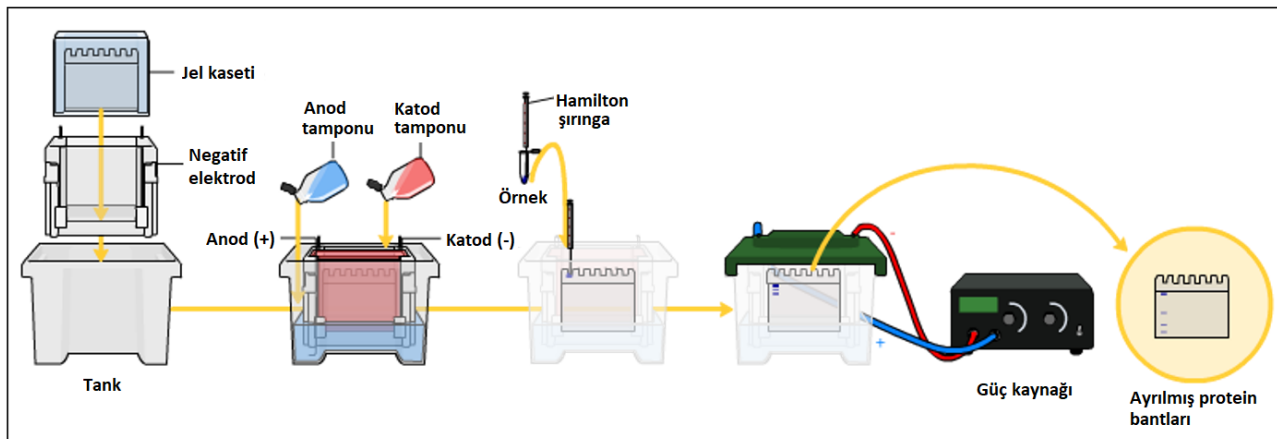
diğinde çapraz bağlı polimer ağı oluşur. Karışıma son olarak eklenen N,N,N,N'-tetrametilendiamin (TEMED) ise APS tarafından serbest radikallerin üretimine neden olarak polimerizasyon reaksiyonunu katalizler ⁽⁹⁾. Akrlamid ve bisakrilamidin toplam konsantrasyonu ile birlikte bisakrilamidin akrilamide oranı jel matriksinin por genişliği ve sertliğini (esnekliğini) etkiler. Bu şekilde gerçekte çözünen protein büyüklüklerinin (moleküler ağırlık) aralığını etkiler. Jelde oluşan porların büyüklüğü kullanılan akrilamidin miktarıyla ters ilişkilidir. %7'lik bir poliakrilamid jel, %12'lik poliakrilamid jelden daha büyük porlara sahiptir. Bu nedenle düşük akrilamid yüzdeleri jeller büyük proteinleri ayırt ederken, yüksek yüzdeleri jeller küçük proteinleri ayırmak için kullanılmaktadır ⁽¹⁰⁾.

Düşük akrilamid yüzdeleri kısım üstte (örnek yüklenen kuyucuğun başında) ve yüksek akrilamid yüzdeleri kısım jelin alt bölgesinde olacak şekilde hazırlanan "Gradyent jeller" proteinin daha detaylı ayırmasını sağlarlar. Proteinlerin optimal rezolüsyonunu elde etmek için Yükleme (stacking) jeli Yürütme (resolving) jelin üst kısmına dökülür. Yükleme jeli, daha düşük pH (ör; 6,8) ve farklı iyonik içerikli daha düşük bir akrilamid konsantrasyonuna (ör; büyük porlar için %7) sahiptir. Bu yüklenen örnekteki proteinlerin jelin yürütme bölümüne girmeden önce elektroforezin ilk birkaç dakikasında **sıkı bir bant halinde** konsantre edilmesini sağlar (Şekil 4). Gradyent

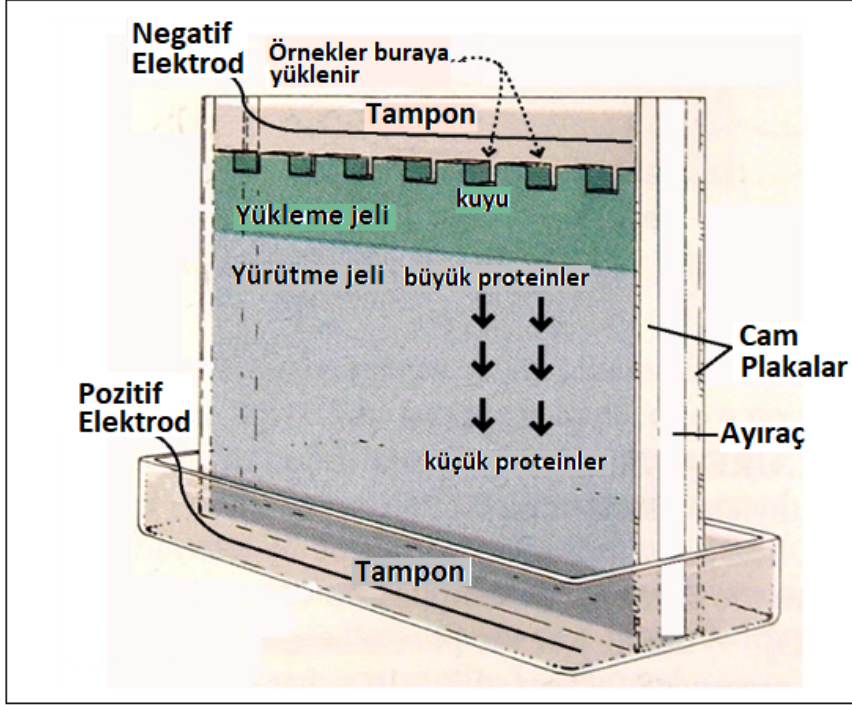
jel kullanıldığında gradiyentin kendisi bu fonksiyonu yerine getirdiği için, yükleme jeli gerekli değildir ^(11,12).

III. PROTEİNLERİN MEMBRANA TRANSFERİ-BLOTLAMA

Elektroforezi takiben proteinlerin jelden membrana transfer edilmeleri gerekir. Bu işlem için kullanılan en yaygın metod, hızlı ve etkin transfer olması nedeniyle elektroforetik transferdir. Bu metod jelden membrana proteinlerin elektroforetik mobilitelerini kullanır. Transfer prensibi poliakrilamid jel elektroforezine benzer, yani negatif yüklü proteinler bir elektrik alanının etkisi altında pozitif elektroda doğru göç eder. Membran, jel ve pozitif elektrod arasına yerleştirilir. Bu şekilde proteinler, jeldeki aynı dağılımla, membranda tutulmaktadır. Transfer işlemi yarı kuru veya ıslak yöntemlerden herhangi biriyle yapılabilir. Her iki sistem de jel ve membran arasındaki yakın temas ile gerçekleşir. Ancak ıslak transferde daha fazla hacimde transfer tamponu daha düşük sıcaklık ve uzun süre gerekmektedir ⁽¹²⁾. Transfer verimi proteinin jelin dışına göç etme yeteneğine ve membrana bağlanma eğilimine bağlı olarak proteinler arasında belirgin farklılık göstermektedir. Transfer etkinliği; jelin kompozisyonu, membranla jelin tam kontakt durumunda olması, elektrodların pozisyonu, proteinlerin büyüklüğü ve kompozisyonu, alanın iyonik gücü ile tamponda alkol ve deterjanların varlığı gibi faktörlerden etkilenir ⁽¹³⁾.



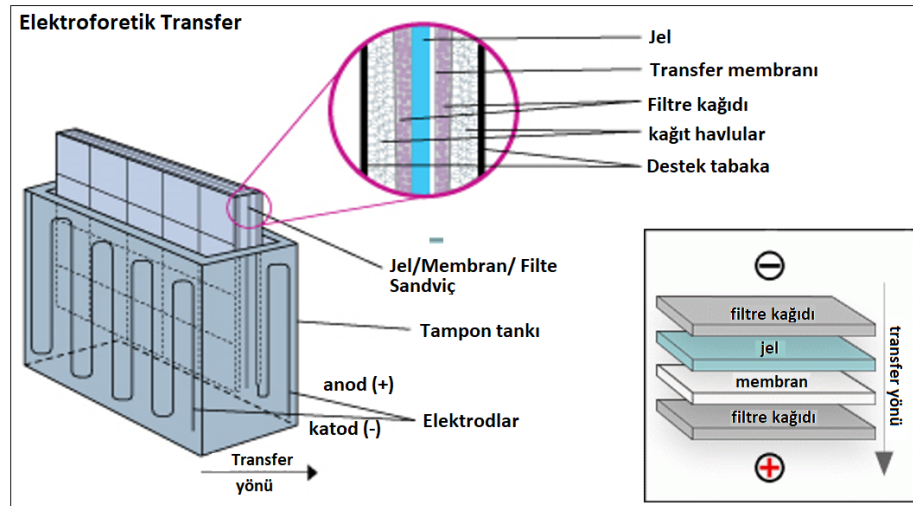
Şekil 3: Örneklerin jelde yürütülmesi



Şekil 4: PAGE yükleme (stacking) ve yürütme (resolving) jeli

Proteinlerin optimal transferi genellikle düşük iyonik güçlü tamponlarda ve düşük elektrik akımında gerçekleşir. Transfer sonrası ve Western Blot yönteminden önce membrandaki toplam protein sıklıkla transferin etkinliğini kontrol etmek için Ponceau S veya Amido Black gibi bir boya ile boyanır. Jel ayrıca proteinin jelden uzaklaştığını

doğrulamak için de boyanabilir. Ancak bu boyama işlemi proteinin membrana etkin bir şekilde bağlandığını garanti etmez. Boyalar antikorun bağlanmasına ve deteksiyona engel olduğu için ideal olan protein boyasının kolaylıkla çıkarılmasıdır⁽¹⁴⁾.



Şekil 5: Western Blotlama Transfer Aparatının Şematik Gösterimi. Burada tanımlanan görüntü dikey bir “ıslak” transfer cihazı için temsili olmasına rağmen, yönlendirme yatay olarak yerleştirilmiş yarı-kuru transfer cihazı için de geçerlidir.

Blotlama Membranları

Blotlama membranları 0.1, 0.2, veya 0.45 µm gibi tipik por genişliğine ve 100 µm kalınlığa sahiptirler. Proteinlerin çoğu 0.45 µm por genişliğine sahip membran kullanılarak başarılı bir şekilde blotlanırken, düşük molekül ağırlıklı proteinler veya peptidler (<20 kDa) için 0.1 veya 0.2 µm por büyüklüğü olan membranlar tavsiye edilmektedir. En yaygın immobilizasyon membranları nitroselüloz, poliviniliden diflorid (PVDF) ve naylondur. Bu membranlar; büyük yüzey alanı/ volüm alanı oranı, yüksek bağlama kapasitesi sayesinde hareketsiz (immobilize) makromoleküllerin depolanmasını sağlamaları, düşük arka plan sinyali, tekrarlanabilirlik için optimize edilebilmeleri ve kolay kullanım özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir⁽¹⁵⁾.

a. Nitroselüloz Membranlar

Nitroselüloz membranlar yüksek protein bağlama afinitesi, farklı deteksiyon metodları ile uyumluluğu ve proteinleri, glikoproteinleri ve nükleik asitleri immobilize etme yeteneklerinden dolayı protein blotlamada kullanılan popüler matrikslerdir. Protein immobilizasyonu hidrofobik etkileşimlerle oluşur. Özellikle yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin elektroforetik transferi esnasında yüksek tuz ve düşük metanol konsantrasyonları protein immobilizasyonunu etkinleştirmektedir. Nitroselüloz membranlar yüksek tuz konsantrasyonları yüklü nükleik asit fragmanlarını elüe etmek için gerekli olduğundan nükleik asitlerin elektroforetik transferinde optimal değildir⁽¹⁶⁾.

b. Poliviniliden Florür (PVDF) Membranlar

PVDF membranlar oldukça hidrofobiktir ve transfer tamponuna batırmadan önce metanol veya etanolle ıslatılmak zorundadır. Proteinler ve nükleik asitler için yüksek bağlama afinitesine sahip olan PVDF membranlar Western, Southern, Northern ve Dot Blotlamalar gibi uygulamalarda kullanılmaktadır. Bağlanma muhtemelen dipol veya hidrofobik etkileşimler aracılığıyla oluşur. PVDF membranlar daha büyük

hidrofobisite nedeniyle diğer desteklere göre adsorbe edilen proteinlerin retensiyonunda daha iyidirler. Ayrıca nitroselüloza göre daha az kırılabilir olmaları nedeniyle daha fazla tercih edilmektedirler⁽¹⁷⁾.

c. Naylon Membranlar

Yüklü naylon (poliamid) membranlar iyonik, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerle bağlanırlar. Yüklü naylonların çoğu alkali koşullarda nükleik asitlerle stabil bağlantılar oluşturan kuaterner aminler içerir. Naylon membranların önemli bir dezavantajı, SDS ve Ponceau S gibi anyonlara non-spesifik ve güçlü bağlanma ihtimalinin olmasıdır⁽¹⁸⁾.

Transfer Tamponları

Western blotlamada yaygın kullanılan tamponlar; Towbin tamponu (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glycine, %20 (v:v) metanol) ve CAPS tamponu (10 mM CAPS pH 10.5, %10 (v:v) metanol)'dur⁽²⁾. Tipik olarak SDS-PAGE jellerinde proteinlerle ilişkili SDS; hem proteinleri jelin dışına efektif olarak taşımak hem de membran desteğe taşımak için yeterli miktarda bulunmaktadır.

Presipite olmaya eğilimli proteinler için düşük konsantrasyonda SDS eklenmesi (0.025-0.1%) gerekebilir. Transfer tamponuna SDS ekleme sonucu oluşan membrandan proteinlerin aşırı transferini engellemek için; zaman, akım gibi diğer transfer parametrelerinin optimizasyonu gereklidir. SDS-PAGE jellerinde transfer tamponlarında bulunan Metanol, destek membranlara bağlanma yeteneklerini artırarak proteinlerden SDS'nin ayrılmasına yardım eder⁽¹³⁾. Ancak metanol daha sonraki analizlerde kullanılan enzimlerin aktivitesini inaktive edebilir. Metanol kullanımı ayrıca jel ve membranın büzülmesine neden olarak düşük çözünürlüğü olan büyük molekül ağırlıklı proteinlerin (150.000 Da) transfer zamanını arttırabilir.

Transfer Metodları

SDS-PAGE veya doğal jellerden nitroselüloz, PVDF veya naylon membranlara makromoleküllerin transferi farklı met-

dodlarla gerçekleştirilmektedir. Bunlar; Difüzyon blotlama, Vakum blotlama, Islak (wet) elektrotransfer ve Yarı-kuru (Semi-dry) elektrotransfer'dir

a. Difüzyon Blotlama

Moleküllerin termal hareketine dayanan bir teknik olan "Difüzyon blotlama", moleküllerin yüksek konsantrasyonda oldukları alandan düşük konsantrasyonda oldukları alana hareketine neden olmaktadır.

Blotlama metodlarında moleküllerin transferi, proteinlerin jel matrisinden dışarı difüzyonuna ve transfer membranına adsorbsiyonuna bağlıdır. Orjinalde "İzoelektrik odaklama (isoelectric focusing, IEF) jellerinden proteinlerin transferi için geliştirilmiş olan difüzyon blotlama, özellikle nükleik asitler gibi diğer makromoleküllerin blotlanması için de kullanışlıdır. Difüzyon blotlama "tek bir jelde çok sayıda immunblotlar" hazırlandığında çok kullanışlıdır. Elde edilen blotlar kütle spektrometresiyle tanımlama ve zimografi tekniği ile proteinleri analiz etmek için de kullanılabilir. Protein verimi toplam transfer edilebilir proteinin %25-50'sidir⁽¹⁹⁾. Bu miktar diğer transfer metodlarından düşüktür. Ayrıca protein transferi kantitatif değildir. Difüzyon blotlama SDS-PAGE jellerinde çok büyük proteinler için zor olabilir, ancak küçük proteinler kolayca transfer edilir.

b. Vakum Blotlama (Vakum Kapiller Blotlama)

Vakum blotlama kapiller blotlamanın bir varyantıdır. Kapiller blotlamada tampon bir rezervuardan jel ve blotlama membranından kurutma kağıdı ve diğer absorban maddelere çekilir. Vakum blotlama polipeptidleri jelden nitroselüloz gibi bir membrana çekmek için levha (slab) jel kurutma sistemini ve diğer uygun jel kurutma donanımlarını kullanır.

Yüksek vakum, jeli veya transfer membranını dağıtacağından güçlü pompalar kullanılamaz. Jeller 45 dakikada vakum altında kuruyabilir, bol rezerve tampon gerektirir. Ayrıca jeller transfer sonrası membrana yapışmaya eğilim gösterir,

fakat jelin rehidratasyonu ayrılmasına yardım eder. Vakum blotlamanın transfer etkinliği %30-65 arasında değişmektedir. Düşük molekül ağırlıklı (14.3 kDa) proteinlerde bu etkinlik en yüksek ve yüksek molekül ağırlıklı proteinlerde (200 kDa) ise en düşüktür. Difüzyon blotlama olduğu gibi vakum blotlamada sadece kalitatif transfere olanak verir⁽²⁰⁾.

c. Islak (Wet) Elektroblotlama (Sıvı Transferi)

Elektroblotlama, proteinleri bir jelden membrana aktarmak için en yaygın kullanılan prosedürdür. Difüzyon veya vakum blotlama ile karşılaştırıldığında başlıca avantajları, transfer hızı ve etkinliğidir. Elektroelüsyon, bir jel-zar sandviçin tampon içine tamamen daldırılması (ıslak transfer) ya da jel-zar sandviçin transfer tamponuna (yarı-ıslak transfer) batırılmış emici kağıt arasına yerleştirilmesi ile gerçekleştirilebilmektedir. Jel transfer sandviç içine yerleştirilerek (filtre kağıdı-jel-membran-filtre kağıdı) pedlerle tampon yapılı ve bir destek levha ile bastırılır. Desteklenmiş jel sandviç, bir tank içine dikey olarak paslanmaz çelik/platin kablo ile bağlı elektrodlar arasına yerleştirilir ve tank transfer tamponu ile doldurulur (Şekil 5). Transferler oluşan ısıyı azaltmak için 4 °C buz torbası ile gerçekleştirilir. Transfer etkinliği transfer süresinin artışıyla geliştirilebilir ve genellikle düşük molekül ağırlıklı proteinler için yüksek molekül ağırlıklı olanlara göre daha iyidir. Ancak sürenin artışıyla proteinlerin membrana aşırı transferi riski vardır. Özellikle büyük por büyüklüğü (0.45µm) olan membranlar kullanıldığında düşük molekül ağırlık proteinler (< 30 kDa) için risk yüksektir⁽¹²⁾.

d. Yarı-Kuru Elektroblotlama (Semi-Dry Transfer)

Islak transfer, jelden membrana protein transferi için en yaygın yöntemlerden olmasına rağmen daha fazla zaman ve efor gerektirir. Yarı kuru (semi-dry) transfer, ıslak transferden daha hızlı gerçekleşir. Yarı-kuru protein transferinde, transfer sandviçi semi-dry transfer aparatında yer alan iki plate elektrodu arasına horizontal

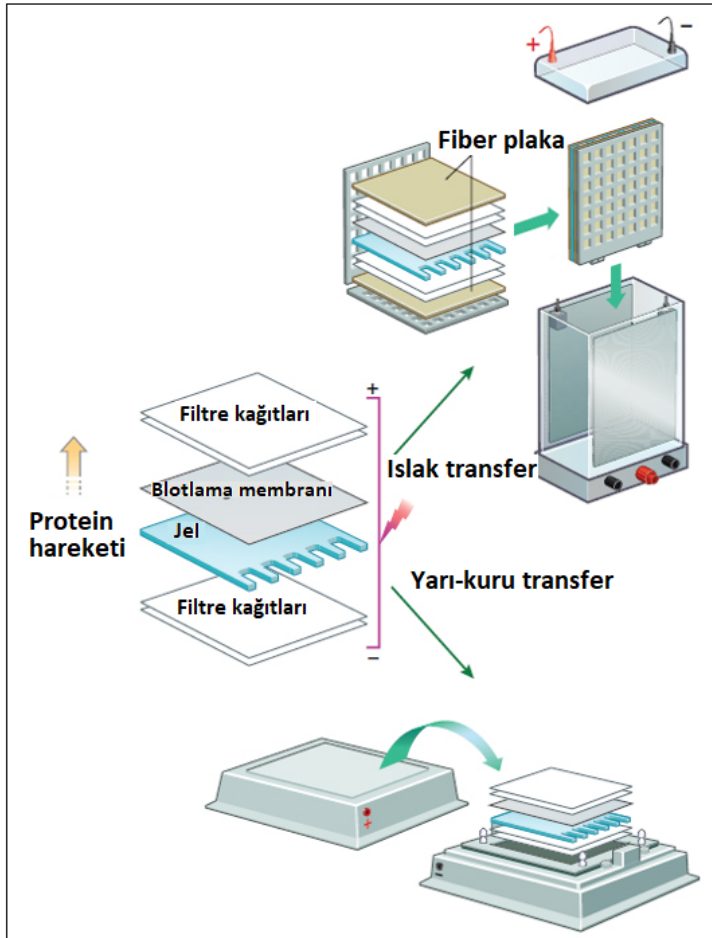
olarak yerleştirilir (Şekil 6). Jelin etrafı yerine jelin içinden geçen akımı maksimize etmek için transfer esnasındaki tamponun miktarı sandviçin içindeki ile sınırlandırılır. Tamponda yeterince ıslatılmış ekstra kalın filtre kağıtları (~ 3 mm kalınlığında) ve membran da buna yardımcı olur. Aynı şekilde filtre kağıdı ile membranın jel büyüklüğüne göre kesilmiş olması da önemlidir. Bu teknikle 1 ila 4 jel hızlı bir şekilde membranlara elektroblotlanabilir. Transfer tamponunda metanol yer alabilir, fakat aromatik hidrokarbonlar, klorine hidrokarbonlar ve aseton içeren diğer organik solvanlardan, semi-dry blottera zarar vereceğinden, sakınılması gerekir. Elektrotransfer 10-60 dakika süreyle ya sabit akımda (0.1 – ~0.4 A) veya voltajda (10- 25V) hazırlanır. Transfer zamanını 7-10 dakikaya indirmek için metanol içermeyen

transfer tamponları önerilmektedir. Bu şekilde, 14-116 kDa arasındaki proteinler için %60-80 transfer etkinliği elde edilebilir⁽²¹⁾.

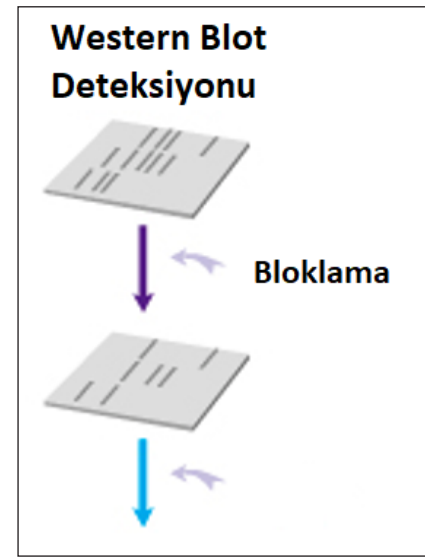
IV. NONPESİFİK BÖLGELERİN BLOKE EDİLMESİ- BLOKLAMA

Western blotlamada kullanılan membran destekleri proteinler için yüksek afiniteye sahiptir. Bu nedenle proteinlerin jelden transferinden sonraki aşamalar esnasında antikor deteksiyonunda nonspesifik bağlanmayı önlemek için membranın kalan yüzeyinin bloke edilmesi önemlidir (Şekil 7),⁽⁷⁾. Saf protein analizi için membran üzerinde boş bölgelerin bloke edilmesi için yağsız süt tozundan normal seruma kadar değişen aralıkta farklı bloklayıcı tamponlar kullanılmaktadır⁽²²⁾.

Bloke edici tampon gürültüyü (background) azaltarak sensitiviteyi iyileştirmek için gereklidir. Her antijen-antikor çifti kendine özgü karakteristiklere sahip olduğundan tek başına hiçbir bloke edici ajan her durumda ideal değildir. Bu nedenle optimizasyon için bloke edici tamponların deneysel olarak test edilmesi gerekmektedir.



Şekil 6: Western blotlama ıslak ve yarı kuru blotlama tekniklerinin karşılaştırılması



Şekil 7: Nonspesifik bağlanmaların önlenmesi için membrana uygulanan bloklayıcı aşaması

Yıkama tampon formülasyonları

Diğer immunassay prosedürlerine benzer şekilde Western Blotlama yıkama aşamaları ile ayrılmış farklı immunokimyasal reaktiflerle bir seri inkübasyondan oluşmaktadır. Yıkama aşamaları bağlı olmayan reaktifleri uzaklaştırmak ve backgroundu azaltmak için gereklidir: Böylece sinyal:gürültü oranı artırılır. Yetersiz yıkama backgroundun artışına neden olurken, aşırı yıkama blottaki antikor ve/veya antijenin elüsyonu yoluyla sensitivitenin azalmasına yol açar. Western blotlamanın diğer aşamalarında olduğu gibi farklı tamponlar kullanılabilir. Bazen yıkama tamponu ilave kimyasal olmasızın, Tris tampon salin (TBS) veya fosfat tampon salin (PBS) gibi sadece fizyolojik bir tampon içerir⁽²³⁾. Çok yaygın olarak nonspesifik bağli materyali uzaklaştırmak

için tampona %0.05 Tween 20 gibi bir deterjan eklenir. Diğer bir yaygın teknik, yıkama tamponuna 1:10 dilüsyonda bloke edici solüsyon eklemektir ⁽⁷⁾. Bloke edici ajanla deterjanın birlikteliği, membrandaki bloke edici ajanın elüsyonunu önleyerek ve/veya membranda immobilize olanlar yerine solüsyondaki proteinle oluşan nonspesifik etkileşimlere izin vererek yöntemde backgroundu azaltmaya yardım edebilir.

V. DETEKSIYON

İlgili proteine bağlanan problemlerin western blotlama yöntemiyle deteksiyon yöntemleri enzimatik (kolorimetrik ve kemilüminesan), radyoaktif ve floresan yöntemlerle gerçekleştirilmektedir (Şekil 8). Hangi sistem kullanılırsa kullanılsın sinyalin yoğunluğunun membran üzerindeki antijen miktarıyla korele olması gerekir.

Antikorlar

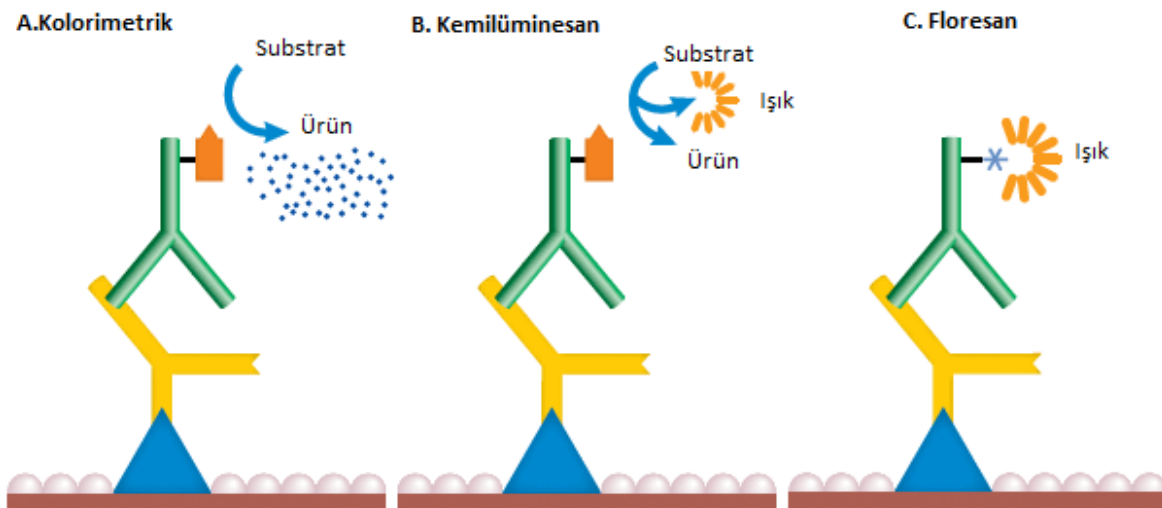
Antikorlar spesifik proteinler üzerindeki spesifik epitoplara bağlanan proteinlerdir. Bloklamadan sonra membran primer antikor ile inkübe edilip yıkama tamponları ile yıkama işleminden sonra sekonder antikorla inkübe edilerek tekrar yıkanır. Çalışma yapmadan önce antikorların optimal konsantrasyonlarının belirlenmesi çok önemlidir (Burnette, 1981). Antikor konsantrasyonu, en iyi sinyal/gürültü oranını sağlayacak şekilde

optimize edilmelidir. Western blotlamada monoklonal ve poliklonal olmak üzere 2 tip antikor kullanılır. Her antikor kendine özgü karakteristiklere sahiptir. Monoklonal antikorlar genellikle farelerden üretilir. Poliklonal olanlar genellikle tavşan veya keçiden üretilirler. Monoklonal antikorlar ilgilenilen protein üzerinde sadece bir epitopa sahipken, poliklonal olanlar çok sayıda epitopa sahiptir. Hem monoklonal hem de poliklonal antikor kullanımında avantajlar ve dezavantajlar olabilmektedir ⁽²⁴⁾. Eğer epitop protein denatürasyonunda değişime uğrarsa proteini tanıyamaz ⁽⁹⁾.

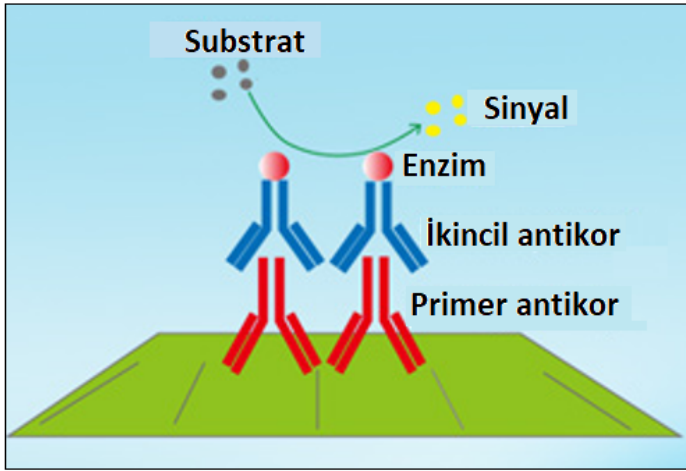
Primer ve Sekonder Antikorlar

Western blotlama spesifik bir proteini veya bir grup protein üzerindeki epitopu (ör, SH2 domeni veya fosforile tirozin) tanıyan bir primer antikorla bloke edilmiş bir membranın problemlenmesiyle gerçekleştirilir. Genel olarak bir Western blotta hedef proteini tanıyan primer antikor direkt olarak saptanamaz. Bu nedenle hedef antijenin deteksiyonu için işaretli sekonder antikor veya diğer deteksiyon reaktifleri kullanılır ⁽²⁵⁾. Western blot deteksiyonunda çok farklı işaretli sekonder deteksiyon reaktifleri kullanılmaktadır. Bunların seçimi ya primer antikorun ait olduğu hayvan türüne yada bu antikorun üzerindeki etikete (ör, biotin veya DIG) bağlıdır. Direkt dedeksiyonda blot üzerindeki antijeni saptamak için kullanılan

primer antikor enzimle veya floresan boya ile işaretlenir. İndirekt dedeksiyonda ise ilk olarak antijene bağlanması için primer antikor eklenir. Bunu primer antikora karşı yönlendirilmiş işaretli sekonder antikor takip eder. İşaretler arasında floresan veya rodamin gibi floresan problemler, horseradish peroksidaz veya alkalın fosfataz gibi enzim konjugatları yer alır (Şekil 9). İndirekt yöntem direkt yöntemle karşılaştırıldığında birçok avantaj sunmaktadır ⁽²⁵⁾. Belirli bir antikorun optimal dilüsyonu dedeksiyon sistemine göre deneysel olarak belirlenmelidir. Sensitivitesi yüksek dedeksiyon sistemi düşük sensitiviteli dedeksiyon sistemlerine göre daha az antikor gerektirir bu antikor maliyetinde önemli tasarruf ve sınırlı antikorla çok daha fazla deney yapılmasına imkan verir. Daha düşük miktarda antikor kullanımı backgroundun azalmasına yardımcı olur. Sınırlı miktarda antikor kullanımı hedefe yüksek afinite ile artan bir spesifite gösterir. Çoğu antikor nonspesifik bandlara bağlanır. Kullanılan antikorumuzun spesifitesini doğrulamak için rekombinant proteinler kullanılır. Eğer bandlar bulanık veya diffüz görünümdeyse bu lipid modifikasyonunun işareti olabilir. Protein çok sayıda banda sahipse bu durum proteinin fosforilasyonuna veya alternatif kesilmiş izoformlarının bulunduğuna işaret edebilir ⁽²⁴⁾.



Şekil 8: Kromojenik, floresan ve kemilüminesan özelliklerine göre enzim-substrat reaksiyonları



Şekil 9: Western blotlamada kullanılan primer ve sekonder antikorlar

Enzimatik işaretler Western blotlamada çok yaygın kullanılırlar ve ekstra aşamalar gerektirmelerine rağmen uygun bir substratla optimize edildiklerinde son derece sensitif olabilirler. Protein saptanmasında işaretleyici olarak en yaygın kullanılan iki enzim, Alkalın fosfataz (AP) ve Horseradish peroksidaz (HRP)'dir. Her bir enzimle kullanım için kromojenik, florojenik ve kemilüminesan substratlar mevcuttur. Alkalın fosfataz enziminin reaksiyon hızının lineer kalması nedeniyle sensitivitenin yüksek olmasını sağlayarak diğer enzimlere göre farklı bir avantaj sunmaktadır. Ancak bu durum reaksiyon süresi uzatmakta ve bu nedenle artmış reaksiyon zamanı düşük sinyal:gürültü oranlarıyla sonuçlanan yüksek backgroundta neden olmaktadır. Antikorlarla konjuge Horseradish peroksidaz (HRP) daha küçük olması ve konjugasyon reaksiyonlarıyla uyumlu olması nedeniyle hem enzim hemde antikorun spesifik aktiviteleri açısından antikor-AP konjugatlarına göre üstünlük sağlamaktadır. Ayrıca yüksek aktivitesi, stabilitesinin iyi olması, düşük maliyeti ve substratlarının yaygın mevcudiyeti HRP enziminin çoğu uygulamada seçim sebebidir.

Enzim konjuge antikorlar hem dedeksiyonda, hemde değişik substratlar mevcut olduğundan Western blot metodlarının dökümentasyonunda daha fazla esneklik sunarlar. En basit dedeksiyon/dökümentasyon sistemi kromojenik substratların kullanımındır. Diğer substratlar kadar sensitif

olmasalarda kromojenik substratlar blotun direkt görüntülenmesine izin verirler. Ancak kromojenik substratlar blot kurdukça solmaya eğilimlidir, dökümentasyonda bu nedenle kullanışlı değildirler.

Florofor-konjuge antikorların kullanımı daha az aşama gerektirir. Çünkü yöntemde substrat kullanım aşaması yoktur. Protokol kısa olmasına karşın bu metod eksitasyon ışık kaynağına duyduğu ihtiyaçtan dolayı floresan sinyal tespiti ve dökümentasyonu için özel ekipman gerektirir. Dijital görüntüleme son gelişmeler ve kızıl ötesi, yakın kızıl ötesi ve kuantum gibi yeni floroforların gelişimi Western blotlama ve diğer immunassaylerde kullanılan floresan problemlerin sensitivitesini ve popüleritesini arttırmıştır. Ekipman ve floresan-konjuge antikorlar oldukça pahalı olmasına rağmen bu metod multipleks uygunlukta ek avantaj sağlar (aynı deneyde birden fazla floroforun kullanımı). Ayrıca diğer blotlama prosedürleri ile karşılaştırıldığında kimyasal atık oldukça azalır.

En sık kullanılan ve hassas bir yöntem olan Kemilüminesans dedeksiyonda artırılmış kemilüminesans (ECL) ilgili proteinin göreceli kantitasyonu için kullanılmaktadır^(24,26). Birincil antikor, ilgilenilen proteine bağlanır ve genellikle horseradish peroksidaz (HRP) ya da alkalın fosfataz (AP)'a bağlı olan ikincil antikora bir kemilüminesan ajanı ile muamelesi sonucu oluşan reaksiyonda protein miktarı ile ilişkili lüminesans üretilir. Işık bir kamera tarafından algılanır

ve detekte edilir. Bu yöntem kullanılarak 1 pg'dan daha az protein tespit edilebilir. Kemilüminesan blotlama substratları diğer substratlardan farklıdır. Çünkü sinyal, enzim-substrat reaksiyonunun geçici bir ürünüdür, sadece reaksiyon olduğu sürece devam eder. Substrat tükendiğinde veya enzim aktivitesini kaybettiğinde reaksiyon durur ve sinyal kaybolur. Ancak uygun antikor dilüsyonları ve yeterli substrat kullanılarak iyi-optimize edilmiş deneylerde, reaksiyon substrata bağlı olarak 1-24 saat stabil ışık çıktısı üreterek X-ray film veya dijital görüntüleme sistemi ile dökümente edilebilen sabit ve sensitif dedeksiyona olanak verir⁽²¹⁾.

Protein Miktar Analizi

Protein analizinde densitometri, mevcut hedef protein miktarını ölçmek için kullanılabilir gibi görüntü analiz yazılımları da protein bantlarını analiz etmek ve protein ekspresyonu değerlerini hesaplamak için kullanılabilir. GAPDH, beta-aktin gibi genler internal kontrol görevi görür ve bu proteinlere kıyasla hedef proteinlerin miktarı semi kantitatif olarak up ya da down regüle olması şeklinde kat değeri verilerek belirlenir⁽⁷⁾.

Kaynaklar

1. Southern, EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*. 1975; 98 (3): 503–517.
2. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979; 76(9): 4350–4354.
3. Peach M, Marsh N, Miskiewicz EI, MacPhee DJ. Solubilization of proteins: the importance of lysis buffer choice. *Methods Mol. Biol.* 2015;1312:49-60.
4. Sapan CV, Lundblad RL, Price NC. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and applied Biochemistry*. 1999; 29(2): 99-108.
5. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.



6. Andrews AT. *Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications*. Oxford University Press. 1986; No. 04; QD79. E44, A5.
7. Jensen EC. *The Basics of Western Blotting. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2012; 295(3):369–71.
8. Burnette WN. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981;112(2):195–203.
9. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*. 2012; 4(9):429-434.
10. Dunn MJ. *Electrophoresis in the presence of additives. Gel electrophoresis proteins*. BIOS Scientific Publishers.1993;41-49.
11. Walker JM. Gradient SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 1984;1:57–61.
12. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting: methods and protocols. *Methods in molecular biology*.Springer. 2015;509.
13. Pettegrew CJ, Javini R, Islam MR. Transfer buffer containing methanol can be reused multiple times in protein electrotransfer. *Journal of biomolecular techniques*. 2009; 20(2): 93-95.
14. Klein D, Kern RM, Sokol RZ. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochemistry and molecular biology international*. 1995;36(1):59-66.
15. Gershoni JM, Palade GE. Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem*. 1983;131(1):1–15.
16. Too CK, Murphy PR, Croll RP. Western blotting of formaldehyde-fixed neuropeptides as small as 400 daltons on gelatin-coated nitrocellulose paper. *Analytical biochemistry*. 1994;219(2):341–348.
17. Martinez-Flores K, Salazar-Anzures AT., Fernandez-Torres J, Pineda C, Aguilar-González CA, López-Reyes A. Western blot: a tool in the biomedical field. *Investigación en Discapacidad*. 2017; 6(3):128-137.
18. Dubitsky A, DeCollibus D, Ortolano GA. Sensitive fluorescent detection of protein on nylon membranes. *J Biochem Biophys Methods*. 2002;51(1):47–56.
19. Chen H, Chang GD. Simultaneous immunoblotting analysis with activity gel electrophoresis in a single polyacrylamide gel. *Electrophoresis*. 2001; 22(10):1894-1899.
20. Peferoen, M. Vacuum Blotting: An Inexpensive, Flexible, Qualitative Blotting Technique. In: Walker, J.M., Ed. *Methods in Molecular Biology-New Protein Techniques*. New York: Humana Press. 1988; 3: 383–393.
21. Kurien BT, Scofield RH. Protein blotting: a review. *Journal of immunological methods*. 2003;274(1-2):1–15.
22. Spinola SM, Cannon JG. Different blocking agents cause variation in the immunologic detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *Journal of immunological methods*. 1985; 81(1): 161–165.
23. Moore C. Introduction to western blotting [Internet]. MorphoSys UK. Oxford, UK: AbD Serotec. 2009;4-20.
24. MacPhee DJ. Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2010; 61(2): 171-177.
25. Yang Y, Ma H. Western blotting and ELISA techniques. *Researcher*. 2009; 1 (2): 67-86.
26. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods*. 2006;38(4):283–293.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Dr. Elif ULU ve Dr. Canan CACINA

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), küçük DNA fragmanlarındaki belirli dizilerin hızlandırılmış bir şekilde çoğaltılmasına izin veren *in vitro* replikasyondur⁽¹⁾. Bu teknik, araştırmacı Kjell Kleppe'nin laboratuvarında tasarlanmış olup 1985 yılında Kary Mullis, sıcaklığa dayanıklı polimeraz kullanarak polimeraz zincir reaksiyonu teknolojisini ortaya koymuştur^(2,3). Mullis, 10 Aralık 1993'te bu icadından dolayı “Nobel Kimya” ödülüne layık görülmüştür⁽³⁾. PZR adı ise, DNA polimeraz enziminin DNA sentezinde görev aldığı gerçeğinden türetilirken, ‘zincir reaksiyonu’ üssel büyüme (2n oranında; burada n, nesil sayısını belirtir) anlamına gelmektedir⁽⁴⁾.

Başlangıcından itibaren PZR; biyoteknoloji, hücre biyolojisi, genetik mühendisliği, adli bilimler, tıp bilimi, ilaç araştırmaları gibi çeşitli alanlarda uygulanmıştır. PZR'nin verimli bir şekilde gerçekleştirilmesi için yöntemler hassas bir şekilde optimize edilmiş ve son otuz yılda oldukça gelişim göstermiştir⁽⁵⁾. İzotermal ve geleneksel amplifikasyon yöntemleri, nükleik asit dizilimi, yüksek çözünürlüklü erime analizi, DNA mikrodizileri, doku dizileri, kütle spektrometrisi, nanopartiküller ve floresan *in situ* hibridizasyon dâhil olmak üzere çok çeşitli tekniklerden faydalanılarak belirli sağlık veya hastalık durumlarındaki değişikliklerin tespiti moleküler tanıda sık kullanılır hale gelmiştir⁽⁶⁾.

PZR'nin yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü; tanısal klinik uygulamalarda, özellikle vücut sıvısı enfeksiyonlarında nadir görülen mikroorganizmaların saptanmasına olanak sağlamaktadır. Aynı zamanda kültüre kıyasla örnekteki organizmaları daha hızlı, daha ucuz ve daha doğru olarak tespit eden bir yöntemdir. Son yıllarda idrar yolu enfeksiyonu semptomları olan hastalarda geleneksel idrar kültüründen daha fazla bakteri tanımlayan ve ayırt eden, doğru idrar analizini mümkün kılan çoklu

(multipleks) PZR tekniğinin uygulandığı gözlenmektedir⁽⁷⁾. Hassas bir teknik olan PZR'nin, analiz edilecek kadar yeterli kopya üretmesi için sadece eser miktarda DNA'ya ihtiyaç vardır. Periferik kan, cilt, saç, tükürük ve mikroplar dâhil olmak üzere çeşitli doku ve organizmalardan DNA elde edildikten sonra PZR gerçekleştirilebilmektedir⁽⁸⁾.

PZR'nin Aşamaları:

Geleneksel PZR'de; kalıp DNA, kalıp DNA'dan yeni ipliği yapmakta görevli dört deoksiribonükleotid (dNTP'ler: dATP, dTTP, dGTP ve dCTP), iki primer veya oligonükleotit, DNA polimeraz enzimi, tampon çözeltisi ve polimeraz enzimi tarafından tanınacak nükleotidlere katılan Magnezyum (Mg²⁺); kalıp DNA'nın milyonlarca kopyasını çoğaltmak için bir dizi termal döngüye tabi tutulur^(2,9). Bu döngü temelde üç aşamayı kapsayan süreçtir⁽⁷⁾:

1. Çift sarmallı DNA kalıbının denatürasyonu,
2. Hedefe özgü primerlerin bağlanması,
3. Bağlanmış primerlerin DNA polimeraz ile uzatılması.

Yöntem, kalıp DNA'ya ve polimeraz tipine bağlı olarak 94°C-96°C arasındaki sıcaklıkta 1 dakika ila 10 dakika arası boyunca gerçekleştirilir. Bunu, tipik olarak 93°C-98°C arasındaki sıcaklıkta yürütülen denatürasyon adımı takip eder. Çift sarmallı DNA'daki (dsDNA) hidrojen bağları kırılır ve sonuçta her bir dsDNA'dan iki tane tek sarmallı DNA (ssDNA) molekülü oluşur (denatürasyon aşaması). Sıcaklık daha sonra 55°C ila 65°C aralığındaki primere özgü bağlanma sıcaklığına düşürülür, böylece primerler tek sarmallı DNA moleküllerinin tamamlayıcı sekanslarına bağlanır (bağlanma aşaması). Daha sonra PZR karışımı, kullanılan polimeraza bağlı olarak 72°C-80°C arasındaki sıcaklığa kadar ısıtılır. Bu adım sırasında tamamlanmamış DNA sekansı, orijinal DNA kalıbının kopyası olan yeni çift sarmallı DNA sentezleyen serbest dNTP'ler varlığında polimeraz ile uzatılır (uzama aşaması)⁽⁵⁾. Bu üç adım

orijinal DNA'nın çoklu kopyalarını üretmek için genellikle 20-40 kez tekrarlanır⁽¹⁰⁾.

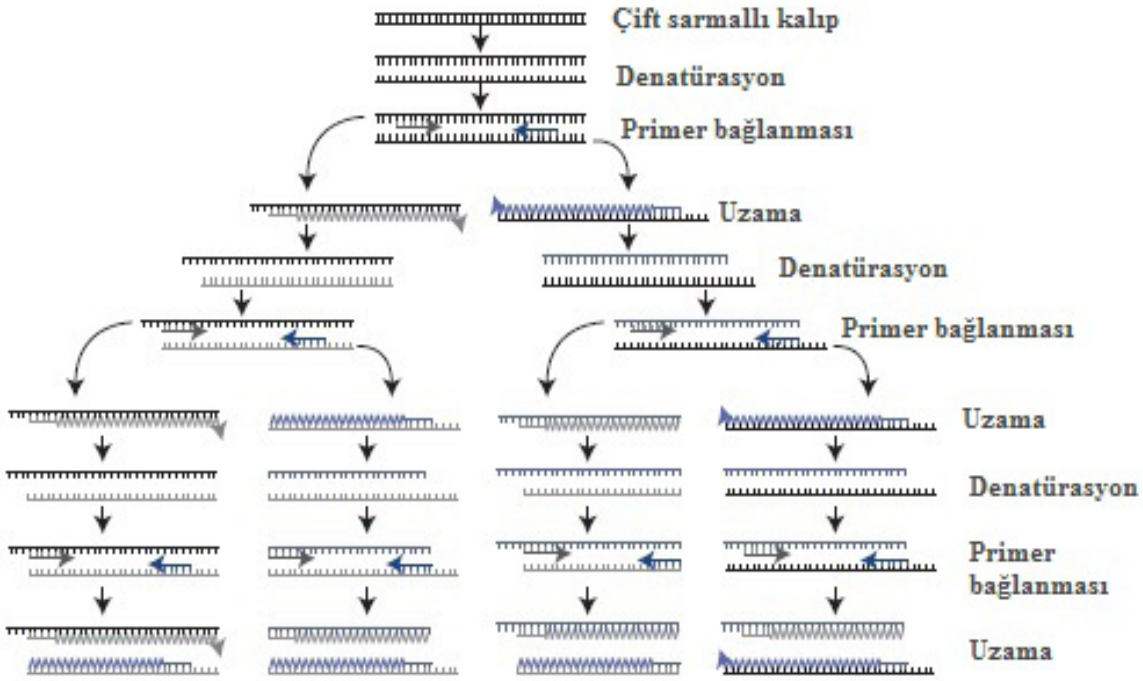
PZR analizlerinde etkili bir *in vitro* replikasyon elde etmek için döngü koşulları (döngünün her fazının süresi ve sıcaklığı, döngü sayısı) ve karışımdaki reaktanların konsantrasyonu (primerler, magnezyum iyonları, dNTP'ler ve DNA kalıpları) gibi parametrelerin koordine edilmesi gerekir. Bununla birlikte *in vitro* replikasyondaki en kritik faktör, uygun primer dizisinin seçimidir. PZR'deki primer tasarım sürecinde dikkate alınması gereken çeşitli faktörler vardır⁽¹⁾:

- i. 18 ila 26 baz arasında değişen primer uzunluğu,
- ii. %40-60 arasında guanin-sitozin yüzdesi,
- iii. Erime sıcaklığı (Tm) değerleri 45°C ila 65°C arasında olmalı (primerler arasındaki maksimum fark 5°C),
- iv. Dört bazdan fazla baz tekrarının olmaması ve
- v. Primerin 3' ucunda G, C, GC veya CG'nin varlığı.

Bu kriterlerdeki tutarsızlıklar DNA amplifikasyonunun özgüllüğünü veya duyarlılığını, olası verimini azaltan moleküller içi ve moleküller arası yapıların bir sonucu olarak PZR'lerde spesifik olmayan ürünlerin oluşumuna yol açabilir⁽¹⁾.

PZR Ürünlerinin Kontrolü:

Polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyon ürünlerinin (amplimerler) analizi, çoğaltılan ilgili DNA bölgesinin kalitesini (yani spesifik olmayan amplimerlerin varlığı veya yokluğu) ve miktarını (göreceli değerler veya kesin değerler) belirlemede önemlidir. PZR ürünlerini analiz etmek için genellikle kullanılan teknikler; analizin PZR reaksiyon kabı dışında gerçekleştirildiği *ex-vitro* teknikler (örneğin jel elektroforezi, DNA hibridizasyonu vb.) ve analizin PZR reaksiyon kabı içinde ve PZR termosiklusu sırasında kendiliğinden gerçekleştirilen daha yeni geliştirilmiş *in vitro* teknikler. Her iki teknikte PZR ürünlerinin analizden önce görüntülenmesini gerektirir, bunun için de bazı metodolojiler kullanılır⁽¹²⁾.



Şekil: PZR'nin aşamaları ⁽¹¹⁾.

PZR Avantajları ve Sınırları:

Polimeraz zincir reaksiyonunun ortaya çıkışı, Southern blot analizine alternatif sağlamıştır ve aşağıdaki avantajları bulunmaktadır ⁽³⁾:

- Teknik olarak daha basittir ve daha hızlı geri dönüş süresine sahiptir; gereken klinik malzeme miktarı çok daha azdır.
- Çoğu durumda test; formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş materyaller üzerinde yapılabilir.
- PZR ile tek bir saç folikülünden yeterli DNA'nın çoğaltılması ve yıllar önce korunan dokuların mikroskop lamplarından DNA analizi bile mümkündür.
- PZR, sekanslamadan sonra mutasyonları saptamak için de kullanılır.

PZR'nin, bahsedilen ve ayrıca bakteriyel türlerin amplifikasyonunu mümkün kılması gibi avantajları olsa da çoklu etiyolojiye sahip bakteriyel enfeksiyonları teşhis etmek için ilaç duyarlılığı testleri ve genetik tiplendirme gibi ilave işlemler yapılmasına ihtiyaç vardır ⁽⁷⁾.

PZR'nin bir başka sınırlaması, titiz çalışma teknikleri ve kalite kontrol gerektirdiğinden yanlış pozitif ve negatif sonuçların olasılığıdır ^(7,13). Ayrıca PZR, bakteri varlığını bildirir, ancak miktarını belirtmez; bu nedenle kontamine olan numuneyi potansiyel enfeksiyon nedeninden ayırtmak zor olabilir ⁽⁷⁾.

PZR Çeşitleri:

PZR tekniğinin bulunmasından bu yana pek çok metot geliştirilmiştir.

1. Asimetrik PZR:

PZR tekniğinin geliştirilmesinden kısa bir süre sonra açıklanan bu yaklaşımın prensibi, PZR karışımına eşit olmayan konsantrasyonlarda iki amplifikasyon primerinin ilave edilmesidir. Asimetrik PZR'de sınırlayıcı primerin tüketimini takiben amplifikasyon primeri istenen ssDNA'yı üretmek devam eder. Basit görünse de asimetrik PZR, spesifik olmayan amplifikasyona eğilimlidir ve genellikle spesifik ssDNA'nın üretimini en üst düzeye çıkarmak için kapsamlı optimizasyon gerekmektedir. Araştırmacılar uygun primer oranlarını,

kalıp konsantrasyonlarını, PZR koşullarını ve amplifikasyon döngülerinin sayısını belirleyerek asimetrik PZR'nin optimizasyon koşullarının oluşmasını sağlar ⁽¹⁴⁾.

2. Allel Spesifik PZR:

Allele özgü PZR; primerin 3' bağlanma bölgesindeki tamamlayıcılığın, amplifikasyonun meydana gelmesinde önemli olduğu ilkesine dayanmaktadır. Primerin diğer noktalarındaki baz uyumsuzlukları tolere edilebilirse de, biri normal allele eşleşen ve diğeri de primerin 3' ucunun patojenik alleli tamamlayıcı olduğu iki set primeri tasarlanarak 3' ucundaki uyumsuzluklar PZR'nin uzama fazındaki amplifikasyonu önler. Hangi primer setinin PZR ürünü ürettiği belirlenerek bireyde normal, patojenik veya her iki allelin mevcut olup olmadığı saptanabilir ve genellikle aynı reaksiyonda eşzamanlı olarak gerçekleştirilen çoklu varyantlar için tekrarlanır ⁽¹⁵⁾.

3. Çoklu PZR (Multiplex PCR):

Çoklu etiyolojilerin bakteriyel enfeksiyonlarında, ajanın PZR teknikleri ile tanımlan-

ması maliyeti yüksektir. Bu durumlarda, çoklu PZR gibi tek reaksiyonla birden fazla DNA hedefini amplifiye edebilen deneylerin en verimli seçenek olduğu gösterilmiştir. Bu tip PZR’de, aynı test tüpüne birden fazla primer çifti dâhil edilir. Çoklu PZR koşulları için optimizasyon sürecinde primer tasarım problemi nedeniyle klinik teşhislerde uygulanması zahmetlidir. Bu teknikte, karışımda kullanılan primerlerin her biri yukarıda belirtilen tüm parametreleri karşılayacak şekilde tasarlanmalıdır. Ayrıca birden fazla hedef sekansın amplifikasyonunu verimli bir şekilde elde etmek için kullanılan tüm primer setleri, tek primer çifti gibi ayarlanmalıdır ⁽¹⁾.

4. Demirlenmiş PZR (Anchored PCR):

Çoğaltılmak istenen DNA’nın sadece bir bölgesinin bilindiği polimeraz zincir reaksiyonu çeşididir. Bu yöntemde, DNA dizilerinin sadece biri büyütülür ve iki primer yerine bir primer kullanılır. Çoğaltılacak DNA bilinen bir diziyeye bağlanır ve bu bilinen dizi gene özgü primer olarak kullanılır ⁽³⁾.

5. Dijital PZR:

Dijital PZR (dPCR) teknolojisi, üçüncü nesil PZR tekniği olarak ortaya çıkmıştır ⁽¹⁶⁾. “Dijital PZR” terimi, Vogelstein ve Kinzler tarafından 1999 yılında saptanmıştır ⁽¹⁷⁾. dPCR’de; polimeraz zincir reaksiyon karışımı, gerekli florofor ile birlikte birkaç küçük üniteye bölünür. PZR karışımının daha küçük birimlere ayrılması, her birimdeki hedef DNA dizisinin nispi konsantrasyonunu artırır, bu da sırayla diğer yabancı tip diziler arasında nadir mutasyonların saptanmasına yardımcı olur. Ayrılan her ünite, geleneksel PZR durumunda olduğu gibi aynı termal döngüye tabi tutulur ⁽⁵⁾. qPCR ve dPCR arasındaki temel farklar vardır ve bunlardan biri; floresans çıkışı qPCR işlemi boyunca izlenirken, dPCR’de sadece üssel faz sırasında yapılır. Ancak dPCR tekniği, çeşitli potansiyel klinik uygulamalarda qPCR ile karşılaştırılabilir hassasiyete sahiptir. dPCR’nin en büyük avantajlarından biri ise, PZR inhibisyonu olasılığını azaltmasıdır. Ayrıca, dPCR bazı

uygulamalar için iyi tekrarlanabilirlik ve üretilebilirlik sunar ve böylece dijital PZR teknolojisinde son yirmi yılda bir dizi önemli gelişme sağlanmıştır. Bununla birlikte, dijital PZR teknolojisi hala istenen işlemi gerçekleştirmek için karmaşık, büyük donanım ve laboratuvar kurulumu gerektirmektedir ⁽⁵⁾.

6. Gerçek Zamanlı PZR (Real-Time PCR):

Gerçek zamanlı PZR günümüzde çok tercih edilen bir yöntemdir ⁽¹³⁾ polimerase chain reaction (PCR). Gerçek zamanlı PZR, hedefin bir kalibratöre göreceli olarak ölçülmesini sağlar ve bu yüzden yöntem kantitatifdir (qPCR) ⁽¹⁰⁾. qPCR, standart PZR’nin gelişmiş halini temsil eder. Bu teknikte ürünler, floresan boyalar kullanılarak reaksiyon döngüleri boyunca sürekli olarak izlenir. DNA dizisinin başlangıç miktarı; qPCR’nin floresans çıkışı eğrisinin, DNA kopyalarının bilinen farklı başlangıç sayılarıyla üretilen standart eğri ile karşılaştırılmasıyla oluşturulabilir. Eşik döngüsü (Ct), floresan sinyalinin eşik geçmesi ve saptanabilmesi için gereken döngü sayısı olarak tanımlanır. Ct seviyeleri, numunedeki hedef nükleik asit miktarı ile ters orantılıdır ⁽²⁾.

Gerçek zamanlı PZR’nin, örnek çıktısı hızlıdır ve geleneksel yöntemlere kıyasla daha hassas ve spesifiktir ⁽¹³⁾. qPCR, klinik ortamlarda yaygın olarak uygulanmaktadır ve nükleik asit ölçümü için altın standart olmaya devam etmektedir ⁽¹⁰⁾. Günümüzde ise yüksek duyarlılık seviyesi nedeniyle qPCR tekniği, farklı hematolojik malignite tiplerinde habis hücrelerin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır ⁽²⁾.

7. Hot start PZR:

Hot start PZR yöntemleri, yüksek sıcaklık döngüsünden önce spesifik olmayan ürün oluşumunu azaltarak veya ortadan kaldırarak özgüllük oranını artırır. Bu yöntem denatürasyon süresinin önemli ölçüde arttırıldığı çok yönlü bir modifikasyondur ve reaksiyon özgüllüğünün ve doğruluğunun amplikon verimini artırma esasına dayanır. Hot start PZR’de amaç, ortaya çıkabilen spesifik olmayan ürünleri

ve primer-dimerini ortadan kaldırmaktır. Bu nedenle herhangi bir amplifikasyon gerçekleşmeden önce numune en uygun Tm’nin üzerindeki sıcaklığa, en az 60°C’ye kadar ısıtılır. Genelde DNA polimeraz başlama, uzama, denatürasyon boyunca reaksiyondan çekilir ⁽¹⁸⁾.

8. İmmüno PZR:

İmmüno-PZR (IPCR), çok yönlü ELISA antijen saptamasını ve ultra duyarlı PZR sinyal amplifikasyonunu birleştirir; böylece çok geniş bir hedef yelpazesinin yüksek hassasiyette tespitini mümkün kılar ^(19,20). IPCR, ELISA’ya göre tespit duyarlılığında 10 ila 10⁹ arasında artış sağlar. Bu da ELISA’nın sinyal üreten antikor-enzim konjugatının, PZR amplifikasyonu için işaretleyici görevi gören antikor-DNA konjugatı ile değiştirilmesiyle elde edilir. İmmüno-PZR, immünolojik araştırma ve klinik teşhislerde geniş uygulama alanına sahiptir ⁽²¹⁾.

9. In situ PZR:

In situ PZR, korunmuş hücreler veya doku kesitleri içindeki spesifik gen dizilerinin amplifikasyonu ve kopya sayılarının *in situ* hibridizasyon (ISH) veya immünohistokimya aracılığıyla tespit edilebilen seviyelere yükseltilmesini sağlayan tekniktir. Genellikle *in situ*, virüsü tespit etmek için mevcut en iyi yöntemdir. Bununla birlikte, RT-*in situ* PZR’de kullanılan primerler uzun ömürlü ve ucuz olduğundan RNA eldesi için de tercih edilebilmektedir ⁽²²⁾.

10. Koloni PZR:

Koloni PZR’da öncelikle seçilen bakteri (*E.coli*) veya maya kolonilerinin, büyüme (agaroz) katmanından plazmid aracılığıyla çoğaltılması gerekir. Daha sonra koloninin ilgili DNA fragmanını veya plazmidini içerip içermediğini belirlemek için PZR yapılır ⁽³⁾.

11. Mikro PZR:

Mikro PZR, biyoçip bazlı deney protokolüdür. Bu teknikte masaüstü boyutlu termo döngüler kullanılır, hızlı numune girişi ve sonucu elde edilir. Böylece hem reaktif maliyetini hem de ayarlanan sıcaklıklar arasındaki geçiş süresini önemli ölçüde azaltır. Patojenlerin varlığını, genetik



dizideki kusurları tespit edebilir veya adli tip analizinde kullanılabilir ⁽²³⁾.

12. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD):

Farklı bakteri türlerinin suşları arasında ayırım yapmak için yaygın olarak kullanılan rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD), ilk olarak 1990'da tanımlanan PZR temelli bir yöntemdir. Bu yöntemle birlikte rastgele bir DNA dizisi her bir suş için spesifik ampfliye DNA fragmanı dizisi olan genetik bir profil üretmek için tanımlanmış genomik dizileri hedefleyen tek bir primer olarak kullanılır ⁽²⁴⁾.

13. Revers-Transkriptaz PZR (RT-PZR):

Genellikle benzer adlandırma kuralları nedeniyle gerçek zamanlı PZR ile karıştırılan revers transkriptaz PZR (RT-PZR), çok küçük RNA örneklerinden kolayca saptanabilir miktarlarda DNA'yı çoğaltmak için kullanılan tekniktir. RT-PZR yönteminin temel yaklaşımı, saptanacak hücrelerin test edilen ortamdaki diğer hücrelerde bulunmayan mRNA'yı tespit etmektir, bu yüzden de tek bir hücrenin mRNA içeriği genellikle sinyal vermek için yeterli olmaktadır ⁽²⁵⁾.

14. Semikantitatif PZR:

Numunede mevcut olan nispi nükleik asit miktarını tespit eder. Numune RNA olduğunda cDNA, RT-PZR ile elde edilir. Daha sonra, iç kontroller (belirteç olarak kullanılır) çoğaltılır ve yaygın bir şekilde kullanılan belirteçler, Apo A1 ve B aktindir. Amplifikasyon ürünü elektroforez ile ayrılır ve agaroz jelde etidyum bromür ile boyandıktan sonra görüntü alınır, optik yoğunluk densitometre ile ölçülür. Tekniğin dezavantajı, yetersiz sonuçlar üreten spesifik olmayan hibridizasyon olasılığıdır. Spesifite kontrolü ise, hibridizasyon için oldukça spesifik probler kullanılarak gerçekleştirilir ⁽⁹⁾.

15. Ters PZR (İnvers PCR):

Ters PZR'de; ters yönde yönlendirilmiş, özel olarak tasarlanmış mutant primerler gerekli tüm mutasyonların eklenmesiyle çift sarmallı DNA çoğaltılır. Primer tasarı-

rımına dikkat edilerek nokta mutasyonlarının ve çoklu mutasyonların girişiyle, yeni sekansların eklenmesi veya sekans silinmesi gibi çeşitli modifikasyonların gerçekleştirilmesinde kullanılabilir ⁽²⁶⁾.

16. Touch-down PZR:

TD-PZR, özellikle Tm değeri hesaplamalarında bulunan sınırlamalarla ilgilenir ve yüksek sıcaklıkla özgüllüğün artırılması esasına dayanır. Reaksiyonların optimizasyonu ve primerlerin yeniden tasarlanması ihtiyacını büyük ölçüde azaltır. Bu teknik, yanlış eşleşmeyi ve spesifik olmayan ürünlerin üretimini ortadan kaldırmak için geliştirilmiştir ^(27,28).

17. Uzun aralıklı PZR (Long-range PCR):

Geleneksel Taq polimerazlarla elde edilenlerden çok daha büyük olan PZR ürünlerinin amplifikasyonuna izin veren yöntem, genellikle yüksek işlenebilirlikli Taq DNA polimeraz karışımına dayanır. Uygun koşullar altında 10-20 kb fragmanlar elde edilebilir, bunun yanında kaliteli genomik DNA'dan 27 kb büyüklüğünde fragmanlar sağlanabilmektedir. Uzun DNA fragmanlarının amplifikasyonu, fiziksel haritalama uygulamaları ve genomlardan doğrudan klonlama gibi birçok uygulama için tercih edilmektedir ⁽³⁾.

18. Yuvalanmış PZR (Nested PCR):

Yuvalanmış PZR, amplifikasyon ürünlerinin doğruluğunu artırabilen prob kullanılarak yapılan PZR'ye göre hem daha spesifik hem de daha hassastır ⁽²⁹⁾. Ayrıca, özgül olmayan ürünleri ortadan kaldırmak için güçlü bir araçtır. Temel prosedürü, tek DNA bölgesini amplifiye eden iki primer setini içermesidir ⁽¹⁸⁾. Bir primer grubunun ("iç" primerler olarak adlandırılır) hedef DNA sekansı, ikinci primer grubunun ("dış" primerler olarak adlandırılır) hedef sekansı içinde bulunur ⁽³⁾. Dış primerler, ilgilenilen segmentin üstündedir ve genellikle 20 ila 30 döngüde spesifik olmayan PZR ürünlerinin eldesinde kullanılır ⁽¹⁸⁾. Uygulamada, standart PZR reaksiyonu önce "dış primerler" kullanılarak hasta numunesi ile gerçekleştirilir. Daha sonra, amplifikasyon

hedefi olarak birinci reaksiyonun ürünü kullanılarak «iç primerler» ile ikinci PZR reaksiyonu gerçekleştirilir. İç primerler, sadece ilk PZR reaksiyonu belirli bir ürün verdiğinde çoğaldığından dolayı ikinci reaksiyonda, birinci reaksiyonun ürününü yeniden çoğaltarak testin özgüllüğünü artırır ⁽³⁾.

19. Geniş Aralıklı 16s rRNA PZR:

16S rRNA gen polimerazı, tüm bakterilerde bulunan değişken ve korunmuş bir bölgedir. Geniş aralıklı primerlerin kullanılmasıyla, 16S rRNA geni içindeki korunmuş sekanslar tanınır ve böylece bakteriyel taksonomi ve filogeni incelemelerinde kullanılır. 16S rRNA, yüksek enfeksiyon şüphesi olan ancak bakteri kültürleri negatif olan hastalardan klinik örneklerde bakteriyel patojenlerin saptanması ve tanımlanmasında alternatif sağladığı için klinik mikrobiyolojide önemli bir yer edinmiştir. Ayrıca 16S rRNA PZR, antibiyotiklerin başlamasından sonra yaşayamayan bakteri DNA'sını da tespit edebilir ve bu da kültür yöntemlerine göre avantaj sağlar ⁽³⁰⁾.

Sonuç olarak, PZR tekniği gerek ülkemizde gerekse dünyada birçok alanda çeşitli araştırmalar için kullanılmaktadır. Gerçekleşen ve gerçekleşmesi beklenen tüm gelişmeler göz önüne alındığında PZR'nin farklı hastalıkların teşhis ve tanısında sağlayacağı katkılar oldukça açıktır.

Kaynaklar

1. Garcia LT, Cristancho LM, Vera EP, Begambre O. A new multiplex-PCR for urinary tract pathogen detection using primer design based on an evolutionary computation method. *J Microbiol Biotechnol.* 2015;25(10):1714-27.
2. Cilloni D, Petiti J, Rosso V, Andreani G, Dragani M, Fava C, et al. Digital PCR in myeloid malignancies: Ready to replace quantitative PCR? *Int J Mol Sci.* 2019;20(9).
3. Debnath M, Prasad GBKS, Bisen PS. Molecular diagnostics: Promises and possibilities. *Mol Diagnostics Promises Possibilities.* 2005;(January):1-520.
4. Goldenberg S. Molecular-based diagnostics, including future trends. *Med (United Kingdom).* 2017;45(10):645-8.

5. Sreejith KR, Ooi CH, Jin J, Dao DV, Nguyen NT. Digital polymerase chain reaction technology-recent advances and future perspectives. *Lab Chip*. 2018;18(24):3717–32.
6. Luchi N, Capretti P, Pazzagli M, Pinzani P. Powerful qPCR assays for the early detection of latent invaders: interdisciplinary approaches in clinical cancer research and plant pathology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(12):5189–204.
7. Dixon M, Sha S, Stefil M, McDonald M. Is it Time to Say Goodbye to Culture and Sensitivity? The Case for Culture-independent Urology. *Urology*. 2019;136:112–8.
8. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction(PCR). *J Invest Dermatol*. 2013;133(3).
9. Hernandez-Rodriguez P, Gomez A. Polymerase Chain Reaction: Types, Utilities and Limitations. In: *Polymerase Chain Reaction*. 2012.
10. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. DPCR: A technology review. *Sensors (Switzerland)*. 2018;18(4):1271.
11. Green MR, Sambrook J. Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Protoc*. 2019;2019(6):436–56.
12. van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. Analysis of PCR Amplification Products. In: *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. 2008. p. 141–82.
13. Kurkela S, Brown DWG. Molecular diagnostic techniques. *Medicine (Baltimore)*. 2009;37(10):535–40.
14. Tolnai Z, Harkai Á, Szeitner Z, Scholz ÉN, Percze K, Gyurkovics A, et al. A simple modification increases specificity and efficiency of asymmetric PCR. *Anal Chim Acta*. 2019;1047(2019):225–30.
15. Jackson M, Marks L, May GHW, Wilson JB. The genetic basis of disease. *Essays Biochem*. 2018;62(5):643–723.
16. Demeke T, Dobnik D. Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(17):4039–50.
17. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(16):9236–41.
18. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 2012;(63):1–15.
19. Ryazantsev DY, Voronina D V., Zavriev SK. Immuno-PCR: achievements and perspectives. *Biochem*. 2016;81(13):1754–70.
20. Schröder H, Grösche M, Adler M, Spengler M, Niemeyer CM. Immuno-PCR with digital readout. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;488(2):311–5.
21. Chang L, Li J, Wang L. Immuno-PCR: An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection. *Anal Chim Acta*. 2016;910:12–24.
22. Nuovo GJ. The surgical and cytopathology of viral infections: Utility of immunohistochemistry, in situ hybridization, and in situ polymerase chain reaction amplification. *Ann Diagn Pathol*. 2006;10(2):117–31.
23. Barman U, Wiederkehr RS, Fiorini P, Lagae L, Jones B. A comprehensive methodology for design and development of an integrated microheater for on-chip DNA amplification. *J Micromechanics Microengineering*. 2018;28(8).
24. Mbwana J, Bölin I, Lyamuya E, Mhalu F, Lagergård T. Molecular characterization of *Haemophilus ducreyi* isolates from different geographical locations. *J Clin Microbiol*. 2006;44(1):132–7.
25. Corey E, Corey MJ. Detection of disseminated prostate cells by reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR): Technical and clinical aspects. *Int J Cancer*. 1998;77(5):655–73.
26. Silva D, Santos G, Barroca M, Collins T. Inverse PCR for point mutation introduction. In: *Methods in Molecular Biology*. 2017. p. 87–100.
27. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc*. 2008;3(9):1452.
28. Jagtar Singh, Niti Birbian SS and AG. A critical review on PCR, its types and applications. *Int J Adv Res BiolSci*. 2014;1(7):65–80.
29. Zhou C, Zhang X, Zhang W, Duan J, Zhao F. PCR detection for syphilis diagnosis: Status and prospects. *J Clin Lab Anal*. 2019;33(5):1–8.
30. Akram A, Maley M, Gosbell I, Nguyen T, Chavada R. Utility of 16S rRNA PCR performed on clinical specimens in patient management. *Int J Infect Dis*. 2017;57:144–9.



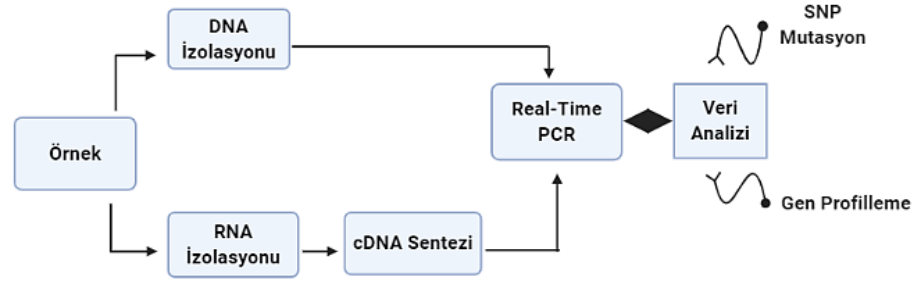
Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-time PCR”

Dr. Şeyda ERCAN ve Dr. İlhan YAYLIM

Gerçek zamanlı kantitatif PCR, nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde geleneksel PCR yöntemi ile gen analizinin birleştirildiği, floresan işaretli prob ve boyaların kullanılarak çoğaltılan DNA bölgelerinin görünür hale getirildiği bir PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemidir. Nükleik asidin uygun tepkime/reaksiyon koşullarının sağlanmasıyla, floresan uyarıcı miktarının, çoğaltılan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı, hem miktarsal hem de mutasyon analizi yapmaya elverişli popüler bir metottur⁽¹⁾.

Hedefte; elde edilen biyolojik örneklerden, DNA'nın kopya sayısının sayısal ifadesi ve mRNA miktarsal analizinin gerçekleştirilmesi esası vardır. Aynı zamanda tek nokta mutasyonlarının belirlenmesi, DNA hasarı belirleme, Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalar da yapılmaktadır⁽²⁾. 1993 Nobel Kimya Ödülünü almaya hak kazanmış olan Dr. Kary Mullis tarafından keşfedilmiş olan bu teknik, günümüzde hem medikal araştırmalarda hem de moleküler tanı çalışmalarında büyük bir yere sahip olmuştur⁽³⁾.

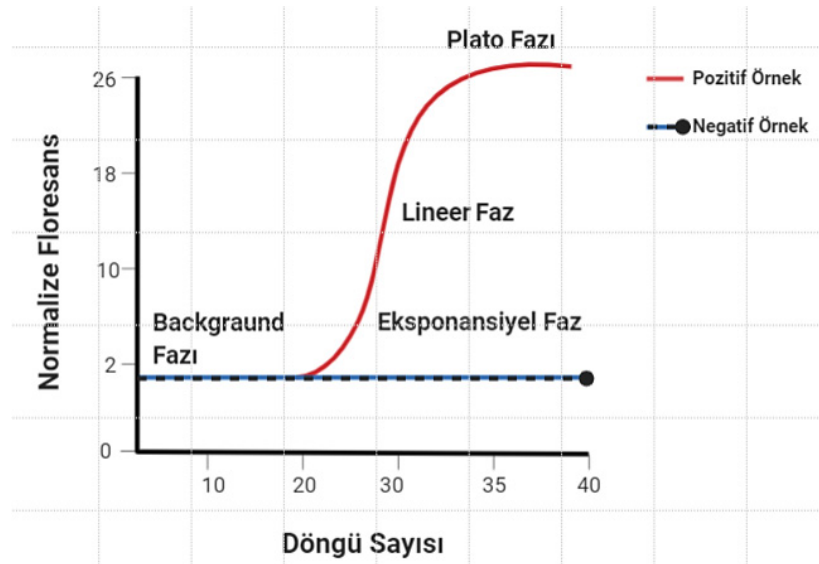
Temelde standart PCR sonrası yapılması zorunlu Post-PCR aşamalarından kurtardığı için araştırmacılara zamanlama açısından avantajlar sağlarken, çalışmanın verilerinin oluşmasında kontaminasyon riskini azaltır ve doğru bir kantifikasyon imkânı sağlar. Geniş bir kullanım alanı olan RT-PCR teknolojisi ile miRNA, siRNA çalışmaları, patojen saptama ve genotipleme çalışmaları yapmak mümkündür fakat günümüzde en çok kullanıldığı alan gen ekspresyon analizleridir⁽⁴⁾ (Şekil 1).



Şekil 1: Real-Time PCR Uygulama Akışı

1. Real-Time PCR Çalışma Prensipleri
Real Time PCR, geleneksel PCR metodundan farklı olarak reaksiyon tüpü içinde çoğaltılan DNA miktarının eş zamanlı olarak ölçülmesine olanak verir⁽⁵⁾. Analiz için eklenen floresan probun amplifikasyon süreci devam ederken hem DNA artışı hem de nükleotid değişimi hakkında bilgi vermektedir. Problar, florofor maddesi ile belirli dalga boyunda ışığa yanan, dizisi çoğaltılan DNA bölgesine özgü komplementer oligonükleotid parçalarıdır. PCR'in gerçekleştiği reaksiyon tüpü içerisinde çoğalan hedef DNA bölgesi ne kadar fazla ise o kadar prob bağlanacak ve floresan ışığa miktarı da o kadar çok olacaktır⁽⁶⁾ (Şekil 2). Cihaz tarafından algılanan ışığa ise analize uygun hale getirilerek database halinde sunulmaktadır.

Geleneksel PCR'in dezavantajı, amplifikasyon verimindeki değişiklik sebebi ile kesin nicel bilginin eksikliğidir. Oluşan her bir amplifikasyon döngüsü için reaksiyon verimi sabit kalır ise, PCR sonrası DNA konsantrasyonu, başlangıçtaki hedef DNA miktarı ile aynı olurdu. Fakat amplifikasyon verimi her döngü için farklı olurken, tek bir reaksiyonun ardışık döngüleri arasında bile farklılık gösterebilir. Özellikle de PCR'in son döngülerinde reaksiyon ürünlerinde, logaritmik olmayan bir artış söz konusu olmaktadır. Real Time PCR sayesinde başlangıçtaki DNA konsantrasyonu ile amplifikasyon boyunca üretilmiş olan PCR ürünleri miktarı arasındaki ilişki net olarak ifade edilebilir⁽⁶⁻⁸⁾



Şekil 2: RT-PCR Amplifikasyon Grafiği

RT-PCR uygulamasında; arkaplan (background) fazı, üstel faz (eksponansiyel faz), logaritmik lineer (doğrusal) faz ve plato fazı olmak üzere 4 temel aşama bulunmaktadır⁽⁹⁾. Background fazı genellikle ilk 10-15 döngü için geçerli aşamadır. Eksponansiyel ve logaritmik lineer faz ise bir önceki background fazının üzerinde yeterli ürün oluştuğunda başlamaktadır (28-40 döngü arası). Bu durumun oluştuğu döngüye eşik döngü (Cycle-Threshold/CT) yada geçiş noktası (cross point/CP) denir. Deneysel sonuçlarını miktarsal olarak yorumlamakta kullanıldığı için önemli bir değerdir. Hedef sekans değeri ne kadar yüksek ise CT değeri o kadar düşük olur. Son aşamada olarak deneyde kullanılan reaktiflerin reaksiyon etkinliklerinin azalması, sistemin plato fazına (end point) geçişine zemin hazırlar⁽¹⁰⁻¹²⁾.

2. Real Time-PCR'da Kullanılan Prob Sistemleri ve Boyalar

Real Time PCR da çoğaltılmış olan hedef dizilerin belirlenebilmesi amaçlı birçok prob sistemi mevcuttur⁽¹³⁾ (Şekil 3). İşlevsel olarak, temelde hedef DNA üzerinde tamamlayıcı baz dizisini tanımlamak için kullanılan kimyasal ya da radyoaktif olarak işaretlenmiş tek zincir yapıdaki oligonükleotidlerdir. Yapıları itibarı ile çoğalan PCR ürünleriyle etkileşime giren proplar, DNA'nın miktarsal analizini mümkün kılmaktadır. Floresan prob sistemindeki teknolojik gelişmeler

sayesinde, farklı prob sistemleri ile tespit edilmek istenen hedef bölgenin varlığının çok az olması durumunda dahi özgül ve duyarlı tespitler yapmak mümkündür⁽⁶⁾.

2.1. Diziye Spesifik Olmayan Boyalar

Diziye spesifik olmayan bu tespitin temelinde DNA bağlayıcı florojenik boyaların kullanılması esası vardır. Bu yöntem hedef sekanstaki varyasyonların (yani tek nükleotit polimorfizmleri veya SNP'ler) varlığından etkilenmez. Ayrıca, florojenik oligopropların tasarımı ile kıyaslandığında daha az uzman bilgisi gerektirir⁽¹³⁾. DNA bağlayıcı boyaların ucuz olması ve kullanım kolaylığı tespitin avantajlarından⁽¹⁴⁾. DNA bağlayıcı florofor olarak kullanılan ilk boya etidyum bromür olup, SYBR Green I, YO-PRO ve BEBO gibi diğer boyalar da kullanılmıştır⁽¹⁵⁻¹⁸⁾. Tüm bu boyalar, çift sarmallı DNA (dsDNA) ile bağlandığında floresan ışık yayar ve bu dsDNA-boya kompleksi, uygun bir ışık dalga boyu ile ortaya çıkar. Dolayısıyla, reaksiyon sırasında herhangi bir dsDNA şablonunun amplifikasyonunda gözlemlenmesi dezavantaj olarak mümkündür⁽¹⁹⁾.

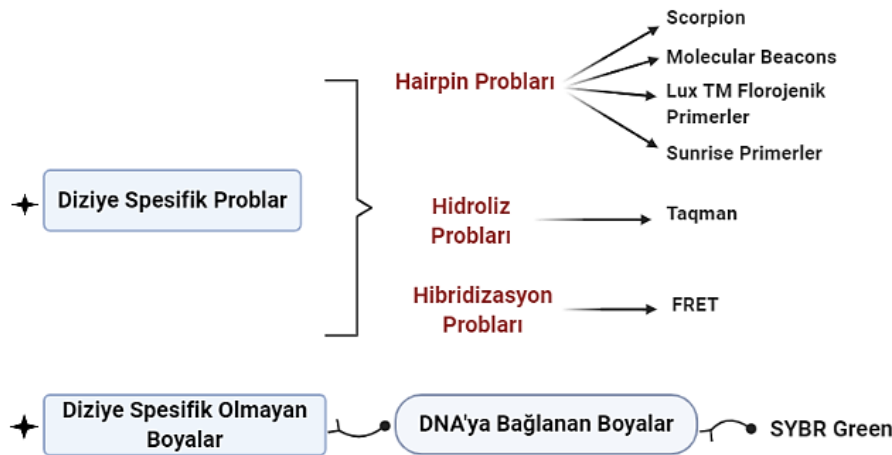
Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak Real-Time PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar.

"SYBR Green I" en fazla kullanılan boya çeşitidir ve çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya ortalama 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder. Reaksiyon başlangıç karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve "SYBR Green I" boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış "real-time" cihazının monitöründen izlenebilir^(2,20).

Optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış dimer-dimer oluşumu gözlenmeyen primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılması yöntemin avantajları arasındadır. Ayrıca floresan işaretli prob ihtiyacı olmadığından, daha az maliyetli olduğu bilinmektedir. Yöntemin dezavantajları arasında; hedef DNA dizisine özgü olmayan çoğalmalarda ortaya çıkabilecek floresan ışımalar sistemde yanıltıcı sonuçlar oluşturabilmektedir. Diğer taraftan hedef DNA dizisi olmadığından primerlerin birbirleri ile komplementer bağlantı kurmaları "primer dimerleri" oluşumuna sebep olabilir ve yanlış pozitif ışımalar gözlenebilir. Bu durumda çoğaltılan DNA'nın hedef bölge olup olmadığının analizi için DNA'ların erime eğrisi analizleri (melting curve, dissociation) yapılması gerekmektedir⁽²¹⁾.

2.2. Diziye Spesifik Proplar

Floresan prob teknolojisinde var olan gelişmeler, Gerçek Zamanlı PCR ile hassas ve spesifik tespit yapılmasına olanak tanımıştır. Temelde, farklı moleküler yapı ve boyalara bağlı olmalarına rağmen, reaksiyonda kullanılan DNA dizisine spesifik proplar; hibridizasyon proplar, hidroliz proplar ve saç tokası (Hairpin) proplar olmak üzere 3 farklı başlık altında toparlayabiliriz. Bu proplar, çoğaltılmış DNA parçasının tamamına değil istenilen hedef bölgeye özgü spesifik bir bağlantı kurarlar. Dolayısı ile tespitite var olan floresan ışımaya, hedef bölgenin tamamına



Şekil 3: Real Time PCR da Kullanılan Prob Sistemleri

ait olmayıp, probun bağlandığı alana özgü ışımayı ifade etmektedir. Bu tekniklerin başında TaqMan, Molecular beacon, LUXTM florojenik primerler, hibridizasyon prob ve Scorpion gibi floresan işaretli problemler gelmektedir^(6,20).

2.2.1. 5' Nükleaz TaqMan-Hidroliz Problemleri

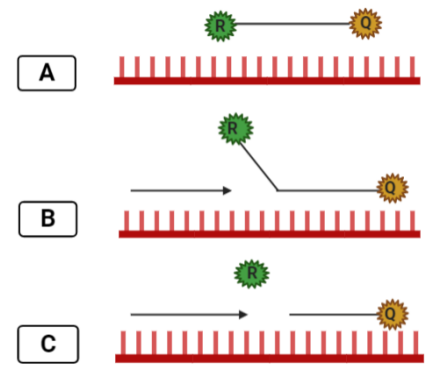
Hidroliz problemleri (DNA polimeraz, 5' ekso-nükleaz aktivitesi ile probu ayırdığı için 5' nükleaz hidroliz prob olarak da adlandırılır) özgüllük sorununa alternatif bir yaklaşım sunmaktadır. TaqMan problemleri en yaygın kullanılan florojenik prob formatı olup, yapısal açıdan, hidroliz problemleri hedef sekansa özgü dually florofor etiketli DNA oligonükleotitlerdir^(21,22). “TagMan probe” yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda fluorophore “reporter” ve 3' ucunda “quencher” bulunmaktadır. 3' uçtaki quencher 5' uçtaki reporter boyanın sinyal oluşturmasını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgelerine “Taq Man” problemleri bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye

gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile 5' ucundan itibaren probu yıkmaya başlar. Serbest hale geçen florokrom sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder^(22,23) (Şekil 5).

Yöntemde kullanılan protokolün kolay olması ve az bir optimizasyon ile gerçekleştirilebiliyor olması hem allelik diskriminasyon hem de ekspresyon profillerinin çıkartılmasında araştırmacılara kolaylıklar sağlamaktadır⁽²⁰⁾. Yaygın olarak kullanılan floresan işaretli reporter boyalar FAM ve VIC/HEX/JOE, quencher boyalar ise TAMRA ya da NFQ'dır⁽⁶⁾.

2.2.2. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Hibridizasyon Problemleri

Light Cycler prob olarak da adlandırılan FRET hibridizasyon problemleri; gerçek zamanlı PCR test platformlarında yaygın olarak kullanılan üçüncü bir prob tespit formatını temsil eder. FRET hibridizasyon problemleri, PCR ürünüde baş-kuyruk konfigürasyonunda yan yana olmak üzere tasarlanmış iki DNA probudur. Oligo 3' ucunda bir fluorescein (FAM) boyaya sahipken, oligo 5' ucunda alıcı bir boya (LC Red 640, LC Red 610, Cy5) ile işaretlenmiştir^(6,24,25).



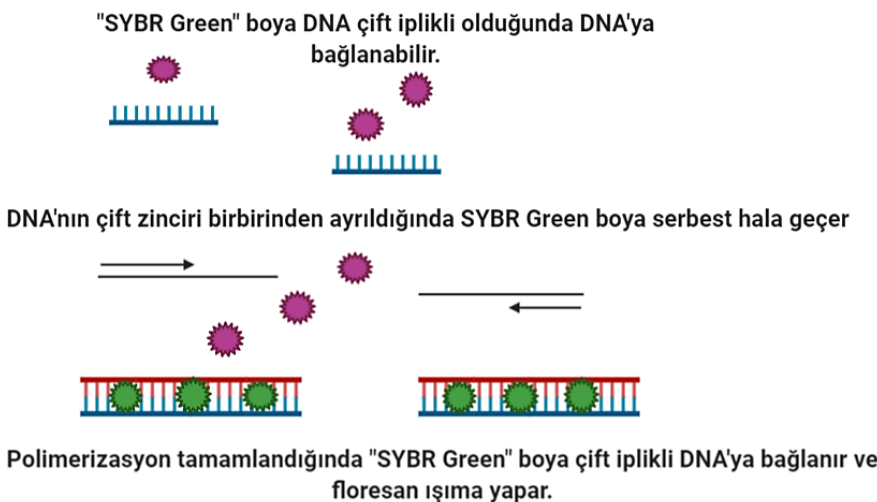
Şekil 5: TaqMan Prob Yöntemi⁽²²⁾.

PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef sekansa bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Enerji “donor” boyadan “acceptor” boyaya doğru transfer olur. Enerji transferi iki boya molekülü arasındaki mesafeye bağlı olup, enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru olarak artmaktadır^(26,27) (Şekil 6).

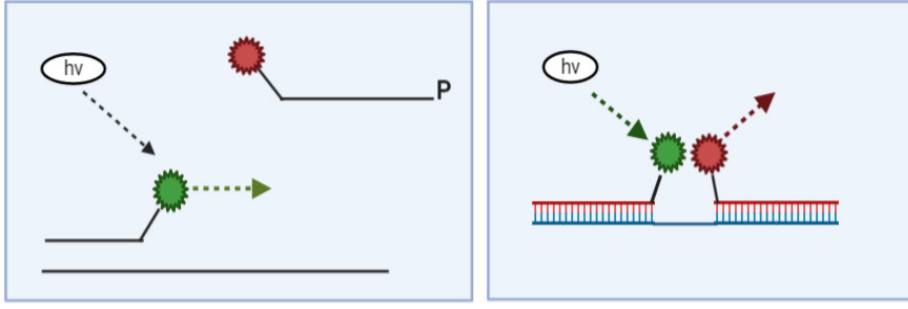
2.2.3. Hairpin Problemleri

Hairpin problemleri teknik olarak floresan ışımaya baskılayıcı sistem yapısı ile hidroliz problemlerine benzer bir işleyişe sahiptirler. İki tip oligonükleotid prob arasında yapısal farklar olmakla birlikte, isimlerinden de anlaşılacağı gibi, saç tokası görünümünde olduklarından “hairpin prob” ismini almışlardır⁽²⁸⁾ (Şekil 7). Hairpin prob yapısal olarak sırasıyla 5' ve 3' uçlarında florofor ve quencher bulunan, ters terminal tekrarlarından (ITR, Inverted terminal repeats) oluşan nükleik asit dizileridir. ITR'lerin tamamlayıcı nükleotid sekanslarının uçları hidrojen bağlarıyla birarada tutulmaktadır. Hairpin yapısı içinde, seçilmiş hedef molekülün bir bölümüne komplementer prob dizisi hedef moleküle yaklaştığında, aradaki hidrojen bağından daha büyük bir kuvvetle tercihen hedef moleküle bağlanmak ister ve hibrit yapı oluşur^(28,29).

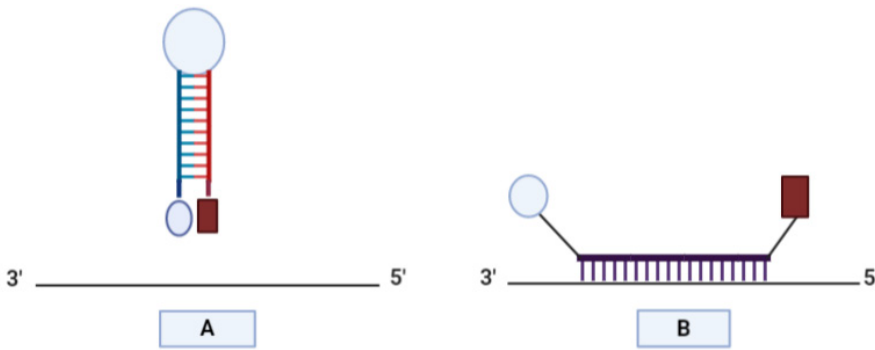
Prob-hedef etkileşim özgünlüğü ve gerçek zamanlı izleme yapılabilmesi sayesinde, yaygın olarak farklı kullanım alanları mevcuttur. Ticari hairpin problemleri arasında, molecular beacons, scorpions, LUX TM florojenik primer ve Sunrise TM primerler bulunmaktadır⁽⁶⁾.



Şekil 4: SYBR Green ile Floresan Sinyal Oluşumu⁽²¹⁾.



Şekil 6: Hibridizasyon Prob Yöntemi (27).



Şekil 7: Hairpin Prob Yöntemi (28).

Kaynaklar

- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-93.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125
- Schaad NW, Fredrick RD. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Can J Plant Pathol.* 2002;24:250–258.
- Deepak SA, Kottapalli KR, Rakwal R, Oros G, Rangappa KS, Iwahashi H, Masuo Y and GK Agrawal. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes *Curr Genomics.* 2007 Jun; 8(4): 234–251.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995- 1001.
- Görmüş U., İnan N., Söğüt İ., Kahraman T., Laboratuvar Dünyası, Biyokimya, Mikrobiyoloji ve Moleküler Genetik Uygulamalarının Klinik Laboratuvarda Kullanımı. Bölüm 19, Nobel Tıp Kitabevleri, 2014, ISBN: 978-605-335-102-3.
- Gibson, U.E., C.A. Heid, et al. (1996). "A novel method for real time quantitative RT-PCR." *Genome Res*6(10): 995-1001.
- Heid, C. A., J. Stevens, et al. (1996). "Real time quantitative PCR." *Genome Res*6(10): 986-994.
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., & Pfaffl, M. W. (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.*, 31, 20, e122.
- Wilhelm, J. and A. Pingoud (2003). "Real-time polymerase chain reaction." *Chembiochem*4(11): 1120-1128.
- Wilhelm, J., A. Pingoud, et al. (2003). "Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes." *Nucleic Acids Res*31(10): e56.
- Wilhelm, J., A. Pingoud, et al. (2003). "SoFAR: software for fully automatic evaluation of real-time PCR data." *Biotechniques*34(2): 324-332.
- Komurian-Pradel, F., Paranhos-Baccalà, G., Sodayer, M., Chevallier, P., Mandrand, B., Lotteau, V., & André, P. (2001). Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. *J. Virol. Methods*, 95, 111–119.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44, 5, 619-626.
- Ishiguro, T., Saitoh, J., Yawata, H., Yamagishi, H., Iwasaki, S., & Mitoma, Y. (1995). Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Anal. Biochem.*, 229, 207–213.
- Tseng, S. Y., Macool, D., Elliott, V., Tice, G., Jackson, R., Barbour, M., & Amorese, D. (1997). An homogeneous fluorescence polymerase chain reaction assay to identify Salmonella. *Anal. Biochem.*, 245, 207–212.
- Morrison, T. B., Weis, J. J., & Wittwer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24, 6, 954-962.
- Bengtsson, M., Karlsson, H. J., Westman, G., & Kubista, M. (2003) A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, 31, 8, e45.
- Yılmaz A., Onen H.A., Alp E., Menevse S., Real-Time PCR for Gene Expression Analysis, ResearchGate, 2012, <https://www.researchgate.net/publication/260248152>.
- Günel T., Quantitative Analysis Of Gene Expression "Real-Time Pcr": Scientific Letter, *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007, 27:763-767.
- 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;17:1013-34.
- Cacherill FR, Uhl JR. Applications and challenges of RealTime PCR for the Clinical Microbiology Laboratory. In: Reischl U, Wittwer C, Cockerill FR, eds. *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications.* 1st ed. Germany: Heidelberg; 2001. p.11.
- Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC, Lutz H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods* 1999;77:37-46.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Gundry, C. N., & Elenitoba-Johnson, K. S. (2001). Real-time multiplex PCR assays. *Methods*, 25, 4, 430-442.
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39, 1, 75-85.

26. Chaplin BE, Rasmussen RP, Bernard PS, Wittwer CT. LightCycler™ hybridization probes the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica* 1999;1:5-8.
27. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22:130-1, 134-8.
28. Susan M. McChlery, Stuart C. Clarke, The Use of Hydrolysis and Hairpin Probes in Real-Time PCR, *Molecular Biotechnology*, Volume 25, 2003.
29. Craig, M.E., D.M. Crothers, and P. Doty (1971) Relaxation kinetics of dimer formation by self complementary oligonucleotides. *J. Mol. Biol.* 62, 383–401.



Genomdaki Tek Baz Değişikliklerinin PCR-Tabanlı Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi Tekniği ile Tayini

Dr. Barış ERTUĞRUL ve
Dr. Özlem KÜÇÜKHÜSEYİN

Evrimsel süreçte, tüm türlerin farklılaşmasından ve bir türün üyeleri arasındaki farklılıklardan genetik çeşitlilik sorumludur. İnsanlar, genetik kodlarındaki %0.1 oranındaki farklılıkla birbirlerinden ayrılırlar. Diğer bir ifade ile insanlardaki genetik materyalin %99,9'u aynı olup geri kalan kısım farklılığa yol açmaktadır. Genetik çeşitliliğe yol açan bu gen değişikliklerinden biri polimorfizm, diğeri ise mutasyondur⁽¹⁻³⁾.

Bir popülasyonda iki ya da daha fazla sayıda farklı fenotipin varlığı **polimorfizm** olarak tanımlanabilir. Diğer bir ifadeyle, popülasyonda mevcut olan genetik çeşitliliğe polimorfizm denir. DNA polimorfizminin, popülasyonda %1'den daha fazla (>%1) sıklıkta bulunduğu kabul edilmektedir. DNA sekansındaki özel bir lokustaki varyasyon frekansı %1'den düşük (<%1) ise **mutasyon** adını alır. Mutasyonlar polimorfizmlerle aynı oluşum temelini kullanırken; mutasyonlardan farklı olarak, genellikle hastalıklarda risk faktörü olarak değerlendirilir⁽¹⁻³⁾.

Genetik varyasyonlar gen düzeyinde veya kromozomal düzeyde meydana gelmektedir. Kromozomal düzeyde meydana gelen varyasyonlar, kromozomlarda kırıklar, dublikasyonlar ve delesyonlar gibi farklı varyasyonlar yaratarak kromozomal anomalilere neden olabilmektedir. Gen düzeyinde varyasyonlar ise tek baz değişimleri (SNPler, Single Nucleotide Polymorphisms / Nokta mutasyonu / Yer değiştirme mutasyonu) ve çerçeve kayması (Frameshift mutasyonlar, İnsersiyonlar ve Delesyonlar) mutasyonları olarak sınıflandırılmaktadır.

Tek baz değişimlerinde (SNPlerde), bir nükleotid bazı diğer bir nükleotid bazı ile yer değiştirir. Eğer, bir purin nükleotidinin (A veya G) diğer bir purin nükleotidi ile veya bir primidin nükleotidinin (C veya T) diğer bir primidin nükleotidi ile yer değişimi söz konusuysa bu değişim transisyon adını alır. Bir purin nükleotidi bir pirimidin nükleotidiyle veya bir pirimidin nükleotidi bir purin nükleotidiyle yer değiştiriyorsa bu değişim transversion olarak adlandırılır. Sonuçta, her iki değişim de farklı şekillerde varyasyonlara neden olabilmektedir: “Yanlış anlamlı mutasyon (Missense mutation)”- da protein kodlayan dizide herhangi bir kodondaki bir nükleotitin değişmesi, farklı bir aminoasidin kodlanarak farklı bir gen ürününün oluşumuna yol açmaktadır. “Anlamsız mutasyon (Nonsense mutation)”da herhangi bir kodonda meydana gelen tek baz değişimi, bu kodonu “durdurucu kodon”a dönüştürerek protein sentezinin erken sonlanmasına ve sonuçta fonksiyonsuz, kısa bir gen ürününün meydana gelmesine neden olur. Ya da SNP, DNA'nın önemsiz bir bölgesini etkilerse veya genin işlevindeki etkisi ihmal edilebilir seviyede ise “sessiz (silent) mutasyon” adını alır. Sessiz mutasyonlarda SNP'ler herhangi bir amino asit değişimine yol açmazlar ancak RNA düzeyinde etkilerini gösterirler.

Çerçeve kaymaları/frameshift mutasyonlarda ise bir veya daha fazla nükleotid ortadan kalkarak veya eklenerek (Delesyonlar/İnsersiyonlar) farklı varyasyonlar meydana gelebilmektedir. İnsersiyon veya delesyonlar, kodonda kaymalar meydana getireceğinden tamamen farklı amino asit dizilimine sahip yeni gen ürünlerinin (peptidlerin veya proteinlerin) meydana gelmesine yol açarak varyasyona neden olabilmektedir.

İnsan genomunda meydana gelen genetik varyasyonlar arasında SNP'lere çok sık rastlanmaktadır. SNP'ler, her 100-300 bazda bir oluşabilmektedir. Bu nükleotid değişikliklerinin büyük çoğunluğu zararsızdır; bireyleri birbirinden ayırmak ya da kalıtsal özellikleri ortaya çıkarmada yani genetik çeşitlilikte önemlidir. Ancak diğer bazıları çeşitli hastalıkların patogenezinde

önemli rol oynayabilmektedir. Dolayısıyla SNP'ler “sessiz SNP'ler” ve “protein fonksiyonunu etkileyen SNP'ler” olarak da sınıflandırılabilir. Bu durumda SNP'lerin çoğunun dahil olduğu sessiz SNP'ler, gen fonksiyonlarını ve kalıtılan özellikleri etkilemeyen SNP'ler sınıfında yer alırken, diğer sınıf SNP'ler ise ya direkt etki göstererek peptid/proteinlerdeki aminoasit dizisini değiştirirler ya da indirekt etkiyle genin regülatör bölgesindeki dizinin fonksiyonunu değiştirerek peptid/proteinler üzerinde etkilerini gösterirler^(2,5,6).

Genetik hastalıklar, DNA sekansındaki bir varyasyonun genin mRNA ya da peptid/protein ürününün niteliğini ya da niceliğini (bazen her ikisini) etkilemesiyle oluşan hastalıklardır. İnsan genomundaki tüm genlerin ve bu genlere ait nükleotid dizilerinin belirlenmesinden sonra, genlerin ifade edilme düzeyleri ve ifade edilen gen ürünlerinin yapı ve işlevindeki farklılıkların belirlenmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bununla birlikte, genomda binlerce aday polimorfik genin bulunması ve her bir bireyin kendi genetik profiline göre, özellikle kanser gibi multifaktöriyel hastalık riskinin belirlenebilmesi, hastalık yatkınlıklarının tahmin edilebilmesi, tedavi yanıtı ya da ilaç cevabının belirlenebilir olması gibi birçok nedenle çoğu araştırmacı moleküler çalışmalara yönelmektedir. SNP verileri günümüzde tanı ve risk profillemesi, aday gen tayini ve haritalama, polimorfizm testleri ve epidemiyolojik, farmakogenetik, fizyolojik, genomik çalışmalarda ve adli genetik gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Örneğin, epidemiyolojik ve biyomedikal araştırmalarda, farklı popülasyonlardaki hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında SNP tayini ve karşılaştırılması yapılmaktadır. Kanser türleri başta olmak üzere diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, alzheimer ve migren gibi multifaktöriyel hastalıklar için SNP taramaları yapılarak hastalık riski ile etiyolojisinin aydınlatılmasına çalışılmaktadır. Bununla birlikte, günümüzde çeşitli hastalıklara özgü SNP profillerinin belirlenmiş olması, bu profillerin kullanılarak hastalık tarama ve teşhisinde önemli rol

oynamaktadır. Ayrıca, SNP profilleri kullanılarak bireylerin ilaç duyarlılıklarındaki farklılıkların belirlenebilmesi açısından bakıldığında, ilaç yan etkilerinin ve ilaç kaynaklı komplikasyonların bertaraf edilmesindeki ve dolayısıyla tedavi başarısına katkıları da önem arz etmektedir. Dolayısıyla, hastanın genotipine göre bireysel tedavi seçenekleri SNP tayinleri ile geliştirilebilecek ve yeni terapötik hedefler belirlenebilecektir (7-10).

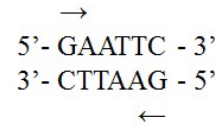
SNP profillerinin belirlenebilmesi için çok farklı yöntemler vardır. Tayin metodları yeni polimorfizmleri taramak ve hedef sekanstaki bilinen polimorfizmin alelleri saptamak amacıyla uygulanmaktadır. Günümüzde SNP profillerinin tayini için DNA dizileme, denatüre gradiyent jel elektroforezi (DGGE), çip teknolojileri, hibridizasyon/emdirim (blotting) teknikleri ve restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP) gibi birçok yöntem kullanılmaktadır (2,5,10,11).

RESTRIKSİYON FRAGMAN UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM, RFLP) YÖNTEMİ İLE SNP TAYİNİ :

RFLP insanlarda genetik bozuklukların saptanmasında kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem, DNA bölgesindeki spesifik bir lokusun "restriksiyon endonükleaz" adı verilen kesim enzimleri ile kesilmesiyle ortaya çıkan farklı uzunluklardaki DNA fragmanlarının analiz edilmesiyle bu lokustaki polimorfizmlerin/mutasyonların incelenmesine olanak tanır (4-6,11-13).

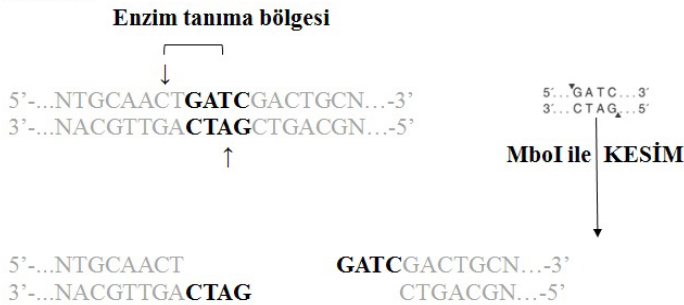
Restriksiyon Endonükleaz (RE)'ler, çok uzun çift sarmal DNA moleküllerini spesifik parçalara kesen ve bu şekilde DNA'yı manipüle etmeyi mümkün kılan enzimlerdir. Bakterilerde yaygın olarak bulunurlar. Nükleotid dizileri ve tanıma bölgelerinin uzunluğu açısından farklı bakterilerden elde edilen birbirinden farklı çok sayıda RE vardır. İsimlendirilmelerinde; ilk harf (büyük) bakterinin cinsini, ikinci ve üçüncü harfler (küçük) bakterinin türünü, ek harfler bakterinin soyunu, Romen rakamları ise aynı bakteri soyundan elde edilen kaçıncı enzim olduğunu göstermektedir. Bakteriler biyolojik faaliyetlerini sürdürmek üzere Tip I, Tip II ve Tip III olmak üzere 3

farklı tipte RE üretirler. Tip I ve Tip III RE'lerin çok alt birimli büyük kompleksler oluşturması, katalitik aktivitelerinde ATP kullanmaları, kesim bölgelerinin enzim tanıma bölgelerinden çok uzakta olması ve dolayısıyla kesimlerinin spesifik olması moleküler çalışmalar için dezavantaj oluşturmaktadır. Tip II RE'ler ise daha basit yapıdadır. Kesimleri organik bir molekül olan ATP'ye bağlı değildir. İnorganik Mg+2 iyonlarının varlığında kesim yaparlar. Tam hedef nükleotitten veya çok yakınından kesim yapma özellikleri nedeniyle moleküler araştırmalar için ideal enzimlerdir. RE'ler, DNA dizisi üzerinde 4-10 baz uzunluğundaki spesifik DNA sekanslarını tanırlar. RE tanıma sekansları sağdan veya soldan okunduğunda aynı olan DNA sekanslarıdır yani palindromlardır (Şekil 1). Palindromlar genellikle 4 veya 6 bazdır fakat bazıları 5, 8 veya daha uzun olabilir.



Şekil 1: Bir palindrom örneği. Sağdan veya soldan okunduğunda aynı olan DNA sekansları.

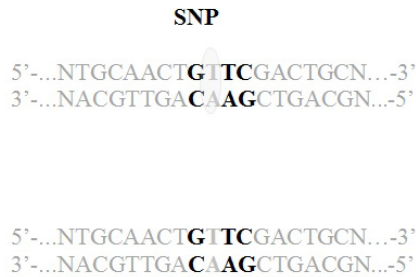
Örnek 1



SONUÇ:

Enzim tanıma bölgesi var... Bir kesim bölgesi
RE Kesimi gerçekleşti
RE kesimi farklı boyda **2 fragman** oluşturdu.

Örnek 2



Enzim tanıma bölgesi yok... Kesim bölgesi yok
RE Kesimi gerçekleşmedi
Enzim tanıma bölgesindeki SNP varlığı,
RE kesimini engelleyerek dizinin **tek parça halinde kesilmeden kalmasına neden oldu.**

Şekil 2: Restriksiyon enzim kesimi. RE'ler enzim tanıma bölgesinin varlığında katalitik aktivite göstererek spesifik kesim bölgelerinde DNA dizisinin fragmanlara ayrılmasına neden olur. Tanıma bölgesinin olmaması enzimin dizi üzerinde etki gösterememesine neden olarak bu bölgeyi, kesilmeden aynı şekilde bırakır. Örnek 1'de MboI restriksiyon endonükleaz enzimi için tanıma dizisi koyu renk ile gösterilmiştir. Aşağı yukarı oklar enzimin kesim yaptığı bölgeleri göstermektedir. RE, GATC tanıma dizisinin olduğu bölgede her iki zincirde G nükleotidinden kesim yaparak katalitik aktivite göstermekte ve yapışkan uçlar oluşturmaktadır. Örnek 2'de tanıma bölgesi içinde bir SNP olduğuna dikkat ediniz. MboI kesim patterni New England BioLabs Inc'den alıntılanmıştır. N, Herhangi bir nükleotidi ifade etmektedir.

Herhangi bir restriksiyon enzimi tarafından tanınan DNA dizisine (sekansına) “restriksiyon bölgesi” denir. Bu bölgeler DNA üzerinde rastgele yerlerde bulunurlar. Bu nedenle farklı bireylerde bu bölgeler aynı RE’ler kullanılarak kesildiğinde bireylerin taşıdığı mutasyonlara bağlı olarak değişik miktar ve uzunlukta parçalar elde edilebilmektedir.

RE’ler tanıma sekansında veya bu sekansın yakınında, DNA’daki deoksiriboz ve fosfat grupları arasındaki bağları hidrolize ederek tanıma sekansının varlığı veya yokluğuna göre farklı uzunluklarda fragmanlar meydana getirirler (Şekil 2).

RE’ler ile kesim sonucu yapışkan uçlu (cohesive ya da sticky ends) parçacıklar ya da küt uçlu (blunt ends) parçacıklar elde edilmektedir. Yapışkan uçlu parçacıklar genellikle Southern blotting (emdirim) tabanlı RFLP tekniğine, küt uçlu parçacıklar ise genellikle PCR tabanlı RFLP tekniğine uygundur (Şekil 3). Ancak pratikte, uygun

koşullar sağlanarak yapışkan uçlar oluşturulan RE’ler de PCR tabanlı RFLP tekniğinde kullanılmaktadır.

PCR tabanlı RFLP yöntemi temelde beş adımdan meydana gelmektedir: 1) DNA izolasyonu 2) PCR ile araştırılacak olan DNA lokusunun çoğaltılması, 3) Elde edilen ve SNP taşıyan PCR ürününün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi, 4) Elektroforez ile kesilen fragmanların ayrımı ve 5) Kesim sonucu oluşan parçacıkların, kesim noktasının varlığı veya yokluğuna göre incelenerek bireyler arasındaki farklılıkların tespiti.

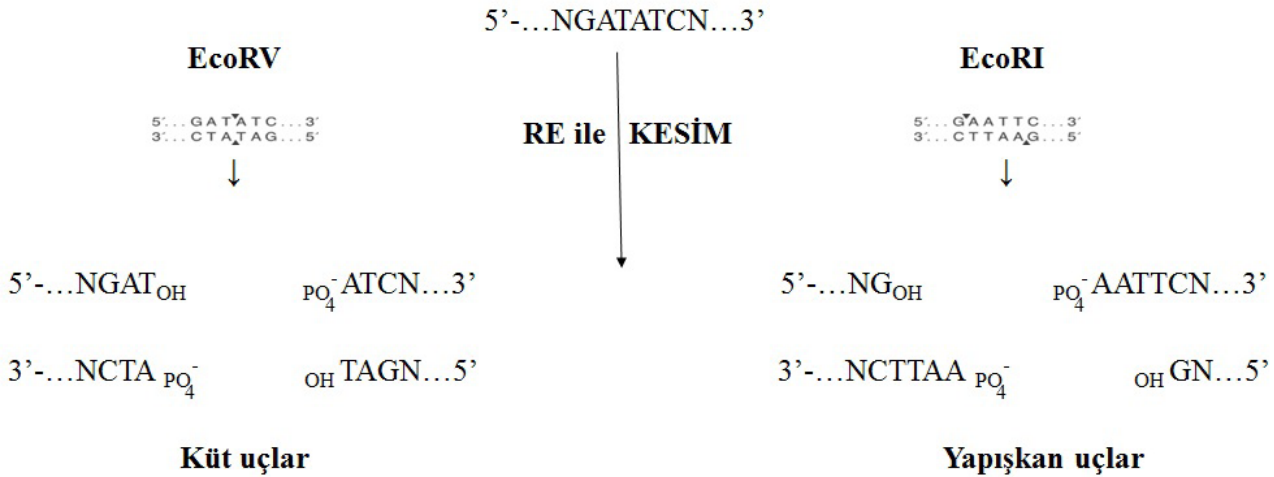
RFLP yönteminin güvenilirliği, araştırılacak olan SNP bölgesini içine alan DNA lokusuna özgü primerler kullanılarak çoğaltılmasından ileri gelir. Yöntemin temel basamaklarından biri olan polimeraz zincir reaksiyonu, genomda yer alan farklı tanıma bölgelerinden kaynaklanan çok sayıda fragmanın elenmesine yardım ederek analiz edilecek asıl fragmanların

görüntülenmesini kolaylaştırır. PCR, ayrıca, DNA molekülünün amplifikasyonunu sağlayarak çeşitli görüntüleme yöntemleriyle analiz edilmesine katkı sağlar.

Araştırılan DNA bölgesine göre RE tayini ve fragmanların değerlendirilmesi

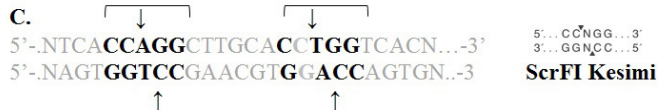
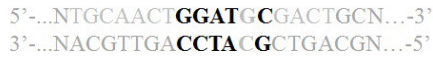
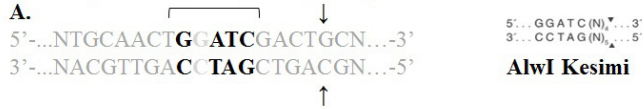
RFLP analizinin daha kolay uygulanabilmesi açısından seçilen enzim büyük önem taşımaktadır. Yöntemin esası, RE’nin SNP bölgesini tanıyıp tanınamasına dayandırılmaktadır. Dolayısıyla RFLP yönteminde, hedef gen bölgesindeki **SNP’nin, enzim tanıma bölgesi içinde yer alması** gerekmektedir.

RE seçiminde, enzim tanıma bölgesi normal ya da mutant DNA dizilerinden birine göre yapılır. Şekil 4’te normal ya da mutant DNA sekansına göre seçilen RE için muhtemel olan fragman değerlendirmesi gösterilmiştir ^(4-6,11-14).

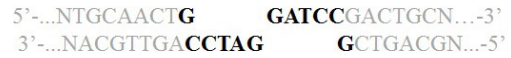
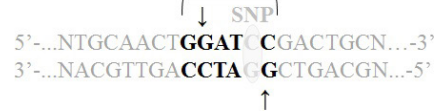
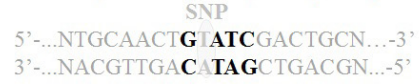


Şekil 3: Yapışkan ve küt uçlar. Bazı RE’ler karşıt fosfodiester bağlarından DNA’nın her iki ipliğini tanıma dizisinin tam ortasından (simetri ekseninden) keserek kör (yada küt) (“blunt end”) uçlar olarak adlandırılan eşlenmemiş bazların olmadığı uçlar bırakırlar. Diğerleri ise DNA’yı her uçta eşlenmemiş 2-4 nükleotid bırakacak şekilde keserek yapışkan uçları (“Sticky” ya da “Cohesive end”) oluşturur. Bu tip kesimlerde DNA zincirinin tam karşılıklı değil; diyagonal kesimi söz konusudur. Yapışkan uçlar, diğer iplikle veya farklı DNA fragmanlarının komplementer yapışkan uçlarıyla baz çifti yaptıklarından hibridizasyon/emdirim tekniklerinde veya rekombinant DNA teknolojisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. EcoRI ve EcoRV kesim patternleri New England BioLabs Inc.’den alıntılanmıştır. N, Herhangi bir nükleotidi ifade etmektedir.

Örnek 1, Normal genotipe sahip birey



Örnek 2, Mutant genotipe sahip birey



Şekil 4: Normal ya da mutant DNA dizilerine göre seçilen RE için fragman değerlendirilmesi. A'da herhangi bir lokustaki DNA dizisi üzerinde meydana gelen guanine (G) nükleotidinin timin (T) nükleotidine dönüştüğü bir varyasyon gösterilmektedir. RE'nin tanıma bölgesi, Örnek 1'deki SNP içermeyen normal DNA dizisinde bir defa yer almaktadır. Dolayısıyla, normal dizide bir kesim bölgesi oluşturarak 2 DNA fragmanı meydana getirmektedir. Aksine Örnek 2'deki mutant dizide AlwI tanıma bölgesi olmadığından kesim gerçekleşmez ve dizi kesilmeden tek parça halinde kalır. Sonuçta, kesilen ürünlere sahip bireyler normal, diğerleri mutant/polimorfiktir. AlwI'nin tanıma sekansından 4 nükleotit sonrasında kesim yaptığına dikkat ediniz. B'de guanine (G) → sitozin (C) dönüşümü BamHI endonükleaz ile tespit edilmektedir. Görüldüğü üzere, RE'nin tanıma bölgesi normal dizide olmayıp, Örnek 2'deki mutant DNA sekansında ise, mutant bireylerin DNA sekanslarında kesim gerçekleşir, normal genotipe sahip bireylerin DNA'ları sabit kalır. BamHI şeklindeki mutant DNA sekansında tek bir tanıma bölgesine sahip olduğundan bu dizi için sadece 2 fragman oluşturduğuna dikkat ediniz. C. RE, normal ve mutasyonlu bölgede farklı sayıda tanıma sekansına sahip olabilir. Dolayısıyla farklı sayıda restriksiyon/kesim bölgesi oluşturarak farklı sayıda fragmanlar meydana getirir. Değerlendirme her bireyin sahip olduğu mutasyona göre oluşan fragman sayılarına göre yapılır. Bu durumda restriksiyon bölge sayısı birbirinden bir farklı olacağından bir farklı sayıda fragman oluştururlar. Seçilen enzimin kesilmek istenilen DNA'yı birden fazla noktada kesmesi sonucu oluşan çok sayıda ve birbirine yakın büyüklükteki fragmanlar analizi zorlaştırmaktadır. Şekilde özel bir DNA sekansındaki C → G dönüşümü gösterilmektedir. ScrFI endonükleazı normal dizide 2 bölge tanıdığından 2 kesim yaparak 3 farklı uzunlukta fragman oluşturmaktadır. Mutasyonlu dizide ise 1 tanıma bölgesine sahip olduğundan 1 kesim yaparak 2 farklı uzunlukta fragman oluşturmaktadır. RE'lere ait kesim patternleri New England BioLabs Inc'den alıntılanmıştır. N, Herhangi bir nükleotidi ifade etmektedir. Aşağı/yukarı oklar RE'nin kesim yaptığı noktaları göstermektedir.

Binlerce farklı restriksiyon enzimi arasından araştırdığımız DNA bölgesine uygun enzim WEB-tabanlı biyoinformatik araçlar ya da programlarla yapılabileceği gibi literatür taraması ile de belirlenebilmektedir. Ancak her ne şekilde olursa olsun bu enzimin SNP bölgesine spesifik olup olmadığı kontrol edilmelidir. Bu amaçla in silico deneyler yapılmaktadır. Bu deneylerde ilk basamak çalışılacak olan gen bölgesine ait dizinin bulunması ve aranılan SNP'nin bu bölgede tespit edilmesidir (örneğin, <https://www.ensembl.org>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> gibi). Ardından izole edilen DNA'nın spesifik bir lokusunun amplifikasyonunun yapılması gerektiğinden, araştırılacak SNP'yi içine alan spesifik DNA lokusuna ait primerlerin -ticari kit kullanılmadığı durumlarda- biyoinformatik araçlarla (Primer3, Pearl Primer gibi WEB-tabanlı programlar kullanılarak) dizayn edilmesidir. Bu primerler literatür taraması ile de bulunabilmektedir. Ancak, bu primerlerin çalışıp/çalışmadığının ya da istenilen

bölgeyi çoğaltıp/çoğaltmadığının tespiti için in silico PCR deneyi yapılarak (www.genome.ucsc.edu) kontrol edilmeleri önerilmektedir. İstenilen bölgeye ait primerlerin dizaynından sonraki basamak, nihayet, SNP'yi tayin etmeye yönelik RE seçimidir. Bu basamakta, PCR'ı yapılan bölgenin hem normal dizisinin hem de SNP'yi içeren mutantlı dizisinin NEBcutter gibi (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) WEB-tabanlı programlar kullanılarak binlerce farklı bakteri RE'leri ile in silico

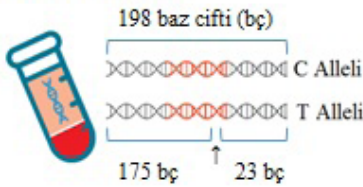
binlerce farklı bakteri RE'leri ile in silico

kesimleri sağlanarak SNP bölgesindeki RE enzimi belirlenir. In silico deneylerin ardından tüm yöntem basamakları için laboratuvarında optimizasyon çalışmaları yapılarak uygun deney protokolleri oluşturulur. Şekil 5’de prostat kanserli hasta ve sağlıklı kontrol grubundan toplanan venöz

kan örnekleriyle yaptığımız bir çalışmadaki, DNA metilasyonu, folik asit, homosistein ve nükleotid sentezini etkileyen DNA metabolizmasındaki önemli enzimlerden biri olan ve MTHF (metilen tetrahidrofolat)’ın THF (tetra hidrofolat)’a dönüşümünü katalize eden MTHF-redüktaz (MTHFR) enzimine

ait 677C>T (rs1801133) polimorfizminin tayini için kullanılan protokol örneklenmiştir. MTHFR geninin 4. Ekzonunda lokalize olan 677 C>T polimorfizmi, 222. kodondaki alaninin valine dönüşümüne neden olarak MTHFR enzim aktivitesini %35-45 arasında azaltmaktadır⁽¹⁴⁾.

1. DNA izolasyonu



3. Hinfl Enzim Kesimi



| Malzemeler | Miktar |
|---------------------|---------|
| DNaz/RNaz | 1,5 µl |
| içermeyen steril su | |
| Tampon Y* | 0,7 µl |
| Tampon Y tango* | 0,7 µl |
| PCR Ürünü | 10,0 µl |
| Hinfl enzimi* | 0,3 µl |

* MBI Fermentas, Ontario, Canada

37°C’de 2 saat
inkübasyon

2. PCR ile ilgili bölgenin amplifikasyonu

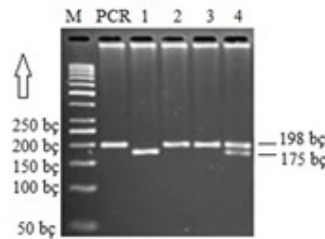
Primer dizileri : 5'-TGAAGGAGAAGGTGCTCGGGA-3'
5'-GGACGGTGC GG TGAGAGTG-5'

| Malzemeler | Miktar |
|----------------------------|---------|
| Steril su | 16,2 µl |
| 10XTampon* | 2,5 µl |
| Mg ⁺⁺ * | 1,5 µl |
| dNTP 81mM)* | 2,0 µl |
| Primer karışımı (10 pM) | 1,5 µl |
| Taq-polimeraz enzimi* | 0,3 µl |

Pre-denatürasyon : 95° C—5 dakika
Denatürasyon : 94° C—1 dakika
Bağlanma : 58° C—1 dakika
Uzama : 72° C—1 dakika
Sontanma : 72° C—5 dakika } 35 döngü

PCR ürünü : 198 baz çifti (bç)

4. Oluşan fragmanların Agaroz Jel elektroforezi ile görüntülenmesi 5. Sonuçların değerlendirilmesi



| ALLELER | |
|-----------------------|-------------------------|
| C Alleli (normal) | 198 bç |
| T Alleli (mutant) | 175 bç + 23 bç |
| GENOTİPLER | |
| CC (homozigot normal) | 198 bç |
| CT (heterozigot) | 198 bç + 175 bç + 23 bç |
| TT (homozigot mutant) | 175 bç + 23 bç |

Şekil 5: MTHFR 677C>T (rs1801133) polimorfizminin PCR-tabanlı RFLP yöntemi ile tayini. Çalışma örneklerinden DNA izolasyonunu takiben uygun primerler kullanılarak rs1801133 polimorfizmini içeren gen bölgesinin PCR cihazında verilen protokol kullanılarak amplifikasyonu sağlanır. Ardından çoğaltılmış olan bölge C → T nükleotid değişimini tayin edecek olan Hinfl endonükleaz enzimi ile inkübe edilir. Inkübasyon sonucu oluşan fragmanların değerlendirilmesi %2 agaroz jel elektroforezi ve uygun görüntüleme yöntemleri ile yapılır. Şekilde agaroz jel görüntüsündeki ilk kuyu (M, marker) DNA büyüklüğünü göstermek amacıyla yüklenen, 50 bç aralığında farklı uzunluklarda DNA fragmanları içeren DNA-belirteçini ikinci kuyu PCR sonucu oluşan ürünü, diğer kuyular (1-4) hasta örneklerini temsil etmektedir. 23 bç’lik kısa fragman %2’lik elektroforezde görülmeyenmektedir (görüntülenmemektedir). Buna göre jelde oluşan fragman büyüklüklerine göre 1 nolu hasta örneği T alleleine ait olan tek bir 175 bç’lik bant içerdiğinden TT homozigot mutant genotipine sahiptir. 2 ve 3 nolu hasta örnekleri ise sadece C alleleine ait olan 198 bç’lik banta sahip olduklarından CC homozigot normal genotipine sahiplerdir. Buna karşın 4 numaralı hasta hem C alleli hem de T alleleine ait 198 bç ve 175 bç’lik bant paterni gösterdiğinden CT heterozigot genotipe sahiptir. Bu durumda anneden ya da babadan gelen allellerden biri normal biri mutanttır. Hinfl kesim patterni New England BioLabs Inc.’den alıntılanmıştır. N, Herhangi bir nükleotidi ifade etmektedir.

Kaynaklar

- Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res.* 1998;8:1229-1231.
- The International HapMap Consortium. The international HapMap project. *Nature* 2003;426:789-796.
- Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Medical Genomics* 2015;8:37.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-350.
- Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature Protocols* 2007;2(11):2857-2864.
- Zhang R, Zhu Z, Zhu H, Nguyen T, Yao F, Xia K, Liang D, Liu C. SNP Cutter: a comprehensive tool for SNP PCR-RFLP assay design. *Nucleic Acids Research*, 2005;33:489-492.



7. Pearson JV, Huentelman MJ, Halperin RF, Tembe WD, Melquist S, Homer N, Brun M, Szelinger S, Coon KD, Zismann VL, Webster JA, Beach T, Sando SB, Aasly JO, Heun R, Jessen F, Kolsch H, Tsolaki M, Daniilidou M, Reiman EM, Papassotiropoulos A, Hutton ML, Stephan DA, Craig DW. Identification of the genetic basis for complex disorders by use of pooling-based genomewide single-nucleotide-polymorphism associated studies *Am J Hum Genet.* 2007;80(1):126-139
8. Goldstein DB, Ahmadi KR, Weale ME, Wood NW. Genome scans and candidate gene approaches in the study of common diseases and variable drug responses. *Trends Genet.* 2003;19:615–622.
9. Ahmadi KR, Weale ME, Xue ZY, Soranzo N, Yarnall DP, Briley JD, Maruyama Y, Kobayashi M, Wood NW, Spurr NK, Burns DK, Roses AD, Saunders AM, Goldstein DB. A single-nucleotide polymorphism tagging set for human drug metabolism and transport. *Nat Genet.* 2005;37(1):84-89.
10. Delrieu O, Bowman C. Visualizing gene determinants of disease in drug discovery. *Pharmacogenomics* 2006;7:311–329.
11. Henrik Berg Rasmussen. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting, *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, Sameh Magdeldin, IntechOpen, 2012. DOI: 10.5772/37724. Available from: <https://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/restriction-fragment-length-polymorphism-analysis-of-pcr-amplified-fragments-pcr-rflp-and-related-te>
12. Chang HW, Yang CH, Chang PL, Cheng YH, Chuang LY. SNP-RFLPing: restriction enzyme mining for SNPs in genomes. *BMC Genomics* 2006;7(30).
13. Chuang LH, Cheng YH, Yang CH, Yang CH. Associate PCR-RFLP Assay Design With SNPs Based on Genetic Algorithm in Appropriate Parameters Estimation. *IEEE Transactions On Nanobioscience.* 2013;12(2):119-127
14. Kucukhuseyin O, Kurnaz O, Akadam-Teker AB, Narter F, Yilmaz-Aydoğan H, Isbir T. Effects of the MTHFR C677T polymorphism on prostate specific antigen and prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12:2275-2278.

Ürolojik Kanselerde Epigenetik Mekanizmalar ve Yöntemler

Dr. Dilara SÖNMEZ ve Dr. İlhan YAYLIM

Ürolojik hastalıklar içinde kritik öneme sahip olan ürolojik kanserler (mesane, prostat, böbrek ve testis kanseri), kanser insidansının %26'sını oluştururken ve mortalitenin de %13'ünü temsil ederler⁽¹⁾. Ayrıca mesane, prostat ve böbrek kanseri en sık görülen ilk 10 kanser içindedir⁽²⁾. Genç nüfusun azalması, toplumlarda artan nüfus artışı ve yaşlanma ile artan risk, ürolojik kanserlerin görülme sıklığını arttırmıştır⁽¹⁾. Patolojik tanı yöntemlerinin kullanılarak teşhis edildiği ürolojik kanserlerin bazıları erken tarama için az sayıda biyomarkera sahip olsalarda bunlar invaziv ve özgüllükten uzaktır⁽¹⁾. Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümünde ve bu hücrenin farklılaşarak çevre hücre ve organları etkilediği karmaşık yeteneklerin ortaya çıkması hem genetik hem de epigenetik faktörlerle gerçekleşmektedir. Hücrenin ve hücreye ait genetik bilginin düzenlenmesinde büyük oranda söz sahibi olan epigenetik faktörler, moleküler biyobelirteç olma yolunda yüksek potansiyele sahiptirler⁽¹⁾. Bu derlemede bilinen ve popüler olan epigenetik düzenleyicilerin mekanizmalarını, uygulama yöntemlerini ve üroonkoljik alanda belirlenen epigenetik temelli biyobelirteçlerin mevcut durumunu özetliyoruz.

Epigenetik, ilk olarak 1942'de çevresel faktörlerin programlı embriyonik kök hücre farklılaşması üzerine etkisini anlatmak amacıyla tanımlanmıştır⁽³⁾. Genom projesinin 2001 yılında tamamlanması ile araştırmacıların genetik yapının değiştirilmesi ve düzenlenmesinin kontrol edilmesi amacıyla, farelerden *Drosophila melanogaster*'e kadar birçok model organizmada genom organizasyonunu anlamak için geniş kapsamlı çalışmalar yapmışlardır⁽⁴⁾.

Tüm bu araştırmalar sonucu epigenetik, aynı DNA sekansına ait alternatif gen aktivite durumlarını oluşturan ve bu modifikasyonların kalıtımla sürdürülebilmeleri için gerekli olan moleküllerin ve mekanizmaların incelenmesini sağlayan bilim dalı olarak düzenlenmiştir⁽⁵⁾. İnsanlarda epidemiyolojik çalışmalarla desteklenen araştırmalar sonucunda rahimde, annenin hamilelik esnasında fetal stres etkenleri (gıda fazlası ve yoksunluğunun, uyuşturucu, alkol bağımlılığı ve duygusal stres vb.) ile doğum sonrası bebeklerde görülen rahatsızlıklar arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Fetal büyüme döneminde genomun modifiye edilmesi annelerin bebeklerini dış dünyada hayatta kalmaya hazırlaması olduğu gibi, büyüme ve metabolik bozukluklara da neden olmaktadır⁽⁶⁾. DNA sekansında herhangi bir değişikliğe neden olmayan epigenetik modifikasyonlar, aynı zamanda gen ekspresyonu değiştirebilen ve somatik olarak kalıtılabilir değişikliklerdir⁽²⁾. Gen ekspresyonu, genomun çalışmasını kontrol eden DNA metilasyonu, kodlanmayan RNA'lar ekspresyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik sinyallerin etkileri ile gerçekleşen dinamik bir olaydır (Şekil 1)^(6,7).

1. DNA Metilasyonları

Nükleik asit epigenetik modifikasyonu genlerin promotör bölgelerindeki, özellikle CpG adacıklarında, sitozinlerin bir dizi enzim yardımı ile metillenerek 5-metilsitozin (5mC)'e dönüşmesi sonucu biyolojik süreçlerin (gen susturma, genomik baskı, X-kromozom inaktivasyonu vb.) kontrol edilmesi olarak bilinir⁽⁸⁾. Genomdaki promotör bölgelerine ait 5mC seviyesi çok hassas bir şekilde düzenlenir ve bu düzenlenme gen ekspresyonunu kontrol ettiği için bu dengedeki anormallikler karsinogenez gibi diğer insan hastalıkları ile de yakından bağlantılıdır⁽⁶⁾. DNA'daki her sitozin metillenebilir ancak çevre-gen etkileşiminde anahtar rolü olan sitozinler guanosine bitişik olanlardır. DNA zincirinin tek halkasında sitozinin ard arda fosfodiester bağları ile guanozine bağlı bu yapıya CpG dinükleotidleri denir⁽⁶⁾. Promotör bölgelerinin yaklaşık %60'ını oluşturarak

CpG adacıklarına dönüşürler. Sitozinin metillenmesi DNA'nın sahip olduğu hidrofobik özelliğini etkiler, hipermetilasyon durumu transkripsiyon aktivatörlerinin bağlanmasını engelleyerek veya kromatinin yeniden şekillenmesi ile genin sessizleşmesine neden olurken, hipometilasyon durumu tam tersi yönde etkileyip gen ekspresyonunu artırır⁽⁶⁾. CpG adacıklarının metillenmesinden sorumlu olan enzimler DNA metiltransferazlar (DNMT), bu metil gruplarının çıkarılmasından (Şekil 2) ise on-on bir translokasyon metilsitozin dioksijenaz (TET; ten-eleven translocation) enzim ailesidir⁽⁶⁾.

Memelilerde dört tip DNMT vardır. Bunların ilki DNMT1'ler, hücrenin replikasyon esnasında ikiye katladığı DNA'sından yeni kopyanın atasal DNA'nın sahip olduğu metilasyon paternini korumasını sağlamaktır. DNMT2 ise RNA'yı katalize ederken, DNMT3a ve DNMT3b de nova metilasyon yeteneği ile embriyonik gelişim esnasında genlerin ekspresyonlarını kalıcı veya geçici olarak değiştirir⁽⁶⁾. Epigenetik düzenlemeleri etkileyen çevresel faktörlerden biri olan hipoksik stresin, mekanizması tam olarak aydınlatılamasa da, DNMT ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir⁽⁹⁾.

DNA üzerinde gerçekleşen epigenetik mekanizmalar birbirine bağlı üç unsur arasındaki dengeye bağlıdır. Bunlardan ilk ikisi bahsedildiği gibi DNMT3'ün novo metilasyonu ve DNMT1'in mevcut metilasyonu sürdürmesidir. Metil kazanımı ve sürdürülmesinden sonra son olarak metil silinmesi gelmektedir. DNA metilasyonu on-on iki translokasyon metilsitozin dioksijenaz (TET) ailesine mensup bir dizi enzim tarafından aktif replikasyondan bağımsız olarak demetile edilebilir^(8,10). Sitozinin DNMT'ler ile 5-metilsitozine (5mC) dönüşmesinin ardından, memelilerde aktif DNA demetilasyonunun ilk basamağı olan 5mC'nin 5-hidroksimetilsitozine (5hmC) oksitlenmesi gerçekleşir. Oksitlenmenin TET enzimleri tarafından gerçekleştirildiği tespit edilmiştir⁽¹¹⁾. TET enzimlerinin katalize ettiği oksidasyon işlemi devam ederek, 5hmC'nin 5-formilsitozin (5fC) ve 5-karboksilsitozin (5caC) dönüşmesi ile son

bulur. 5fC ve 5caC artık DNA tamir mekanizmasında görevli timin DNA glikosilaz tarafından baz eksizyonu ile metillenmemiş bir sitozin ile yer değiştirmeye veya sitozin dekarboksilaz ile sitozine dönüşmek için hazır hale gelir (Şekil 3) (12).

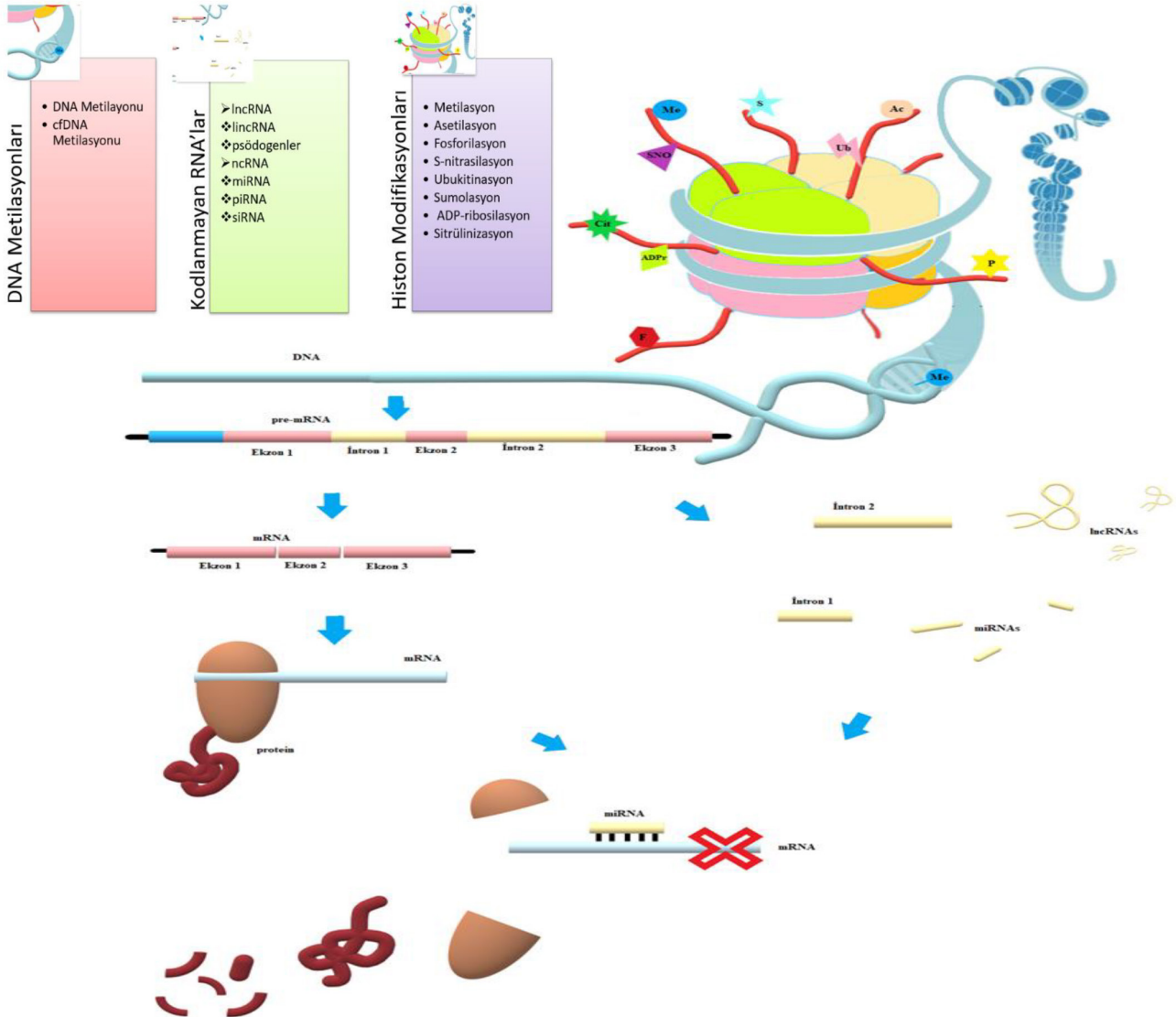
Hipoksinin TET üzerine ve embriyonik gelişim üzerine etkise DNMT'lerde olduğu gibi iyi araştırılmamış olsa da, TET enziminin hipoksik koşullar altında seviyesinin önemli ölçüde azaldığı ve malignitelerle ise ilişkili olduğu bildirilmiştir (13).

DNA metilasyonu embriyonik aşama başta olmak üzere tüm canlılar için önem-

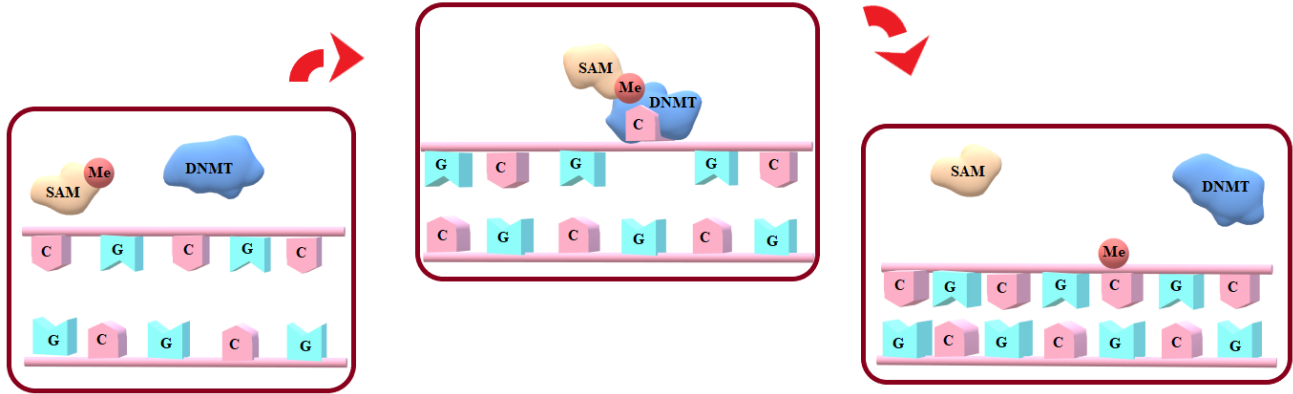
lidir. İnsan gelişimi sırasında, dölenen yumurtalarda blastosit aşaması süresince kadar erkeğe ait DNA'da tam demetilsayona görülür (6). Embriyonun, uterusu gömülmesi olarak bilinen implantasyon sırasında de novo remetilasyon işlemi başlar. Bu işlem dokuya özgü paternin oluşumunda hayati fonksiyona sahip genler aktif kalacak şekilde bazı genlerin aktifleşirken, bazı genler sessizleştirilir (6). Bu süreci etkileyecek herhangi bir durum sonucu aminoasitlerde görülebilecek bir eksiklik genomik demetilasyon ve de novo metilasyonu etkileyebilir (6). 2018'de insan

plasentasında yapılan çalışma maternal strese yanıt olarak Metabolik yollar ait üç önemli bölgenin DNA metilasyon düzeylerinin değiştiği tespit edilmiştir (14). Bu ve benzeri çalışmalar göstermiştir ki, kalori yetersiz beslenme(15), düşük proteinli dengesiz bir diyet(16,17), hipertansiyon(18), annenin obezite(19) veya diyabet(20) durumu ve aile içi şiddet(21) nedeniyle psikolojik stres faktörlerinin DNA metilasyonunda değişikliklere yol açabilir(6).

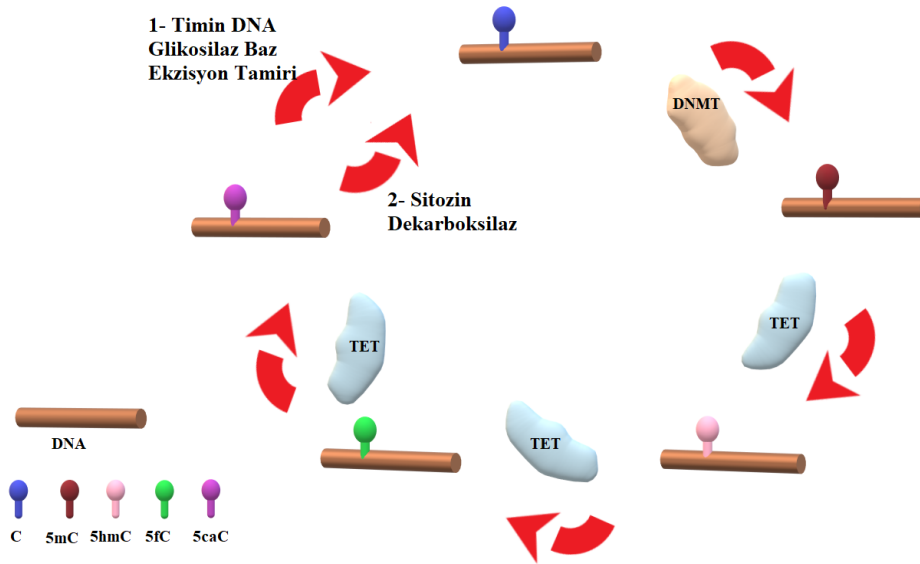
Epigenetik Mekanizmalar



Şekil 1: Epigenetik mekanizmalar (6).



Şekil 2: DNA metilasyonu.



Şekil 3: DNA Demetilasyonu.

Epigenetik biyomarkörler hastalığın özellikle kanserde erken tespiti, tümör dinamiği değerlendirmesi, minimal rezidüel hastalıkların tespiti ve terapi izlemesi hakkında bize önemli ipuçları sunmaktadır⁽²²⁾. Örneğin Mesane kanseri hücre hattında yapılan bir çalışmada bir metiltransferaz olan EHMT2'nin apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir⁽²³⁾. Mesane kanserinde yapılan bir başka çalışmada, poliaminle modüle edilmiş faktör-1 (PMF-1) geni metilasyonun, mesane kanserlerinde tümör nüksünü azaltmak için kullanılan Bacillus Calmette-Guérin (BCG)

ile ilişkisine bakmayı hedeflemişlerdir. Böylece bu tedaviye hangi hastaların daha iyi yanıt verebileceğini bulmayı hedefleyen araştırma ekibi PMF-1'in metilasyon durumunun, BCG tedavisi tümürlü hastaların rekürrens ve progresyon ile korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmaları sonucunda kişiye özgü terapi seçeneklerinin oluşturulmasına katkıda bulunabilecek bir biyomarker önermişlerdir⁽²⁴⁾. Renal hücreli kanserlerde RASSF1A'nın metilasyonu başta olmak üzere TIMP3, APC, CDKN2A transkriptleri P14 ve P16, GSTP1, PTGS2, RARB, PCDH17, TCF21, CDH1, FHIT, LRRC3B

ve WNT antagonistleri idrar ve kanda teşhis için önerilen metilasyon markörleri arasındadır⁽²⁵⁾. Testiküler germ hücreli tümörlerde (TGCT) yapılan bir çalışmada ise, ailesel vakaların sağlıklılara nazaran artan PDE11A, SPRY4 ve BAK1 promoter metilasyonu ve azalmış KITLG promoter metilasyona sahip olduğunu tespit edilmiştir. Ve bu metilasyonların TGCT'nin erken tanı için potansiyel biyomarkörler olduklarını öne sürülmüştür⁽²⁶⁾. Teknolojinin gelişmesi ile bu alandaki son çalışmalar da daha minimal invaziv olan likit biyopsilere yönelmiştir⁽²⁷⁾. Özellikle



kanser tanısı ve prognozunda yeni biyobelirteçlerin keşfedilme potansiyeline sahip likit biyopsilerden elde edilen nükleik asitlerin kısa bir yarılanma ömrüne (16 dakika ile 2.5 saat arasında) sahip olması gerçek zamanlı olmasını ve özellikle kanser hastalarında dinamik yükün tümör yükünü tahmin etmesini sağlamaktadır (27,28). Likit biyopsilerin belki de en önemli avantajı dolaşımdaki nükleik asitler primer, sekonder tümörleri ve metastatik hücreler ile bütünsel bir sonucu temsil ettiği için tümör heterojinitesinde kaynaklı sorunları çözebilir (29,30). Likit biyopsi materyalleri, apoptoz, nekroz ve aktif sekresyon yoluyla kan veya diğer vücut sıvılarına hücesiz olarak salınan DNA (cfDNA) ve RNA (cfRNA), dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC) ve hücre dışı vezikülleridir (EV) (22). Somatik mutasyonlar başta olmak üzere birçok genetik biyobelirteçin kanser çeşitleri arasında ve durumdan duruma farklılık göstermesi bu likit biyopsi materyallerinde epigenetik biyobelirteç oluşturma potansiyelini arttırmaktadır (27). Epigenetik belirteç olarak en çok çalışılan likit materyallerden biri de cfDNA'lardır. Yaklaşık 167bp'den oluşan cfDNA'lar sağlıklı bireyler ve kanser hastalarında karşılaştıklarında anlamlı derece farklılık gösterirken anormal şekilde görülen DNA metilasyonu tümör oluşumunun erken evreleri de dahil kanserin tüm sürecinde bol miktarda bulunabilirler (27). Tüm bilgiler ışığında cfDNA üzerindeki metilasyon paterninin analizi başta kanser olmak üzere bir çok hastalık için tanısı ve prognozu için daha sağlam ve duyarlı bir yaklaşım olma niteliği taşımaktadır (27). CfDNA'nın yanı sıra hücre ayıklama teknolojisindeki ilerlemeler sonucunda dolaşıma katılan tümör hücrelerinin (CTC) metilom analizleri özellikle kök hücre özelliği kazanan metastatic kanser hücreleri arasındaki çalışmaların gerçekleşmesiyle yeni epigenetik biyomarkörlerin keşfedilmesine olanak sağlamıştır (31,32). Ayrıca henüz tam olarak aydınlatılamasada cfRNA (33) ve cfDNA fragmentasyon paternleri (34) üzerine çalışmalar umut verici şekilde devam etmektedir. Bu çalışmalardan biri de renal kanserlerin sağlıklı ve hasta serumlarında

mükemmel bir şekilde ayırt edilmesini sağlayan ve tanı için önerilen APC, FHIT ve RASSF1A metillenmiş cfDNA'larıdır (25).

2. Histon Modifikasyonları

DNA'nın histon paketleri ile paketlenmiş yoğun hali olarak bilinen kromatin kondensasyonu, hücre için paketlenmiş bölgenin ekspresyonun gerekli olmadığı durumlarda transkribe edilmesini engeller (35). Genomdaki bu düzenleme aynı zamanda genleri mutasyona neden olacak dış streslerden korumaktadır. Bu amaçlar doğrultusunda DNA (146 baz çifti) histon proteinlerinin (H1, H2A, H2B, H3 ve H4) etrafına sarılarak kromatinin temel birimi olan nükleozomları oluştururlar (6,35). Histon proteinlerinin N terminal kuyrukları transkripsiyon sonrası çeşitli değişikliklere uğrayarak nükleozomun yapısını açık veya kapalı hale getirerek genin transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına izin verir veya sıkıştırarak izin vermezler (2). Genlerin bu şekilde okunması veya susturulmasına kromatinin yeniden düzenlenmesi denmektedir (35). Günümüzde en çok çalışılan asetilasyon ve metilasyon kovalent histon modifikasyonlarının yanı sıra fosforilasyon, S-nitrosilasyon, sumolasyon, ubikitinasyon, ADP-ribosilasyon, farnesilasyon ve sitrülünasyon modifikasyonlarında bulunmaktadır. **Asetilasyon;** Negatif yüklü DNA'nın pozitif yüklü histonlara sarılmasında görev alan lizin kalıntılarını nötralize eden asetil grupları nükleozomların konformasyonunu etkileyerek ekspresyonun gerçekleşmesini sağlar (2,36). Bu aktifleşmeyi sağlayan asetiltransferazlar (HAT) sayesinde asetilasyon gerçekleşirken, tersi bir işlemi yapan histon deasetilazlar (HDAC) asetil gruplarını çıkarıp histon konformasyonunu eski haline getirir. Deasetilasyon sonucu transkripsiyon faktörlerinin bu bölgeye erişimi engellenir (2,36). Histon asetilasyonlarının genlerin ekspresyonunu artırma özelliği kanserde hücrelerin malign transformasyonuna yol açtığı bilinmektedir (36).

Metilasyon; Histon kuyruklarında lizin (K), histidin ve arjinin kalıntılarının metilasyonu histonların elektrik yüklerini değiştirmeden gen ekspresyonunda

değişikliğe neden olurlar (36). Histon metiltransferaz (HMT) ve histon demetilaz (HDM) enzimleri ile gerçekleşen metil transferi lizin ve arginin kalıntıları için çoklu (mono-, di- veya tri-) olarak da gerçekleşebilmektedir. Histon metilasyonunda epigenetik etki H3 üzerindeki K4, K9, K27, K36 veya K79 gibi lizin bölgelerinin metilasyonu ile gerçekleşir (36,37). Histonların metilasyonu, gen ekspresyonu, genomik stabilite, DNA onarımı, yaşlanma, hücre döngüsü ve hücre gelişim ve farklılaşmasındaki kritik rollerini hem gen ekspresyonu (H3K4 metilasyonu) hem de supresyonu (H3K9 metilasyonu, H3K27 trimetilasyonu H3K20 trimetilasyonu) meydana getirerek gerçekleştirirler (38). Onkolojik bir çok süreçte önemli rollere sahip olduğu bilinen histon metilasyonlarından H3K4me2 downregülasyonu, prostat, akciğer ve pankreas kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türleri ilişkilendirilirken, yaşlanma süreci, mide kanseromu, yumurtalık kanseri, lenfomalar ve kolon kanserinde H3K27me3 ve H4K20me3'ün aşağı regülasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (39).

Fosforilasyon; Histonların N-terminal kuyruklarında bulunan treonin, serin ve tirozin kinaz ve fosfatazlar yardımı ile ATP'den bir fosfat grubunu almaları sonucu gerçekleşir. Fosforilasyon sonucunda pozitif yüklerinde azalma olan histonlar ekspresyona neden olabilirler (36). H3 fosforilasyonu c-jun, c-fos ve c-myc dahil olduğu geçici ve çok hızlı bir şekilde aktive edilmesi gereken genlerin ekspresyonunu indüklemeleri ile birçok hücrenel mekanizma için kritik öneme sahiptir (4). H3 fosforilasyon kaybının, X'e bağlı kalıtım gösteren ve hastalarda zihinsel geriliğe neden olan Coffin-Lowry sendromu ilişkili olduğu tespit edilmiştir (40).

Ubikitinasyon; Sonu glisin kalıntısı ile biten ve 76 amino asitten (8.7 kDa) oluşan ubikutin küresel bir alana sahip polipeptittir (41). Ubikutin, histon proteinlerinde (H2A, H2B, H3 ve H4 ve H1) bulunan lizin kalıntılarının p-amino grubu ile bir izopeptid bağ oluşturur. Birden fazla kez ubikutinlene bilen (mono- veya poliubikutin) bu lizin kalıntılarında ubikitin aktarımı bir

seri enzim tarafından gerçekleşir. Öncelikle ubikutin aktive edici bir enzime (E1) ATP'ye bağlı bir reaksiyon yardımı ile kendine bağlı ubikutini aktifleştirir. Ardından ubikitin-konjüge edici enzime (E2) aktarılan aktifleşmiş ubikutin, ubikitin ligazı (E3) enzimiyle hedef protein üzerindeki lizin kalıntısına bağlanır⁽⁴¹⁾. Dinamik bir histon modifikasyonu olan ubikuitinasyon gen transkripsiyonu, DNA hasar tamir mekanizmasını, nükleozom stabilitesini ve histon proteinlerinin tahliyesi de dahil olmak üzere birçok mekanizması kontrol eder⁽⁴¹⁾. Geri dönüşümlü olarak gerçekleşen ubikuitinasyon, ubiquitin'e özgü peptidaz olan deubikuitinasyon enzimleri (DUB) ile histona bağlı ubikutinler çıkarılabilir. Yapılan onkolojik bir çalışmada bir histon E3 ubikuitin ligazın (RING1A / RING1B) veya E3'ün allosterik aktivatörünün (BMI1) aşırı ekspresyonunun tümör baskılayıcı genleri ekspresyonunu engellediği bildirilmiştir⁽⁴²⁾.

SUMOlasyon; Amino asit sekansı olarak %18 oranında ubikutine bezeyen küçük ubikitin benzeri modifiye edici (SUMO) bir N-terminal uzantı haricinde üç boyulu yapı olarak da benzerlik gösterir⁽⁴³⁾. Henüz tam olarak aydınlatılmamış da N-terminal uzantının, SUMOlasyon'un ubikuitinasyondan farklı hücresel süreçlere dahil olmasının nedeni olarak düşünülmektedir. Ubikuitinasyon mekanizmasının parçası olan üç enzim E1 (SAE1, SAE2), E2 (Ubc9) ve E3 (RanBP2; PIAS1,-2,-3,-4; Pc2) haricinde SUMO proteazlar (SENP-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7) ve SUMO molekülleri (SUMO-1,-2,-3,-4) SUMOlasyonun insanda gerçekleşmesi için gerekli moleküllerdir⁽⁴³⁾. İnaktif SUMO moleküllerinin aktif hale gelebilmesi için SENP'lerin karboksi terminal diglisin (GG) motifini ortaya çıkarmaları gerekmektedir. Olgun hale gelen SUMO molekülü ATP aracılı aktifleşme için, SAE1 ve SAE2 dahil olduğu heterodimerik E1 aktifleştirici enzimi ile aktif forma dönüştürülürler. Ardından SUMO, E2 konjüge enzimi olan Ubc9'a aktarılır⁽⁴³⁾. Son olarak hedef proteinin lizin kalıntısı ile SUMO c-terminali arasında E3 ligaz tarafından bir izopeptid bağ oluşturularak eklenir⁽⁴³⁾. Çoğunlukla tek olarak (mono-) eklenen SUMO işlemin

tekrarlanması ile çoklu (poli-) olarak da eklenebilir⁽⁴⁴⁾. Bilindiği gibi bir proteinde birden fazla lizin kalıntısı olabilir ancak SUMOlasyonun gerçekleşebilmesi için proteinin özel bir konsensüs motifine sahip olması gerekmektedir. Genel olarak, birçok SUMOylation motifi Ψ -K-X-E veya Ψ -K-X-E/D şeklindedir. Ψ bir hidrofobik amino asidi temsil ederken K hedef lizin kalıntısını, X herhangi bir amino asiti ve D / E ise Asp veya Glu'dür^(45,46). Ubikuitinasyon gibi geri dönüşümlü olan SUMOlasyonda, hedef proteinden SUMO moleküllerinin çıkarılması sumo-spesifik proteazlar (SENP'ler) tarafından gerçekleşir⁽³⁶⁾. SUMOlasyon Ubikuitinasyon ile DNA tamir mekanizmasında kritik rol oynarken, Ras/MAPK, JNK and Hedgehog yolları gibi sinyal iletim yollarının kontrolünde, kromozom bütünlüğünün korunması, transkripsiyonun baskılanması ve genomik stabilite dahil olmak üzere bir çok moleküler yolağı düzenlenmesini sağlamaktadır^(43-44,46). Prostat kanserinde yapılan bir çalışmada insan SENP1 ekspresyonu arttığını ve bu onkojenik etkinin androjen reseptörüne bağlı hücre proliferasyonu düzenleyebileceği bildirmiştir⁽⁴⁷⁾.

Sitrülinasyon; H3R2 / R8 / R17 / R26, H4R3, H2A ve H1 gibi histon proteinlerinin üzerinde bulunan arginin kalıntılarının peptidil arginin deiminazlar (PADI'ler) tarafından sitriline dönüştürülmesine sitrülinasyon denmektedir⁽⁴⁸⁾. Histonların elektrostatik yükünde değişikliğe neden olan bu reaksiyon proteinin katlanma durumunu ve işlevini etkilemektedir⁽⁴⁸⁾. Özellikle PADI2 ve PADI4 çekidekteki histonları sitriline etmesi sonucu oluşan sitriline histon H3 (H3Cit) seviyesindeki artışı ileri kanser vakalarında tespit edilmiş ve H3Cit seviyesinin prognostik bir biyobeliteç olarak öne sürülmüştür⁽⁴⁹⁾. Ayrıca genomda oluşan DNA hasarı sonucunda PADI4-p53 ağını aktive edilebildiği ve sonuç olarak nükleofosmin ve histon ilişkili şaperon proteinlerinin katalizlendiği bildirilmiştir⁽⁴⁸⁾.

S-nitrasilasyon; S-nitrasilasyona kromatinlerden asetil gruplarının çıkarılmasında görev alan HDAC'larda bulunan sistein

kalıntısına nitrosil (NO) grubunun eklenmesi ile aktivitelerinin baskılar. Sonuç olarak kromatinden korepresörlerin ayrılmasına neden olur⁽⁵⁰⁻⁵¹⁾. Ayrıca NO maruziyeti 5-metilsitozin seviyesinde, metilsayonda görevli bazı enzimlerin ekspresyonunda (DNMT1 ve DNMT3) azalma ve bazı metilasyon (H3K9, H3K27, H3K36 ve H4K20) seviyelerinde değişikliğe neden olabilirler. Tüm bu değişiklikler ile transkripsiyonel yanıtın değişir⁽⁵²⁻⁵¹⁾.

ADP-ribosilasyon (ADPr); pozitif yüklü nikotinamid adenin dinükleotid (NAD+) bir ADP-riboz parçasının, hedef proteine ait bir amino asit kalıntısından eş zamanlı salınan nikotinamid ile transferine monoADP-ribosilleme denir⁽⁵³⁻⁵⁴⁾. Ökaryotik hücrelerde bu amino asitler lizin, arginin, glutamat, aspartat, sistein, fosfo-serin ve asparagindir ve transfer ADP-ribosiltransferazlar (ART) alt grubu olan difteri toksin benzeri ADP-ribosiltransferazlar (ARTD) (eski adıyla PARP ailesi da bilinebilir) tarafından gerçekleştirilir⁽⁵⁴⁾. Proteine bağlı ADP-riboz daha sonraki ADP-ribosilasyonlarda alıcı olarak işlev görüp mono formunu poli olarak geliştirebilir⁽⁵³⁾. Proteinlerden ADPr çıkarılmasında, poli formların mono formlara dönmesinde PARG ve ARH3 rol alırken mono formların tamamen proteinlerden çıkarılmasını ARH3, PARG ve liyaz enzimleri sağlar⁽⁵⁴⁾. Kromatin yapısı gevşemesine neden olan ADPr'nin yüksek negatif yükünden dolayı yine negatif DNA'yı itmesinden kaynaklanır. Kromatin bölgesindeki bu açılma replikasyonu artırır ve DNA onarımı için gerekli proteinlerin ilgili bölgeye toplanmasına yol açar ve ayrıca açık hale gelen promotörlere transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına izin vererek gen ekspresyonunu etkiler^(54,53). Prostat kanserinde yapılan bir çalışmada, yüksek ekprese edilen Bcl2 ve CLU genlerin kemoterapötik ilaç direncine olan etkisinin HDAC ve DNMT inhibitörleri ile tersine çevirebileceği bildirilmiştir⁽²⁾. Mesane kanseri hücrelerinde ve transgenik fare modeli kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada DNMT inhibitörü olarak kullanılan Belinostat hücre proliferasyonunda anlamlı



bir azalma göstererek pozitif bir sonuç oluşturmuştur⁽²⁾.

3. Kodlama yapmayan RNA'lar

RNA'dan proteine çevrimi amacıyla herhangi bir bilgi taşımayan, yada çok kısa peptitler üretebilirler, ancak gen ekspresyonu ve protein düzeyinde düzenleyici rolü olan ribonükleik ait sekanslarına kodlayıcı olmayan RNA'lar (ncRNA'lar) denir⁽⁵⁵⁾. Uzunluklarına göre sınıflandırılan ncRNA'lar, 200 nükleotidden uzunsu uzun kodlayıcı olmayan RNA'lar (lncRNA'lar), kısa ise küçük ncRNA'lar (sncRNA) olarak adlandırılır⁽⁵⁶⁾.

3.1 Uzun Kodlayıcı Olmayan RNA'lar

Fonksiyonları henüz tam olarak açıklanamasa da, lncRNA'lar inhibe edilen genlerin ekspresyonunu kontrol edebilir, kromozom yapısının düzenlenmesinde, dolaşıma katılarak hormon benzeri bir etkinin oluşturulmasında rol alabilir ve ayrıca genlerin fonksiyonlarının tespitinde kullanılan siRNA üretimine de katılabilirler⁽⁵⁶⁻⁵⁷⁾. Psödogenler, dairesel RNA'lar (circRNA'lar) ve büyük intergenik ncRNA'ların dahil olduğu (lincRNA'lar) lncRNA'lar, ekzonların üst üste binmesi, DNA'nın antisens ipliğinden, intergenik gölgelerden veya intron gibi DNA'nın kodlayıcı olmayan sekanslar olmak üzere genomun neredeyse her bölgesinden kodlanabilirler⁽⁵⁶⁾. lncRNA'lar, son yıllarda yapılan çalışmalarla hücre reaksiyonlarının hemen hepsinde etiketleri tespit edilmiş, kanser başta olmak üzere birçok insan hastalığının oluşum nedenleri ile ilişkilendirilmiştir⁽⁵⁶⁾. Örneğin lncRNA ürotelyal karsinomla ilişkili 1 (UCA1) mesane kanserinde yüksek ekspresyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Mesane kanseri hücrelerinde UCA1'i tanıyıp CRISPR / Cas9 sisteminin susturmasını sağlayan klavuz bir RNA (gRNA; guide RNA) tasarlamışlardır. UCA1'in mesane kanserinde önemini araştıran bu çalışma sonucunda CRISPR / Cas9-UCA1 hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunun ihibe ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca elde edilen veriler sonucunda, UCA1 idrarda kolayca tespit

edilebilecek invaziv olmayan bir beliteç olarak önermişlerdir⁽⁵⁸⁾.

Psödogenler; Psödogenler, genlerin promotör bölgelerinde meydana gelen delesyon veya insersiyon sonucu çerçeve kayması veya stop kodunu oluşturma gibi mutasyonlarla fonksiyonel protein kodlayama yeteneğini kaybederler. Kısa peptitlerde üretebilme yeteneğine sahip psödogenler, daha sonra bahsedilecek olan miRNA'ların hedeflediği mRNA'lar yerine geçerek aktivitelerini engelleyebilirler⁽⁵⁶⁻⁵⁷⁾. Psödogenlerle yapılan bir çalışmada, tip 2 diyabetli hastalarından (T2D) alınan megakaryositlerde, T2D'de hastalarında yaygın görülen hiper pıhtılaşma ve trombosit aktivasyonunun lncRNA'larla ilişkisini araştırmak amacıyla çok sayıda lncRNA taramışlardır. Çalışma sonucunda metallothionein 1 psödojen 3'ün (MT1P3) sağlıklı bireylere göre anlamlı bir şekilde yukarı regüle edildiğini bildirilmiştir⁽⁵⁹⁾.

Dairesel RNA'lar; Yaklaşık 500 nükleotid uzunluğunda olan dairesel RNA'lar (circRNA'lar) pre-mRNA'ların ko-transkripsiyonundan veya post-transkripsiyon esnasında çıkarılan ekzonlardan üretilebilirler. 5 'başlık ve 3' kuyruk bulundurmamaları nedeniyle bu uçlar birbirine tek sarmallı sürekli bir ilmek yapısı oluşturacak şekilde kovalent olarak bağlıdır. Diğer doğrusal RNA'ların aksine açık uç bulundurmayan bu circRNA'lar daha stabil ve dokuya özgü oldukları gibi hücre tipleri veya gelişim aşamaları için spesifik olabilirler. Yapılan bir çalışmada embriyonik dönemde fare uzuvlarının gelişimi için kritik role sahip Fmn geninin ekzonlarından yüksek oranda bazı circRNA'ların ürettiği gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda, circRNA'nın Fmn genine ait mRNA'ları bir tuzak gibi hasettiği ve böylece genin protein düzeyinde seviyesini düzenlediği bildirilmiştir⁽⁶⁰⁾. Bir başka çalışma ise circRNA'ların miRNA tuzakı olma özelliğine dikkat çekerek, testise özgü bir circRNA olan Cinsiyet belirleme bölgesi Y'nin (Sry) miR138'leri bir sünger gibi toplayarak protein seviyesinde artışa neden olduklarını göstermiştir⁽⁶¹⁾. Ayrıca circRNA'ların, bu RNA tipine spesifik bir

özelliği ise çoklu miRNA bağlanma bölgelerini barındırmasıdır⁽⁵⁶⁾.

İntergenik ncRNA'lar; Histon modifikasyonlarında da görev alan intergenik ncRNA'lardır (lincRNA'lar) mRNA'ar gibi RNA polimeraz RNA Polimeraz tip II tarafından sentezlenir ve splicing, 5'-kaplama ve poliadenilasyon gibi post-transkripsiyonel modifikasyonlara tabi olurlar⁽⁵⁵⁾. mRNA'dan farklı olarak ise hücreye veya dokuya daha spesifiktir, henüz tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte sahip oldukları küçük okuma çerçevesi (ORF; open reading frames) ile kısa peptitler oluşturabilirler ve çekirdekte bol miktarda bulunan hücre komponentlerinden biridir⁽⁵⁵⁾. mRNA'lara nazaran daha az seviyede eksprese edilen lncRNA'lar kromatin modifikasyonuna katılarak veya transkripsiyon regülatörlerine gen ekspresyonunu engelleyebilir, transkripsiyon faktörleri ile etkileşime geçerek enhansırların ilgili genin promotör bölgesine bağlanmasında rol alabilir, miRNA süngeri görevi görüp mRNA stabilitesini düzenleyebilir, çekirdek porlarından geçmemesi gereken proteinleri engelleyebilir ve son olarak başka bir hücrede görev almak üzere taşıyıcı bir protein, serbest veya kese için ekstraselüler matrikse salınabilir⁽⁵⁶⁾.

3.2 Kısa Kodlayıcı Olmayan RNA'lar

Hedef bir genin susturmasını veya transkripsiyonel aktivasyonun regülasyonunu gene özgü çift iplikli RNA (dsRNA) yardımıyla durdurulmasına RNA interferansı (RNAi) denir. RNAi genomda bulunan genlerin ekspresyonunu düzenlemenin yanı sıra eksternal RNA'ların, viral genlerin veya transpozonların da ekspresyonunun baskılanmasını sağlayabilirler⁽³⁵⁾. Bu amaçla görevli sncRNA'lar ise mikroRNA'lar (miRNA'lar), küçük engelleyici RNA'lar (siRNA) ve Piwi etkileşimli RNA'lardır (piRNA)^(56,62). **MikroRNA'lar;** RNA polimeraz II tarafından transkribe edilen miRNA insan genomunda intergenik veya intrajenik olabilir⁽⁶³⁾. miRNA'ların çoğunluğu protein kodlayabilen / kodlanmayan genlerde bulunan intronlarının ve ekzonlarının içinde yani intrajenik bölgede bulunur. Ve

ayrıca bu genlerin translasyona uğramamış bölgesinden (UTR) ve genomun tekrar bölgelerinde de bulunabilir. Bazı miRNA'lar ise tek bir promotöre bağlı polisistronik transkriplerin oluşturduğu kümelerin içinde veya kendine özgü promotörleri ile monosistronik olarak transkribe edilebilirler⁽⁶³⁾. miRNA'lar transkribe edildiklerinde 1 kb'den daha uzun olan primer miRNA'ların (pri-miRNA) 5' ucu 7-metil-guanosin (m7G), 3' ucu poliadenilat ile kaplanmış. pri-miRNA, mikroşlemci komplek olarak bilinen Drosha ve DGCR8 tarafından tanınır ve ~ 70 nt uzunluğunda öncü miRNA'yı (pre-miRNA) üretirler⁽⁶³⁾. Saç tokası şekiline sahip pre-miRNA bir taşıyıcı protein olan ekspozin 5 (EXP5) ve Ran-GTP ile sitoplazmaya taşınır. Oluşan üçlü kompleks sitoplazmada Ran-GTP'nin bir fosfat kaybı ile dağılır. Yalnız kalan pre-miRNA'nın 5' ucuna bağlanan Dicer ile onun kofaktörleri olan TAR elemanı bağlayıcı protein (TRBP) ve protein kinaz R-aktif edici protein (PACT) tarafından 22 nükleotitik miRNA dubleksine ayırır⁽⁶³⁾. Son olarak olgun miRNA'ya dönüştürülmek üzere RNA dubleksi, Argonaute (AGO) proteinine yüklenir, AGO diğer ipliğin ayrarak sitoplazmaya bırakır. miRNA yüklü AGO, RNA'nın neden olduğu susturma kompleksini (RISC) oluşturmak için GW182 nin dahil olduğu kofaktörler ile birleşir⁽⁶³⁾. MiRNA yüklü AGO, GW182 (TNR-C6A olarak da bilinir) dahil olmak üzere diğer kofaktörlerle birleşir ve RNA'nın neden olduğu susturma kompleksi (RISC) olarak adlandırılan efektör kompleksini oluşturur. MiRISC (miRNA ile indüklenen susturma kompleksi), bağlanacağı hedef gen mRNA'nın bozulmasını ve translasyonunu baskılamak için hazırdır⁽⁶³⁾. Birçok hücrel aktivitenin düzenlenmesini kontrol eden miRNA'lar hastalıkların tanı ve prognoz için biyobelirteç olma potansiyeline sahiptir. Ve çalışmalar göstermiştir ki bazı miRNA'lar prostat kanserinde (miR-141, miR-449 vb.) hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, migrasyon ve invazyonda yer alan genlerin ekspresyonunu etkilerken, renal kanserlerde (miR-210, miR-30c, miR-23b, miR-29b ve miR-34a vb.) apoptoz, anjiyogenez ve epitelyal mezenkimal geçiş de değişiklik-

lere neden olmuş ve mesane kanserinde hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve sinyal iletim yollarını hedefleyen miRNA'lardan miR-21 ve miR-129'un ekspresyonundaki artış kötü prognozla ilişkilendirildikleri bildirilmiştir⁽²⁾. Zhang ve arkadaşları, kanserde aşırı eksprese edildiği bilinen bir metiltransferaz olan EZH2'yi hedefleyen bir miR143 ile honokioli gibi kanser hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu inhibe eden bileşik ile idrar kesesi kanseri hücrelerine uygulandıklarında kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiklerini bildirmişlerdir. Verilerini umut verici bir terapötik seçenek olarak önermektedirler⁽⁶⁴⁾. Yapılan bir diğer çalışmada ise renal kanserli hastaların serumlarında kontrol grubuna nazaran yüksek oranda görülen beş miRNA (miR-193a-3p, miR-362, miR-572, miR-378 ve miR-28-5p) tanı için yüksek doğruluk potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir⁽²⁵⁾. DNMT3A2'yi hedefleyerek metilasyonu düzenleyen, miR-199a-3p'nin normal bir insan testis hücre hattında (HT) yıkarması bu genin ekspresyonunu arttırdığı, artan DNMT3A2 proteininin malign testis tümöründe önemli ölçüde aşırı eksprese edildiği tespit edilmiştir⁽⁶⁵⁾.

Küçük Engelleme RNA'ları; siRNA'lar endojen veya ekzojen kaynaklı RNA'ları (virüs replikasyonu, transpozon aktivitesi veya gen transkripsiyonu sonucu oluşan RNA'ları) kalıp olarak kullanılır ve RNA polimeraz enzimi tarafından dsRNA olarak sentezlenir^(35,66). Oluşan dsRNA miRNA'lar da olduğu gibi EXP5 yardımı ile nükleus dışına taşındıktan sonra Dicer tarafından 21-23nt tek zincirli RNA parçacıklarına ayrılır. Ardından ATP bağımlı bir şekilde RISC kompleksine aktarılan siRNA hedef mRNA'ya dizisi üzerindeki eşleşme bölgesine bağlanır ve buradan endonüklazlarla keserek mRNA'nın translasyonu inhibe eder⁽³⁵⁾. İn Vitro koşullarda üretilen siRNA'lar yapılan bazı RNAi tedavilerinin umut verici sonuçlardan biri Machado-Joseph hastalarında bulunan mutasyon MJD1 geninin siRNA'lar ile susturulmasıyla edilmiştir. MJD1 genindeki bir CAG kodonunun anormal tekrarlanması sonucu oluşan

mutant protein ataksin-3'ün, anormal katlanmasının çekirdekte birikmesi ile nörodejenerasyona sebep olmuştur. Viral vektörlerle verilen siRNA tedavisinin, bu genin transkripsiyonel gen susturulmasına cevap verdiği ve fareler üzerinde tekrarlanan deneyin hiçbir toksikolojiye neden olmadığı rapor edilmiştir. RNAi tedavisi, ilerlemesini durdurmak için dahi tedavisi olmayan bu hastalığa umut verici bir tedavi seçeneği sunmaktadır⁽⁶⁷⁾. SiRNA'larla yapılan son çalışmalardan bir diğeri, siRNA'nın bir histon metiltransferaz olan EZH2'yi susturduğunu ve böylece insan küçük hücreli olmayan akciğer ve mide kanseri hücre hatlarında cisplatin direncini tersine çevirebileceğini rapor etmişlerdir⁽⁶⁸⁾.

Piwi etkileşimli RNA'lar; Hücre içinde mRNA ekspresyonun düzenleyen miRNA'lara benzer şekilde piRNA'lar da transpozom elementlerinin (TE), genom içindeki yerlerini değiştirebilen DNA elementleri, seviyelerinin düzenlenmesinde görev alırlar⁽⁶⁹⁾. Genom dizileme projesinin ortaya koyduğu gibi memeli genomunun %45'ini işgal eden TE'ler genom instabilitesini değiştirme veya mutasyon oluşturma yeteneğine sahiptirler⁽⁶⁹⁾. Son on yılda yapılan çalışmalar sonucu ncRNA'ların “karanlık maddesi” olduğu düşünülen piRNA'ların genomu korumak için özel bir sistem olduğu keşfedilmiştir⁽⁷⁰⁾. Ayrıca bu çalışmalar kanserde piRNA'ların aşırı ekspresyonun tümörü tümör olmayandan ayırdığı ve metastazdan apoptoza kadar kanserin birçok sürecinde rol aldığı bildirilmiştir. Diğer birçok hastalıklarda ilişkisi olduğu düşünülen piRNA'lar 23-30 nt uzunluğun Ago proteinlerinin alt familyasından biri olan PIWI'ye bağlı olarak fonksiyonlarını gerçekleştirirler. piRNA dizilerinde veya genomda dağınık halde bulunan ökratik TE bölgelerinden sentezlenen piRNA öncüsü miRNA'ların aksine Dicer enzimine ihtiyaç duymazlar⁽⁷⁰⁾. Bunun yerine daha karmaşık bir yolla üretilen sense ve anti-sense iplikler henüz bilinmeyen bir yolla ayrılıp iki ayrı yol izlerler. Piwi proteinine yüklenen sense iplikleri Aub ve Ago3'ün dahil olduğu ping-pong döngüsü olarak



bilinen aplifikasyon sürecine girerler. Zucchini endonükleaz (Zuc) enzimi tarafından tanınıp kesilen antisense ipliği PiWi proteini yüklendikten sonra diğer çoğaltılan PiWi yüklü piRNA'lar ile nükleusa dönerler. Burada MTase and HDAC'ın yardımıyla TE'lerin post-transkripyonel baskılanmasını sağlarlar⁽⁷⁰⁾. TE'lerin susturulmasının yanı sıra metilasyon veya asetilasyonun gerçekleşmesi için gerekli moleküllerin bölgeye toplanmasına yardımcı olan piRNA'lar, 2010 yılında yapılan çalışmada rapor edilen katil immünoglobulin benzeri reseptörlerin (KIR'ler) susturulması gibi⁽⁷¹⁾, genlerin ekspresyonun düzenlenmesinde de görev alabilirler⁽⁷⁰⁾.

Epigenetik Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler

Epigenetik çalışmalarda öncelikle çalışılacak molekülün ve materyalin iyi tanınması gereklidir. Çalışmanın tasarlanması sürecinde araştırılan literatürlerde öncelikle materyaliniz toplanma koşullarının en elverişli şekilde nasıl gerçekleştirilebileceğini, nasıl saklanacağı, materyal içinden izole edilecek molekülünüzün toplama sırasında ön işleminin yapıp yapılmayacağı gibi faktörler çalışma için kritik öneme sahiptir. Örneğin cfdNA'da metilasyonun çalışılacağı bir çalışmada K2 EDTA'lı tüpler kullanılmamalı yerine tercihen hücre parçalanmasını önleyen ve Polietilen tereftalat (PET) malzeme ile dayanıklılığı arttırılmış cfdNA toplama tüpleri kullanılmalıdır. Aksi halde K3 EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 2-3 saat içerisinde santrifüj edilerek plazmaları sıvı azotta saklanmalıdır. DNA'nın metilasyonu ölçülmesi için bilinen üç yöntem vardır. Bunlar; (i) bisülfid uygulaması; küçük veya büyük seviyede DNA metillenmesin araştırılması için uygundur. Bu yöntem tek baz çifti çözünürlülüğünde olması, dizilemeyle kolayca belirlenebilmesi açısından avantajlıyken, DNA'nın yıkılması ve mikrodizileme teknolojisinde kolayca uygulanmadığı için dezavantajlıdır⁽⁷²⁾. (ii) Metillenmeye duyarlı restriksiyon enzimleriyle kesim; Spesifik olarak genom üzerindeki bir bölgeye özgü yapılacak

olan metilasyon çalışmasıdır. Bu yöntem, primerler ve bu primerlerin çoğaltıkları alana özgü kesim yaparak, yüksek düzeyde hassas ve basittir, ancak metillenmeye duyarlı kesim enzimleri kesim yerleri ile sınırlıdır⁽⁷²⁾. (iii) 5-metilsitozin antikorumları ile affinite saflaştırması; Büyük ölçekli, hızı ancak düşük çözünürlüklü DNA metilasyonu çalışmaları için uygundur. Genomda DNA metillenmesinin kapsalı olarak araştırılmasını sağlan bu teknik ise antikorumların çapraz reaksiyon verme ihtimalleri, genom üzerindeki tekli CpG dinükleotidleri hakkında çok bilgi olamaması ve CpG yoğunluğunun bilgisayarda düzenlenmesi gerekliliğinden dolayı dezavantajlar içermektedir⁽⁷²⁾.

Histon modifikasyonlarının değerlendirilmesi ve haritalandırılmasında kullanılan yöntemlerden ilki "Chip-chip" yöntemidir. Histon modifikasyonlarının genom düzeyinde araştırılmasına imkan veren bu yöntem biyoformatik ve analitik olarak da daha az karmaşıktır. İkincisi ise chipten gelen sinyallerin kantitatif olarak da bir değer verdiği ve yeni nesil dizileme için örneklerin mültipleks hale gelmesine izin veren bir yöntem olan "Chip-Seq" yöntemidir⁽⁷²⁾.

miRNA'ların sahip olduğu bir çok nicel ve nitel özelliklerden dolayı çalışmanın hassasiyeti bir çok faktöre bağlıdır⁽⁷²⁾. Yaklaşık 22 nt'lik miRNA'lara qPCR için tasarlanan primerler bağlanamada zorlanabilir, yine kısa olmalarına rağmen farklı erime derecelerine (Tm) sahip olmaları ve aynı miRNA'nın farklı biyolojik örneklerde farklı olması gibi faktörler bunlardan bir kaçısıdır⁽⁷²⁾. miRNA dizileri ve hedefledikleri genler "miRDB, DIANA TOOLS, miRBase, MirWalk" gibi linklerden ulaşılabilir. Tüm gerekli ön çalışmaların ardından miRNA ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için üç yöntem kullanılabilir, Bunlar; yaygın, basit ve ucuz olanı gerçek zamanlı PCR (qPCR) yöntemi olmakla birlikte aynı anda çoklu miRNA çalışmasına imkan veren mikrodizileme, in situ melezleme ve Northern damgalama teknikleridir⁽⁷²⁾. qPCR tekniğinde tekniğinin yaygın olarak kullanılmasının bir diğer nedeni bir çok labratuvarda bu

teknik için gerekli alt yapının zaten var olmasıdır. qPCR tekniğinde örnekten ya direk total RNA izole edilir ve tüm RNA'lar cDNA'ya çevrilir yada miRNA izolasyonu için özel kitlerle miRNA'lar izole edilir ve tüm miRNA cDNA'ya çevrilir. İki yöntemin de sonrasında çalışmada seçilen miRNA'ya özgü primer ve prob'lar yardımıyla qPCR'da eş zamanlı amplifikasyon ve ölçüm yapılır. Sonuçlar referans miRNA (RNU6B vb.) ve hedef genin kontrol grubundaki ekspresyon düzeyi üzerinden değerlendirilir⁽⁷²⁾. Uzun çift iplikli RNA öncülerinden in vitro olarak üretilebilen siRNA'lar, pek çok hücresel sürecin aydınlatılmasında yardımcı olmuşlardır⁽⁷²⁾. Gen delesyonunda olduğu gibi telafi edici mekanizmaların devreye girmemesi ve gen delesyonu gibi etiki bir yöntem olmasının yanı sıra ucuz ve hızlı olması nedeniyle de tercih edilen post-transkripyonel bir gen susturma yöntemidir. RNA ile yapılan protein fonksiyon çalışmalarında az miktarda siRNA'nın hedeflenen genin mRNA'sı üzerindeki etkisinin çok yüksek olmasıyla da oldukça verimlidir⁽⁷²⁾. Transkripsiyon sonrası gen susturma amaçlı üretilen siRNA'lar web tabanlı bir site yardımıyla doğru bir şekilde tasarlanmalıdır. Ardından tasarlanan siRNA'nın etkinliğini belirlemek amacıyla ön bir çalışma yapılarak hedef mRNA (Northern blot, terstranskriptaz veya qPCR yöntemleri ile) ve hedef genin protein düzeyi (immunositokimyal veya western blot yöntemi ile) ölçülmelidir⁽⁷²⁾. Dışarıdan verilen siRNA'lar ile yapılan gen susturma çalışmaları geçicidir, fakat hücrelerin viral vektörlerle enfekte edilip hücrenin kendisinin siRNA'ları yapmasını sağlamak kalıcı duruma gelebilir. Bu nedenle çalışma amacına uygun olarak siRNA'nın hücreye aktarılması önemlidir. Herhangi bir işlem uygulanmamış yalın halde bulunan çift iplikli siRNA'ların, taşıdıkları yüksek yük, hücrenin etkili bir şekilde siRNA'ları hücre içerisine almasını sağlayacak bir moleküller mekanizmaya sahip olmamaları (C. Elegans hariç) nedeniyle kolayca hücre içine giremezler⁽⁷²⁾. Bu nedenle siRNA'ların elektroporasyon, kimyasal maddeler, vektörler veya vektörleri taşıyan virüslerle

hücre içine aktarılır. Bu aşamada transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini ve susturma oranının belirlenmesi için kontrol grupları oluşturulması çalışma açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle kontrol grubu olarak, hiçbir deneysel parametreye tabi tutulmayan bir grup, siRNA taşımayan transfeksiyon ajanının uygulandığı bir grup, referans (housekeeping) geni hedef alan siRNA'nın uygulandığı bir grup ve son olarak herhangi bir geni hedeflemeyen siRNA'nın uygulandığı bir grubu içermelidir⁽⁷²⁾. Bu şekilde çalışmanız sırasıyla, hedef genin normal hücrelerdeki durumunu, transfeksiyon ajanının neden olabileceği toksikolojik bir etkinin oluşup oluşmadığını, hedef doku veya hücrede susturulan bir genin başarılı olma oranını ve siRNA'nın oluşturabileceği taklit etkiyle gerçek etki arasındaki ayrımın ölçülmesi sağlar⁽⁷²⁾. Çalışma sonucunda, grupların araştırmanın amacına göre belirlenen zamanlarda (12., 24., 48., 72. Saatlerde) alınan örneklerinden mRNA ekspresyon ve protein seviyeleri belirlenerek çeşitli istatistik analizleri yapılarak verilerin değerlendirilmesi yapılır⁽⁷²⁾.

SONUÇ

Sonuç olarak epigenetik regülasyonda görevli bu mekanizmalar bir çok hastalıkta olduğu gibi ürolojik kanserlerde de mihenk taşı potansiyeline sahip olup devrim niteliğinde, tanı, prognoz ve tedavi için hedef biyomarkörler sunmaktadırlar ve sunabilirler. DNA metilasyonu, histon asetilasyonu/metilasyonu ve miRNA'lar en çok çalışılan epigenetik mekanizmalardır. Ancak diğer epigenetik regülatörlerde henüz keşfedilmemekle birlikte kritik öneme sahip oldukları düşünülmektedir. Non-invaziv veya minimum invaziv olarak tespit edilmesi kolay olan bu regülatörler likit biyopsi alanında yapılacak çalışmalara da hız kazandıracak niteliktedir. Ancak tanımlanmış epigenetik biyobelirteçlerin çok az bir kısmı kliniğe yansımıştır. Bunun nedeninin epigenetik ilaçların oluşturabileceği olası yan etkilerin tam olarak araştırılmamış olmasıdır⁽²⁾. Epigenetik mekanizmaların hücre kaderi

ve bu mekanizmaların birbiri üzerine olan etkisi araştırıldıkça klinik sınırların aşılabacağı ve klinik başarıyı sağlayacağı düşünülmektedir. Özellikle kanser alanında yoğunlaşan epigenetik çalışmalar, aynı kanser türünde iki vakanın aynı terapiye olan farklı yanıtlarına da cevap potansiyeli taşımaktadır. Kişiselleştirilmiş tedavinin en az yan etki ile gerçekleşmesi yönünde de ışık tutan epigenetik tedavilerin gelişimi sürekli bir hedef olmalıdır. Ayrıca hedefe özgü epigenetik ajanlarla kombine uygulanabilecek immünolojik, metabolik veya geleneksel tedavilerin daha hızlı ve nitelikli klinik başarıya ulaşma potansiyelleri gelecek çalışmalarda göz ardı edilmemelidir.

Kaynaklar

1. Lobo J, Jerónimo C, Henrique R. Targeting the immune system and epigenetic landscape of urological tumors. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3).
2. Faleiro I, Leão R, Binnie A, de Mello RA, Maia AT, Castelo-Branco P. Epigenetic therapy in urologic cancers: An update on clinical trials. *Oncotarget.* 2017;8(7):12484–500.
3. Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol.* 2012;41(1):10–3.
4. Vijayanthi T, Pandian GN, Sugiyama H. Chemical Control System of Epigenetics. *Chem Rec.* 2018;18(12):1833–53. [cited 2020 Mar 22] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30378269>.
5. Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature.* 2019;571(7766):489–99.
6. Goyal D, Limesand SW, Goyal R. Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease. *J Endocrinol.* 2019;242(1):T105–19. [cited 2020 Mar 22] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31091503>.
7. O'Donnell KJ, Meaney MJ. Epigenetics, Development, and Psychopathology. *Annu Rev Clin Psychol.* 2020;16(1):annurev-clinpsy-050718-095530.
8. Chen Y, Hong T, Wang S, Mo J, Tian T, Zhou X. Epigenetic modification of nucleic acids: From basic studies to medical applications. *Chem Soc Rev.* 2017;46(10):2844–72. [cited 2020 Mar 22] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28352906>.
9. Hu X-Q, Chen M, Dasgupta C, et al. Chronic hypoxia upregulates DNA methyltransferase and represses large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel function

- in ovine uterine arteriest. *Biol Reprod.* 2017;96(2):424–34.
10. Yang J, Bashkenova N, Zang R, Huang X, Wang J. The roles of TET family proteins in development and stem cells. *Development.* 2020;147(2) [cited 2020 Mar 29] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31941705>.
11. Tahilian M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (80-).* 2009;324(5929):930–5.
12. Weisenberger DJ. Characterizing DNA methylation alterations from the cancer genome atlas. *J Clin Invest.* 2014;124(1):17–23.
13. Thienpont B, Steinbacher J, Zhao H, et al. Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. *Nature.* 2016;537(7618):63–8.
14. Brunst KJ, Tignor N, Just A, et al. Cumulative lifetime maternal stress and epigenome-wide placental DNA methylation in the PRISM cohort. *Epigenetics.* 2018;13(6):665–81.
15. Mochizuki K, Hariya N, Honma K, Goda T. Relationship between epigenetic regulation, dietary habits, and the developmental origins of health and disease theory. *Congenit Anom (Kyoto).* 2017;57(6):184–90.
16. Goyal R, Galfy A, Field SA, Gheorghie CP, Mittal A, Longo LD. Maternal Protein Deprivation: Changes in Systemic Renin-Angiotensin System of the Mouse Fetus. *Reprod Sci.* 2009;16(9):894–904.
17. Goyal R, Van-Wickle J, Goyal D, Longo LD. Antenatal maternal low protein diet: ACE-2 in the mouse lung and sexually dimorphic programming of hypertension. *BMC Physiol.* 2015;15(1):2.
18. Goyal R, Longo LD. Maternal protein deprivation: Sexually dimorphic programming of hypertension in the mouse. *Hypertens Res.* 2013;36(1):29–35.
19. Sun W, Dong H, Becker AS, et al. Cold-induced epigenetic programming of the sperm enhances brown adipose tissue activity in the offspring. *Nat Med.* 2018;24(9):1372–83.
20. Agarwal P, Morrisseau TS, Kereliuk SM, Doucette CA, Wicklow BA, Dolinsky VW. Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2018;55(2):71–101. [cited 2020 Mar 30] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29308692>.



21. Serpeloni F, Radtke K, de Assis SG, Henning F, Nätt D, Elbert T. Grandmaternal stress during pregnancy and DNA methylation of the third generation: an epigenome-wide association study. *Transl Psychiatry*. 2017;7(8):e1202.
22. Geeurickx E, Hendrix A. Targets, pitfalls and reference materials for liquid biopsy tests in cancer diagnostics. *Mol Aspects Med*. 2019;100828. [cited 2020 Mar 31] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31711714>.
23. Cui J, Sun W, Hao X, et al. EHMT2 inhibitor BIX-01294 induces apoptosis through PMAIP1-USP9X-MCL1 axis in human bladder cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2015;15(1):4.
24. Alvarez-Múgica M, Fernández-Gómez JM, Cebrian V, Fresno F, Escaf S, Sánchez-Carbayo M. Polyamine-modulated factor-1 methylation predicts bacillus Calmette-Guérin response in patients with high-grade non-muscle-invasive bladder carcinoma. *Eur Urol*. 2013;63(2):364–70.
25. Joosten SC, Smits KM, Aarts MJ, et al. Epigenetics in renal cell cancer: Mechanisms and clinical applications. *Nat Rev Urol*. 2018;15(7):430–51. [cited 2020 Apr 16] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29867106>.
26. Mirabello L, Kratz CP, Savage SA, Greene MH. Promoter methylation of candidate genes associated with familial testicular cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2012;3(3):213–27.
27. Huang J, Wang L. Cell-free DNA methylation profiling Analysis— Technologies and bioinformatics. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11) [cited 2020 Mar 22] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31698791>.
28. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14(9):985–90.
29. De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2014;25(9):1729–35.
30. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Horswell S, et al. Detection of ubiquitous and heterogeneous mutations in cell-free DNA from patients with early-stage non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27(5):862–7.
31. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(7):409–24. [cited 2020 Mar 31] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30796368>.
32. Gkountela S, Castro-Giner F, Szczerba BM, et al. Circulating Tumor Cell Clustering Shapes DNA Methylation to Enable Metastasis Seeding. *Cell*. 2019;176(1–2):98–112.e14.
33. Ovcharenko A, Rentmeister A. Emerging approaches for detection of methylation sites in RNA. *Open Biol*. 2018;8(9).
34. Cristiano S, Leal A, Phallen J, et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature*. 2019;570(7761):385–9.
35. Yarat A, Akbay T, Alturfan El. *Biyokimya Temel ve Özel Konular*. İstanbul: Akademisyen kitapevi; [date unknown]. 485–502 p.
36. Gaździcka J, Gołabek K, Strzelczyk JK, Ostrowska Z. Epigenetic Modifications in Head and Neck Cancer. *Biochem Genet*. 2019;
37. Audia JE, Campbell RM. Histone modifications and cancer [Internet]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(4) doi:10.1101/cshperspect.a019521.
38. Peng JC, Karpen GH. H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability. *Nat Cell Biol*. 2007;9(1):25–35.
39. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: A dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet*. 2012;13(5):343–57.
40. Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, et al. Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science (80-)*. 1999;285(5429):886–91.
41. Jeusset L, McManus K. Developing Targeted Therapies That Exploit Aberrant Histone Ubiquitination in Cancer. *Cells*. 2019;8(2):165.
42. Gray F, Cho HJ, Shukla S, et al. BMI1 regulates PRC1 architecture and activity through homo- and hetero-oligomerization [Internet]. *Nat Commun*. 2016;7 doi:10.1038/ncomms13343.
43. Yang Y, He Y, Wang X, et al. Protein SUMOylation modification and its associations with disease. *Open Biol*. 2017;7(10).
44. Bergink S, Jentsch S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature*. 2009;458(7237):461–7. [cited 2020 Apr 11] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325626>.
45. Martin S, Wilkinson KA, Nishimune A, Henley JM. Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(12):948–59. [cited 2020 Apr 11] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17987030>.
46. Yau TY, Molina O, Courey AJ. SUMOylation in development and neurodegeneration [Internet]. *Dev*. 2020;147(6) doi:10.1242/dev.175703.
47. Bawa-Khalife T, Cheng J, Wang Z, Yeh ETH. Induction of the SUMO-specific protease 1 transcription by the androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2007;282(52):37341–9.
48. Song S, Yu Y. Progression on citrullination of proteins in gastrointestinal cancers. *Front Oncol*. 2019;9(JAN).
49. Thålin C, Lundström S, Seignez C, et al. Citrullinated histone H3 as a novel prognostic blood marker in patients with advanced cancer. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191231.
50. Müzeyyen İzmirli. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar [Van Med J]. *Van Tıp Derg*. 2013;20(1):48–51.
51. Ageeva-Kieferle A, Rudolf EE, Lindermayr C. Redox-dependent chromatin remodeling: A new function of nitric oxide as architect of chromatin structure in plants. *Front Plant Sci*. 2019;10:625.
52. Nott A, Watson PM, Robinson JD, Crepaldi L, Riccio A. S-nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. *Nature*. 2008;455(7211):411–5.
53. Bartlett E, Bonfiglio JJ, Prokhorova E, et al. Interplay of Histone Marks with Serine ADP-Ribosylation. *Cell Rep*. 2018;24(13):3488–3502.e5.
54. Messner S, Hottiger MO. Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends Cell Biol*. 2011;21(9):534–42.
55. Mongelli A, Martelli F, Farsetti A, Gaetano C. The dark that matters: Long noncoding RNAs as master regulators of cellular metabolism in noncommunicable diseases. *Front Physiol*. 2019;10(MAY):369.
56. Beermann J, Piccoli MT, Viereck J, Thum T. Non-coding rnas in development and disease: Background, mechanisms, and therapeutic approaches. *Physiol Rev*. 2016;96(4):1297–325.
57. Sonmez D, Gogebakan B, Ecevit H, Ataç L, Urhan Kucuk M, İzmirli M. Sahte İsmi Haketmeyen Genler; Psödogenler [Internet]. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Derg*. 2016;7(25) doi:10.17944/mkutfd.62254.
58. Zhen S, Hua L, Liu YH, et al. Inhibition of long non-coding RNA UCA1 by CRISPR/Cas9 attenuated malignant pheno-

- types of bladder cancer. *Oncotarget*. 2017;8(6):9634–46.
59. Zhou M, Gao M, Luo Y, Gui R, Ji H. Long non-coding RNA metallothionein 1 pseudogene 3 promotes p2y12 expression by sponging miR-126 to activate platelet in diabetic animal model. *Platelets*. 2019;30(4):452–9.
 60. Chao CW, Chan DC, Kuo A, Leder P. The mouse formin (Fmn) gene: Abundant circular RNA transcripts and gene-targeted deletion analysis. *Mol Med*. 1998;4(9):614–28.
 61. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*. 2013;495(7441):384–8.
 62. Holoch D, Moazed D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet*. 2015;16(2):71–84.
 63. Khan S, Ayub H, Khan T, Wahid F. MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer. *Biochimie*. 2019;167:12–24. [cited 2020 Mar 22.] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31493469>.
 64. Zhang Q, Zhao W, Ye C, et al. Honokiol inhibits bladder tumor growth by suppressing EZH2/miR-143 axis. *Oncotarget*. 2015;6(35):37335–48.
 65. Chen BF, Gu S, Suen YK, Li L, Chan WY. microRNA-199a-3p, DNMT3A, and aberrant DNA methylation in testicular cancer. *Epigenetics*. 2014;9(1):119–28.
 66. Wei JW, Huang K, Yang C, Kang CS. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncol Rep*. 2017;37(1):3–9.
 67. Nóbrega C, Codêso JM, Mendonça L, Pereira De Almeida L. RNA Interference Therapy for Machado-Joseph Disease: Long-Term Safety Profile of Lentiviral Vectors Encoding Short Hairpin RNAs Targeting Mutant Ataxin-3. *Hum Gene Ther*. 2019;30(7):841–54.
 68. Zhou W, Wang J, Man W-Y, Zhang Q-W, Xu W-G. siRNA silencing EZH2 reverses cisplatin-resistance of human non-small cell lung and gastric cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(6):2425–30.
 69. Hyun S. Small RNA Pathways That Protect the Somatic Genome. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5):912.
 70. Yu Y, Xiao J, Hann SS. The emerging roles of PIWI-interacting RNA in human cancers. *Cancer Manag Res*. 2019;11:5895–909.
 71. Cichocki F, Lenvik T, Sharma N, Yun G, Anderson SK, Miller JS. Cutting Edge: KIR Antisense Transcripts Are Processed into a 28-Base PIWI-Like RNA in Human NK Cells. *J Immunol*. 2010;185(4):2009–12.
 72. Yılmaz S, Öztürk Sezgin M, Dağistanlı F. *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri Genomik ve Proteomik Analizler*. Nobel Tıp Kitabevleri; 2018. 391–470 p.



Rekombinant DNA Teknolojisinin Tıpta Kullanımı; Moleküler Cerrahi

Dr. Hilal FINDIK KIYAN ve
Dr. İlhan YAYLIM

Dünyanın dört bir yanında sağlık sorunları nedeniyle pek çok kişi hayatını kaybetmektedir. Her yıl milyonlarca insan kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet, AIDS / HIV, tüberküloz, sıtma gibi hastalıklardan ölmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi, yeni aşılarda ve farmasötikler geliştirilerek sağlık koşullarının iyileştirilmesinde hayati bir rol oynamaktadır.

Bu teknoloji sayesinde pek çok protein ve hormon üretimi kolaylaşmış ve etkileri arttırılmıştır. Ayrıca zamanla, aşı çalışmaları ve özellikle gen tedavisi çalışmalarında da kullanımı yaygınlaşmış ve yeni teröpatik stratejiler geliştirilerek hastalıkların tanı/tedavi süreçlerinde önemli bir yere sahip olmuştur. İlerleyen bilimsel çalışmaların ışığı altında, rekombinant DNA teknolojisi

de hızlı bir gelişim göstermektedir. Halen devam eden çalışmalarla, rekombinant DNA teknolojisinin tıpta kullanımı genişletilmektedir.

Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA (rDNA) molekülleri, farklı biyolojik kaynaklardan elde edilen DNA'ların laboratuvar yöntemleriyle (Örn; Moleküler klonlama) birleştirilmesiyle elde edilen moleküllerdir. Oluşan bu yeni genetik sekans, ana genetik materyalden farklıdır. rDNA moleküllerine bazen “**kimerik DNA**” denilmektedir, çünkü efsanevi kimeralar gibi iki farklı türün materyallerinden yapılabilmektedir. Rekombinant DNA moleküllerinin yapımında kullanılan DNA dizileri herhangi bir türden kaynaklanabilir. Örneğin, bitki DNA'sı bakteriyel DNA'ya birleştirilebilir veya insan DNA'sı mantar DNA'sı ile birleştirilebilir. Ayrıca, normalde hiçbir yerde oluşmayan DNA dizileri, DNA'nın kimyasal senteziyle oluşturulabilir ve rekombinant moleküllere dahil edilebilirler⁽¹⁾.

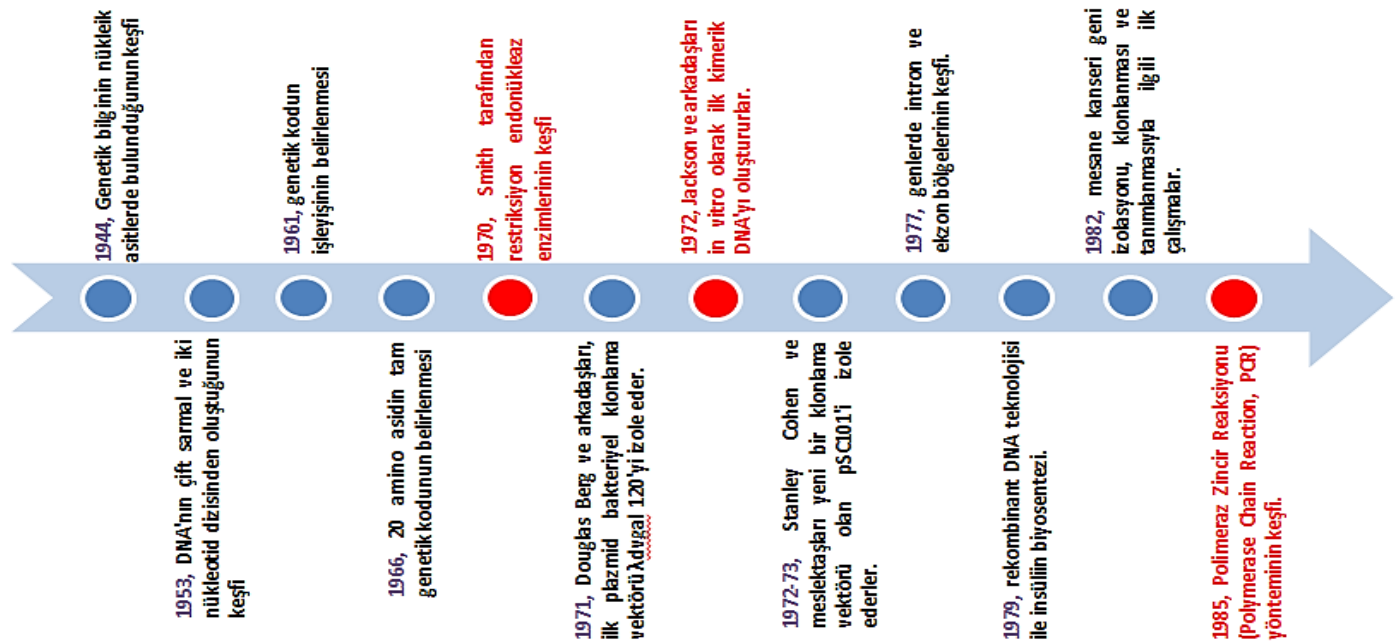
Rekombinant DNA teknolojisi ilk olarak 1970'lerde ortaya çıkmasına rağmen, rekombinasyonun temel prensibi yıllar

önce keşfedilmiştir. 1928'de Londra'da bir zatürre salgınından sorumlu bakterileri inceleyen Frederick Griffith, canlı hücrelerin, diğer hücrelerden salınan genetik materyali alarak fenotipik olarak transforme olduğunu göstermiştir. Böylece, genetik materyalin hücreler arasında iletilip yeni bir genetik bilgi olarak dönüştürülmesi olayını “**genetik transformasyon**” olarak adlandırmıştır⁽²⁾. Rekombinant DNA Teknolojisinin gelişimine katkı sağlayan önemli olaylar *Şekil 1*'de gösterilmiştir

Rekombinant DNA Teknolojisi Araçları

1-Enzimler: Rekombinant DNA Teknolojisinde 3 temel enzim rol oynamaktadır.

- ✓ **Restriksiyon enzimleri:** Kesmeye yardımcı olur,
- ✓ **Polimerazlar:** Sentezlemeye yardımcı olur,
- ✓ **Ligazlar:** Bağlamaya yardımcı olur.



Şekil 1: Rekombinant DNA Teknolojisi Gelişiminin Zaman Çizelgesi

Restriksiyon enzimleri restriksiyon bölgesi denilen belirli dizileri tanır, bağlanır ve keserler. Her restriksiyon bölgesi 'palindrom'dur; Yani karşılıklı zincirlerde her iki 5'-3' yönde aynı şekilde okunurlar (Örn; GCGCG). Bu asimetrik kesim sonucu tek zincirli kuyrukları olan 'yapışkan uçlar' oluşur. Tamamlayıcı yapışkan uçlar elde etmek için, hem hedeflenen gen hem de vektör aynı restriksiyon enzimleri tarafından kesilirler. Bu sayede, hedeflenen geni vektöre bağlayabilmesi için ligazların işi kolaylaşmış olur ⁽¹⁾.

2-Vektörler: Hedeflenen genin taşınmasına ve entegre edilmesine yardımcı olurlar. Vektörler, rekombinant DNA teknolojisi araçlarının çok önemli bir parçasını oluşturur, çünkü vektörler hedeflenen geni konak organizmaya ileten nihai araçlardır. Klonlama vektörlerinin yapısında '**replikasyon orijini**' bulunmaktadır. Replikasyon orijini, plazmid replikasyonunun hücre içerisinde başlayabilmesi için gerekli proteinleri bağlayan, ökaryotik kromozomal DNA üzerinde bulunan özel bir nükleotid dizisidir. Ayrıca vektör yapısında '**antibiyotik direnç genleri**' bulunmaktadır. Antibiyotik direnç genleri, rDNA vektörünün verildiği bakteri kültürlerine eklendiğinde, antibiyotik muamelesinde sadece vektörün çalıştığı bakteriler hayatta kalabilmektedirler. Ancak, antibiyotik direnç genleri hücre seçilimini sadece bakteriler arasında gerçekleştirebilmektedir. Bu yüzden, farklı hücre kültürlerinde seçilimi kolaylaştırması için antibiyotik direnç geni yerine '**seçilebilir belirteçler (selectable marker)**' kullanılmaktadır. Hücre kültürleri belli maddeler ile muamele edildiğinde bu belirteçler çalışmakta ve vektörü içeren konak hücrelerin kolayca seçilebilmesini sağlamaktadırlar. Hedeflenen gen bölgesinde, restriksiyon enzimlerince tanınan 'çoklu klonlama bölgesi (multiple cloning site)' bulunmaktadır. Bu bölge, vektör ile birleştirilecek olan DNA parçasının, DNA ligaz aracılığıyla birleştirilmesini ya da belirli restriksiyon endonükleaz enzimleri (EcoRI, HindIII vb.) kullanılarak kesilmesini sağlamaktadır. Ayrıca, ifade vektörlerinin

vazgeçilmez bir parçası olan '**promotör bölgesi**', bir sonraki genin ifadesi için gerekli olan transkripsiyon faktörleri ve RNA polimerazın bağlanmasını sağlayan bölgedir ⁽³⁾ (Şekil 2).

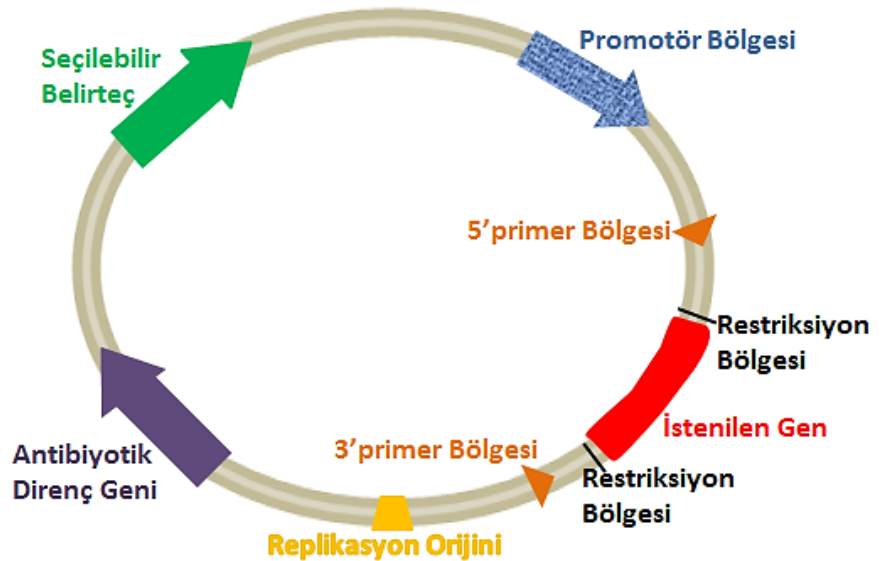
Vektörler **küçükten büyüğe** şu şekilde sıralanır; Bakteri plazmid vektörleri, bakteriyofaj vektörleri, kozmid vektörleri, ifade vektörleri, bakteriyel yapay kromozom (bacterial artificial chromosome, BAC), maya yapay kromozom (yeast artificial chromosome, YAC). **Plazmidler ve bakteriyofajlar**, çok yüksek kopya sayısına sahip oldukları için rekombinant DNA teknolojisinde en yaygın kullanılan vektörlerdir. Bakterilerde, mayalarda ve bazı ökaryotik canlılarda bulunan plazmidler, bakteri kromozomunun dışında, halkasal ve çift zincirli DNA molekülleridir. Plazmidler genetik mühendisliği aracılığıyla tasarlanarak klonlama vektörleri oluşturulmaktadır ⁽⁴⁾. Klonlama vektörleri **icerdikleri elementlere göre** bir kaç türde farklılaşır; Shuttle vektörleri, ifade vektörleri, gen knockdown vektörleri, reporter plazmidler ve viral plazmidler. İfade vektörleri, belirli bir genin ifade edilmesi için tasarlanmaktadır. Ancak **Shuttle vektörleri** birden fazla hücre türünde kullanılabilmek için tasarlanmaktadır. **Gen knockdown vektörleri**, belli bir

hücrede ifade edilen bir genin ifadesini azaltmak için tasarlanmaktadır. **Reporter plazmidler** sayesinde başka genlerin ifadesi incelenebilmektedir. Plazmid içerisinde '**reporter geni**' adı verilen DNA bölgesi bulunmaktadır, bu sayede başka genlerin ifadesi ile etkileşime girebilmektedirler. **Viral plazmidler** ise ilaçların hedeflenmesinde kullanılabilen viral kapsidlerin üretiminde kullanılmaktadırlar ⁽⁴⁾.

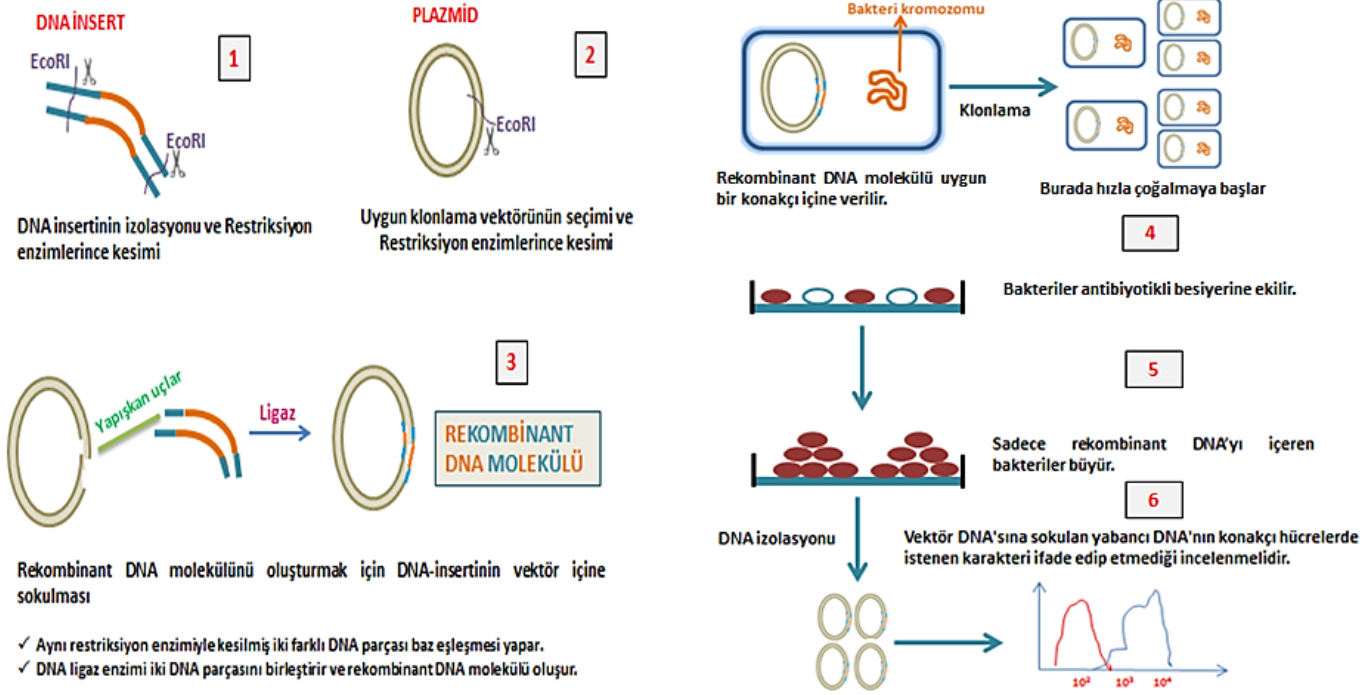
3-Konakçı organizma: Konakçı, rDNA'nın enzimler yardımıyla içerisine girdiği organizmadır. rDNA'ların konakçıya girmesi için birkaç yol vardır; mikroenjeksiyon, biyolistik veya gen tabancası, alternatif soğutma ve ısıtma, kalsiyum iyonlarının kullanımı, vb ⁽¹⁾.

Rekombinant DNA Teknolojisinin Temel Basamakları

1. DNA insertinin seçimi ve Restriksiyon enzimlerince kesimi
2. Uygun klonlama vektörünün seçimi
3. rDNA molekülünü oluşturmak için DNA-insertinin vektör içine sokulması
4. rDNA molekülü uygun bir konakçı içine verilmesi
5. Dönüşmüş (transforme) konakçı hücrelerin seçimi
6. Konakta DNA-insertinin ekspresyonu ve çoğalması.



Şekil 2: Plazmid vektör haritası (3).



Şekil 3: Rekombinant DNA Teknolojisinin Temel Basamakları⁽⁵⁾.

1. DNA insertinin seçimi ve Restriksiyon enzimlerince kesimi: Rekombinant DNA teknolojisindeki ilk adım, klonlanacak olan ilgili DNA segmentinin seçilmesidir. Bu istenen DNA segmenti daha sonra enzimatik olarak izole edilir. Restriksiyon enzimleri DNA moleküllerini özgül nükleotit dizilerinden tanır ve keser. Bu özgül DNA segmenti, **DNA insert /Yabancı DNA/Hedef DNA/Klonlanmış DNA** olarak adlandırılır⁽⁵⁾.

2. Uygun klonlama vektörünün seçimi: Bir klonlama vektörü, içine DNA insertinin entegre edildiği, kendi kendini kopyalayan bir DNA molekülüdür. Rekombinant DNA teknolojisinin bir sonraki adımında uygun bir klonlama vektörü seçilir. En yaygın olarak kullanılan vektörler plazmidler ve bakteriyofajlardır⁽⁵⁾.

3. rDNA molekülünü oluşturmak için DNA-insertinin vektör içine sokulması: Restriksiyon enzimleriyle oluşturulan DNA fragmentleri, **ligaz enzimiyle** vektöre bağlanır (birleştirilir) ve rekombinant DNA molekülü oluşur⁽⁵⁾.

4. rDNA molekülü uygun bir konakçı içine verilmesi: Uygun konakçı hücreler seçilir ve oluşturulan rDNA molekülü bu konakçı hücrelere verilir. rDNA'nın konakçı hücreye giriş sürecine **transformasyon (dönüşüm)** denir. Genellikle seçilen konakçılar E. coli gibi bakteriyel hücrelerdir, ancak maya, mantarlar da kullanılabilir. Rekombinant molekül konak içerisinde kendini eşler ve birbirine özdeş düzinelerce kopyası ya da klonları oluşur⁽⁵⁾.

5. Dönüşmüş (transforme) konakçı hücrelerin seçimi: Dönüştürülmüş hücreler (veya rekombinant hücreler), rekombinant DNA molekülünü alan konakçı hücrelerdir. Bu adımda markör (işaretleyici) genlerinin kullanıldığı çeşitli yöntemlerle, transforme edilmiş hücreler transforme edilmemiş hücrelerden ayırt edilebilirler⁽⁵⁾.

6. Konakta DNA-insertinin ekspresyonu ve çoğalması: Son olarak, vektör DNA'sına sokulan yabancı DNA'nın konakçı hücrelerde istenen karakteri ifade edip etmediği incelenmelidir. Ayrıca, transforme edilmiş

konakçı hücreler, yeterli sayıda kopya elde etmek için çoğaltılabilir. Gerekirse, bu genler başka bir organizmaya da aktarılabilir⁽⁵⁾. Yukarıda belirtilen basamaklar rekombinant DNA oluşumunda uygulanan genel/temel basamaklardır. Daha özel ele alındığında rekombinant DNA'nın oluşumunda 3 farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlar; **Transformasyon, Faj Giriş ve Bakteriyel Olmayan Transformasyondur**⁽¹⁾.

Transformasyon (Dönüşüm): Transformasyonun ilk adımı, vektöre eklenecek bir DNA parçası seçmektir. İkinci adım, bu DNA parçasını bir restriksiyon enzimi ile kesmek ve daha sonra DNA insertini DNA Ligaz ile vektöre bağlamaktır. Insert, rekombinant moleküllerin tanımlanmasına izin veren seçilebilir bir belirteç içerir. Sıklıkla bir antibiyotik belirteç kullanılır. Böylece, **belirli bir antibiyotiğe maruz kaldığında vektörü olmayan konakçı hücre ölür, ancak vektörü olan konakçı hücre dirençli olduğu için yaşayacaktır.** Vektör, transformasyonla bir konakçı hücreye yerleştirilir. Olası bir konakçı hücre örneği E. Coli'dir. Konakçı

hücreler, yabancı DNA'yı almak için özel olarak hazırlanmalıdır. Her vektör, onları farklı uygulamalara uygun hale getirmek için farklı özelliklere sahiptir (simetrik klonlama bölgeleri, yüksek kopya sayısı ve boyut) ⁽¹⁾.

Bakteriyel Olmayan (Non-Bakteriyel) Transformasyon: Bu işlem aslında transformasyona çok benzer. Aradaki tek fark; *burada konakçı hücre olarak bakterinin kullanılmamasıdır*. DNA doğrudan dönüştürülen hücrenin çekirdeğine enjekte edilir ⁽¹⁾.

Faj Girişi: Bakteri yerine bir fajın kullanıldığı transformasyona eşdeğer olan bir **transfeksiyon** işlemidir. **Lambda (λ) veya M13 fajları** kullanılarak rekombinant vektörler oluşur. Rekombinant vektörler fajın protein kafası içine paketlenir ve sonra konak bakteri hücrelerine sokulur. Bakterinin içinde vektörler çoğalarak çok sayıda faj kopyası oluşur. Oluşan bu fajlar konak bakteri hücrelerini parçalarlar. Petri kabında berrak lekeler şeklinde **plak** olarak bilinen yapılar oluşur ⁽¹⁾.

Rekombinant DNA Teknolojisinin Uygulama Alanları

Rekombinant DNA teknolojisi günümüzde geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir ⁽⁶⁾. Bu alanlar şekil 4'te özetlenmiştir.

Rekombinant DNA Teknolojisinin Tıptaki Rolü

Rekombinant DNA teknolojisi medikal sektörde ve ilaç sektöründe yoğun olarak kullanılmaktadır. Çoğunlukla insan protein ve hormonlarının üretiminde kullanılmıştır ⁽⁷⁾. Ancak zamanla aşı çalışmaları ve gen tedavi çalışmalarında da kullanılarak geniş bir alana yayılmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi, hastalıkların tedavisinde ve sağlık koşullarının iyileştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır ⁽⁸⁾.

Gen tedavisi: Gen tedavisi, terapötik potansiyele sahip gelişmiş bir tekniktir. Gen tedavisinde amaç, *istenilen genin hedef hücrede eksprese edilmesini sağlamaktır*. Bu amaçla virüsler kullanılmaktadır. Bunun için, virüslerin patojenik genleri çıkarılmakta ve bunun yerine *istenilen gen* konulmaktadır. Hedef hücreler virüsle enfekte olduklarında, virüs tarafından taşınan *istenilen gen*, insan DNA'sına kalıcı olarak entegre olmaktadır. Enfekte hücrelerin bölünmesiyle oluşan yeni hücreler de bu gen ekspresyonunu devam ettirmektedirler. Gen transferi için **adenovirüsler, retrovirüsler ve lentivirüsler** kullanılmaktadır ⁽⁹⁾.

Birincil immün yetmezlik olan **adenosin deaminaz eksikliği (ADA-SCID)** tedavisinde gen tedavisi kullanımı etkili olmuştur. İlk çalışmalarda, **matür T hücreleri** ex vivo olarak retrovirüsle enfekte edilmiştir, ancak başarı elde edilememiştir ^(10,11).

Daha sonraki klinik çalışmada, çeşitli kaynaklardan elde edilen **hematopoietik kök hücreler ve daha gelişmiş retrovirüsler** kullanılmış ve başarılı olunmuştur. Buna göre, hastaların çoğunda tedavinin üzerinden 10 yıl geçmesine rağmen gen nakli yapılan hücrelerin sağ kaldığı ve bu süre içinde önemli bir yan etki gözlemlenmediği bildirilmiştir ⁽¹²⁾.

Adrenolökodistrofi (X-ALD) hastalığı için gen tedavisi uygulanarak hastalığın yavaşlaması sağlanmıştır. Hastanın kendisinden kemik iliği hücreleri alınarak, ALD'ye yol açan genin bulunduğu X kromozomuna **HIV-1'e dayalı lentiviral vektör** aracılığıyla **onarıcı gen** verilmiştir. Sonuç olarak gen düzeltilmesi başarıyla gerçekleşmiştir. Bu çalışmayla bilim adamları ilk kez lentiviral vektör kullanarak hastalığın tedavisinde başarılı sonuçlar elde etmişlerdir ⁽¹³⁾.

Yapılan bir çalışmayla, iki hastada T hücre reseptörünü kodlayan bir retrovirüs kullanılmış ve metastatik melanom lezyonlarının gerilediği gösterilmiştir. Bu strateji daha sonra metastatik sinovyal hücreli karsinomları tedavi etmek için kullanılmıştır ⁽¹⁴⁾.

Nisan 2006'da yapılan İsviçre-Alman faz I/II gen tedavisi klinik çalışması, kronik granülomatöz hastalığını tedavi etmeyi amaçlamış ve çalışma başarıyla sonuçlanmıştır ⁽¹⁵⁾.

Ayrıca bir çalışmada, periferik kandan izole edilen mobilize CD34 + hücreleri retroviral olarak transdüksiyona tabi tutulmuş ve hastaya aşılanmıştır. Sonuç olarak, hastanın ölümüne yol açan enfeksiyonun şiddetinde azalma olduğu ve hastaların üçte ikisinin bu tedaviden net bir şekilde yarar gördüğü gözlemlenmiştir. Tedaviden sonra ise, viral promoter metilasyonla susturulmuş ve bu da enfeksiyonun şiddetlenmesine yol açmıştır ⁽¹⁶⁾.

Akciğer, jinekolojik, deri, ürolojik, nörolojik ve gastrointestinal tümörler, hematolojik maligniteler ve pediatrik tümörler dahil olmak üzere pek çok kanser türünde gen tedavisi uygulanmaktadır. Bu kanser türlerini tedavi etmek için kullanılan en önemli stratejiler; *immünostimülatör molekülleri eksprese etmek için tasarlanmış tümör hücre-*



Şekil 4: Rekombinant DNA Teknolojisinin Geniş Uygulama Alanları ⁽⁶⁾.

leri ile aşılama, tümör antijenlerini kodlayan rekombinant viral vektörlerle aşılama, tümör antijenlerini eksprese etmek için tasarlanmış konakçı hücrelerle aşılama. Ayrıca, tümör baskılayıcı genlerin immünoterapiye, onkolitik viroterapiye ve gen kontrollü enzim ön ilaç tedavisine transferi de önemli tedavi stratejilerindedir. Yaygın olarak transfer edilen bir tümör baskılayıcı gen olan **p53**, kanser tedavi çalışmalarında anahtar bir role sahiptir. Bazı stratejilerde ise, p53 gen transferi, kemoterapi veya radyoterapi ile birleştirilmiştir⁽¹⁷⁾.

Yeni fiber kimerik onkolitik adenovirüs vektörleri (*Ad5 / 35-EGFP*), hepatosellüler karsinomun (HCC) daha iyi tedavi edilebilmesi için kullanılmaktadır. Uygun analizlerle bu vektörlerin kullanılmış ve böylece HCC’de transgenik virüsün çok fazla kopyası üretilmiştir. Bu yüksek transgenik ekspresyon seviyesinin, normal hücreleri sitotoksitesiteye karşı koruduğu, in vitro HCC hücreleri üzerinde gelişmiş bir antitümör etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Ayrıca, bu yöntemle tümör büyümesinin inhibe edildiği tespit edilmiştir⁽¹⁸⁾.

Son yıllarda yapılan pek çok çalışmayla, gen tedavisi daha da ilerlemiş ve etkinliği geliştirilmiştir⁽¹⁹⁾.

Rekombinant Hormon/ Aşı / İlaç Geliştirme: İlaç metabolize eden enzim sistemleri, ilaçların etkinliği ve etkilerinin araştırılması açısından çok önemlidirler. Rekombinant DNA teknolojisi ile bu enzimlerin heterolog ekspresyonu sağlanarak, tedavi amaçlı ya da geliştirme amaçlı kullanılmaları sağlanmaktadır⁽²⁰⁾.

Rekombinant DNA teknolojisi ilaçların yanında birçok aşının üretiminde de rol almıştır⁽²¹⁾. Aşılar, enfeksiyona karşı bağışıklık sağlama amacı ile insan veya hayvan vücuduna verilen, zayıflatılmış veya etkisiz hale getirilmiş bir patojen içeren kimyasal preparatlardır. **Rekombinant aşılar**, rekombinant DNA teknolojisi ile biyolojik olarak sentezlenmiştir ve bu aşılar, bakteri, virüs veya protozoanın neden olduğu çok

sayıda ciddi hastalığa karşı etkilidirler. Buna örnek olarak çocuk felci, sıtma, kolera, hepatit, kuduz, çiçek hastalığı aşılarını verebiliriz⁽¹⁾. Rekombinant aşılar, geleneksel aşılarla göre daha yüksek etkinliğe ve spesifiteye sahiptirler⁽¹⁸⁾.

Rekombinant DNA teknolojisi ile oluşturulan ilk aşı Hepatit B aşısıdır. İlk başlarda Hepatit B virüsüne karşı aşılar serumdan yapılmaktaydı. Sonra 1984 yılında yapılan bir çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* mayasında, HBsAg gen dizisi içeren bir vektör hazırlanmış ve rekombinant HBsAg üretimi gerçekleştirilmiştir. Şempazeler üzerinde rekombinant HBsAg içeren aşı denenmiş ve Hepatit B virüsüne karşı direnç gösterdiği ortaya çıkmıştır⁽²²⁾. 1986 yılında yapılan bir çalışmada ise, bu aşının yetişkinlerde ve çocuklarda dozları ayarlanarak kullanıldığında güvenli ve etkili olduğu gösterilmiştir⁽²³⁾.

Rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen ilaçlar tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1: Rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen ilaç ve aşı örnekleri⁽⁵⁾.

| Aktif Molekül | İlaç İsmi | Terapötik Endikasyonu |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| İnsülin | Humalog, NovoRapid, Gensulin R, Humulin R, Actrapid HM | Diyabet |
| Factor VIII | KOGENATE® Bayer Factor VIII | Hemofili A hastası erkekler için |
| Factor IX | Bayer Factor IX | Hemofili B |
| İnsan Büyüme Hormonu (HGH) | Genotropin, Humatrop, Serostin | Büyüme hormonu yetersizliği |
| Eritropoetin (EPO) | Eprex, Epogen | Anemi |
| İnterferon | Avonex, Rebif, Betaseron | Hepatit B Virüsü |
| a-L-iduronidaz | Aldurazyme | Mukopolisakkaridoz tip I (MPS I; a-L-iduronidaz eksikliği) |
| N-asetilgalaktozamin-4-sülfataz (galsülfaz) | Naglazyme | Mukopolisakkaridoz tip VI (MPS VI; Maroteaux Lamy sendromu) |
| Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) | Neupogen | Nötrofil üretimini uyarmak (örn; kemoterapiden sonra) ve hematopoietik kök hücreleri kemik iliğinden kana mobilize etmek için |
| Doku plazminojen aktivatörü (TPA) | Activase | Kan pıhtılarını çözmek için |
| Dornaz alfa | Pulmozyme | Kistik fibrozis |
| Glukoserebrozidaz | Ceredase | Tip 1 Gaucher hastalığı |
| Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) | Engerix B | Hepatit B virüsüne karşı aşı |
| Folikül uyarıcı hormon (FSH) | Pergonal | Kadınlarda doğurganlık sorunlarını, özellikle anovular ve oligo ovular olan kadınları, tedavi etmek |



Rekombinant DNA teknolojisiyle protein ve hormon üretimine verilebilecek en iyi örnek insülin'dir. İlk defa 1978-1981 yılları arasında rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, tip 1 ve 2 Diyabet tedavisi için insülin üretmeye yönelik adımlar atılmıştır. İlk olarak 1978 yılında, insan insülin hormonunun geni kimyasal olarak sentezlenebilmiştir⁽²⁴⁾. 1979 yılında, bu insülin geni rekombinant DNA teknolojisi ile Escherichia coli bakterisinde ifade edilmiştir⁽²⁵⁾. 1981 yılında ise, Escherichia coli'de ifade edilen insülin hormonunun, insan insülin reseptörleri ile etkileşime geçebildiği ve bu sayede ilaç amaçlı kullanılabilirliği gösterilmiştir⁽²⁶⁾. Bundan sonraki yıllarda ise kullanımı pek çok yerde kabul görmüştür⁽²⁷⁾.

Rekombinant DNA Teknolojisinin Ürolojide Kullanımı

Ürolojik hastalıkların tanı ve tedavisine yönelik yapılan pek çok çalışmada Rekombinant DNA Teknolojisi kullanılmaktadır. Tablo 1'de rekombinant ilaç/aşı örnekleri geniş bir yelpazede gösterilmiştir. Bu geniş alanlar içinde üroloji de yer almaktadır.

Ayrıca üroloji alanında rekombinant hormon üretimi çalışmalarıyla başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde insan folikül uyarıcı hormonunun (FSH) in vitro üretimi mümkün olmuştur. Foliküler gelişimin uyarıldığı üremeye yardımcı tedavi uygulamaları, rekombinant DNA teknolojisinin bir başarısıdır. Çok sayıda hasta rekombinant FSH ile tedavi edilmektedir. Dahası, rekombinant FSH ve Luteinize edici Hormon (LH) rekombinasyonu, yumurtlamayı ve hamilelik şansını arttırmak için başarılı hale getirilmiştir⁽²⁸⁾.

Ayrıca üroloji alanında gen tedavisi uygulamaları da kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Üroloji alanında gen tedavisinin uygulanması kanser tedavisi ile sınırlı değildir, aynı zamanda kansere bağlı olmayan mesane disfonksiyonları ve erektil disfonksiyon (ED) için de gen tedavi stratejileri kullanılmaktadır⁽²⁹⁾.

Mesane kanserine yönelik efektif bir gen tedavi uygulaması tasarlamak için, *histo-*

loji, histolojik derecelendirme ve hastalığın yayılımı gibi faktörler dikkate alınmalıdır. Vektör sistemlerinin seçimi, uygulama şekli ve doku seçici gen ekspresyonu ihtiyacı bu faktörlere göre dikkatle seçilmelidir. En önemli faktör ise *hastalığın yayılımıdır*. Yüzeysel tümörler transüretal instilasyona uğrayabilir ve vektörlerin tümörle temas süresi kateter blokajıyla uzatılabilir. Mesane, idrar bileşenlerine karşı antiaderan bir glikosaminoglikan (GAG) tabakası ile korunduğundan, mesane duvarına yeterli penetrasyon sağlamak için, viral vektörlerin aşılmasından önce bu katmanın geçirgenleştirilmesi (örneğin etanolla) gerekmektedir⁽³⁰⁾. Öte yandan metastatik hastalık daha zorlayıcı bir sistemik tedavi gerektirir, çünkü intravezikal olarak aşılınmış vektörler yeterince emilemez veya metastatik bölgelere iletilemezler. Dolayısıyla doku seçici gen ekspresyonunda özellikle *metastatik dokunun seçilimi* önem kazanmaktadır⁽³¹⁾.

Mesane kanseri gen tedavisinde başlıca tedavi stratejileri; *düzeltilici, indükleyici ve sitotoksik stratejilerdir*.

Düzeltilici Gen Tedavisi: Kanser için düzeltilici gen tedavisi, metastatik hastalığa neden olan büyüme kontrol yollarının kaybını önlemek, yavaşlatmak veya tersine çevirmek için kullanılan preneoplastik veya neoplastik hücrelerdeki genlerin ku-

surlu kopyalarının replasmanını veya inaktivasyonunu içerir⁽³²⁾. Düzeltilici stratejiler, tümör hücrelerinde sınırsız hücre bölünmesini, organ infiltrasyonunu veya metastazı durdurarak, mutasyona uğramış bir genin fizyolojik işlevini geri kazanmaya çalışır⁽³¹⁾. Düzeltilici gen tedavisinde, hastalıklı dokudaki hücrelere normal (yabani tip) bir genin sokulmasıyla hastalığın patofizyolojik ilerlemesinin önlenmesine veya tersine çevrilmesine yönelik adımlar atılmaktadır⁽³¹⁾ (Şekil 5A).

Genitoüriner kanserlerin oluşabilmesi için en az dört ila altı genetik değişimin gerekli olduğu öngörülmektedir. Bu genetik değişimler; nokta mutasyonları, DNA sekansı delesyonları, kromozomal translokasyonlar, amplifikasyonlar veya DNA'daki metilasyon değişikliklerinden kaynaklı gen ekspresyonundaki değişimlerdir. Genitoüriner kanser tipleri farklı histolojik özelliklere sahip olduğundan, genetik değişiklikler de tümör tipine özgü olabilir. Örneğin, mesane kanserinde kromozom 9 üzerinde p53 mutasyonu görülme sıklığı yüksekken, metastatik prostat kanser hücrelerinde kromozom 16 üzerinde daha az yaygın olan bir p53 mutasyonu vardır. Renal hücreli karsinom ise, kromozom 3 üzerinde bir tümör baskılayıcı gen olan von Hippel-Lindau (VHL) genine sahiptir⁽³¹⁾ (Tablo 2).

Tablo 2: Ürolojik Kanserlerde Genomik Değişiklikler: Düzeltilici Gen Tedavisinde Potansiyel Hedefler

| Tümör Tipi | Genomik Lokus |
|------------------------|------------------------------------------------------------|
| Mesane kanseri | P53 geni |
| Prostat kanseri | HPC geni Glutasyon S Transferaz-Pi (GST-Pi) P53 geni |
| Renal hücreli karsinom | VHL geni |
| Wilms tümörü | WT-1 geni WT-2 geni ✓ |

✓ *Düzeltilici Stratejiler*; Büyüme inhibisyonu, Metastaz inhibisyonu, Ekspresyon kontrolü, Gen defektlerinin tamiri ⁽³¹⁾ (Şekil 6).

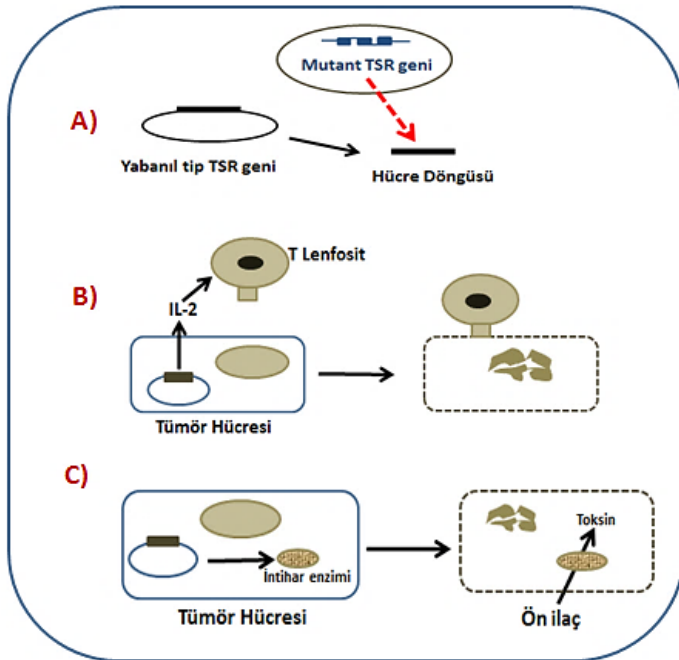
İndükleyici Gen Tedavisi: Mesane tümörüne karşı zayıf bir bağışıklık yanıtı artırır ya da bir tetikleyiciyi harekete geçirir. Bunun için, mesane tümörü hücreleri IL-2 gibi bir

immün modüle edici sitokin genle trans-fekte edilir ve hastalara aşılamayla tekrar verilir. Ayrıca, bağışıklık sistemi hücreleri daha “güçlü” bağışıklık yanıtı oluşturmak için transfekte edilebilir ⁽³¹⁾ (Şekil 5B).

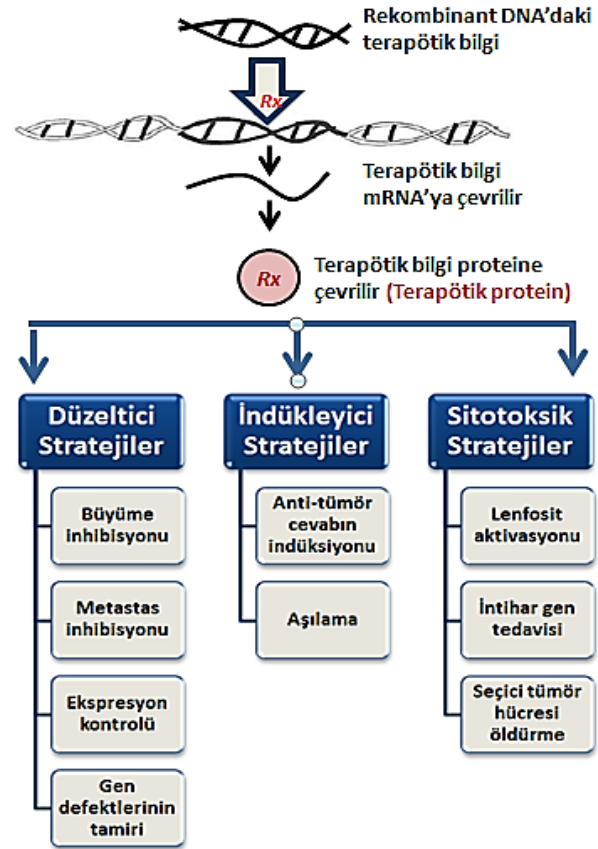
✓ İndükleyici Stratejiler; Anti-tümör cevabın indüksiyonu, aşılama ⁽³¹⁾ (Şekil 6).

Sitotoksik Gen Tedavisi: Bu tedavi, iyi huylu dokuyu korurken tümör hücrelerinin seçici olarak öldürülmesine izin verir. Tümör hücreleri, toksik olmayan ön ilaçları sitotoksik maddelere dönüştüren enzimlerle transdükte edilir ⁽³¹⁾ (Şekil 5C).

✓ Sitotoksik stratejiler; Lenfosit aktivasyonu, intihar gen tedavisi, seçici tümör hücresi öldürme ⁽³¹⁾ (Şekil 6).



Şekil 5: Mesane kanseri için düzeltici (A), indükleyici (B), sitotoksik (C) gen tedavisi örnekleri ⁽³¹⁾.



Şekil 6: Mesane kanseri gen tedavisinde başlıca tedavi stratejileri ⁽³¹⁻³²⁾.

Sonuç

Hastalıkların tedavisinde en çok tercih edilen yöntemler ilaç kullanımı ve cerrahi müdahalelerdir. Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde ise hastalığın prognozu iyileştirilerek yaşam süresi ve kalitesi arttırılmaktadır. Moleküler yaklaşımlarla hastalığa yol açan etkenler belirlenerek, hedefe yönelik tedavi süreci izlenmektedir.

Kullandığımız vektörlerle istediğimiz onarıcı geni istediğimiz yere yerleştirerek burada çoğalmasını sağlayabiliyoruz. Aynı zamanda istenilmeyen özellikler de kesip çıkartılabiliyor. Bir nevi **moleküler cerrahi** de diyebiliriz rekombinant DNA teknolojisine. Günümüze kadar pek çok çalışmada, rekombinant DNA teknolojisi kullanılmış ve

bu sayede farklı ve etkili teröpatik stratejiler geliştirilmiştir. Hastalıkların tanı ve tedavisinde hayati bir role sahip olan bu teknoloji kümülatif bir gelişim göstermektedir. Pek çok hormonun, ilacın ve aşının üretiminde kullanılan rekombinant DNA teknolojisi, gün geçtikçe daha efektif bir yöntem olma yolunda sağlam adımlarla ilerlemektedir.



Kaynaklar

1. Shinde SA, Chavhan SA, Sapkal SB, Shrikhande VN. Recombinant DNA Technology and its Applications: A Review. *International Journal of MediPharm Research*. 2018;4(2):79-88.
2. Pray L (2008). Recombinant DNA technology and transgenic animals. *Nature Education*, 1(1): 51.
3. AddGene. What is a Plasmid? AddGene at <https://blog.addgene.org/plasmids-101-what-is-a-plasmid>
4. Soydemir E, Aksoy ZB. 2017. Rekombinant DNA Teknolojisi ve Günümüzdeki Kullanımı. *Güncel Gastroenteroloji* 21(1): 14-17.
5. Stryjewska A, Kiepur K, Librowski T, Lochyński S. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacol Rep*. 2013;65(5):1075-85.
6. Khan S, Ullah MW, Siddique R, Nabi G, Manan S, Yousaf M, Hou H. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *Int J Genomics*. 2016;2016:2405954.
7. Cederbaum, SD, Fareed, GC, Lovett, MA, Shapiro, LJ. Recombinant DNA in medicine. *West. J. Med*. 1984 Aug;141(2):210-22.
8. Niri NM, Memarnejadian A, Hadjati J, et al. Construction and Production of Foxp3- Fc (IgG) DNA Vaccine / Fusion Protein. *Med. Biotechnol*. Apr-Jun 2016;8(2):57-64.
9. <http://www.sdplatform.com/Yazilar/Kose-Yazilari/122/Gen-tedavisinin-dunubugunu-ve-yarini.aspx>
10. Blaese RM, Culver K.W, Miller AD, et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science* 1995 Oct 20;270(5235):475-80.
11. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaldler K, et al. Insertional Mutagenesis Combined With Acquired Somatic Mutations Causes Leukemogenesis Following Gene Therapy of SCID-X1 Patients. *J Clin Invest*. 2008 Sep;118(9):3143-50.
12. Aiuti A, Vai S, Mortellaro A, et al. Immune Reconstitution in ADA-SCID After PBL Gene Therapy and Discontinuation of Enzyme Replacement. *Nat Med*. 2002 May;8(5):423-5.
13. Montini E, Biffi A, Calabria A, et al. Integration site analysis in a clinical trial of lentiviral vector based haematopoietic stem cell gene therapy for meatchromatic leukodystrophy, *Human GeneTherapy*. 2012.vol. 23, articleA13.
14. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol*. 2011 Mar 1;29(7):917-24.
15. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaldler K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med*. 2006 Apr;12(4):401-9.
16. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EV11 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med*. 2010 Feb;16(2):198-204.
17. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—an update. *J Gene Med*. 2013 Feb;15(2):65-77.
18. Zhang J, Tarbet EB, Toro H, et al. Adenovirusvectored drug-vaccine duo as a potential driver for conferring mass protection against infectious diseases. *Expert Rev Vaccines*. 2011 Nov;10(11):1539-52
19. Lam P, Khan G, Stripecke R, et al. The innovative evolution of cancer gene and cellular therapies. *Cancer Gene Ther*. 2013 Mar;20(3):141-9.
20. Rostami-Hodjegan A, Tucker GT. Simulation and prediction of in vivo drugmetabolism in human populations from in vitro data. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Feb;6(2):140-8.
21. Jackwood MW, Hickie L, Kapil S, et al. Vaccine development using recombinant DNA technology. *Counc. Agric. Sci. Technol*. Issue Pap. 7, 1–11 (2008).
22. McAleer, Buynak EB, Maigetter RZ, et al. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*. 1984 Jan 12-18;307(5947):178-80.
23. Zajac BA, West DJ, McAleer WJ, et al. Overview of Clinical Studies With Hepatitis B Vaccine Made by Recombinant DNA. *J Infect*. 1986 Jul;13 Suppl A:39-45.
24. Crea R, Kraszewski A, Hirose T, et al. Chemical synthesis of genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Dec; 75(12): 5765–5769.
25. Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, et al. Expression in Escherichia Coli of Chemically Synthesized Genes for Human Insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Jan;76(1):106-10.
26. Keefer LM, Piron M, De Meyts P. Human Insulin Prepared by Recombinant DNA Techniques and Native Human Insulin Interact Identically With Insulin Receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Mar;78(3):1391-5.
27. Johnson IS. Human Insulin From Recombinant DNA Technology. *Science*. 1983 Feb 11;219(4585):632-7.
28. Assidi M, Dufort I, Ali A, et al. Identification of Potential Markers of Oocyte Competence Expressed in Bovine Cumulus Cells Matured With Follicle-Stimulating Hormone and/or Phorbol Myristate Acetate in Vitro. *Biol Reprod*. 2008 Aug;79(2):209-22.
29. Mahendran Ratha, Tham Sin Mun and Esuvaranathan Kesavan (2011). Gene Therapy in Urology. In Chunsheng Kang (Eds.), *Gene Therapy Applications* (pp. 243–262). DOI: 10.5772/22235. eBook (PDF) ISBN: 978-953-51-6453-1.
30. Engler H, Anderson SC, Macherer TR, et al. Ethanol Improves Adenovirus-Mediated Gene Transfer and Expression to the Bladder Epithelium of Rodents. *Urology*. 1999 May;53(5):1049-53.
31. Ardelt P, Böhle A. Molecular Aspects of Bladder Cancer IV: GeneTherapy of Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2002 Apr;41(4):372-80; discussion 380-1.
32. Simons JW, Marshall FF. The Future of Gene Therapy in the Treatment of Urologic Malignancies. *Urol Clin North Am*. 1998 Feb;25(1):23-38.



Sorular

- Gen ekspresyonunu incelemek için en yararlı olan aşağıdaki tekniklerden hangisidir?
 - Northern blot
 - Southern blot
 - Western blot
 - Eastern blot
 - Kromatografi
- ELISA için aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır?
 - Antijen- antikor oluşumuna dayanan immunolojik temelli bir yöntemdir
 - Bir örnek içerisindeki antijen veya antikorları tespit edebilir
 - Enzim-substrat etkileşimi sonucu oluşan renk değişimi gözlemlenir
 - Spektrofotometrik olarak kantitatif tayin yapılır
 - Antijen-antikor etkileşimi kovalent bağlar ile gerçekleşir ve geri dönüşümsüzdür
- Aşağıdaki epigenetik mekanizmalardan hangisi kodlanmayan RNA'lara ait epigenetik mekanizmalara dahil değildir?
 - lncRNA
 - ADP-ribosilasyon
 - piRNA
 - psödogenler
 - ncRNA
- Rekombinant DNA teknolojisi için aşağıdakilerden hangisi yanlıştır?
 - Bitki DNA'sı bakteriyel DNA'ya birleştirilebilir
 - İnsan DNA'sı mantar DNA'sı ile birleştirilebilir
 - DNA'nın kimyasal senteziyle normalde hiçbir yerde oluşmayan DNA dizileri oluşturulabilir ve rekombinant moleküllere dahil edilebilirler
 - Plazmidler, bakteri kromozomunun dışında, halkasal ve tek zincirli DNA molekülleridir
 - rDNA'nın konakçı hücreye giriş sürecine transformasyon denir
- Aşağıdakilerden hangisi biyolojik örneklerden gerçekleştirilecek analiz çalışmalarında Sıvı Kromatografik yöntemlerin seçilmesinin sebeplerinden biri değildir?
 - Birden fazla molekülü analiz edebilmesi
 - Güvenirliliği ve tekrarlanabilirliği yüksek sonuçlar vermesi
 - Gelişmiş sistemlerle kısa sürede çok sayıda örnek ile çalışma imkanı olması
 - Analizi yapılacak tek bir moleküle spesifik ve duyarlı olması
 - Çok farklı biyolojik örneklerde, çok küçük miktarlardaki molekülleri analiz edebilmesi
- RT-PCR ile ilgili aşağıda verilen bilgilerden hangisi yanlıştır?
 - Floresan oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğalma yöntemidir
 - Floresan işaretli prob ve boyalar kullanılır
 - Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması aynı cihaz içinde ve aynı tüp içinde gerçekleştirilebilmektedir
 - En son elektroforez aşaması ile çoğalan hedef bölge PCR lar görünür hale gelirler
 - Analiz tüpleri açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır
- Aşağıdakilerden hangisi Western Blotlama evrelerinden biri değildir?
 - Örnek hazırlanması
 - Spesifik Restriksiyon enzimleri ile örneklerin kesilmesi
 - Örneklerin jelde yürütülmesi ve Membrana transfer- Blotlama
 - Nonspesifik antikor bağlama bölgelerinin bloke edilmesi
 - Antikorla inkübasyon ve dedeksiyon
- Akan hücre ölçer ile CD3, CD4, CD8, CD19, CD16,CD56 sonuçlarını içeren immünoprofilinden hangi hücre hakkında bilgi edinilemez?
 - T hücre oranları
 - B hücre oranları
 - NK hücre oranları
 - NKT hücre oranları
 - Bazofil hücre oranları
- Hücre kültürü temel teknikleri ile ilgili aşağıda verilen ifadelerden hangisi yanlıştır?
 - Hücre kültürü uygulamalarında takip edilmesi gereken konular; besiyeri, optimum sıcaklık, pH, O₂ ve CO₂ yoğunluğudur
 - İçerikleri tam olarak paylaşılmayan serumlar hücreler üzerinde farklı etkiler gösterebileceğinden bazı laboratuvarlar serum kullanmamayı tercih etmektedir
 - Adherent hücre kültüründe besiyeri değişimi, tutunamayan hücrelerin elenerek uzaklaştırılması açısından da oldukça önemlidir
 - Hücre dondurma ve hücre çözme işlemlerinde maksimum verim için hücreler kryoprotektanlar kullanılarak dondurulur
 - Hücreler morfolojik özelliklerine göre iki tiptedir; fibroblastik hücreler ve epitelyal hücreler
- Hangisi Polimeraz zincir reaksiyonu yönteminde uygun primer tasarımında önemli noktalardan biri değildir?
 - Guanin-Sitozin yüzdesi yaklaşık %50 olmalıdır
 - İleri ve geri primerler arasındaki erime sıcaklığı farkı en fazla 5°C olmalıdır
 - Primerin 3' ucunda G ya da C bazının bulunması gerekir
 - Primer uzunluğu 18-22 nükleotid olan primerler seçilmelidir
 - Baz tekrarı dörtten fazla olmalıdır