

**VANGL1 Geni Heterozigot Missens V239I, R274Q, M328T
Mutasyonlarının Nöral Tüp Defektlerinin Etiyolojisindeki
Rolünün Değerlendirilmesi**

Proje No: 109S198

Yard. Doç.Dr. G. Ozan ÇETİN
Prof.Dr. Nagihan YALÇIN

EKİM 2010
DENİZLİ

ÖNSÖZ

Nöral tüp defektleri, etiyojisi tam olarak aydınlatılmamış multifaktöriyel kompleks hastalıklardandır. Diğer kompleks hastalıklarda olduğu gibi etiyojide çevresel ve genetik etkenler suçlanmaktadır.

VANGL1 geni, Wnt planar hücre polaritesi yolağı genlerinden biridir ve Vangl1 proteini planar hücre polaritesinin sağlanması yanında, hücrelerin konverjant ekstansiyon hareketinde de görev almaktadır. Bu görev nedeniyle başta embriyonik nöral krista hücreleri olmak üzere çeşitli hücrelerin göçlerinde yer almaktadır.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda *VANGL1* genindeki çeşitli mutasyonların insan nöral tüp defekti (NTD) etiyojisinde yer aldığını gösteren ya da tersi yönde sonuçlar elde edilmiştir. Bu projede NTD tanısı almış fetal otopsi materyallerinde *VANGL1* geninin tanımlanmış ve NTD ile ilişkilendirilmiş mutasyonları araştırılmış ve literatürdeki farklı görüşlere katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Bu amaçla hazırlanan ve tamamlanan “*VANGL1* Geni Heterozigot Missens V239I, R274Q, M328T Mutasyonlarının Nöral Tüp Defektlerinin Etiyojisindeki Rolünün Değerlendirilmesi” başlıklı proje TÜBİTAK tarafından 15/10/2009 tarihinde 109S198 no’lu Hızlı Destek Projesi olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|-------------------------------|--------------|
| Özet | 6 |
| Abstract | 7 |
| Giriş ve genel bilgiler | 8 |
| Gereç ve Yöntem | 10 |
| Bulgular | 14 |
| Tartışma | 16 |
| Sonuç | 18 |
| Referanslar | 19 |
| Ek1..... | 21 |
| Proje özet bilgi formu | 23 |

TABLO LİSTESİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Tablo 1. Çalışmaya alınan NTD'li olguların NTD tipleri ve örnek alınan dokuları..... | 10 |
| Tablo 2. <i>VANGL1</i> geni missens mutasyon bölgelerine yönelik hazırlanan primer dizileri..... | 12 |
| Tablo 3. <i>VANGL1</i> missens mutasyonları ile ilgili gen bölgelerinin amplifikasyonu için kullanılan PCR karışımı..... | 12 |
| Tablo 4. V239I mutasyon bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan termal profil..... | 13 |
| Tablo 5. R274Q mutasyon bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan termal profil..... | 13 |
| Tablo 6. M328T mutasyon bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan termal profil..... | 13 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | Sayfa |
|---|-------|
| Şekil 1. V239I mutasyon bölgesinin PCR ürünlerinin jel görüntüsü, DNA dizi analizi görüntüsü ve dizi analizi sonucu..... | 14 |
| Şekil 1. R274Q mutasyon bölgesinin PCR ürünlerinin jel görüntüsü, DNA dizi analizi görüntüsü ve dizi analizi sonucu..... | 15 |
| Şekil 1. M328T mutasyon bölgesinin PCR ürünlerinin jel görüntüsü, DNA dizi analizi görüntüsü ve dizi analizi sonucu..... | 16 |

Özet

Nöral tüp defektleri en sık gözlenen konjenital anomalilerden biridir ve yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir. Etiyolojide çevresel ve genetik bir çok faktör suçlanmaktadır. Wnt planar hücre polaritesi yolağında yer alan *VANGL1* genindeki çeşitli mutasyonların nöral tüp defektleri ile ilişkisini araştıran çalışmalarda tam olarak bir fikir birliği sağlanamamıştır.

Bu proje kapsamında Pamukkale Üniversitesi ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakülteleri Patoloji Anabilim Dallarının arşivlerinde yer alan fetal otopsi materyallerinden 28 kontrol ve nöral tüp defekti olan 18 olgu değerlendirilmiştir. Olguların ve kontrollerin, formalinle fikse edilerek parafine gömülmüş doku örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu ile *VANGL1* geni V239I, R274Q ve M328T mutasyon bölgeleri amplifiye edilmiş ve DNA dizi analizi ile değerlendirildiğinde olgularda ve kontrol grubunda her üç mutasyon da saptanmamıştır.

Projemiz nöral tüp defekti ile *VANGL1* geni mutasyonları arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere yapılması düşünülen daha geniş kapsamlı bir projenin ön çalışması olarak planlanmıştır. Araştırma konusu ile ilgili daha geniş bir seride yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: nöral tüp defekti, *VANGL1*, mutasyon

Abstract

(Evaluation of the role of *VANGL1*, V239I, R274Q, and M328T heterozygous missense mutations in the aetiology of neural tube defects)

Neural tube defects are one of the most common congenital anomalies which have high mortality and morbidity rates. There are so many genetic and environmental factors in the aetiology. There is no consensus in the literature for the association of mutations in a Wnt planar cell polarity pathway gene, *VANGL1*, with neural tube defects.

18 cases of neural tube defects and 28 controls from the archives of Pamukkale and Dokuz Eylül Universities' Pathology Departments were enrolled in this study. DNA samples were isolated from the formalin fixed- paraffin embedded tissue samples of the cases and controls.

V239I, R274Q, and M328T mutation sites was amplified by polymerase chain reaction and analyzed by DNA sequencing, but no mutation was detected in the cases and controls.

This project was planned as a preliminary study for another study, which would be about the association of *VANGL1* variations and NTD in a larger cohort. The research subject should be carried out in larger series of cases and controls.

Keywords: neural tube defects, *VANGL1*, mutation

Giriş ve Genel Bilgiler

NTD, yaklaşık 1000 canlı doğumda bir gözlenmektedir (DUNLEVY, 2007). Konjenital kardiyovasküler sistem anomalilerinden sonra görülen en sık doğumsal anomali grubudur (MANNING, 2001). Oldukça heterojen bir klinik gözlenmektedir ve en ağır tipi olan kranyoraşizisin yanı sıra anensefali, spina bifida ve ensefalosel gibi bozukluklar da NTD içerisinde yer almaktadır. Birçok nöral ve non-nöral malformasyonlar NTD'ye eşlik etmektedir. NTD, açık (anensefali, myelomeningosel, spina bifida) ve kapalı (meningosel, myelosistosel, dermal sinus, kaudal regresyon) olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Açık NTD çoğunlukla 17-30. postfertilizasyon günleri arasında, nöral tüpün kapanması (nörülasyon) sırasında oluşan bir hata sonucunda ortaya çıkmaktadır. Kapalı NTD ise postnörülasyon döneminde oluşmaktadır (PADMANABHAN, 2006).

NTD etiyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Anne adayının prekonsepsiyonel döneminde diyetle folik asit almasının NTD insidansını %50-70 oranında azaltması etiyolojide çevresel faktörleri düşündürmekle birlikte, yapılan hayvan çalışmalarında NTD ile ilişkili pek çok gen mutasyonu suçlanmaktadır. Ancak ailesel olguların azlığı ve suçlanacak tek gen mutasyonlarının bulunmaması NTD olgularının çoğunluğunun genetik ve/veya çevresel etkenlerin etkilerinin bir arada ortaya çıkması sonucunda oluştuğunu düşündürmektedir (DUNLEVY, 2007; PADMANABHAN, 2006).

NTD-folat arasındaki ilişki nedeniyle folat ve homosistein metabolizmalarında yer alan proteinleri kodlayan genler NTD'nin etiyolojisinde etkili olan gen mutasyonlarını ortaya koyabilmek için araştırılmış ve 5,10-metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geninde yaygın rastlanan bir polimorfizm olan C677T varyasyonunun artmış NTD riski ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (3). Yine folat metabolizmasında yer alan metilen tetrahidrofolat dehidrogenaz (MTHFD) geninin R293H ve R653Q polimorfizmleri de artmış NTD riski ile ilişkilendirilmiştir (PADMANABHAN, 2006).

Drosophila, fare, Xenopus gibi canlılarda yapılan çalışmalarda; ürünleri, Wnt sinyal iletim yollarından planar hücre polaritesi (PCP) yolağında yer alan, çeşitli genler tanımlanmıştır. Bu genlerde oluşabilecek mutasyonlar sonucunda vertebralılarda, insandaki kraniyoraşizise benzer bir nöral tüp defekti ortaya çıkmaktadır (WOLFF, 1998; KİBAR, 2001; JENNY, 2003; GOTO, 2002). Sonuçta PCP, vertebralı embriyolarının nörülasyonunda önemli bir yoldur. Bu yolda yer alan Vangl2, kıvrımlı kuyruklu farelerde yapılan çalışmalar sonucunda, PCP genleri arasında NTD ile ilişkilendirilen ilk genidir (KİBAR, 2001; TORBAN, 2004). Vangl2, drosophilada göz, kanat ve bacak dokularının gelişimi sırasında planar hücre polaritesinin sağlanmasından sorumlu Stbm/Vang geninin memelilerdeki homoloğudur (TORBAN, 2004). Vertebralılarda ikinci bir Vangl geni de (Vangl1) tanımlanmıştır. Vangl1 ve Vangl2 proteinleri %70 benzerlik göstermektedirler ve ikincil yapılarının da hemen hemen aynı olduğu düşünülmektedir (KATOH, 2002). PCP yolağında Vangl dışında Fz, Dsh/Dvl, Fmi/Stan/Celsr1, Pk, RhoA genleri de yer almaktadır (AXELROD, 2002).

VANGL1 ve *VANGL2*'nin insan NTD patogenezindeki rolünün aydınlatılması için yapılan az sayıdaki çalışmada bazı mutasyonlar tanımlanmakla birlikte NTD ile bu mutasyonların ilişkisi kesin olarak ortaya konamamıştır. Doudney ve arkadaşları (DOUDNEY, 2005) tarafından yapılan ilk çalışmada insan NTD'inde *VANGL1* ve 2'nin rolleri araştırılmıştır. Araştırmada öncelikle *Vangl1* ve *Vangl2*'nin farelerde gelişmekte olan nöral tüpte ko-ekspresye edildikleri gösterilmiş ancak ekspresyonlarının hücre tabakası düzeyinde farklılıklar göstermesinden dolayı birbirlerini kompanse etmedikleri bulunmuştur. Yine de *Vangl2* mutant zebra balıklarında *Vangl1* overekspresyonu, konverjent ekstansiyon hareketinin tamamlanmasını sağlayarak iki proteinin fonksiyonel olarak birbirlerinin yerine geçtiklerini göstermiştir. Aynı çalışmada 66 NTD hastasında *VANGL1* ve *VANGL2*'nin kodlayıcı bölge ve ekleme bölgesi mutasyonları da araştırılmıştır. Sonuçta *VANGL1* için 3 adet, *VANGL2* için 6 adet nükleotid varyantı bulunmuştur. Bu varyantlardan sadece *VANGL1* 346G→A varyantı non-sinonim bir değişikliğe neden olmaktadır ve kraniyoraşizis ve spina bifida hastalarında kontrol grubuyla benzer frekansta saptanmıştır. Ayrıca kraniyoraşizisli bir hastada heterozigot olarak saptanan *VANGL2*'nin 6. intronu 30. nükleotid bölgesindeki 7 bp'lik bir duplikasyon da kontrol grubunda gözlenmemiş ve bu mutasyonun introna eklenmiş bir enhanser olabileceği düşünülmüştür. Elde edilen veriler ışığında araştırma sonucunda *VANGL* geni mutasyonlarının insan NTD'nin ana nedenlerinden olmadığı öne sürülmüştür.

Kibar ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (KİBAR, 2007) ise NTD olan 137 İtalyan hasta ve 7 Fransız fetusta *VANGL1* mutasyon taraması yapılmış ve *VANGL1* geni hastalık spesifik, heterozigot missens V239I, R274Q ve M328T mutasyonları saptanmıştır. Her üç mutasyon da *VANGL* ailesinde korunmuş olan amino asid rezidülerini etkilemektedir. V239I ve R274Q mutasyonları ailesel NTD olan 2 hastada bulunurken M328T sporadik bir olguda gözlenmiştir. Ailesel tipte NTD olan geri kalan 11 hastada *VANGL1*'in açık okuma çerçevesinde herhangi bir hastalık spesifik mutasyon gözlenmemiştir. Açık okuma çerçevesinde gözlenen diğer 8 dizi varyasyonu ise hem NTD'li hastalarda hem de kontrol grubunda gözlenmiştir ve *VANGL* ailesindeki yüksek düzeyde korunmuş amino asid rezidülerini etkilememektedir.

Torban ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada (TORBAN, 2008) *Vangl1*'in NTD etiyojisi ve embriyogenezdeki rolünün aydınlatılması için *Vangl1* ve *Vangl2* geni mutasyonu taşıyan fare modeli oluşturulmuştur. Araştırma sonucunda *Vangl1* ve *Vangl2*'nin nöral tüpün kapanmasını düzenlemek için birbirleriyle ilişkili oldukları gösterilmiştir. *Vangl1* ve *Vangl2* genlerinin her ikisinde de heterozigot mutasyon taşıyan farelerde NTD'nin yanı sıra kardiyak anomaliye de rastlanmıştır.

NTD olgularında *VANGL1* genindeki başka mutasyonların araştırıldığı bir başka çalışmada sporadik ve ailesel spinal rafizimli olgularda p.Ser83Leu, p.Phe153Ser, p.Arg181Gln, p.Leu202Phe ve p.Ala404Ser mutasyonları tanımlanmıştır (KİBAR, 2009). Bu değişikliklerin tümü evrimsel olarak korunmuş residüler üzerinde yer almaktadır ve hiçbirine kontrol grubunda rastlanmamıştır.

Ülkemiz popülasyonunda *VANGL1* mutasyonları ile NTD gelişimi arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla yapmayı planladığımız bir araştırmanın ön verilerini elde etmek amacıyla, Pamukkale ve Dokuz Eylül Üniversiteleri Patoloji AD'da, NTD tanısı almış fetal otopsi materyallerinde, *VANGL1*'in bilinen V239I, R274Q ve M328T mutasyonlarını araştırmak üzere bu çalışmayı yaptık.

Gereç ve Yöntem

Materyal

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD arşivlerinde fetal doku örnekleri taranmış ve yeterli doku kesitlerinin alınmasına uygun arşiv materyaline sahip nöral tüp defektli (NTD) 18 olgu ve NTD tanısı olmayan, asfiksi, kordon dolanması gibi tanılara sahip 28 kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma materyali olarak, olgulara ait %10 formaldehit solusyonu ile tespit edilen ve sonrasında parafin bloklara gömülen (FFPE) arşiv doku örnekleri kullanılmıştır. Çalışmaya alınan olgular, tanıları ve DNA izolasyonu için örnek alınan dokuları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Çalışmaya alınan NTD'li olguların NTD tipleri ve örnek alınan dokuları

| Olgu No | NTD Tipi | Örnek Alınan Doku |
|---------|-------------------------|-------------------|
| 1 | Ensafalozel | Karaciğer |
| 2 | Meningozel | Böbrek |
| 3 | Meningozel | Karaciğer |
| 4 | Anensefali+Spina Bifida | Karaciğer |
| 5 | Spina bifida | Karaciğer |
| 6 | Ensafalozel | Karaciğer |
| 7 | Anensefali | Karaciğer |
| 8 | Meningomyelozel | Karaciğer |
| 9 | Meningomyelozel | Karaciğer |
| 10 | Nöral tüp defekti | Karaciğer |
| 11 | Spina bifida | Karaciğer |
| 12 | Meningomyelozel | Karaciğer |
| 13 | Spinal meningo-myelozel | Karaciğer |
| 14 | Anensefali | Karaciğer |
| 15 | Anensefali+ Meningozel | Karaciğer |
| 16 | Spina bifida | Karaciğer |
| 17 | Spina bifida | Karaciğer |
| 18 | Spina bifida | Karaciğer |

Kesitlerin hazırlanması

Çalışma grubunu oluşturan olgulara ait FFPE doku bloklarından 4-5 mikron kalınlığında 4-5 adet seri kesitler alınmış ve bu kesitler DNA izolasyonu amacıyla steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.

Parafin bloklardan genomik DNA izolasyonu:

Olgu ve kontrol gruplarına ait doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu ticari kit yardımı ile (PureLink Genomic DNA Kit, Invitrogen) yapılmış ve izolasyon uygulaması şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

- Doku örneklerinden steril bistüri ve pens yardımı ile, fazla parafinin mekanik uzaklaştırma işlemi yapıldı ve steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- Deparafinizasyon için, her örneğe 1000 µL ksilen ilave edildi ve vorteks yardımı ile homojenize edildi.
- Örnekler oda sıcaklığında, 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelet üzerine 1000 µL %96-100 etanol ilave edildi ve vorteks yardımı ile iyice homojenize edildi.
- Örnekler oda sıcaklığında, 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Rezidüe ksileni tamamen uzaklaştırmak için, etanolle yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı.
- Örneklerdeki etanolün tamamen uzaklaşması için 37 °C'de 10-15 dk inkübe edildi.
- Örnekler 180 µL kitle birlikte sağlanan PureLink Genomic Digestion tamponu ve 20 µL Proteinaz K eklendi ve vorteks yardımı ile homojenize edildi. 50°C'de örnekler tamamen lize olana kadar inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası örnekler oda sıcaklığında, 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi ve lizat yeni bir tüpe alındı.
- Örnekler 20 µL kitle birlikte sağlanan RNaz A eklendi ve vorteksle iyice homojenize edildikten sonra oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası örnekler 200 µL PureLink Genomic Lysis/Binding tamponu eklendi ve vortekslenerek karıştırıldı.
- Örnekler 200 µL %96-100 etanol ilave edildi ve 5 sn boyunca kuvvetlice vortekslendi.
- Bu karışım dikkatli bir biçimde spin kolonlara aktarıldı ve 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne alındı.
- Spin kolon üzerine 500 µL kitle birlikte sağlanan 1. yıkama tamponu (Wash Buffer 1) eklendi ve 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne alındı.
- Spin kolon üzerine 500 µL kitle birlikte sağlanan 2. yıkama tamponu (Wash Buffer 2) eklendi ve 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.

- Spin kolon üzerine 100 µL kitle birlikte sağlanan elüsyon tamponundan eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildikten sonra, 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Elde edilen DNA örneklerinin, konsantrasyonlarını ve saflığını belirlemek amacı ile spektrofotometrede (Biophotometer, Eppendorf) ölçümleri yapıldı. Tüm örneklere ait değerler bir excel dosyasına kaydedildi. Geride kalan DNA örnekleri, kullanılabildiği kadar -20°C'de saklandı. İzole edilen DNA örneklerinin spektrofotometre sonuçları Ek 1'de verilmiştir.

Polimeraz Zincir Tepkimesi

VANGL1 geni heterozigot missens V239I, R274Q ve M328T mutasyonlarının analizi için parafine gömülü doku örneklerinden elde edilen genomik DNA'nın polimeraz zincir tepkimesi (PCR) ile amplifikasyonu amaçlandı. Bu amaçla hazırlanan primer dizileri aşağıda verilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. *VANGL1* geni missens mutasyon bölgelerine yönelik hazırlanan primer dizileri

| İlgili Gen Bölgesi | F Primer | T _m | R Primer | T _m | Ürün Büyüklüğü |
|------------------------|--------------------------------|----------------|------------------------------|----------------|----------------|
| V239I mutasyon bölgesi | 5'-ACGGGTGTTTGTGTTTCGTGC-3' | 61.0°C | 5'-TAGAAGCGGGACTCGCCATCG-3' | 65.0°C | 255 bp |
| R274Q mutasyon bölgesi | 5'-TGGAACCCAGTGGACTTCTGTATG-3' | 58.2°C | 5'-TGCTCGGAATTTGGAGGCTGTT-3' | 59.1°C | 230 bp |
| M328T mutasyon bölgesi | 5'-TTTCCCACCCTCGTGGTATT-3' | 55.2°C | 5'-AAGAGGGTACTGGCATCAGGA-3' | 56.7°C | 217 bp |

Mutasyonlarla ilgili gen bölgelerinin amplifikasyonu amacıyla hazırlanan PCR reaksiyon karışımının ana bileşenleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. *VANGL1* missens mutasyonları ile ilgili gen bölgelerinin amplifikasyonu için kullanılan PCR karışımı

| İçerik | Hacim | Son konsantrasyon |
|-----------------------|--|-------------------|
| PCR-grade su | Toplam reaksiyon hacmini 50µL'ye tamamlayacak | - |
| Forward primer | 1 µL | 0,5 µM |
| Reverse primer | 1 µL | 0,5 µM |
| Master karışımı (2X)* | 25 µL | 1X |
| Kalıp DNA örneği | - | 2 ng / µL |
| Toplam hacim | 50 µL | |

*: Reaksiyon karışımı için "Fermentas PCR Master Mix" kullanıldı.

VANGL1 geninde ilgili mutasyon bölgelerinin amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyonlarının termal profilleri aşağıda verilmiştir (Tablo 4-6).

Tablo 4. V239I mutasyon bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan termal profil

| Basamak | Sıcaklık | Süre | Döngü sayısı |
|-------------------------|----------|-----------|--------------|
| Başlangıç denatürasyonu | 95°C | 10 dakika | |
| Denatürasyon | 95°C | 1 dakika | 40 döngü |
| Annealing | 59°C | 1 dakika | |
| Ekstansiyon | 72°C | 1 dakika | |
| Final ekstansiyon | 72°C | 10 dakika | |

Tablo 5. R274Q mutasyon bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan termal profil

| Basamak | Sıcaklık | Süre | Döngü sayısı |
|-------------------------|----------|-----------|--------------|
| Başlangıç denatürasyonu | 95°C | 10 dakika | |
| Denatürasyon | 95°C | 1 dakika | 40 döngü |
| Annealing | 57°C | 1 dakika | |
| Ekstansiyon | 72°C | 1 dakika | |
| Final ekstansiyon | 72°C | 10 dakika | |

Tablo 6. M328T mutasyon bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan termal profil

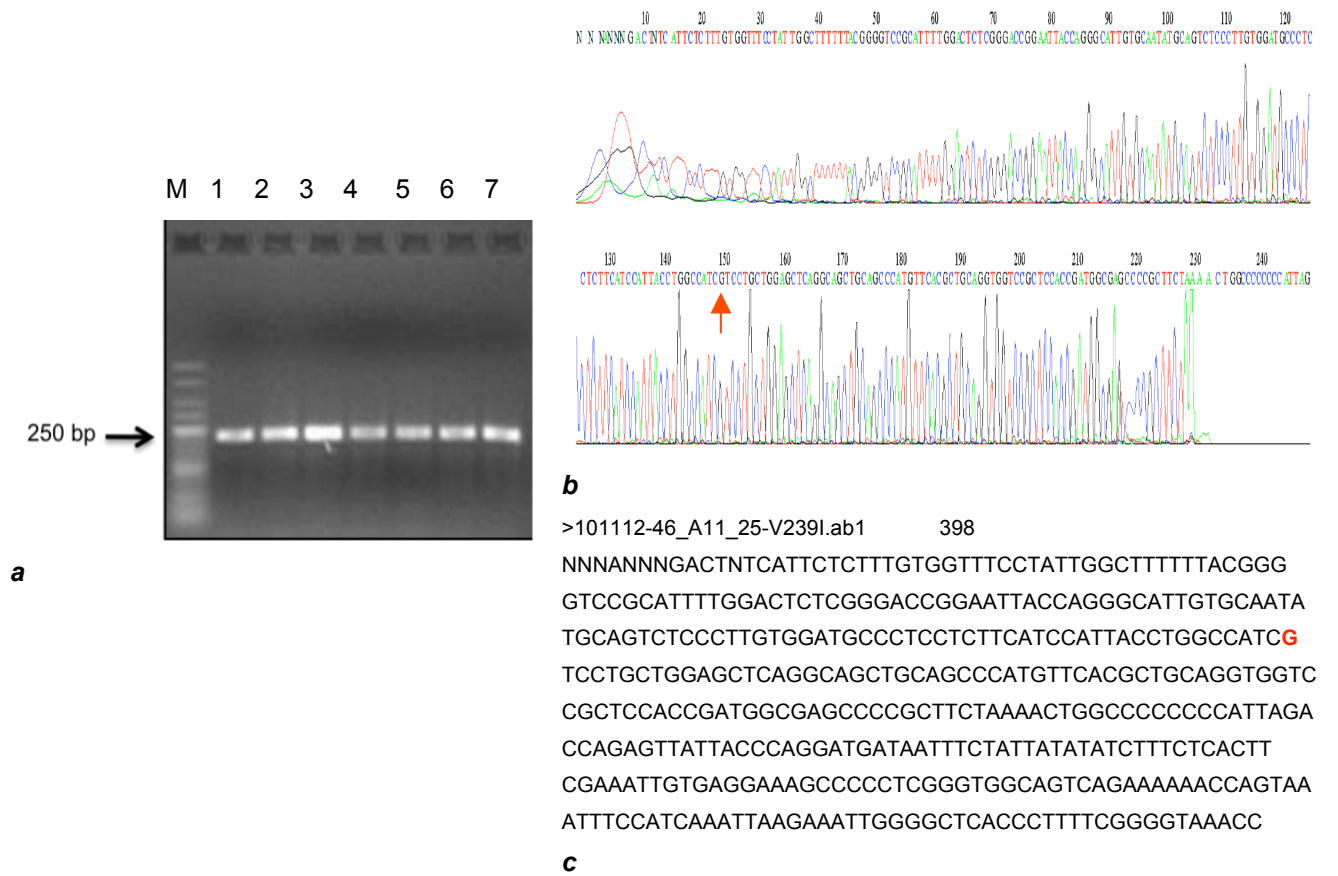
| Basamak | Sıcaklık | Süre | Döngü sayısı |
|-------------------------|----------|-----------|--------------|
| Başlangıç denatürasyonu | 95°C | 10 dakika | |
| Denatürasyon | 95°C | 1 dakika | 40 döngü |
| Annealing | 56°C | 1 dakika | |
| Ekstansiyon | 72°C | 1 dakika | |
| Final ekstansiyon | 72°C | 10 dakika | |

DNA Dizi Analizi

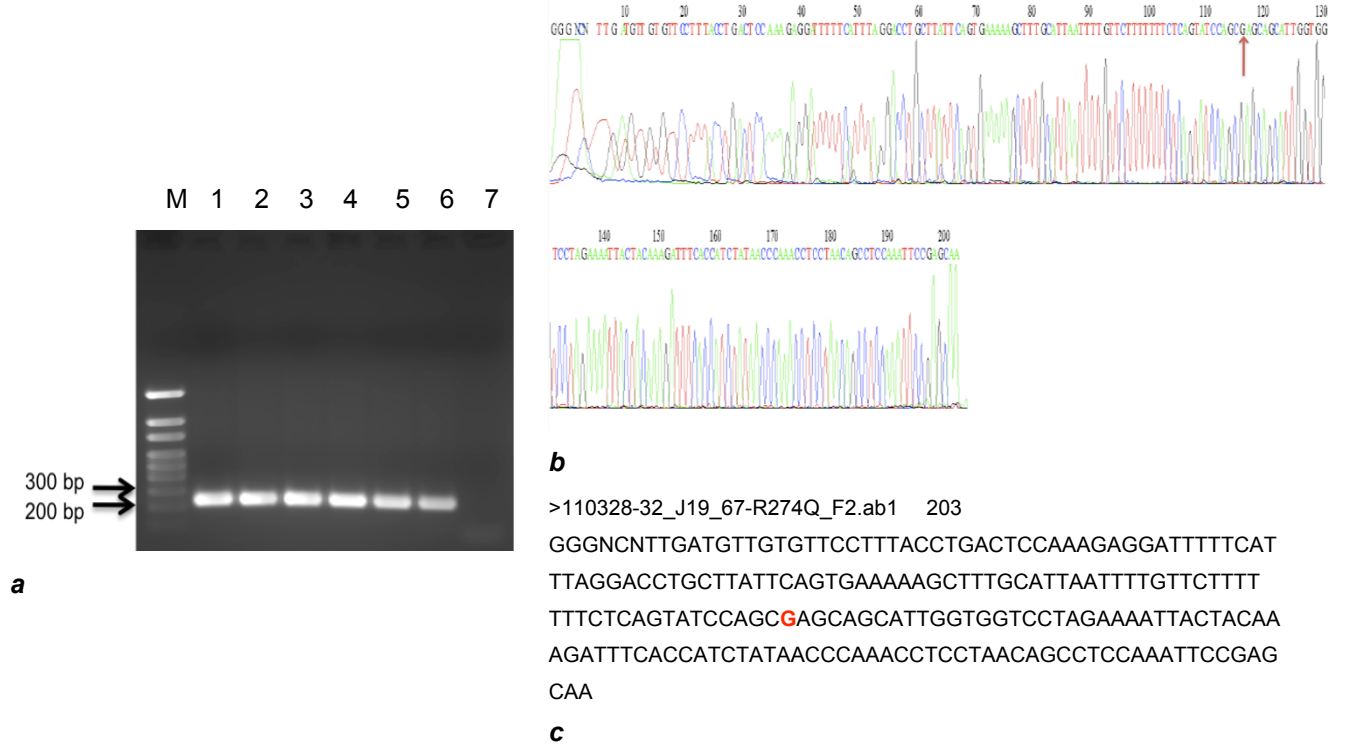
Olguların ve kontrol grubunun doku örneklerinden elde edilen DNA'nın mutasyonların bulunduğu ilgili gen bölgeleri mutasyonun analiz edilmesi amacıyla DNA dizi analizi ile değerlendirildi. DNA dizi analizi laboratuvarımızda uygun altyapı bulunmadığı için hizmet alımı yoluyla gerçekleştirildi.

Bulgular

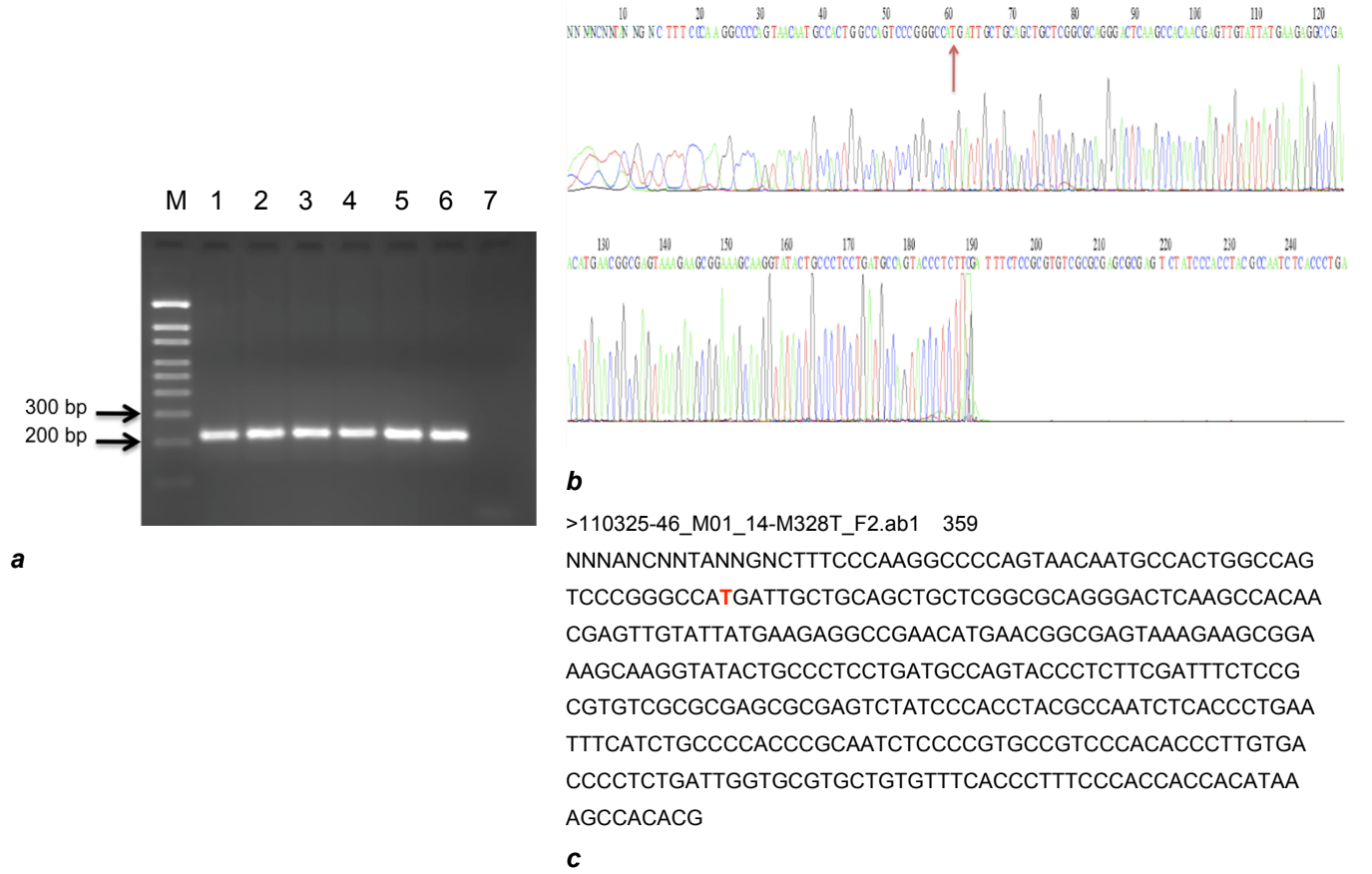
Araştırmada değerlendirilen toplam 18 olgu ve 28 kontrolde iki yönlü dizi analizi sonucunda V239I, R274Q ve M328T mutasyonları gözlenmemiştir (Şekil 1-3).



Şekil 1. a. Olgu ve kontrol grubundan seçilen örneklerle ait V239I mutasyon bölgesinin PCR ürünlerinin %1 agaroz jeldeki görüntüsü. M: Marker **b.** Olgu grubundan 5 numaralı örneğin DNA dizi analizi görüntüsü. Mutasyon bölgesi kırmızı ok ile gösterilmiştir. **c.** Aynı örneğin dizi analizi sonucu. Mutasyon sonucunda 715. pozisyonundaki G, A ile yer değiştirmektedir (G715A).



Şekil 2. a. Olgu ve kontrol grubundan seçilen örnekler için R274Q mutasyon bölgesinin PCR ürünlerinin %1 agaroz jeldeki görüntüsü. M: Marker, 7 no.lu kuyu negatif kontrol **b.** Olgu grubundan 8 numaralı örneğin DNA dizi analizi görüntüsü. Mutasyon bölgesi kırmızı ok ile gösterilmiştir. **c.** Aynı örneğin dizi analizi sonucu. Mutasyon sonucunda 821. pozisyonundaki G, A ile yer değiştirmektedir (G821A).



Şekil 3. a. Olgu ve kontrol grubundan seçilen örnekler için M328T mutasyon bölgesinin PCR ürünlerinin %1 agaroz jeldeki görüntüsü. M: Marker, 7 no.lu kuyu negatif kontrol **b.** Olgu grubundan 6 numaralı örneğin DNA dizi analizi görüntüsü. Mutasyon bölgesi kırmızı ok ile gösterilmiştir. **c.** Aynı örneğin dizi analizi sonucu. Mutasyon sonucunda 983. pozisyonadaki T, C ile yer değiştirmektedir (T983C).

Tartışma

Nöral tüp defektleri oldukça sık görülen ve klinik heterojenite gösteren konjenital defektlerdendir (MANNING, 2001; DUNLEVY, 2007). Etiyolojisinde çevresel ve genetik bir çok faktör suçlanmaktadır. Etiyolojide araştırılan genetik faktörler arasında Wnt planar hücre polaritesi yolağında yer alan ve hücrenin planar polaritesinin sağlanması dışında, konverjant ekstansiyon hareketinden de sorumlu olan *VANGL1* geni mutasyonları da bulunmaktadır (DOUDNEY, 2005; KİBAR, 2007; KİBAR, 2009). Ancak literatürde bu mutasyonların etkin rolü ile ilgili fikir birliği sağlanamamıştır.

Bu çalışmada NTD'li fetal otopsi olgularının formalinle fikse edilerek parafine gömülmüş arşiv dokularından yararlanarak, DNA dizi analizi yöntemi ile literatürde NTD ile ilk olarak ilişkili bulunan üç *VANGL1* mutasyonunun taranması ve daha geniş bir seride yapılması düşünülen yeni mutasyonların da araştırılmasını içerecek bir projenin ön verilerinin elde edilmesi amaçlandı.

Pamukkale ve Dokuz Eylül Üniversiteleri Patoloji AD arşivlerinden elde edilen 18 NTD'li olgu ve 28 kontrol fetuslerinin hiçbirinde V239I mutasyonu gözlenmedi. Literatürde daha önce yapılan 137 spinal disrafizimli İtalyan olgu ve 7 kraniyoraşizisli Fransız fetusu kapsayan çalışmada da bu mutasyon yalnızca bir olguda saptanmıştır (KİBAR, 2007).

Yukarıda bahsedilen çalışmada V239I mutasyonu saptanan ve lipomyeloşizis, hidromyeli ve kaudal regresyonu bulunan bu İtalyan olgunun, dermal sinusü olan erkek kardeşinde ve klinik bulgusu olmayan annesinde de aynı mutasyon bulunurken, babası, teyzesi ve anne tarafından büyük ebeveynlerinde mutasyona rastlanmamıştır. Yapılan fonksiyon çalışmalarında V239I mutasyonunda etkilenen valin aminoasidinin, Vangl1 proteinin dördüncü transmembran domeyninde yer aldığı, invaryant olduğu ve tüm Vangl ailesi proteinlerde korunmuş olan "VLLE" motifinin bir parçası olduğu bulunmuştur. Mutasyon sonucunda bu aminoasidin izolösin ile yer değiştirmesi, bölgenin hidrofobik özelliğinde değişikliğe yol açmazken, daha büyük bir yan zincirin oluşmasına neden olmaktadır. Yapısal olarak gerçekleşen bu değişiklik nedeniyle Vangl1, partner proteinleri olan Dvl1, 2 ve 3 ile bağlanmaktadır (KİBAR, 2007).

Aynı araştırmada, 144 olguda R274Q ve M328T mutasyonları sırasıyla yalnızca birer spina bifida olgusunda gözlenmiştir (KİBAR, 2007). R274Q mutasyonunu taşıyan hastada myelomeningosel, hidrosefali ve konjenital club foot deformiteleri bulunmaktadır. Olgunun annesi ve teyzesinde de minimal bir NTD bulgusu olan vertebral şizis saptanmıştır. Bu olgunun annesinde de R274Q mutasyonu gözlenmiş ancak teyzesinden DNA örneği alınamamıştır. R274Q mutasyonu Vangl1 proteininin sitoplazmik domeyninde yer almaktadır. Bu bölge *C.elegans* dışında türler arasında korunmuş bir bölgedir. *C.elegans*'ta bu bölgede arjinin yerine glutamat yer almaktadır ancak her ne kadar bu değişiklikle protein motifi korunmamış olsa da bu bölgenin arjininden kaynaklanan yüklü (charged) özelliği korunmaktadır. Bu özellik R274Q mutasyonu sonucunda oluşan arjininin glutaminle yer değiştirmesi durumunda ise kaybedilmektedir (KİBAR, 2007).

Anılan çalışmada 328. pozisyondaki metiyoninin treoninle yer değiştirmesine neden olan M328T mutasyonu ise myelomeningosel, hidrosefali, tip II Chiari malformasyonu, gergin (tethered) spinal kord, club foot, lumbosakral skolyoz ve sakrokoksigeal kifoz deformiteleri olan sporadik bir olguda saptanmıştır (KİBAR, 2007). M328T mutasyonu da Vangl1 proteininin sitoplazmik domeyninde yer almaktadır. Bu bölgede metiyoninin hidrofobik özelliği evrimsel olarak korunmuştur. Bu pozisyonda treoninin yer almasıyla treoninin hidroksil yan zinciri nedeniyle hidrofobik özellik artmaktadır. R274Q ve M328T mutasyonları sonucunda Vangl1'in Dvl proteinleriyle ilişkisinde değişiklik gözlenmemiştir (KİBAR, 2007).

Yine Kibar ve arkadaşlarının NTD'deki yeni *VANGL1* mutasyonlarını araştırdıkları ve 284 İtalyan ile 389 Amerikan orijinli NTD hastasını kapsayan ikinci çalışmalarında, saptanan mutasyonların dördü (p.Phe153Ser, p.Arg181Gln, p.Leu202Phe ve p.Ala404Ser) yalnızca birer hastada bulunurken, p.Ser83Leu, 3 olguda saptanmıştır (KİBAR, 2009). Araştırmada yaklaşık 1500 kişilik kontrol grubu

değerlendirilmiş ancak anılan mutasyonlar kontrol grubunda bulunmamıştır. Her ne kadar az sayıdaki olguda bu mutasyonlar saptanmış olsa da, fonksiyon çalışmaları *VANGL1* genindeki mutasyonların NTD ile ilişkisini ortaya koymuştur (KİBAR, 2009).

Yukarıdaki literatür bilgilerinden de görüleceği üzere NTD ile ilişkili bulunan *VANGL1* mutasyonları oldukça nadir gözlenmekte ancak, proteinde fonksiyonel kayıplara yol açabildikleri gibi yapısal, biyokimyasal ya da fiziksel değişikliklere de neden olabilmektedirler. Araştırmamızda da olgu sayımızın literatüre göre çok düşük olması incelenen mutasyonların saptanmamasının başlıca nedeni olarak görünmektedir. Bunun dışında *VANGL1* geninde proje kapsamında değerlendirilmeyen NTD ile ilişkisi bilinen (KİBAR, 2009) ya da bilinmeyen başka mutasyonlar, PCR ve dizi analizi ile saptanamayacak heterozigot geniş delesyonlar, kopya sayısı değişiklikleri, *VANGL1* genindeki metilasyon durumu gibi epigenetik değişiklikler veya NTD'nin multifaktöriyel etyolojisine uygun olacak şekilde, -başta Wnt PCP yolağındakiler olmak üzere- farklı genlerde yer alan mutasyonlar da söz konusu olabilir. Bu genetik/ epigenetik etyolojik faktörlerin değerlendirilmesi için daha geniş serilerde yapılacak geniş kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç

NTD en sık görülen konjenital anomalilerden biridir ve etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Aralarında *VANGL1* mutasyonlarının da bulunduğu çeşitli genetik faktörler de çevresel faktörlerle birlikte hastalığın gelişiminde rol oynayabilir. Literatürde yer alan çok az sayıdaki araştırma, *VANGL1* mutasyonlarının NTD etiyolojisindeki rolü konusunda farklı sonuçlar ortaya koymaktadır.

Araştırmamız sonucunda NTD etiyolojisinde yer aldığı düşünülen *VANGL1* V239I, R274Q ve M328T mutasyonları araştırma ve kontrol grubunda yer alan hiçbir fetusta bulunmamıştır. Literatürde daha önce mutasyonun bildirildiği araştırmalarda da bu mutasyonlar 144 NTD'li olgudan birer tanesinde saptanmıştır. Yine, NTD ile ilişkili yeni *VANGL1* mutasyonlarının araştırıldığı çalışmada 284 İtalyan ve 389 Amerikan orijinli hastadan oluşan toplam 673 kişilik bir olgu grubuyla yaklaşık 1500 kişilik kontrol grubu mutasyonlar yönünden incelenmiştir ve yine çok az sayıda olguda mutasyonlar bulunmuştur. Çalışmamıza dahil ettiğimiz olgu ve kontrol gruplarımızın sayısı bu anlamda sınırlayıcıdır. Bu açıdan değerlendirildiğinde araştırmanın çok merkezli, daha geniş olgu ve kontrol gruplarını kapsayacak şekilde ele alınmasında fayda vardır.

Referanslar

1. DUNLEVY L.P.E., Chitty L.S., Burren K.A., Doudney K., Stojilkovic-Mikic T., Stanier P., Scott R., Copp A.J., Greene N.D., Abnormal folate metabolism in fetuses affected by neural tube defects, *Brain*, 130,1043-9, (2007).
2. MANNING N., Archer N., Treatment and outcome of serious structural congenital heart disease, *Semin Neonatol*, 6, 37-47, (2001).
3. PADMANABHAN R., Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects, *Congenit Anom (Kyoto)*, 46, 55-67, (2006).
4. WOLFF T., Rubin G.M., Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in Drosophila, *Development*, 125, 1149-59, (1998).
5. KIBAR Z., Vogan K.J., Groulx N., Justice M.J., Underhill D.A., Gros P., Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail, *Nature Genet*, 28, 251-5, (2001).
6. JENNY A., Darken R.S., Wilson P.A., Mlodzik M., Prickle and strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling, *The EMBO Journal*, 22/17, 4409-20, (2003).
7. GOTO T., Keller R., The planar cell polarity gene strabismus regulates convergence and extension and neural fold closure in Xenopus, *Dev Biol*, 247, 165-181, (2002).
8. TORBAN E., Wang H.J., Groulx N., Gros P., Independent mutations in Mouse Vangl2 that cause neural tube defects in looptail mice impair interaction with members of the disheveled family, *J Biol Chem*, 279, 52703-13, (2004).
9. KATOH M., Strabismus (STB)/Vang-like(VANGL) gene family, *Int J Mol Med*, 10, 11-5, (2002).
10. AXELROD J.D., Strabismus comes into focus, *Nature Cell Biol*, 4, E6-E8, (2002).
11. DOUDNEY K., Ybot-Gonzalez P., Paternotte C., Stevenson R.E., Greene N.D., Moore G.E., Copp A.J., Stanier P., Analysis of the planar cell polarity gene Vangl2 and its co-expressed paralogue Vangl1 in neural tube defect patients, *Am J Med Genet A*, 136, 90-2, (2005).

12. KIBAR Z., Torban E., McDearmid J.R., Reynolds A., Berghout J., Mathieu M., Kirillova I., De Marco P., Merello E., Hayes J.M., Wallingford J.B., Drapeau P., Capra V., Gros P., Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects, *N Engl J Med*, 356, 1432-7, (2007).
13. TORBAN E., Patenaude A.M., Leclerc S., Rakowiecki S., Gauthier S., Andelfinger G., Epstein D.J., Gros P., Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 3449-54, (2008).
14. KIBAR Z., Bosoi C.M., Kooistra M., Salem S., Finnell R.H., De Marco P., Merello E., Bassuk A.G., Capra V., Gros P., Novel mutations in VANGL1 in neural tube defects, *Hum Mutat*, 30, E706-15, (2009).

Ek 1.

Olgu ve kontrol grubu DNA örneklerine ait DNA konsantrasyonları

| No | Örnek No | A260 | A280 | A260/A280 | Kons μ /mL |
|----|----------|-------|-------|-----------|----------------|
| 1 | 1 | 0.193 | 0.122 | 1.58 | 96.5 |
| 2 | 2 | 0.05 | 0.035 | 1.43 | 25 |
| 3 | 3 | 0.089 | 0.056 | 1.59 | 44.5 |
| 4 | 4 | 0.184 | 0.115 | 1.60 | 92 |
| 5 | 5 | 0.054 | 0.035 | 1.54 | 27 |
| 6 | 6 | 0.121 | 0.09 | 1.34 | 60.5 |
| 7 | 7 | 0.145 | 0.089 | 1.63 | 72.5 |
| 8 | 8 | 0.028 | 0.022 | 1.27 | 14 |
| 9 | 9 | 0.146 | 0.093 | 1.57 | 73 |
| 10 | 10 | 0.114 | 0.071 | 1.61 | 57 |
| 11 | 11 | 0.302 | 0.202 | 1.50 | 151 |
| 12 | 12 | 0.052 | 0.037 | 1.41 | 26 |
| 13 | 13 | 0.203 | 0.131 | 1.55 | 101.5 |
| 14 | 14 | 0.150 | 0.088 | 1.70 | 75 |
| 15 | 15 | 0.125 | 0.094 | 1.33 | 62.5 |
| 16 | 16 | 0.131 | 0.075 | 1.75 | 65.5 |
| 17 | 17 | 0.074 | 0.060 | 1.23 | 37 |
| 18 | 18 | 0.167 | 0.120 | 1.39 | 83.5 |
| 19 | K1 | 0.036 | 0.031 | 1.16 | 18 |
| 20 | K2 | 0.026 | 0.023 | 1.13 | 13 |
| 21 | K3 | 0.033 | 0.027 | 1.22 | 16.5 |
| 22 | K4 | 0.023 | 0.021 | 1.10 | 11.5 |
| 23 | K5 | 0.314 | 0.312 | 1.01 | 157 |
| 24 | K6 | 0.044 | 0.033 | 1.33 | 22 |
| 25 | K7 | 0.052 | 0.038 | 1.37 | 26 |
| 26 | K8 | 0.039 | 0.029 | 1.34 | 19.5 |
| 27 | K9 | 0.02 | 0.018 | 1.11 | 10 |
| 28 | K10 | 0.02 | 0.016 | 1.25 | 10 |
| 29 | K11 | 0.038 | 0.035 | 1.09 | 19 |
| 30 | K12 | 0.032 | 0.027 | 1.19 | 16 |
| 31 | K13 | 0.026 | 0.022 | 1.18 | 13 |
| 32 | K14 | 0.047 | 0.036 | 1.31 | 23.5 |
| 33 | K15 | 0.084 | 0.059 | 1.42 | 42 |
| 34 | K16 | 0.106 | 0.068 | 1.56 | 53 |
| 35 | K17 | 0.055 | 0.044 | 1.25 | 27.5 |
| 36 | K18 | 0.129 | 0.088 | 1.47 | 64.5 |
| 37 | K19 | 0.03 | 0.024 | 1.25 | 15 |
| 38 | K20 | 0.06 | 0.042 | 1.43 | 30 |
| 39 | K21 | 0.072 | 0.05 | 1.44 | 36 |
| 40 | K22 | 0.043 | 0.034 | 1.26 | 21.5 |
| 41 | K23 | 0.085 | 0.075 | 1.13 | 42.5 |
| 42 | K24 | 0.042 | 0.035 | 1.20 | 21 |
| 43 | K25 | 0.045 | 0.038 | 1.18 | 22.5 |
| 44 | K26 | 0.023 | 0.021 | 1.10 | 11.5 |

| | | | | | |
|----|-----|-------|-------|------|----|
| 45 | K27 | 0.122 | 0.079 | 1.54 | 61 |
| 46 | K28 | 0.036 | 0.028 | 1.29 | 18 |

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

| |
|---|
| Proje No: 109S198 |
| Proje Başlığı: <i>VANGL1</i> geni heterozigot missens V239I, R274Q, M328T mutasyonlarının nöral tüp defektlerinin etiolojisindeki rolünün değerlendirilmesi |
| Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yard. Doç. Dr. G. Ozan ÇETİN Prof. Dr. Nagihan YALÇIN |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kınıklı/Denizli |
| Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15/10/2009 – 15/10/2010 |
| Öz (en çok 70 kelime) Araştırmamızda, nöral tüp defekti etiolojisinde yer aldığı düşünülen <i>VANGL1</i> geni heterozigot missens mutasyonları değerlendirilmiştir. Olgu ve kontrol gruplarında V239I, R274Q ve M328T mutasyonlarının her üçü de saptanmamıştır. Araştırma konusu ile ilgili çok merkezli, daha geniş olgu ve kontrol gruplarını kapsayacak, farklı mutasyon türleri ve bölgelerinin de araştırılacağı çalışmalara gereksinim vardır. |
| Anahtar Kelimeler: Nöral tüp defekti, <i>VANGL1</i> , mutasyon |
| Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> <small>Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.</small> |
| Projeden Yapılan Yayınlar: Bulunmamaktadır. |