

Derleme

Türk Toplumunda Sık Görülen Kalıtsal Hastalıklarda PCR Tekniğine Dayalı DNA Tanı Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Servis Olarak Sunulması

Sibel KANTARCI, Serpil ERASLAN, KYahya LALELİ
Düzen Laboratuvarlar Grubu, Moleküler Genetik Bölümü, İstanbul-Türkiye

Genetik hastalıklar, dünyada olduğu kadar, ülkemizde de önemli bir sağlık sorunudur. Bu tür hastalıkların, bireylerle sınırlı kalmayıp, kuşaktan kuşağa aktarılma riskinin olması ve çoğunun kesin tedavisinin bulunmaması, bu sorunun temel nedenlerini oluşturur. Klinik olarak tanımlanmış genetik hastalıkların topluma ve hasta ailelerine getirdiği maddi ve manevi yük ise küçümsenmeyecek boyuttadır. Bununla birlikte, kalıtım şeklinin bilinmesi, ailede olası ve kesin taşıyıcıların saptanması ve doğacak olan çocukta aynı hastalığın ortaya çıkıp çıkmayacağını araştırılması, özellikle kesin tedavisi olmayan hastalıkların önlenmesi için günümüzde izlenebilecek tek yoldur.

Genetik hastalıklar, bireyin kalıtım materyalinde meydana gelen kalıcı olumsuz değişiklikler ile ortaya çıkar. Bu değişiklikler, sitogenetik yöntemlerle tespit edilebilen, yapısal veya sayısal kromozom anomalilerinin yanı sıra, sadece moleküler DNA analiz sistemleri ile tespit edilebilen ekson delesyon/duplikasyon, mikro delesyon/duplikasyon, substitüsyon, inversiyon, insersiyon gibi mutasyonlardan kaynaklanabilir. Genetik bilimindeki bilgilerin her geçen gün artması, kalıtım materyalinin kolay incelenmesini sağlayan güçlü teknolojilerin gelişmesini sağlamaktadır. Bu gelişmeler çerçevesinde, dünyada, bu tür hastalıklardan etkilenen bireyler ve ailelerine yardımcı olmak amacı ile, genetik danışma merkezleri ve genetik laboratuvarları kurulmaktadır. Ülkemizde de, genetik analiz sistemlerinin üniversitelerin araştırma grupları tarafından etkin olarak kullanılır hale getirilmesi ile birlikte, genetik tanı yöntemlerinin servis ola-

rak sunulması konusunda önemli adımlar atılmaktadır.

Türkiye de sık görülen kalıtsal hastalıklar için etkili bir moleküler DNA analiz programının oluşturulması amacı ile, Boğaziçi Üniversitesi Biyoloji Bölümü* ve Düzen Laboratuvarlar Grubu 1993 yılında ortak bir proje başlattı. Proje, üniversite laboratuvarında kullanılan rutin DNA analiz yöntemlerinin, ülkemizde ilk defa özel bir laboratuvar bünyesinde uygulanmasını sağladı. Proje süresince, Duchenne/Becker kas distrofisi (DMD/BMD), hemofili A, hemofili B, kistik fibroz (CF), β -talasemi ve orak hücre anemisi (SCA) hastalıklarında, polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction : PCR) tekniğine dayalı DNA tanı yöntemleri ile ilgili uygulamaların aktarılması ile, İstanbul Düzen Laboratuvarı Moleküler Genetik Bölümü kuruldu. 1996 yılında sonlanan proje döneminden sonra bölümümüz, sırası ile, Faktör V Leiden, Spinal Musküler Atrofi (SMA), ve akondroplazi (ACH) hastalıklarını da çalışma kapsamına aldı. Şubat 1996-Şubat 1999 tarihleri arasında 76 faktör V Leiden, 73 P-talasemi, 46 CF, 42 DMD/BMD, 9 hemofili A, 9 SMA, 4 SCA, 3 hemofili B ailesi olmak üzere toplam 266 aile mutasyon belirleme veya bağlantı analizi isteği ile bölümümüze başvurdu. Çalışma süresince, prenatal tanı isteyen 31 aileye toplam 33 prenatal tanı verildi.

Bölüm, mevcut çalışmalarının yanı sıra, Kasım 1998 tarihinden itibaren araştırma çalışmalarına da başladı. Bu çalışmalar arasında, rutin DNA analizleri sonucunda mutasyon bulunamayan ailelerde,

Taht/ma Adresi: Simel Kantarcı
Düzen Laboratuvarlar Grubu, Moleküler Genetik Bölümü, İstanbul

(*B.Ü. Biyoloji Bölümü'nün adı 1996 yılında Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü olarak değişti.)

bilinmeyen mutasyonların araştırılması için uygun DNA analiz tekniklerinin geliştirilmesi ve Infantil polikistik böbrek hastalığı (otozomal resesif polikistik böbrek hastalığı; ARPKD) ailelerinin haplotip analizi yer almaktadır.

AMAÇ VE UYGULAMA

İstanbul Düzen Laboratuvarı Moleküler Genetik Bölümü'nün amacı, Türkiye'de sık görülen kalıtsal hastalıklar için etkili bir moleküler tanı programı uygulamaktır. Bu uygulama sırasında göz önünde bulundurulması gereken ve üç ana başlık altında toplayabileceğimiz kriterler vardır.

1. Hasta kabul işlemleri : Aile, çalışma için kabul edilmeden önce, tanıyı koyan ve aileyi bize gönderen doktor ve/veya merkez ile görüşülerek, aile ağacı, hasta birey ve gerektiği durumlarda diğer aile bireylerinin klinik/laboratuvar bulguları ile ilgili bilgilerin alınması.
2. Çalışma planının belirlenmesi: Çalışma şekli (mutasyon tespiti ile tanının doğrulanması, direkt veya indirekt yöntemler ile taşıyıcılık tanısı veya prenatal tanı) belirlenmelidir. Mutasyon ve polimorfizmlerin analiz metodları ve süreleri farklı olabilir. Buna bağlı olarak analiz bitiş süresi belirlenir.
3. Sonuç bildirme : Analiz sonuçları ile ilgili rapor hazırlanarak, aileye herhangi bir yorum yapılmadan, ilgili doktor ve/veya merkeze iletilir.

Kalıtsal hastalıkların tanısında kullanılan DNA analiz tekniklerinin uygulanması sırasında, analizi yapılan hastalık ile ilgili genetik mekanizmaların iyi bilinmesinin önemi büyüktür. Bölümümüzde çalışılan kalıtsal hastalıkları, kalıtım patemlerine göre üç grupta toplamaktayız.

A. Ototomal Resesif Kalıtım Gösteren Hastalıklar : Somatik kromozomlar üzerinde bulunan ve resesif kalıtım paterni gösteren genler yolu ile, bir kuşaktan diğerine aktarılırlar. Cinsiyet kromozomları üzerinde olmadıkları için, hastalık fenotipinin ortaya çıkma olasılığı, kız ve erkek çocuklarda eşittir. Taşıyıcı bir anne babadan olacak bütün çocukların %25 inin hasta, %50 sinin ise taşıyıcı olma riski vardır. Hastalığa neden olan mutasyonların çeşitleri ve görülme sıklıkları etnik farklılıklar gösterebilir. Akraba evlilikleri, bu tür hastalıkların ortaya çıkma olasılığını arttıran, önemli bir faktördür.

Kistik Fibroz (CF): CF beyaz ırkta sıklıkla rastlanan ve otosomal resesif geçiş gösteren en ciddi kalıtsal hastalıklardan biridir. CF, tüm etnik gruplarda ve coğrafik bölgelerde görülür. Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa popülasyonlarında daha sık rastlanır. Bu popülasyonlarda her 1900-3700 ki-

şiden bir tanesi CF'lidir ve her 25 kişiden birisinin CF taşıyıcısı olduğu bilinmektedir (1). Kistik fibroz dış salgı bezlerinde klor iyonu taşınmasını düzenleyen "kistik fibroz hücre zarından geçiş düzenleyici protein" (cystic fibrosis transmembrane conductance regulatory protein : CFTR) olarak bilinen proteinin yapısal bozukluğundan kaynaklanır. Hastalığa, 7q31-32 kromozom bölgesine lokalize olan CFTR geninde meydana gelen değişik mutasyonlar neden olur. CFTR geni üzerinde şimdiye kadar 700'den fazla mutasyon tespit edilmiştir (2).

Hastalık belirtileri tüm dış salgı bezlerinde görülür. Kronik akciğer hastalıkları, pankreatik dış salgı yetersizliği gibi belirtilerin yanı sıra, etkilenmiş bireylerin ter elektrolit değerleri oldukça yüksektir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, infertilite olgularında, özellikle CBAVD (conjenital bilateral absence of vas deferens) vakalarının büyük bir bölümünde, durumun CFTR geninde meydana gelen mutasyon ve/veya varyasyonlardan kaynaklandığını ortaya koymuştur (3, 4).

CF, Türk toplumunda da sık görülen bir hastalıktır. Toplumumuzda, bugüne kadar tespit edilen 20'ye yakın mutasyondan en sık görüleni, yaklaşık %16'lık bir frekans ile, (F508 dir (5).

β-talasemi: Hemoglobin (Hb) iki a- ve iki β-globin zincirinden oluşan tetramerik bir proteindir. Akdeniz anemisi veya Cooley anemisi olarak bilinen p-talasemi, P-globin zincirinin sentezlenmesi veya yetersiz sentezlenmesi sonucu ortaya çıkan bir hemoglobinopatidir (6). Akdeniz kıyılarındaki ülkelerden başlayarak uzak doğuya kadar uzanan kuşak içinde bulunan ülkelerde (İtalya, Yunanistan, Hindistan, Güney Çin gibi) çok sık görülür. Hastalığın ortaya çıkmasına, 11. kromozomun kısa kolu üzerine lokalize olan P-globin geninde meydana gelen mutasyonlar neden olur. Dünyada bugüne kadar belirlenmiş 180'den fazla P-talasemi mutasyonu vardır (7).

β-talaseminin kesin tedavisi olmadığı için taşıyıcıların belirlenmesi önemlidir. Buna yönelik olarak yapılan kan sayımında ortalama eritrosit hacmi (MCV) ve ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) değerlerinin düşmesi, periferik yaymada mikrositoz görülmesi ve hemoglobin elektroforezi sonucunda HbA₂ değerinde görülen artış, önemli kriterlerdir. Taşıyıcı olduğu belirlenen ebeveynlerde yapılan moleküler analiz, taşıyıcılık genotipini çoğu zaman ortaya koyar ve dolayısı ile, prenatal tanıya olanak sağlar.

Türkiye genelinde, hastalık geninin frekansı ortalama %2'dir; fakat bu frekans bölgesel farklılık gösterebilir (8). Genetik araştırmalar, çok değişik etnik grupların bir arada yaşadığı ülkemizde şimdiye kadar 40'ın üzerinde mutasyon olduğunu gös-

terdi. Bu mutasyonlardan en sık görülen IVS-I-110'un frekansı toplumumuz için %40.1'dir (9).

/ β -globin geninde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanan ve β -talasemi çalışmaları sırasında incelenen diğer hemoglobinopatiler, hemoglobin S (HbS) ve hemoglobin C (HbC) dir.

Orak hücre anemisi (SCA; HbS) : / β -globin zincirinin yapısal değişikliği sonucu ortaya çıkan bir hemoglobinopatidir. Eritrosit morfolojisinin bozulması orak şeklini almasına neden olur. Bu eritrositler mikrosirkülasyonda vazos-oklüzyon ve kronik hemoliz meydana getirirler. Hasta veya taşıyıcılarda, HbA1 değeri düşük ve HbS değeri yüksektir. HbS fenotipine, p-globin zincirinin 6. amino asidi olan glutamik asitin valine dönüşmesine neden olan bir nokta mutasyonu yol açar (6).

Hemoglobin C (HbC): Dünyada HbS'ten sonra en sık görülen hemoglobin varyantıdır. Eritrositlerde kristalleşen yapıların oluşmasına sebep olur ve homozigot HbC veya HbC/p-talasemi birleşik heterozigotlarda anemi durumu ve dalak büyümesi oluşur. HbC fenotipine, p-globin zincirinin 6. amino asidi olan glutamik asitin lizine dönüşmesine neden olan bir nokta mutasyonu yol açar (6).

Spinal müsküler atrofi (CSMA) : Omurilikte bulunan anterior boynuz hücrelerinde meydana gelen bir hastalıktır. Bu hastalar yürüme, baş ve boynu sabit tutma, yutma gibi istemli kas hareketlerini güç yaparlar. Klinik olarak belirlenmiş üç tipi vardır:

- SMA Tip I (Werdnig-Hoffmann Hastalığı): SMA'nın en ağır formudur. Etkilenmiş bireylerin çoğu doğumlarını takip eden ilk altı ay içinde, bir kısmı da iki yaş öncesi ölürlere (10).

- SMA Tip II : SMA'nın kronik formudur. Etkilenmiş bireyde belirtiler iki yaşından önce başlar ve tanı bu yaşlarda rahatlıkla konulabilir. Yürüme yi öğrenmeleri mümkündür fakat zayıf göğüs kasları yüzünden çabuk yorulurlar (11).

- SMA Tip III (Kugelberg-Welander Hastalığı) : SMA'nın hafif formudur. Belirtiler, iki yaş civarında ortaya çıkabileceği gibi, daha ileri yaşlarda da görülebilir (12).

SMA hastalarının çoğu, hayatlarının ilerleyen yıllarında solunum yolu yetersizliği veya enfeksiyonlarına bağlı komplikasyonlar yüzünden hayatlarını kaybederler.

Özellikle SMA tip II ve III hastalarında, kreatin fosfokinaz (CPK) değerlerinin serumda yükselmesi, elektromyografi (EMG) ve kas biyopsi sonuçları hastalık tanısını destekleyen önemli kriterlerdir.

Moleküler çalışmalar, SMA fenotipi ile bağlantılı görülen ve 5ql 1.2-13.3 kromozom bölgesine haritalanan 500 kilobazlık (kb) bir DNA bölgesinin, invert duplike halde bulunduğunu gösterdi (13, 14). 1995 yılında bu bölgeden birkaç gen izole

edildi. Bunlardan bir tanesi "survival motor neuron" (SMN) denilen, birbirine yüksek homoloji gösteren sentromerik (SMNc) ve telomerik (SMNt) iki kopyası olan gendir (15). SMA hastalarının %97'sinin SMNt geninde homozigot ekson delesyonları görülür. SMNc'de meydana gelen delesyonların hastalık fenotipine etkisi olmadığı düşünülmektedir. İzole edilen bir diğer gen, "neural apoptosis inhibitory protein" (NAİP) geni olarak isimlendirilir (16). SMA tip I hastalarının %67'inde, SMA tip II ve III hastalarının %24'ünde NAİP gene ait ekson delesyonları tespit edilmiştir. Dünyada, SMA hastalığının moleküler mekanizması ile ilgili araştırmalar devam etmektedir.

Türk toplumunda yapılan çalışmalarda SMNt delesyon frekansının %85-90 arasında olduğu tespit edildi (17).

Faktör V Leiden : Aktive protein C (APC), antikoagulant özelliğe sahip bir serin proteazdır. Normal homeostaz sırasında APC faktör Va ve VIIIa'nın proteolitik inaktivasyonunu sağlayarak kanın pıhtılaşmasını sınırlar. Tromboz hastalarının yaklaşık %50'sinde, APC antikoagulant cevaba karşı bir rezistans olduğu bilinmektedir (APC rezistans)(18). APC rezistans fenotipinin, büyük oranda faktör V geninde meydana gelen bir nokta mutasyonuna (1691 G→A substitüsyonu; FVQ506) bağlı olduğu bulunmuştur, (19). Faktör V Leiden olarak isimlendirilen bu mutasyonu homozigot veya heterozigot olarak gösteren bireylerde APC rezistansına bağlı tromboz olaylarının fazla olduğu bilinmektedir.

5. İnfantil Polikistik Böbrek Hastalığı (ARPKD) : Otozomal resesif-polikistik böbrek hastalığı (ARPKD), en genel kalıtsal renal kistik hastalıklarından biridir. Rapor edilen insidansı canlı doğumlarda 1:6.000 (Amerika raporlarında) - 1:40.000 (Avrupa literatürlerinde)'dir. Tüm veriler dikkate alınınca muhtemel insidans canlı doğumlarda 1-2:10.000'dir (20, 21).

ARPKD, birçok çocuk vakada ölüme sebep olduğu için, hasta çocuğu olan ailelerde prenatal tanıya büyük bir istek vardır. ARPKD'in fetal ultrason ile prenatal tanısı (hatta doğumda oldukça genişlemiş böbreğe sahip vakalarda bile) genellikle 22. gebelik haftasından önce mümkün değildir. Hafif manifestasyonu olan vakalarda ultrason ile prenatal tanı imkansız olabilir. ARPKD lokusunun öp'nin proksimaline haritalanması, riskli ailelerde haplotipe dayalı prenatal tanıya imkan verdi (22). Bu hastalıktan sorumlu olan gen henüz klonlanmadığı için taşıyıcılık tanısı ve prenatal tanıda henüz mutasyon analizi yapılamamaktadır. Prenatal tanı isteyen ailelerde başvurunun kabulü için gereken kriterler;

- Karakteristik ultrasonografik işaretli tipik klinik işaretlerin manifestasyonu

- Aşağıda belirtilen kriterlerden en az birinin varlığı, ebeveynlerde ultrason incelemesi sonucunda renal kistin olmayışı - hepatik fibrozun klinik işaretleri veya histopatolojik kanıtı
en az bir hasta kardeşte ARPKD'in patolojik anatomik kanıtı ebeveynlerin akraba olması (23).

B. Otozomal Dominant Kalıtım Gösteren Hastalıklar: Somatik kromozomlar üzerinde bulunan ve dominant kalıtım paterni gösteren genler yolu ile, bir kuşaktan diğerine, cinsiyet farkı gözetmeksizin aktarılırlar. Mutasyonun hem homozigot hem de heterozigot formlarında hastalık görülür. Homozigot mutant bireylerde klinik tablo daha ağırdır. Her iki ebeveynin heterozigot olduğu durumlarda, çocukların %25'nin homozigot mutant, %50'sinin ise heterozigot olma riski vardır. Ebeveynlerden sadece birinin heterozigot olması durumunda, çocukların %50'sinin heterozigot olma riski vardır.

Akondroplazi : Kemik gelişiminde meydana gelen aksaklıklara bağlı olarak ortaya çıkan küçüklüktür. Hastalığın, doğumda klinik ve radyolojik olarak rahatlıkla tanısı konulur. Hastalık, kısa ekstremiteler, çıkık bir alın ve basık burun köküne sahip büyük bir baş ve iskelet sistemi anomalileri ile karakterize edilir. Hastalığın görülme frekansı bütün toplumalarda yaklaşık 1/26000'dir (24). Akondroplazi vakalarının yaklaşık %95'inde olaya, 4p16.3 kromozom bölgesine lokalize olan, fibroblast büyüme faktör reseptörü-3 (FGFR-3) geninde meydana gelen bir mutasyon (1138G→A substitüsyonu) yol açar. Özellikle, homozigot mutant bireylerde klinik tablonun çok ağır seyretmesi ve doğumdan bir süre sonra ölümlü sonuçlanması, moleküler düzeyde prenatal tanının önemini artırır.

C. X'e Bağlı Resesif Kalıtım Gösteren Hastalıklar: X kromozomu üzerinde bulunan ve resesif kalıtım paterni gösteren genler yolu ile, taşıyıcı anneden erkek çocuğa aktarılırlar. Bazı durumlarda, hastalık anne taşıyıcı olmadığı halde ortaya çıkabilir. Taşıyıcı bir anneden doğacak olan erkek çocuğun etkilenmiş olma ihtimali %50'dir. Kız çocukları ise aynı oranda hastalığın taşıyıcısı olabilirler. Ak raba evliliklerinin hastalığın ortaya çıkma frekansına etkisi yoktur. Hastalığa sebep olan mutasyonların çeşitleri ve frekansları çoğu zaman etnik farklılıklar göstermez.

Duchenne/Becker Kas Distrofisi (DMD/BMD): DMD/BMD, kas hücrelerinin iç membran yapısında bulunan distrofin proteininin yapısal bozuklarından kaynaklanan bir kas hastalığıdır. Distrofin proteininin fonksiyonu, yapısal özellikleri ve diğer proteinler ile olan ilişkileri ko-

nularında yapılan çalışmalar hala devam etmektedir. Bununla birlikte, araştırmalar, bu proteinin eksikliğinin, kas hücre membranının stabilitesini bozduğunu göstermektedir. Buna bağlı olarak tahrip olan kas dokusu, zamanla yerini yağ dokusuna bırakır. Her 3300 erkek doğumda bir görülen DMD, ağır bir fenotipe sahiptir. Hastalık belirtileri 2-5 yaş arasında, yürüme, merdiven çıkma, oturup-kalkmada güçlük ile başlar ve zaman içinde daha da ağırlaşır. Etkilenen bireyler 18-20 yaş arasında kalp veya akciğer yetmezliğine bağlı komplikasyonlar sebebi ile ölürlür (25, 26).

Hasta serumunda, kreatin fosfokinaz (CPK) ve laktik dehidrogenaz (LDH) değerlerinin yükselmesi, elektromyografi (EMG) ve kas biyopsi sonuçları hastalık tanısını destekleyen önemli kriterlerdir.

BMD ise, DMD nin allelik, hafif bir formudur ve daha ender görülür. Hastalığa, distrofini kodlayan ve Xp21 kromozomuna lokalize olmuş gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlar sebep olur. Olguların, %50-60'ında hastalık etkeni olan mutasyon, ekson delesyonlarıdır (27). Duplikasyonlar vakaların sadece %6'sında görülür (28). Geri kalan durumlarda hastalık etkeni nokta mutasyonlarıdır. DMD/BMD mutasyon çeşitleri ve frekansları etnik varyasyon göstermez.

2.5 mega bazçiflik (Mbç) uzunluğu ile, distrofin geni insan genomunun, bugüne kadar izole edilmiş olan en büyük genidir. Bu özelliği dolayısı ile gen içi rekombinasyon riski oldukça fazladır. İndirekt analiz (bağlantı analizi) kullanımı sırasında, rekombinasyon olasılığı, göz önünde bulundurulması gereken faktörlerden biridir.

Hemofili A ve Hemofili B : Her iki hastalık gaubunda da, kanın pıhtılaşmamasına bağlı olarak hayati komplikasyonlar meydana gelir. Hemofili A, pıhtılaşma zincirinde rolü olan ve Xq28 kromozom bölgesine lokalize genin kodladığı faktör VIII proteinine, hemofili B ise yine aynı zincirde fonksiyonel olan ve Xq27 kromozom bölgesine lokalize genin kodladığı faktör IX proteinine ait gen bölgelerinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanır (29, 30). Toplumda görülme frekansları, sırası ile, 1/5000-10000 ve 1/30000'dir. Her ikisinde de saptanmış mutasyonlar olmasına karşın ilginç bir şekilde bu mutasyonların aileye özel olduğu anlaşılmış dolayısı ile hastalarda direkt mutasyon analizi ile tanıya gidilmesi zorlaşmıştır (31, 32). Dolayısı ile, şu anda bu hastalıklar için araştırma bazında uygulanan mutasyon tarama tekniklerinin dışında, rutin olarak en sık uygulanan metod, gen içi ve gen dışı markörler kullanılarak yapılan bağlantı analizidir.

Bununla birlikte, hemofili A olgularında ağır fenotipe yol açan, faktör VIII geninin 22. intron bölgesinin (İnt22h) inversiyon mutasyonuna oldukça sık rastlanmaktadır.

Bütün bu hastalıklarda, mutasyonun belirlendiği durumlarda taşıyıcılık tanısı ve prenatal tanı %100 kesinlikle verilebilir. Bununla birlikte ailede kalıtılan mutasyon tespit edilememişse, taşıyıcılık tanısı ve prenatal tanı ancak bağlantı analizi ile yapılabilir.

Bölümümüzde çalışılan bütün hastalıklarda, analizini yaptığımız mutasyonların ismi, her bir mutasyonun toplum frekansı ve analiz yöntemleri Tablo 1'de verilmiştir. Mutasyon tespit edilemeyen ailelerde yapılan bağlantı analizi sırasında kullanılan markörlerin isimleri ise Tablo 2'de yer almaktadır.

KALITSAL HASTALIKLARIN MOLEKÜLER TANISINDA KULLANILAN TEKNİKLER

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) DNA'nın bir bölümünü in vitro ortamda çoğaltıp, maniple edilir hale getirmek için kullanılan hızlı bir yöntemdir. PCR'ın kullanım alanı gittikçe artmaktadır. Bu yöntem, genetik hastalıklarda, DNA'da mevcut mutas-

yonların ve polimorfizmlerin bulunmasında; enfeksiyon hastalıklarında patojen organizmalara ait DNA'nın veya RNA'nın varlığını ve miktarını göstermede büyük kolaylık sağlar. PCR tekniği, DNA'nın istenilen bölgesinin, 20-30 bazlık spesifik oligonükleotid primerler kullanılarak, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz olan Taq DNA polimeraz enzimi ile çoğaltılmasına dayanır. PCR, diğer analiz sistemlerine geçmek için hızlı ve duyarlı bir ara metod olarak kabul edilir.

Bölümümüzde kullanılan analiz sistemleri iki ana başlık altında toplanır. Bunlar Doğrudan Analiz ve İndirekt Analiz (Bağlantı Analizidir. Bu analiz sistemleri, kendi içlerinde gruplara ayrılır.

A. Doğrudan Analiz (bilinen mutasyonların taranması)

1. PCR sonrası doğrudan inceleme

a. Çoklu gen amplifikasyon sistemleri (MI, Mil) : DMD/BMD hastalarının delesyon analizlerinde kullanılan primer mbderidir. Hastalığa neden olan delesyonların, 2500 kilo bazlık distofin geninin iki ayrı bölgesinde lokalize olduğu saptan-

Tablo 1. Moleküler Genetik Birimi'nde Rutin Çalışma Kapsamında Olan Mutasyonlar

Hastalık ismi	Kalıtım Şekli	Mutasyon ismi	Mutasyon çeşidi	Türk populasyonunda görüme frekansı (%)	Kullanılan yöntem		
DMD/BMD CF	X'e bağlı resesif Otozomal resesif	ekson delesyonu	Makro delesyon	50-60	MI ve MII PCR		
		ΔF508	Mikro delesyon	15.38	Heterodupleks		
		1677delTA	Mikro delesyon	5.13	Heterodupleks		
		W1282X	Substitüsyon	1.28	REA		
		N1303K	Substitüsyon	1.28	REA		
		V520F	Substitüsyon	?	REA		
		S549X	Substitüsyon	?	REA		
		R560T	Substitüsyon	?	ASO		
		G542X	Substitüsyon	2.56	ASO		
		R349X	Substitüsyon	?	REA		
		2083AA→G	Substitüsyon	4.91	Heterodupleks		
		2043delG	Mikrodelesyon	1.64	Heterodupleks		
		CFTR-2,3 del (ekson 2 ve 3 delesyonu)	Mikrodelesyon	?	Direkt PCR		
		β-talasemi	Otozomal resesif	5T varyasyonu	T insertion	?	ARMS (infertilite)
				IVS+110	Substitüsyon	40.1	ARMS, RDB
IVS-H	Substitüsyon			5.1	ARMS, RDB		
IVS-I-5	Substitüsyon			1.1	ARMS, RDB		
IVS+6	Substitüsyon			10.1	ARMS, RDB		
IVS+116	Substitüsyon			0.2	REA		
IVS-II-1	Substitüsyon			4.9	ARMS, REA, RDB		
IVS-II-745	Substitüsyon			5.1	ARMS, REA, RDB		
Cd39	Substitüsyon			3.8	REA, RDB		
FSC-5	Mikro delesyon			2.1	REA, heterodupleks, RDB		
FSC-6	Mikro delesyon			0.6	REA, heterodupleks, RDB		
FSC-8	Mikro delesyon			5.5	Heterodupleks, RDB		
FSC8/9	İnseriyon			1.2	Heterodupleks, RDB		
HbS	Substitüsyon			4.4	REA, RDB		
HbC	Substitüsyon			?	RDB		
-87	Substitüsyon	0.8	RDB				
-30	Substitüsyon	3.1	ARMS				
Faktör V eksikliği	Otozomal resesif	FV-Leiden	Substitüsyon	-	REA		
SMA	Otozomal resesif	SMN1 ekson 7-8 del.	Makro delesyon	85	REA		
NAIP	Otozomal resesif	NAIP ekson 5-6 del.	Makro delesyon	15	İkili mutipleks PCR		
Akondroplazi	Otozomal dominant	1138 G→A/C	Substitüsyon	90-98	REA		

Tablo 2. Moleküler Biyoloji Ünitesi'nde Rutin Çalışma Kapsamında Kullanılan Bağlantı Analiz Markörleri

Hastalık ismi	Kalıtım Şekli	Polimorfizm İsmi (Markör İsmi)	Markör Tipi
DMD/BMD CF	X'e bağlı resesif	PERT87.8/Taq I	RFLP
		PERT87.15/Xmn I	RFLP
		PERT87.15/Bam HI	RFLP
		I 38/Taq I	RFLP
		5'DYS I	VNTR
		5'DYS II	VNTR
		5'DYS III	VNTR
		Str 44	VNTR
		Str 45	VNTR
		Str 49	VNTR
		Str 50	VNTR
		3' (CA) _n	VNTR
		Hemofili A	X'e bağlı resesif
St 14	VNTR		
Intron 13	VNTR		
Hemofili B	X'e bağlı resesif	Intron d/Taq I	RFLP
		+8kb3'/Hha I	RFLP
CF	Otozomal resesif	Intron α/Dde ±50bp insersiyon	RFLP
		1540A→G/Hph I	RFLP
		IVS8 (CA) _n	VNTR
		IVS 17b (CA) _n	VNTR
ARPKD	Otozomal resesif	IVS 17b (TA) _n	VNTR
		D6S1714	VNTR
		D6S1024	VNTR
		D6S465	VNTR
		D6S466	VNTR

miştir. Bu bölgelere hot-spot bölge denilir. Çoklu gen amplifikasyon sistemleri, hot-spot bölgesi içinde bulunan 9 ekson bölgesinin çoğalmasını sağlayan iki setten oluşur. Normal bireylerde 9 bölgenin amplifikasyonu beklenir. Delesyonlu bireylerde ise, delesyonlu bölge/bölgeler amplifikasyon negatif görülür.

b. ARMS (Allele Refractory Mutation System) PCR: Herhangi bir restriksiyon enzim kesim bölgesi değişikliğine neden olmayan nokta mutasyonlarının tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Hasta bireye ait DNA örneği, mutasyonlu ve normal bölgeye özgü primerler ile iki farklı tüpte, aynı reaksiyon koşulları altında amplifiye edilir. Ayrıca, her iki reaksiyon tüpünün içinde, amplifikasyon kontrolü için kontrol-primerler kullanılır. Amplifikasyon sonucu, kontrol-bölgenin tüm bireylerde amplifikasyon pozitif olması beklenir. Bununla birlikte, homozigot mutant bireyler, mutant bölge için amplifikasyon pozitif; homozigot normal bireyler, normal bölge için amplifikasyon pozitif ve heterozigotlar hem mutant hem de normal bölge için amplifikasyon pozitif olurlar.

c. ASA (Allele Specific Amplification ; Allele Özgü Amplifikasyon): Yöntemin temeli, mutasyonun bulunduğu bölgeye özgü, ya da bir başka

değiş ile, allele özgü primer kullanmaya dayanır. Ayrıca, amplifikasyonun kontrolü için kontrol primerleri kullanılır. İncelenen örnek mutasyonu taşıyorsa, hem kontrol bölge hem de mutasyona özgü bölge için amplifikasyon pozitif görülür; mutasyonu taşımayan ise, sadece kontrol bölge için amplifikasyon pozitifdir.

Heterozigot bireylerde, allellerden birinde mevcut olan mutasyon sebebi ile, homozigot mutantlarda olduğu gibi, her iki bölge için amplifikasyon pozitif görülür.

2. PCR ürününün değişik işlemlerden geçirdikten sonra incelenmesi

a. REA (Restriksiyon Enzim Analizi) : Tek bir baz çiftinin değişimi ile oluşan bir mutasyon restriksiyon enzim bölgesinin ortadan kalkmasına veya yeni bir kesme bölgesi oluşmasına neden olabilir. Restriksiyon enzim analizi ile tespit edilebilen mutasyonun saptanmasında kullanılan yaklaşım, mutasyonun bulunduğu bölgenin PCR ile çoğaltılması ve çoğaltılan DNA'nın mutasyona özgü restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra analiz edilmesinden ibarettir.

b. Heterodupleks oluşum analizi ; 1-5 nükleotidlik delesyon mutasyonunu jel üzerinde saptamak oldukça güçtür. Fakat homozigot normal ve mutant bireylere ait DNA örnekleri, aynı tüp için-

de amplifiye edildikleri takdirde, heterodupleks denilen yapıları oluştururlar. Heterodupleksler, tam uyuşmayan baz çiftlerinin varlığı nedeni ile homoduplekslere kıyasla farklı bir elektroforetik özellik gösterir.

c. RDB (Reverse dot blot) (fi-globin strip assay; Vienna-Lab) : Kit, 14 ayrı mutasyonun kısa sürede taranmaqsını sağlamaktadır. Kite ait prosedür içinde DNA ekstraksiyonu, PCR, hibridizasyon ve renklendirme reaksiyonu yer almaktadır. Kitten çıkan DNA ekstraksiyon çözeltileri kullanılarak elde edilen genomik DNA, yine kitin içinde bulunan PCR amplifikasyon mixleri ile karıştırılarak PCR multipleks reaksiyonuna sokulur ve reaksiyon sonucu biyotinlenir. Sonuç olarak PCR ürünü strip üzerinde bulunan immobilize mutant ve normal oligonükleotid problemler ile hibridize edilir. Bağlanan biyotinli diziler streptavidin-alkalen fosfataz ve renklendirme substratları kullanılarak belirlenir. Hastaya ait DNA'da taranan mutasyonlardan biri var ise analiz sonucunda strip üzerinde mevcut mutant prob bölgesinde bir renk belirir. Normal problemlerin bağlı olduğu bölgelerde ise mutasyonsuz normal alleller bağlanır.

B. İndirekt Analiz (Bağlantı Analizi) : Bu analiz mutasyonun tespit edilemediği durumlarda aile içinde anne/anne+baba ve hasta çocuk arasındaki allel geçişlerinin belirlenmesine dayalıdır. Bunun için RFLP ve/veya VNTR markörleri kullanılır.

1. Restriction Fragment Length Polymorphisms; Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmleri (RFLPs) : Hastalığa neden olan mutasyonların tanımlanmadığı durumlarda aile içinde hastalık ile birlikte kalıtılan allelin dolaylı bir yaklaşım kullanılarak tespit edilmesidir.

DNA polimorfizmleri, DNA üzerinde, hastalığa neden olmayan nükleotid değişimleri olarak tanımlanır. Bu doğal farklılıklar kuşaktan kuşağa Mendel yasalarına göre aktarılırlar. Eğer bu polimorfizmler, bir restriksiyon enzimi kesme bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden olursa kolaylıkla saptanabilirler. DNA, bu enzim ile kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur. DNA polimorfizmlerinin bulunduğu bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltmanın mümkün olması, bir bölgenin kolaylıkla jel elektroforezi ile doğrudan analizine olanak sağlamıştır. Restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmleri (RFLP) kalıtsal hastalıkların prenatal tanı ve taşıyıcılık tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır.

RFLP analizinin temeli, anne ve babanın iki ayrı alleli taşıyan iki kromozomun birbirinden ayırılmasına ve aile içinde daha önceden bulunan hasta bir çocuk yardımı ile hangi kromozomların riskli olduğunun, yani hangi kromozomun mutasyona uğramış alleli (bozuk geni) taşıdığına saptanmasına dayanır. RFLP analizinde, iki kromozom birbirinden, gen içinde veya gen yakınında bulun-

nan bir DNA polimorfizminin bulunması (+) ya da bulunmaması (-) ile ayrılır.

Analizin kesinliği kullanılan polimorfik markörün, hastalık loküsüne yakınlığı ile doğrudan ilişkilidir. Hastalık loküsüne mümkün olduğunca yakın gen içi markörlerin kullanımı tanının kesinliğini %100'e kadar artırır. Hastalığa neden olan genin, DMD/BMD'de olduğu gibi, çok büyük olması durumunda ise, gen içi markörler kullanılsa bile tanının kesinliği %95 civarındadır. Kullanılan genetik markör ve hastalık loküsü birbirine ne kadar yakınsa rekombinasyon olasılığı o kadar küçüktür.

X kromozomuna bağlı olarak seyreden kalıtsal hastalıklarda RFLP analizinin uygulanabilmesi için ön koşul annenin herhangi bir polimorfizm için informatif (+/-) olmasıdır. Otozomal kalıtsal hastalıklarda ise, RFLP analizinin uygulanabilmesi için hem annenin hem de babanın informatif bulunması ve riskli kromozomların belirlenmesi gerekmektedir. Riskli kromozomun belirlenmesinde ise, daha önce dünyaya gelmiş hasta ve sağlıklı çocukların analizi ve hatta bazı durumlarda yakın akrabaları da içeren detaylı aile analizi gereklidir.

RFLP analizi, özellikle hastalığın kalıtsal olarak kuşaktan kuşağa geçtiği bilinen durumlarda kolaylıkla taşıyıcı tanısı için kullanılabilir. Sporadik olgularda ise taşıyıcı tanısı dikkatle verilmelidir.

2. Variable Number of Tandem Repeats; Değişken Sayıda Tandem Tekrarları (VNTRs) :

Dolaylı bir yaklaşım kullanılarak prenatal tanı ve taşıyıcılık tanısı verilmesinde kullanılan bir yöntemdir. VNTR yönteminde kullanılan DNA polimorfizmleri, farklı sayılardaki tandem tekrarlarıdır. Her tandem tek bir birim olarak ele alınır. PCR için kullanılan primerler, bu birimi sınırlayacak nükleotid dizisine sahiptir. PCR sonucu oluşan ürünlere jel üzerinde bakarak birim sayısından kaynaklanan uzunluk farkına göre allel geçiş durumu tespit edilebilmektedir. RFLP analizinde olduğu gibi, X kromozomuna bağlı olarak seyreden kalıtsal hastalıklarda VNTR analizinin uygulanabilmesi için ön koşul annenin herhangi bir polimorfizm için informatif olmasıdır. Otozomal kalıtsal hastalıklarda ise, VNTR analizinin uygulanabilmesi için hem annenin hem de babanın informatif bulunması ve riskli kromozomların belirlenmesi gerekmektedir.

YORUM

Özetle, bugüne kadar Düzen Laboratuvarı Moleküler Biyoloji Ünitesi, proje kapsamında başlatılmış olan hastalıklarda var olan rutin analiz yöntemlerinin uygulamaya sokulması, gerek hasta ailelerine gerekse doktorlara en kısa zamanda sonuç verilmesi ve genetik danışma zincirinde üzerine düşen görevi en doğru şekilde yerine getirebilmesi için gerekli disiplini kurmuş ve 1996 senesinden

bu yana bu disiplini korumuştur. Bununla birlikte, kalıtsal hastalıkların yukarıda bahsi geçenlerle sınırlı kalmadığının ve toplum sağlığı için tehdit oluşturan daha birçoklarının olduğunun bilincindedir. Bu sebeple amacımız, araştırma kapsamında yapılması gereken çalışmaların laboratuvarımız bünyesinde gerçekleştirilebilmesi için yeni, duyarlı ve hızlı DNA analiz yöntemlerini uygulamaya sokmaktır ve çalışma spektrumumuzu genişletmektir.

KAYNAKLAR

1. National Center for Biotechnology Information (NCBI); On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM); HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/disp-mim?219700>.
2. Cystic Fibrosis Mutation Database at HYPERLINK <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>
3. Lissens W, Liebaers I: The genetics of male infertility in relation to cystic fibrosis. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 1997; 11: 797-817.
4. Costes B, Girodon E, Ghanem N et al: Frequent occurrence of the CFTR intron 8 (TG)_n 5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Eur J Hum Genet*, 1995; 3: 285-93.
5. Onay T, Topaloglu O, Zielenski J et al: Analysis of the CFTR gene in Turkish cystic fibrosis patients: identification of three novel mutations (3172delAC, P1013L and M1028I). *Hum Genet*, 1998; 102: 224-30.
6. National Center for Biotechnology Information (NCBI); On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM); HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/disp-mim?141900>
7. Huisman THJ, Carver MFH, Baysal E: A Syllabus of Thalassemia Mutations (1997), The Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, USA, 1997.
8. Çavdar A, Arcasoy A: The Incidence of P-Thalassaemia and Abnormal Hemoglobin in Turkey," *Açta Haematologica*, 1971; 45:312-8.
9. Tadmouri GO, Tüzmen S, Özçelik H et al: Molecular and Population Genetic Analyses of β -Thalassaemia in Turkey. *Am J Hem*, 1998; 57:215-20.
10. National Center for Biotechnology Information (NCBI); On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM); HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/disp-mim?253300>
11. National Center for Biotechnology Information (NCBI); On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM); HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/disp-mim?253550>
12. National Center for Biotechnology Information (NCBI); On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM); HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/disp-mim?253400>
13. Melki J, Sheth P, Abdelhak S et al: Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet*, 1990; 336:271-3.
14. Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH et al; Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature*, 1990; 345:823-5.
15. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S et al: Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Celi*, 1995; 80:155-65.
16. Roy N, Mahadevan MS, McLean M et al: The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Celi*, 1995; 80:167-78.
17. Savaş S. The Molecular Analysis of SMA in Turkish Population. PhD Thesis, 1999.
18. National Center for Biotechnology Information (NCBI); On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM); HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/disp-mim?227400>
19. Alhenc-Gelos M, Gandrille S, Aubry ML et al: Unexplained thrombosis and factor V Leiden mutation. *Lancet*, 1994; 344:555-6.
20. National Center for Biotechnology Information (NCBI); On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM); HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/disp-mim?263200>
21. Guay-Woodford LM, Muecher G, Hopkins SD et al: The severe perinatal form of autosomal recessive polycystic kidney disease maps to chromosome 6p21.1-p12: implications for genetic counseling. *Am J Hum Gene*, 1995; 56:1101-7.
22. Zerres K, Muecher G, Bachner L, Deschenes G et al: Mapping of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21-cen. *Nat Genet*, 1994; 7:429-32.
23. Zerres K, Muecher G, Becker J et al. Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): molecular genetics, clinical experience, and fetal morphology. *Am J Med Genet*, 1998; 76:137-44.
24. National Center for Biotechnology Information (NCBI); On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM); HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/disp-mim?100800>
25. National Center for Biotechnology Information (NCBI); On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM); HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/disp-mim?310200>
26. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D: *Metabolic and molecular basis of inherited disease*. 7th ed. Wiley-Liss Inc., 1997; p.4199.
27. Bartlett RJ, Pericak-vance MA, Koh J. et al. Duchenne muscular dystrophy: high frequency of deletions. *Neurol*. 1988; 38, 1-4.
28. Hu X, Burghes AHM, Ray PN et al: Partial gene duplications in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *J. Med. Genet*, 1988; 25, 369-76.
29. National Center for Biotechnology Information (NCBI); On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM); HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/disp-mim?306700>
30. National Center for Biotechnology Information (NCBI); On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM); HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/disp-mim?306900>
31. Tuddenham EG, Schwaab R, Seehafer J et al: Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene, second edition. *Nucleic Acids Res*, 1994; 11;22:4851-68.
32. The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site; HYPERLINK <http://europium.mrc.rpms.ac.uk/usr/WWW/WebPages/main.dir/main.htm>
33. Turkish Human Mutation Database HYPERLINK <http://bucmpe.cmpe.boun.edu.tr/hmuttr/hemb.htm>

TEŞEKKÜR

Projeye olan katkıları dolayısı ile Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı (TTGV)'na ve çalışmalarımız süresince yardımlarını esirgemeyen Boğaziçi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Betül Kırdar ve çalışma ekibine teşekkür ederiz.