

Tıpta moleküler genetik tanı ve klinik uygulamalar

Molecular genetic diagnosis and clinical applications in medicine

Sacide pehlivan¹

¹Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Özet

Teknolojideki gelişmeler ve insan genom projesinin beklenen süreden önce tamamlanması ile genetik bilgilenmemizde baş döndürücü bir artış meydana gelmiştir. Bu bilgilerin ışığında da insan sağlığı ve hastalıklarına yaklaşımda büyük bir değişim oluşmuştur. Son 20 yılda hızla gelişen yeni genetik teknoloji; hastalıkların önlenmesi, tanısı ve tedavisi için pek çok test olanağı sunmaktadır. Günümüzde, rutin tanıda kullanılan 900-1000 arası genetik testin olduğu bilinmektedir. Klinisyenler bu yeni teknolojiyi ve yaklaşımı bir an önce öğrenerek hastalarının yararına kullanmalıdır. Bu derlemede, tıpta moleküler genetik tanı ve klinik uygulamaları gözden geçirilecektir.

Anahtar kelimeler; İnsan, Moleküler Genetik Tanı, Kalıtsal Hastalıklar, DNA, PCR

Abstract

There has been an amazing increase in our acquiring genetic information by means of the technological developments and the completion of the human genome project in a shorter time than expected. Within the light of this information, there has been a great change in approaching human health and diseases. Having developed rapidly within the last 20 years, the new genetic technology provides many opportunities of test for the prevention, diagnosis and treatment of diseases. Today it is known that there are 900 to 1000 genetic tests used in routine diagnosis. Clinicians should learn this new technology and approach in a very short period of time and use them for the benefit of their patients. Molecular Genetic Diagnosis and Clinical Applications in Medicine will be reviewed in this collection.

Key words; Human, Molecular Genetic Diagnosis, Inherited Disease, DNA, PCR

Gaziantep Üniversitesi Tıp Dergisi 2007, 1:17-21

GİRİŞ

Genetik testlerin öyküsü DNA ile başlar. DNA; tüm çekirdekli hücrelerde bulunan, hücre tarafından üretilen proteinlerin üretim bilgilerini saklayan kimyasal bilgi bankasıdır. Her insan hücresinde 46 molekül çift zincirli DNA vardır ve tüm hücreler aynı DNA'yı taşır. Herbir DNA molekülü 50-250 milyon baz içeren çift sarmal yapıdadır (Şekil 1). Aktif genler hücre tipine göre farklıdır. Temel hücre gereksinimleri için ise sürekli aktif genler vardır. GEN; Protein zincirindeki amino asitleri kodlayan üçlü nükleotidleri taşıyan DNA parçası olup, DNA'nın aktif alt ünitesi olarak tanımlanabilir(1).

✉ Yazışma Adresi:

Sacide PEHLİVAN, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tlf: 0.342 3606060 Gaziantep / Türkiye

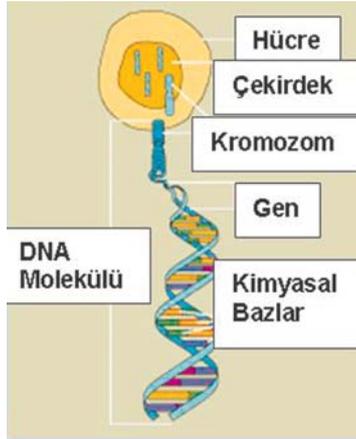
E-Mail : spehlivan@gantep.edu.tr

A. GENETİK TEST NEDİR?

Klinik amaçlarla kalıtsal hastalık yapan genotipleri, mutasyonları, fenotipleri saptamak için DNA, RNA, kromozom, protein ve çeşitli metabolitlerin analiz edilmesine genetik test adı verilebilir(2). Kromozomların incelenbilmesi için canlı ve bölünen hücreler gereklidir. DNA analizi için ise hücrenin canlı olması gerekmez. Bu nedenle; DNA testleri genomun geniş bir zaman boyutunda, ayrıntılı olarak incelenbilmesini sağlamıştır(3).

B. GENETİK HASTALIKLAR

Temel olarak 5 grupta toplanabilir ve analizleri için farklı genetik yöntemler kullanılabilir. Bunlara örnek olarak; Sitogenetik, moleküler sitogenetik, moleküler genetik ve array Comparative Genom Hibridizasyonu (CGH)'i sayabiliriz. İstenilecek testler genetik hastalık grubuna göre değişiklik gösterir. Tek gen hastalıkları klasik sitogenetik yöntemlerle değil, moleküler genetik yöntemlerle analiz edilir (4-7).



Şekil 1. Hücre içindeki çekirdek DNA'sı (2).

1. Tek Gen Hastalıkları: Ör: Talasemi; Moleküler genetik teknikler kullanılarak analizi yapılır (8-9).

2. Kromozomal Bozukluklar: Ör: Down sendromu; Sitogenetik, Moleküler sitogenetik, Moleküler Genetik ve Array CGH yardımıyla analiz edilebilir (4-5-7-10).

3. Poligenik-Multifaktöriyel Kalıtım: Ör: Tip I ve II diyabet; Moleküler genetik analizi yapılabilir (11).

4. Mitokondrial Kalıtım: Ör: Leberin optik atrofisi; Moleküler genetik yöntemlerle analizi yapılabilir (12).

5. Somatik Mutasyonlar: Ör: Kanserler, Sitogenetik; Moleküler sitogenetik, Moleküler genetik yöntemler yardımıyla analizi yapılabilir (13-15).

C. MOLEKÜLER GENETİK TESTLERDE KULLANILAN TEMEL METODLAR

a) Moleküler hibridizasyon; DNA'nın çift sarmal dizisi ısıtarak birbirinden ayrılır, soğutulunca benzer DNA veya RNA dizisi ile uygun ortamda bir araya gelir (Şekil 2).

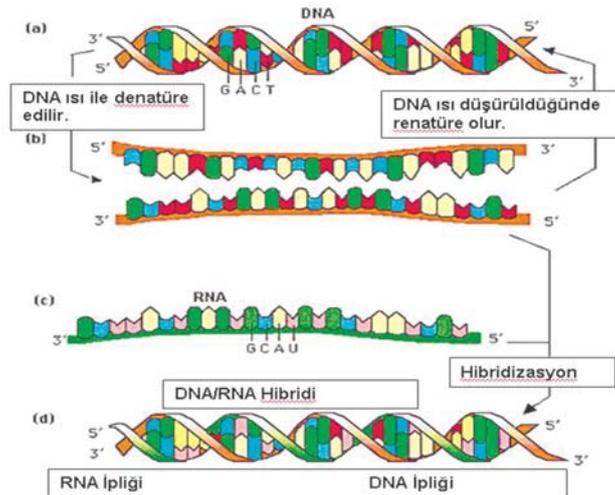
b) Kesici Enzimler (Restriksiyon enzimleri); Bakterilerde bulunan ve yabancı DNA'lara karşı korunmaya yarayan enzimlerdir ve buldukları organizmaya göre adlandırılırlar (EcoRI, *Escherichia Coli* den elde edilir). Kesici enzimlerle DNA fragmentleri elde etmek (RFLP) bu fragmentleri vektörlerde klonlamak mümkündür (Şekil 3). Tüm genomun polimorfik kesici enzim bölgelerini (marker) gösteren haritalarda önceki moleküler genetik analizlerde kullanılmıştır (16).

c) Gen Probları (DNA fragmentleri); Oligonükleotid problemler 19-20 bazlık küçük DNA fragmentleri tek baz değişikliğini bile tanıyabilir (2).

D) DNA ANALİZİNDE KULLANILAN BAZI YÖNTEMLER

Rutin DNA analizinde kullanılan pek çok yöntem mevcuttur. Aşağıda en çok kullanılan yöntemlere örnekler verilmiştir (17).

1. Restriction Fragment Length polymorphism (RFLP)
2. Polymerase chain reaction (PCR)
3. Southern Blot Analizi
4. DNA Dizi Analizi
5. Single strand conformational polymorphism (SSCP)
6. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)
7. Heterodubleks analizi
8. Chemical mismatch cleavage (CMC)
9. DNA chipi



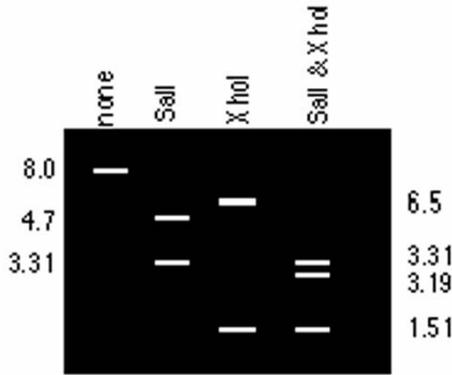
Şekil 2. Moleküler hibridizasyonun aşamaları (16).

E) DNA ANALİZİ İLE TANI NASIL YAPILIR?

Çalışılacak hastalığa ait mutasyon biliniyorsa, ilgili yöntem kullanılarak analiz yapılabilir. Ama mutasyon bilinmiyorsa ise ilgili gen bölgesinin geçişinin analizi yada DNA'sının analizi kullanılarak indirekt tanısı mümkündür (18).

a) Direkt DNA Analizi ile Tanı

DNA' da bilinen mutasyonun analiz edilerek gö



Şekil 3. Kesici enzimlerle kesilmiş, jel elektroforezi yapılmış ve etidyum bromür ile boyanmış DNA fragmentleri (2).

b) İndirekt DNA Analizi (Bağlantı Analizleri)

Mutasyonun gösterilemediği durumlarda gen içinde veya dışında gen ile birlikte kalıtılan polimorfik markörlerle konur. Ailenin informatif olması gerekir ve ailedeki başka bireylerden de DNA'nın gerekliliği söz konusudur. Aile informatif değil ise veya rekombinasyon var ise bağlantı analizi ile tanı konulamaz (20).

F) RUTİN TANI VERİLEN MOLEKÜLER GENETİK ANALİZLERE ÖRNEKLER

F.1) TROMBOZ PANELİ

a) **Faktör V Leiden Polimorfizmi;** Tromboz için birkaç genetik faktörün varlığı saptanmıştır. Bunların en önemlisi pıhtılaşma faktörü V'in aktif protein C'ye direncidir (APC direnci). APC direnci damar trombozu için en sık görülen risk faktörüdür. APC direnci vakalarının %90'ından Faktör V Leiden mutasyonu sorumludur. Bu mutasyon varlığında faktör V'in APC tarafından inaktive edilmesi engellenir ve kanın yoğun pıhtılaşması meydana gelir. Faktör V geninde Leiden mutasyonu taşıyıcıları ömür boyu yüksek derecede derin ven trombozu riskine sahiptirler. Faktör V Leiden için homozigot genotip seyrek olsa da, batı ülkelerinde nüfusun %15'i Faktör V Leiden için taşıyıcıdır ve bu durum kişisel tromboz riskini 5 -10 kat artırır. Homozigot Leiden mutasyonunun penetransı %80, heterozigot mutasyonun penetransı % 12- 20 civarındadır.

b) Faktör II (Protrombin) G20210A Mutasyonu;

Faktor II (protrombin) G20210A mutasyonu kalıtsal trombozun Leiden polimorfizminden sonra gelen en sık nedenidir. Bu plazmadaki protrombin düzeyinin yükselmesine neden olarak tromboz olasılığını artırır. Sigara, obezite, hipertansiyon ve diyabet gibi risk faktörleriyle birleştiğinde miyokard enfarktüsü riskini de artırdığı gösterilmiştir. Ailede tromboz hikayesi varsa, fetus büyümesinde gerilik ve plasenta ayrılması (placenta abruptio) ile seyreden gebelik komplikasyonu varsa protrombin mutasyon testi yapılması tavsiye edilir. Tek aleldeki G20210A mutasyonu tromboz riskini 3-11 misli artırır. Homozigot protrombin mutasyonunda veya Faktör V Leiden mutasyonu ile beraber bulunduğu venöz tromboz riski çok daha fazla artmaktadır.

Metilentetrahidrolat redüktaz (MTHFR);

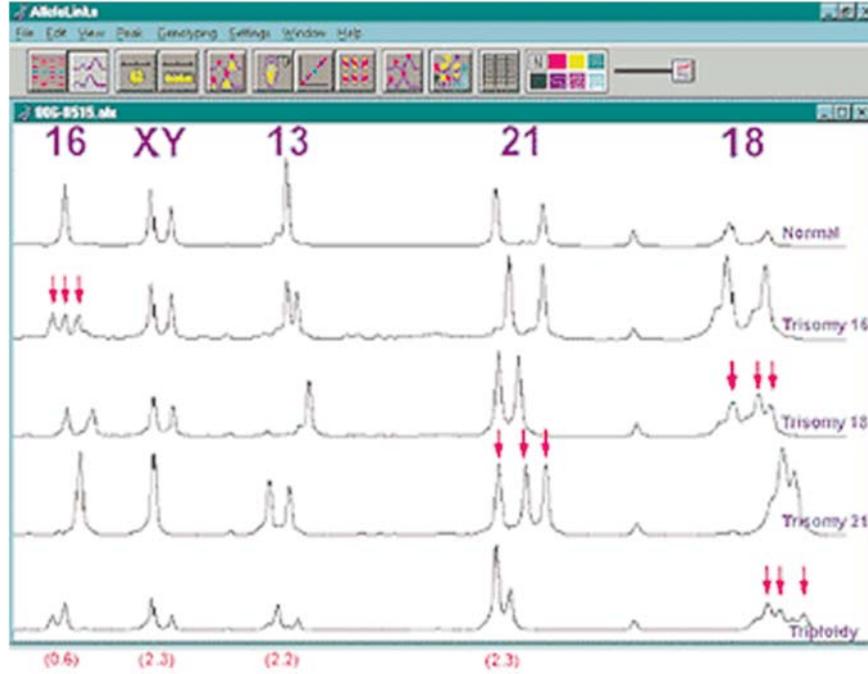
MTHFR geninde C677 mutasyonunun homozigot olması plazma homosistein düzeylerinde yükselmeye neden olur. Hipertansiyon, hiperlipidemi veya diyabet gibi diğer risk faktörleri olmasa dahi homozigot C677 mutasyonunun tek başına kalp damar hastalığı riskini 3 misli artırdığı saptanmıştır. A1298C / C677T bileşik heterozigot durumun da homosistein düzeylerinde yükselmeye neden olduğu bildirilmiştir. Homosistein yüksekliğini araştırmak için her iki mutasyonun da test edilmesi tavsiye edilmektedir. Bebeklerde doğumsal bir hastalık olan nöral tüp defekti riskinin de homozigot C677T veya bileşik heterozigot A1298C / C677T mutasyonları ile arttığı ileri sürülmektedir. Homosistein düzeylerinde ve nöral tüp defekti riskindeki artış sadece MTHFR mutasyonlarına bağlı olmayıp toplumun genetik yapısına, diyetlere ve yaşam biçimine göre değişiklik gösterir. Nöral tüp defekti, homosisteinemi, erken yaşta kalp damar hastalığı, erken yaşta venöz tromboz öyküsü olanlarda MTHFR mutasyonlarının testi önerilmektedir. Bu hastalarda folik asit tedavisinin başarılı olduğu gösterilmiştir.

F.2) AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ (FMF)

Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF), en sık görülen periyodik ateş ataklarından birisidir. Türkler, Kuzey Afrikalılar, Irak Musevileri ve Ermenilerde yaygındır. Sebebi belirsiz ateş atakları ile birlikte seyreden ve iki-üç gün devam eden karın ağrısı (peritonit) ve/veya akciğer ağrısı (plevral ağrı) ve/veya ayak bilekleri ve diz kapaklarında eklem iltihabı (artrit) olan hastalar için FMF şüphesi bulunmaktadır. Kan testlerinde yüksek eritrosit sedimentasyonu, lökosit sayısında ve fibrinojen miktarında artış gözlenir. Hastalığın semptomları ve şiddeti hastalar arası farklılık gösterir, hatta bazı durumlarda aile bireylerinde bile hastalık seyirlerinde farklılıklar olabilir. Vakaların %70'inde ilk belirtiler 15 yaşına kadar ortaya çıkar. Uzun süre tedavi edilmediği takdirde amiloid birikmesi nedeniyle böbrek yetmezliğine neden olur. Bazen de diğer belirtiler görülmeden ilk olarak amiloidoz gözlenir.

F.3) QF-PCR ile TRİZOMİ TANISI

Yeni moleküler testlerin kullanıma girmesiyle kromozomal bozuklukların prenatal tanısında hızlı (24-48 saat) ve güvenilir şekilde QF-PCR ve FISH yardımıyla sonuçlar elde edilebilmektedir. Her iki metod da trizomi 21, 13, 18 ve sex kromozom anomalileri için (Kleinfelter, Turner) kullanılmaktadır (Şekil 4)(10).



Şekil 4. QF-PCR yardımıyla trizomilerin tanısı

ÖZELLİKLERİ

- Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction (QF PCR); DNA kısa tekrar dizilerinin kullanılmasıyla uygulanan, kantitatif bir yöntemdir.
- DNA örneği florasan primerler kullanılarak çoğaltılır, PCR ürünleri kapiller elektroforezde (ABI 310 Genetic Analyser) ayrıştırılarak analiz yapılır. Bilinen tüm kromozomal anomalilerin %99'unu kapsamaktadır.
- Daha az örnek (amniyon sıvısı 2-4cc) alınmaktadır.
- Ekonomiktir.
- 24-48 saatte sonuç vermektedir.
- Gelecekte maternal kandan fetal hücre tayini ile non invaziv prenatal testler arasına girmeye aday olarak kabul edilmektedir.

F.4) POLİMORFİZM

İnsan değişkenliğinin temelini oluşturur. Çevresel uyarılara yanıtı da içeren polimorfizmin klinik fenotipe etkileri istatistik olarak, genetik-epidemiolojik çalışmalarla belirlenir²¹.

Ör; Tekli Nükleotid Polimorfizmleri (SNP); Genomdaki tek nükleotid değişiklikleridir (AAGGCTAA ATGGCTAA).

- * Genomda 3-500 bazda bir gözlenir.
- * Toplumun en az %1 inde olan tek nükleotid değişikliği SNP olarak kabul edilir.
- * Genetik varyasyonların %90'undan sorumludur.
- * Hücre fonksiyonunu genel olarak etkilemezler, etkenlere verilen yanıtları değiştirebilirler.
- * Evrimsel olarak stabildirler, kuşaktan kuşağa geçerler.
- * Etkenlere yanıtları epidemiyolojik olarak değerlendirmede, biyomedikal, farmakogenetik çalışmalarda uygundur.

G.) MİKRO-CHİP (microarray) TEKNOLOJİSİ

1995 yıllarında geliştirilen fonksiyonel genomiksin anlaşılmasına ışık tutan teknolojidir. Microarray; üzerinde binlerce gen dizisinin immobilize edildiği, yapıştırıldığı ya da fikse edildiği küçük, katı desteklerdir. Genlerin immobilize edildiği destek materyalleri; cam mikroskop slideları, silikon çipler ya da naylon membranlar olabilirler. "ARRAY" belirli bir düzen içerisinde dizmek demektir. Mikroarrayler ile DNA, cDNA ya da oligonükleotit protein vb analizi yapılabilir. Tüm genomun ve ekspresyon ürünlerinin (RNA, protein) tek bir chip üzerinde incelenmesini sağlayan teknoloji olup hastalık tanısı, farmakogenomik, gen keşfi vb. alanlarda büyük öneme sahiptir (22). Microarraylerin Uygulama Alanları;

- Gen Ekspresyon Seviyelerindeki Değişiklikleri Belirlenmesi,
- Tümör sınıflandırması, risk belirlenmesi ve prognozun belirlenmesi
- Genomik Kazanım ve Kayıpların Belirlenmesi,
- İlaç geliştirme, ilaç etkilerinin çalışılması ve terapi geliştirilmesi
- DNA'daki Mutasyonların Belirlenmesi,
- İlaç geliştirme, terapi geliştirme ve kanser oluşumunun yol izinin belirlenmesi şeklinde kısaca özetlenebilir.

SONUÇ

Moleküler genetik analizler sadece DNA düzeyinde değil RNA ve protein üzerinde de yapılarak hastalıkların tanısı, prognozunun belirlenmesi, tedavinin yönlendirilmesinde de giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. Gelecekte bu tekniklerin hasta başında yapılabilecek kadar basit bir hale geleceği muhakkaktır. Ancak en önemli eksiklerimiz sağlıklı türk popülasyonda bu konularla ilgili çalışmalarımızın az olmasıdır. Bu eksikliğimizi giderecek DNA ve doku bankalarının kurulması, bu alanlarda toplumumuza daha yararlı tanı ve tedavinin yönlendirilmesine ilişkin testlerin oluşturulmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. Molecular biology of the cell. Fourth Ed. Newyork. Garland Publishing Inc. 2000.
2. Ozkinay F. Moleküler Genetik Tanı. Ders Notları, EgeÜniversitesi, 2006.
3. Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. Modern Genetic Analysis. New York; c1999.
4. Marical H, Douet-Guilbert N, Bages K, et al. Second-trimester prenatal screening for trisomy 21 using biochemical markers: a 7-year experience in one cytogenetic laboratory. *Prenat Diagn* 2006; 26: 308-312.
5. Molecular cytogenetic characteristics of Down syndrome newborns. *J Hum Genet* 2006; 51: 541-547.
6. Musti M, Kettunen E, Dragonieri S, et al. Cytogenetic and molecular genetic changes in malignant mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 170: 9-15.
7. Natrajan R, Little S, Sodha N, et al. Analysis by array CGH of genomic changes associated with the progression or relapse of Wilms' tumour. *J Pathol* 2006; 13: [Epub ahead of print].
8. Zdebska E, Krawcewicz A, Adamowicz-Salach A, et al. Beta-Thalassemia in Poland. I. Mediterranean mutations in beta-thalassemia. *Pol Merkur Lekarski* 2006; 20: 53-56.
9. Baig SM, Azhar A, Hassan H, et al. Spectrum of beta-thalassemia mutations in various regions of Punjab and Islamabad, Pakistan: establishment of prenatal diagnosis. *Haematologica* 2006; 91: ELT02.
10. Allen SK, Luharia A, Gould CP, et al. Rapid prenatal diagnosis of common trisomies: discordant results between QF-PCR analysis and karyotype analysis on long-term culture for a case of trisomy 18 detected in CVS. *Prenat Diagn* 2006; [Epub ahead of print].
11. Zhao J, Ji JZ, Wang DW, et al. Detecting of mtDNA mutations at position A3243G and G3316A in patients with type 2 diabetes mellitus in Wenzhou. *Yi Chuan* 2006; 28: 1206-1212.
12. Mitochondrial D-loop variation in leber hereditary neuropathy patients harboring primary G11778A, G3460A, T14484C mutations: J and W haplogroups as high-risk factors. *Arch Med Res* 2006; 37: 1028-1033.
13. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, et al. Risk and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* 2006; 26; [Epub ahead of print].
14. Tubbs RR, Pettay J, Barry TS, et al. The specificity of interphase FISH translocation probes in formalin fixed paraffin embedded tissue sections is readily assessed using automated staining and scoring of tissue microarrays constructed from murine xenografts. *J Mol Histol* 2006; [Epub ahead of print].
15. Pehlivan S, Koyuncuoglu M, Pehlivan M, et al. Premalignant lesions of the kidney share the same genetics changes as conventional renal cell carcinoma. *World J Urol*. 2004; 22: 120-123.
<http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/images/NUCLEIC.gif>
16. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook F, Molecular Cloning a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; USA, 1983.
17. Strachan T and Andrew P. Human Molecular Genetics 2 2nd ed. New York and London; ; c1999.
18. Pehlivan S, Ozkinay F, Okutman O, et al. Achondroplasia in Turkey is defined by recurrent G380R mutation of the FGFR3 gene. *Turk J Pediatr* 2003; 45: 99-101.
19. Erdem H, Pehlivan S, Topaloglu H, et al. Allele distribution of D5S125, MAP1B5' and D5S679 microsatellite markers in Turkish spinal muscular atrophy families. *Turk J Pediatr* 1997; 39: 447-452.
20. Liu QR, Drgon T, Johnson C, et al. Addiction molecular genetics: 639,401 SNP whole genome association identifies many "cell adhesion" genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006; [Epub ahead of print]. *Arrays of Hope. Cell* 2006; 127: 657-659.