

# Strip Assay Metodu Kullanılarak "Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)" Geni Mutasyonlarının Analizi

ANALYSIS OF MUTATIONS IN "CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR (CFTR)" GENE USING STRIP ASSAY METHOD

Ayfer ÜLGENALP

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Genetik Bilim Dalı  
Dokuz Eylül Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi ( DEGETAM)

### ÖZET

**Amaç:** Türk Populasyonu'ndaki CFTR gen mutasyonlarının bildirilmesi.

**Gereç ve yöntem:** Çalışma da; 36 CFTR geni mutasyonunu tek bir çalışmada analiz eden Strip Assay Metodu ile, Kistik Fibrozis (KF)'li veya Konjenital olarak bilateral vas deferens aplazisi (CBAVD) bulunan toplam 254 örnek analiz edildi.

**Bulgular:** Çalışılan 254 DNA örneğinde on farklı mutasyon saptandı. delF508 sıklığı %4, mutasyonlar açısından genel olarak bilgi vericilik oranı % 6,8 olarak bulundu.

**Sonuç:** CFTR geni mutasyonlarının rutin saptanması açısından strip assay tekniği hızlı ve bilgi verici bulundu.

**Anahtar sözcükler:** Kistik fibroz, CFTR, Strip assay

### SUMMARY

**Objective:** In order to determine the spectrum of CFTR gene mutations in the Turkish population.

**Material and method:** In this study, a total of 254 samples with CF and CBAVD were analyzed by Strip Assay Method that detects all 36 CFTR mutations in one step.

**Results:** Analysis of 254 DNA samples resulted in ten different mutations. delF508 mutation frequency was %4 .Ratio of informativeness ratio was % 6.8.

**Conclusion:** Strip Assay Method is suitable and informativeness technic to analyze CFTR gen mutations.

**Key words:** Cystic fibrosis, CFTR, Strip assay

### Ayfer ÜLGENALP

Dokuz Eylül Üniversitesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD  
Genetik BD  
Genetik Tanı Merkezi (DEGETAM)  
Tel: (232) 412 236 66  
e-posta: [ayfer.ulgenalp@deu.edu.tr](mailto:ayfer.ulgenalp@deu.edu.tr)

Kistik fibrozis (KF) (CF; MIM# 219700) beyaz ırkta özellikle de Kuzey Avrupa'da sıklıkla görülen otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır. Hastalığın insidansı yaklaşık 1/2500 yeni doğan olup taşıyıcı frekansı 1/25'dir (1). Ülkemizde akraba evliliğinin fazla olması nedeniyle bu

oranın daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Hastalıktan sorumlu olan gen 1989 yılında klonlanmıştır (2,3). 7q31 bölgesine haritalanan gen 250kb (kilobaz) uzunluğunda olup Cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR; MIM# 602421) olarak tanımlanan 1450 amino asitten olu-

şan bir proteini kodlamaktadır. Epitel hücrelerde yerleşik olan CFTR proteini, klor iyonları için kanal görevi yapar ayrıca sodyum iyonlarının kontrolünden de sorumlu olup ATP bağlayıcı proteinler ailesinin de bir üyesidir. Allelik heterojenitenin yüksek olduğu kistik fibrozisde 1500 civarı mutasyon bildirilmiştir (4). En sık rastlanan mutasyon delF508 (508. pozisyondaki fenil alanin amino asidinin delesyonu) olup ülkemizdeki en yüksek görülme sıklığı %28,4'tür (5,6). Mutasyonların çoğu ailelere özgü mutasyonlardır. KF'deki mutasyonların tespiti hastalarda oluşturduğu klinik tablo (genotip-fenotip ilişkisi) ve genetik danışma açısından önemlidir.

KF'li erkeklerin %95'ten fazlasında obstrüktif azospermik infertilite bulunmaktadır. Konjenital olarak Bilateral Vas Deferens Aplazisi (CBAVD) görülen, KF ile ilgili diğer semptomları olmayan (atipik KF) hastaların %70'e yakınında CFTR geni mutasyonları bildirilmiştir. İnfertil erkeklerde İntrastoplazmik Sperm İnjesyonu (ICSI) öncesinde genetik danışmanlıkta CFTR mutasyonlarının taramasının yapılması önerilmektedir (7-9).

Moleküler genetik laboratuvarlarında rutin olarak CFTR geni mutasyonlarını tanımlamaya yönelik çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Son yıllarda CFTR geni için piyasaya çıkarılan Strip Assay testlerle, aynı anda birden fazla bilinen mutasyonu daha hızlı ve seri bir biçimde taramak mümkün olmaktadır. CFTR Strip testi, PCR ile çoğaltılmış DNA ürünlerinin mutasyona özgü oligonükleotid problemleriyle hibridizasyonu prensibi üzerine kurulmuştur. Normal Dot-Blot hibridizasyonunda DNA örnekleri membrana sabitleştirilirken, bu yöntemde oligonükleotid problemleri membrana sabitleştirilmiş durumdadır. Test; kandan DNA izolasyonu, CFTR geninin biyotin ile işaretlenmiş primerlerle amplifiye edilmesi, PCR ürününün normal ve mutant problemleri paralel bantlar şeklinde taşıyan hazır membranla hibridizasyona sokulması, sonuçta da renk reaksiyonu ile görüntülemeye dayanan aşamalardan oluşmaktadır (10).

Araştırmamızda, Dokuz Eylül Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi (DEGETAM)'ne rutin olarak yönlendirilen örneklerden Strip Assay yöntemi ile çalıştığımız CFTR geni mutasyon sonuçlarını literatüre katkı açısından sunmak istedik.

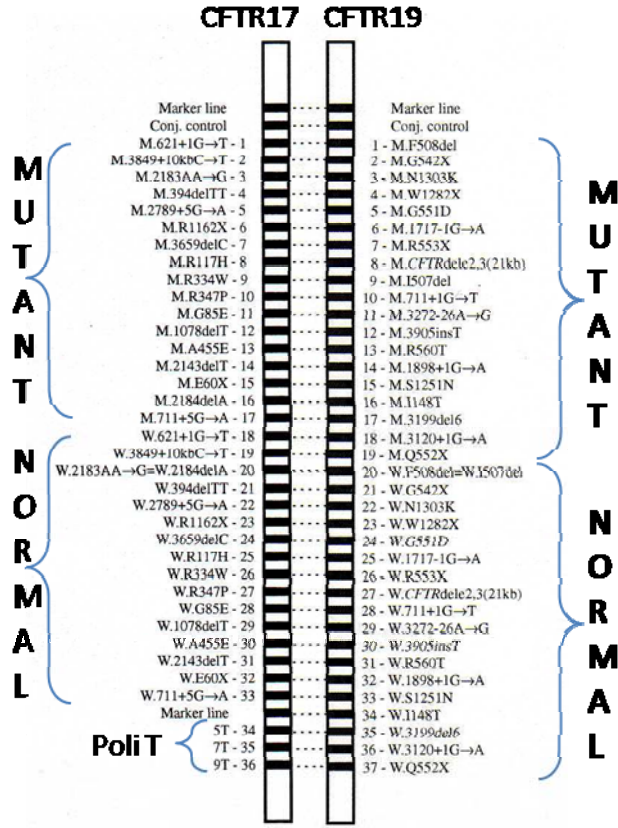
## GEREÇ VE YÖNTEM

2005-2009 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi (DEGETAM)'ne farklı sağlık kuruluşlarınca yönlendirilen ve klinik olarak kistik fibrozis tanısı almış ya da taşıyıcı olduğu düşünülen 244 kişi ve konjenital bilateral vas deferens aplazisi bulunan 10 kişi olmak üzere toplamda 254 olgu çalışmaya alındı.

Olgulardan DNA izolasyonu için; antikoagülan olarak EDTA içeren 10 ml'lik tüplere periferik kan örneği alındı. Genomik DNA, tuzla çöktürme metodu kullanılarak periferik kan lökositlerinden elde edildi (11). DNA'ların konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ölçüldü (NanoDrop, Thermo Scientific). DNA örnekleri, CFTR geni için yaygın olduğu düşünülerek seçilmiş ve 36 mutasyonu kapsayan Inno-Lipa CFTR17 ve Inno-Lipa CFTR19 strip assay kiti ile multipleks PCR işlemi yapılarak çoğaltıldı (Şekil 1). Bu işlem için önce; biyotinlenmiş primerler kullanılarak hedef DNA'nın 95°C'de 15 dakika başlangıç denaturasyonu sağlandı. Daha sonra primerlerin bağlanması için 57°C'de 1 dakika, primerlerden yeni DNA sentezlenmesi için 68°C'de 1 dakika ve ara denatürasyon işlemi için 95°C'de 1 dakika bekletilerek amplifikasyon 30 döngü olarak tamamlandı (Thermal Cycler 9700-Perkin Elmer Cetus). Elde edilen ampikonlar özel olarak hazırlanmış ve üzerine paralel olarak immobilize bağlanmış allel-spesifik (Wild tip/Mutant tip) oligo nükleotid problemlerle ters hibridizasyon esasına dayalı bir prensiple hibridize edildi ve biyotinle işaretli sekanslar streptavidin-alkaline fosfatase ve substratları kullanılarak analiz edildi (Innogenetics, Biotechnology for Healthcare, Belgium).

## BULGULAR

Toplam 254 hastada 10 farklı mutasyon saptanmıştır. Çalışılan örneklerin mutasyon frekansları Tablo I'de özetlenmiştir. İntron 8 (IVS 8)'de yer alan poli Timidin (poliT) dizilerinin allel dağılımları Tablo II'de özetlenmiştir. CBAVD'li 10 olguda mutasyon ve poliT allel dağılımı Tablo III'te gösterilmektedir.



**Şekil.** CFTR Strip Assay: Mutant ve normal oligonükleotit problemlerinin pozisyonlarını gösteren referans membranlar

**Tablo I.** CFTR geni mutasyonları için taranan 508 allelde mutasyonların dağılımı

Mutasyonlar	Allel Sayısı (n)	Allel Sıklığı (%)
F508del	20	4
N1303K	1	0.2
G542X	1	0.2
2183AA→G	4	0.8
2789+5G→A	2	0.4
G85E	2	0.4
CFTRdele2,3(21kb)	1	0.2
3849+10kbC→T	2	0.4
I148T	1	0.2
W1282X	1	0.1
Bilinmeyen	473	93
<b>Toplam</b>	<b>508</b>	<b>100</b>

**Tablo II.** CFTR geni intron 8 (IVS8)'de yer alan poli T polimorfizmlerinin taranan 508 alleldeki dağılımı

Poli T genotipi	Allel Sayısı (n)	Allel Sıklığı (%)
5 T	24	5
7 T	419	82
9 T	65	13
<b>Toplam</b>	<b>508</b>	<b>100</b>

**Tablo III.** CBAVD'li 10 olguda mutasyon ve poli T allel dağılımı

CFTR Mutasyon (allel/allel)	Poli T genotipi (allel/allel)
--- / ---	7 T / 7 T
F 508 / ---	7 T / 9 T
--- / ---	7 T / 7 T
F 508 / ---	7 T / 9 T
--- / ---	7 T / 7 T
--- / ---	7 T / 7 T
--- / ---	7 T / 7 T
--- / ---	5 T / 5 T
--- / ---	7 T / 7 T

## TARTIŞMA

Kistik fibrozis, multisistem tutulumu ile giden otozomal resesif geçişli kalıtsal metabolik bir hastalıktır. Hastalar-daki temel bozukluk; hücrelerdeki klor iyonunun hücre dışına sekresyonundan sorumlu CFTR proteininin ge-ninde oluşan mutasyonlar sonucu, proteinin kanal görevini düzgün yapamamasından kaynaklanmaktadır. Hastalığın görülme sıklığı, ülkelere ve ırklara göre değişmektedir. Genotipik ve fenotipik heterojenite gösteren bir hastalıktır. Genotipik heterojenitesinin kaynağı mutasyonların çoğu-nun tek bir ailede görülen özel mutasyonlar olmasıdır. En sık rastlanan mutasyon dünya genelinde %66 sıklıkla rastlanan delF508 olarak bildirilmiştir (12). Avrupa'daki delF508 oranı kuzeyden-güneye doğru azalan bir şekilde %87 ve %17,9 olarak bildirilmiştir (13). Türkiye'de kistik fibrozis mutasyonlarını belirlemek için yapılan çalışmalarla ilgili literatürler sınırlı sayıda olmasına rağmen, delF508 ile ilgili olanlar daha sık görülmektedir. Ülkemizdeki delF508 allel frekansı çeşitli yayınlarda %14-28,4 arasında göste-rilmiştir (5,6,14-18). Strip assay tekniğini kullanarak 254 DNA örneği ile yaptığımız bu çalışmada delF508 oranını

%4 olarak saptadık. Farklı yöntemlerle yaptığımız daha önceki çalışmalarımızda bu oranı %14 olarak saptamıştık (15). delF508 için elde edilen bu değer, şimdiye kadar Türk toplumunda bildirilen araştırmaların en düşüğüdür. Ülke geneline baktığımızda Çukurova bölgesi için belirlenen oran %8,8'dir (19). Ege bölgesinde 116 örnekle yapılan çalışmada delF508 sıklığı %4,7 saptanmıştır (20). Bizim grubumuzdaki bu düşük oranının nedenini, örnek sayısının artmasına bağlı olarak frekanstaki azalma olarak görmekteyiz. Ayrıca Ege Bölgesi'nden %4,7'lik bir oranın da bildirilmiş olması, bölgesel özelliğin de bu konuda rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda, 2183AA-G mutasyonu sıklığı %4, 2789+5G-A, G85E, 3849+10kbC-T mutasyonları sıklığı %2, N1303K, G542X, W1282X, 148T, CFTRdel2,3 (21kb) mutasyon sıklıkları ise %1 olarak saptanmıştır. Toplam mutasyon oranı ise %6,8 olarak bulunmuştur. Genelde düşük gibi görünen bu oran DEGETAM'a CFTR geni mutasyonları için yollanan örneklerin heterojenliği ve klinik tanıların şüpheli olmasından kaynaklanabilir.

Erkek infertilitesini ilgilendiren CBAVD, moleküler seviyede incelendiğinde, bu fenotipin kistik fibrozun atipik bir manifestasyonu olduğu görülmüştür. CBAVD hasta erkeklerin %70'inde mutasyon tespit edilmektedir. Ayrıca RNA işleme hatası sonucu intron 8 (IVS8)'de yer alan poliT dizilerinin üç farklı varyantı bulunmaktadır (5T,7T,9T). 5T varyantı, intron 8 (IVS8)'deki işleme bölgesinde oluşan (acceptor / donor site) bir hata sonucu CFTR proteininde ekzon 9'un atlanarak sentezlenmesi ile düşük verimlilikte bir protein olarak sentezlenmektedir. Genel popülasyonla karşılaştırıldığında CBAVD'li erkeklerin %3-5'inde 5T alleli bulunmaktadır (21). Bizim sonuçlarımızda 254 örnekte genel olarak 5T alleli %5 olarak saptanmıştır. CBAVD'li on örnekte ikisinde heterozigot olarak del F508 mutasyonu (%10), bir örnekte ise homozigot 5T polimorfizmi (%10) saptanmış olup bu gruptaki toplam mutasyon ve polimorfizm allel sıklığı %20'dir. Dayangaç ve ark 51 Türk CBAVD'li hasta ile yaptıkları çalışmada allellerin üçte ikisinde (%72,5) 27 farklı mutasyon tanımlanmış ve delF508 mutasyon frekansını %1,9 olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada iki predominant mutasyon IVS8 ve D115217 allellerin üçte birinden fazlasında bulunmaktadır (22). Daha geniş ve spesifik hasta grubuyla yapılan

bu çalışmanın sonuçlarından da anlaşılacağı üzere, kullanılan mutasyon panellerinin kısıtlı olması ve özellikle ülkemizdeki spesifik mutasyon profili nedeniyle CBAVD'li hasta gruplarında CFTR geni mutasyonları nispeten daha nadir görülmektedir. Klasik metodların çoğu ile karşılaştırıldığında mutasyon çeşitliliği ve 5T varyantını saptayabilmesi, kolay ve hızlı olması strip assay tekniği ile yapılan rutin çalışmaları mutasyon yakalama açısından daha avantajlı kılmaktadır.

## 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-mim219700>.
2. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989; 245:1066-1072.
3. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science 1989; 245:1059-1065.
4. Cystic fibrosis Mutation Database at HYPERLINK <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>
5. Yılmaz E, Erdem H, Özgüç et al. Study of 12 mutations in Turkish cystic fibrosis patients. Hum Hered.1995; 45: 175-177.
6. 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: 224-230.
7. Lissens W, Liebaers I. The genetics of male infertility in relation to cystic fibrosis. Baillieres Clin Obstet Gynaecol, 1997; 11: 797-817.
8. 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: 285-293.
9. Schulz S, Jakubiczka S, Kropf S, Nickel I, Muschke P, Kleinstein J. Increased frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males. Fertil Steril, 2006; 85: 135-138.
10. Başak AN. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel moleküler hematoloji kursu. 2005; 99-106.
11. Miller SA, Dykens DD, Polesky HF. A simple salting out

- procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
12. Zielenski J, Tsui L-C. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet.* 1994; 29:777-807.
  13. Messaoud T, Verlingue C, Denamur E et al. Distribution of CFTR mutations in cystic fibrosis patients of Tunisian origin: identification of two novel mutations. *Eur J Hum Genet* 1996;4: 20-24.
  14. Köprübasi FF, Malik N, Bösch-al-Jadooda N, Alkan M, Tanac R, Bühler E. Molecular genetic analysis of Turkish cystic fibrosis patients. *Ann Genet* 1993;36:1449.
  15. Ülgenalp A, Uzuner N, Giray Ö, Bora E, Erçal D. Türk Kistik Fibrozisli Hastalarda 14 Yaygın Mutasyonun Tanınması. *İzmir Göğüs Hastalıkları ve Hastanesi Eğitim Hastanesi Dergisi*, 2000;14:1-4.
  16. Onay T, Zielenski J, Topaloglu O et al. Cystic fibrosis mutations as associated haplotypes in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Biology* 2001; 73:191-203.
  17. Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat* 1997; 10: 135-154.
  18. Kiliç MO, Ninis VN, Dağlı E et al. Highest heterogeneity for cystic fibrosis: 36 mutations account for 75% of all CF chromosomes in Turkish patients. *Am J Med Genet* 2002; 113: 250-257.
  19. Inal TC, Yuregir G, Ozer G, Yuksel G. Detection of F508 mutation in the Cukurova Region. *Turk J Med Sci* 2000; 30: 605-607.
  20. Kosava B, Eroğlu Z, Yılmaz B ve ark. F508, I507 ve F508C kistik fibroz mutasyonlarının gerçek-zamanlı multipleks PCR ile hızlı analizleri. *Ege Journal of Medicine*, 2008; 47: 103 -109.
  21. Chillon M, Casals T, Mercier B et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995; 332:1475-1480.
  22. Dayangaç D, Erdem H, Yılmaz E et al. Mutations of the CFTR gene in Turkish patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod* 2004;19: 1094-1100.