

Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Genindeki Akdeniz Mutasyonunun Mikroarray Tekniğiyle Saptanması

[Detection of Mediterranean Mutation in the Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Gene with Microarray Technique]

¹Şule Menziletoğlu Yıldız,

²Sedefgül Yüzbaşıoğlu Arıyürek,

²Kıymet Aksoy

¹Çukurova University Vocational School of Health Services 01330 Balcalı, Adana/Turkey

²Çukurova University Faculty of Medicine Department of Biochemistry 01330 Balcalı, Adana/Turkey

¹Çukurova Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu 01330 Balcalı, Adana/Türkiye

²Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 01330 Balcalı, Adana/Türkiye

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Öğr. Gör. Dr. Şule MENZİLETOĞLU YILDIZ

Tel: 322.338 65 38
Faks: 322.338 65 39
syildiz@cu.edu.tr

Kayıt tarihi : 25 Mayıs 2009; Kabul tarihi : 4 Ağustos 2009

[Registered: 25 May 2009; Accepted: 4 August 2009]

ÖZET

Purpose: In this study, the type of mutations in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficient cases was defined using microarray technique.

Methods: Twenty-five cases (17 male/8 female) with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency determined by Beutler method were analyzed. DNA samples were isolated using Poncz principle to design hybridization probes for Gd-Mediterranean mutation. Subsequently, the 6th exon of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene was amplified. After desalting, uncomponded primers were removed, the amplified polymerase chain reaction product was electronically addressed and denatured by NaOH. Following hybridization, the signals were automatically scanned, and evaluated by dedicated software. The NanoChip Molecular Biology Workstation® was standardized with 25 cases for Gd-Mediterranean mutation.

Results: Twenty-five cases with glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of 0-4.9 U/gHb were examined, and 13 homozygous, two heterozygous and 10 normal subjects for Gd-Mediterranean mutation were identified. These findings were consistent with the results obtained from RFLP method, which is considered the golden standard. Therefore, the Workstation® system has been found to be suitable to analyze the wild and mutant type of glucose-6-phosphate dehydrogenase in all cases.

Conclusion: This research is the first study in which the microarray technique was utilized to detect Gd-Mediterranean that is the most seen glucose-6-phosphate dehydrogenase mutation in Turkey. The microarray technique allows large number of samples to be tested in a short period with no use of radioactive materials. In our study, genotypes were correctly identified for all subjects.

Key Words: Gd-Mediterranean mutation, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, microarray

ABSTRACT

Amaç: Bu çalışmada glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği olan olguların mutasyonları mikroarray tekniği kullanılarak belirlenmiştir.

Metotlar: Beutler yöntemiyle glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği belirlenen 25 olgu (17 erkek/8 kadın) incelendi. DNA örnekleri, Gd-Akdeniz mutasyonu için hibridizasyon probu tasarlamak amacıyla, Poncz yöntemi kullanılarak elde edildi. Bunun ardından, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz geninin 6. eksonu çoğaltıldı. Tuzlardan arındırıldıktan ve bağlanmamış primerler uzaklaştırıldıktan sonra, amplifiye polimeraz zincir reaksiyonu ürünü elektronik olarak adreslendi ve NaOH ile denatüre edildi. Hibridizasyonu takiben, sinyaller otomatik olarak tarandı ve cihazın yazılımıyla değerlendirildi. Nanoçip Moleküler Biyoloji Çalışma İstasyonu, Gd-Akdeniz mutasyonu için 25 olguya standardize edildi.

Bulgular: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi 0-4,9 U/gHb arasında olan toplam 25 olgu incelendi ve 13 olgu homozigot, iki olgu heterozigot, 10 olgu da Gd-Akdeniz mutasyonu için normal olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, altın standart olarak kabul edilen RFLP yöntemiyle elde edilen sonuçlarla uyumlu bulundu. Dolayısıyla, Çalışma İstasyon sistemi bütün olgulardaki glukoz-6-fosfat dehidrogenaz normal ve mutant tipi analiz etmeye uygun bulundu.

Sonuç: Bu araştırma, Türkiye’de en yaygın glukoz-6-fosfat dehidrogenaz mutasyonu olan Gd-Akdeniz mutasyonunu belirlemek için mikroarray tekniğinin uygulandığı ilk çalışmadır. Mikroarray tekniği fazla sayıda olguların, radyoaktif madde kullanılmadan, kısa süre içerisinde test edilebilmesine olanak sağlar. Tüm olgular için genotipleme doğru olarak belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Gd-Akdeniz mutasyonu, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği, mikroarray

Giriş

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi (G6PD, EC 1.1.1.49) pentoz fosfat yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimidir. G6PD enzim eksikliği bilinen en yaygın kalıtsal enzim eksikliğidir ve dünyada 400 milyondan fazla insanı etkilemektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterlerine göre (biyokimyasal, kinetik ve klinik) bugüne kadar 400'den fazla G6PD varyantı tanımlanmıştır (1). Tarama çalışmaları ile Çukurova bölgesinde G6PD enzim eksikliğinin % 8,2 oranında olduğu belirlenmiş ve kinetik özellikleri farklı Gd-Adana, Gd-Balcalı ve Gd-Samandağ olmak üzere üç varyant rapor edilmiştir (2,3). G6PD geni X kromozomunun q28 bandında yer almaktadır. Bu nedenle G6PD enzim eksikliği daha çok erkek bireyleri etkilemektedir. G6PD geni 13 eksondan ve 12 introndan oluşmaktadır. Enzimin işlevini belirleyen 515 amino asitin mRNA'sı 18500 bp uzunluğundadır. G6PD enziminin aktif formunun moleküler ağırlığı 59,2 kDa olup 2 veya 4 alt birim içerir (4).

Enzimin normal tipi Gd B⁺ olup en yaygın varyantı Gd-Akdenizdir. Gd-Akdenizin elektroforetik göç hızı Gd B⁺ gibidir ve enzim aktivitesi % 0-10 arasındadır. Akdeniz bölgesindeki beyazlarda en sık olarak gözlenen varyanttır (5-8).

Bu çalışmada G6PD enzim aktivitesi eksik olan (0-4.9 U/gHb) olguların Gd-Akdeniz mutasyonu mikroarray cihazıyla saptamak için alete hibridizasyon probu tasarlanarak probun çalışma koşulları standardize edilmiş ve olguların genotiplendirmesi yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Eritrosit içi G6PD enzimin düzeyi Beutler yöntemi ile ölçülmüş ve aktivitesi 0-4.9 U/gHb arasında olan 25 olgunun lökosit DNA'sı Poncez yöntemine göre fenolkloroform kullanılarak izole edilmiştir (9,10). Mikroarray cihazına Gd-Akdeniz (563 C→T) mutasyonun tanısı için özgün hibridizasyon probu tasarlanmış ve moleküler düzeyde genotiplendirme yapılmıştır. DNA'yı çoğaltma işlemi 25 µl hacimde; 100ng DNA ile 200 µM dNTPs, 10mM Tris-HCl (pH8,3), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,5 U Fermentas Taq DNA polimeraz ve 10pmol primer karışımı olacak şekilde hazırlanmıştır. Isısal döngüleyicide 95°C'de 1dk, 60°C'de 1dk ve 72°C'de 1dk olarak 35 döngü Gd-Akdeniz mutasyonunu içeren 195 bp'lik uzunluktaki gen parçası çoğaltılmıştır (9,10). 10mmHg basınç uygulamasıyla vakum altında deiyonize su kullanılarak Millipore Corporation® ile çoğaltılan gen ürünleri tuzdan arındırılmıştır. Tuzdan arındırılmış çoğaltma ürünleri sistemin yükleyici kısmındaki kartuş yüzeyindeki test alanlarına elektrik akımı yardımıyla robotik kol ile otomatik olarak adreslenmiştir. Mutasyona özgü olarak tasarlanan hibridizasyon probu ile hibridize edilerek okuma işlemi otomatik olarak yapılmıştır. Cihazın yazılımından elde edilen veriler değerlendirilmiştir. Tüm hastalara Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurul araştırma projesi bilgi ve taahhüt formu ile rıza formu imzalatılmış, etik komiteden onay alınmıştır.

Gd-Akdeniz Mutasyonuna Özgü Prob Tasarımı

Gd-Akdeniz mutasyonuna özgü, mutasyon noktasından başlayan 3'-5' yönünde 10-12 bp'lik işaretleyici ile mutasyon noktasından bir nükleotit önce başlayan 5'-3' yönünde 35-40 bp'lik sabitleyici ve evrensel kuyruk ile floresan boyaları taşıyan evrensel işaretleyici olmak üzere dört kısım içeren prob tasarımı yapılmıştır. Tasarım için internet kaynaklı serbest programlar kullanılmıştır (11,12).

Okuma Yönteminin Oluşturulması

Tasarlanan hibridizasyon probunun ayırım sıcaklığı standardize edilmiştir. Ayırım sıcaklığı, mutant-normal sinyal oranının en az 50 kat olduğu sıcaklık bulununcaya kadar 24°C'den başlayarak 4 derecelik artışlarla 44°C'ye kadar çıkmış ve elde edilen sinyaller değerlendirilmiştir. Ayırım sıcaklığına göre en iyi sinyal değerlerinin elde edildiği protokol tasarlanan prob için okuma protokolü olarak kabul edilmiştir (11).

Bulgular

Gd-Akdeniz mutasyonu için tasarlanan hibridizasyon probunun ayırım sıcaklığı 41°C olarak belirlenmiştir. Okuma protokolünde ise 56°C'de 60 sn, 53°C'de 30 sn, 50°C'de 30 sn 48°C'de 30 sn ve 47°C'de 60 sn beklenmiş, beş defa yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi ile yıkanarak 24°C'de okuma yapılmıştır.

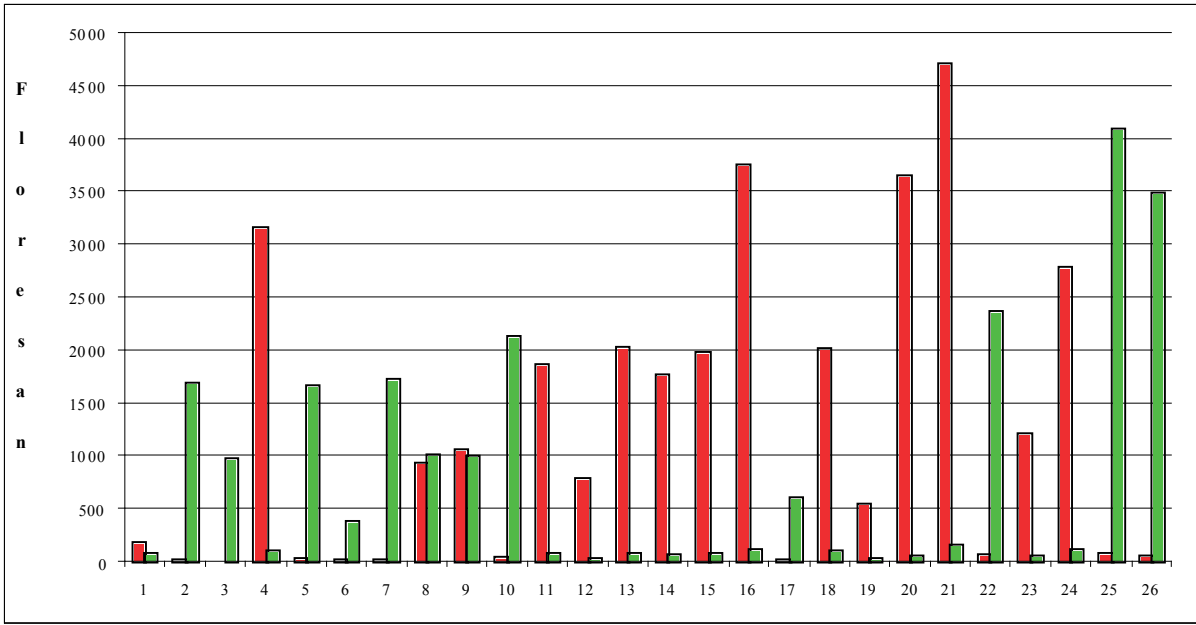
Mikroarray yöntemiyle çalışılan 25 olgunun Gd-Akdeniz mutasyonu için okunan floresan sinyal verileri Şekil 1'de gösterilmiştir. Gd-Akdeniz mutasyonu için on üç olgunun homozigot, iki olgunun heterozigot ve on olgunun da normal olduğu saptanmış, veriler ise Tablo 1'de verilmiştir.

Tartışma

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz bütün hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH'lar yağ asidi, kolesterol, steroid, amino asitlerin, nükleik asitlerin, nükleotit yapılı koenzimlerin sentezinde ve de methemoglobinin eritrositle redüklenmesinde işlev yapmaktadır (13-16).

Gelişen moleküler tanı yöntemleri sonucu DNA düzeyindeki çalışmalar çok hızlı gelişmeler göstermiş ve daha çok geni daha kısa zamanda analiz edecek otomatik cihazlar üretilmeye başlanmıştır (17). Bölgede yaygın olarak gözlenen G6PD enzim eksikliğine neden olan Gd-Akdeniz mutasyonu için prob tasarımı yapılmış ve optimum analiz koşulları standardize edilmiştir.

Temeli Northern ve Southern blot tekniğine dayanan mikroarray teknolojisi hibridizasyon tepkimelerine dayalı yöntemle mutasyon taraması, polimorfizm analizleri ve haritalama gibi genetik çalışmalarda kullanılmaktadır. Mikroarray yönteminin en önemli avantajı aynı anda bir çok genle veya örnekle ilgili bilgi alınması, hızlı ve güvenilir sonuç elde edilmesi yanında otomasyona adapte edilebilir olması nedeni ile rutin analizlerde yaygın kullanım alanı bulmuştur (18-21).



Şekil 1. Mikroarray analizinde Gd-Akdeniz probe ile alınan mutant ve normal floresan sinyal değerlerinin çubuk grafiği. Yeşil normal, kırmızı ise mutant alele ait sinyal değerini göstermektedir. 4,11,12,13,14,15,16,18,19, 20,21,23,24 numaralı olgular homozigot, 8,9 numaralı olgular heterozigot ve 2,3,5,6,7,10,17,22,25,26 numaralı olgular ise normaldir.

Tablo 1. Gd-Akdeniz mutasyonunun floresan sinyali, sinyal oranları ve genotipleri

Olgu No	Kırmızı	Yeşil	Oran (K/Y)	Genotipleme	Genotip
1 + Kontrol Gd-Akdeniz	174	75	2,32 : 1	Kırmızı / Yeşil	Heterozigot
2	12	1688	03:20,7	Yeşil / Yeşil	Normal
3	5	973	04:14,6	Yeşil / Yeşil	Normal
5	26	1655	02:03,6	Yeşil / Yeşil	Normal
6	7	383	01:54,7	Yeşil / Yeşil	Normal
7	16	1716	02:47,3	Yeşil / Yeşil	Normal
10	38	2121	01:55,8	Yeşil / Yeşil	Normal
17	13	607	01:46,7	Yeşil / Yeşil	Normal
22	68	2360	01:34,7	Yeşil / Yeşil	Normal
25	76	4080	01:53,7	Yeşil / Yeşil	Normal
26	56	3484	02:02,2	Yeşil / Yeşil	Normal
8	925	1007	01:01,1	Kırmızı / Yeşil	Heterozigot
9	1054	993	1,06:1	Kırmızı / Yeşil	Heterozigot
4	3152	105	30,02:1	Kırmızı / Kırmızı	Homozigot
11	1864	80	23,3:1	Kırmızı / Kırmızı	Homozigot
12	777	26	29,88:1	Kırmızı / Kırmızı	Homozigot
13	2024	71	28,51:1	Kırmızı / Kırmızı	Homozigot
14	1755	69	25,43:1	Kırmızı / Kırmızı	Homozigot
15	1978	73	27,1:1	Kırmızı / Kırmızı	Homozigot
16	3745	115	32,57:1	Kırmızı / Kırmızı	Homozigot
18	2012	99	20,32:1	Kırmızı / Kırmızı	Homozigot
19	544	19	28,63:1	Kırmızı / Kırmızı	Homozigot
20	3645	53	68,77:1	Kırmızı / Kırmızı	Homozigot
21	4701	149	31,55:1	Kırmızı / Kırmızı	Homozigot
23	1204	54	22,3:1	Kırmızı / Kırmızı	Homozigot
24	2780	110	25,27:1	Kırmızı / Kırmızı	Homozigot

Mikroarray yöntemine dayalı çalışan NanoChip Molecular Biology WorkstationÖ sistemi kendine ait bir mikroçip kartuşuna ihtiyaç gösteren açık bir sistemdir. Bu kartuş elektronik olarak kontrol edilebilen 100 test alanı içermektedir. Straptavidin kaplı her bir test alanı üzerine biyotinli çoğaltma ürünleri sabitlenerek normal veya mutant dizilere komplementer olan spesifik floresan işaretli oligonükleotid problr ile hibridize edilmektedir. Kamera ile kaydedilen floresan sinyaller ise cihazın yazılımı ile değerlendirilmektedir (11).

Gemignani ve arkadaşları G6PD ve talasemi mutasyonları için "Talasochip" adında yeni bir çip geliştirerek Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak gözlenen 17 mutasyonun taramasını yapmışlardır (20).

Ye Bang-Ce ve arkadaşları Çin'de yaygın olarak gözlenen G6PD enzim eksikliği neden olan 12 mutasyonu mikroarray yöntemiyle belirlemişlerdir. Olguların tamamı RFLP yöntemiyle de çalışıldığında aynı sonuçlar elde edilmiştir (21).

Bu çalışmada Çukurova bölgesinde en yaygın olarak gözlenen Gd-Akdeniz (563 C→T) mutasyonunu mikroarray cihazıyla saptamak için tasarlanan hibridizasyon probunun optimum koşulları standardize edilmiş ve mikroarray sonuçlarının doğruluğu *Mbo II* enzimi kullanılarak RFLP yöntemiyle de kanıtlanmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi (2007.BAP.12) ve DPT (2005K120320-E) tarafından desteklenmiş Nanotıp laboratuvarında yapılmıştır.

Kaynaklar

- [1] Glader B, Lukens JN (1999). Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency and Related Disorders of Hexose Monophosphate Shunt and Glutathione Metabolism. Wintrobe's Clinical Hematology.10th, Egypt: Mass Publishing, 1176-1190.
- [2] Aksoy K, Yuregir GT, Dikmen N, Unlukurt I (1987). Three new G6PD variants G6PD Adana, G6PD Samandag, and G6PD Balcali in Cukurova Turkey. Hum Genet 76:199-201.
- [3] Kılınç Y (1982). The incidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in cord blood in mid south part of Turkey. ÇÜ Tıp Fak Der 3:229-232.
- [4] Yalın S, Yalın E, Aksoy K (2002). Türkiye'de saptanan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz varyantları. Arşiv 11:1-14.
- [5] Yalın S, Yalın AE, Ünlükurt İ, Aksoy K (2001). Çukurova bölgesinde saptanan G6PD varyantlarının kinetik özellikleri. Turk J Biochem 26: 83-89.
- [6] Aksoy K, Yüregir GT, Dikmen N, Ünlükurt İ (1989). Isıya dayanıklı yeni bir Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği. ÇÜ Tıp Fak Der 14:202-206.
- [7] Aksoy K, Yüregir GT, Dikmen N, Ünlükurt I (1990). Türkiye'de saptanan yeni bir G6PD B + varyantı: G6PD Antakya. ÇÜ Tıp Fak Der 15:186-191.
- [8] Yüregir GT, Aksoy K, Dikmen N, Ünlükurt İ (1989). Heterogeneity of Glucose-6-phosphate dehydrogenase in Çukurova, Turkey. Biochim Clin 13:933-935.
- [9] Beutler E (1984). Red cell metabolism: A manual of Biochemical Methods, 3rd Ed, Orlanda: Grune & Stratton Inc, 68-71.
- [10] Poncz M, Solowiejzk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S (1982). Construction of human gene library from small

amounts of peripheral blood . Analysis of β like globin genes. Hemoglobin 6:27-36.

- [11] Nanogen Nanochip Molecular Biology Workstation Guide.
- [12] Erişim: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> Erişim tarihi: 20/04/2009
- [13] Ünlükurt İ, Aksoy K, Yüregir GT (1993). Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Enzimi ile Eser Element Arasındaki İlişki. ÇÜ Tıp Fak Der 18:141-145.
- [14] Beutler E (1989). Glucose-6-phosphate dehydrogenase: New perspectives. Blood 73: 1397-1401
- [15] Yüregir GT, İspir T (1984). Çukurova'da Hb S ve G6PD enzim eksikliği ve aralarındaki ilişki. DOĞA Tıp Ecz Der 8:232-244.
- [16] Yüregir GT, Aksungur P, Burgut R (1989). A survey of high A₂ β talasemi, hemoglobin variants, G6PD deficiency anemia in Karataş, Çukurova, Southern Turkey. Doğa TU Med Sci 13:203-210.
- [17] Moutereau S, Narwa R, Matheron C, Vongmany N, Simon E, Goossens M (2004). An improved electronic microarray-based diagnostic assay for identification of MEFV mutations. Hum Mutat 23:621-628.
- [18] Ferrari M, Cremonesi L, Bonini P, Foglieni B, Stenirri S (2005). Single-nucleotide polymorphism and mutation identification by the nanogen microelectronic chip technology. MethodsMol Med 114:93-106.
- [19] Ayalew TM, Mark E, Bolander M, Stephen M, Ansell M, Eric D, Wieben P, Thomas C, Spelsberg P (2002). Primer on medical genomics. Microarray experiments and data analysis. Mayo Clin Proc 77:927-940.
- [20] Gemignani F, Perra C, Landi S, Canzian F, Kurg A (2002). Reliable detection of beta-thalassemia and G6PD mutations by a DNA microarray. Chem Clin 48: 2051-2054.
- [21] Ye Bang-Ce, Liu Hongqiong, Lei Zhensong (2004). Rapid detection of common chinese glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations by microarray-based assay. Am J Hematol 76:405-412.