

GEN AMPLİFİKASYON VE SENTETİK OLİGONÜKLEOTİD PROBLAR İLE HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİNİ KULLANARAK BETA TALASSEMİDE BAZI NOKTA MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF SOME POINT MUTATIONS IN BETA THALASSEMIA PATIENTS BY GENE AMPLIFICATION AND SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDE PROBE HYBRIDIZATION METHODS

Oya UYGUNER* - Turay YARDIMCI ** - Engin BERMEK*** -
Beyazıt ÇIRAKOĞLU *** - Muzaffer AKSOY***

SUMMARY

In this study, the DNAs of one healthy individual and nine patients with anemia or beta thalassaemia were analyzed to detect some of the point mutations which may cause beta thalassaemia.

The DNA was isolated from approximately 5 ml of blood and 0.5 mg of that DNA was amplified in a reaction mixture containing primers bordering the related area in the β -globin gene, deoxyribonucleotides (dNTPs), and taq polymerase enzyme. The amplification was done by 25 subsequent cycles consisting of denaturation at 95°C for one minute, primer hybridization at 55°C for one minute, and primer extension at 72°C for three minutes. Amplified DNA samples were transferred onto nylon membrane at equal amounts after the concentrations were adjusted by agarose gel electrophoresis, and hybridized with four different 19 nucleotide (nt) long synthetic oligonucleotide probes containing point mutations, which were labelled with $^{32}\text{PdATP}$ at 5' ends. It was found that three patients had G→A at IVS-1 nt 1, two patients had T→C at IVS -1 nt 6, and one patient had C→A point mutation at exon 2 codon 39. Since each of these six samples were hybridized both with the normal and mutant probes, they were identified to be heterozygote for these mutations. None of the samples showed G→A mutation at IVS-1 nt 110. Normal (healthy) sample hybridized with only normal probes and did not hybridize with any of the mutant probes.

ÖZET

Bu çalışmada, bir sağlıklı gönüllü ve dokuz anemili veya beta talassemili hastanın DNA'sında, beta talassemiye neden olan bazı mutasyonların bulunup bulunmadığı incelendi.

* Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı,
Niğantaşı/İSTANBUL.

** Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı,
Niğantaşı/İSTANBUL.

*** TÜBİTAK, Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Merkezi, Biyoloji Bölümü,
Gebze/İSTANBUL.

Yaklaşık 5 ml kan örneğinden elde edilen DNA'nın 0,5 µg'ı β-globin geninin ilgili bölgesini sınırlayan primerler, deoksiribonükleotidler (dNTP), taq polimeraz enzimi içeren bir reaksiyon karışımı içinde, 95°C de bir dakika denatürasyon, 55°C de bir dakika hibridizasyon (primer eşleşmesi), ve 72°C de üç dakika primer zincir uzamasını içeren 25 döngümlük işleme tabi tutularak amplifiye edildi. Amplifiye DNA örnekleri agaroz gel elektroforezi ile konsantrasyon ayarlamaları yapıldıktan sonra eşit miktarlarda naylon membran üzerine geçirilerek 5' ucundan ³²PdATP ile işaretlenmiş mutasyon içeren bölgelere özgü 19 nükleotidlik (nt) dört ayrı sentetik oligonükleotid problrarı ile hibridizasyona sokuldu. Hastaların üçünde IVS-1 nt 1 de G→A, ikisinde IVS-1 nt 6 da T→C, ve birinde 2 inci eksonda kodon 39 da C→A nokta mutasyonlarının bulunduğu saptandı. Bu altı örneğin her biri hem normal ve hem de mutant problrar ile hibridize oldukları için örneklerin bu mutasyonlar için heretozigot oldukları tanısı kondu. IVS-1 nt 110 da G→A hiç bir hastada rastlanmadı. Normal (sağlıklı) örnek, bütün normal problrar ile hidridize olup hiç bir mutant ile hibridize olmadı.

GİRİŞ

Son yıllarda, bir çok hastalıkların moleküler yapısı rekombinant DNA teknolojisinin uygulanması ile açıklığa kavuşmuştur (1). Genetik hastalıklarla ilgili olarak, özellikle DNA'nın polimorfik yapılarının tayini, prenatal teşhis için çok kıymetli klinik bilgiler temin etmemize yardımcı olmuştur (2-6).

Kromozomal mutasyonların saptanmasında en büyük ilerleme, ilk olarak Saiki ve arkadaşları tarafından tarif edilen, gen amplifikasyonunun başarı ile uygulanması ile elde edilmiştir (7). Bu yöntem sayesinde, spesifik DNA dizileri, selektif olarak zenginleştirilerek, genlerde dizilerin değişkenliği (7-9), ve kromozomal düzenlemelerin incelenmesi (10), genomik nükleotid dizilerinin yüksek verimlilikte klonlanması (11), ve mitokondrial ve genomik DNA dizilerinin tayin edilmesi (12-16), mümkün olmaktadır.

Türk toplumunda, β-talassemiye neden olan mutasyonların araştırılması ile ilgili çalışmalar, en sık rastlanan β - talassemik allelin β⁺ IVS-1 nt 110 da G→A mutasyonu olduğunu göstermektedir (17-18).

Bu çalışmada, anemili ve β-talassemitli 9 hasta ile bir sağlıklı gönüllü kişinin kromozomlarında gen amplifikasyonu ve normal ve mutant sentetik oligonükleotid problrar ile hibridizasyon yöntemleri kullanılarak bazı nokta mutasyonların bulunup bulunmadıkları araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Çalışmada kullanılan kan örneklerinin alındığı olguların hematolojik ve klinik bulguları tablo-1 de özetlenmiştir.

Tablo-1: Kan Örneklerinin Alındığı Olguların Hematolojik ve Klinik Bulguları

	Hb (g/dl)	K.K. (10 ¹² /L)	Hematokrit (%)	OEV (fl)	OEH (pg)	OEHK (g/dl)	HbA ^a (%) ²	HbF ^b (%)	Teşhis ^c	
Normal Değerler Erkek (E) Kadın (K)	14-18 12-16	4,2-5,4 3,6-5,0	42-52 36-46	80-96	27-31	32-36	1,8-3,2	< 2		
Özge Yaş Hb Cinsiyet										
1	46-K	9.2	4.45	34	76.4	20.7	27.0	5.8	0	Heterozigot
2	90-E	7.5	2.88	22	76.4	26.0	34.0	2	32.5	Homozigot
3	39-E	8.9	4.2	33	78.5	21.2	27.0	5	1.5	Heterozigot
4	46-E	11.8	6.7	33.1	49.4	17.6	35.6	3.3	0.9	Hipokrom Mikrositik anemi
5	37-K	7.5	3.316	26	78.4	22.6	28.8	5	15	β-talassemi intermedia sübhesi
6	11-K	9.4	3.86	32	83.0	24.3	29.3	4.7	0	Heterozigot
7	18-E	9.7	4.5	35	78.0	21.6	27.7	4.8	1	Heterozigot
8	34-K	9.5	4.5	32	71.1	21.1	29.7	4.2	0	Heterozigot
9	90-E	15.7	5.03	44.9	89.2	31.2	35.0	2.9	1.4	Normositik anemi
10	38-K	14.8	4.7	42	89.3	31.9	35.2	2.5	0.5	Sağlıklı gönüllü

(Hb: hemoglobin; K.K.: Kırmızı küre; OEV: Ortalama eritrosit volümü; OEH: Ortalama eritrosit hemoglobini; OEHK: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu)
(a) DEAE kolon kromatografisi (2) - (b) Alkali denatürasyon yöntemi (2) - (c) Prof.Dr. Muzaffer Aksoy tarafından yapılmıştır.

DNA ların eldesi ve konsantrasyonlarının hesaplanması

DNA nın eldesi için, Gross-Bellard ve ark. ile Grossens ve ark. nın yöntemleri modifiye edilerek kullanıldı (19, 20).

5 ml EDTA lı kan örneği 10 ml lik tüplerde + 4°C de 2500 xg de (600 rpm, rotor: SS-34), 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Supernatan atıldı. Hücre peleti, 3 defa, + 4°C de 2500xg de, 10 dakika, % 0,9 NaCl ile yıkandı. Pelet, 50 ml lik tüplere aktarılarak, üzerine 15-20 ml 131 mM NH₄Cl ve 0,9 mM NH₄HCO₃ içeren lizat solüsyonu ilave edildi ve eritrositlerin lize olması için 15 dakika buz içinde bekletildi. İşlemin tamamlanmasından sonra, tüp, + 4°C de, 10000xg de (7000 rpm, rotor: HS-4), 10 dakika fren kullanmadan santrifüj edildi. Hemoli-

zat atılarak, absorban bir kağıt üzerine ters çevrilerek kısa bir süre bekletildi ve tüp dibine yapışan pelet 10 ml 1x STE (10 mM Tris. HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) tamponu ile yıkandı. Daha sonra, tüp üzerine, 4,5 ml 1x STE ilave edilerek pelet süspansiyonu yapıldı. Son konsantrasyonu 100 µg/ml proteinaz K (Sigma) içerecek hacimde Proteinaz K tamponu (100 mM Tris. HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1 mM DTT; 10 mg/ml Proteinaz K) ve % 1 SDS ilave edildi. Bu karışım, 37°C de bir gece (16 saat) bekletildi. Maniatis ve ark.nın tarif ettiği şekilde hazırlanan 25 hacim doymuş fenol solüsyonu, 24 hacim kloroform ve 1 hacim izoamil alkol karışımında iki defa, 24 hacim kloroform ve 1 hacim izoamil alkol karışımında bir defa ve son olarak su ile doymuş eterde bir defa ekstre edildi (21). Nükleik asitler, 1/10 hacim 3 M sodyum asetat, pH 5,0 ve 2,5 hacim saf etanol ilavesi ile çöktürüldü. Pelet iki defa % 70 lik bir defa da saf etanol ile yıkanarak liyofilize edildi. Pelet 1 ml 1x TE (10 mM Tris. HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) içinde çözüldü ve -20°C de saklandı. DNA ların % 1 SDS içinde 260 nm de optik dansite değerleri alınarak aşağıdaki formüle göre konsantrasyonları hesaplandı. DNA konsantrasyonları 0,42 µg/ml ile 1,67 µg/ml arasında değişmektedir.

$$\text{O.D.} \times 50 \mu\text{g/ml} \times 200 \text{ (seyrelti faktörü)}$$

$$= \dots \mu\text{g}/\mu\text{l DNA}$$

$$1000 \mu\text{l/ml}$$

$$(1 \text{ O.D.} = 50 \mu\text{g/ml DNA})$$

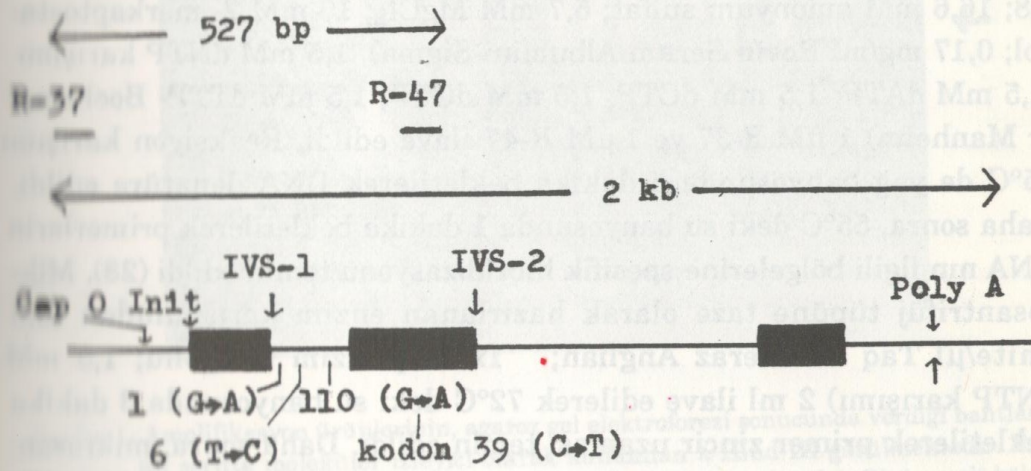
Amplifikasyon primerleri ve prob olarak kullanılan oligonükleotidler

Amplifikasyon primerleri 20, prob olarak kullanılan oligonükleotidler 19 deoksiribonükleik asit zincir uzunluğunda olup dizgisi tablo 2 de gösterilmektedir. Primerler (R-37 ve R-47), β-globin geninin "cap" noktası 'O' kabul edilirse, -76.ıncı nükleotidden başlayarak IVS-1, 1, IVS-1, 6, IVS-1, 110 ve β-39 uncu kodon mutasyonlarını kapsayacak şekilde, ikinci eksonun 451 inci nükleotidinde son bulan 527 bazlık bir bölgeyi içermektedir.

Tablo-2: Primerlerin (R-37, R-47) ve prob olarak kullanılan sentetik oligonükleotidlerin, β -globin geni üzerindeki pozisyonları, dizi analizleri ve tipleri

No	Pozisyon	5' Dizi Analizi 3'	Tip
R-37	-76 cap'a göre 5'	CCAATCTACTCCCAGGAGCA	Primer
R-47	+ 451 Exon 2	CACTCAGTGTGGCAAAGGTG	Primer
I	IVS-I,1	GCAGATTGGTATCAAGGTT	Mutant
II	IVS-I, 1,6	GCAGGTTGGTATCAAGGTT	Normal
III	IVS-1, 6	GCAGGTTGGCATCAAGGTT	Mutant
IV	IVS-I, 110	CTGCCTATTGGTCTATTTT	Normal
V	IVS-I,110	CTGCCTATTAGTCTATTTT	Mutant
VI	Ekson 2, kodon 39	CCTTGGACCCAGAGGTTCT	Normal
VII	Ekson 2, kodon 39	AGAACCTCTAGGTCCAAGG	Mutant

Şekil 1 de primerlerin ve sentetik oligonükleotidlerin β -globin genindeki pozisyonları ve tablo 3 de ise incelenen nokta mutasyonlarının mutant sınıfları açıklanmaktadır.



Şekil-1: Primerler (R-37, R-47) ile mutant bölgelerin, β -globin genindeki pozisyonları. Siyah renkli kutular, soldan sağa sırasıyla ekson 1, ekson 2 ve ekson 3ü göstermektedir.

Tablo-4: Çalışmada incelenen nokta mutasyonlarının mutant sınıfları ve ortaya çıkardıkları β - talassemi tipleri. *No. lar tablo 2 den alınmıştır.

No+	Pozisyon	Mutant Sınıfı	Tipi Kaynak
I	IVS-1 1 (G→A)	RNA proçesinde, kesilme noktasında değişme (splice junction mutation)	β^+ (22)
III	IVS- 6 (T→C)	RNA proçesinde, "concensus" deęişmesi	β^+ (22)
V	IVS-I 110 (G→A)	RNA proçesinde, IVS içinde deęişme (Internal IVS change)	β^+ (23, 24)
VII	Ekson 2 kodon 39 (C→T)	Fonksiyonel olmayan mRNA oluşması (non sense mutation)	β^0 (25 - 27)

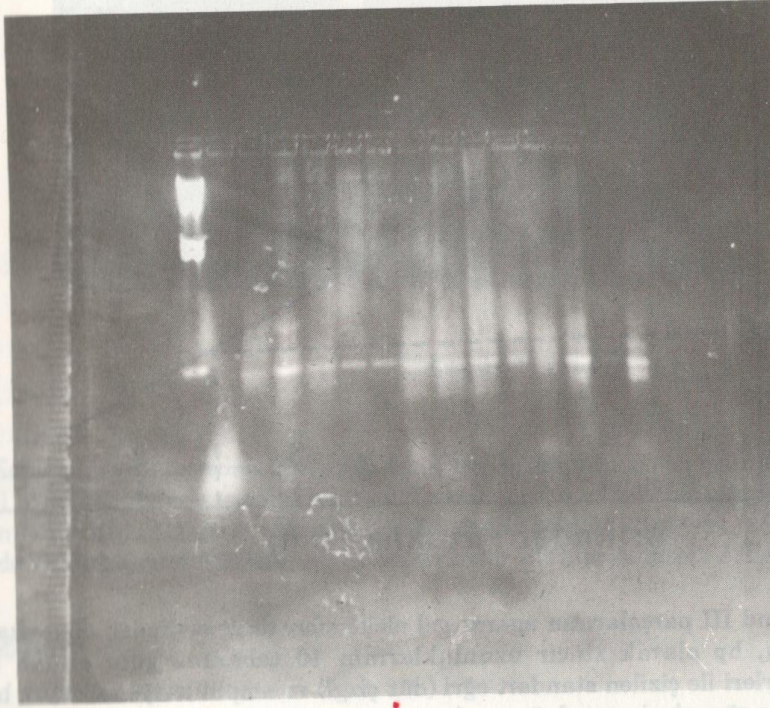
Gen amplifikasyonu

Amplifikasyon, laboratuvarımızın koşullarına modifiye edilerek uygulanmıştır (7, 28, 29). Bir mikrosantrifüj tüpüne, son hacmi 50 μ l olacak şekilde 0,5 μ g DNA, 1x Taq enzim tamponu (67 mM Tris. HCl, pH 8,8; 16,6 mM amonyum sulfat; 6,7 mM MgCl₂; 10 mM 2- merkaptotanol; 0,17 mg/ml Bovin Serum Albumini-Sigma), 1,5 mM dNTP karışımı (1,5 mM dATP; 1,5 mM dCTP; 1,5 mM dGTP; 1,5 mM dTTP- Boehringer Mannheim) 1 μ M R-37 ve 1 μ M R-47 ilave edildi. Reaksiyon karışımı 95°C de yağ banyosunda 5 dakika bekletilerek DNA denatüre edildi. Daha sonra, 55°C deki su banyosunda 1 dakika bekletilerek primerlerin DNA nın ilgili bölgelerine spesifik hibridizasyonu temin edildi (28). Mikrosantrifüj tüpüne taze olarak hazırlanan enzim karışımından (0,5 ünite/ μ l Taq Polimeraz Anglian; 1x Taq enzim tamponu; 1,5 mM dNTP karışımı) 2 ml ilave edilerek 72°C deki su banyosunda 3 dakika bekletilerek primer zincir uzaması temin edildi. Daha sonra, mikrosantrifüj tüpü, 1 dakika 95°C de denatürasyon, 1 dakika 55°C de hibridizasyon ve 3 dakika 72°C de zincir uzama işlemlerinin gerçekleşmesi için tutuldu ve bu döngü 25 defa tekrarlandı. 10.uncu döngüden sonra 2 ml ve 20. inci döngüden sonra 1 μ l Taq enzim karışımından ilave edildi. İşlem sonunda reaksiyon -20°C de saklandı.

Agaroz gel elektroforezinde amplifikasyon ürünlerinin incelenmesi

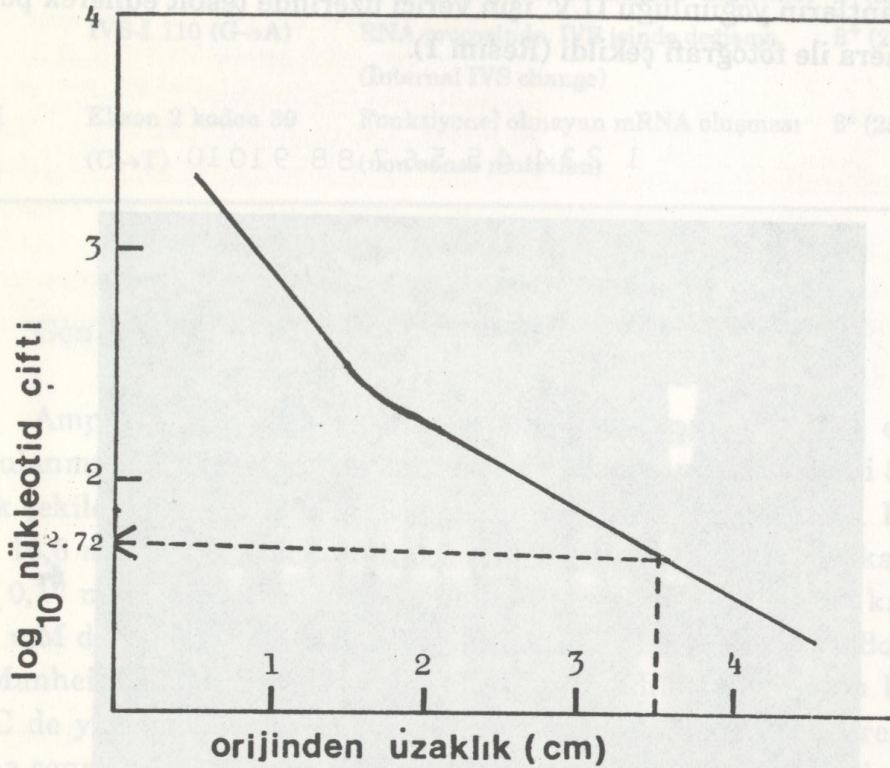
Her bir amplifikasyon reaksiyonundan alınan 4 µl örnek, 5 µl agaroz gel yükleme tamponu (% 0,05 bromofenol mavisi; % 20 fikol, tip 400-Bigma) ve 11 µl distile su karıştırılarak 1xTAE (40 mM Tris; 4 mM EDTA, pH 8,0; 20 mM sodyum asetat; asetik asit ile pH 7,8 e ayarlanır) tamponu içinde % 1,4 lük agaroz geli (0,5 µg/ml etidyum bromür içerir) üzerine yüklendi ve 7 volt/cm de 4 saat yürütüldü. İzleyici olarak Hind III (Biolabs) ile kesilmiş λ DNA sı kullanıldı. Amplifikasyon bantları ve bantların yoğunluğu U.V. ışın verici üzerinde tesbit edilerek polaroïd kamera ile fotoğrafı çekildi (Resim 1).

1 2 3 4 4 5 5 6 7 8 8 9 10 10



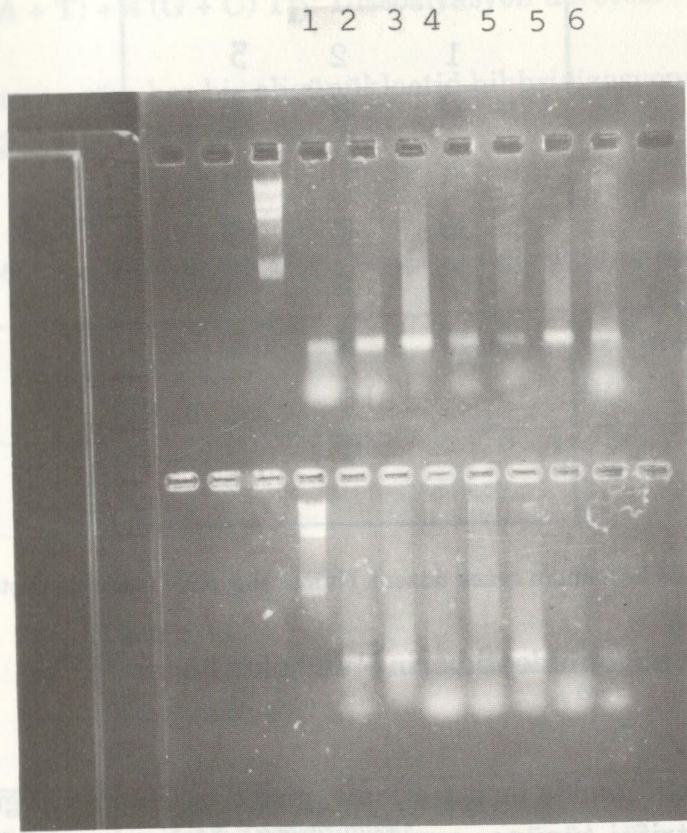
Resim-1: Amplifikasyon ürünlerinin, agaroz gel elektroforezi sonucunda verdiği bantlar. En sol şeritte moleküler izleyici olarak kullanılan λ Hind III görülmektedir. Resim üzerindeki numaralar tablo 1 de verilen olgu numaralarıdır. Ok işaretli bölgede görülen bantlar, her örnekte gen amplifikasyonunun farklı yoğunluklarda fakat her örnekte gerçekleştiğini göstermektedir (Bazı örnekler çift tatbik edilmiştir.)

İzleyici bantların orijine olan uzaklıklarına karşılık, zincir uzunluklarının baz çifti (bp) olarak 10 tabanına göre alınan logaritmik değerinin verdiği standart eğri üzerinde amplifikasyon bantlarının zincir uzunlukları hesaplandı (şekil 2). Bu şekilde, dikey eksendeki 2,72 değerinin 524 baz çiftine tekabül etmesi, istenen DNA parçasının tamamının amplifiye edildiğini gösterdi.



Şekil-2: λ Hind III parçalarının agaroz gel elektroforezinde orijinden olan uzaklıklarına karşı, bp olarak zincir uzunluklarının 10 tabanına göre alınan logaritmik değerleri ile çizilen standart eğri (düz çizgi) ve amplifikasyon ürününün bu standart eğriye göre zincir uzunluğunun hesaplanması (kesik çizgiler).

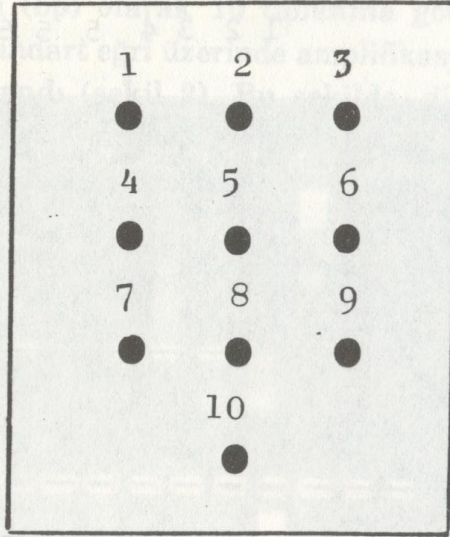
Dot-blota yüklenecek amplifiye DNA örnek miktarlarının eşit olması için resim 1 de gözlenen bant yoğunluklarına göre göz ile yapılan ayarlamalarda tesbit edilen hacimlerin bant yoğunlukları resim 2 de görülmektedir.



Resim-2: Konsantrasyon ayarlaması yapıldıktan sonra, amplifikasyon ürünlerinin, agaroz gel elektroforezinde verdiği bantlar. En sol şeritte moleküler izleyici olarak kullanılan λ Hind III görülmektedir. Resim üzerindeki ve altındaki numaralar tablo 1 de verilen olgu numaralarıdır (Bazı örnekler çift olarak tatbik edilmiştir).

Dot-blot

Yükleme hacimleri 5-10 μ l arası değişen amplifikasyon ürünleri, son hacimleri 100 μ l olacak şekilde 0,4 M NaOH ve 25 mM EDTA, pH 8,0 tamponu içinde, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek denatüre edildi. Yüklemeden 5 dakika önce distile su ile ıslatılan naylon membran daha sonra vakumlu dot-blot cihazına (Bio-Rad) yerleştirildi. Şekil 3 de dot-blotdaki örnek düzeni görülmektedir. Blot olukları, daha sonra 100-200 μ l 2x SSC (300 mM NaCl; 30 mM trisodyum sitrat; 12 M HCl ile pH 7,0) ile yıkandı. Blot önce bir absorban kağıt üzerinde, oda sıcaklığında daha sonra 80°C de 2 saat kurutuldu.



Şekil-3: Dot-blot da kullanılan örnek düzeni. Numaralar tablo 1 de verilmiştir.

Sentetik oligonükleotidlerin 5' uç noktasından ^{32}P ile işaretlenmesi

Radyoaktif madde ile işaretleme, modifiye edilerek uygulandı (21). Bir mikrosantrifüj tüpüne, son hacmi 50 μl olacak şekilde 40 pmole sentetik oligonükleotid (Symbicom), 1x Polinükleotid Kinaz enzim tamponu (70 mM Tris. HCl, pH 7,6; 10 mM MgCl_2 ; 0,5 mM DTT), 100 $\mu\text{Ci}^{32}\text{PdATP}$ (Amersham, 5000 Ci/mmol) ve 2 ünite Polinükleotid Kinaz enzimi (Biolabs) ilave edildi. 37°C deki su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. Mikrosantrifüj tüpüne 2 μl 0,5 M EDTA, pH 8,0 ilavesi ile reaksiyon durduruldu.

Reaksiyon karışımı, gel filtrasyon prensibine göre işleyen Sephadex G-25 (Sigma) den geçirilerek prob izole edildi. Normal ve mutant olmak üzere yedi ayrı oligonükleotidin ^{32}P ile 5'uç işaretleme çalışmalarında % 44-% 92 değerler arasında değişen değerlerde inkorporasyon elde edildi.

Hibridizasyon

Dot-blot için hibridizasyon yöntemi modifiye edilerek uygulandı (30). Hibridizasyon dereceleri (T_H), aşağıdaki denkleme göre hesaplandı (31).

$$T_H: T_D - 3^\circ\text{C} \quad T_H: \text{hibridizasyon derecesi}$$
$$T_D: 2(A + T) + 4(G + C) \quad T_D: \text{Dissosiyasyon derecesi}$$

Bu yöntemle göre her bir oligonükleotid hibridizasyonu için hesaplanan T_H değerleri tablo 5 de gösterilmiştir.

Tablo-5: Oligonükleotid problemleri için hesaplanan hibridizasyon dereceleri

Oligonükleotid Numarası*	Hibridizasyon Derecesi (T_H)
I	51°C
II	53°C
III	55°C
IV	49°C
V	47°C
VI	60°C
VII	58°C

*Oligonükleotid numaraları Tablo 2'de verilmiştir.

Naylon membran, önce 5-10 ml 5x SSPE (0,75 M NaCl; 0,075 M trisodyum sitrat; 12 M HCl ile pH 7,0), 5x Denhardt solüsyonu (% 0,1 fkol, tip 400; % 0,1 polivinilpirolidon-Sigma; %0,1 Bovin Serum Albumini), ve % 0,5 SDS içinde, bir saat ön hibridizasyon yapıldı. Daha sonra aynı sıcaklıkta aynı tampon içinde radyoaktif prob ($9,4-54,6 \times 10^6$ sayım/dakika) ilave edildi ve 2 saat hibridize edildi. Hibridizasyon süresinin tamamlanmasından sonra naylon membran 2 defa, 500 ml 5xSSPE ve %0,1 SDS içinde, oda sıcaklığında, 10 dakika ve 1 defa 500 ml 5xSSPE ve %0,1 SDS içinde T_H derecesinde, 10 dakika yıkandı. Membran kısa bir süre, absorban bir kağıt üzerinde kurutuldu. İnce bir naylon torba içinde otoradyografiye verildi.

Otoradyografi

Röntgen film kasetinin her iki yüzeyinde bulunan şiddetlendirici levhalar arasında sandviç yapılan film, 4-18 saat, -70°C de bekletildi

(32). Film kaseti -70°C den çıkartılarak, karanlık odada, aşağıdaki şekilde banyo edildi.

Kodak röntgen banyosu	: 5 dakika
Su banyosu	: 1 dakika
Sabitleştirici banyo	: 10 dakika
(200 g sodyum tiosülfat; 12 g sodyum sülfat; 12 g potasyum meta bi sülfat)	
Çalkalama	: 15 dakika

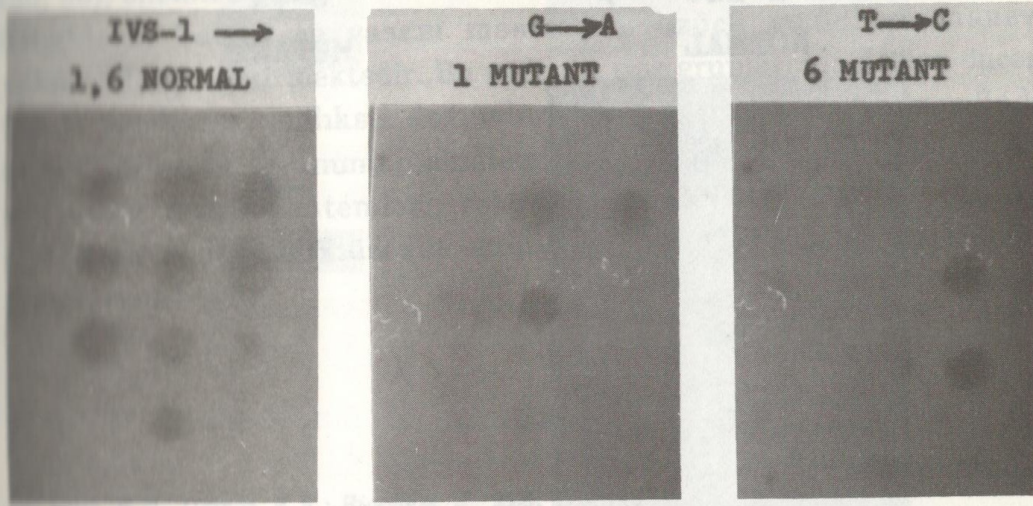
Film oda sıcaklığında kurutuldu.

Naylon membrandan probun uzaklaştırılması

Naylon membran ($0,45\ \mu\text{m}$, Nytran NY 13, Schleicher Schuell), her otoradyografiden sonra, üzerindeki prob uzaklaştırılarak, başka bir prob ile yeniden hidridize edildi (33). Naylon membran, 2 defa 10 dakika, oda sıcaklığında, 50 mM NaOH içinde yıkandı. Daha sonra, tampon 5 defa değiştirerek, oda sıcaklığında 1xTE içinde yıkandı. Yıkama işlemlerinin tamamlanmasından sonra, radyoaktif maddenin tamamıyla uzaklaşıp uzaklaşmadığı, radyoaktif detektör ile kontrol edildi. Radyoaktivitenin tamamıyla uzaklaşmadığı durumlarda, yıkama işlemi tekrarlandı.

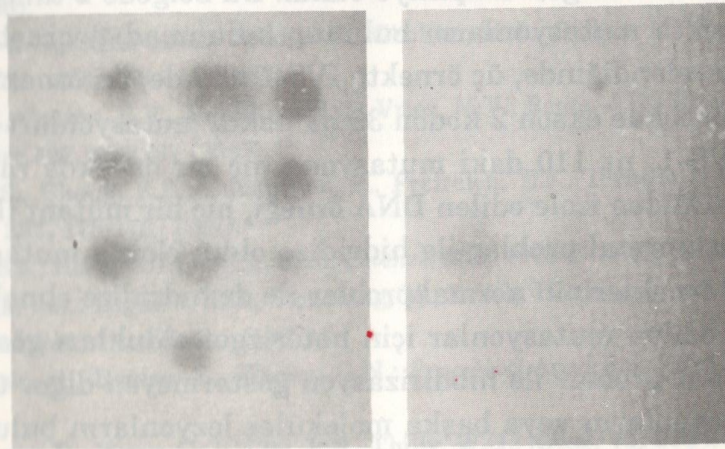
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Dot-blot hidridizasyonunun sonuçlarına göre, 10 adet DNA örneğinin üçünde IVS-1 in 1 inci nükleotidinde G \rightarrow A, ve ikisinde IVS-1 in 6 inci nükleotidinde T \rightarrow C, ve birinde 2 inci eksonda 39 uncu kodonda C \rightarrow A mutasyonlarının bulunduğu saptandı (Resim 3 ve Resim 4). IVS-1 in 110 uncu nükleotidinde G \rightarrow A mutasyonuna rastlanmadı (Resim 5).

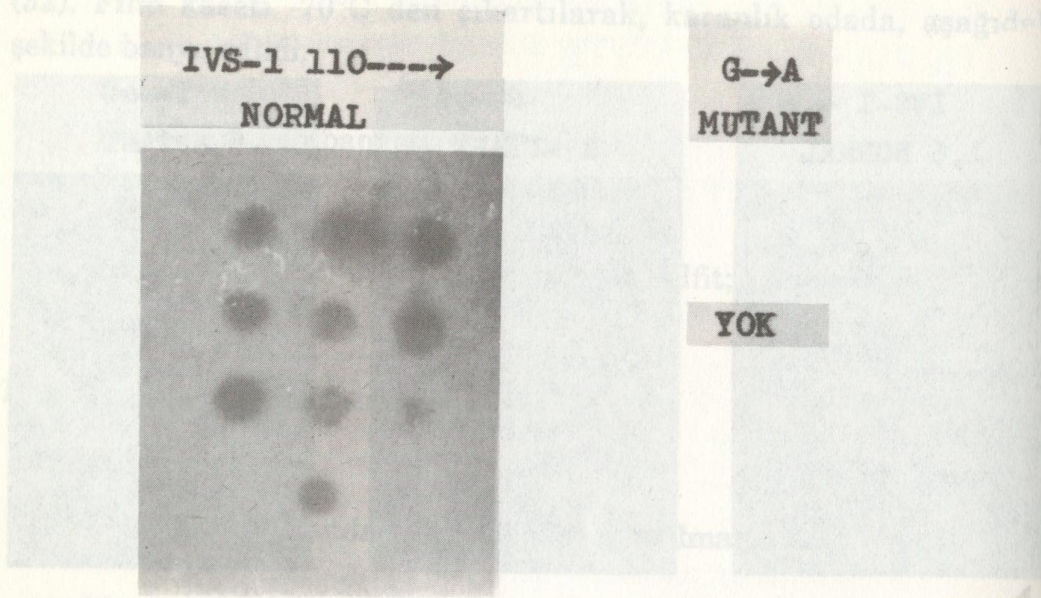


Resim-3: IVS-1 nükleotid 1,6 normal, IVS-1 nükleotid 1 mutant ve IVS-1 nükleotid 6 mutant hidridizasyonları

EKSON 2 KODON 39 --- C → A
NORMAL MUTANT



Resim-4: 2 inci eksonda 39 uncu kodonda normal ve mutant hidridizasyonları.



Resim-5: IVS-1 nükleotid 110 normal ve mutant hibridizasyonları

Bu çalışmada, İstanbul'un çeşitli hastanelerinden gönderilen, klinik bulguları anemi veya β -talassemi gösteren 9 hasta kanı ile bir sağlıklı gönüllü kanından DNA izole edildi. DNA örneklerinde, β -globin geninin belirli bir bölgesi amplifiye edildi. Bu bölgede β -talassemiye yol açan bazı nokta mutasyonların bulunup bulunmadığı araştırıldı. Otodiyografi incelendiğinde, üç örnekte IVS-1 nt 1 de, iki örnekte IVS-1 nt 6 da ve bir örnekte ekson 2 kodon 39 da nokta mutasyonları bulunduğu saptandı. IVS-1 nt 110 daki mutasyona hiç bir örnekte rastlanmadı. Sağlıklı gönüllüden izole edilen DNA örneği, hiç bir mutant ile hidridize olmadı fakat normal problemler ile hidridize oldu. Nokta mutasyon tesbit edilen DNA örneklerinin normal problemler ile de hidridize olmaları, hastaların tesbit edilen mutasyonlar için heterizgot oldukları gösterdi. Kullanılan mutant problemler ile hibridizasyon göstermeyen diğer üç hastada, başka mutasyonların veya başka moleküler lezyonların bulunabileceği görüşü kuvvetlendi.

Talassemi, özellikle Akdeniz kökenli insanlarda yaygın olarak bulunur. Bu bölgelerde rastlanan malarya parazitinin mutant alleller için pozitif seleksiyon göstermesi, hastalığın neden özellikle akdeniz kökenli insanlarda yaygın olduğu hususuna bir görüş getirmektedir (34).

Türkiye'de sıklığı %2 olarak tesbit edilmiş bulunan β -talassemi (35, 36), önemli bir sağlık sorununun olmasını yanısıra hastalıklı doğan bebeklerin bakım ve yaşam masrafları, üzücü maddi ve manevi yükümlülükler getirmektedir. Bu nedenle, risk gruplarında doğum öncesi teşhis yapılması, sağlıklı doğumları önleyecek ve Türkiye genelinde önemli bir sağlık sorununu çözümlenmiş olacaktır. Doğum öncesi, en modern kesin teşhis yöntemleri, rekombinant DNA teknolojisinin hastalıkların moleküler düzeyde anlaşılmasına gösterdiği katkıları ile gerçekleşmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ellis, K.P., Davies, K.E.: *Biochem. J.*, **226**, 1-11 (1985).
2. Kan, Y.W., Dozy, A.M.: *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5631-5635 (1978).
3. Geever, R.F., Wilson, L.B., Nallaseth, F.S., Milner, P.F, Bittner, M., Wilson, J.T.: *Natl.Acad. Sci. USA*, **78**, 5081-5085 (1981).
4. Wilson, J.T., Milner, P.F., Summer, M.E., Nallaseth, F.S., Fade, H.E., Reindollar, R.H., McDonough, P.G., Wilson, L.B.: *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **79**, 3628-3631 (1982).
5. Chang, J.C., Kan, Y.W.: *New Eng.J.Med.*, **307**, 30-32 (1982).
6. Orkin, S.H., Little, P.F.R., Kazazian, H.H.Jr., deBoehm, C.D.: *New Eng.J.Med.*, **307**, 32-36 (1982).
7. Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn,G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.: *Nature*, **324**, 163-166 (1986).
8. Emburg, S.H., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Gholsen, M.A., Golbus, M., Arnheim, N., *New Eng.J.Med.*, **316**, 656-661 (1987).
9. Bos, J.L., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Vries, M.V., Boom, J.H., Eb,A.J., Vogelstein, B.: *Nature* **327**, 293-297 (1987).
10. Lee, M.S., Chang, K.S., Cabanillas, F., Freireich, E.J., Truzillo, J.M., Strass, S.A.: *Science*, **237**, 175-178 (1987).
11. Scharf, S.J., Horn, G.T., Erlich, H.A.: *Science*, **233**, 1076-1078 (1986).
12. Wrischnik, L.A., Higuchi, R.G., Stoneking, M., Erlich, H.A., Arnheim, N., Wilson, A.C.: *Nucl.Acids Res.*, **15**, 529-542 (1987).
13. McManon, G., Davies, E., Wogen, G.N.: *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **84**, 4974-4978 (1987).
14. Keohavong, P., Wang, C.C., Cha, R.S., Thilly, W.G.: *Gene*, **71**, 211-216 (1988).
15. Wong, C., Dowling, C.E., Saiki, R.K., Higuchi, R.G., Erlich, H.A., Kazazian, H.H. Jr. *Nature*, **330**, 384-386 (1987).
16. Engelke, D.R., Hoener, P.A., Collins, F.S.: *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **85**, 544-548 (1988).
17. Akar,N., Çavdar, A.O., Dessi, E., Loi, A., Pirastu, M., Cao, A.: *J.Med.Genet.*, **24**, 378-381 (1987).

18. Diaz-chio, J.C., Yang, K.G., Stomming, T.A., Efrenow, D.G., Kutlar, F., Aksoy, M., Altay, C., Gürgey, A., Kılınc, Y., Huisman, T.H.J.: *Blood*, **71**, 248-251 (1988).
19. Gross-Bellard, M., Outed, P.: *Eur.J.Biochem.*, **36**, 32-38 (1973).
20. Goossens, M., Kan, Y.Y.: *Meth. Enzym.* **76**, 805-817 (1981).
21. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrodi, J.: *Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, New York*, 1982.
22. Orkin, S.H., Kazazian, H.H.Jr., Antonarakis, S.E., Goff, S.C., DeBoehm, C.D., Sexton, J.P., Waber, P.G., Giardina, P.V.J.: *Nature*, **296**, 627-631 (1982).
23. Spritz, R.A., Jagadeeswaren, P., Choudary, P.V., et al.: *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **78**, 2455-2459 (1981).
24. Westaway, P., Williamson, R.: *Nucl.Acids Res.*, **9**, 1777-1788 (1981).
25. Moschonas, N., deBoehr, E., Growveld, F.G., Dahl, H.H.M., Skewmaker, C.K., Flavell, R.A.: *Nucl.Acids Res.* **9**, 4391 (1982).
26. Orkin, S.H., Goff, S.C., Nathan, D.G.: *J.Clin.Invens.*, **67**, 878-884 (1981).
27. Treacartin, R.F., Liebhaber, S.A., Chang, J.C., Lee, Y.W., Kan, Y.W.: *J.Clin.Invens*, **68**, 1012-1017 (1981).
28. Saiki, R.K., Gelfard, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.: *Science*, **239**, 487-491 (1988).
29. Wong, C., Lowling, C.E., Saiki, R.K., Higuchi, R.G., Erlich, H.a., Kazazian, H.H. Jr.: *Nature*, **330**, 384-386 (1987).
30. Diaz-Chico, J.C., Yang, K., Yang, K., Efremov, D.G., Stoming, T.A., Huisman, T.H.J.: *Biochem.et.Biophys.Acta.*, **949**, 43-48 (1988).
31. Beltz, G.A., Jacobs, K.A., Eickbusch, T.T., Cherbas, P.T., Kafatos, F.C.: *Meth.Enzymol.*, **100**, 266-285 (1983).
32. Swanstrom, R., Shank, P.R.: *Anal.Biochem.*, **85**, 184-192 (1978).
33. Anderson, M.L.M., Young, B.D.: Quantitative filter hybridization. In: *Nucleic Acids Hybridizations*. Eds.: Hawes, B.D., Higgins, S.J., Practical Approach Series, Iri Press, Oxford, Washington D.C., 1985, 73-137.
34. Rotter, J.I., Diamond, J.M.: *Nature*, **329**, 289-291 (1987).
35. Aksoy, M.: *Anormal Hemoglobinler ve Thalassemik Sendromlar*. TÜBİTAK, Ankara, 1982, s.42.
36. Çavdar, A.O., Arcasoy, A., Thalassaemia and abnormal haemoglobins in Turkey. In: *International Symposium on Abnormal Hemoglobins and Thalassemia*. Ed.: Aksoy, M., TÜBİTAK, Ankara, 1975, s.337.