

Non-Sendromik Yarık Dudak/Damaklı Olgularda ACOD4 Geni Mutasyon Analizi

Mutation Analysis of ACOD4 Gene in Cases with Non-syndromic Cleft Lip/Palate

Mehmet Ali SÖZEN^{1,3}, Marie M TOLAROVA², Richart A SPRITZ¹

¹ Human Medical Genetics Program, University of Colorado at Denver and Health Sciences Center, Denver, CO

² Department of Orthodontics, University of the Pacific, San Francisco, CA

³ Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, Afyonkarahisar

ÖZET: Non-sendromik yarık dudak ve/veya damak (nsYD/D= nsCL/P, MIM 119530) en yaygın başlıca doğum defektlerinden biridir. Birçok aday gen alel ilişkilendirme metodu ile non-sendromik yarık dudak/damak malformasyonunda olası rol alıp almadığını test etmek için çalışılmıştır. Kromozom yeniden düzenlemelerine sahip nadir olgular, ilgilenilen bir hastalık için aday genleri belirlemede eşsiz ipuçları sağlayabilir. Son zamanlarda, bu şekildeki iki çalışma yeni kromozom yeniden düzenlemeleri belirlemiş ve bu suretle non-sendromik yarık dudak/damak hastalığı için iki yeni aday gen ortaya çıkarmıştır: *CLPTM1* ve *ACOD4*. Buna dayalı olarak, biz *ACOD4* geninin non-sendromik yarık dudak/damak hastalığındaki potansiyel rolünü belirlemek için ilgili gende mutasyon analizi gerçekleştirdik. Kuzey Venezuela'dan toplam 96 hastada *ACOD4* geninin kodlayan beş ekzonunda mutasyon taraması gerçekleştirdik. İki hastada *ACOD4* geninin 4. ekzonunda bir sessiz mutasyon, Ala241Ala, belirledik ve başka herhangi bir varyant bulamadık. Sonuç olarak, bu bulgular *ACOD4* geninin nsYD/D malformasyonu gelişiminde yaygın bir genetik risk faktörü olduğunu, en azından bu çalışmada çalışılan güney Amerika'lı (Venezüella) popülasyonda, desteklememektedir.

Anahtar Kelimeler: *ACOD4* geni, perisentrik inversiyon, yarık dudak, yarık damak, mutasyon analizi

ABSTRACT: Non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (CL/P, MIM 119530) is perhaps the most common major birth defect. A large number of candidate genes have been studied by allelic association studies to test possible involvement in non-syndromic cleft lip and palate. Rare patients with de novo chromosomal rearrangements and a rare disease can offer unique clues for identifying candidate genes for a disorder of interest. Two recent studies identified novel chromosomal rearrangements and thereby identified two novel candidate genes for nsCL/P: *CLPTM1* and *ACOD4*. Based on this, we carried out mutation analysis of the *ACOD4* gene for its potential involvement in nsCL/P. We screened a total of 96 nsCL/P patients from Venezuela for variation in the five coding exons of *ACOD4*. We detected a silent variant, Ala242Ala, in exon 4 in two patients, but found no other variants. Altogether, our data do not support *ACOD4* as a common genetic risk factor for nsCL/P malformation, at least in the South American (Venezuelan) population studied here.

Key Words: *ACOD4* gene, pericentric inversion, cleft lip, cleft palate, mutation analysis

GİRİŞ

Non-sendromik yarık dudak/damak (nsYD/D=nsCL/P) ikincil damak yarığı veya yarıksız damakla seyreden coğrafi ve etnik kökene göre değişen yaklaşık 1/1000 canlı doğumu etkileyen (Kuzey Amerika beyazların bebeklerinde yaklaşık

1/800) yaygın bir anomalidir (1,2). Yarık dudak/damak (YD/D) olgularının yaklaşık %70'i izole, sporadik bozukluk olarak görülürken, %30'unu da sendromik olgular oluşturmaktadır. Non-sendromik YD/D (nsYD/D=nsCL/P; MIM 119530) birçok lokusun göreceli olarak küçük etkileriyle ortaya çıkan poligenik, multifaktöryel bir hastalıktır (3,4,5,6). Birçok sendromik versiyonda rol oynayan genlerin non-sendromik olgularda da rol aldığı gösterilmiştir (7). Birçok kromozom bölgesi örneğin, 2p13, 4p ve 4q31, 6p24, 17q21-24 ve 19q13.2 potansiyel kantitatif özellik lokusları (Quantitative trait loci, QTR) olarak şu ana kadar çalışılmış ve birçok aday gen non-sendromik yarık dudak/damak'ta rol oynayıp oynama-

madığını test için alel ilişkilendirme metoduyla analiz edilmiştir (8,9,10,11,12,13,).

Bağlantı analizi ve parametrik olmayan yaklaşımlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda kromozom 4p ve 4q'daki bazı bölgelerin sendromik ve non-sendromik YD/D (CL/P) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (14,15,16). 4p sendromu (Wolf-Hirschhorn sendromu) yarık dudak/damak hastalığının başka bir nedeni olarak literatürde yer almıştır (17). 4. kromozomun kısa (p) kolunda yer alan *MSX1* geni insanlarda non-sendromik yarık dudak/damak olgularıyla ilişkili bulunan bir başka aday genidir (18). 4. kromozomun uzun (q) kolunu içine alan delesyon, translokasyon ve dublikasyonları içeren birçok kromozom yeniden düzenlemeleri ile gözlenen birçok olgular rapor edilmiştir (19,20,21,22,23). Bu delesyon ve yeniden düzenlemelerden bazıları sendromik yarık/dudak damakla ilişkilendirilmiştir. Birçok hastalıkla ilgili genleri belirlemede kromozom yeniden düzenlemeleri taşıyan hastalar ilgili aday genleri ortaya çıkarmada büyük katkıda bulunmuştur. Bu bağlamda böbrek kanserlerinde rol oynayan bir gen bir tranlokasyonla belirlenmesinin yanısıra (24), yakın zamanlardaki başka bir çalışmada da, kromozom 19 üzerinde bir membran proteinini kodlayan ve dengeli bir translokasyon, t(2;19) (q11.2q13.3), ile bozulan bir gen de (*CLPTMI*) non-sendromik yarık dudak/damak malformasyonuna aday bir gen olarak belirlenmiştir (25). Günümüzdeki pozisyonel klonlama stratejileri kullanılarak yeniden düzenlenen kromozom yerlerindeki veya yakınındaki muhtemelen fonksiyonları bozulan ve ilgili hastalık tablolarının ortaya çıkmasına yol açan genler büyük bir başarı ile tesbit edilebilmektedir. Bunun en yakın örneğini *ACOD4* geni oluşturmaktadır. *ACOD4* geni iki kuşak boyunca yarık dudak/damakla birlikte segregе olmuş bir ailede belirlenen 4. kromozomdaki bir perisentrik inversiyonun, inv(4)(p13q21), tesbiti ile ortaya koyulmuştur (26). Flourescence In situ Hybridiation (FISH), YAC, BAC Contig haritalaması tekniklerinin kombinasyonu kullanılarak inversiyon kırık noktası belirlenmiş ve dizi analizi yapıldığında, inversiyon ile *ACOD4* geninin bozulduğu ortaya konmuştur. Ki bu genin 4q21'de lokalize olan ve yeni bir Açıl-CoA desaturaz enzimini kodlayan 5 ekzonlu bir gen olduğu gösterilmiştir (26).

Bu çalışmanın amacı yarık dudaklı bir ailede iki kuşak boyunca segregе olmuş olan perisentrik

inversiyonla bozulan *ACOD4* geninin intron ekzon sınır kısımları dahil kodlayan ekzonlarında non-sendromik yarık dudak ve/veya damaklı olgularda SSCP tekniği ile mutasyon analizi gerçekleştirmektir. Bunun sonucunda *ACOD4* geninin ilgili hastalıkla ilişkili olup olmadığına veya ilgili hastalığın gelişiminde katkıda bulunup bulunmadığını ortaya koymaktı. Bunun için 96 non-sendromik yarık dudak/damaklı olguda *ACOD4* geninin beş ekzonunda yapılan mutasyon analizi sonucu 2 olguda sessiz mutasyon belirlenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Genomik DNA örnekleri kuzey Venezuela'nın Cumana bölgesindeki non-sendromik yarık dudak/damaklı hastalardan gönüllü rıza esasına bağlı kalınarak alındı. Bu çalışma Kuzey Venezuela'dan 96 non-sendromik YD/D'lı hastada *ACOD4* geninin kodlayan beş ekzonunda SSCP ve dizi analizi metodu kullanılarak mutasyon analizi yapıldı. Genomik DNA'lar hastalardan filtre kağıtları üzerine damlatılan ve kurutulan kan damlalarından izole edildi (27) ve elde edilen genomik DNA'lar Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için kalıp olarak kullanıldı. Tablo 1'de verilen intronik oligonükleotid primerler kullanılarak PCR ürünlerinin amplifikasyonu yapıldı. PCR reaksiyonunda zincir sentezi için Platinum DNA Taq polimeraz enzimi kullanıldı ve üretici firmanın (Invitrogen) tavsiyeleri doğrultusunda reaksiyon şartları optimize edildi. *ACOD4* geninin kodlayan bölgelerinde (başlıca 5 ekzon) mutasyon taraması için amplifikasyonu yapılan farklı uzunluktaki PCR ürünleri kullanıldı. Bunun için ilgili ürünler eşit miktarda (10 ul'lik bir PCR ürünü için 10 ul 2X formamid içeren jel yükleme tamponu ilave edilerek yaklaşık 5 dakika 99 derecede denature edildi ve jelle yükleninceye kadar buzda muhafaza edildi. Denatüre edilen PCR ürünleri 0.5X'lik MDE kullanılarak (Biohittaker Molecular Applications) önceden hazırlanmış %10 gliserol içeren jelle yüklendi (28). Yükleme bittikten sonra, jel 25-30W sabit güçte yaklaşık PCR ürününün uzunluğuna bağlı olarak 3-5 saat yürütülerek elektroforez yapıldı ve farklı SSCP/heterodupleks kalıpları gösteren PCR ürünleri, ilgili hasta genomik DNA'larından tekrar PCR ve takiben de "jelden DNA ekstraksiyon kiti" (Qiagen) kullanılarak DNA'lar saflaştırıldıktan sonra DNA dizi analizine tabi tutuldu ve mutasyon olup olmadığına bakıldı.

Tablo 1. ACOD4 geninin ekzonlarının amplifikasyonunda kullanılan oligonükleotid primerler

Primer adı	Primer dizisi	Amplikon büyüklüğü (bp)*
ACODEkzon1F	5' GTGCGGAGAATTCCCCCCTA 3' (forward primer)	350
ACODEkzon1F2	5' ACCCTCGAGCTCCGCTCGGGCA 3' (forward primer)	308
ACODEkzon1R	5' ACTTACCCCAGAGCAGAGTGA 3' (reverse primer)	
ACODEkzon2F	5' ACGTGTGTCCCTGTTCAGGA 3' (forward primer)	280
ACODEkzon2R	5' CTCCATACTGCCATCTGCA 3' (reverse primer)	
ACODEkzon3F	5' GCGGTTCTCTTCTTCACTCA 3' (forward primer)	321
ACODEkzon3R	5' ATGAGTCCACCTCATTGTGC 3' (reverse primer)	
ACODEkzon4F	5' TCAGCGGGTCCCTCATGGTGA 3' (forward primer)	307
ACODEkzon4R	5' ATTCTCCCCATTGGCCCTCA 3' (reverse primer)	
ACODEkzon5F	5' CTATGCAGAGAGGTGGTGA 3' (forward primer)	283
ACODEkzon5R	5' GAGGTTGCAACGGCAGACA 3' (reverse primer)	

*bp—baz çifti

Tablo 2. Kuzey Venezuela'lı olguların ACOD4 geninin mutasyon analizinde belirlenen varyantlar

Varyant	Ekzon	Yabancıl tip alel	mutant tip alel	nsYD/D'li hastalardaki sıklığı (n=96)
Ala241Ala (A241A)	4	GCC (Ala)	GCT (Ala)	2/192 (0.01)

BULGULAR

ACOD4 geninin non-sendromik yarık dudak/damak hastalığı ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için Kuzey Venezuela'dan 96 non-sendromik yarık dudak/damaklı olguda kromozom 4q21'de lokalize olmuş ACOD4 geninin kodlayan beş ekzonunda mutasyon taraması sonucu, ilgili genin 4. ekzonunda iki hastada sessiz bir mutasyon belirlendi (Tablo 2). Bu mutasyon ile 241. kodondaki GCT>GCC'ye dönüşümü herhangi bir aminoasit değişimi ortaya çıkarmamıştır. Dolayısıyla bu sessiz mutasyon "Ala241Ala" olarak gösterilmiştir. Mutasyon analizi yapılan diğer ekzonlarda (ekzon 1,2,3 ve 5) başka herhangi bir mutasyon veya varyant tesbit edilmemiştir. Bu yüzden, bu çalışmada ACOD4 geninin non-sendromik yarık dudak/damak malformasyonunun etyolojisinde rol oynayabileceği yönünde kesin destekleyici bulgu elde edilememiştir.

TARTIŞMA

Non-sendromik yarık dudak ve/veya damak (YD/D=CL/P) malformasyonunun etyolojisi hastalığın kompleksliğinden dolayı hala büyük oranda bilinmemektedir. Birçok genetik ve çevresel faktörle-

rin non-sendromik yarık dudak/damak (nsCL/P) malformasyonunun gelişiminde rol oynayabileceği gözükmemektedir. Şu ana kadar bağlantı analizleri ve ilişkilendirme çalışmalarıyla 4q dahil bazı kromozom bölgeleri non-sendromik yarık malformasyonunun etyolojisinde düşünülmüş ve bu bölgelerdeki bir çok aday genlerdeki mutasyonların hastalığın gelişiminde katkıda bulunduğu gösterilmiştir (7). Bu aday genleri belirlemede kromozom yeniden düzenlenmelerinin yararlı katkıları birkaç çalışmada gösterilmiştir (24,25,26).

Bu çalışmada, 2 kuşak yarık dudak damak ile segregasyon olmuş olan bir ailede tesbit edilen bir perisentrik inversiyondan dolayı inversiyon kırık yerinde belirlenen ACOD4 aday bir gen olarak düşünülmüş ve ilgili gende mutasyon analizi yapılmıştır ve bu genin non-sendromik yarık dudak/damak malformasyonunun oluşumunda bir katkısının olup olmadığı araştırılmıştır (26). ACOD4 geninin 4. ekzonundaki iki hastada heterozigot olarak belirlenen Ala241Ala mutasyonu dışında incelenen diğer kodlayan ekzonlarda başka bir değişim gözlenmemiştir. Gendeki bu sessiz değişimin fonksiyonel bir etkisinin olup olmadığını ortaya koyan herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle bu değişimin fonksiyonu ile ilgili ileri çalışmalar yapılması ge-

rekmetedir. Bunun beraber, bu değişimin hastalık etiolojinde bir rolünün olmaması da ihtimal dahilindedir. Ayrıca, mutasyon analizinin gerçekleştirildiği tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP) tekniği ile yaklaşık %70 civarında mutasyonların belirlenebildiği göz önüne alınırsa; bu tekniğin sınırlayıcı bir sonucu olarak ortaya çıkan şudur ki; çalışmada non-sendromik yarık dudak/damak malformasyonunun etiolojisinde rol oynayan bazı patolojik değişimlerin kaçırılmış olması da ihtimal dahilindedir. Bundan başka, bu çalışmada incelenmeyen yukarı 5' promoter bölgesi, intron bölgeleri ve hatta 3' bölümündeki muhtemel düzenleyici bölgelerdeki potansiyel patolojik değişiklikler olabileceği göz ardı edilmemelidir. Bu düzenleyici bölgelerdeki mutasyonlar *ACOD4* geninin ekspresyonunu etkileyebilir. Bu bölgeler ile ilgili geniş popülasyonlarda detaylı çalışılmalıdır.

Sonuç olarak, Veneziella popülasyonunda yapılan bu çalışmada belirlenen *ACOD4* varyantı açıkça 4q12 de yer alan bu genin non-sendromik yarık dudak damaktaki rolünü destekleyici görünmemektedir. Bununla birlikte, bu çalışma *ACOD4* geninin muhtemel regülatör bölgelerinde veya farklı tekniklerle mutasyon analizi yapılması bu genin ilgili malformasyonda genetik risk faktörü olarak rol oynayıp oynamadığını belirlemede yararlı olabileceğini ve ayrıca *ACOD4* geninin non-sendromik yarık dudak/damak malformasyonundaki rolünü açıklığa kavuşturmak için farklı popülasyonlarda yapılacak başka mutasyon analizi çalışmalarına ihtiyaç olduğunu öngörmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma R.A.S.'e verilen National Institutes of Health DE13571 projesi ile desteklenmiştir. Ayrıca kritik amaçlı okumasından dolayı Dr. Nejat Düzgüneş'e de teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Vanderas AP. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft Palate J*, 1987; 24: 216-225.
- Tolarova MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet*, 1998; 75: 126-137.
- Schutte BC, Murray JC. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Molec Genet*, 1999; 8: 1853-1859.
- Spritz, RA. The genetics and epigenetics of orofacial clefts. *Curr Opin Pediatr*, 2001; 13: 556-560.
- Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet*, 2002; 61: 248-256.
- Cobourne MT. The complex genetics of cleft lip and palate. *Eur J Orthod*, 2004; 26: 7-16.
- Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of nonsyndromic clefts. *Hum Mol Genet*, 2004; 13 Spec No 1:R73-81. Epub 2004 Jan 13.
- Pezzetti F, Scapoli L, Martinelli M, Carinci F, Bodo M, Carinci P, Tognon M. A locus in 2p13-p14 (OFC2), in addition to that mapped in 6p23, is involved in nonsyndromic familial orofacial cleft malformation. *Genomics*, 1998; 50: 299-305.
- Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Martinelli M, Carinci P, Tognon M. Evidence of linkage to 6p23 and genetic heterogeneity in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Genomics*, 1997; 43: 216-220.
- Blanco R, Suazo J, Santos JL, Paredes M, Sung H, Carreno H, Jara L. Association between 10 microsatellite markers and nonsyndromic cleft lip palate in the Chilean population. *Cleft Palate Craniofac J*, 2004; 41: 163-167.
- Marazita ML, Field LL, Cooper ME, Tobias R, Maher BS, Peanchitlertkajorn S, Liu YE. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in China: assessment of candidate regions. *Cleft Palate Craniofac J*, 2002; 39: 149-156.
- Marazita ML, Field LL, Cooper ME, Tobias R, Maher BS, Peanchitlertkajorn S, Liu YE. Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in Chinese multiplex families. *Am J Hum Genet*, 2002; 71: 349-364.
- Warrington A, Vieira AR, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Romitti PA, Murray JC. Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate. *J Med Genet*, 2006; 43: e26.
- Mitchell LE, Healey SC, Chenevix-Trench G. Evidence for an association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and a gene located on the long arm of chromosome 4. *Am J Hum Genet*, 1995; 57: 1130-1136.
- Beiraghi S, Foroud T, Diouhy S, Bixler D, Conneally PM, Delozier-Blanchet D, Hodes ME. Possible localization of a major gene for cleft lip and palate to 4q. *Clin Genet*, 1994; 46: 255-256. No abstract available
- Kobayashi J, Kimijima Y, Yamada S, Amagasa T, Saito-Ohara F. 4p- syndrome and 9p tetrasomy mosaicism with cleft lip and palate. *J Craniomaxillofac Surg*, 2000; 28: 165-70.

17. Zellweger H, Bardach J, Bordwell J, Williams K. The short arm deletion syndrome of chromosome 4 (4p-syndrome). *Arch Otolaryngol*, 1975; 101: 29-32.
18. van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet*, 2000; 24: 342-343.
19. Butler LJ, Palmer AV, Spencer T, Tabios-Broadway R, Wall WJ. A new interstitial deletion of chromosome No. 4 del(4) (q22::q25). *Clin Genet*, 1987; 31: 199-205.
20. Raczenbek C, Krassikoff N, Cosper P. Second case report of del(4) (q25q27) and review of the literature. *Clin Genet*, 1991; 39: 463-466.
21. Kulharya AS, Maberry M, Kukolich MK, Day DW, Schneider NR, Wilson GN, Tonk V. Interstitial deletions 4q21.1q25 and 4q25q27: phenotypic variability and relation to Rieger anomaly. *Am J Med Genet*, 1995; 55: 165-170.
22. Fujimoto A, Reddy KS, Spinks R. Interstitial deletion of chromosome 4, del(4)(q12q21.1), in a mentally retarded boy with a piebald trait, due to maternal insertion, ins(8;4). *Am J Med Genet*, 1998; 75: 78-81.
23. Strehle EM, Ahmed OA, Hameed M, Russell A. The 4q-Syndrome. *Genet Couns*, 2001; 12: 327-339.
24. Gemmill RM, West JD, Boldog F, Tanaka N, Robinson LJ, Smith DI, Li F, Drabkin HA. The hereditary renal cell carcinoma 3:8 translocation fuses FHIT to a patched-related gene, TRC8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; 95: 9572-9577.
25. Yoshiura K, Machida J, Daack-Hirsch S, Patil SR, Ashworth LK, Hecht JT, Murray JC. Characterization of a novel gene disrupted by a balanced chromosomal translocation t(2;19)(q11.2;q13.3) in a family with cleft lip and palate. *Genomics*, 1998; 54: 231-240.
26. Beiraghi S, Zhou M, Talmadge CB, Went-Sumegi N, Davis JR, Huang D, Saal H, Seemayer TA, Sumegi J. Identification and characterization of a novel gene disrupted by a pericentric inversion inv(4)(p13.1q21.1) in a family with cleft lip. *Gene*, 2003 24;309(1):11-21.
27. Polski JM, Kimzey S, Percival RW, Grosso LE. Rapid and effective processing of blood specimens for diagnostic PCR using filter paper and Chelex-100. *Mol Pathol*, 1998; 51: 215-217.
28. Lee ST, Park SK, Lee KH, Holmes SA and Spritz RA. A non-radioactive method for simultaneous detection of single-strand conformation polymorphisms (SSCPs) and heteroduplexes. *Mol Cells*, 1995; 5: 668-672.