

## **ΔF508, ΔI507 ve F508C kistik fibroz mutasyonlarının gerçek-zamanlı multipleks PCR ile hızlı analizleri**

Rapid analysis of the cystic fibrosis ΔF508, ΔI507 and ΔF508C mutations by real-time multiplex PCR

Kosova B<sup>1</sup> Eroğlu Z<sup>1</sup> Yılmaz B<sup>1</sup> Gündüz C<sup>1</sup> Özel R<sup>1</sup> Sayın E<sup>2</sup>  
Çoğulu Ö<sup>3</sup> Özkınay F<sup>3</sup> Özkınay C<sup>2</sup> Topçuoğlu N<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova – İZMİR

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Bornova – İZMİR

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Bornova – İZMİR

### **Özet**

**Amaç:** Kistik fibroz genellikle çocukluk yaşlarında ortaya çıkan ve tüm ekzokrin bezlerin fonksiyon bozukluğu ile seyreden kalıtsal bir hastalıktır. Avrupa’ da yaygın olarak görülen bu hastalık kişilerin yaşam kalitesini etkilemekte ve tekrarlayan ağır solunum yolu enfeksiyonlarının açtıkları komplikasyonlar nedeniyle, erken yaşta ölüme yol açmaktadır. Kistik fibroz’ daki en yaygın mutasyon ΔF508’ dir. Bununla birlikte, binden fazla kistik fibroz gen (*CFTR*) mutasyonu tanımlanmıştır; ΔI507 ve F508C gibi. F508C ve ΔF508 mutasyonları ayrıca konjenital vas deferens agenezin gelişiminde de rol oynarlar. Çalışmadaki amacımız, aynı *CFTR* gen bölgesine düşen bu üç mutasyonu gerçek-zamanlı multipleks PCR yöntemi ile hızlı analizlerini gerçekleştirmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Ege Bölgesinde yaşayan kistik fibrozlu veya konjenital unilateral vas deferens agenezisi bulunan toplam 116 olgunun DNA örnekleri, tek bir çalışmada üç *CFTR* mutasyonun ayırıcı tanılarına gidilecek şekilde tasarlanmış olan gerçek zamanlı bir multipleks PCR yöntemiyle çalışıldı. Kullanılan yöntem ayrıca jel elektroforezi ve dHPLC yöntemleriyle de karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Çalışmanın sonunda, ΔI507 ve F508C mutasyonları için taşıyıcı olgu saptanmamasına karşılık, olguların % 6.0’ sı ΔF508 aleli için heterozigot taşıyıcı ve % 1.8’ i de homozigot hasta bulundu. ΔF508 mutasyonunun görülme sıklığı % 4.7 olarak belirlendi. Gerçek-zamanlı multipleks PCR yönteminin jel elektroforezi ve dHPLC’ den daha hızlı sonuç verdiği görüldü.

**Sonuç:** Kistik fibrozlu veya konjenital unilateral agenezisi bulunan olgularda *CFTR* ΔF508, ΔI507 ve F508C gen mutasyonlarının hızlı tayininde gerçek-zamanlı multipleks PCR ilk tercih edilen yöntem olmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** Kistik fibroz, konjenital unilateral vas deferens agenezisi, *CFTR*, ΔF508, ΔI507, F508C, mutasyon, gerçek-zamanlı PCR, multipleks, jel elektroforezi, dHPLC, Ege Bölgesi.

### **Summary**

**Purpose:** Cystic fibrosis, usually seen in childhood, is a hereditary disease that proceeds with the dysfunction of all exocrine glands. The disease is widely spread in Europe, affects the life quality of the affected individuals and causes their early death because of complications resulting from repeatedly serious respiratory tract infections. The most common mutation in cystic fibrosis is ΔF508. But so far, more than a thousand of other mutations have been discovered in the cystic fibrosis gene (*CFTR*); like ΔI507 and F508C. F508C and ΔF508 mutations are also implicated in the development of congenital vas deferens aplasia. The aim of this study was the rapid analyses of these three mutations that reside in the same *CFTR* gene region with a real-time multiplex PCR method.

**Methods:** A total of 116 DNA samples of cases coming from the Aegean Region with cystic fibrosis or unilateral vas deferens aplasia were analyzed by a specifically designed real-time multiplex PCR method that detects all three *CFTR* mutations in one-step. The applied method was also compared with gel electrophoresis and dHPLC methods.

Yazışma adresi: Buket KOSOVA, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova-İZMİR

Makalenin geliş tarihi : 08.08.2007; kabul tarihi : 10.01.2008

**Results:** Although, we could not detect any carrier for the  $\Delta I507$  and  $F508C$  mutations at the end of our study; 6.0 % of the cases were heterozygous carriers for the  $\Delta F508$  allele and 1.8 % homozygous ill. The frequency of the  $\Delta F508$  mutation was defined as 4.7 %. The applied PCR method was also found to be faster in obtaining results compared to gel electrophoresis and dHPLC.

**Conclusion:** The employed real-time multiplex PCR method should be the preferential method for the rapid analysis of the CFTR  $\Delta F508$ ,  $\Delta I507$  and  $F508C$  gene mutations in cases with cystic fibrosis or congenital unilateral vas deferens aplasia.

**Key words:** Cystic fibrosis, congenital unilateral vas deferens aplasia, CFTR,  $\Delta F508$ ,  $\Delta I507$ ,  $F508C$ , mutation, real-time PCR, multiplex, gel electrophoresis, dHPLC, Aegean Region

## Giriş

İlk kez 1935 yılında Dorothy H. Andersen tarafından tanımlanan kistik fibroz, başta ekzokrin pankreas olmak üzere, tüm ekzokrin bezlerin fonksiyon bozukluğu ile seyreden kalıtsal bir hastalıktır (1). Cinsiyete bağlı olmayan, otozomal resesif geçişli bu hastalığın beyaz ırktaki taşıyıcılık oranı 1/25 ve canlı doğum insidansı 1/2.000-3.500' dir. Bununla birlikte, görülme sıklığı etnik gruplar arasında ve ülkeden ülkeye büyük farklılıklar gösterir (2). Kistik fibroz hastalığına neden olan gen 7. kromozomun q31.2 bölgesine lokalize edilmiştir ve 250 kilobaz (kb) uzunluğundadır; üzerinden 6.5 kb uzunluğunda bir mRNA ve 1.480 aminoasit büyüklüğünde bir protein sentez edilir (3-6). Kistik fibroz transmembran regülatör (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) adını alan bu protein normal hücrelerde klor (Cl<sup>-</sup>) transportundan sorumlu bir kanalı oluşturur. CFTR geninde en sık rastlanılan ve kistik fibroz hastalığına neden olan mutasyon  $\Delta F508$  ( $F508del$ )' dir. Bu mutasyonda, üç bazın delesyonu sonucunda proteinin 508. pozisyonundaki fenilalanin aminoasidi eksik kodlanır (5-8).  $\Delta F508$  mutasyonu proteinin anormal işlenmesi ve taşınmasına neden olduğundan, mutant alel üzerinden kodlanan protein membranlarda bulunmaz (9). Bu nedenle, viskozitesi artmış sekresyonlar olguların akciğerlerinde birikir ve bakterilerin üremesiyle ağır enfeksiyonlar gelişir. Tekrarlayan enfeksiyonlar, olguların kronik ilerleyici obstrüktif hastalık geliştirmelerine ve erken yaşta ölmelelerine neden olur (2). Günümüzde  $\Delta F508$  mutasyonu dışında 1.000' nin üzerinde CFTR mutasyonu daha tanımlanmıştır (10). Bunlardan  $\Delta I507$  ve  $F508C$ , aynı  $\Delta F508$  mutasyonu gibi proteinin ilk nükleotid-bağlama bölgesini etkilerler (11-12). Kistik fibroz hastaların hangi mutasyonu taşıdıklarının belirlenmesi, mutasyonların hastalığın kliniğe yansması ve şiddeti ile doğrudan ilişkili olduklarından çok önemlidir (13). Örneğin, adı geçen bu üç mutasyon kistik fibroz hastalığına yol açtıkları halde, hastalığın kliniğe daha şiddetli yansmasına ve akciğer fonksiyonunun yaşa bağlı gittikçe azalmasına neden olanı  $\Delta F508$ ' dir (14). Ayrıca  $\Delta F508$  mutasyonu,  $F508C$  ile birlikte vas deferens' in konjenital bilateral agenezisi ve bu şekilde infertiliteyle de yol açabilmektedir (15).

Çalışmadaki amacımız, aynı CFTR gen bölgesi içine düşen  $\Delta F508$ ,  $\Delta I507$  ve  $F508C$  mutasyonlarını hızlı bir metod olan gerçek-zamanlı PCR yöntemi ile aynı anda, yani multipleks olarak, kistik fibroz veya vas deferens agenezisi bulunan olgularda saptamak ve Ege Bölgesi' ndeki görülme sıklıklarını belirlemektir.

## Gereç ve Yöntem

**Olgular:** Çalışma grubumuz, 2000 – 2005 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı' na başvuran ve klinik olarak kistik fibroz tanıları konulan 114 ve Üroloji Anabilim Dalı' na başvuran ve konjenital unilateral vas deferens agenezisi bulunan 2, toplam 116 olgudan oluşmakta idi. Tüm olgular Ege Bölgesi' nden gelmekteydi.

**DNA İzolasyonu:** Her olgudan alınan 3 ml periferik kan örneği, antikoagulant olarak EDTA içeren bir tüp içerisinde DNA izolasyonu yapılabildiği kadar -20°C' de saklandı. DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit' i kullanıldı (Roche Applied Science). Nükleik asidi cam lifli filtreye bağlama prensibine dayanan bu izolasyon işlemi sonrasında, DNA' nın konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ölçüldü. Olguların DNA' ları PCR' ları gerçekleştirilene kadar -86°C' de saklandı.

**Gerçek-Zamanlı Multipleks PCR:**  $\Delta F508$ ,  $\Delta I507$  ve  $F508C$  mutasyonlarını içeren 256 baz çift' lik (bç) CFTR gen bölgesi bir çift primer ve floresan-ışaretili prob kullanılarak çoğaltıldı. Primer ve problemlerin dizileri; ileri primer 5'-GGAGGCAAGTGAATCCTGAG-3', geri primer 5'-CCTCTTAGTTGGCATGCT-3', fluorescein-ışaretili prob 5'-TTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAA-F3', ve LCRed640-ışaretili prob 5'-LCRed640-GAAAATATCATCTTTGGTGTTC-P3' di. Son hacim 10 µl olacak şekilde hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 4.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.50 µM ileri primer, 0.50 µM geri primer, 0.20 µM fluorescein-ışaretili prob, 0.25 µM LCRed640-ışaretili prob, 1x LightCycler-DNA Master Hybridization PCR tampon çözeltisi / enzim karışımı ve 50 nmol genomik DNA içermekteydi. PCR şartları; 95°C' de 1 dk' lık ilk denatürasyonu takiben; 45 döngü, 95°C' de 0 sn denatürasyon ve 63°C' de 25 sn bağlanma ile uzama; erime eğrisi analizi için, 95°C' de 0 sn denatürasyonu takiben ısı değişim oranı 2°C/sn olacak şekilde 71°C' ye kadar soğutma, sonra ısı değişim oranı 0.1°C/sn olacak şekilde 37°C' ye kadar tekrar bir soğutma ve aynı ısı değişim oranı ile 70°C' ye kadar ısıtma; son olarak ta 40°C' de 30 sn son soğutma olacak şekilde gerçek-zamanlı bir PCR cihazı olan LightCycler® 1.2v' de ayarlandı (Roche Applied Science). Her mutasyon için olguların genotiplendirilmeleri, çalışma sonrasında oluşan PCR ürünlerin erime derecelerine (melting temperature, T<sub>m</sub>) göre cihazın F2 kanalında gerçekleştirildi.

**Konvensiyonel PCR:** Aralarında 3 bç' lik fark bulunan yabancıl tip (wild type, wt) ve  $\Delta F508$  CFTR alelleri, jel

elektroforezi ve denatüre edici yüksek performanslı likit kromatografisi (dHPLC) yöntemleriyle ayırabilmek için olguların DNA' ları yine aynı ileri ve geri primerler kullanılarak konvansiyonel PCR' a tabi tutuldu. Son hacim 50 µl olacak şekilde hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.50 µM ileri primer, 0.50 µM geri primer, 0.20 mM dNTP karışımı, 1 U Taq DNA polimeraz enzimi, 1x PCR tampon çözeltisi ve 50 nmol genomik DNA içermektedir. PCR şartları; 94°C' de 3 dk' lık ilk denatürasyonu takiben; 40 döngü, 95°C' de 1 dk denatürasyon, 56°C' de 1 dk bağlanma ve 72°C' de 1 dk uzama; 72°C' de 10 dk son uzama sonrasında da 4°C' de ∞ soğutma olacak şekilde CTC-3000 PCR cihazında ayarlandı (Techne).

Jel Elektroforezi: PCR ürünlerinin 10' ar µl' leri % 2' lik agaroz ve % 12' lik poliakrilamid jellerde yürütüldü, EtBr ile boyandı ve bir jel görüntüleme sisteminde değerlendirildi (Vilber Lourmat).

dHPLC: Daha önce hazırlanmış olan PCR örneklerin 5-10 µl' leri WAVE MD System Model 4000 dHPLC cihazında çalışıldı (Transgenomic). Erime profili olarak 56°C' den 60°C' ye kadar bir aralık belirlendi ve heterozigot olduğu bilinen örneklerin profilleri çıkartılmaya çalışıldı.

İstatistiksel Analiz: Elde edilen sonuçlar yüzde değerleri verilerek hesaplandı ve daha önce yayınlanmış olan araştırma sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

## Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 116 olgunun yaş ortalamaları 11.00 ± 12.06' di. Bunların, 63' ü erkek (11.35 ± 12.53) ve 53' ü kadındı (10.81 ± 11.44). Çocuk ve erişkin olarak değerlendirildiklerinde ise, 1-16 yaşındaki 93 çocuk olgunun yaş ortalamaları 6.00 ± 4.42 ve ≥ 17 yaşındaki 23 erişkin olgunun yaş ortalamaları da 33.00 ± 6.80' di. Olguların cinsiyete ve yaş gruplarına göre yaş ortalamaları Tablo 1' de özetlenmiştir. Araştırılan üç CFTR gen mutasyonu için yabancıl genotipte olan olgular % 92.2, ΔF508 aleli için heterozigot taşıyıcı olan olgular % 6.0 ve ΔF508 aleli için homozigot hasta olan olgular % 1.8' di.

**Tablo 1.** Yaş Ortalamaları. Çalışmadaki olguların yaş ortalamaları, cinsiyetlerine ve yaş gruplarına göre hesaplanmıştır. \*SD: standard deviation, standart sapma.

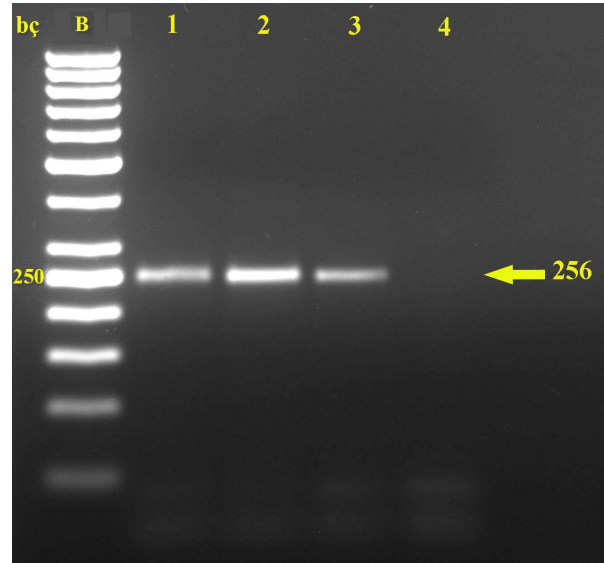
Cinsiyet / Yaş Grubu	Yaş Ortalaması ± SD*
Erkek (n = 63)	11.35 ± 12.53
Kadın (n = 53)	10.81 ± 11.44
0-16 Yaş (n = 93)	6.00 ± 4.42
≥ 17 Yaş (n = 23)	33.00 ± 6.80
Toplam (n = 116)	11.00 ± 12.06

Olguların hiçbirisi ΔI507 ve F508C mutasyon taşıyıcısı değildi. Ayrıca, iki konjenital vas deferens agenezili olgu

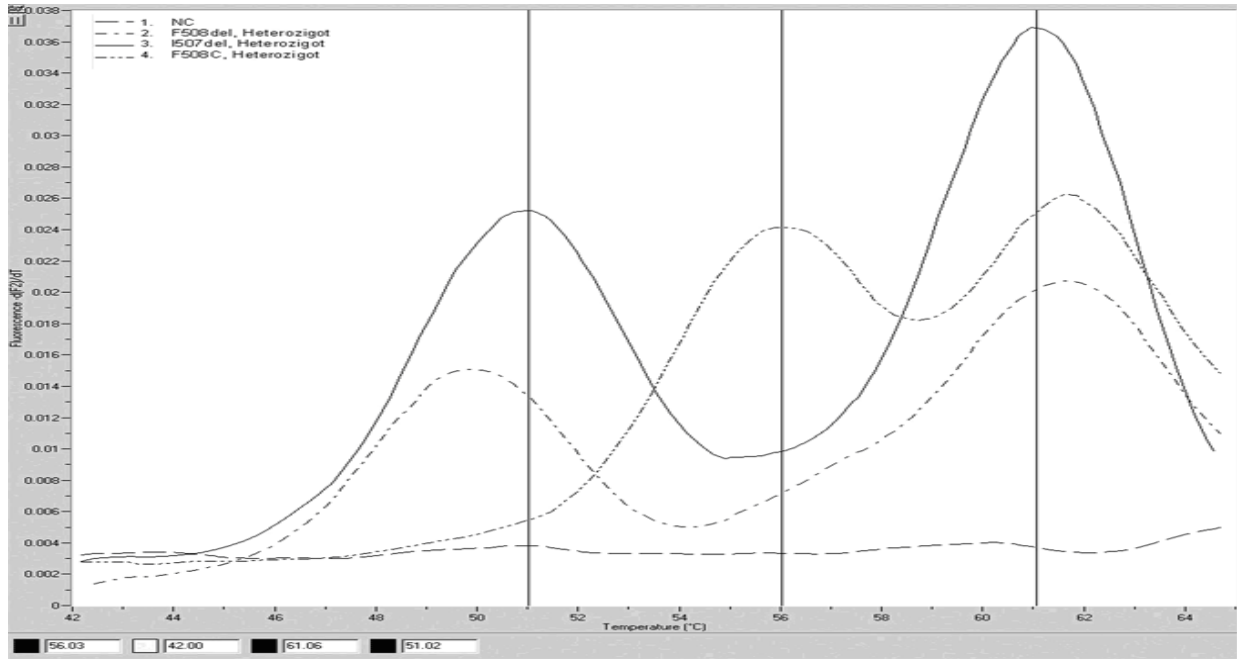
da araştırılan üç kistik fibroz mutasyonu için yabancı genotipteydi. Buna göre, Ege Bölgesi kistik fibrozlu olgulardaki CFTR ΔF508 alelinin görülme sıklığı % 4.7 olarak belirlendi. Olguların CFTR ΔF508 mutasyonu için genotip ve haplotip dağılımları Tablo 2' de özetlenmiştir.

**Tablo 2.** CFTR ΔF508 Gen Mutasyonu için Genotip ve Haplotip Dağılımı. Çalışmadaki olguların CFTR ΔF508 gen mutasyonu için genotip ve haplotip dağılımları cinsiyete göre sayı ve yüzdeleri verilerek hesaplanmıştır. WT: wild type, yabancı tip; HT: heterozigote, heterozigot taşıyıcı; M: mutant, homozigot hasta.

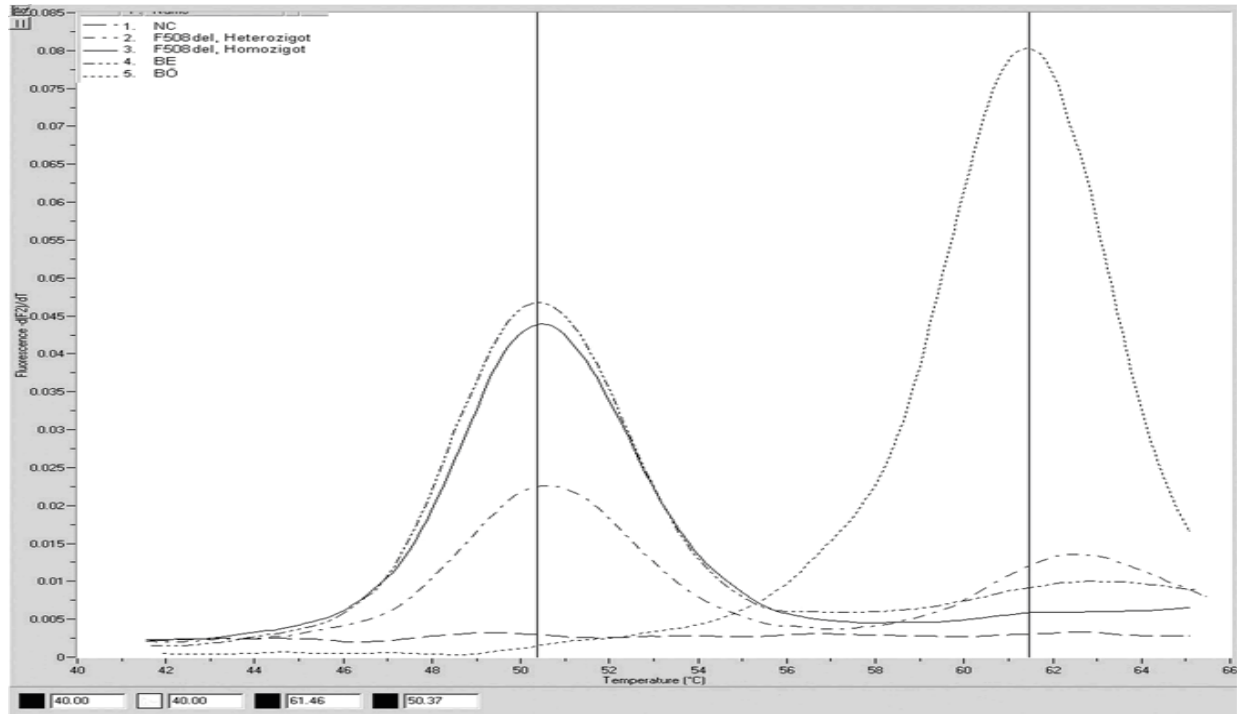
CFTR ΔF508	Erkek n = 63	Kadın n = 53	Toplam n = 116
<b>Genotip</b>			
WT n (%)	60 (95.2)	47 (88.7)	107 (92.2)
HT n (%)	3 (4.8)	4 (7.5)	7 (6.0)
M n (%)	0 (0)	2 (3.8)	2 (1.8)
<b>Haplotip</b>			
WT n (%)	123 (97.6)	98 (92.4)	221 (95.3)
M n (%)	3 (2.4)	8 (7.6)	11 (4.7)



**Resim 1.** ΔF508 için Normal, Heterozigot ve Homozigot Olan Olguların % 2' lik Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri. Resimde, bazı olgulara ait PCR ürünlerinin % 2' lik agaroz jel elektroforez sonrası görüntüleri verilmiştir: bç: baz çifti; B: Belirteç DNA (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; MBI Fermentas); 1 No.' lu Örnek: Yabancı genotipe sahip olgunun PCR ürünü; 2 No.' lu Örnek: ΔF508 heterozigot taşıyıcı genotipe sahip olgunun PCR ürünü; 3 No.' lu Örnek: ΔF508 homozigot hasta genotipe sahip olgunun PCR ürünü; 4 No.' lu Örnek: Negatif H<sub>2</sub>O Kontrol.



**Şekil 1.**  $\Delta F508$ ,  $\Delta I507F$  ve 508C Mutasyonlarının Gerçek-Zamanlı Multipleks PCR Sonuçları. Grafikte örneklerin erime eğrileri görülmektedir. Y-ekseni eğrinin ilk negatif derivatifi (-dF/dt) zamana karşı alındığında elde edilen değerleri, X-ekseni ısıyı belirtir. Erime ısı (Tm) eğrinin pik noktasından okunur. Buna göre, çalışmada kullanılan CFTR heterozigot pozitif kontrollerin Tm değerleri sırasıyla,  $\Delta F508$  için  $49.0 \pm 1^\circ\text{C}$  ile  $61.0 \pm 1^\circ\text{C}$  ( \_ \_ e ğri),  $\Delta I507$  için  $51.0 \pm 1^\circ\text{C}$  ile  $61.0 \pm 1^\circ\text{C}$  ( \_\_\_\_ e ğri) ve F508C için  $56.0 \pm 1^\circ\text{C}$  ile  $61.0 \pm 1^\circ\text{C}$ ' dir ( \_ . . e ğri). Negatif kontrolün Tm değeri bulunmamaktadır ( \_ \_ e ğri).

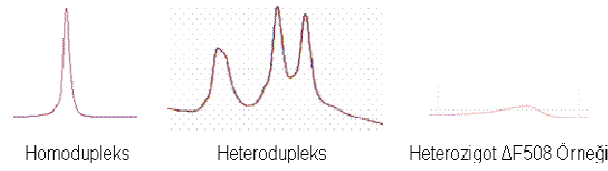


**Şekil 2.**  $\Delta F508$  Mutasyonunun Gerçek-Zamanlı Multipleks PCR Sonuçları. Grafikte  $\Delta F508$  mutasyonunu taşımayan yabancı genotipteki bir olgunun  $61.0 \pm 1^\circ\text{C}$ ' de verdiği tek pik (..... e ğri),  $\Delta F508$  için homozigot hasta olan bir olgunun ve homozigot pozitif kontrolün  $49.0 \pm 1^\circ\text{C}$ ' de verdikleri tek pik (sırasıyla, \_ . . ve \_\_\_\_ e ğri), ve  $\Delta F508$  heterozigot pozitif kontrolün  $49.0 \pm 1^\circ\text{C}$  ile  $61.0 \pm 1^\circ\text{C}$ ' de ( \_ \_ e ğri) verdiği iki pik görülmektedir. Negatif kontrol, DNA yerine  $\text{H}_2\text{O}$  içerdiğinden Tm değeri bulunmaz ve eğrisi düz çıkar ( \_ \_ e ğri).

Gerçek-zamanlı multipleks PCR sonrasında elde edilen CFTR gen ürünlerin wt ve mutant alel olarak ayırımı, erime eğrisi analizi sonrası belirlenen Tm dereceleri göre gerçekleştirildi. Buna göre wt alelin Tm derecesi  $61.0 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\Delta\text{F508}$  alelin  $49.0 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\Delta\text{I507}$  alelin  $51.0 \pm 1^\circ\text{C}$  ve F508C alelin  $56.0 \pm 1^\circ\text{C}$ ' di ( Şekil 1-2).

CFTR geninin PCR ile çoğaltılan wt ve  $\Delta\text{F508}$  alel büyüklükleri, sırasıyla 256 bç ve 253 bç' di. Oluşan bu iki farklı uzunluktaki PCR ürününün jel elektroforez ile ayırımı % 2' lik agaroz (Resim 1) ve % 12' lik poliakrilamid (gösterilmedi) jelleriyle gerçekleştirilmeye çalışıldı. Buna göre,  $\Delta\text{F508}$  mutasyonu için yabani genotipte veya homozigot hasta olan olgularda sırasıyla, 256 bç veya 253 bç uzunluğunda birer band;  $\Delta\text{F508}$  mutasyonu için heterozigot taşıyıcı olan olgularda ise 256 ve 253 bç uzunluğundaki her iki band görülecekti. Ancak, her iki jelde de CFTR  $\Delta\text{F508}$  mutasyonu için heterozigot taşıyıcı olan olguların aleller arasındaki bu 3 bç' lik fark görülebilir bir şekilde ayıramadı ve yabani ile mutant aleller arasında bir büyüklükte, tek, kalın ve parlak bir band gibi görüldü (Resim 1).

Normalde dHPLC yönteminde araştırılan mutasyon için heterozigot taşıyıcı olan hasta örneklerinde karakteristik heterodupleks bir yapının görülmesi beklenir (Şekil 3, ortada). Fakat, PCR' da kullanılan ileri ve geri primerlerin yapıları ve böylece çoğaltılan CFTR wt ve  $\Delta\text{F508}$  alellerin yapıları dHPLC sisteminde ayırmaya uygun olmadıklarından, istenilen bu heterodupleks yapı gözlenemedi (Şekil 3, sağda). Bunun için, geri kalan örnekler de dHPLC uygulamalarına tabi tutulmadı.



**Şekil 3.**  $\Delta\text{F508}$  Mutasyonu İçin Heterozigot Taşıyıcı Olan Bir Olgunun dHPLC Sonucu. Şekilde, araştırılan gen mutasyonu için yabani veya homozigot hasta genotipte olan bir olgunun dHPLC sonrası görülmesi beklenen homodupleks eğrisi (solda) ile heterozigot genotipte olan bir olgunun heterodupleks eğrisi (ortada) görülmektedir (34). Sağ tarafta ise,  $\Delta\text{F508}$  mutasyonu için heterozigot taşıyıcı olan bir olgunun eğrisi görülmektedir; normalde heterodupleks yapıda olması gereken bu eğri çalışmamızda doğrusal bir çizgiye yakın çıkmıştır.

## Tartışma

Ege Bölgesi kistik fibrozlu veya konjenital unilateral vas deferens agenezisi bulunan toplam 116 olgunun  $\Delta\text{F508}$ ,  $\Delta\text{I507}$  ve F508C mutasyon sıklıkları araştırıldığında, bu oranların  $\Delta\text{I507}$  ve F508C için % 0 ve  $\Delta\text{F508}$  için % 4.7 olduğu belirlendi. Bununla birlikte  $\Delta\text{F508}$  için elde edilen değer, şimdiye kadar Türk toplumundaki kistik fibroz

hastaları ile yapılmış olan araştırmalarda bulunan en düşük olanıdır. Normalde  $\Delta\text{F508}$  mutasyon sıklığının Türk kistik fibroz hastalarında % 15-28.4 olduğu gösterilirken (16-19), İnal ve arkadaşlarının Çukurova Bölgesi için belirledikleri oran da düşük ve % 8.8' di (20). Almanya' da yaşayan Türkler' deki  $\Delta\text{F508}$  mutasyon sıklığı ise % 22-27' dir (21).  $\Delta\text{F508}$  en sık kistik fibroza neden olan mutasyon olmakla birlikte, toplumların etnik ve bölgesel kökenlerine bağlı olarak görülme oranı % 17.9 ile % 90 arasında değişmektedir (13). Farklı Avrupa toplumları ile yapılan araştırmalarda  $\Delta\text{F508}$  mutasyon sıklığının Kuzey Avrupa' ya doğru gittikçe arttığı ve en yüksek Danimarka' da olduğu gösterilmiştir (13, 22-23). Köprübaşı ve arkadaşlarının da belirtmiş oldukları gibi Avrupa ülkelerinin çoğunda  $\Delta\text{F508}$  mutasyon sıklığı Türk toplumunkinden daha yüksek ve % 40-70 arasındadır (16).

$\Delta\text{I507}$  ve F508C mutasyonlarının Türk toplumundaki görülme sıklıklarıyla ilgili bilgi bulunmamaktadır. Fakat, Almanya' da konjenital bilateral veya unilateral vas deferens agenezili 106 hastanın F508C mutasyon frekansının % 3 ve  $\Delta\text{F508}$ ' in % 54 olduğu gösterilmiştir (24). Daha sonra, yine Almanya' daki araştırma grubunun ve Dayanaç ile arkadaşlarının birlikte yürüttükleri ve toplam 51 Türk konjenital bilateral vas deferens agenezili hastayı inceledikleri çalışmada,  $\Delta\text{F508}$  mutasyon frekansının yalnızca % 1.9 olduğu ve F508C mutasyonuna da hiç rastlanılmadığı ortaya konulmuştur (25). Konjenital vas deferens agenezinin sıklıkla obstruktif azoospermi' ye yol açtığı ve erkeklerde % 1-2 oranında infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (26). Bu çalışmada, konjenital unilateral vas deferens agenezili iki infertil erkek olgunun, araştırılan her üç CFTR gen mutasyonu için taşıyıcı olmadıkları belirlenmiştir.

Kistik fibroz tanısında değişik moleküler yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bunlardan bazıları heterodupleks analizi, denatüre edici gradient jel elektroforezi, restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP), floresan rezonans enerji transferi (FRET), floresan-temelli oligonükleotid ligasyon, floresan problu nick-translasyon PCR ve gerçek-zamanlı PCR' dir (12, 27-32). Çalışmada CFTR  $\Delta\text{F508}$ ,  $\Delta\text{I507}$  ve F508C mutasyonların tayininde FRET tekniğine dayalı gerçek-zamanlı multipleks PCR yöntemi (33) kullanıldı ve jel elektroforezi ile dHPLC yöntemleriyle karşılaştırıldı.

Gerçek-zamanlı multipleks PCR yönteminin başlıca tercih edilme sebebi, diğer yöntemlere göre daha hızlı olmasıdır: 32 hasta örneğinin çalışılması ve mutasyonlarının belirlenmesi ~30 dk sürmektedir. Değerlendirme doğrudan cihazın kendisi tarafından, PCR aşamasının hemen ardından, floresan işaretli problemlerin özgül Tm değerlerinin ölçülmesiyle gerçekleştirilmektedir. Bu esnada örneklerin bulunduğu kapiller tüpler açılıp, pipetle agaroz jele yüklenmedikleri için, kontaminasyon riski ve zaman kaybı çok düşüktür. Yöntemin bir diğer avantajı ise, her amplifikasyon

döngüsü sonrasındaki ürün artışının gerçek-zamanlı olarak cihazın bilgisayar ekranından izlenebiliyor olmasıdır. Buna göre, eğer bir örnekteki ürün artışı geç, yani çalışmanın sonlarına doğru gerçekleşiyorsa, çalışmaya doğrudan müdahale edilerek döngü sayısı arttırılabilmektedir; ya da tersi, zaten yeterince ürün elde edilmiş ise, çalışma önceden sonlandırılabilir. Tek bir çalışmada her üç mutasyonun bir kerede yüksek özgüllükte belirlenebiliyor olması da hem maddi, hem de zaman açısından avantajlı olmaktadır (32-33).

$\Delta F508$ ' deki delesyon nedeniyle, ilgili mutant alel üzerinden oluşan PCR ürünü wt aeline göre 3 bç daha kısadır. Kullanılan gerçek-zamanlı PCR yöntemin hassasiyeti ve elde edilen sonuçların doğruluğunu gösterebilmek için, aynı zamanda konvansiyonel PCR sonrası jel elektroforezi ve dHPLC de gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda, % 2' lik agaroz ve % 12' lik poliakrilamid jeller üzerinde koşulan  $\Delta F508$  ve wt alelleri birbirlerinden yeterince iyi ayırlamamıştır. Bununla birlikte, aynı aleller heterodupleks oluşturulması sonrasında düşük mobilite özel poliakrilamid jel sistemiyle ayrılabilir (20, 28). Fakat, bu durumda bile PCR sonrası poliakrilamid jelin hazırlanması, örneklerin jelde koşulması ve boyanarak incelenmeleri gibi bazı ek işlem ve hazırlıkların yapılması gerekeceğinden, gerçek-zamanlı PCR' dan daha geç sonuçlar elde edilecek ve daha az örnek birlikte incelenebilecekti.

Normalde dHPLC 1 bç' lik delesyonu saptayabilecek hassasiyete sahip bir yöntemdir. Girardet ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada dHPLC ile tek bir lenfosit hücreindeki  $\Delta F508$  mutasyonu saptanabilmiş ve yöntem preimplantasyon genetik çalışmaları için önerilmiştir (34). Bu çalışmada, heterozigot hasta örnekleri için beklenen heterodupleks yapı

gösterilememiş ve nedeni olarak PCR' da kullanılan primer yapıların uygunsuzluğu düşünülmüştür. Fakat, dHPLC' nin standardizasyonu için farklı primer çiftleri kullanılmış olursa dahi, heterodupleks yapının oluşumuna neden olan mutasyonun kesin belirlenebilmesi için DNA dizi analizinin yapılması gerekecekti. Böylece bu yöntem, CFTR genin aynı bölgesini düşen  $\Delta F508$ ,  $\Delta I507$  ve  $F508C$  mutasyonlarının ayırıcı tanısı için tek başına yeterli değildir. dHPLC yöntemi ayrıca, aynı jel elektroforezi gibi PCR sonrası bazı ek işlem ve hazırlıkların yapılmasına gerek duyduğundan, gerçek-zamanlı PCR' dan daha geç sonuçlar vermektedir. Kistik fibroz şüphesinde hızlı genetik sonuç verilmesi, özellikle preimplantasyon genetik tanı (preimplantation genetic diagnosis, PGD) veya ileri gebelik haftalarındaki prenatal tanıda çok önem kazanmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada gerçek-zamanlı multipleks PCR kullanılarak kistik fibrozlu veya konjenital unilateral agenezisi bulunan olgularda CFTR  $\Delta F508$ ,  $\Delta I507$  ve  $F508C$  gen mutasyonlarının görülme sıklıkları araştırılmış ve  $\Delta F508$  için % 4.7 bulunmuştur. Gerçek-zamanlı multipleks PCR, jel elektroforezi ve dHPLC yöntemleriyle karşılaştırıldığında daha avantajlı bulunmuş ve normal genetik tanının yanında, hızlı tanı konulması gereken durumlarda (örn.: PGD ve prenatal tanı) ilk uygulanması gereken yöntem olarak önerilmiştir.

### Destekleyen kişi ve kuruluşlar

*CFTR  $\Delta F508$ ,  $\Delta I507$  ve  $F508C$  pozitif DNA kontrolleri için Utah Üniversitesi' nden Cameron N. GUNDRY' e teşekkür ederiz. Ayrıca, Ege Üniversitesi İdari Mali İşler Daire Başkanlığı Bilimsel Teknik ve Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü' ne maddi desteklerinden dolayı teşekkür ederiz (BAP Proje No.: 2001-TIP-001).*

### Kaynaklar

1. Anderson DH. Cystic fibrosis of the pancreas. J Chronic Dis. 1958; 7(1):58-90.
2. Tuğ E, Tuğ T. Kistik Fibrozis ve Moleküler-Genetik Yaklaşımlar. Toraks Dergisi. 2003; 4(2):198-204.
3. Danes BS, Bearn AG. Localisation of the cystic-fibrosis gene. Lancet 1968; 2(7581):1303.
4. Dallaire L, Destine ML. Localisation of the cystic-fibrosis gene. Lancet 1969; 1(7591):419-20.
5. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989; 245(4922):1066-1073.
6. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewics D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 1989; 245(4922):1073-1080.
7. Estivill X, Chillon M, Casals T, Bosch A, Morral N, Nunes V, Gasparini P, Seia A, Pignatti PF, Novelli G, et al. Delta F508 gene deletion in cystic fibrosis in southern Europe. Lancet 1989; 2(8676):1404.
8. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Population variation of common cystic fibrosis mutations. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Hum Mutat 1994; 4:167-177.
9. Kalin N, Claass A, Sommer M, Puchelle E, Tummeler B. DeltaF508 CFTR expression in tissues from patients with cystic fibrosis. J Clin Invest 1999; 103:1379-1389.
10. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanism of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. Cell 1993; 73:1251-1254.

11. Schwarz M, Summers C, Heptinstall L, Newton C, Markham A, Super M. A deletion mutation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) locus: Delta I507. *Adv Exp Med Biol.* 1991; 290:393-398.
12. Kobayashi K, Knowles MR, Boucher RC, O'Brian WE, Beaudet AL. Benign missense variations in the cystic fibrosis gene. *Am J Hum Genet.* 1990; 47(4):611-615.
13. Zielenski J. Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Respiration* 2000; 67:117-133.
14. al-Jader LN, Meredith AL, Ryley HC, Cheadle JP, Maguire S, Owen G, Goodchild MC, Harper PS. Severity of chest disease in cystic fibrosis patients in relation to their genotypes. *J Med Genet.* 1992; 29(12):883-887.
15. Meschede D, Eigel A, Horst J, Nieschlag E. Compound heterozygosity for the delta F508 and F508C cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutations in a patient with congenital bilateral aplasia of the vas deferens. *Am J Hum Genet.* 1993; 53(1):292-293.
16. Koprubasi FF, Malik N, Bosch-al Jadooa N, Alkan M, Buhler E. Molecular genetic analysis of Turkish cystic fibrosis patients. *Ann Genet.* 1993; 36(3):144-149.
17. Onay T, Topaloğlu Ö, Gökğöz N, Kayserili H, Başaran S, Çokuğraş H, Söylemez Y, Akçakaya N, Apak M, Kırdar B. DNA analysis of cystic fibrosis in Turkish population. 12th National Congress of Biochemistry, Abstract Book, (Ed.Özer N) Şafak Matbaacılık San. İstanbul, 1994; 55.
18. Yılmaz E, Erdem H, Ozguc M, Coskun T, Ozcelik U, Gocmen A, Ozalp I. Study of 12 mutations in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Hered.* 1995; 45(3):175-177.
19. Kilinc MO, Ninis VN, Dagli E, Demirkol M, Ozkinay F, Arıkan Z, Cogulu O, Huner G, Karakoc F, Tolun A. Highest heterogeneity for cystic fibrosis: 36 mutations account for 75% of all CF chromosomes in Turkish patients. *Am J Med Genet.* 2002; 113(3):250-257.
20. İnal TC, Yüregir G, Özer G, Yüksel B. Detection of Cystic Fibrosis  $\Delta$ F508 Mutation in the Çukurova Region. *Turk J Med Sci* 2000; 30: 605-607.
21. Hundrieser J, Bremer S, Peinemann F, Stuhmann M, Hoffknecht N, Wulf B, Schmidtke J, Reiss J, Maass G, Tummler B. Frequency of the F508 deletion in the CFTR gene in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Genet.* 1990; 85(4):409-10.
22. Kerem E et al. European Cystic Fibrosis Registry Report on 2003 data. European Cystic Fibrosis Society (ECFS) 2006; [http://www.ecfsoc.org/ECFRegistry/RCFR\\_annual\\_report\\_2003\\_Final.pdf](http://www.ecfsoc.org/ECFRegistry/RCFR_annual_report_2003_Final.pdf)
23. Schwartz M, Johansen HK, Koch C, Brandt NJ. Frequency of the delta F508 mutation on cystic fibrosis chromosomes in Denmark. *Hum Genet.* 1990; 85(4):427-428.
24. Dork T, Dworniczak B, Aulehla-Scholz C, Wiczorek D, Böhm I, Mayerova A, Seydewitz HH, Nieschlag E, Meschede D, Horst J, Pander HJ, Sperling H, Ratjen F, Passarge E, Schmidtke J, Stuhmann M. Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of vas deferens. *Hum Genet.* 1997; 100(3-4): 365-377.
25. Dayangac D, Erdem H, Yılmaz E, Sahin A, Sohn C, Ozguc M, Dork T. Mutations of the CFTR gene in Turkish patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod.* 2004; 19(5):1094-1100.
26. Şamlı MM. Konjenital vas deferens agenezisi. *İnfertilite* 2004; 18:235-237.
27. Chen X, Zehnbauser B, Gnirke A, Kwok P. Fluorescence resonance energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(20):10756-10761.
28. Dodson LA, Kant JA. Two-temperature PCR and heteroduplex detection: application to rapid cystic fibrosis screening. *Mol Cell Probes.* 1991; 5(1):21-25.
29. Eggerding FA, Iovannisci DM, Brinson E, Grossman P, Winn-Deen ES. Fluorescence-based oligonucleotide ligation assay for analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *Hum Mutat.* 1995; 5(2):153-165.
30. Fanen P, Ghanem N, Vidaud M, Besmond C, Martin J, Costes B, Plassa F, Goossens M. Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions. *Genomics.* 1992; 13(3):770-776.
31. Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(16):3761-3766.
32. Wittwer CT, Marshall BC, Reed GH, Cherry JL. Rapid cycle allele-specific amplification: studies with the cystic fibrosis delta F508 locus. *Clin Chem.* 1993; 39(5):804-809.
33. Gundry CN, Bernard PS, Herrman MG, Reed GH, Whittwer CT. Rapid F508del and F508C assay using fluorescent hybridization probes. *Genet Test* 1997; 3(4):365-370.
34. Girardet A, Cathala P, Claustres M. Rapid detection of the deltaF508 mutation in single cells using DHPLC: implications for preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet.* 2003; 20(4):153-156.