

Duchenne/Becker Kas Distrofili Hastalarda Distrofin Genindeki Delesyonların Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Moleküler Analizi*

Dr. M. Emin ERDAL¹, Dr. Münife NEYAL², Dr. Mustafa YILMAZ², Dr. İ. Ömer BARLAS³

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı¹, MERSİN

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji² ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik³ Anabilim Dalları, GAZİANTEP

ÖZET

AMAÇ: Duchenne/Becker kas distrofisi (DMD/BMD), ilerleyici kas zayıflamasıyla seyreden X kromozomuna bağlı resessif geçişli bir hastalıktır. DMD/BMD kas distrofili hastalarda distrofin genindeki delesyonları araştırmak amaçlandı.

YÖNTEM: Bu çalışmada, 23 farklı aileden 36 DMD/BMD'li hastada polimeraz zincirleme reaksiyon tekniği (PCR) kullanılarak distrofin genindeki delesyonlar araştırıldı.

SONUÇ: Akraba olmayan dört hastanın distrofin geninde, bir veya daha fazla eksonda delesyon saptandı.

YORUM: Bu basit ve kolay teknik doğum öncesi dönemde DMD/BMD'li hastaların saptanmasında büyük yarar sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: Duchenne/Becker kas distrofisi, distrofin, PCR.

GİRİŞ

Duchenne ve Becker kas distrofisi (DMD/BMD), X kromozomal resessif bir hastalıktır. Hastalığa neden olan distrofin geni, insanda X kromozomu üzerinde Xp 21.3'e yerleşmiş 2.3 Mb'lık ve en az 75 ekson içeren bir genidir^{4,15,16,21,23}. Distrofin geninde meydana gelen delesyonlar sonucu oluşan hastalık, yenidoğan erkek çocuklarda 1/3500 sıklıkta görülürken, kızlarda nadir görülmektedir^{3,5,14}. Özellikle DMD, kas dokusunda erime sonucu güçsüzlük ve kas zayıflığı ile karakterize olup, kardiyak sorunlar ve solunum güçlüğü nedeniyle erken yaşta ölüme neden olan tehlikeli bir hastalıktır. DMD/BMD tanısı, polimeraz zincirleme reaksiyon (PCR, polymerase chain reaction) yöntemiyle belirlenmekle birlikte, son yıllarda farklı moleküler yöntemler uygulanarak hem hastaların hem de

taşıyıcıların tanısı konulabilmektedir^{10,17,18,27}.

Günümüzde kesin tedavisi olmayan hastalığın tedavisi konusunda gen mühendisliği uygulamaları ve hayvan modeli çalışmaları devam etmektedir^{9,19,25}.

Bu çalışmada, DMD/BMD'li hastalarda, hastalığa neden olan distrofin geninin bazı eksonlarındaki delesyonların PCR yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece, ailenin diğer bireylerine (anne ve kız kardeşler, v.s) RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) analiziyle taşıyıcı olup olmadıklarının belirlenmesi mümkün olacaktır. Taşıyıcı oldukları belirlenen bireylerin, daha sonraki gebeliklerinde doğum öncesi (prenatal) tanı yöntemleri uygulanarak moleküler analizlerin yapılması ve toplumda ölümcül olan hastalığın doğum öncesi dönemde belirlenerek önlenmesi mümkün olacaktır.

(* Bu araştırma Gaziantep Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (TF.97.08). Ayrıca çalışma VI. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresinde poster bildiri olarak sunulmuştur.

MATERYAL ve METOD

Araştırmada, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalına başvuran, EMG ve laboratuvar testleriyle ön tanıları konmuş DMD/BMD'li ve şüpheli hastalardan olmak üzere 23 farklı aileye ait toplam 36 bireyden alınan EDTA'lı kan örnekleri kullanıldı. Ayrıca, on sağlıklı bireyden alınan kan örnekleri de kontrol amacıyla kullanıldı. Kan örneklerinden "genomik DNA

saflaştırma" kiti (MBI Fermentas) veya standart tuz çöktürme yöntemi kullanılarak, DNA' lar elde edildi. Elde edilen DNA'lar ile Tablo 1'de belirtilen multipleks I primerleri ve Tablo 2'de belirtilen Multipleks II primerleri^{2,4,6} kullanılarak ayrı ayrı PCR işlemi yapıldı. PCR işlemi, otomatik bir Thermal Cycler (Techne, Genius) kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 1. Multipleks -I primerleri.

Ekson	Primer Dizisi	PCR Ürünü
4F 4R	5'- TTgTCggTCTCCTgCTggTCAGTg- 3' 5'-CAAAGCCCTCACTCAACATgAAgC- 3'	196 bp
8F 8R	5'- gTCCTTTACACACTTTACCTgTTgAg- 3' 5'- ggCCTCATTCTCATgTTCTAATTg- 3'	360 bp
12F 12R	5'- gATAgTgggCTTTACTTACATCCTTC- 3' 5'-gAAAgCACgCAACATAAgATACACCT- 3'	331 bp
17F 17R	5'- gACTTTcAgTgTTgAgATTACTTTCC- 3' 5'- AAgCTTgAgATgCTCTCACCTTTTCC- 3'	416 bp
19F 19R	5'- TTCTACCACATCCCATTTTCTTCCA- 3' 5'- gATggCAAAAgTgTTgAgAAAAgTC- 3'	459 bp
44F 44R	5'- CTgATCCATAgCTTTTACCTgCA- 3' 5'-TCCATCACCTTCAgAACCTgATCT- 3'	268 bp
45F 45R	5'- AAACATggAACATCCTTgTggggAC- 3' 5'- CATTCTATTAgATCTgTCgCCCTAC- 3'	547 bp
48F 48R	5'- TTgAATACATTggTAAATCCCAACATg- 3' 5'-CCTgAATAAAgTCTTCTTACCACAC- 3'	506 bp
51F 51R	5'- gAAATTggCTCTTTAgCTTgTTTC- 3' 5'- ggAgAgTAAAgTgATTggTggAAAATC- 3'	388 bp

Tablo 2. Multipleks -II primerleri.

Ekson	Primer Dizisi	PCR Ürünü
PmF PmR	5'gAAgATCTAgACAgTggATACATAACAAATgCATg- 3' 5'- TTCTCCgAAggTAATTgCCTCCCgATCTgAgTCC- 3'	535 bp
3F 3R	5'- TCATCCATCATCTTCggCAgATTAA- 3' 5'- CaggCggTAgAgTATgCCAAATgAAAATCA- 3'	410 bp
6F 6R	5'- CCACATgTAggTCAAAAAATgTAATgAA- 3' 5'- gTCTCgTAATCTTCTTACCTATgACTATgg- 3'	202 bp
13F 13R	5'- AATAggAgTACCTgAgATgTAgCAgAAAT- 3' 5'- CTgACCTTAAgTTgTTCTTCCAAAgCAg- 3'	238 bp
43F 43R	5'- gAACATgTCAAAGTCACTggACTTTCATgg- 3' 5'- ATATATgTgTTACCTACCCTTgTCggTCC- 3'	357 bp
47F 47R	5'- CgTTgTTgCATTgTCTgTTTCAgTTAC- 3' 5'- GtctaaccTTTATCCACTggAgATTg- 3'	181 bp
49F 49R	5'- gTgCCCTTATgTACCAGgCAgAAATg- 3' 5'- gCAATgACTCgTAAATAgCCTTAAgATC- 3'	439 bp
50F 50R	5'- CACCAAATggATTAAGATgTTCATgAAT- 3' 5'- TCTCTCACCAGTATCATCTTCATAg- 3'	271 bp
52F 52R	5'- AATgCAggATTTggAACAgAggCgTCC- 3' 5'- TTCgATCCgTAATgATTgTTCTAgCCTC- 3'	113 bp
60F 60R	5'- AggAgAAATgCgCCTCTgAAAgAACg- 3' 5'- CgCAgAAgCTTCCATCTggTgTTCAGg- 3'	139 bp

PCR ortamı:

Distile su.....	12 µl
10XPCR tampon.....	5 µl
dNTP Mix (2mM).....	10 µl
Primer F (her bir ekson için).....	1 µl
Primer R (her bir ekson için).....	1 µl
MgCl ₂ (25 mM).....	6 µl
Taq DNA polimeraz (2-5 unit/ µl)...	0.5 µl
Genomik DNA.....	1 µl

PCR şartları:

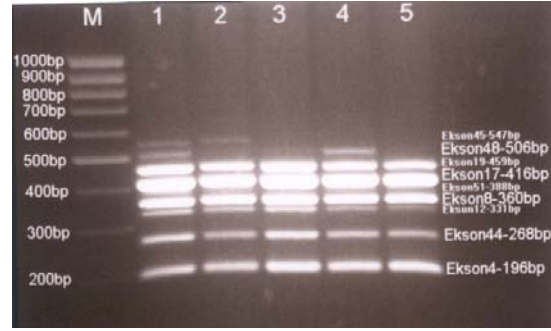
94°C	5 dak.	↕	1 döngü
94°C	48 sn.		
60°C	48 sn.	↕	30 döngü
72°C	3 dak.		
72°C	7 dak.		1 döngü

Multipleks I ve II primerleri kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucu elde edilen PCR ürünleri ve DNA marker (100 bp DNA ladder, MBI Fermentas), % 2'lik agaros jelde (TBE tamponda, 0.5 µg/ml ethidium bromide içeren) 100 volt'ta yaklaşık 30-45 dakikada elektroforezleri yapılarak ayrımları sağlandı. Elektroforez sonucu oluşan DNA fragmentlerinin gözlenmesi ve değerlendirilmesi, jel görüntüleme sistemiyle (Vilber Lourmat) gerçekleştirildi.

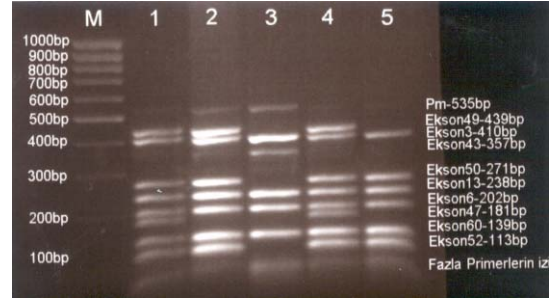
BULGULAR

Bu çalışmada, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalında DMD/BMD olduğundan kuşku edilen ve kas güçsüzlüğü yakınmaları olan 36 hastaya ait kan örneklerinden elde edilen DNA'dan, PCR tekniği kullanılarak, distrofin genindeki delesyonlar araştırıldı. Akraba olmayan dört hastanın distrofin geninde bir veya daha fazla sayıda eksonda delesyon saptandı. Bu hastalardan DMD-8 kodlu olgunun 47. ve 48. eksonlarında, DMD-19 kodlu olgunun 45, 47, 48, 49,50, 51 ve 52. eksonlarında, DMD-20 kodlu olgunun sadece 45. eksonunda ve DMD-31 kodlu olgunun 45, 47, 48 ve 49. eksonlarında delesyonlar gözlemlendi. Çalışılan bazı örnekler için multipleks I

primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu oluşan ürünlerin elektroforez görüntüleri Şekil 1'de ve multipleks II primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu oluşan ürünlerin elektroforez görüntüleri ise Şekil 2'de görülmektedir.



Şekil 1. Multipleks I primerleri kullanılarak yapılan PCR ürünlerinin elektroforez sonucu oluşan görüntüsü. M=DNA moleküler marker; 1=kontrol birey; 2=DMD-8 kodlu hasta; 3=DMD-19 kodlu hasta; 4=DMD-20 kodlu hasta ve 5=DMD-31 kodlu hasta.



Şekil 2. Multipleks II primerleri kullanılarak yapılan PCR ürünlerinin elektroforez sonucu oluşan görüntüsü. M=DNA moleküler marker; 1=kontrol birey; 2=DMD-8 kodlu hasta; 3=DMD-19 kodlu hasta; 4=DMD-20 kodlu hasta ve 5=DMD-31 kodlu hasta.

TARTIŞMA

Araştırma sonucunda, DMD-8 kodlu hastanın 47 ve 48. eksonlarında, DMD-19 kodlu hastanın 45, 47, 48, 49,50, 51 ve 52. eksonlarında, DMD-20 kodlu hastanın sadece 45. eksonunda ve DMD-31 kodlu hastanın 45, 47, 48 ve 49. eksonlarında delesyonlar saptanmıştır. İncelenen hastaların hemen hepsinin 45-52. eksonlar arasındaki bölgedeki delesyonları taşıdıkları saptandığından, ekson bölgesinin öncelikle araştırılmasının uygun olacağı söylenebilir. Araştırılan diğer hastalarda delesyon saptanmamış olması, bu olguların başka bir kas hastalığı taşıdığını veya distrofin geninin

incelenen eksonlar dışındaki eksonlarında delesyon veya mutasyonlar olabileceğini düşündürülebilir. Türk DMD/BMD'li hastalarla yapılan çalışmalarda da 45-52. Eksonlar arasındaki delesyon sıklığının yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır^{7,8,11,12,20}.

DMD X'e bağlı resessif kalıtım ile geçen ölümcül ve etkin bir tedavisi olmayan, ancak erken gebelik döneminde prenatal tanısı mümkün olan bir kas hastalığıdır. Hasta/taşıyıcı tanısı çeşitli klinik ve laboratuvar testleriyle (serum CPK, EMG, kas biyopsisi, distrofin tayini, DNA analizi, v.s) ve aile ağacı incelenmesiyle konulabilmektedir¹¹. Prenatal tanı moleküler genetik yöntemlerle (delesyon analizi, mutasyon taraması ve RFLP, v.s), cinsiyet tayiniyle ve fetal distrofin analizi ile yapılabilmektedir. Bu yöntemler arasında en kesin tanı DNA analiz yöntemi ile gerçekleştirilebilir. Bu yöntemle, sadece hastaların mutasyon tipleri belirlenmemekte, aynı zamanda taşıyıcı bireylerin belirlenmesi ve prenatal tanı ile doğum öncesi tanı konulması da mümkün olmaktadır^{1,13,22,24,26}.

Elde edilen bulgular ışığında ailenin diğer bireylerinin (anne, kız kardeşler v.s.) RFLPs analiziyle (Asp 700, BamH 1, Taq I v.s enzimler kullanılarak) taşıyıcı olup olmadıkları belirlenebilir. Aileye genetik danışma verilebilir ve daha sonraki gebeliklerinde prenatal tanı yapılarak, ölümcül olan bu hastalığın doğum öncesi dönemde saptanması durumunda gebelik sonlandırılabilir.

Bu basit ve kolay teknik, doğum öncesi dönemde DMD/BMD'li hastaların saptanmasında büyük yarar sağlayacaktır.

SUMMARY

Molecular Analysis with Polymerase Chain Reaction in the Dystrophin Gene Deletions in Patients with Duchenne/Becker Muscular Dystrophy

PURPOSE:Duchenne/Becker muscular dystrophies (DMD/BMD) are progressive muscle-wasting disorders with an X-linked recessive mode of inheritance. Distribution of the dystrophin gene

deletions in patients with DMD/BMD muscular dystrophy were objected to investigate.

METHODS:In this study, deletions in the dystrophin gene region were examined by the polymerase chain reaction (PCR) technique in 36 DMD/BMD patients from 23 different families.

RESULTS:In four unrelated patients deletions in one or more exons were identified.

CONCLUSION:This simple and rapid technique offers great potential in the prenatal diagnosis of DMD/BMD.

Key Words: Duchenne/Becker muscular dystrophies, dystrophin, PCR.

KAYNAKLAR

1. Abbs S, Bobrow M: Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. J Med Genet 1992; 29:191-6.
2. Abbs S, Yau SC, Clark S, et al: A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: a comparative analysis with cDNA hybridisation shows mistypings by both methods. J Med Genet 1991; 28:304-11.
3. Baumbach LL, et al: Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. Neurology 1989; 39:465-74.
4. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM and Kunkel LM: Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum.Genet 1990; 86:45-8.
5. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE et al: Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Res 1988; 16:11141-56.
6. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, et al: Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds): PCR protocols: A guide to methods and applications. New York London, Academic Press, 1990, p 272-81.
7. Çağlayan SH: Screening of deletions in Duchenne muscular dystrophy gene locus using polymerase chain reaction. Doğa-Tr J Med Sci 1991; 15:435-43.
8. Dincer P, Topaloglu H, Ayter S, et al: Molecular deletion patterns in Turkish Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Brain Dev 1996; 18:91-4.
9. Emery AEH: The muscular dystrophies. BMJ 1998; 317:991-5.

10. Eraslan S, Kayserili H, Apak MY, et al: Identification of point mutations in Turkish DMD/BMD families using multiplex-single stranded conformation analysis (SSCA). *Eur J Hum Genet* 1999; 7:765-70.
11. Gokgoz N, Kuseyri F, Topaloglu H, et al: Screening of deletions and RFLP analysis in Turkish DMD/BMD families by PCR. *Clin Genet* 1993; 43:261-6.
12. Gökğöz N, Topçu M, Kuseyri F et al: Screening of deletions in Turkish Duchenne-Becker muscular dystrophy patients by using two separate multiplex gene amplification systems. *Doğa-Tr J Med Sci* 1992; 16:113-23.
13. Jakubiczka S, Mitulla B, Liehr T, et al: Incidental prenatal detection of an Xp deletion using an anonymous primer pair for fetal sexing. *Prenat Diagn* 2000; 20:842-6.
14. Koeing M, Monaco A, Kunkel LM: The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; 53:219-28.
15. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, et al: Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; 50:509-17.
16. Liechti-Gallati S, Koenig M, Kunkel LM, et al.: Molecular deletion patterns in Duchenne and Becker type muscular dystrophy. *Hum Genet* 1989; 81:343-8.
17. Ligon AH, Kashork CD, Richards CS, Shaffer LG: Identification of female carriers for Duchenne and Becker muscular dystrophies using a FISH-based approach. *Eur J Hum Genet* 2000; 8:293-8.
18. Lee CC, Wu MC, Wu JY, et al: Carrier detection of Duchenne/Becker muscular dystrophy by using fluorescent linkage analysis in Taiwan. *Acta Paediatr Taiwan* 2000; 41:69-74.
19. Mann CJ, Honeyman K, Cheng AJ, et al: Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:42-7.
20. Onengut S, Kavaslar GN, Battaloglu E, et al: Deletion pattern in the dystrophin gene in Turks and a comparison with Europeans and Indians. *Ann Hum Genet* 2000; 64:33-40.
21. Pfister MH, Apaydin F, Turan O, et al: Clinical evidence for dystrophin dysfunction as a cause of hearing loss in locus DFN4. *Laryngoscope* 1999; 109:730-5.
22. Ray PF, Vekemans M, Munnich A: Single cell multiplex PCR amplification of five dystrophin gene exons combined with gender determination. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:489-94.
23. Read AP, Mountford RC, Forrest SM et al: Patterns of exon deletions in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Hum Genet* 1988; 80:152-6.
24. Roberts RG, Cole CG, Bobrow M, Bentley DR: Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:811.
25. Walter MC, Lochmuller H.: Novel approaches to treat muscular dystrophies. *Expert Opin Investig Drugs* 2001; 10:695-707.
26. Ward PA, Hejtmancik JF, Witkowski JA, et al: Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy: Prospective linkage analysis and retrospective dystrophin cDNA analysis. *Am J Hum Genet* 1989; 44:270-81.
27. Yuge L, Hui L, Bingdi X: Detection of gene deletions in Chinese patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy using cDNA probes and the polymerase chain reaction method. *Life Sci* 1999;65:863-9.

Yazışma Adres:

Doç. Dr. M. Emin ERDAL
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yenişehir Kampüsü
33161-MERSİN
e-posta: merdal36@hotmail.com