

# Üronkolojide kullanılan temel moleküler yöntemler

## Basic molecular methods used in urooncology

Dr. Bora İrer<sup>1</sup>, Dr. Güven Aslan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> İzmir Büyükşehir Belediyesi Eşrefpaşa Hastanesi, Üroloji Kliniği, İzmir

<sup>2</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, İzmir

### ÖZET

Prostat kanseri ve mesane başta olmak üzere diğer üriner sistem tümörlerinin görülme sıklığı giderek artmaktadır. Bu sebeple yeni tümör belirteçlerine ve non-invaziv tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır ve yeni tedavi yöntemlerini ortaya çıkarmak için genetik faktörler araştırılmaya başlanmıştır. Kanser etiopatogenezinde genetik faktörlerin rolünü anlamak için moleküler yöntemlerin kullanıldığı birçok bilimsel çalışma literatürde yer almaktadır. Bu derlemede üronkolojide kullanılan temel moleküler yöntemler kısaca gözden geçirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Üronkoloji, moleküler metodlar

İletişim (✉): borairer@yahoo.com

### ABSTRACT

Incidences of prostate cancer and other urological cancers particularly bladder cancer have increased in recent years. For this reason requirement for new tumor markers and non invasive diagnostic tools has raised and genetic factors for tumor pathogenesis have been studied to reveal new therapeutic methods. Many studies that used molecular methods took place in the literature to explain genetic factors for cancer etiopathogenesis. Basic molecular methods that are used in urooncology are reviewed in this paper.

**Key words:** Urooncology, molecular methods

**H**em dünyada hem de ülkemizde en yaygın sağlık sorunlarının başında gelen kanserler, her dört ölümden bir tanesine sebep olmaktadır. 2013 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde 1,660,290 yeni kanser olgusu belirlenmiş, 580,350 kanserden ölüm meydana gelmiştir. Prostat kanseri 238,590 yeni olgu ile 1. sırada bulunmaktadır. Üriner sistem kanserlerinde yeni olgu sayısının toplamı 140,430 olarak belirtilmiş ve bunların içinde mesane tümörleri 72,570 olgu ile ilk sırada yer almıştır (1).

Günümüzde kanser etiolojisinde genetik faktörlerin önemli bir yer kapladığı ortaya konmuş ve preventif ve küratif tedavi stratejileri bu özelliklere göre planlanmaya başlanmıştır (2). Kanser tanısının cerrahi olarak çıkarılan ya da biyopsi sonucu ile elde edilen dokunun histopatolojik olarak incelenmesi sonrası konuyor olması, araştırmacıları noninvaziv tanı tekniklerine ve yeni tümör belirteçlerini ortaya çıkarmaya yönlendirmektedir (2). Bu amaçla, medikal onkoloji ve urooncolojide yapılan bilimsel çalışmalarda moleküler yöntemler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Teknolojinin de ilerlemesiyle doku ve gen bankaları kurulmuş gen ekspresyonu veritabanları bilimsel çalışmacıların hizmetine sunulmuştur (3, 4).

Bu derlemede moleküler çalışmaların temelini oluşturan hücre kültürlerinden ve dokulardan RNA, DNA ve Protein elde edilme

*“Araştırılan genin hücresel ya da dokusal düzeyde DNA ekspresyonunu göstermek için PCR, protein ekspresyonunu göstermek için Western blot yöntemleri kullanılır.”*

yöntemleri ile polimer zincir reaksiyonu (PCR) ve Western blot gibi temel moleküler yöntemler gözden geçirilmiştir. Araştırılan genin hücresel ya da dokusal düzeyde DNA ekspresyonunu göstermek için PCR, protein ekspresyonunu göstermek için Western blot yöntemleri kullanılır. Bu temel moleküler çalışmalarda kaliteli ve doğru sonuçlar alındıktan sonra bir sonraki moleküler yöntemler olan, Hücrelere gen transfeksiyonu, İmmunofluoresans mikroskopisi ve İmmunohistokimya çalışmalarına, Hücrelere gen transfeksiyonlarına ve bu hücrelerde Live Cell İmaging sistemleri kullanılarak proteinlerin sentezlendiği anın ve hücrede görev yaptığı organellere hareketinin canlı gözlemlenmesi gibi ileri moleküler çalışmalara, hücre kültürlerinde ilaç uygulamaları sonrasında gen ya da protein ekspresyonunun nasıl ve hangi aşamada etkilendiğini gösteren zorluk derecesi artmış PCR ve Western blot çalışmalarına, apoptozis çalışmalarına geçilebilir.

*“Sürekli hücre kültürlerinin daha hızlı büyüme hızları ve daha yüksek klonlanma yetileri ve daha çeşitli kromozom komponentleri vardır. Sonsuz çoğalma yeteneği olan tek tip hücrelerden oluşurlar. genellikle kanser dokularından ya da epitel hücrelerinden elde edilmişlerdir.”*

## Hücre kültürleri ve dokulardan RNA, DNA ve protein sentezi

Hücre kültürleri elde edilmiş yöntemine göre ya primer hücre kültürleri ya da sürekli hücre kültürleri olarak ikiye ayrılır.

### Primer hücre kültürleri

Primer hücre kültürleri dokulardan izole edilir. Birden fazla hücre tipini örneğin fibroblastları ve epitel hücrelerini bir arada içerebilir. Primer hücre kültürü elde etmek için doku alındıktan hemen sonra ya bir besiyerinin içine konur ya da daha sonra kullanılmak üzere genellikle sıvı nitrojen içinde dondurulup -180 C derecede saklanır. Dokular enzimatik veya mekanik yöntemlerle parçalanarak hücre kültürleri için uygun sıvı besiyerlerinde 37 C derecede inkübe edilirler. Dokulardan elde edilen primer hücre kültürlerinin çoğalma yeteneği sınırlıdır. Pasajlandıkça özelliklerini kaybetme eğilimindedirler.

### Sürekli hücre kültürleri

Sürekli hücre kültürlerinin daha hızlı büyüme hızları ve daha yüksek klonlanma yetileri ve daha çeşitli kromozom komponentleri vardır. Sonsuz çoğalma yeteneği olan tek tip hücrelerden oluşurlar. genellikle kanser dokularından ya da epitel hücrelerinden elde edilmişlerdir. Üroonkolojide prostat, mesane ve böbrek kanseriyle ilgili çalışmalarda kullanılan ve American Type Cell Culture (ATCC) den elde edilebilecek sürekli hücre hatlarından bazıları sırasıyla LNCaP, DU145 ve PC-3, T24, RT24,

RT112, HB-CLS ve ECV-304, A-498, CaKi-1, RC-124 olarak örneklendirilmiştir (5, 6).

İster primer hücre kültürü olsun ister sürekli hücre kültürü olsun, tüm hücre kültürü çalışmaları laminar flow kabinler içinde, çevreden gelebilecek bakteri ve virüs kontaminasyonuna karşı gerekli önlemler alınarak yapılmalıdır. Hücre kültürü çalışmalarında en sık karşılaşılan sorun bakteri kontaminasyonudur. Bu sebeple kontaminasyonu önlemek için hücre kültürlerinin sıvı ortamlarına antibiyotik eklenmesi faydalı olmaktadır. Kontaminasyon engellenemez ise bu kontaminasyona sebep olan bakteri veya virüsün RNA veya proteinleri yapılan PCR ve Western blot analizlerinde hatalı sonuçların çıkmasına neden olur.

### RNA, DNA ve Protein elde edilmesi:

Hücre kültürlerinden veya dokulardan RNA elde etmek için en sık kullanılan kimyasal ajan TRizol'dür. Doku yada hücrelerin üzerine eklenen trizol lizise sebep olur ve bu lizata eklenen kloroform-izopropanol ile, uygulanan santrifüj sonrası RNA çöktürülür. Ethonol ile çözülen RNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemlerle ölçülür (Ref 3,4). Bu RNA dan cDNA sentezi kitleri kullanılarak tek zincirli cDNA elde edilir. Elde edilen cDNA'lar RT-PCR da araştırılacak genin primer DNA sekanslarıyla birlikte gen ekspresyonunu belirlemek için kalıp olarak kullanılır. RNA çok hızlı bir şekilde denatüre olabileceğinden ve elde edilen RNA miktarları genellikle çok düşük olduğundan protokollerin tüm aşamaları buz üstünde çalışılmalıdır (7, 8).

Protein eldesi için ilk aşama hücrelerin veya dokunun mekanik olarak parçalanmasıdır. Hücre kültürlerinin içinde bulunduğu pasajlama plaklarından sıvı besiyerleri aspirasyonla uzaklaştırılır. Hücreler buldukları plaktan kazanarak, dokular ise seramik bir havanda sıvı nitrojen ile dondurulduktan sonra ezilerek protein eldesi için hazır hale getirilirler. Parçalama işlemi uygulanmış doku yada hücrelere içinde proteaz inhibitörleri bulunan lizis buffer eklenir ve santirifüj işlemi uygulanır. Dipte kalan hücre ve doku artıklarının üstündeki sıvı kısım ayrı bir tüpe alınır ve spektrofotometrik olarak protein konsantrasyonu ölçülür. (REF5). Protein eldesi işleminde deneratürasyondan korunmak için protokollerin tüm basamaklarında tüpler buz içinde olmalı ve aşamalar +4 C derecelik soğuk odalarda yapılmalıdır (8).

### Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ile gen ekspresyonu ölçümü

RNA dan elde edilen cDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı qRT-PCR için ekspresyonu araştırılacak genin primerleri (5' ve 3' DNA kalıpları) DNA polimeraz enzimi, dNTP(nükleotid)ler gerekmektedir.(ref 3, 4) Web'te <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> adresi kullanılarak genin DNA'sının primer DNA sekansları hazırlanır ve önerilen tek zincirli DNA parçaları firmalara sentezletirilir.

cDNA'lar PCR öncesi 50 C derecede 2 dakika ve 95 C derecede 10 dakika ısıtılır. Reel-Time PCR cihazında aşamalar genellikle 50 siklus üzerinden, her siklus 15 saniye 95 C derecede denatürasyon ve 1 dakika 60 C derecede annealing ve extension olacak şekilde kurulur. Reaksiyon sonlandığında çeşitli bilgisayar programları kullanılarak örneklerin gen ekspresyon düzeyleri quantitative olarak hesaplanır. Ayrıca PCR ürünleri genellikle agaroz jel üzerinde elektroforezle ayrıştırılır. Hedef genin moleküler ağırlığına göre jel üzerindeki yeri semi-quantitative olarak belirlenir (8, 9).

### RT-PCR'da dikkat edilmesi gereken anahtar noktalar

Elde edilen RNA'nın ve sentezlenen cDNA'nın çalıştığı kontrolü için genelde GAPDH gibi Housekeeping genler kullanılır.

Kullanılan protokollerin basamakları atlanmadan uygulanmalıdır.

Mikrolitre düzeyinde ölçülerle çalışıldığı için otomatik pipetler kalibre edilmelidir.

Tüm aşamalar buz üstünde yapılmalıdır.

DNA kontaminasyonunu önlemek için eldiven mutlaka takılmalıdır.

RT-PCR sonuçları iyi analiz edilmeli ve sonuç alınmadıysa, PCR sikluslarının sayısı ve süreleri değiştirilmelidir. Tekrar sonuç alınmaması durumunda araştırılacak gen için yeni primerler sentezlenerek yeniden RT-PCR kurulmalıdır.

Araştırılacak gen için birden çok primer sipariş etmek zaman kaybedilmesini önlemek açısından faydalıdır.

Deneyler sık tekrarlanmalı, sabırlı ve titiz çalışılmalıdır.

### Western Blot ile protein ekspresyonu ölçümü

Western Blot yöntemi için doku veya hücre kültürü örneklerinden elde edilen proteinler, primer antikor olarak araştırılacak proteine

*“...araştırılan genin DNA ve Protein ekspresyonu için öncelikle hücre kültürlerinde çalışmak, PCR için primerlerin ve Western blot için antikörlerin çalıştığından emin olup, araştırılan genin ve proteinin özelliklerine iyice aşına olduktan sonra doku çalışmalarına geçilmesi önerilir.”*

spesifik antikor, sekonder antikor, protein işaretleme, yüklem solüsyonları ve poliacrilamid jel gerekmektedir. Bu yöntem elektroforez, transfer ve immunblot aşamalarından oluşmaktadır. Poliacrilamid Jel Elektroforez (PAGE) aşamasında proteinler moleküler ağırlıklarına göre jel üzerinden geçen elektrik akımı sayesinde ayrıştırılırlar. Ayrıştırılan proteinler transfer solüsyonları ile elektrik akımı kullanılarak PVDF membrana transfer edilirler ve daha sonra önce primer antikörle sonra sekonder antikörle immunblot işlemi yapılır. Membran üzerindeki protein antikör ilişkisini göstermek için kemilüminisans maddeler kullanılarak filme aktarılan spesifik sinyal ve X-Ray cihazları ile görüntülenir (8, 10).

### Western Blot yönteminde dikkat edilmesi gereken anahtar noktalar

Protein konsantrasyonları doğru ölçülmelidir.

Primer antikörün çalıştığından ve western blot için uygunluğundan emin olunmalıdır.

Elektroforez tanklarında ve transfer tanklarında uygun elektrik akımı ve voltajı kullanılmalıdır.

Yıkama solüsyonları doğru hazırlanmalı ve yıkama sürelerine uyulmalıdır.

Negatif ve pozitif kontroller mutlaka kullanılmalıdır.

Protokollerin tüm aşamaları, proteinlerin denatürasyonunu önlemek için buz üstünde ve +4C derecede yapılmalıdır.

Eğer sinyal alınamıyorsa, protein eldesinde sorun olabilir veya protein konsantrasyonu ölçümü yanlış yapılmış olabilir. Uygun antikor seçilmemiş antijen antikör ilişkisinde uyumsuzluk veya PVDF membrana transfer gerçekleşmemiş, uygun yıkama sürelerine uyulmamış olabilir. Elektroforez işleminde yeteri kadar süre beklenmez ise hücre veya dokunun yapısındaki tüm proteinler birbirlerinden yeteri kadar ayrılamazlar ve araştırılan protein net seçilemez. Gereğinden fazla konsantrasyonda primer ve sekonder antikor kullanıldıysa, uygun yıkama süresine uyulmıyorsa arka fonda kirlilik nedeniyle zayıf sinyal alınabilir. Farklı moleküller ağırlıklı protein bantlarında işaretlenme varsa uygun sıcaklıkta (+4 C derecede) çalışılmadığından veya çok yüksek voltajda elektroforez yapıldığından dolayı proteinler denatüre olmuş, parçalanmış olabilir ve yeniden protein eldesi gerekebilir (8, 10).

Dokular hücre kültürlerine göre daha kompleks protein ve DNA yapılarına sahiptirler. Aranılan genin DNA'sı ve Proteinini dokulardan elde edilen toplam RNA ve Proteinin içinde orantısal olarak hücre kültürlerinden elde edilenlere göre daha azdır. Bu sebeple

araştırılan genin DNA ve Protein ekspresyonu için öncelikle hücre kültürlerinde çalışmak, PCR için primerlerin ve Western blot için antikörlerin çalıştığından emin olup, araştırılan genin ve proteinin özelliklerine iyice aşına olduktan sonra doku çalışmalarına geçilmesi önerilir. Hatta bu amaçla doku çalışmalarında hücre kültürleri çalışmalarını pozitif kontrol olarak kullanılır. Örneğin androjen yanıtı maksimum düzeyde olan LNCaP hücrelerinden elde edilen proteinlerin, androjen uygulamasıyla sekresyonu artan bir proteinin prostat dokularında ekspresyonu araştırılırken pozitif kontrol olarak kullanılması faydalı olabilir. Son yıllarda uygulamaya giren Lazer Mikrodiseksiyon yöntemleriyle mikroskobik olarak doku kesitlerinden hedef alanlar (örnek kanser alanları) direkt ayrılıp bu örneklerden RNA ve Protein elde edilerek daha kaliteli sonuçlar alınabilir (11).

### Sonuç

Moleküler yöntemlerin kullanıldığı bilimsel çalışmalar onkolojide ve üroonkolojide giderek artmakta ve moleküler yöntemlerin ise teknolojinin ilerlemesiyle karmaşık hale gelip zorluk derecesi artmaktadır. Ülkemizde ise klinisyen araştırmacılar tarafında moleküler yöntemlerin kullanıldığı bilimsel çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Bazı klinikler kendi moleküler laboratuvarlarını kurmaya ve bir çok uzmanlık öğrencisi tez çalışmasında bu yöntemleri kullanmaya başlamıştır. Bu derleme yazısı ile moleküler yöntemleri kullanarak literatüre katkı yapmak isteyen akademisyenlere yardımcı olmak istenmiş ve bu amaçla Hücre ve doku kültürleri, RNA, DNA ve protein sentezi, RT-PCR ve Western blot yöntemleri hakkında kısa hatırlatmalar yapılmıştır.

### Kaynaklar

1. Siegel R, Jemal A, Naishadham D. Cancer Statistics, 2013. Ca Cancer J Clin 2013;63(1):11-30.
2. Urquidi V, Rosser C J, Goodison S. Molecular Diagnostic Trends in Urological Cancer: Biomarkers for Non-Invasive Diagnosis. Curr Med Chem 2012; 19(22): 3653-63.
3. Reis ST, Feitosa EB, Pontes J. Tumor Banks: The Cornerstone of Basic Research in Urology. International Braz J Urol 2010; 36(3): 348-54.
4. Pascal LE, Deutsch EW, Campbell DS. The urologic epithelial stem cell database (UESC) - a web tool for cell type-specific gene expression and immunohistochemistry images of the prostate and bladder. BMC Urology 2007; 7:19.
5. Sobel RE, Sadar MD. Cell Lines Used in Prostate Cancer Research: A Compendium of Old and New Lines - Part 1 and 2. J Urol 2005;173(2):342-59.
6. Philips BJ, Coyle CH, Morrisroe SN. Induction of Apoptosis in Human Bladder Cancer Cells By Green Tea Catechins. Biomed Res 2009; 30(4): 207-15.
7. Byler TK, Leocadio D, Shapiro O. Valproic Acid Decreases Urothelial Cancer Cell Proliferation and Induces Thrombospondin-1 Expression. BMC Urology 2012; 12: 21.
8. Irer B, Toylu A, Aslan G. Increased Expression of NKX3.1 in Benign Prostatic Hyperplasia. Urology 2009; 73 (5):1140-4
9. Erickson HS, Albert PS, Gillespie JW. Quantitative RT-PCR Gene Expression Analysis of Laser Microdissected Tissue Samples. Nat Protoc 2009; 4(6):902-22.
10. Mahmood T, Yang PC. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. N Am J Med Sci 2012; 4(9):429-34.
11. Leiva IM, Emmert-Buck MR, Gillespie JW. Handling of Clinical Tissue Specimens for Molecular Profiling Studies. Curr Issues Mol Biol 2003;5(2):27-35.