Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi 2018;28(1):1-6
doi:10.5222/terh.2018.001

Derleme

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ve onkolojik araştırmalardaki önemi

Comparative genomic hybridization and its importance in oncological research

Hülya TOSUN YILDIRIM[1], Gülden DİNİZ[2], Safiye AKTAŞ[3]

[1]Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, Antalya, Türkiye
[2]Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, İzmir, Türkiye
[3]Dokuz Eylül Üniversitesi, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZ

Genetik değişiklikler kanser hücrelerinin önemli bir özelliğidir ve genellikle kanser patogenezine katkıda bulunan biyolojik süreçleri ve yolları hedefler. Bu genetik değişikliklerin saptanması hastaların tanı ve tedavisinin yönetiminde artan öneme sahiptir. Çeşitli çözünürlük düzeylerinde genomik değişimi değerlendiren iki önemli yöntem vardır. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği ve onunla ilişkili Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KGH), gendeki değişikliğin veya genomdaki daha büyük değişikliklerin saptanmasını sağlar. KGH, 2 DNA örneği- test ve kontrol örneği- arasındaki kopya sayısındaki değişiklikleri karşılaştıran ve ölçen bir FISH tekniğidir ve ayrıca kazanılmış veya kaybedilmiş kromozomal bölgelerin bir haritasını çıkarır. Daha da önemlisi, KGH analizleri, tümör progresyonu, tedavi yanıtı veya prognozu ile ilişkili olan, spesifik genetik değişikliğin doğru tanımlanmasına olanak tanır. Bu teknikler ile karsinogenezde önemli rol oynayan daha önce bilinmeyen genetik değişiklikler ve genlerin saptanmasında yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Bu derlemede, onkolojik araştırmalardaki KGH'nin önemi tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KGH), onkolojik araştırma, önemi

ABSTRACT

Genetic alterations are key features of cancer cells and generally target biological processes and pathways that contribute to cancer pathogenesis. Detection of these genetic alterations has an increasingly important role in determining patient diagnosis and care.There are two major product platforms that assess genomic alterations at various levels of resolution. Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH) techniques and related technology of Comparative Genomic Hybridisation (CGH) allow detection of genetic variations or larger alterations in the genome. CGH is a type of FISH technique that compares and measures differences in copy number changes between 2 DNA samples (the test and control samples) and also provides mapping of chromosomal regions that are gained or lost. More importantly, CGH analyses have allowed highly accurate localization of specific genetic alterations that, for example, are associated with tumor progression, therapy response or prognosis. The techniques have proven to be useful for identification of previously unknown genetic changes and genes that play an important role in tumor carcinogenesis. In this article, the importance of CGH in oncological research has been discussed.

Key words: Comparative Genomic Hybridisation (CGH), oncological research, importance

Alındığı tarih: 08.06.2017
Kabul tarihi: 13.09.2017

Yazışma adresi: Uzm. Dr. Hülya Tosun Yıldırım, 1258 Sokak Vizyon Park Konutları 1. Kat, Daire 4, Uncalı - Antalya - Türkiye
e-mail: drhulyatosun@gmail.com

GİRİŞ

DNA, genetik talimatları taşıyan nükleik aisttir ve tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gereklidir. DNA, sarmal şeklinde 6 milyon nükleotid içeren sıkıca paketlenmiş 22 çift otozomal ve bir çift cinsiyet kromozomu 23 çift yani 46 kromozomdan (46XX veya 46XY) oluşmuştur. Nukleotid dizisindeki herhangi bir nedenle meydana gelen ve kalıtsal olan değişikliklere "mutasyon" denir [1].

Mutasyonlar, amplifikasyon, delesyon, translokasyon, interstisyel delesyon, inversiyon ve heterozigosite kaybı gibi büyük ölçekli veya nokta mutasyonu, insersiyon ve delesyon gibi küçük ölçekli olabilir. Bu mutasyonlar sıklıkla DNA'ya zarar verebilen birtakım kimyasal maddelerin veya virüslerin ya da X-ışınları-mor ötesi ışınların neden olduğu ve ender olarak da hücre bölünmesi sırasındaki hatalar ile ortaya çıkar. Oluşan bu mutasyonlar, yararlı, etkisiz ve zararlı olabilir ki mutasyonların büyük bir kısmı, hücre içinde DNA'nın kendi kendini onarmasını sağlayan mekanizmalar ile yok edilir. Mutasyonun hücre bölünmesindeki kontrol mekanizmasını ortadan kaldırması, hücre genomunda ard arda gelen mutasyonların ya da epigenetik değişikliklerin birikimi ile kanser ortaya çıkar ve özetle bir hücrede kanser gelişimi çok basamaklı (multi-step) bir olaydır [1].

Anöploidi, delesyonlar ve diğer kromozomal yeniden düzenlemeler gibi DNA'daki kopya sayı değişikliklerine bağlı onkogenlerin artışı, tümör supresör genlerdeki azalma, apopitozis genlerinde inhibisyona bağlı olarak kanser gelişir. Bu genomik değişiklikler, normal hücrelerin anormal hücrelere geçişinde kantitatif, açık ve temel değişikliklerdir [2]. Bu genetik değişikliklerin saptanması, hastanın tanı ve tedavi bakımından önemli olduğu kadar, sonraki nesillerde gelişimini ve oluşmasını önlemek açısından da önemlidir [3].

Günümüzde kanser çok önemli bir hastalıklar grubudur ve bu hastalıkta özgü kromozom anomalilerinin saptanmasında sitogenetik analizler büyük bir öneme sahiptir. Klasik sitogenetik ve moleküler sitogenetik metodlar hastalıkların tanısı, prognozu ve son yıllarda sıklıkla kullanılan hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde klinik tanı ve tedaviye büyük destek sağlamaktadır [1,4,5].

Genetik Tanı Yöntemleri

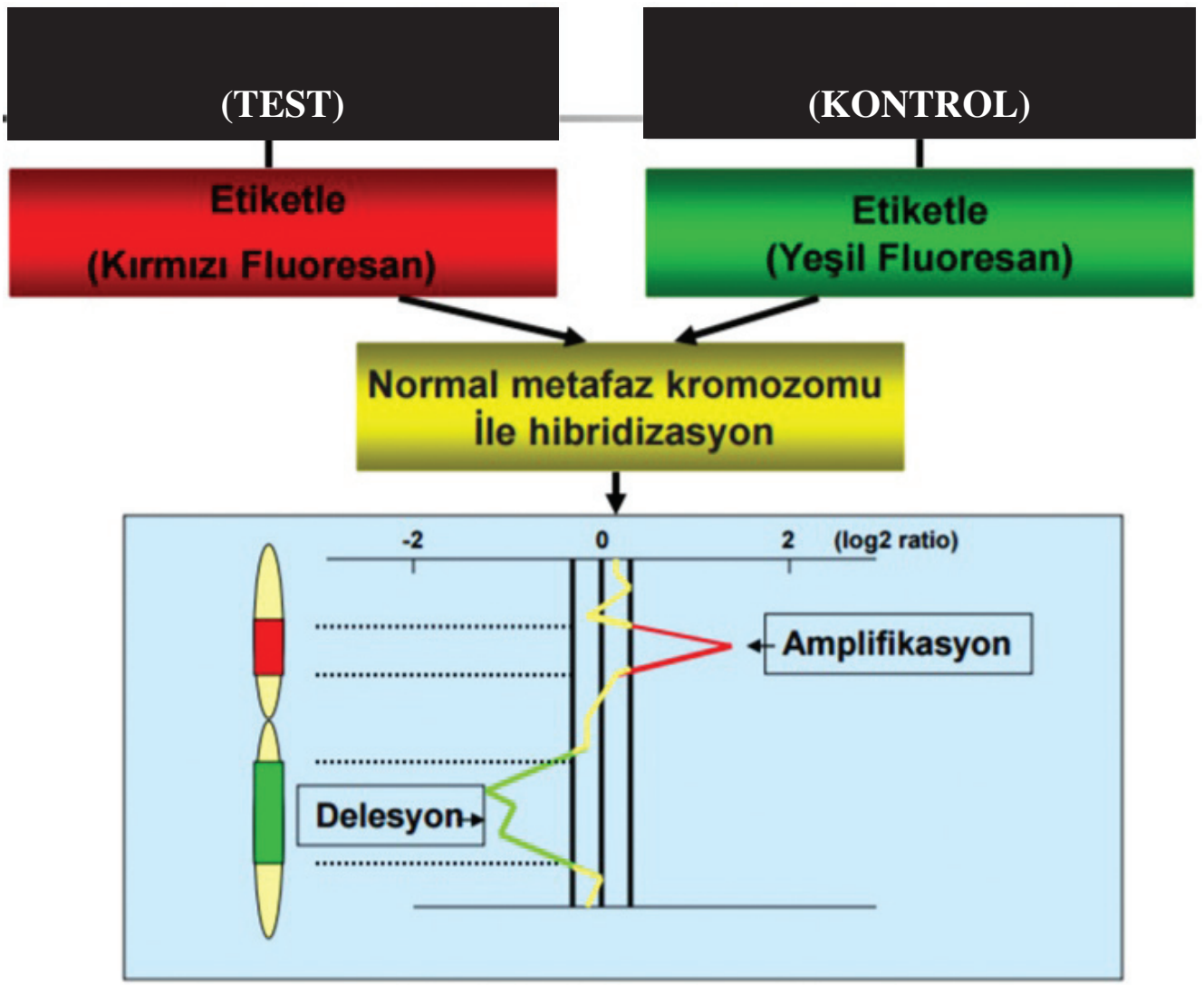
Genetik tanı yöntemleri temelde iki başlık altında incelenebilir. İlki, sitogenetik tanı yöntemleri ile kromozom hücresel düzeyde incelenebilmektedir. Bu metotta DNA'daki kromozom sayısı ve yapısı incelenir. Diğeri moleküler sitogenetik tanı yöntemi, sitogenetik tekniklerin ve moleküler biyolojinin birlikte kullanıldığı ve kromozom analizlerinin tanı değerini arttıran bir yöntemdir. Bu yöntem, klasik sitogenetik yöntemler ile saptanamayan mutasyonların renkli DNA probları kullanılarak tanımlanmasını sağlayan efektif ve hızlı yöntemleri içermektedir. Günümüzde moleküler sitogenetik yöntemlerin temelinde FISH bulunmaktadır [3].

FISH, moleküler ve sitogenetik teknikleri bir araya getiren bir yöntemdir. Bu teknikte, Prob adı verilen özel DNA veya RNA dizileri kullanılarak kromozom üzerinde görüntülenmesi hedeflenen DNA dizileri belirlenebilmektedir. DNA probları mikroskop lamına fikse edilmiş kromozomların içerdiği DNA ile hibridize olma yeteneğine sahiptir. Bu teknik "in situ hibridizasyon" olarak tanımlanmaktadır. Bu yönteme in situ denmesinin nedeni DNA'nın iki iplikli halde lam üzerinde denatüre olmasıdır. Bu denatürasyon durumu işaretli bir probun DNA ile hibridize olmasına olanak vermektedir. FISH tekniğinde, problarda işaretleyici olarak fluoresan boya kullanıldığı için "fluoresan situ hibridizasyon" denilmektedir. Fluoresan işaretli prob hibridize olduğunda kromozomlar floresan boyadan yayılan ışığın belirli bir dalga boyunda absorblanması ile görünür hale gelirler. Bu hibridizasyon sinyalinin ve bu prob ile hibridize olan DNA segmentinin lokalizasyonu daha sonra mikroskop altında değerlendirilir. Gen veya lokusa spesifik probla belirli bir genin varlığı, yokluğu veya lokalizasyonu saptanabilir [3-5].

FISH'de dahil olmak üzere klasik sitogenetik

yöntemlerin, kanser sitogenetiğinde karşılaşılan mutasyonları saptamada yetersiz kalması yeni yöntem arayışlarını beraberinde getirmiştir. Sitogenetik ve moleküler genetik tekniklerin birleşimi olan KGH bu sorunun ortadan kalkmasını sağlamıştır [3]. Kallioniemi ve ark tarafından uygulamaya sokulan KGH yöntemi ile DNA dizisindeki kopya sayısı değişimleri (amplifikasyon ve delesyon) değerlendirilebilmiştir [6-8].

KHG tekniği, temeli FISH'e dayanan, farklı floresan boya ile boyanmış test (hasta) ve referans DNA örneklerinin normal kromozomlara bağlanması ile elde edilen floresan renk farklılıklarını gösteren sitogenetik bir yöntemdir. Bu yöntem ile (a) Standart tekniklerle saptanması olası olmayan yapısal kromozom anomaliler daha güvenilir saptanabilir, (b) En az iki genomun birbiri ile karşılaştırılmasına olanak sağlar, (c) Tek bir deneyde tüm genomu analiz etmeye olanak tanır, (d) Sitogenetik analiz için yeterli metafaz elde edilemeyen tümörlerin incelenebilmesi için kullanılabilir, (e) taze ve donmuş dokulara uygulanabilir. Bu tekniğin sınırlılıkları da mevcuttur. Bunlar heterojen doku veya hücre popülasyonu ile çalışılması, standardizasyonun zorluğu, dolayısıyla incelemeyi ve araştırmayı yalnızca alanında uzman kişilerin yapabilmesidir [3,6,9].



Resim 1. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemi.

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon Yöntemi

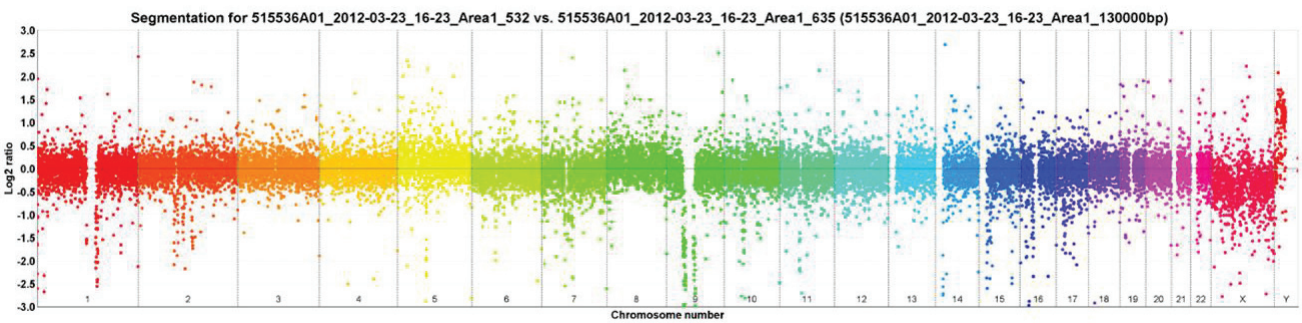
KGH için analiz edilecek DNA (test DNA'sı) ile normal DNA (kontrol DNA'sı) farklı florokromlarla işaretlenir ve normal hücrelerden elde edilen metafaz kromozomları ile hibridize edilir. Referans metafaz alanındaki kromozomlar boyunca floresan yoğunluklarındaki farklılıklar, tümör DNA'sındaki kopya sayısı değişiklikleri (amplifikasyonlar veya delesyonlar) anlamına gelir. Farklı floresan fenotipi gösteren DNA'lar normal metafaz kromozomları ile hibridize oldukları zaman birbiri ile örtüşüyorsa, mavi-turuncu bir renkte izlenir. Eğer test DNA'sında bir delesyon söz konusu olursa bu bölgede hibridizasyon gerçekleşmez, dolayısıyla bölge kırmızı renkte izlenir. Buna karşılık DNA'da bir amplifikasyon varsa, bu bölgede hibridizasyon daha yoğun olduğu için bölge diğer bölgelerden daha parlak yeşil olarak izlenir (Resim 1). Görüntü analiz sisteminin programıyla bilgisayarda hibridizasyon oranlarına göre kromozom hibridizasyon profilleri hesaplanabilir (Resim 2). Tarayıcıda taranan görüntü bilgisayar ortamına aktarılır, çeşitli programlar ile verilerin analizi yapılır [6,7,10].

Özetle KGH analizindeki adımlar şunları içerir: Doku kontaminasyonunu önlemek için dikkatli stereoskopik mikrodiseksiyon, DNA elde edilmesi, DNA işaretlemesi, mikroarray hibridizasyon, mikroarray görüntüleme ve özel yazılım ile verilerin analizi. Bu taranan ham verilerden özet grafik gösterimi oluşturulur ya da bu konuda eğitim almış patolog da bu ham verileri analiz edip değerlendirebilir. Bu ham verilerin değerlendirilmesi, küçük genomik değişikliklerin kesin yerini onaylamak için yararlıdır ayrıca gen füzyonunu taramak ve füzyon eşini belirlemek için de kullanılabilir [7,10].

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon ve Onkolojik Araştırmalardaki Önemi

KGH, yeni ve geniş bir moleküler sitogenetik analiz olup, tanı konulamayan birçok olguda kromozomal hastalığın tanımlanmasına olanak sağlar. Özellikle prenatal tanıda da kullanılabilen bu tetkikler ile mental retardasyon ve otizme neden olan spesifik kromozom değişiklikleri tek bir panel kullanılarak incelenebilmektedir. Ayrıca, çok fazla sayıda hastalığı içine alan nöromuskuler hastalık grupları ve doğumsal metabolik hastalık grupları için de bu yöntem kullanılabilmektedir [7,12].

KGH yöntemi ile temelde tümöre neden olan spesifik genetik değişiklik ya da daha önce tanımlanmş o tümöre özgü bilinen karakteristik genetik anomalilerdeki değişiklik paterni ile tümör progresyonu veya hasta sağkalımı üzerine ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Hematolojik kanserlerde dahil olmak üzere bir solid tümörde çok farklı noktalarda gözlenebilen genetik değişimler saptanabilmektedir [2,7]. Son yıllarda kanserlerde KGH yönteminin kullanıldığı çok sayıda çalışma yayınlanmıştır ve esas itibariyle birçok kanser ve o kanserlerden üretilen hücre hatlarındaki kromozomal değişiklikler detaylı olarak incelenmişir. Ayrıca bu yöntem, premalign veya in situ lezyonlar, invaziv kanserler ve metastatik kanserler gibi tümörün farklı gelişim aşamalarını temsil eden tümör örneklerinin karşılaştırılması ile tümör progresyonu sırasında DNA



Resim 2. Bir olguda tüm kromozomların tek panel gökkuşağı tarzında görünümü.

kopya sayısındaki artan değişiklikler gösterilebilmiştir [13].

Natrajan ve ark.'nın [14] Wilms tümöründe KGH yöntemi ile genomik değişiklikleri inceledikleri bir çalışmada, Wilms tümöründe kromozomal sapmanın sayısındaki artış ile tümör progresyonu ve relaps arasında ilişki bulunmuştur. Ek olarak spesifik genetik değişiklik 17p kaybının, tümör progresyonuyla bağlantılı ve bu anomalinin olasılıkla tümör gelişiminde son basamak olduğu saptanmıştır.

Pankreasın asiner hücreli karsinomları tedavi seçeneklerinin çok sınırlı olduğu ve klinik açıdan agresif neoplazilerdir. Bu kanserlerde tümörün oluşmasının ve progresyonunun moleküler mekanizması yanısıra kanserin prekürsör lezyonu tanımlanamamıştır. Bergmann'ın pankreasın asiner hücreli karsinomlarında KGH yöntemi ile kanser gelişimini aydınlatmaya çalıştığı çalışmada, daha önce pankreas duktal adenokarsinomundan ve nöroendokrin neoplazilerinden farklı stabil mikrosatellit ve unstabil kromozomal genotip ile karakterli yineleyen kromozomal dengesizlik saptanmıştır [15].

Meme ve kolorektal kanserler gibi yaygın ve sık görülen tümörler yanı sıra daha ender görülen gastrointestinal stromal tümör, insulinomlar ve ependimomlarda KGH yöntemi ile tüm genom analizi yapılmıştır. Bu çalışmalar, çeşitli tümör tiplerinde DNA kopya sayısı değişikliklerinin ayrıntılı ve detaylı incelenmesine olanak tanımış ve kanser gelişiminde meydana gelen kopya sayısı değişiklikleri hakkında zengin bilgiler sağlamıştır. Özellikle daha önce belirtilmemiş bazı özel bölgelerde gen amplifikasyonları ve delesyonları belirlenmiştir [7,8].

Strefford ve ark.'nın [11] renal solid kitlelerde histolojik tanı ile FISH ve KGH yöntemini karşılaştırdıkları bir çalışmada, KGH yönteminin malign ve benign renal kitlelerin histolojik alt tip sınıflamasında FISH'dan daha iyi korelasyon gösterdiğini saptamışlardır. Biyopsi örneklerinden doğru tanı koymak üzere genetik incelemenin eklenmesi tümörün doğru sınıflandırılması yanı sıra tümörün biyolojik davranışının tahmin edilebilmesi ve ileride tedavi planlarına etkisi açısından çok önemlidir.

SONUÇ

Onkolojik araştırmalarda, moleküler sitogenetik yöntemlerin nihai hedefi, kanserle ilişkili genlerin yerlerini olabildiğince kesin olarak belirlemektir. Böylelikle KGH yöntemi ile elde edilen veriler, bu sapmaların içerdiği genlerin tanımlanması ve belirlenmesi kusursuz bir başlangıç noktası sağlar. Bununla birlikte, KGH yönteminin yalnızca o kromozom bölgesindeki amplifikasyonu veya delesyonu işaret ettiğini ve varsayılan genlerin hastalık patogenezine gerçek katkısının olup olmadığının ispatı için fonksiyonel analizler gereklidir. KGH çalışmalarından elde edilen veriler, kansere bağlı genetik sapmalar hakkındaki bilgilerimize önemli katkı sağlamakta ve KGH teknolojisinin hala kanser araştırmalarında önemli bir araç olarak işlev görmeye devam ettiğini göstermektedir. Yapılan araştırmalar ve elde edilen datalar ile amaç, karsinogeneziste hedef genlerin tespiti ile kanser oluşumunun engellenmesi ve oluşan kanserde hedefe yönelik tedavi ile olguların sağ kalımının arttırılmasıdır.

KAYNAKLAR

1. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A, Martin KC. Molecular cell biology, 2016, Eighth edition, W. H. Freeman and Company, USA
2. Kallioniemi A. CGH microarrays and cancer. Curr Opin Biotechnol. 2008;19(1):36-40. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.11.004
3. King W, Proffitt J, Morrison L, Piper J, Lane D, Seelig S. The role of fluorescence in situ hybridization technologies in molecular diagnostics and disease management. Mol Diagn. 2000;5(4):309-19. https://doi.org/10.2165/00066982-200005040-00009
4. Kallioniemi A, Visakorpi T, Karhu R, Pinkel D, Kallioniemi OP. Gene Copy Number Analysis by Fluorescence in Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization Methods. 1996;9(1):113-21.
5. Watters AD, Bartlett JM. Fluorescence in situ hybridization in paraffin tissue sections. Mol Biotechnol. 2002;21(3):217-20. https://doi.org/10.1385/MB:21:3:217
6. Chiyan Lau, 2016, Molecular Pathology in Cancer Research, Lakhani SR, Fox SB (Editors), Springer, New York, U.S.A. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6643-1
7. Hester SD, Reid L, Nowak N, Jones WD, Parker JS, Knudtson K, Ward W, Tiesman J, Denslow ND. Comparison of comparative genomic hybridization technologies across microarray platforms. J Biomol Tech. 2009;20(2):135-51.
8. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridiza-

tion for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science. 1992;258(5083):818-21. https://doi.org/10.1126/science.1359641
9. Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, Kallioniemi A, Christensen B, Lundsteen C, Philip J. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. Am J Hum Genet. 1995;57(5):1211-20.
10. Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. Cytometry. 1995;19(1):10-26. https://doi.org/10.1002/cyto.990190104
11. Strefford JC, Stasevich I, Lane TM, Lu YJ, Oliver T, Young BD. A combination of molecular cytogenetic analyses reveals complex genetic alterations in conventional renal cell carcinoma. Cancer Genet Cytogenet. 2005;159(1):1-9. https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2004.09.020
12. Szczałuba K, Demkow U. Array comparative genomic hybridization and genomic sequencing in the diagnostics of the causes of congenital anomalies. J Appl Genet. 2017;58(2):185-98. https://doi.org/10.1007/s13353-016-0376-z
13. Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, Sorlie T, Hernandez-Boussard T, Lonning PE, Tibshirani R, et al. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. Gene Chromosome Canc. 2006;45:1033-40. https://doi.org/10.1002/gcc.20366
14. Natrajan R, Little SE, Sodha N, Reis-Filho JS, Mackay A, Fenwick K, Ashworth A, et al. Analysis by array CGH of genomic changes associated with the progression or relapse of Wilms' tumour. J Pathol. 2007;211:52-9. https://doi.org/10.1002/path.2087
15. Bergmann F. Pancreatic acinar neoplasms: Comparative molecular characterization. Pathologe. 2016;37:191-5. https://doi.org/10.1007/s00292-016-0235-z