



Kemik İliği Nakli Uygulanan Hastalarda DNA Fingerprinting Yöntemiyle Kimerizm Tesbiti

Determination of Chimerism in the Bone Marrow Transplant Patients by Using DNA Fingerprinting

Yeşim İLÇÖL¹Bülent İLÇÖL²Yavuz TAGA¹

Özet

İnsan DNA'sında genomun %70 kadarı tek kopya geri kalan %20-30'u ise tekrarlayan dizilerden oluşmuştur. Büyük ölçüde tekrarlayan diziler birkaç baz çiftinden oluşan motifleri içeren mikrosatellitler ve daha uzun birimleri içeren minisatellitlerdir. İnsan genomunda yer alan bu tekrarlamalı dizilerden oluşturulmuş probler kullanılarak birçok ileri derecede değişken bölge eşzamanlı olarak tanımlanabilmiş ve kişiye özgül DNA Fingerprint analizi gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada kemik iliği nakli uygulanan hastalardan nakil öncesi ve sonrası ve vericilerden elde edilen DNA'lar, Hinf I ve Alu I restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra Southern blot yöntemiyle membrana aktarıldı. 5'ucundan Digoksinin'le işaretlenmiş basit tekrar problemleriyle hibritleştirildi. 12 hastadan 3 tanesinde (%25) graft rejeksiyonu ve relapsta önemli bir risk faktörü olabileceği söylenen karışık kimerizmin gelişmiş olduğu, diğerlerinin tam kimerik oldukları tesbit edildi.

Anahtar kelimeler: DNA Fingerprinting, Southern blot, kemik iliği nakli.

Abstract

Human genomic DNA is composed of approximately 70% single copy and 20-30% repetitive sequences. Highly repetitive sequences are microsatellites which contain longer units. Many hypervariable regions are detected simultaneously using probes composed of these repetitive sequences in human genom and an individual-specific DNA

Fingerprint analysis is performed.

In this study the DNA samples from bone marrow transplantation patients obtained before and after the procedure and from the donors were digested with restriction endonucleases Hinf I and Alu I. The resulting products were transferred to membranes Southern blotting and hybridized simple repeat probes which were labeled at their 5'ends with digoxigenin. Mixed chimerism which is assumed to be an important risk factor in predicting graft rejection and relapse was detected in three of twelve (25%) bone marrow transplants. The others were complete chimerics.

Key words: DNA Fingerprinting, Southern blotting, bone marrow transplantation.

GİRİŞ

İnsan genomunda ileri derecede polimorfik bölgelerin bulunduğu, bu bölgelerin küçük motiflerin birbiri ardınca tekrarlarından oluştuğunu ve değişkenliğin tekrarların sayısındaki farklılıktan kaynaklandığı bildirilmiştir (1). Jeffreys ve ark. 1985 yılında myoglobin geninde 33 bç'lik bir dizinin dört kez tekrar ettiğini ve bu bölgeden elde edilen problemlerle insan genomunda bulunan pek çok değişken sayıdaki ardışık tekrarların eşzamanlı olarak tanımlanabileceğini göstermişlerdir (2). Southern

1 Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.
2 Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı

blotlarda bu multilokal problemlerle ileri derecede kompleks ve kişiye özgül yapılar meydana getirilmiş, bunlar DNA Fingerprinting olarak adlandırılmışlardır (3). Yapısal özelliklerinden dolayı tekrarlamalı diziler içeren bu bölgeler minisatellitler (4), değişken sayıda ardışık tekrarlar (5) olarak adlandırılmışlardır. Minisatellitlerden daha kısa, birkaç baz çiftinden oluşan, tekrarlayan motifler içeren lokuslar mikrosatellitler ya da basit dizi tekrarları olarak adlandırılmışlardır (6).

DNA Fingerprinting tekniği adli tıpta kimlik tesbitinde (7), ikizlerin tek veya çift yumurta ikizi olmalarının belirlenmesinde (8), akrabalık ve babalık tayininde (9), enfeksiyonlarda etken patojenlerin tanımlanmasında (10,11), türler arası polimorfizmin belirlenmesinde (12), Huntington hastalığı, Duchenne kas distrofisi gibi birçok kalıtsal hastalıktan sorumlu genleri lokalize etmeye yarayan bağlantı analizlerinde (13) ve kemik iliği nakli hastalarının izlenmesinde kullanılmaktadır (14).

DNA Fingerprinting kemik iliği nakli sonrası hemopoetik kimerizmin ortaya konulmasında çok yararlı bir genetik belirleyici tekniktir. Nakil sonrası hem kendisinin hem de vericisinin hücrelerini taşıyan hastada karışık kimerizm, sadece vericisinin hücrelerini taşıyan hastada tam kimerizm gelişmiştir.

DNA analizinin az sayıda bölünmeyen çekirdekli hücre kullanılarak yapılabilmesi Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RPUP) analizinin kuvvetli bir engraftment işaretleyicisi olmasını sağlar (15). Relaps ve rejeksiyonun önemli bir belirteci olabileceği söylenen karışık kimerizmin, DNA Fingerprinting analiziyle belirlenmesi son derece özgül ve duyarlı bir yöntemdir. Ayrıca relaps olan hastalarda lösemik hücrelerin kökeninin belirlenmesinde de kullanılabilir (16).

GEREÇ VE YÖNTEM

Kemik iliği nakli ünitesinde izlenen 12 hastanın 6 tanesinde AML, 4 tanesinde KML, 2 tanesinde ALL nedeniyle kemik iliği nakli uygulanmıştır. Hastaların 4'ü erkek, 8'i kadın, yaşları 17-39 arasında de-

ğişmektedir. Hastaların 7'sine karşı cinsten kardeşinden nakil yapılmıştır.

Hastalardan nakil öncesi (nakilden 1 hafta önce) ve sonrası (nakilden 3 hafta sonra) ve vericilerden içinde 0,1 ml 0,5 M EDTA (ph:8.0) bulunan tüplere 10 ml kan alındı ve DNA'ları elde edildi (17). DNA saflığı ve miktarı spektrofotometrik olarak tespit edildi (18). Elde edilen DNA'lar RPUP analizleri yapılabilmek için -20°C'de bekletildiler. Elde edilen DNA'nın 10 µg'ı Hinf I yada Alu I enzimleri ile 37°C'de 4 saat inkübasyon ile kesildi. Örnekler 1xTAE elektroforez tamponu içinde (0.8'lik agaroz gelde 20 Volt, 30 mA'de 16 saat yürütüldü. Gel elektroforez sonunda ethidium bromid ile boyandı ve UV ışını altında gözlemlendi. Naylon membrana transfer edilecek DNA'ları içeren gel parçası 15 dk depürinasyon, 30 dk denatürasyon solusyonunda bekletildi. DNA Southern transfer yöntemiyle gelden membrana aktarıldı. Membran transfer sonrası oda ısısında kurutulduktan sonra 2 saat 80°C'lik etüvde bekletilerek DNA'nın naylon membrana bağlanması sağlandı.

Naylon membran özgül olmayan bağlanmaları önleyici özelliği olan bloke edici madde içeren 6xSSC içinde ve oda ısısında 1 saat bekletildikten sonra (CAC)5 probu için 40°C'de, (GACA)4 probu için 38°C'de ön hibritleştirme tamponu ile inkübe edildi. En az 1 saat süren ön hibritleştirmeden sonra, membran 4 saat aynı ısıda hibritleştirme tamponu ile inkübe edildi. Bu şekilde işaretli prob DNA iplikçisinde komplemanter olduğu bölgeye hibridizasyon aşamasında bağlandıktan sonra, özgül olmayan antikor bağlanmalarını önlemek için bloke edici madde içeren 6xSSC içerisinde ve oda ısısında 1 saat bekletildi. Yıkama tamponu ile 10 dk yıkandıktan sonra alkalen fosfatla konjuge olmuş antidigoksinin antikorunu aynı tampon içerisinde 1:5000 oranında eklendi ve membran bunun içerisinde 15 dk bekletildi. Fazla antikorlar yıkama tamponu ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Membran 0.33 mg/ml NBT(nitroblue tetrazolyum tuzu) ve 0.17 mg/ml BCIP (5-bromo-4 kloro-3- indolil fosfat) ilavesinden sonra gece boyu bekletildi ve 12 saat sonra mavi mor hibrit moleküllerinin oluşumu gözlemlendi.



BULGULAR

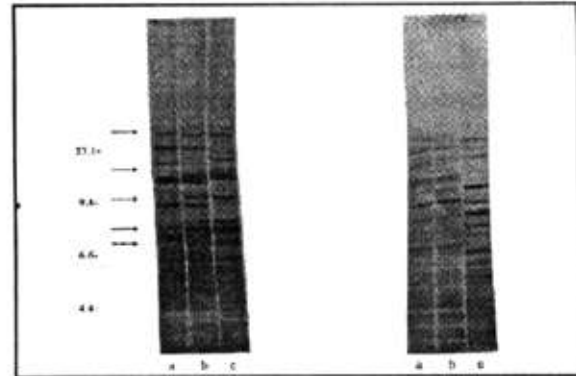
12 hasta ve vericisinde (CAC)5 ve (GACA)4 problemleriyle hibridizasyon sonrası oluşan ortalama polimorfik band sayısı hesaplandı (Tablo 1). Hastaların çeşitli özelliklerine göre dağılımları Tablo 2'de, hematolojik özellikleri Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 1. 12 hasta ve vericisinde (CAC)5 ve (GACA)4 problemleriyle hibridizasyon sonrası oluşan bantlar

Prob	Restriksiyon Enzimi	Bir kişide oluşan ortalama polimorfik band sayısı
(CAC)5	Alu I	15.5
	Hinf I	14.2
(GACA)4	Alu I	3.4
	Hinf I	3.1

(CAC)5 ve (GACA)4 basit tekrar problemlerinin naylon membrana aktarılan DNA ile hibritleştirilmesi neticesi renk reaksiyonu ile oluşan profiller incelendi. Nakil sonrası alıcının profilinin vericinininkiyle tamamen aynı olması tam kimerizm, tamamen aynı olmaması ve

alıcının nakil öncesi bantlarının bir kısmının nakil sonrası profilde görülmesi karışık kimerizm olarak değerlendirildi. Hastaların 3 tanesinde karışık kimerizm geliştiği (%25) (Resim 1), diğerlerinin ise tam kimerik oldukları belirlendi (Resim 2).



Resim 1. Karışık kimerizm.

Vericinin (a), hastanın nakil sonrası (b) ve hastanın nakil öncesi (c) DNAlarının, Alu I ile kesiminden elde edilen parçaların (CAC)5 probu ile hibridleştirilmesinin renk reaksiyonu ile görülmesi. (Alıcı-verici farklılığını gösteren bantlar okla gösterilmiştir.)

Resim 2. Tam kimerizm.

Vericinin (a), hastanın nakil sonrası (b) ve hastanın nakil öncesi (c) DNAlarının, Hinf I ile kesiminden elde edilen parçaların (CAC)5 probu ile hibridleştirilmesinin renk reaksiyonu ile görülmesi.

Tablo 2. Hastaların çeşitli özelliklerine göre dağılımları

	Toplam	Karışık kimerizm	Tam kimerizm
Hasta sayısı	12	3	9
Median yaş	25	27	24
Yaş aralığı	17-39	17-36	18-39
Hastanın cinsiyeti			
Kadın	8	2	6
Erkek	4	1	3
Vericinin cinsiyeti			
Kadın	5	1	4
Erkek	7	2	5
Verici/alıcı cinsiyet uyumu			
Kadın / Kadın	3	1	2
Erkek / Erkek	2	1	1
Kadın / Erkek	2	0	2
Erkek / Kadın	5	1	4
Hastalık			
Akut myeloid lösemi (AML)	6	2	4
Kronik myeloid lösemi (KML)	4	1	3
Akut lenfoblastik lösemi (ALL)	2	0	2

Tablo 3. Hastaların çeşitli hematolojik özellikleri

	Kadın Hastalar	Erkek Hastalar
Lökosit (/µl)	0.7-2.4x10 ³	0.9-3.1x10 ³
Eritrosit (/µl)	2.01-3.68x10 ⁶	1.8-4.0x10 ⁶
Hemoglobin (g/dl)	6.5-11.8	8.9-13.0
Hematokrit (%)	20-34.1	25.2-38.5
Trombosit (/µl)	13-110	2-98

Kullandığımız yöntemin karışık kimerizmi belirleme duyarlılığını saptamak için alıcı DNA'sı verici DNA'sıyla total lökosit DNA'sı içinde %1, %5, %10, %15 ve %25 oranlarında olacak şekilde karıştırıldı. Bu deney sonucunda alıcı DNA'sı total DNA içinde en az %5 oranında bulunduğu zaman karışık kimerizmi belirleyebildiğimizi tesbit ettik.

TARTIŞMA

DNA Fingerprinting tekniği, elde edilen DNA'ların restriksiyon enzimleriyle kesimi, membrana aktarımı, membranın işaretli problarla hibridizasyonu ve oluşan profillerin incelenmesi basamaklarını içermektedir. Meydana getirilen kişiye özgül yapılar bireylerin birbirinden ayrılmasını sağlamaktadır (7).

Kemik iliği nakli hastalarında engraftment kendisini granülosit ve trombosit sayılarındaki artış ve retikülositlerin yeniden ortaya çıkışı ile belli eder. Ortalama engraftment süresi olan 15-20 gün içerisinde hastanın periferinde görülen bu hücrelerin kendisine ya da vericisine ait olduğu karyotipleme, immünoglobülin allotipleri, kırmızı ve beyaz hücre enzimleri, eritrosit hücre antijenleri ile belirlenebilmektedir. Derin lökopeni, transfüzyon bağımlılığı ve şiddetli immunsupresyon özellikle erken nakil sonrası dönemde bu işaretleyicilerin kullanılabilirliğini sınırlayan başlıca etmenlerdir (19). Bu dönemde DNA Fingerprinting yöntemiyle engraftment tesbiti önem taşır.

Alıcı-vericinin aynı cinsten olmadığı olgularda verici ve alıcı hücrelerinin birarada var olması fenomeninin (karışık kimerizm) belirlenmesinde sitogenetik analiz sıklıkla kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda sitogenetik analizle RPUP'lerin duyarlılıkları karşılaştırılmış ve RPUP'lerin nakil sonrası dönemde alıcı hücrelerinin yeniden ortaya çıkışının saptanmasında daha duyarlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır (20).

Yapılan çalışmaların bir kısmında hematolojik kanserler nedeniyle ilik nakli uygulanan ve karışık kimerizm gelişen hastalarda relaps riskinin yüksek

olduğu belirtilirken (20-22), diğer bir kısmında bu sonuç doğrulanmamıştır (23). Alıcı-vericide nadir de olsa noninformatif durumlar olabilmektedir ancak olgularda bu durumlar görülmemiştir. Çalışma grubumuz 12 kemik iliği nakli hastasından oluşan küçük bir grup olmakla birlikte, hastalarımızda belirlediğimiz karışık kimerizm oranı (%25) daha önce yapılan çalışmalarla uyum göstermiştir. İlerki çalışmalarda karışık kimerizm gelişen olguların uzun süre izlenmesinin ve bu dönemlerdeki kimerizm durumlarının değerlendirilmesinin, bu hastalardaki relaps oranının belirlenmesi açısından çok faydalı olacağını düşünmekteyiz.

RPUP'lerin alıcı hücreleri hastanın periferinde %10-25 oranında bulunduğu zaman karışık kimerizmi saptadıklarını bildirenlerin yanısıra, %1-5 oranında bulunduğu saptayabildiğini gösteren çalışmalar da vardır. Çalışmamızda karışık kimerizmi belirleme duyarlılığı incelendi; alıcı DNA'sı %1'den başlayarak artan oranlarda total lökosit DNA'sı içinde verici DNA'sıyla karıştırılarak %5 bulundu. Bu sonuç RPUP'lerin karışık kimerizmi belirleme hassasiyetinin yüksek olduğunu bildiren çalışmalarla aynı görüşü paylaşmaktadır. Karışık kimerizmin relaps riskini arttırdığı tesbit edildiği takdirde kullandığımız yöntemin relaps riski hakkında çok değerli bilgiler vereceğini düşünüyoruz. DNA Fingerprinting'de kullanılan basit dizi tekrar problemlerinden (CAC)5 ile oluşturulan hibridizasyon bandlarının sayısı ve sıklığı diğer problemlere göre daha fazladır (24). Bu proba yapılan daha önceki DNA Fingerprinting deneylerinde çeşitli restriksiyon enzimleriyle DNA'nın kesimi sonrası bu probun 11-16 band oluşturduğu görülmüştür. Daha az polimorfik olan (GACA)4 probu ise (CAC)5 probuna göre daha küçük DNA parçalarını tanımlamaktadır. Çalışmamızda bu proba ile daha önceki çalışmalarda elde edilen band sayılarına yakın bulundu. Çalışmamızda dioksijenin ile işaretli (GACA)4 probunun 2-9 kb'dan daha büyük DNA parçalarını da tanıyabildiğini belirledik.

Kullanılan problemlerin radyoaktif olmayan yön-

temlerle işaretlenmesinin çeşitli avantajları vardır. Daha dayanıklı olmaları, radyoaktivitenin tehlikelerine maruz kalınmaması, sonuçların daha kısa sürede elde edilebilmesi bunlardan birkaçıdır (25). Streptavidinin nitrosellüloz ya da naylon membran antidioksigenin sistemi, yine radyoaktif olmayan biyotin-streptavidin sistemine tercih edilmektedir (26). Bu nedenlerle çalışmamızda radyoaktif olmayan dioksigenin-antidioksigenin sistemi tercih edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Bell G.L., Selby M.J., Rutter W.J. (1982) The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature*, 295, 31-35
- Jeffreys A.J. (1987) Highly variable minisatellites and DNA fingerprints. *Biochem Soc Trans*, 15, 309-315.
- Wong Z., Wilson V., Jeffreys A.J. (1986) Cloning a selected fragment from a human DNA fingerprint : isolation of an extremely polymorphic minisatellite. *Nucleic Acid Res* 14, 4605-4616.
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985) Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 344, 67-73.
- Nakamura Y., Leppert M, O'Connell P. (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235, 1616-1622.
- Edwards A., Hammond H.A., Jin L. (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, 12, 241-253.
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985) Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature*, 316, 76-79.
- Tsongalis G., Wu A.H., Silver H, Ricci A.Jr. (1999) Applications of forensic identity testing in the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol*, 112 (Suppl 1), 93-103.
- Helminen P., Ehnholm C., Lokki M.L. (1988) Application of DNA fingerprints to paternity determinations. *Lancet*, 12, 574-576.
- Sternberg S., Brandsstrom B. (1999) Biochemical fingerprinting and ribotyping of isolates of *Actinobacillus* *Vet Microbiol* 66(1), 53-65.
- Giesendorf A.J., van Belkum A, Koeken A. (1993) Development of species specific DNA probes for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter pylori* by polymerase chain reaction fingerprinting. *J Clin Microbiol*, 31, 1541-1546.
- Zietkewich E., Rafalski A., Labuda D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction. *Genomics*, 20, 176-183.
- Cawood A.H. (1989) DNA fingerprinting. *Clin Chem*, 35 (9), 1832-1837.
- Ugozzoli L., Yam P., Petz L.D. (1991) Amplification by the polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation. *Blood*, 77, 1607-1675.
- Blazar B.R., Orr H.T., Arthur D.C. (1985) Restriction fragment length polymorphism as markers of engraftment in allogeneic marrow transplantation. *Blood*, 12,
- Harano H., Maruta A., Matsozaki M. (1993) Evaluation of chimerism after bone marrow transplantation with single locus minisatellite DNA probes. *Bone Marrow Transplant*, 12, 221-224.
- Jackson DP, Hayden JD, Quirke P. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. In: McPherson MJ, Quirke P, Taylor, editors. *PCR A Practical Approach*. New York: Oxford University Press, (1992): 29-49.
- Downs M, Warner PJ, Turner A. (1998) Optical and electrochemical detection of DNA. *Biomaterials*, 9:66-70.
- Thomas E.D. Harrison's principles of Internal Medicine 12th edition, s 221-224, Oxford University Press, (1991):New York.
- Roy D.C., Tantravahi R., Murray C. (1990) Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: A stable equilibrium. *Blood*, 75, 296-
- Endler G., Greinix H., Winkler K., Mitterbauer G. (1999) Genetic fingerprinting in mouthwashes of patients after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, Jul;24(1):95-98.
- Okamoto R, Harano H, Matsuzaki M. (1995) Predicting relapse of chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation by bcr-abl Mrna



- and DNA fingerprinting. *Am J Clin Pathol* Nov; 104 (5):510-516.
23. Schattenberg A., De Witte T., Salden M. (1989) Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *73*, 1367-1372.
24. Zischler H., Kammerbauer C., Studer R. (1991) Oligonucleotide fingerprinting with (CAC)₅: Nonradioactive in-gel hibridizasyon and isolation of individual hyper-variable loci *Electrophoresis*, 12, 141-146.
25. Schreiner T., Prochnow- Calzia H., Maccari B. (1996) Chimerism analysis after allogeneic bone marrow transplantation with nonradioactive RFLP and PCR-AFLP using the same DNA. *J Immunol Methods* Sep 13;196(1):93-96.
26. Zischler H., Nanda I., Schafer R. (1989) Digoxigeninated oligonucleotide probes specific for simple repeats in DNA fingerprinting and hybridization in situ. *Hum Genet*, 82, 227-233.