

# Prenatal Tanıda Genetik

## Derya Erçal

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Genetik Bilim Dalı ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İzmir, Prof.Dr.

Fetusu temsil eden hücre ve dokular, gebelik öncesinde embriyonun uterus içine implante edilmesinden önceki dönemde (Pre-implantasyon Genetik Tanı- PGT) ve gebeliğin farklı dönemlerinde, kromozom anomalileri ve etiyolojilerini gen defektlerinin oluşturduğu morbidite ve mortalitesi yüksek genetik hastalıkların tanısında kullanılır.

Hücre ve dokuların elde edilmesi, işlenmesi ve sonuç çıkarılmasının her aşamasında farklı teknik zorluklarla karşı karşıya kalınan sorunların giderilebilmesi, uyumlu çalışan bir prenatal tanı ekibiyle yapılabilir.

Gebelik öncesi veya sırasında gerçekleşecek ve testin hangi nedene bağlı olarak uygulanacağı ve bunun sonucunda nasıl bir yarar veya risk sağlayacağı genetik danışmanlıkla önceden belirlenmelidir. Aile ile birlikte prenatal tanı ekibi olarak karar verildikten sonra preimplantasyon dönemi, 1. Trimester ve 2. Trimester dönemlerinde elde edilecek örneklerde doğrudan ve/veya hücre kültürleri yapılarak sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalar gerçekleştirilir. Prenatal tanıya gidilirken vurgulanması gereken en önemli nokta medikal bir endikasyonun bulunması şartıdır. En sık kullanılan endikasyonlar ;

- İleri maternal yaş
- Önceki çocukta kromozom anomalisi varlığı
- Ebeveynde dengeli translokasyon varlığı
- Multipl konjenital anomali ve mental retardasyonlu çocuk öyküsü
- X'e bağlı geçiş gösteren hastalıklar
- Nöral tüp defektli çocuk veya akraba varlığı
- Ebeveynde tekrarlayan düşüklerin varlığı
- DNA analizi ile saptanabilen çeşitli genetik hastalıklar (Kan hst, metabolik hst, immün yetmezlik, nörojenetik hst, kistik fibrosis vb.)

**Sitogenetik İncelemeler :** Elde edilen hücre/dokuyu doğrudan kullanma veya, hücre kültürü yapılması sonrasında;

Kromozom analizi ;

a) Flöresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) – Moleküler sitogenetik (erken ve geç dönem )

b) Sitogenetik inceleme yöntemleri ( geç dönem ) ile gerçekleştirilebilir.

Elde edilen hücre/doku doğrudan kullanılır ise interfaz hücreleri, kültüre edilirse, metafaz ve profazda mitozu durdurulan (mitotik arrest) hücrelerden elde edilen kromozom plaklarından yararlanılır.

Prenatal Tanı amacıyla dönemlere göre sitogenetik, moleküler sitogenetik ve/veya moleküler inceleme kullanılır. Erken prenatal tanıda, bugün için belirli sayıda kromozomlarla ilgili, yalnız sayısal olarak bilgi veren moleküler karyotipleme (Kantitatif Flöresans PZR – QF PCR) ve FISH yöntemi vardır. Örneklerde doğrudan sitogenetik inceleme ve/veya DNA analizi yapılabilir ve en erken iki – üç saat ile üç-dört günde sonuç alınabilir. Prenatal Tanıda;

A) Gebelik öncesi - Ovum veya sperm

- Polar cisim
- Blastomer (1-2 hücre)
- Trofoektoderm biyopsisi

B) Gebelikte ;

1- İlk trimester;

a) Maternal kanda dolaşan fetal hücreler

- Lenfositler
- Eritroblastlar
- Sinsityotrofoblastik hücreler

b)Maternal kandaki serbest fetal DNA

c)Koryon villus biyopsi

2- İkinci trimester;

a) Amniotik sıvı (12- 20. Haftalar)

12- 14 hafta Erken  
15- 20 hafta Klasik

b) Kordon kanı ( 18- 20. Haftalar)

c) Fetal deri biyopsi ( 20- 22. Hafta )

d) Maternal kan ve amnion sıvısındaki serbest fetal DNA örnek olarak kullanılabilir.

**Kullanılan Bantlama yöntemleri:**

(1) G-Bantlama GTG- GTL): Giemza- Leishman, Tripsin

(2) C- Bantlama: Sentromerik bantlama

(3) Q- Bantlama: Quinakrin bantlama

(4) R- Bantlama: Revers (ters) bantlama

(5) NOR- Bantlama: Gümüşleme (Nucleolar Organising Region), teknikleri hastalık durumuna göre karar verilerek kullanılır, mikroskopta ve/ veya bilgisayarlı görüntü analiz sistemi (Computerized Image Analyser) ile incelenir.

Kullanılacak sitogenetik teknik değişkendir ve buna hastalığın ön tanısı veya aranan olası anomalinin özelliğine göre karar verilir. Sitogenetik inceleme sonuç olarak bir ultrapatolojik incelemedir ve yoğun bir klinik bilgi kullanımını da içerir. Laboratuvar sonuç raporlarının sorumluluğunu taşıyan uzman klinik bilgiler konusunda eğitilmiş ve deneyimli olmalıdır. Çünkü sonuçta verilecek karar, fetusun yaşamına yön verecek kritik bir uygulamadır. Laboratuvar sonucu, yalnızca hücreler, kromozomlar ve genler ile ilgili bilgi nakledilmesi değildir.

## Moleküler Sitogenetik:

### In Situ Hibridizasyon/ Flöresan In situ Hibridizasyon (FISH)

DNA sekanslarının kromozom lokalizasyonunu göstermede kullanılan doğrudan yöntemdir. Moleküler genetik tekniklerde hücreler veya dokular parçalanarak nükleik asitler izole edilirken, in situ hibridizasyon tekniğinde ilgilenilen gen; kromozomların, hücrelerin veya dokuların doğal ortamı içinde görüntülenebilir. Belirli genleri taşıyan belirli bantlar bu yöntemle gösterilebilir. Lamlar üzerine yerleştirilen interfaz hücreleri ve/veya profaz-metafaz plakları, yüksek derecede spesifik flöresan problemler ile boyanarak hedef kromozom bölgesine bağlanması sağlanır, flöresan mikroskop ve/veya görüntü analiz sistemi ile aynı anda çok farklı ve üç boyutlu görüntüler saptanabilir. Son yıllarda, prenatal tanıda hızlı FISH yöntemi olarak sayısal kromozom anomalilerinin belirlenmesi, mikrodilesyon hastalıklarının tanımlanması, subtelomerik delesyonların ve kromozomal aberasyonların belirlenmesi, ve kromozomal yeniden düzenlenmelerin (reunion) ortaya çıkarılmasında başarıyla kullanılmaktadır ve tanı süresini çok kısaltmıştır. Bir kromozomun tümü veya çok küçük bir bölgesine ait görüntüler mono-dual renk veya çoklu renklerle analiz edilebilir.

M-FISH (multicolor FISH, multiplex FISH) tekniği sayesinde kromozomların görüntülenmesi sağlanır ve G-bantlama ile karıştırılabilen marker kromozomlar veya yapısal anomalilerin tanınması mümkün olur. M-FISH, G-bantlama ile kombine edilirse, maksimum sitogenetik bilginin elde edilmesi sağlanabilir.

CGH (Comparative Genomic Hybridization): DNA parça kayıp ve/veya kazanımlarının sağlıklı bireylerle karşılaştırılarak görüntülenmesidir. Yeni teknikler ile 1Mb kadar ayrıntıya inilebilmektedir.

Prenatal tanıda kullanılan bu tetkikler anormal kromozomlar, mutant DNA allelleri veya enzim defektleri gibi hücresel anormallikleri ortaya koymalıdır. Ancak bazen genetik deri hastalıklarında (genodermatozlar) alınan doku örneği doku histolojisine dayanarak tanı koymaya da izin verebilir.

Kültüre edilen amniotik hücreler veya korionik villuslardan elde edilen kromozomların hazırlanması veya analizi için ortalama bir iki hafta gereklidir, DNA analizi veya biyokimyasal inceleme daha kısa sürede yapılabilir.

Genellikle USG ile saptanabilen bazı bozukluklar, kromozom anormallikleri ile beraber olabildiklerinden amniotik sıvı veya kordosentez ile elde edilebilecek olan fetal kan hücrelerinin karyotipinin yapılması gereklidir. Kistik higroma, ekstremitte anormallikleri, omfalosel, duodenal atrezi/stenoz, hidrosefali ve yüzdeki malformasyonlar ile birlikte kromozom anormallikleri daha yüksek oranda görülür. Kromozom bozuklukları tek yerine multipl malformasyonlar saptandığında daha sıktır. Yapılan bir çalışmada multipl malformasyonlar nedeniyle karyotipi yapılan fetüslerin %30'unda kromozom anormallikleri saptanmıştır. Multipl konjenital anomalileri olan yenidoğanlarda ise kromozomal anomali bulma oranı %8- 10 kadardır. Anormal US bulguları olan ve karyotipleri yapılan fetüslerde en sık otozomal trizomiler (21,18,13), 45,XO Turner sendromu ve dengesiz yapısal bozukluklar görülür. Servikal higroma sıklıkla 45,XO karyotipi gösterir fakat Down sendromu, trizomi 18' de de olabilir.

Prenatal kromozom analiz problemleri; Fetal hücrelerde mozaizm bulunduğu zaman değerlendirme sorun olabilir. KVB ve amniotik sıvı hücre kültürlerinde psödomozaizm ve/veya gerçek mozaizm ayrımı dikkatle yapılmalı ve mozaizme rastlandığında klinik bulgular çok iyi değerlendirilmelidir. Postnatal çalışmalar, kültürlerdeki gerçek mozaizmin fetüste de yüksek oranda görüldüğünü doğrulamaktadır. Ancak yapısal aberasyonlardaki mozaizm çok zorlukla doğrulanır.

XX ve XY hücre kuruluşlarında görülen mozaizm vakalarının bazıları anne kontaminasyonuna bağlıdır ve bu durum amniotik sıvı hücre kültürlerinden daha çok uzun süreli CVS kültürlerinde görülür. Maternal kontaminasyonu azaltmak için korionik villus örneğindeki anne desidua hücrelerini dikkatli ayırmak gerekir. Eğer kontaminasyondan şüphe edilirse amniosenteze başvurmak doğru olur.

Gebeliğin 10-11. Haftalarında yapılan CVS çalışmalarında, sitotrofoblastlar, villöz stroma ve fetustaki karyotipler arasındaki uyumsuzluğun %2 olduğu rapor edilmiştir. Fetüste olmadan plasentadaki mozaizm daha sıktır. Yeni doğmuş infant veya fetüste nonmozaik trizomi 13 veya 18 olduğunda normal karyotipli hücrelerin oranı %12-100 olarak değişmektedir. Zigot trizomik olduğunda sitotrofoblastın progenitör hücreindeki ek kromozomun postzigotik kaybı nedeniyle normal hücre kuruluşunun oluşması trizomik fetüsün anne karnında yaşam olasılığını arttırmaktadır.

Prenatal tanı için genetik danışmada mozaizmi saptamak ve yorumlamak, mozaizmin sayısız farklı tipleri hakkında yetersiz izlem bilgileri olduğu için en zor olan problemlerden biridir. Anne ve babalar bu konuda uyarılmalı ve bulunursa bunun ne anlama geldiği konusunda (belli başlı sendromlar dışında) kati bilgilerin olmadığı söylenmelidir.

Prenatal tanı zamana karşı yarışır. CVS üremese amniosentez ile kromozom çalışması yapma zamanı vardır. Amniotik sıvıda üreme olmazsa kordosentez ve fetal kanın kültürü yararlı bir alternatiftir.

Bazen sıradan bir tetkik sırasında beklenmeyen ters bulgular ortaya çıkabilir. Örneğin; normal kromozom sayısı fakat ortak varyantı, nadir yeniden düzenlenme veya marker kromozom: Böyle bir durumda fetustaki bu belirgin bulgular parental karyotip bilinene kadar kesinleşemeyeceği için, fetüste görülen varyantın, de novo veya kalıtsal olup olmadığını saptamak için anne ve baba karyotiplenir. Eğer normal anne ve babada aynı görünüm varsa bu büyük olasılıkla normal varyanttır ve nadir örnekler hariç kötü sonuçlara neden olmaz.

## Maternal kandaki fetal hücreler

Annedeki kan örneklerinden gebeliğin erken döneminde fetal hücrelerin saptanması ideal bir yöntemdir. Fetal kromozom anomalileri direkt olarak annenin serumunun incelenmesi ile saptanabilir ve DNA veya enzimatik tanı hücreler kültüre edilmeden yapılabilir. Fetal nükleuslu hücrelerin izolasyonunda flow sitometrenin kullanımı ile kabul edilebilir sonuçlar elde edilebilmeye başlamıştır. Yapılan bir çalışmada erken gebelikte 20cc anne kanında 200'den fazla fetal hücre elde edilmiş ve 16 gebelikte cinsiyet tayini, trizomi veya dizomi 21 saptanmıştır. Bu örneklerde birçok FISH probu ile 13,18,21,X,Y kromozomları çalışılmıştır. Fetal hücrelerin maternal dolaşımdan ayrıştırılması hala deneyseldir ve invaziv olmaması nedeniyle prenatal tanı için umutla geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Benzer şekilde anne kanından elde edilen fetal DNA (cff DNA) 11 – 42 haftalar arasında prenatal tanı amacıyla ayrılarak saflaştırılabilir. Serbest DNA'nın %3-6'sı maternal plazmada bulunur. Mayıs 2001'denberi Bristol (UK)'de XL bozukluklar ve fetal Rh durumu için başarıyla kullanılmaktadır.

## Moleküler Genetik Analizler

Prenatal moleküler genetik tanı için genellikle DNA analizi kullanılır. Hastalıkla ilişkili olan gen biliniyor ve bu gendeki değişik mutasyonlar aynı hastalığa neden oluyorsa, doğrudan mutasyon tarama(direkt) yöntemleri kullanılır. Hastalığa neden olan mutasyonların bilinmediği durumlarda ise ilgili genin içinde veya yakınında bulunan polimorfik bölgeler analiz edilir. İndirekt yöntem olarak adlandırılan bu yöntemde tüm aile bireylerinin incelenmesiyle hastalık taşıyan kromozomlar saptanabilir.

## DNA Analiz Yöntemleri:

Haritalanmamış ve klonlanmamış genlerin mutasyonları saptanamaz. Mutasyon bilindiğinde direk analiz, bilinmediğinde gen ile rekombinasyona giremeyecek kadar yakın olan polimorfik bölgelerin yardımıyla, DNA'daki kesim noktalarının farklılığından yararlanılarak, ortaya çıkan farklı DNA parçaları indirekt olarak incelenir. Bu analize "Restriction Fragment Length Polimorphism (RFLP)" adı verilir.

Son yıllarda, PCR (polymerase chain reaction) ile mutasyon taraması sık kullanılmaktadır. PCR ile mutasyon taşıyan DNA bölgesi invitro yöntem ile amplifiye edilir. Denatüre edilen çift iplikli DNA, primerler ve ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimi yardımıyla, komplementer DNA oluşturularak, 20-30 siklus sonrasında, DNA kalıbının yaklaşık milyon kez amplifikasyonu sağlanır. "Thermal Cycler" adı verilen aletlerle yapılan işlem 1-2 saatte bitmektedir. PCR ürünü agaroz veya akrilamid elektroforezi ile analiz edilebilir. Otoanlizörler ile 'line assay' yöntemleri özellikle postnatal taramalarda başarıyla kullanılmaktadır.

Tekrarlayan dizilerin varlığı, yani trinükleotid tekrar sayısının artması bir nesilden diğerine değişebilir. Bu durumdan bazı hastalıkların tanınmasında faydalanılır. Sinir sistemi hastalıkları olan bu grupta dinamik mutasyon sonrası üçlü nükleotid dizilerinin sayıca artmasıyla hastalık ortaya çıkar. Tekrar sayısı yükseldikçe tam mutasyon olasılığı artar. PCR ve jel elektroforezi ile bu tekrarlayıcı dizilerin sayısını ve mutasyon olma olasılığını gösterebilmek mümkündür.

Southern Blot Analizi: Yüksek rezolüsyonlu jel elektroforezini komplementer nükleotid dizilerinin hibridizasyonuna dayandırır. Band yapısı, genin varlığı veya yokluğu, büyüklük varyasyonu gösterebilir.

**DNA Dizi Analizi** : Bilinen mutasyonların analizinde uygulanabildiği gibi bilinmeyenlerin araştırılması için de kullanılan bir yöntemdir. Genellikle SSCP ve DGGE gibi tarama yöntemleri ile mutasyon taşıyan bölge saptandıktan sonra uygulanır. Dizi analizi direkt olarak PCR ile çoğaltılan DNA parçasında veya indirekt olarak M13 fajına klonlanarak yapılır. Direkt analiz; kimyasal (Maxam-Gilbert) ve enzimatik (Sanger) yolla yapılabilir. Kimyasal yöntemde DNA molekülü kinaz enzimi ile 5' fosfat ucundan 32 P ile işaretlenir. Seçici olarak 4 bazı parçalayan kimyasal maddeler kullanılarak farklı uzunluklarda DNA parçaları elde edilir ve elektroforezle ayrılan bantlar otoradyografi ile incelenir. Duyarlılığı ve uygulama kolaylığı açısından tercih edilen enzimatik yöntemin temeli DNA polimeraz enzimi yardımı ile in vitro DNA sentezidir. Öncelikle incelenen DNA parçası asimetrik PCR ile tek zincir halinde çoğaltılır ve kalıp olarak kullanılır. Kalıp üzerinden 5' fosfat uçları radyoaktif olarak işaretlenmiş ve sentezleri didioksiribonükleotidler kullanılarak durdurulmuş farklı uzunlukta yeni zincirler sentezlenir. Her modifiye baz için ayrı tüplerde sentez yapılır ve ürünler denatüre akrilamid jel elektroforezinde 4 sıra halinde yürütülür. Radyoaktif işaretli kısa DNA parçalarının denatüre akrilamid jel elektroforezindeki migrasyonuna göre kalıp DNA zincirinin dizi analizi gerçekleştirilir. Dizinin 5' ucundaki baz jelde en hızlı yürüyen olacak şekilde bantlar otoradyografide aşağıdan yukarıya doğru okunurlar.

**SSCP (Single strand conformational polymorphism)**: Bilinmeyen mutasyonun taranmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Mutasyonu aranacak olan genin, parçalar halinde amplifiye edilmesi ve baz dizisinin sağlıklı kontrolden farklı olup olmadığının araştırılması prensibine dayanır. Bu yöntemde ilgilenilen hedef dizi PCR ile çoğaltılır ve nondenatüre poliakrilamid jelde elektroforeze edilerek tek zincirli moleküllerin birbirinden ayrılması sağlanır. Mutasyonun tersiyer yapıda meydana getirdiği farklılık nedeni ile, mutant zincirlerin jeldeki mobiliteleri normalden farklı olur. Otoradyogramda yeni ve farklı bantların görülmesi ile mutasyon varlığı anlaşılır. İyi bir tarama yöntemi olan SSCP'nin mutasyon saptama duyarlılığı %80'in üzerindedir.

**DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)** : Bilinmeyen mutasyonların taramasında yaygın olarak kullanılan bir başka yöntemdir. Tek zincirli-işaretli prob dsDNA ile aynı ortamda denatüre ve renatüre edildikten sonra DGGE uygulanır. Denatürasyon ile dsDNA molekülü ayrılır ve proba komplementer olan zincir, renatürasyon aşamasında proba hibridizasyon yapar. Renatürasyona katılmayan probu ortamdaki uzaklaştırmak için dışardan proba komplementer olan tek zincirli halkasal DNA eklenir. Mutasyon nedeni ile oluşan "mismatch"ler denatüre edici ortamda normalden daha yavaş hareket ederler. Mutant/normal DNA heterodupleksi varsa erime özellikleri ve migrasyonu normale göre değişir. Böylece hangi mutasyon olduğu saptanamamakla birlikte ilgili bölgede mutasyon varlığı gösterilebilir.

Rutinde en çok kullanılan yöntemler hala PZR, RFLP gibi bilinen teknikler olmasına rağmen son yıllarda teknolojiye hızlı ilerlemeler tanı yöntemi spektrumunu artırmıştır. Genotip Analizörlerinin ve sekans aletlerinin rutine girmesi, ' real time ' PZR ve benzer tekniklerin devreye girmesi tanı hız ve doğruluğu artırmıştır.

**MPLA (Multiple Ligand Probe Amplification):** En fazla 45 değişik DNA dizisinin PZR tabanlı tek bir reaksiyon yardımı ile incelenmesidir. Bunun için sadece 20ng DNA kullanmak yeterlidir. MPLA nükleik asid primerleri yerine prob içerir. Problar hedef dizi ile hibridize olduktan sonra ligasyon reaksiyonu gerçekleşir,örnekteki hedef dizinin bir kopyası oluşturulur. Ligasyonlu problar multipleks PZR yöntemi ile çoğaltılır. MPLA yönteminde tüm spesifik diziler eş zamanlı olarak amplifiye edilir. Ürünler dizileme tipi elektroforez cihazında analiz edilirler.

#### **QF PCR ve MPLA uygulamaları:**

1. 13,18,21,X ve Y kromozomlarının anöploidilerinin araştırılması
2. Büyük kromozomal delesyon ve dublikasyonların araştırılması
3. Tek ekzon delesyon/dublikasyonlarının araştırılması
4. Kanseri dokusu gen kayıp / kazançlarının araştırılması
5. Tümör supresör genlerin promotör bölgelerindeki CpG adacıklarının metilasyonunun incelenmesi gibi alanlarda başarıyla kullanılmaktadır. Son birkaç yılda ise tüm kromozomların sayısal moleküler karyotiplenmesi çalışmaları başlamıştır.

#### **Kaynaklar**

- 1) Bennett RL. Getting to the Roots: Recording the family tree. In: Bennett RL (ed). The practical guide to the genetic family history. New York; Wiley-Liss, 1999: 38-67.
- 2) Thompson MW, Mc Innes RR, Willard HF. Clinical Cytogenetics: General principles and autosomal abnormalities. In: Thompson MW, Mc Innes RR, Willard HF (eds). Genetics in Medicine. Philadelphia; W.B. Saunders Co, 1991: 201-228.
- 3) Wilson GN. Laboratory Genetics, New developments. In; Wilson GN (ed). Clinical Genetics. New York; Wiley- Liss, 2000: 99-181.
- 4) Knight SJL, Horsley SW, Regan R, Lawrie NM, Maher EJ, Cardy DLN, Flint J, Kearney L. Development and Clinical Application of an Innovative Fluorescence in situ Hybridization Technique Which Detects Submicroscopic Rearrangements Involving Telomeres. Eur J Hum Genet 1997; 5: 1-8
- 5) Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. Science 1996; 273: 494-497.
- 6) Thompson MW, Mc Innes RR, Willard HF. Tools of human molecular genetics. In: Thompson MW, Mc Innes RR, Willard HF (eds). Genetics in Medicine. Philadelphia; W.B. Saunders Co, 1991: 97-112.
- 7) Larrabee PB, Johnson KL, Pestova E, Lucas M, Wilber K, LeShane ES, Tantravahi U, Cowan JM, Bianchi DW. Microarray analysis of cell-free fetal DNA in amniotic fluid: a prenatal molecular karyotype. Am J Hum Genet. 2004 Sep;75(3):485-91.
- 8) Sekizawa A, Purwosunu Y, Matsuoka R, Koide K, Okazaki S, Farina A, Saito H, Okai T. J Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. J Obstet Gynaecol Res. 2007 Dec;33(6):747-64 .
- 9) Puszyc WM, Crea F, Old RW. Noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidy using cell-free nucleic acids in maternal blood: promises and unanswered questions. Prenat Diagn. 2008 Jan;28(1):1-6.