

DNA tanı testleri

Filiz Özbaş - Gerçeker¹, Dr. Meral Özgüç²

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,
TÜBİTAK DNA/Hücre Bankası ve Gen Araştırmaları Laboratuvarı Uzman Biyolog¹,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Profesör²

DNA TANI TESTLERİ

DNA testleri sağlık problemlerine işaret edebilecek, kalıtsal DNA dizilerindeki varyasyonların tespit edilmesi temeline dayanır. Bu tanım kişilik tesbitleri ve sonradan kazanılmış değişikliklerin incelenmesini kapsamamaktadır. Genetik testler germline değişikliklerin incelenmesini içerdiği için sadece kişiyi değil aynı zamanda ailesini ve sonraki kuşakları da ilgilendirmektedir. Kalıtılmayan DNA değişikliklerinin test edilmesi (ör: enfeksiyon), babalık tayini ve adli tıp testleri bu anlamda genetik test kapsamına girmemektedir (1).

Genetik hastalıkların tanısı uzun yıllar klinik değerlendirmelere ve biyokimyasal testlerle protein analizlerine dayalı olarak yapılmaktaydı. Ancak son yıllarda moleküler genetik bilimindeki ilerlemeler ile gen teknolojilerinin geliştirilmesi DNA testlerinin kullanımına yol açtı. Bilhassa İnsan Genom Projesi'nden elde edilen veriler, hastalıklara neden olan genlerin haritalanmasına, DNA varyasyonlarının tesbitine olanak sağladı ve kalıtsal DNA hatalarının hastalık gelişimindeki rolü tanı kriterlerinin içinde yer almaya başladı (2).

DNA daki genetik şifre bilgisi her hücrede sabit olduğu için, DNA testlerinin en büyük avantajı kolay elde edilen kan hücrelerinde uygulanır olması, ayrıca hastalığın presemptomatik evresinde veya prenatal dönemde de kullanılabilmesidir. DNA testleri 2 farklı yöntemle dayanmaktadır :

1) Direkt tanı

Hastalığa neden olan gen belli bir kromozoma haritalanmış ve klonlanmış ise, bu gendeki DNA mutasyonlarını tesbit etmek mümkün olacaktır. DNA testi bu durumda hastalığı taşıyan ailede özgül mutasyonu belirlemeye yönelik uygulanır. Direkt olarak mutasyonu test edebilmede aşağıdaki noktalara dikkat etmek gerekmektedir :

a) Heterojenite

Birden fazla gende aynı hastalığa neden olan mutasyonlar bulunabilir (genetik heterojenite, ör: Tuberoskleroz OMIM#191100) (3). Bazı hastalıklarda ör: kistik fibrozis bir gen (CFTR) içinde 995 mutasyon rapor edilmiştir (allelik heterojenite) (4). Bu durumlarda incelenecek olan genin yapısının çok iyi biliniyor olması gerekmektedir.

b) "Founder" mutasyonlar

Mutant allel frekansları toplumlar arası farklılık göstermektedir. Ör: CFTR genindeki F508 mutasyonu Batı Avrupa ve Amerika' da % 70 oranında gözlenmekte ancak ülkemizde mutant allellerin % ~28 sini oluşturmaktadır (5). Bu açıdan DNA testlerinde direkt mutasyon tesbiti için toplumda özgül mutasyon profilinin daha önceden belirlenmesi gerekmektedir. Klinik olarak hastaya tanıya yardımcı olabilmek için direkt DNA testlerinin mutasyonları % 90 gibi bir oranı belirliyor olması gerekmektedir (6).

2) İndirekt tanı

Mutasyonların tanımlanamadığı ancak hastalık geninin kromozom haritasının bilindiği durumlarda DNA testleri "Linkage" (bağlantı) analizi ile indirekt olarak gerçekleştirilir. Bu durumda genin içinde veya gen ile rekombinasyona uğramayacak (mayoz sırasında birbirinden ayrılmayacak) şekilde gene yakın (~1cM), tek nükleotid polimorfizmleri (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) (7) ve kısa tekrar dizileri (Short Tandem Repeats, STR) (8) gibi DNA polimorfizmlerinden yararlanılır. Polimorfizmin tüm aile bireylerindeki (ebeveyn, sağlıklı bireyler ve indeks vaka) dağılımı incelenerek, bu polimorfizm ile linkage halinde olduğu daha evvel tesbit edilmiş olan genin aile içinde normal ve mutant allellere

aktarımı indirekt olarak belirlenmiş olur (9). Bu testlerin uygulanmasında da bazı noktalara dikkat edilmelidir. İndeks vakasının polimorfizmi nasıl kalıtıldığına dayalı olarak yapılan bu testlerde, indeks vakasının hayatta olması gerekmektedir. Ayrıca indirekt testlerde tüm aile bireylerinin incelenmesi zorunluluğu olduğu için, bu testler daha uzun zaman alırlar. Bu açıdan prenatal dönemde uygulanabilmeleri için hamilelik öncesi ailenin incelenmesi gerekmektedir.

DNA TANI TESTLERİNİN UYGULAMALARI:

DNA tanı testleri;

- 1) Doğum öncesi (Prenatal)
- 2) Yeni doğan (Neonatal)
- 3) Erişkin

evrelerde uygulanabilir.

1. Doğum öncesi evre:

Bu evredeki testler, hamilelik sırasında fötusun tanısına yönelik veya hamilelik öncesinde taşıyıcı tesbiti için geçerlidir.

Hamilelik sırasında fetal doku en erken tanı için amniosentez (12 - 16. hafta) veya korionik vilus aspirasyon (8 - 12. hafta) yöntemleri ile elde edilebilir. Annenin dolaşımında bulunan fetal hücrelerden tanı da yakın bir gelecekte mümkün olacaktır (10).

Farklı toplumlarda yüksek frekansta görülen genetik hastalıklar için taşıyıcı tesbiti yapılmaktadır. Ör: Akdeniz' de Talasemiler (11) ve İsrail' de Tay-Sachs (12) taramaları

2. Yenidoğan evresi:

Günümüze değin, yeni doğan tarama testleri fenilketonuri ve konjenital hipotiroidizm örneğinde olduğu gibi anormal metabolit tesbiti ile yapılmaktadır (13, 14). Günümüzde yeni doğan evresinde uygulanabilecek DNA' ya bağlı testlerin geliştirilmesi sadece bu evrede değil ilerki yaşlarda patoloji oluşturma riski olan mutasyonların da tesbitini gerçekleştirecektir. Bu açıdan hukuksal ve etik sorunlar ortaya çıkabilecektir. Bu nedenle bu testlerin uygulanma evresinde bu tür sorunların göz önünde bulundurulması gerekecektir.

3. Erişkin evresi:

Bu evrede uygulanabilir testler tek gen hastalıkları, kanser ve diğer yaygın hastalıklar olmak üzere üç gruba ayrılabilir (15):

a) Tek gen hastalıkları :

Erişkinlerdeki tek gen hastalıklarında en sık karşımıza çıkan örnek AD-Huntington hastalığıdır. 1986' da indirekt, 1993 yılında sorumlu gen tesbit edildikten sonra direkt DNA testleri bulunan bu

hastalık 1/10,000 gibi düşük bir insidansa sahiptir. Testler sonucunda, ailenin diğer bireylerinin de genetik statüsünün ortaya çıkma riski söz konusudur. Bu, psikolojik, sosyal sorunlar yaratabilecek bir problemdir. Bu açıdan Huntington örneğinde DNA testleri çok iyi bir danışmanlık çerçevesinde uygulanmalıdır (16).

c) Kalıtsal kanserler:

Kalıtsal kanserlere yatkınlık (susceptibility) genlerinin (BRCA1, BRCA2, MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, MSH6, P16, APC) (17, 18, 19, 20, 21, 22) bulunması ile yüksek risk altındaki taşıyıcıların tesbiti DNA testi ile yapılabilmektedir. Ancak Huntington örneğinde olduğu gibi kanser testleri de psikolojik ve etik sorunları beraberinde getirmekte ve sadece testin uygulanması değil hasta ve ailesine uzman kişiler tarafından danışmanlık verilmesi önem kazanmaktadır (23).

Meme kanserlerinin % 5-10' unun genetik mutasyonlardan kaynaklandığı düşünülürse, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin tanımlanması meme kanserinin tanısı ve tedavisinde önemli bir gelişme sağlamıştır. Özellikle Aşkenazi toplumunda olduğu gibi yüksek riskteki toplumlarda taramanın getireceği faydalar mevcuttur (24). Ancak bu testlerde dikkat edilmesi gereken noktalar vardır.

- 1) Pozitif sonuç yüksek kanser riskine işaret etmekle birlikte kişinin yaşam sürecinde ne zaman kanser olacağı konusunda bilgi vermemektedir.
- 2) BRCA1 ve BRCA 2 genleri oldukça büyük genlerdir ve bugüne kadar yaklaşık olarak 700 mutasyon bildirilmiştir (25). Bu açıdan mutasyon taraması maliyet ve zaman açısından yüküldür.

d) Multifaktöryel yaygın hastalıklar:

Erişkinlerde en sık görülen yaygın hastalıklar arasında diyabet, koroner kalp hastalıkları, Alzheimer hastalığı, hipertansiyon, migren sayılabilir. Birden fazla genin birbirleri ve çevre faktörleri ile etkileşimi ile ortaya çıkan patolojilere yatkınlık genlerinin katkısının araştırılması günümüzde en popüler genetik araştırmaların başında gelmektedir.

Günümüzdeki mevcut teknolojilerle tek gen hastalıklarındaki sorumlu mutasyonların tayin edilmesi mümkündür. Ancak multifaktöryel yaygın hastalıklardaki gen varyasyonlarının tesbit edilmesi daha karmaşıktır. Yatkınlık genleri ve yaygın hastalıklar ilişkisinde tek nükleotid (Single nucleotide polymorphism, SNP) varyasyonlarından yararlanılmaktadır. SNP' ler genomda sıklıkla bulunan (~1/1000 baz) ve eşit şekilde dağılım gösteren genetik belirleyicilerdir (26). 1999 yılında insan SNP

haritalarının oluşturulmasına yönelik bir konsorsiyum kurulmuş (27) ve 2001 yılında da insan SNP haritası yayınlanmıştır (28). Hastalıklara yatkınlık genlerinin (susceptibility genes) tesbit edilmesi ve uzun vadede kişilere özel ilaç ve tedavi uygulamalarının mümkün olabileceği varsayılmaktadır. Geniş ölçekli tarama tekniklerinin (ör: gen çipleri, robot sistemleri ve biyoinformatik sistemleri) geliştirilmesi ile çok pahalı olan bu testlerin maliyetlerinin düşürülmesi ve çok daha kısa sürede uygulanmaları sağlanacaktır (1).

DNA TESTLERİNİN KALİTE KONTROLÜ

DNA testlerinin sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Ancak bu programların sağlıklı bir şekilde uygulanması için muhtemel risklerini de belirlemek gerekmektedir.

DNA testlerinin; presemptomatik tanı, hastalıklara yatkınlığın tesbiti, erken tanı, önleme ve uygun tedavi seçimi konularında sonsuz faydaları mevcuttur. Ancak genetik bilginin bilinçsizce ve yanlış amaçlarla kullanılması riski hukuki, psikolojik, sosyolojik ve etik sorunlara yol açabilir (1).

Bu sorunların giderilmesinde en önemli basamak elde edilen genetik bilginin hastaya doğru bir şekilde ifade edilmesidir. Bu bilginin anlaşılabilir, geniş kapsamlı ve yeterli kalitede olması testi yaptıran kişinin kendisi ve hatta çocukları için en doğru kararı verebilmesi için gereklidir (29). Test uygulanacak kişilerin bu kararı bağımsız olarak vermeleri gerekmektedir. Bu açıdan test uygulanmadan evvel kişi uzman tarafından testin faydası ve potansiyel riskleri hakkında bilgilendirilmeli ve kişi testi almadan önce **bilgilendirilmiş onam formu** imzalamalıdır.

- Eğer bir mutasyonun popülasyondaki sıklığı düşükse, mutasyonun toplumda taranması yerine ailelerde taranması daha uygundur.
- **Penetrans** (belirli bir genotip varlığında hastalık fenotipinin görülmesi sıklığı) gözden kaçırılmaması gereken bir diğer önemli noktadır. Kansere ilişkili genlerin çoğunda düşük penetrans karşımıza çıkmaktadır (30) ve bu genetik testlerin uygulanmasında bir sorun teşkil edebilir. Ayrıca aynı genotipe sahip kişilerin farklı fenotipik özellikler taşımaları da olasıdır.

Bütün bu noktalar göz önünde bulundurulduktan sonra genetik testin uygulanmasına karar verilmelidir.

Testlerin sonuçları **gizlilik** (Confidentiality & privacy) esasına göre değerlendirilmelidir. Sonuçlar hekim tarafından değerlendirilmeli, üçüncü şahıslara (örneğin devlet makamları, sigorta şirketleri, eğitim kurumları) bu bilgiler aktarılmamalıdır. Genetik testlerin sonuçları biyokimyasal testlerden çok farklı olup test uygulanan kişiyi değil gelecek kuşakları da

etkilemektedir. Bu açıdan diğer tıbbi verilerden farklı olarak değerlendirilmelidir (31).

DNA tanı testleri son yıllarda geliştirilmiş olan genetik teknolojilere bağlıdır. Örneğin, DNA daki mutasyonların ve polimorfizmlerin tesbiti DNA'nın PCR (Polymerase Chain Reaction) tekniği ile amplifiye edilerek problemler ile hibridizasyon yöntemleri veya restriksiyon endonükleaz enzimleri ile analizlerine dayalıdır. PCR hızlı ve hassas bir yöntemdir ancak yorumlanması uzmanlık gerektirir. Bu açıdan moleküler tanı teknikleri kullanılan ve DNA tanı testi uygulayan laboratuvarların çerçeve kurallara uymaları, sonuçların sağlıklı bir şekilde verilmesini sağlamaktadır (32).

Sonuçlar standart hale gelmiş raporlar aracılığı ile testi talep eden hekime verilmelidir. Raporla test edilen örnek, tarih, kullanılan metod, hastalık ve analiz sonuçları açıkça belirtilmelidir. Genel olarak PCR ile uygulanan analiz sonuçlarının raporları 7 gün içinde tamamlanmaktadır. Hastalara ait kişisel bilgiler dosyalama sistemlerinde saklanmalıdır. Ancak açık sistemlerde kodlanarak kullanılmalı, hastanın ismi deney tüplerinde ve laboratuvar defterinde açık olarak yazılı olmamalıdır. Yine analiz sonuçları elektronik veri tabanları şeklinde korunuyor ise bilgisayar sistemi şifrelenmeli ve herkese açık olmamalıdır (32).

Testlerin uygulanması ve yorumlanması uzman kişilerce olmalıdır. Kullanılan teknik ve protokollerin özgüllüğü ve hassasiyeti kanıtlanmış olmalıdır. Laboratuvarlar iç ve dış kalite kontrol (internal & external quality assesment) programlarını gerçekleştirmelidir. Örnek: European Union - External Quality Assurance (EU-EQA) programı (33).

Sonuç olarak, gün geçtikçe sağlık alanında daha da yaygın uygulamaları olacak olan DNA tanı testleri çok hassas metodlar olup; kime, nasıl uygulanması ve sonuçlarının kimler tarafından nasıl değerlendirilmesi gerektiğine dair çerçeve kurallarının belirlenmesini, ulusal ve hatta uluslararası harmonizasyona gidilmesini gerektiren testlerdir.

KAYNAKLAR

1. OECD Workshop Vienna 2000 on genetic testing: Policy issues for the new millenium. 23-25 February, 2000.
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001; 409: 860-922.
3. Janssen LAJ, Sandkuyl LA, Merkens EC, et al. Genetic heterogeneity in tuberous sclerosis. Genomics 1990; 8: 237-42.

4. CFTR mutation database: www.genet.sickkids.on.ca/cftr/
5. Yılmaz E, Erdem H, Özgüç, M, Coşkun T, Özçelik U, Göçmen A, Özalp I. Study of 12 mutations in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Hered*. 1995; 45(3): 175-7.
6. Karnes PS. Concise review for Primary-Care Physicians: Ordering and interpreting DNA tests. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 1192-5.
7. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, et al. Large scale identification, mapping & genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998; 280: 1077-82.
8. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992; 12(2):241-53.
9. Kruglyak L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet* 1997; 17: 21-4.
10. Bianchi DW. Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *J Pediatrics* 1995; 127: 847-56.
11. Cao A, Saba L, Galanello R, Rosatelli MC. Molecular diagnosis and carrier screening for beta thalassemia. *JAMA* 1997; 278(15):1273-7.
12. Bach G, Tomczak J, Risch N, Ekstein J. Tay-Sachs screening in the Jewish Ashkenazi population: DNA testing is the preferred procedure. *Am J Med Genet* 2001; 99: 70-5.
13. Scriver, CR. Science, medicine and PKU. *Acta Paediatrica Supplementum* 1994; 407: 11-8.
14. Grant DB. Congenital hypothyroidism: optimal management in the light of 15 years' experience of screening. *Arch Dis Child* 1995; 72: 85-9.
15. Battista RN, Hodge MJ. Putting the genome to work: Testing for genetic disease and implications for health services. OECD: The economic aspects of biotechnologies related to human health, section III (Using genetic information in testing and diagnosis) 1997; 149-91.
16. Harper PS, Lim C, Craufurd D. Ten years of presymptomatic testing for Huntington's disease: the experience of the UK Huntington's Disease Prediction Consortium. *J. Med. Genet.* 2000; 37: 567-71.
17. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eldens D, et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1994; 266: 120-2.
18. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789-92.
19. Fishel R, Lescoe MK, Rao RS, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75: 1027-38.
20. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368: 258-61.
21. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991; 251: 1366-9.
22. Leach FS, Nicolaidis N, Papadouloupoulos N, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75: 1215-25.
23. Stemerding D, Koch L, Bourret P. DNA diagnosis and the emergence of Cancer Genetic Services in European Health Care. *Eur J Hum Genet* 1997; 5 (suppl 2): 25-30.
24. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richard CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet* 1996; 14: 185-7.
25. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *New Engl J Med* 1997; 336: 1401-8.
26. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 1999; 22: 231-8.
27. <http://snp.cshl.org/>
28. Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409(6822): 928-33.
29. Lippman-Hand A, Fraser F. Genetic counselling: provision and perception of information. *Am J Med Genet* 1979; 3: 113-27.
30. Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 679-89.
31. EUROGAPPP Project 1999-2000, Public and Professional Policy Committee (PPPC). Population

- genetic screening programmes : proposed recommendations of the European Society of Human Genetics. Eur J Hum Genet 2000; 8(12): 998-1000.
32. EUCROMIC Quality Assesment Group. Quality guidelines and standards for genetic laboratories/clinics in prenatal diagnosis on fetal samples obtained by invasive procedures : an attempt to establish a common European framework for quality assesment. Eur J Hum Genet 1997; 5: 342-50.
33. Dequeker E, Cassiman JJ. Genetic testing and quality control in diagnostic laboratories. Nat Genet 2000; 25: 259-60.