

Moleküler Tanıda Yüksek Çözünürlüklü Erime Yöntemi ve Klinik Önemi

High Resolution Melting Method in Molecular Diagnostics and Their Clinical Importance

Ebubekir Dirican, Mustafa Akkiprik

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Öz

Her geçen gün moleküler biyoloji alanında teknolojinin gelişmesiyle paralel, birçok yeni moleküler analiz yöntemleri ortaya çıkmaktadır. Biz de bu derlemede, moleküler tanıda önemli olduğu gösterilmiş olan Yüksek Çözünürlüklü Erime (High Resolution Melting) (HRM) analizini, uygulama alanlarını ve klinikte yapılmış çalışmalarla önemini anlatmayı amaçladık. HRM kapalı tüp sisteminde, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR: PCR) sonrasında dayalı genetik varyasyonları belirlemek için kullanılan yeni bir yöntemdir. HRM'nin çalışma prensibi nükleik asit örneklerinin erime davranışına dayanmaktadır. Çift zincirli DNA'nın denatürasyonu erime sıcaklığının artmasıyla oluşan floresan değişikliklerinin saptanmasıyla belirlenir. Wild type (yaban tipi) ve heterozigot örneklerinin farklılıkları erime grafiklerinde kolaylıkla saptanabilmektedir. Bu yöntemde erime eğrisi analiziyle daha fazla bilgi ve detay elde edilebilmektedir. HRM analizi, örneklerin sekans, uzunluk, guanin sitozin (GC) içeriğine göre ayırımı yapabilmektedir. Popülasyonda yaygın görülen tek nükleotit değişikliklerinin (SNP) tespiti, hastalıklarla ilişkili gen mutasyon taramaları ve DNA metilasyon analizleri HRM yöntemi ile hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanabilmektedir. PZR ürünlerindeki nükleotit dizi değişimleri ve çeşitli varyasyonlar DNA erime eğrisi şekilleriyle HRM yönteminde saptanabilmektedir. Kombine yeni nesil DNA boyaları ve geliştirilen gen tarama yazılımları sayesinde güçlü analiz yapabilme kapasitesinin yanı sıra kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyetli olma özelliği ile gerçek zamanlı HRM yöntemi pek çok klinik uygulamada ön plana çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Yüksek çözünürlüklü erime, tek nükleotit değişiklikleri, erime eğrisi, mutasyon, metilasyon

Abstract

Along with the development of technology in the field of molecular biology, many new molecular analyses are being developed each day. In this review, we aim to explain high-resolution melting (HRM) analysis, which has been shown to be important in molecular diagnostics, its applications, and its importance in the areas of clinical practice. The HRM system in a closed tube is used to determine post-polymerase chain reaction (PCR)-based genetic variations as a new method. The working principle of HRM is based on the melting behavior of nucleic acid samples. The denaturation of double-stranded DNA is determined by detecting the fluorescence change caused by increased melting temperature. The differences between wild-type and heterozygous samples may be easily detected in melting graphs. Using this method, melting curve analysis can be performed with more precision. In HRM analysis, the samples can be distinguished according to the guanine cytosine (GC) content and sequence length. Thus, the detection of common single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the population, scanning of gene mutations associated with diseases, and analysis of DNA methylation can be performed quickly and reliably using the HRM method. Nucleotide sequence variations and several variations in the PCR products can be detected with the DNA melting curve shape using the HRM method. In addition to being low-cost and easily implementable, the real-time HRM method enables powerful analysis because of the combined new-generation DNA dyes and developed gene scanning software, thereby standing out in many clinical applications.

Keywords: High-resolution melting, single-nucleotide polymorphism, melting curve, mutation, methylation

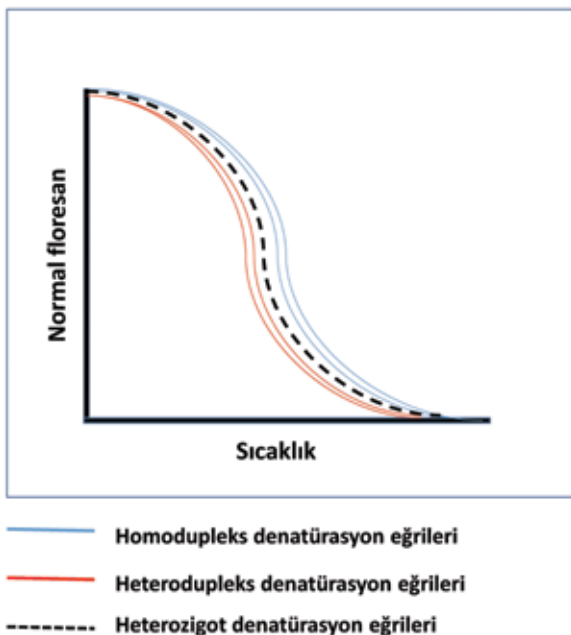
GİRİŞ

Pek çok genetik hastalığın moleküler gelişim sürecinde, genetik ve epigenetik mekanizmaların önemli olduğu kabul edilen bir gerçektir. Bu olaylarda birçok gendeki kusur veya anomalilerin bu hastalıkların tetiklenmesinde rol aldıklarını bilmekteyiz. Bu anomalilerin başında ise mutasyonlar, tek nükleotit değişimleri (SNPs) ve metilasyon durumu önemli genetik değişiklikler arasında yer almaktadır. Bu genetik değişiklikler her zaman için anomali oluşturacağına dair kesin bir bilgi olmamakla birlikte, klinikte tanımlanmış bazı genetik değişimlerin rutinde hastalıkların tanısında kullanılmakta olduğunu bilmekteyiz. Bu yöntemle daha önce bazı tanımlanmış genler olmakla beraber (TP53, PIK3CA, CDH1 ve PTEN gibi) yeni tanımlanacak genlerdeki anormalliklerin hem tanıda hem de tedavide yönlendirici olabileceği düşünülmektedir. Bu tanı ve tedavideki doğru yaklaşımın hastalığın seyrini nasıl etkileyeceğini de düşündüğümüzde bu araştırmaların önemi ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden bu derlemede, HRM analiziyle özellikle kanser ve birçok genetik hastalığın moleküler tanısında kullanılmış olan çalışmalar ile tedavide yol gösterici olduğunu gösteren uygulamalar derlenmiştir.

İnsan genomunun moleküler analizi için birçok pahalı teknolojik yöntem gereksinim duyulmaktadır. Bu yöntemlerin bütçesi yüksek olan araştırmaların dışında kullanımı, yani rutinde ve klinikte hastaların tanısında kullanımının zor olması hastaların tedavisine yardımcı olabilmemizi kısıtlamaktadır. Bu yüzden her geçen gün maliyeti düşürmek için tanı ve tedaviye yönelik yeni analiz yöntemleri geliştirilmektedir. Fakat doğru ve güvenilir yöntemlerin tanımlanması ve kullanılması bu hastalar için oldukça önemlidir. Biz de bu derlemede, moleküler tanıda rutin kullanımının artacağını beklediğimiz güvenilir ve hızlı analiz yapabilen HRM yöntemiyle önemli

verilerin elde edilebileceğine dair hem kendi yaptığımız çalışmamızı ve hem de klinikte rutinde kullanılabileceğine dair önceden yapılmış bilimsel çalışma verilerini paylaşmayı hedefledik.

HRM yöntemi 1997 yılında Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (real time PCR: RT-PZR) yönteminin kullanıma girmesiyle geliştirilmiş otomatize bir yöntemdir. HRM, DNA'nın ayrışma (melting) kinetiğini görüntülemek için geliştirilen bir yöntemdir. HRM tamamen kapalı tüp sisteminde gerçekleşen ve sadece genel DNA interkalasyon boyaalarının araya girdiği bir sürece sahiptir. Bu kapalı tüp sistemi sayesinde kontaminasyon riski azaltılmaktadır ve bu HRM yöntemine önemli bir avantaj sağlamaktadır. Çift zincirli DNA örnekleri sıcaklığın artmasıyla ayrışır, boya salınır ve floresan azalır. Bu floresandaki azalış DNA'nın %50'sinin denatüre (Tm) olmasıyla giderek daha hızla artar (1). Floresan ölçüm 'erime eğrisi (melt curve)' olarak kaydolur. Aynı zamanda bu eğriler 'denatürasyon eğrileri' olarak da ifade edilmektedir. Bu eğriler HRM'den elde edilen ham veriyi bize vermektedir. Bu veri, aslında belli zaman dilimlerinde, sıcaklık artışına karşılık floresan sinyal şiddetindeki değişim olarak tanımlanmaktadır. Bu erime eğrileri 65°C'den 95°C'ye kadar olan her 0.5°C'lik sıcaklık artışlarını kapsamaktadır. Her bir örneğin analizi, eğrinin şekli ve pozisyonuna göre yapılır (Resim 1). Örnekler arasındaki her bir bazlık değişiklik hızlı bir şekilde saptanır ve tanımlanır (1). Ayrıca HRM yönteminin süresinin 2 saatten az olması da önemli bir kolaylık sağlamaktadır. Kısaca HRM yöntemi PZR işleminden sonra gerçek zamanlı PZR cihazında aynı tüpte otomatize ve programlamayla takip eden bir prosedüre sahiptir. Bu yüzden veri eldesi gerçek zamanlı PZR'den sonra 10-15 dk. içinde gerçekleşebilmektedir. Bu veriler 2 saniyedeki 0,1-1,0°C sıcaklık artışına karşılık oluşan floresan sinyal şiddeti değişiminin ölçülmesiyle elde edilmektedir (2, 3). Bu yöntemin önemli bir yanı ise hem parafinli hem de taze dokuda analiz yapmaya imkan vermesidir (4-6). HRM yönteminin bu önemli avantajlarının yanında az da olsa bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlardan biri, 150-250 baz çiftlik (bc) gibi küçük amplifikasyonlarda spesifitesinin yüksek olmasıdır.

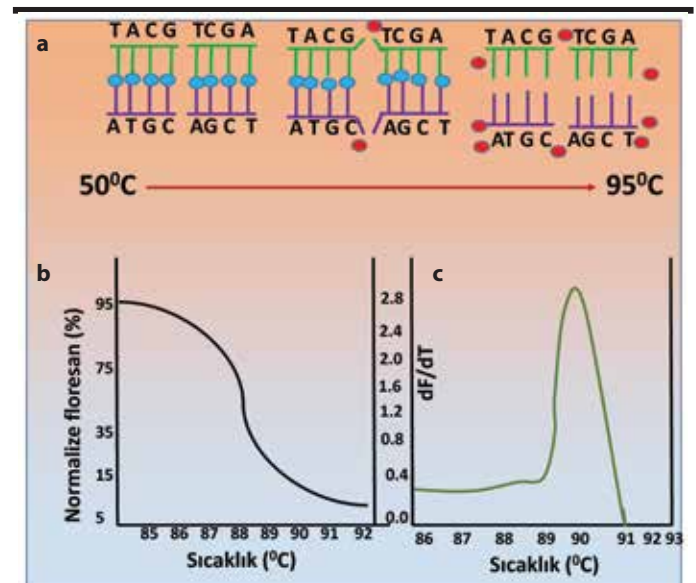


Resim 1. HRM analizinde homozigot ve heterozigot denatürasyon eğrileri

Yani 500-600 bc'lik büyük amplifikasyonlarda veriminin düşebileceği söylenmektedir. Bu dezavantajında sürekli gelişen teknolojiyle beraber yeni bir programlamayla giderilebileceği tahmin edilmektedir.

Daha önceki paragraflarda HRM yönteminde sıcaklık artarken, DNA'nın tek zincirli konformasyona dönüşünü ve floresan şiddetinde azalma meydana geldiğini vurgulamıştık. HRM yönteminde floresan sinyallerin oluşması için çeşitli boyalar (SYBR Green gibi) kullanılmaktadır. HRM yönteminde birçok farklı boya çeşidi kullanılabilir. Beraber birçok farklı gerçek zamanlı PZR cihazında da yapılabilen bir tekniktir. Bu yüzden cihazın kitine özgü kullanılan toksik etkisi düşük olan boyalar bulunmaktadır (LCGreens1 (Idaho Technology Inc, Salt Lake City, Utah), Syto9s (Invitrogen; Carlsbad, CA, United States), SYBR Green BioRad iQ™5 USA, EvaGreens (Biotum) (Inc. Corporate Place, Hayward, CA) and LightCyclers 480 ResoLight Dye (Roche, Indianapolis, IN)) (7). Bu boyalardaki farklılıklar aynı zamanda farklı karakterizasyonun ortaya çıkmasında da önemlidir. Bu boyalar sayesinde DNA denatürasyonu izlenmekte ve kaydedilmektedir (Resim 2). Bu boyaların konsantrasyonundaki yüksekliklerin baskılayıcı (inhibitör) olumsuz durumları tetikleyebileceği bilinmektedir (8). Bununla birlikte, HRM yönteminin yapıldığı kitin de önemli olduğu unutulmamalıdır. Çünkü farklı kitler aynı örnek için farklı Tm değeri verebilmektedir. Bunun sebebi olarak; özellikle kullanılan master mix'in (reaksiyon çözümü) farklı olması vurgulanmıştır. Bunlar dışında moleküler tanıma ilgililenen kanser türü ve ilgilinin genin bölgesi (ekzon, intron veya splice bölgesi) de çok önemlidir. Çünkü genetik değişiklik beklenen genin kodlayıcı bölgesi (ekzon) mi yoksa başka bir bölgesinde mi olduğu doğru hedeflenmiş olmalıdır. Bu bölgeler, çoğunlukla kodlayıcı, regülatör veya intronik bölgeleri kapsamaktadır (9).

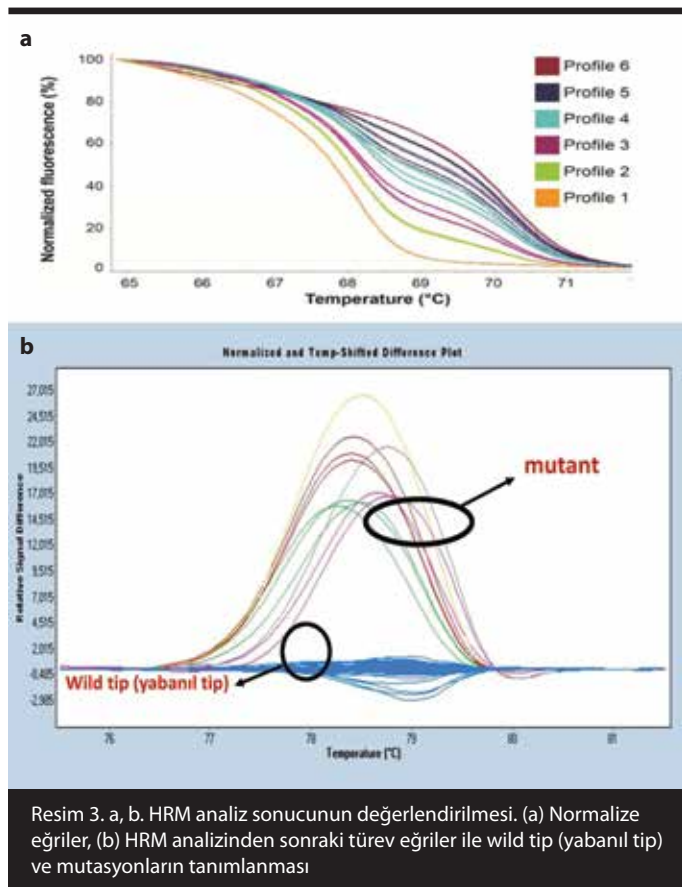
HRM yönteminin analizinde örneklerdeki heterodupleks ve homodupleks DNA türlerinin varlığını yansıtan erime eğrilerinden yararlanılmaktadır. Böylece analiz sırasında normal olduğu kabul edilen örneğin eğrisiyle hasta bireyin eğrileri karşılaştırılarak değerlendirme yapılır (10). Bu yüzden farklı genotipe sahip bireylerin farklı denatürasyon



Resim 2. a-c. HRM yönteminin reaksiyon mekanizması. (a) Sıcaklık arttıkça çift iplikli DNA'nın denatüre olması, (b) HRM analiziyle normalize edilmiş eğrilerin oluşması, (c) Amplikonların melting (erime) eğrisi, erime sıcaklığına karşı negatif türev eğrisi (dF/dT)

Tablo 1. HRM analizinin araştırma alanları

Mutasyon Tarama	Tür tanımlaması
Heterozigot Kaybı Görüntüleme	Aday genlerin belirlenmesi
DNA parmak izi	Popülasyon allel frekansının belirlenmesi
SNP Genotipleme	HLA eşleştirmesi
Haplotip karakterizasyonu	Genotipik benzerliğin kanıtlanması
DNA metilasyon analizi	
DNA haritalama	
SNP: tek nükleotit değişikliklerinin; HLA: insan lökosit antijeni; DNA: deoksiribonükleik asit	



Resim 3. a, b. HRM analiz sonucunun değerlendirilmesi. (a) Normalize eğriler, (b) HRM analizinden sonraki türev eğriler ile wild tip (yabanıl tip) ve mutasyonların tanımlanması

rasyon eğrisi profili sergilemesi beklenir. Özetleyecek olursak; heterozigot ve homozigot bireylerin eğrileri farklılığı ortaya çıkarmaktadır (Resim 3). Böylece, HRM analizi, DNA erime eğrisi profilini göstermeyele ortaya çıkmış olup, nükleik asitlerdeki küçük bir sekans farklılığını saptama özelliğine sahip sensitivitesi ve spesifitesi yüksek; mutasyonları saptama, metilasyon analizi ve genotiplemede kullanılan yeni önemli bir konvansiyonel gerçek zamanlı PZR yöntemi olarak bilime hizmet etmektedir (11). HRM yöntemi tek bir bazlık bilinen bir varyasyonu saptamak için veya bilinmeyen bir genetik mutasyonu keşfetmek için kullanılabilir.

KLİNİK ve ARAŞTIRMA ETKİLERİ

Yüksek çözünürlüklü erime yöntemi mutasyon tarama, metilasyon, genotipleme ve tür tanımlama gibi birçok amaçla kullanılmasına karşın, literatüre baktığımızda daha çok mutasyon, mikrobiyal tanı

ve metilasyon analizleriyle ön plana çıktığı görülmektedir (Tablo 1). 2014 yılında Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne gelmiş olan 101 meme kanseri hastasında PI3K sinyal yolağındaki meme kanserinde frekansı yüksek olan PIK3CA gen mutasyonlarını HRM (LightCycler 480 System) yöntemiyle analiz ettiğimizde, PIK3CA mutasyon frekansını %31 (31/101) olarak saptadık (Tablo 2). HRM yönteminin sonuçlarını Sanger dizilemeyle doğruladığımızda %87 spesifitesinin olduğunu belirledik (12).

Yapılmış diğer çalışmalara baktığımızda, 2016 yılında 27 Fanconi anemili hastada HRM yöntemiyle mutasyon taraması yapıldığında, hastaların 6'sında mutasyon saptanmıştır ve araştırmacılar HRM yönteminin dizi değişikliklerinin araştırılması için yararlı olabileceğini vurgulamışlardır (13). Bir başka çalışmada ise 75 meme kanser hastasında PIK3CA, AKT1 ve PTEN gen mutasyonları HRM ile tanınmıştır. PIK3CA mutasyonları 21 vakada görüldüğü ve frekansının %28 olduğu gösterilmiştir. AKT1 ve PTEN mutasyonlarının frekansları ise sırasıyla %4 ve %3 olarak saptanmıştır (14). Başka bir araştırmacı grup ise, 89 meme kanser hastasında ve 50 kontrol bireyinden alınmış periferik kanda HRM yöntemiyle APC geninde SNP taraması yapmıştır. Bu bireylerin 1'inde yeni bir mutasyon saptanmıştır ve 13 bireyde ise bilinen SNP'lerden tanımlanmıştır (15). Diğer bir çalışmada ise, BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki sık görülen germline mutasyonların HRM yöntemiyle hızlı bir şekilde saptandığı gösterilmiştir. Fakat doğrulamak için sekansa gönderilmesi gerektiği ifade edilmiştir (16). Tan ve ark.(17) ise normal karyotipli 44 akut miyeloid lösemi hastasında HRM yöntemiyle NPM1 ve FLT3-ITD mutasyonlarını analiz etmiştir. Hastaların 8'inde yalnızca NPM1 mutasyonu ve hastaların 4'ünde hem NPM1 hem de FLT3-ITD mutasyonları saptanmıştır. FLT3-ITD genin 14. ekzonunda Y572C (c.1715A>G) olarak tanımlanan yeni bir mutasyon belirlenmiştir. Do ve ark. (18) 219 küçük hücreli olmayan akciğer kanser parafinli dokuda E17K mutasyonunu HRM yöntemiyle taramışlar ve sadece 4 hastada bu mutasyon olduğunu saptamışlardır. Lin ve ark. (19) 122 hemofili A hastasında multiplex PZR yöntemiyle tüm ekzonları taramışlar ve 29 yeni mutasyon saptamışlardır. Sonra da HRM analiziyle mutasyon taraması yaptıklarında 28 hastanın 25'inde mutasyonlar belirlenmiş ve HRM yönteminin %89 doğrulukta saptama yapabildiğini göstermişlerdir. HRM'nin sensitivitesinin ise % 93 olduğunu bildirmişlerdir. Bir çalışmada ise 75 Zellweger sendromlu hastada HRM analiziyle PEX geninde mutasyon taraması yapılmıştır. Elde ettikleri sonuçlara göre 77 farklı mutasyon tanımladıkları ve 47 mutasyonun daha önce hiç rapor edilmediği vurgulanmıştır (20). Kolorektal kanserde yapılan HRM mutasyon analizinde ise MUTYH geninde hastaların %15,8 (13/82)'inde mutasyon saptanmıştır (21).

Tablo 2. HRM yönteminin klinik uygulamaları

Referans	Hastalık	İncelenen Gen	Analiz	Saptama (n/%) veya sonuç
Nicoş ve ark. (26)	Küçük olmayan akciğer kanseri	PIK3CA	Mutasyon	30/145 (2,1)
Moghadam ve ark. (13)	Fankoni anemisi	FANCA	Mutasyon	6/27 (22)
Draht ve ark. (27)	Kolon kanseri	RET	Metilasyon	33/239 (13,8) metile
Chang ve ark. (28)	Oral skuamöz karsinoma	TNFAIP3	SNPs ve mutasyon	3/81 (3,7)
Koochak ve ark. (29)	Kolon kanseri	KRAS ve BRAF	Mutasyon	KRAS: 336/1000 (33,6) BRAF: saptanmadı
Sun ve ark. (23)	Serviks lezyon	DAPK1, MGMT ve RARB	Metilasyon	MGMT: %48 metile DAPK1: %38 metile RARB: %31.2 metile
Zhao ve ark. (30)	Osteogenez bozukluğu	COL1A1 ve COL1A2	Mutasyon	COL1A1: 74/200 (37) COL1A2: 51/200 (25,5)
Tian ve ark. (31)	Hepatoseller karsinoma	GSTP	Metilasyon	48/90 (53,3) metile
Spitzwieser ve ark. (32)	Meme kanseri	CCND2, DAPK1, GSTP1, HIN-1, MGMT ve RASSF1A	Metilasyon	RASSF1A: %94 metile HIN-1: %82 metile MGMT: %65 metile
Dirican ve ark. (12)	Meme kanseri	PIK3CA	Mutasyon	31/101 (31)
Destouni ve ark. (33)	Kistik fibrozis	CFTR	Haplotip analizi	88/93 (94,6)

PIK3CA: fosfatidil inozitol-3-kinaz katalik alfa; FANCA: fankoni anemisi komplemantasyon grup A; RET: ret proto-onkogen; TNFAIP3: TNF (tümör nekroz faktör) alfa tetikleyici protein 3; KRAS: KRAS proto-onkogen, GTPase; guanozin trifosfataz; BRAF: B-Raf proto-onkogen, serin/treonin kinaz; DAPK1: ölüm ilişkili protein kinaz 1; MGMT: O-6- metilguanin- DNA metiltransferaz; RARB: retinoik asid reseptör beta; COL1A1/2: kolajen tip 1 alfa 1 / 2 zincir; GSTP: glutatyon S-transferaz pi; CCND2: siklin D2; HIN-1: "high in normal" -1; RASSF1A: Ras ilişkili (RalGDS/AF-6) domain ailesi üyesi 1; CFTR: kistik fibrozis transmembran iletkenlik regülatör

HRM yöntemi mutasyon analizlerinin dışında sıklıkla epigenetik araştırmalarda metilasyon analizlerinde de kullanılmaktadır (Tablo 2). Khor ve ark. (22) oral hücre karsinomalarında CELSR3 gen metilasyon profilini HRM yöntemiyle analiz etmişlerdir ve bu genin %86 yüksek metilasyon profiline sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada ise 250 servikal lezyonda DAPK1, MGMT ve RARB genlerin promotör bölge metilasyonunu Metilasyona Spesifik HRM (MS-HRM) ile analiz etmişlerdir. MGMT geninin DNA metilasyonunu belirlemede HRM yönteminin etkin olduğu rapor edilmiştir (23). Shao ve ark. (24) bir yeni tümör süpressör gen olan BLU geninde 100 gastrik, 100 kolorektal ve 70 pankreas kanserli hastada HRM ile metilasyon analizi yapmışlardır ve BLU geninin bu üç kanserde de anlamlı şekilde yüksek metile olduğunu saptamışlardır. Ayrıca BLU geninin metilasyonu ile ekspresyon durumu karşılaştırıldığında negatif bir korelasyon olduğunu da rapor etmişlerdir. Heitzer ve ark. (25) bazal hücre karsinomalarında PTCH hallmark geninin metilasyon durumunu üç farklı yöntemle; HRM, bisülfid modifikasyon ve MethyLight yöntemleriyle değerlendirmişlerdir. Bu üç yöntem arasında HRM yönteminin taze dokuda metilasyonu belirlemede en etkin yöntem olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada ise, duktal meme kanser hastalarda BRCA1 ve FHIT promotör bölgelerinin metilasyon analizi HRM yöntemiyle yapılmıştır ve her iki genin yüksek metilasyon profili sergilediği saptanmıştır (34). Runov ve ark. (35) telomerin metilasyon durumunu HRM ile çok hızlı bir şekilde analiz ettiklerini ifade etmişlerdir. Qiu ve ark. (36) 114 HPV-16 enfekte olan serviks kanser hastasında HPV-16L1 genin metilasyon durumunu merak etmişler ve HRM ile değerlendirmişlerdir. MS-HRM yönteminin HPV-16L1 gen metilasyonunu analiz etmede güçlü bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Mikrobiyal genotipleme için birçok yöntem olmasına karşın, HRM yöntemi var olan yöntemlere kıyasla daha hızlı ve kolay analiz im-

kanı sağlamaktadır. HRM teknolojisi bakteriyel, viral ve parazitik patojenlerdeki direnç gelişiminden sorumlu spesifik mutasyonların analizi için de önemli bir yöntemdir. Yapılmış mikrobiyoloji çalışmalarında, bilinen mutasyonlarla mikrobiyal fenotipleri karşılaştırma da HRM yönteminin değerli olduğu gösterilmiştir. HRM ile yapılmış mikrobiyal uygulamaların sayısının 2006 yılından 2012 yılına kadar 59'dan 125'e çıktığı rapor edilmiştir ve bu çalışmaların sayısının giderek artması beklenmektedir. Yapılmış ilk çalışmalara baktığımızda *Mycobacterium chelonae-M. abscessus* türleri HRM yöntemiyle tanımlanmaya çalışılmıştır (37). Başka bir çalışmada ise ribozomal DNA'dan 100 bç'lik fragmentten *Cryptococcus neoformans* ve *Cryptococcus gattii* türlerinin ayrımının yapıldığı gösterilmiştir (38). HRM yöntemi antimikrobiyal direnç mekanizmalarını göstermek için de kullanılmaktadır ve *Plasmodium falciparum*'da ilaç direnç mutasyonları HRM analizi ile saptanmıştır. Yapılmış başka bir çalışmada ise, 6 gendeki çoklu mutasyonların bu mikroorganizmanın ilaç direnciyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (39). Ayrıca HRM yöntemi enfeksiyon hastalıklarının tedavisiyle ilgili araştırmalarda da kullanılmaktadır. Kronik hepatit C virüs enfeksiyonlarında interferona dayalı tedaviye yanıtta rs126979860 polimorfizmin ilişkili olduğu HRM analiziyle belirlenmiştir (40). Wu ve ark. (41) HRM yöntemiyle HCV virüsünü genotiplemede %97,5'lere varan doğrulama gücüne ulaştıklarını rapor etmişlerdir. Bezdicek ve ark. (42) ise invazif mantar hastalıklarının tedavisine karar vermede önemli olan türlerin tanımlanmasında HRM yöntemi kullanmışlardır. *Aspergillus spp.*, *Candida spp.* ve *Mucormycetes* türlerini analiz etmişlerdir. 18 hastanın 13'ünde pozitif sonuç elde etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, HRM yönteminin sensitivitesi, spesifitesi, pozitif tahmin gücü ve negatif tahmin gücü sırasıyla % 67, % 100, % 100 ve %94 olarak saptanmıştır. Böylece bu yöntemin mantar patojenlerinin tanımlanmasında ne kadar etkin bir yöntem

olduğuna işaret etmişlerdir. HRM analiziyle tüberküloz menenjit geni olan rhoB'de mutasyon taraması yapılmıştır ve 516. kodonda 2 hastada ve 531. kodonda ise 1 hastada mutasyon saptanmıştır (43). Aynı çalışmada HRM analizinin rhoB geninini saptamada oldukça hızlı olduğunu ve ilaç direncini değerlendirmede iyi bir yöntem olabileceği vurgulanmıştır. 2016 yılında yapılmış bir çalışmada ise *Leishmania* türlerinin tanımlanması amacıyla hsp70 (ısı şok protein 70)'i amplifiye ederek HRM yöntemiyle analiz etmişler ve yöntemin etkinliğinin oldukça yüksek olduğunu saptamışlardır (44). Özetleyecek olursak; HRM yöntemi epidemiyolojik çalışmaların uygulamaları için önemli olabileceği ve mikroorganizmaların tanısında ve bunlarla ilişkili hastalıklardaki gelişmelere yardımcı olabileceğini görmekteyiz.

Bunlar dışında başka birçok genetik hastalıkta HRM yöntemiyle mutasyon, metilasyon ve genotipleme üzerine yapılmış çalışma bulmamız mümkündür. Örneğin; HRM yöntemiyle tip 2 diyabetli hastalarda SUMO4 gen polimorfizimleri analiz edilmiş ve rs237025 polimorfiziminin tip 2 diyabetle ilişkili olduğu, fakat rs237024 ve rs600739 polimorfizimlerinin ilişkili olmadığı saptanmıştır (45). Deng ve ark. (46) Y kromozomundaki kısa tekrar bölgeleri (STR) HRM yöntemi ile genotiplemişler ve HRM yönteminin oldukça hızlı yaklaşık 2 saat gibi bir zamanda analizi başardığını rapor etmişlerdir. Yimniam ve Jindadamrongwech (47) tek nükleotit mutasyonların yaygın olmayan α -Hb heterozigot varyantlara sebep olduklarını HRM yöntemiyle belirlemişler ve bu yöntemin ucuz ve basit olmasından dolayı rutinde kullanımının mümkün olabileceğini ifade etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, 91 hastada P-450 (CYP2D6) ilaç metabolize ile ilişkili olan polimorfizimler HRM yöntemiyle analiz edilmiş ve 1846G>A, 2988G>A, 100C>T, 2549delA, 2615_2617delAAG ve 1707delT polimorfizimlerini taşıyan hastaların zayıf ve orta metabolize eden bireyler oldukları saptanmıştır (48). Migren hastaları üzerine yapılmış bir çalışmada ise, GABRG2 geninde (GABAA receptor gamma-2-subunit) SNP taraması yapılmış, ama herhangi bir korelasyon belirlenememiştir (49). Ailesel hiperkolesterolemi hastalarında HRM analiziyle LDL reseptör genleri olan APOB (p.R3527Q) genin ekzon 26 ve PCSK9 (p.D374Y) geninin ekzon 7 bölgelerindeki genetik varyasyonlar araştırılmıştır. 28 hastanın 17'sinde altı farklı varyasyon saptamışlar ve HRM yönteminin klinik uygulamalarda maliyeti ve zaman kaybını düşürmek için önemli olabileceğini ve sonuçlarının spesifitesinin ve kuvvetinin yüksek olduğunu vurgulamışlardır (50).

Bütün bu bilgiler bize; tanı ve tedavide önemli olan hastalıklı hücrede, mikroorganizmaların, mutasyonların ve metilasyon durumlarının gösterilmesi için, daha fazla çalışmada ve daha geniş hasta popülasyonunda, HRM yönteminin kullanımının ve geliştirilmesinin gelecekte kişiye özgü tip alanında önemli olabileceğini göstermektedir.

SONUÇ

HRM yöntemi moleküler biyoloji çalışmalarında mutasyon (bilinen/bilinmeyen), polimorfizm, epigenetik ve epidemiyolojik alandaki uygulamalar için güvenilir ve güçlü bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yöntem diğer genotipleme tekniklerine kıyasla özellikle çok verimli olması, basit çalışma prensibi, hızlı ve güçlü analiz imkanı vermesiyle birçok avantajı yapısında barındırmaktadır. En önemli özelliklerinden birinin de kontaminasyon riskinin az olmasıdır ve düşük maliyet, kullanım kolaylığı, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olması da HRM yönteminin kullanımını yaygınlaştıracaktır. Günümüze kadar yapılmış çalışmalar göstermektedir ki; HRM yöntemi klinik moleküler

tanıda büyük kolaylıklar ve doğru analize imkan sağlamaktadır. Ayrıca bazı çalışmalarda % 100 sensitivitede saptama ve % 98 spesifitesi ve düşük yanlış pozitif sonuç verdiği gösterilmiştir. Bir diğer önemli nokta ise HRM yönteminin daha çok heterozigot varyantları saptamada sensitivitesinin yüksek olduğunun bilinmesidir. Bu yüzden patojen ve non-patojen varyantların saptamasında büyük bir kolaylık sağlamaktadır.

Biz de bu derlemede HRM yöntemin çalışma prensipleri avantaj ve dezavantajları, uygulama alanları ve klinik tanıda yapılmış çalışmalar ışığında bazı bilgiler paylaşmaya çalıştık. HRM yönteminin rutin tanıda kullanımının ve veriminin artırılmasıyla hem kanserde hem de diğer hastalıkların tanı ve tedavisinde yönlendirici olabileceğine inanmaktayız.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - E.D., M.A.; Tasarım - E.D., M.A.; Denetleme - M.A.; Kaynaklar - E.D., M.A.; Malzemeler - E.D., M.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi - E.D., M.A.; Analiz ve/veya Yorum - E.D., M.A.; Literatür taraması - E.D., M.A.; Yazıyı Yazan - E.D., M.A.; Eleştirel İnceleme - E.D., M.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek aldıklarını beyan etmişlerdir (SAG-C-DRP- 100216-0040 ve SAG-E-120514-0130 MA'ya). Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAPKO).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author contributions: Concept - E.D., M.A.; Design - E.D., M.A.; Supervision - M.A.; Resource - E.D., M.A.; Materials - E.D., M.A.; Data Collection and/or Processing - E.D., M.A.; Analysis and/or Interpretation - E.D., M.A.; Literature Search - E.D., M.A.; Writing - E.D., M.A.; Critical Reviews - E.D., M.A.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received by grants (SAG-C-DRP- 100216-0040 and SAG-E-120514-0130 to MA). from the Research Foundation of Marmara University (BAPKO).

KAYNAKLAR

- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154-60. [\[CrossRef\]](#)
- Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS. Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 2001; 25: 430-42. [\[CrossRef\]](#)
- Gundry CN, Bernard PS, Herrmann MG, Reed GH, Wittwer CT. Rapid F508del and F508C assay using fluorescent hybridization probes. *Genet Test* 1999; 3: 365-70. [\[CrossRef\]](#)
- Taylor CF. Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochem Soc Trans* 2009; 37: 433-7. [\[CrossRef\]](#)
- Fadhil W, Ibrahim S, Seth R, Ilyas M. Quick-multiplex-consensus (QMC)-PCR followed by high-resolution melting: a simple and robust method for mutation detection in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Clin Pathol* 2010; 63: 134-40. [\[CrossRef\]](#)
- Gallegos Ruiz MI, Floor K, Rijmen F, Grünberg K, Rodriguez JA, Giaccone G. EGFR and K-ras mutation analysis in non-small cell lung cancer: comparison of paraffin embedded versus frozen specimens. *Cell Oncol* 2007; 29: 257-64.
- Eischeid AC. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Res Notes* 2011; 4: 263. [\[CrossRef\]](#)
- Monis PT, Giglio S, Saint CP. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Anal Biochem* 2005; 340: 24-34. [\[CrossRef\]](#)

9. Chanock SJ, Burdett L, Yeager M, Llaça V, Langerød A, Presswalla S, et al. Somatic sequence alterations in twenty-one genes selected by expression profile analysis of breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R5. [\[CrossRef\]](#)
10. White H, Potts G. Mutation Scanning by High Resolution Melt Analysis. Evaluation of Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science), HR-1 and 384-Well LightScanner (Idaho Technology) Wessex, UK: National Genetics Reference Laboratory; 2006.
11. Garritano S, Gemignani F, Voegelé C, Nguyen-Dumont T, Le Calvez-Kelm F, De Silva D, et al. Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus. *BMC Genet* 2009; 10: 5. [\[CrossRef\]](#)
12. Dirican E, Kaya Z, Gullu G, Peker I, Ozmen T, Gulluoglu BM, et al. Detection of PIK3CA gene mutations with HRM analysis and association with IGF1P-5 expression levels in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 9327-33. [\[CrossRef\]](#)
13. Moghadam AA, Mahjoubi F, Reisi N, Vosough P. Investigation of FANCA gene in Fanconi anaemia patients in Iran. *Indian J Med Res* 2016; 143: 184-96. [\[CrossRef\]](#)
14. Tserga A, Chatziandreou I, Michalopoulos NV, Patsouris E, Saetta AA. Mutation of genes of the PI3K/AKT pathway in breast cancer supports their potential importance as biomarker for breast cancer aggressiveness. *Virchows Arch* 2016; 469: 35-43. [\[CrossRef\]](#)
15. Chang YS, Lin CY, Yang SF, Ho CM, Chang JG. Analysing the mutational status of adenomatous polyposis coli (APC) gene in breast cancer. *Cancer Cell Int* 2016; 16: 23. [\[CrossRef\]](#)
16. Takano EA, Mitchell G, Fox SB, Dobrovic A. Rapid detection of carriers with BRCA1 and BRCA2 mutations using high resolution melting analysis. *BMC Cancer* 2008; 8: 59. [\[CrossRef\]](#)
17. Tan AY, Westerman DA, Carney DA, Seymour JF, Juneja S, Dobrovic A. Detection of NPM1 exon 12 mutations and FLT3 - internal tandem duplications by high resolution melting analysis in normal karyotype acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2008; 1: 10. [\[CrossRef\]](#)
18. Do H, Solomon B, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. Detection of the transforming AKT1 mutation E17K in non-small cell lung cancer by high resolution melting. *BMC Res Notes* 2008; 1: 14. [\[CrossRef\]](#)
19. Lin SY, Su YN, Hung CC, Tsay W, Chiou SS, Chang CT, et al. Mutation spectrum of 122 hemophilia A families from Taiwanese population by LD-PCR, DHPLC, multiplex PCR and evaluating the clinical application of HRM. *BMC Med Genet* 2008; 9: 53. [\[CrossRef\]](#)
20. Ebberink MS, Kofster J, Wanders RJ, Waterham HR. Spectrum of PEX6 mutations in Zellweger syndrome spectrum patients. *Hum Mutat* 2010; 31: E1058-70. [\[CrossRef\]](#)
21. López-Villar I, Ayala R, Wesselink J, Morillas JD, López E, Marín JC, et al. Simplifying the detection of MUTYH mutations by high resolution melting analysis. *BMC Cancer* 2010; 10: 408. [\[CrossRef\]](#)
22. Khor GH, Anisah Froemming GR, Zain RB, Abraham TM, Lin TK. Involvement of CELSR3 hypermethylation in primary oral squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016; 17: 219-23. [\[CrossRef\]](#)
23. Sun Y, Li S, Shen K, Ye S, Cao D, Yang J. DAPK1, MGMT and RARB promoter methylation as biomarkers for high-grade cervical lesions. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 14939-45.
24. Shao Y, Zhang W, Zhang C, Wu Q, Yang H, Zhang J, et al. High-resolution melting analysis of BLU methylation levels in gastric, colorectal, and pancreatic cancers. *Cancer Invest* 2010; 28: 642-8. [\[CrossRef\]](#)
25. Heitzer E, Bambach I, Dandachi N, Horn M, Wolf P. PTCH promoter methylation at low level in sporadic basal cell carcinoma analysed by three different approaches. *Exp Dermatol* 2010; 19: 926-8. [\[CrossRef\]](#)
26. Nicos M, Krawczyk P, Powrózek T, Szudy P, Jarosz B, Sawicki M, et al. PIK3CA mutations detected in patients with central nervous system metastases of non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2016; 36: 2243-9.
27. Draht MX, Smits KM, Jooste V, Tournier B, Vervoort M, Ramaekers C, et al. Analysis of RET promoter CpG island methylation using methylation-specific PCR (MSP), pyrosequencing, and methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM): impact on stage II colon cancer patient outcome. *Clin Epigenetics* 2016; 8: 44. [\[CrossRef\]](#)
28. Chang YC, Chang YS, Chang CC, Liu TC, Ko YC, Lee CC, et al. Development of a high-resolution melting method for the screening of TNFAIP3 gene mutations. *Oncol Rep* 2016; 35: 2936-42. [\[CrossRef\]](#)
29. Koochak A, Rakhshani N, Karbalaie Niya MH, Tameshkel FS, Sohrabi MR, Babaee MR, et al. Mutation analysis of KRAS and BRAF genes in metastatic colorectal cancer: a first large scale study from Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016; 17: 603-8. [\[CrossRef\]](#)
30. Zhao X, Xiao J, Wang H, Ren X, Gao J, Wu Y, et al. Spectrum of COL1A1/2 mutations and gene diagnosis in Chinese patients with osteogenesis imperfecta. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2015; 95: 3484-9.
31. Tian M, Zhao B, Zhang J, Martin FL, Huang Q, Liu L, et al. Association of environmental benzo[a]pyrene exposure and DNA methylation alterations in hepatocellular carcinoma: A Chinese case-control study. *Sci Total Environ* 2016; 541: 1243-52. [\[CrossRef\]](#)
32. Spitzwieser M, Holzweber E, Pfeiler G, Hacker S, Cichna-Markl M. Applicability of HIN-1, MGMT and RASSF1A promoter methylation as biomarkers for detecting field cancerization in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2015; 17: 125. [\[CrossRef\]](#)
33. Destouni A, Poulou M, Kakourou G, Vrettou C, Tzetzis M, Traeger-Synodinos J, et al. Single-cell high resolution melting analysis: A novel, generic, pre-implantation genetic diagnosis (PGD) method applied to cystic fibrosis (HRMA CF-PGD). *J Cyst Fibros* 2016; 15: 163-70. [\[CrossRef\]](#)
34. Liu L, Sun L, Li C, Li X, Zhang Y, Yu Y, et al. Quantitative detection of methylation of FHIT and BRCA1 promoters in the serum of ductal breast cancer patients. *Biomed Mater Eng* 2015; 26: S2217-22. [\[CrossRef\]](#)
35. Runov AL, Vonsky MS, Mikhelson VM. DNA methylation level and telomere length as a basis for the biological aging clock model construction. *Tsitologiya* 2015; 57: 192-6.
36. Qiu C, Zhi Y, Shen Y, Gong J, Li Y, Rong S, et al. Performance of the HPV-16 L1 methylation assay and HPV E6/E7 mRNA test for the detection of squamous intraepithelial lesions in cervical cytological samples. *J Virol Methods* 2015; 224: 35-41. [\[CrossRef\]](#)
37. Odell ID, Cloud JL, Seipp M, Wittwer CT. Rapid species identification within the Mycobacterium chelonae-abscessus group by high-resolution melting analysis of hsp65 PCR products. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 96-101. [\[CrossRef\]](#)
38. Gago S, Zaragoza Ó, Cuesta I, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Buitrago MJ. High-resolution melting analysis for identification of the Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii complex. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3663-6. [\[CrossRef\]](#)
39. Daniels R, Ndiaye D, Wall M, McKinney J, Séne PD, Sabeti PC, et al. Rapid, field-deployable method for genotyping and discovery of single-nucleotide polymorphisms associated with drug resistance in Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2976-86. [\[CrossRef\]](#)
40. Kovanda A, Poljak M. Real-time polymerase chain reaction assay based on high-resolution melting analysis for the determination of the rs12979860 polymorphism involved in hepatitis C treatment response. *J Virol Methods* 2011; 175: 125-8. [\[CrossRef\]](#)
41. Wu D, Fu X, Wen Y, Liu B, Deng Z, Dai L, et al. High-resolution melting combines with Bayes discriminant analysis: a novel hepatitis C virus genotyping method. *Clin Exp Med* 2016 May 13. [Epub ahead of print] [\[CrossRef\]](#)
42. Bezdicek M, Lengerova M, Ricna D, Weinbergerova B, Kocmanova I, Volfova P, et al. Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis. *Med Mycol* 2016; 54: 714-24. [\[CrossRef\]](#)
43. Sharma K, Modi M, Kaur H, Sharma A, Ray P, Varma S. rpoB gene high-resolution melt curve analysis: a rapid approach for diagnosis and screening of drug resistance in tuberculous meningitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; 83: 144-9. [\[CrossRef\]](#)

44. Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Stocco de Lima AC, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. high resolution melting analysis targeting hsp70 as a fast and efficient method for the discrimination of leishmania species. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10: e0004485. [\[CrossRef\]](#)
45. Pu LM, Nan N, Yang Z, Jin ZN. Association between SUMO4 polymorphisms and type 2 diabetes mellitus. *Yi Chuan* 2012; 34: 315-25. [\[CrossRef\]](#)
46. Deng JQ, Liu BQ, Wang Y, Liu W, Cai JF, Long R, et al. Y-STR genetic screening by high-resolution melting analysis. *Genet Mol Res* 2016; 15. [\[CrossRef\]](#)
47. Yimniam W, Jindadamrongwech S. Scanning for α -Hemoglobin variants by high-resolution melting analysis. *J Clin Lab Anal* 2016; 30: 633-40. [\[CrossRef\]](#)
48. Pindurová E, Zourková A, Zrůstová J, Juřica J, Pavelka A. Alternative reliable method for cytochrome P450 2D6 poor metabolizers genotyping. *Mol Biotechnol* 2013; 53: 29-40. [\[CrossRef\]](#)
49. Chen T, Murrell M, Fowdar J, Roy B, Grealy R, Griffiths LR. Investigation of the role of the GABRG2 gene variant in migraine. *J Neurol Sci* 2012; 318: 112-4. [\[CrossRef\]](#)
50. Whittall RA, Scartezini M, Li K, Hubbard C, Reiner Z, Abraha A, et al. Development of a high-resolution melting method for mutation detection in familial hypercholesterolaemia patients. *Ann Clin Biochem* 2010; 47: 44-55. [\[CrossRef\]](#)