



# TEK ZİNCİR KONFORMASYON POLİMORFİZMİ (SSCP) ANALİZİNDE YANLIŞ POZİTİFLİK

H. Asuman ÖZKARA<sup>1</sup>

## FALSE POSITIVITY IN SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM (SSCP) ANALYSIS

**Summari:** The performance of a mutation scanning method, SSCP analysis was evaluated by analyses of the results of alpha-subunit gene of defective enzyme hexosaminidase A (Hex A) in infantile Tay-Sachs disease. DNA samples were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR), then denatured and subjected to SSCP analysis. DNA sequencing analysis of the suspected exons that showed different bands on SSCP gel was performed. The fragment sizes of the amplified 14 exons and flanking sequences of HEXA gene were 174-273 bp. Abnormal band patterns were observed in 13 out of 15 patients' samples. DNA sequencing analysis detected deletion (12bp), single nucleotide transition and transversion and splice site mutations, in 9 out of 13 patients' samples. Mutations of 4 of the patients have not been detected, even though their SSCP results were positive. The other exons of these patients were normal by SSCP analysis. In order to increase the performance of the SSCP analysis, the composition of the gel and the temperature of the electrophoresis were changed. Changing of the gel composition and temperature affected the single strand conformation. Theoretically, same nucleotide sequences give the same conformation at the same environmental conditions. At 4 DNA samples that were amplified with the same primers by PCR, different conformations were observed at the same condition for the same nucleotide sequence. It may arise from the variability of intronic sequences of different persons. This variability may affect single stranded DNA conformation and causes different band appearances in SSCP analysis. The sensitivity and the false-positivity of SSCP for HEXA gene was found 60% and 26%, respectively. As a conclusion, SSCP is a useful and cheap method compared to the other mutation scanning methods for detecting new mutations in large genes. False positivity of the method indicated that different band migrations on SSCP gel do not always mean a mutation. Using different combinations of various factors that affects SSCP and combination of SSCP with the other mutation analysis methods can enhance the performance of SSCP.

**Key Words:** Tay-Sachs disease, HEXA gene, SSCP analysis, false positivity

**Özet:** Bir mutasyon tarama yöntemi olan SSCP analizinin performansı, infantil Tay-Sachs hastalığında eksik olan heksozaminidaz A (Hex A) enzimi alfa altbirim geninin analiz sonuçları ile değerlendirildi. DNA örnekleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı ve denatüre edilip SSCP analizine uygulandı. SSCP analizinde farklı bant görülen eksonların DNA dizi analizi yapıldı. PCR ile çoğaltılan HEXA geninin 14 eksonu ve çevresindeki dizilerin büyüklüğü 174-273 baz çifti arasında değişiyordu. Onbeş hasta örneğinden 13'ünde SSCP analizinde normal olmayan bant paterni gözlemlendi. DNA dizi analizi ile 13 hastanın 9'unda delesyon, tek nükleotid transizyon ve transversiyonu ve kesim bölgesi mutasyonları bulundu. Onüç hastanın 4'ünde SSCP'de pozitif sonuçlar elde edilmesine rağmen, DNA dizi analizi ile mutasyon saptanamadı. Bu hastalarda diğer eksonlar SSCP analizi ile normal bulundu. SSCP analizinin performansını artırmak amacı ile elektroforez jelinin kompozisyonu ve elektroforez sıcaklığı değiştirildi. Jel kompozisyonu ve sıcaklığın değiştirilmesi tek iplikli DNA'nın konformasyonunu etkiledi. Teorik olarak aynı nükleotid dizileri aynı koşullarda aynı konformasyonu alırlar. Aynı primerlerle PCR'da çoğalan 4 DNA örneğinde, aynı nükleotid dizisi için, aynı koşullarda normal kontrole göre farklı konformasyonlar gözlemlendi. Bu, intron dizilerinde varolan kişiler arası farklılıktan kaynaklanabilir. Bu farklılık tek iplikli DNA'nın

*konformasyonunu etkileyebilir ve SSCP analizinde farklı bantların ortaya çıkmasına neden olabilir. HEXA geni için SSCP'nin duyarlılığı %60, yanlış pozitiflik oranı ise %26 bulunmuştur. Sonuç olarak, SSCP büyük genlerde yeni mutasyonları belirlemek için diğer mutasyon tarama yöntemlerine göre kullanışlı ve ucuz bir yöntemdir. Yanlış pozitif bulgu SSCP jelinde farklı bant migrasyonunun her zaman bir mutasyonu göstermeyeceğini göstermektedir. SSCP'nin performansı, SSCP'yi etkileyen faktörlerin değişik kombinasyonları veya SSCP'nin diğer mutasyon analiz yöntemleri ile kombine edilmesi ile artırılabilir.*

**Anahtar Kelimeler:** Tay-Sachs hastalığı, HEXA geni, SSCP analizi, yanlış pozitiflik

## GİRİŞ

Genetik değişikliklerin çoğunun DNA'daki tek baz farklılıklarına bağlı olması bunları saptamak için çeşitli yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Kalıtsal hastalıklarda hastalığa neden olan spesifik mutasyonların tanımlanması bu hastalıkların tanıları, prenatal tanıları ve diğer aile bireylerinin test edilmesi için önemlidir. PCR tekniğinin bulunması ile birlikte hastalıklara neden olan mutasyonları tanımlayabilmek için kullanılan yöntemlerde büyük bir çeşitlilik ortaya çıkmıştır (1, 2). Bunlar içinde en yaygın kullanılanı SSCP'dir. SSCP bilinmeyen mutasyonları saptamak için kullanılan bir mutasyon tarama yöntemidir. Tek iplikli DNA'nın denatürasyon olmayan koşullar altında aldığı ikincil yapıdaki farklılıkları saptar. İkincil yapı esas olarak baz kompozisyonuna bağlıdır (3). Ortamın sıcaklığı, DNA'nın boyu, elektroforez jelinin özellikleri, DNA'yı tek iplikli hale getirmek için kullanılan maddeler ve yöntemler aynı baz kompozisyonunda farklı ikincil yapılar oluşmasını sağlarlar (4-6). SSCP analizi mutasyonlar sonucu tek iplikli DNA'da oluşan yeni konformasyona bağlı elektroforezdeki yürüme farklılığından yararlanarak mutasyonların yeri hakkında bilgi verir. Mutasyonu tanımlamaz. Nokta mutasyonları, küçük delesyonlar, insersiyonlar ve polimorfizmlerin yeri SSCP analizi ile belirlenebilir (7, 8). SSCP'nin yaygın olarak kullanılması ile bu yöntemin mutasyonları saptamadaki duyarlılığı ile ilgili değişik veriler ortaya çıkmıştır. SSCP'nin mutasyonları saptamadaki duyarlılığının %50-80 arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. Bu rakam SSCP'yi etkileyen koşullar değiştirildiği zaman %90'a kadar çıkabilmektedir. Ancak 4 farklı

parametreyi değişik kombinasyonlarla çalışmak iş yükünü çok artırmaktadır. Bunların denendiği durumlarda bile %10'luk mutasyonu belirlenemeyen bir grup bulunmaktadır (9, 10).

Bu çalışmada SSCP analizinin performansı, Hex enzimi alfa altbirim genindeki mutasyon taraması sonuçları ile sunulmuştur.

## MATERYAL VE METOD

### Hastalar ve kontrol grubu:

Klinik ve laboratuvar bulguları ile infantil Tay-Sachs hastalığı tanısı almış 15 hastanın mutasyon analizi yapıldı.

Kontrol örneği mental retardasyonu olmayan sağlıklı bir çocuktan elde edildi.

### DNA izolasyonu:

10 ml EDTA'lı kandan fenol-kloroform ve tuz çöktürme metodu ile izole edildi (11).

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

Hastalar ve kontrol örneğinin Hex alfa-altbirim geninin 14 eksonu ve çevresindeki diziler özgül primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (11). 59-61°C arasında değişen annealing dereceleri uygulandı. PCR ile çoğaltılan DNA'ların büyüklüğü 174-273 bazçifti arasında idi.

### Agaroz jel elektroforezi:

PCR ile çoğaltılmış örnekler amplifikasyon ve kontaminasyon değerlendirmesi için %2'lik Agaroz jel elektroforezine uygulandı. DNA bantları etidyum bromür ile görünür hale getirildi (11).

### SSCP

PCR ürünü DNA, 96 C'de kaynayan su veya metal blokta 10 dk tutularak gerçekleştirildi. Örnekler 33cm x 39cm x 0.4mm boyutlarında %10 gliserol içeren %6'lık poliakrilamid jele (Sigma, USA) veya %10 gliserol içeren MDE (Mutation Detection Enhancement, FMC, USA) jele uygulandı. Oda sıcaklığında veya 4°C'de 400V'da 15mA'de 16-20 saat sürsünce elektroforez yapıldı.

#### Gümüş boyama:

Jel, %100 etanol, %100 asetik asit içeren çözelti ile yıkandıktan sonra %0.1'lik AgNO<sub>3</sub> ile boyandı. Jele %1.5 NaOH, %0.01 NaBH<sub>4</sub> ve formaldehit içeren çözeltinin uygulanmasının ardından bantlar görünür hale getirildi. %0.75'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile boyanan bantlar fikse edildi (12).

#### DNA dizi analizi:

Sanger dideoksi zincir sonlanması yöntemi ile Sequenase kit version 2 (USB) kullanılarak manuel ve 'thermocycler'da 'cycle sequencing' reaksiyonunun ardından ABI prizim otomatik dizi analizörü (Perkin-Elmer Cetus) kullanılarak yapıldı (13).

Tablo 1. Tay-Sachs hastalığına sahip Türk bebeklerde SSCP ve DNA dizi analizi ile bulunan Hex A alfa altbirim gen mutasyonları

Mutasyon	Lokalizasyon	Mutasyonun saptandığı hasta sayısı
1- INS-5 G→A	Intron 5	1
2- R393X	Ekson 11	1
3- R137X	Ekson 3	1
4- 12 bç delesyon	Ekson 10	4
5- G454D	Ekson 12	1
6- Splice bölge G→A	Ekson 3	1

#### SSCP ve DNA dizi analizi ile şu sonuçlar elde edildi:

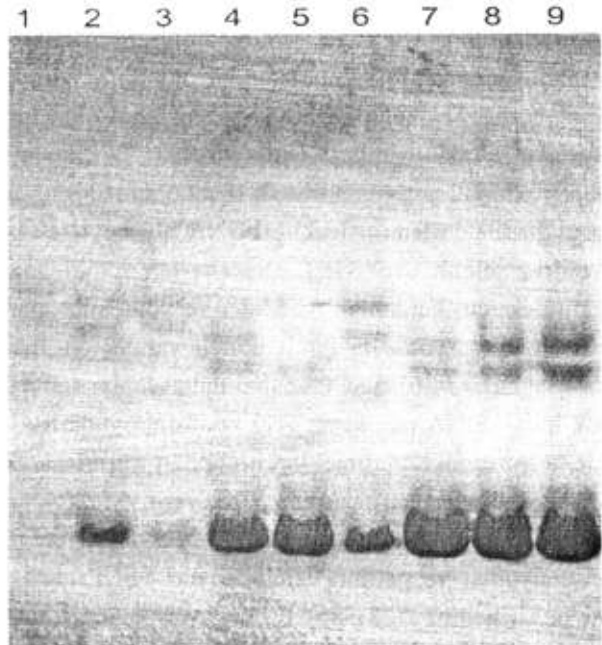
1- 15 hastadan 13 tanesinde SSCP analizi ile mutasyon olan ekson belirlendi. DNA dizi analizi ile bunların 9 tanesinde SSCP ile belirlenen eksonda 6 farklı mutasyon tanımlandı (Tablo 1).

2- SSCP analizi ile 13 hastanın kalan 4 tanesinde standart SSCP koşullarında (oda sıcaklığında %10 gliserol içeren %6 poliakrilamid jel) ekson 6'da normal kontrole göre farklı bantlar gözlemlendi (Şekil 1). Ekson 6'nın DNA dizi analizi sonuçları ise normal bulundu (Şekil 2).

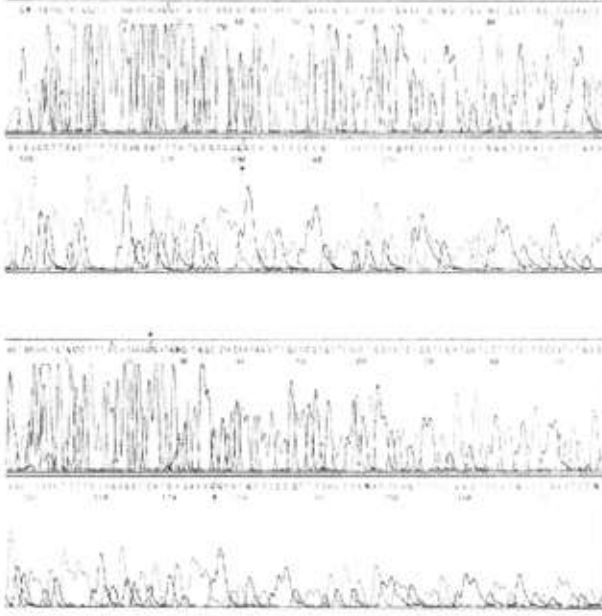
3- SSCP analizi %10 gliserol içeren MDE jel ile 4 C'de yapıldığında bu 4 hastanın kardeş olan 2 tanesinde ekson 4'de normal kontrol DNA'ya göre farklı bantlar elde edildi (Şekil 3). Ekson 4'ün DNA dizi analizi mutasyon olmadığını gösterdi (Şekil 4). Bu hastalarda SSCP analizi ile diğer eksonlar normal bulundu.

4- Aynı jel farklı sıcaklıkta elektroforez uygulaması ile aynı sonuçlar elde edildi.

5- SSCP analizinin duyarlılığı %60, yanlış pozitiflik oranı %26 bulundu. Hastaların %14'ünde negatif sonuç elde edildi.

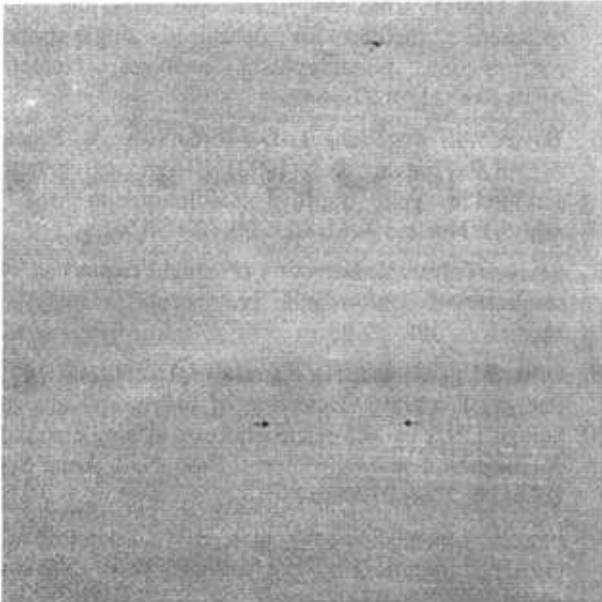


ŞEKİL 1:Ekson 6 SSCP analizi: %10 gliserol içeren %6 poliakrilamid jel elektroforezi. Elektroforez oda sıcaklığında yapılmıştır.1-8 numaralı örnekler hastaları, 9 numara kontrolü göstermektedir. 1,2,3 ve 6 numaralı hastaların kontrole göre farklı bantları okla işaretlenmiştir. Şeklin altında görülen koyu bantlar renature olan çift iplikli DNA'lara aittir.

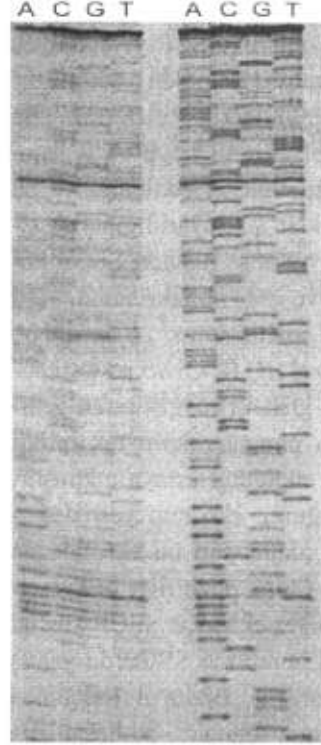


ŞEKİL 2: Ekson 6 DNA dizi analizi: Hasta (üstte) ve kontrol (altta) örneğinin ekson 6 DNA dizi analizi. Okla işaretli kısım ekson 6'yı, dışındaki kısımlar ise intron 6 ve intron 7'nin bir kısmını göstermektedir

1 2 3 4 5 6 7 8 9



ŞEKİL 3: Ekson 4 SSCP analizi: %10 gliserol içeren 0,4xMDE jel elektroforezi. Elektroforez 4° C sıcaklıkta yapılmıştır. 1-7 numaralı örnekler hastaları, 8 numara normal kontrolü, 9 numara pozitif kontrolü göstermektedir. 5 ve 6 numaralı hastaların kontrola göre farklı bantları okla işaretlenmiştir.



ŞEKİL 4: Ekson 4 DNA dizi analizi: Hasta (sağda) ve kontrol (solda) örneğinin normal ekson 4 DNA dizi analizi.

## TARTIŞMA

Yaklaşık 4.8 kb (1587 bazçifti) büyüklüğündeki Hex genini analiz etmede 1991 yılından beri yeni mutasyon tarama yöntemi olarak tercih ettiğimiz SSCP analizi, 1989 yılında Orita ve ark. tarafından tanımlanmış ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Diğer mutasyon tarama yöntemlerine göre daha kolay uygulanabilmesi hızla yayılmasında etken olmuştur. Bizim SSCP analizlerimiz sonucunda hastalarımızın %60'ında (15'te 9) fenotipe neden olan mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonlardan 2 tanesi dur kodonu oluşturmakta, 2 tanesi ekson-intron kesim bölgesinde bozukluğa (nokta mutasyonu), 1 tanesi bir aminoasit değişikliğine (nokta mutasyonu), 1 tanesi ise, proteinde 4 aminoasitin kaybına (12 bazçiftlik delesyon) neden olmaktadır (14,15). SSCP literatürde gösterildiği gibi nokta mutasyonları ve küçük delesyonları saptama özelliğine sahiptir. Yanlış pozitiflik oranı %26 dır. Hastaların %14'ünde SSCP ile farklı bant saptanamamıştır. Farklı çalışmalarda SSCP'nin





duyarlılığı %50-80 arasında bildirilmiştir (16,17). Bu çalışmalar bilinen mutasyonların SSCP'yi etkileyen farklı koşullarda denenmesi ile elde edilmiştir. SSCP'yi elektroforez jelinin içeriği, elektroforezin yapıldığı sıcaklık, DNA parçasının boyu ve denaturasyon yöntemi gibi parametrelerin etkilediği ve bu parametrelerdeki değişiklikler ile duyarlılığın yükseltilebileceği bilinmektedir. Normal standart SSCP koşullarında (oda sıcaklığı ve %6 poliakrilamid %10 gliserol içeren jel) yanlış pozitif sonuç alınan DNA örneklerini elektroforez sıcaklığı (4°C) ve jel kompozisyonunu (MDE jel %10 gliserol) değiştirerek yeniden analiz ettiğimizde bu parametrelerin tek iplikli DNA'nın ikincil yapısını etkilediği ortaya çıkmıştır. Yanlış pozitif sonuç aldığımız eksonun yeri değişmiştir. DNA dizi analizi sonucunun bu eksonda da normal çıkması ikinci bir yanlış pozitifliği ortaya çıkarmıştır. Bu hastalarda diğer eksonlar SSCP analizi ile normal bulunmuştur. Literatürde SSCP'de yanlış pozitiflik oranı belirtilmemiştir. Bizim 4 hastamıza ait örneklerden elde ettiğimiz sonuçlar, bu hastalarda ekson 4 ve ekson 6'da diğer hastalara ve kontrol DNA'ya göre, DNA dizi analizi ile ancak bir kısmını görebildiğimiz intronik bölgelerde bir polimorfizm olduğunu düşündürmektedir. İnsanlarda DNA'nın nükleotid dizisi kişiden kişiye farklılık gösterir. Her birkaç yüz baz çiftinde bir nükleotid değişikliği olduğu gösterilmiştir. Bu farklılık SSCP'de normal kontrol ile hasta DNA'larının farklı konformasyon almalarına neden olabilir. Ayrıca tek ipliklerin birden fazla 'metastable' konformasyonları normal kontrole göre farklı bantların ortaya çıkmasını sağlayabilir. Bu hastalarda hastalığa neden olan mutasyonu SSCP ile saptayamamamızın bir nedeni diğer eksonlarda DNA tek ipliğinin ikincil yapısını etkilemeyecek nitelikte bir mutasyonun varlığı da olabilir. PCR ile tüm eksonların çoğaltılmış olması büyük delesyon ve insersiyon mutasyonları olasılığını düşündürmemektedir. Bunun yanı sıra bu hastalarda enzim defektine gende bir bozukluk olmaksızın proteinin sentez sonrası modifikasyon bozukluğu da neden olabilir. Bunun kanıtlanması SSCP analizinin duyarlılığını artıracaktır.

Sonuç olarak, SSCP yeni mutasyonların yerini belirlemede kullanışlı, ancak standart SSCP koşulları ile

mutasyonun yerinin belirlenemediği örnekler için çok iş yükü gerektiren bir yöntemdir. SSCP ile elde edilen farklı bantlar her zaman bir mutasyonu göstermeyebilir. Farklı mutasyon tarama teknikleri ile kombinasyon ve SSCP'yi etkileyen koşulların değiştirilmesi ile SSCP'nin performansı artırılabilir.

## KAYNAKLAR

1. Cotton, R.G. (1993). Current methods of mutation detection. *Mutat Res.* 285, 125-144.
2. Nollau, P., Wagener, C. (1997). Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clin Chem.* 43(7), 1114-1128.
3. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879.
4. Humpries, S.E., Gudnason, V., Whittall, R., Day, I.N.M. (1997). Single-strand conformation polymorphism with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *43(3)*, 427-435.
5. Hongyo, T., Buzard, G.S., Calvert, R.J., Weghorst, C.M. (1993). 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res.* 21, 3637-3642.
6. Savov, A., Angelicheva, D., Jordanova, A., Eigel, A., Kalaydjieva, L. (1992). High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res.* 20, 6741-6742.
7. Sekiya, T. (1993). Detection of mutant sequences by single-strand conformation polymorphism analysis. *Mutat Res.* 288, 79-83.
8. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86, 2766-2770.
9. Fan, E., Lewin, D.B., Glicman, B.W., Logan, D.M. (1993). Limitations in the use of SSCP analysis. *Mutat Res.* 288, 85-92.
10. Sheffield, V.C., Beck, J.S., Kwitek, A.N., Sandstrom, D.W., Stone, E.M. (1993). The sensitivity of single-strand conformation analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics.* 16, 325-332.

11. Özkara, H.A. (1994). "Tay-Sachs hastalığında heksozaminidaz A alfa altbirim geninin SSCP yöntemi ile incelenmesi". Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
12. Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P.M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 196, 80-83.
13. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74, 5463-5467.
14. Özkara, H.A., Akerman, B.R., Ciliv, G., Topçu, M., Renda, Y., Gravel, R.A. (1995). Donor splice site mutation in intron 5 of the HEXA gene in a Turkish infant with Tay-Sachs disease. *Hum Mutat* 5, 186-187.
15. Özkara, H.A., Navon, R. (1998). At least six different HexA mutations cause Tay-Sachs disease among the Turkish population. *Mol genet Metab.* 65, 250-253.
16. Ayme, S. (2000) Bridging the gap between molecular genetics and metabolic medicine: Access to genetic information. *Eur J Pediatr.* 159(Suppl 3), S183-S185.
17. Cotton, R.G. (2000). Methods in clinical molecular genetics. *Eur J Pediatr.* 159(Suppl 3), S179-S182.