

GNAI2 Geninde İki Aday Polimorfizm

Emrah Kara¹, Cevdet Nacar¹, Beki Kan^{1,2}

¹Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

²Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: GNAI2 geninin 193 numaralı kodonunda bir hipofiz tümöründe ilk kez saptanmış olan bir mutasyonun polimorfizm olma olasılığının incelenmesi.

Hastalar ve Yöntem: Kandan elde edilen DNA'lar GNAI2 geninin beşinci ve altıncı eksonları ile aralarındaki intron bölgesini içerecek şekilde Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) ile çoğaltıldı. PZT ürünleri Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) yöntemiyle mutasyon belirleme (MDE) ve poliakrilamid jellerinde incelendi. Seçilen bazı örneklerin otomatik DNA analizi gerçekleştirildi.

Bulgular: SSCP analizinde farklı örnekçe belirlenen iki örneğin otomatik DNA dizi analizlerinde, 193 numaralı kodonda mutasyon olmadığı ancak GNAI2 geninin beşinci ve altıncı eksonları arasındaki intron bölgesinde bir C/T (C20151) değişikliğinin olduğu saptandı.

Sonuç: Bulgularımız GNAI2 geninin 193 numaralı kodonunda daha önce belirlenen değişikliğin polimorfizm olma olasılığını desteklememektedir.

Anahtar sözcükler: G proteini, polimorfizm

TWO CANDIDATE POLYMORPHISMS OF THE GNAI2 GENE

ABSTRACT

Objective: To investigate whether a variation in codon 193 of the GNAI2 gene previously determined in a recurrent somatotroph adenoma is a polymorphism.

Patients and Methods: Genomic DNA extracted from blood was amplified for the fifth and sixth exons and the intervening sequence of the GNAI2 gene with Polymerase Chain Reaction (PCR). PCR products were analyzed with Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) on Mutation Detection Enhancement (MDE) and polyacrylamide gels. Selected samples were subjected to direct sequencing.

Results: In total, two samples exhibited abnormal banding patterns in SSCP analysis. DNA sequencing of the PCR products revealed no mutations in codon 193. On the other hand, these samples exhibited a C/T (C20151) variation in the intervening sequence between exons 5 and 6 of the GNAI2 gene.

Conclusions: Our results do not support the possibility of a polymorphism in codon 193 of the GNAI2 gene.

Keywords: G protein, polymorphism

Canlı organizmalar varlıklarını sürdürebilmek için hücrelerarası iletişime gerek duyarlar. Proteinler, nükleotidler, retinoidlerin, yağ asidi türevleri, çeşitli çözünmüş gazlar gibi çok sayıda sinyal molekülü bu iletişime aracılık eder. Sinyal moleküllerin bir kısmı hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerle etkileşerek sinyal iletimini başlatır. GPCR (G-protein-coupled receptor) olarak adlandırılan G proteinleriyle kenetli reseptörler sinyal iletimini

kenetli oldukları G proteinleri aracılığıyla sağlarlar. Hücre zarının sitoplazmik yüzüne yerleşik heterotrimerik G proteinleri veya diğer adıyla G proteinleri küçük monomerik guanin nükleotid bağlayan proteinleri de içine alan geniş GTPaz üst ailesinin bir üyesidir (1-3). Yapısı temel olarak bakterilerden canlılara kadar korunmuş olan G proteinleri, buldukları tüm canlılarda hücre kontrolünde çok önemli rol oynarlar. α , β ve γ adlı üç alt birimden oluşmuşlardır. G proteinleri α alt birimlerine göre 4 sınıfa ayrılırlar: $G_{s\alpha}$, $G_{i/\alpha}$, $G_{q\alpha}$ ve $G_{12\alpha}$. G proteinleri etkin olmadıkları

durumdayken α , β ve γ alt birimleri bir arada, hücre zarının iç yüzeyine tutunmuş durumdadırlar ve α alt birimine guanozin difosfat (GDP) bağlıdır. Agonistin G proteini ile kenetlenen reseptöre bağlanmasının ardından, uyarılmış reseptör G proteini ile etkileşime girer. G proteininin α alt biriminden GDP ayrılır ve GTP bağlanır. GTP'nin bağlanmasıyla heterotrimerik protein α monomerine ve $\beta\gamma$ heterodimerine ayrılır. Ayrılan α alt birimi efektör proteiniyle etkileşip, onu etkinleştirir. α alt birimindeki içsel guanozin trifosfataz (GTPaz) etkinliği sonucu GTP, GDP'ye hidrolizlenir ve α monomeri $\beta\gamma$ dimeri ile tekrar bir araya gelir. α gibi $\beta\gamma$ alt birimleri de G proteinleriyle kenetlenen efektörleri uyarabilirler (1,2). α alt biriminin GTPaz etkinliği G proteininin etkinlik süresinin uzunluğunu belirler. GTPaz etkinliği hızlıysa G proteini daha kısa süre etkin kalırken, GTPaz etkinliği yavaşladıkça G proteini daha uzun süre etkin kalır. α alt biriminin GTPaz etkinliği ve $\beta\gamma$ kompleksiyle ilişkisi G protein sinyali düzenleyicileri (RGS Regulatory of G protein signaling) adı verilen proteinler tarafından düzenlenir (4). Örneğin, $G_{i\alpha}$ 'ya bağlanan RGS proteinleri GTP hidrolizinin hızını arttırmırlar.

$G_{i/ou}$ ailesinin üyelerinden biri olan $G_{i\alpha}$ adenilat siklaz enziminin baskılanması ile cAMP derişiminde azalmaya neden olan G proteindir. $G_{i\alpha}$ proteini GNAI2 geni tarafından eksprese edilmektedir. GNAI2 geni 23140 nükleotid uzunluğunda olup, 9 ekson içermekte ve 3 numaralı kromozomda bulunmaktadır. Çok sayıda varyantı bulunmasına karşın sadece 2 varyantının tam dizisi bilinmektedir.

G protein kenetli reseptörler ve G proteinlerindeki genetik farklılıkların McCune-Albright sendromu, pseudohipoparatiroidizm tip la, Albright kalıtsal osteodistrofisi, testotoksikozis, Jansen hastalığı, otozomal dominant hipokalsemi, hipofiz ve over tümörleri gibi çok sayıda hastalıkta rol aldığı bilinmektedir (5-8). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, belirli hastalıklara karşı gösterilen yatkınlığın ya da direncin ve ilaçlara yanıtın genomdaki polimorfizmlerle ilişkili olduğunu düşündürmektedir (8,9). G proteini polimorfizmlerinin hipertansiyon, ateroskleroz, diyabet, madde bağımlılığı gibi birçok hastalıkta rolü olduğuna ve bireylerin ilaçlara verdiği yanıtı etkileyebileceğine ilişkin bulgular elde edilmiştir (10-12). G proteinleri sinyal iletilişinin önemli bir bileşeni olarak hücre büyümesi ve farklılaşması, onkogeneze, embriyogeneze, kemotaksiz, görme, tatma ve koku duyuları, endokrin ve ekzokrin bezlerin işlevleri, nöratransmisyon ve HIV'e karşı direnç gibi çok sayıda biyolojik süreçte görev almaktadır (13). Dolayısıyla, G proteini polimorfizmlerinin bu süreçlerle ilgili hastalıklarda rolünün olması beklenebilir. Daha önce hipofiz tümörleriyle yapılan bir çalışmamızda GNAI2 geninin 193 numaralı

kodonunda yeni bir tek nükleotid mutasyonu (AAG-AGG) belirlenmiştir (14). Bu mutasyon sonucu yüksüz lizin amino asiti, yine yüksüz bir amino asit olan arjinine dönüşmüştür (K193R). Bu çalışmada bu nokta mutasyonunun polimorfizm olma olasılığı araştırılmıştır.

Yöntemler

Hastalar

Çalışmada, Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarı'ndan sağlanan 4 adet DNA örneği ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda yürütülen başka bir araştırma için kistik fibrozlu hasta ve bu hastaların yakınlarından elde edilen toplam 41 DNA örneği kullanılmıştır. Bu çalışma için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

Kandan genomik DNA izolasyonu

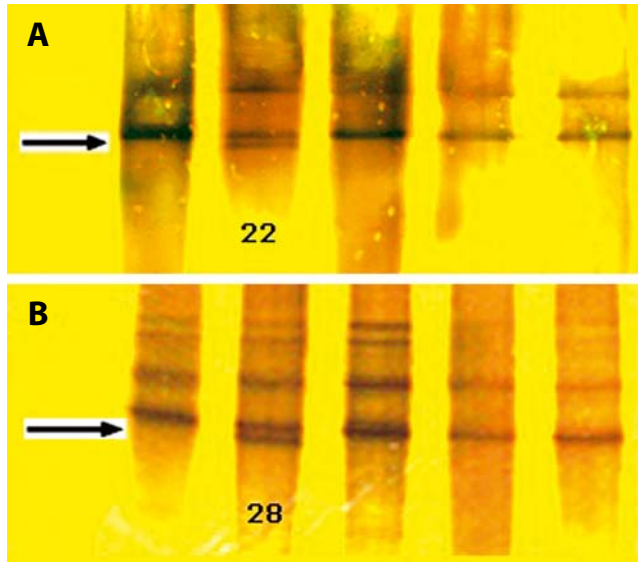
EDTA'lı tüpte bulunan kan iyonik olmayan P40 deterjanı içeren lizis çözeltisi ile işleme sokuldu. Hücre çekirdeğini çöktürmek için çözelti 2000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Hücre çekirdeğini de içeren çökelek SDS iyonik deterjanını içeren başka bir lizis çözeltisi ile işleme sokularak DNA'nın açığa çıkması sağlandı. Protein kalıntılarını uzaklaştırmak için çözeltiyeye fenol eklendi. Karışım 12.000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. DNA içeren üst faz alınarak kloroform:izoamil alkol (1:24) ile işleme sokuldu. Karışım tekrar santrifüj edilerek üst faz alındı. Alınan üst faza soğuk etanol eklenerek DNA'nın çöktürülmesi sağlandı. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra DNA çökeleği TE (Tris ve EDTA) çözeltisinde çözündürüldü.

Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)

GNAI2 geninin 193 numaralı kodonunda polimorfizm olasılığının incelenmesi için, GNAI2 geninin 5. ve 6. eksonları ve aradaki intron dizisini içeren 523 baz çifti büyüklüğündeki bölge, 400 ng genomik DNA, 10 pmol PF: 5'- ATT GCA CAG AGT GAC TAC ATC CCC-3' ve 10 pmol PR: 5'- CCA CAT CAA ACA TCC TGC AGA TA-3' primerleri kullanılarak, 50 μ l hacimde PZT tampon çözeltisi, 3.0 mM $MgCl_2$, 0.25 mM dNTP ve 2 ünite Taq polimeraz varlığında, 94°C'ta 1 dk denatürasyon, 56 °C'ta 1 dk yapışma ve 72°C'ta 2 dk sentez koşullarında 30 döngü ile çoğaltıldı.

SSCP (Tek Sarmal Komformasyon Polimorfizmi)

PZT ürünleri, %95 formamit, 10 mM NaOH, %0.05 bromfenol mavisi ve %0.05 ksilol içeren denatüre edici tamponla 95°C'ta 5 dk süreyle işlem gördükten sonra buzda saklandı. Örnekler gliserol içeren ve içermeyen 0.5XMDE (mutasyon belirleme), ve %6 denatüre edici olmayan poliakrilamid jellerinde 200 V'ta 2-6 saat elektroforeze tabi tutuldu.



Şekil 1. PZT ile çoğaltılmış genomik DNA'nın SSCP analizi. Örnekler **A)** gliserol içermeyen, %6'lık poliakrilamid jelinde denatürleyici olmayan koşullarda ve **B)** gliserol içeren MDE jelinde incelendi. 22 numaralı örnekte (**A**) ve 28 numaralı örnekte (**B**) gözlenen farklı bantlar okla belirtilmiştir.

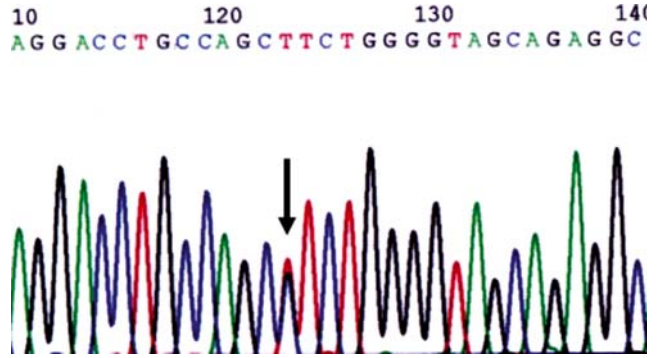
Jeller %10 etanol ve %5 asetik asit ile sabitleştirilip, %0.1 gümüş nitrat ile boyandı, bantlar %1.5 NaOH / %0.15 formaldehit ile ortaya çıkarıldıktan sonra tepkime %0.75 sodyum karbonatla durduruldu (15).

Otomatik DNA dizi analizi

45 µl PZT ürününe eşit hacimde PEG/Mg/NaAc çözeltisi eklendi (%26 polietilen glikol 8000, 6.5 mM MgCl₂, 0.6 M sodyum asetat, pH: 6-7). Karışım oda sıcaklığında 10-15 dk bekletildikten sonra iki kez, 13.000 devirde santrifüjlenip ardından %95-100'lük etanolla yıkandı. Son bir kez daha 13.000 devirde santrifüjlendi ve etanol pipetle uzaklaştırıldı. Örnekler 15 dk oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, 20 µl damıtık suda çözündürüldü. 2 µl örnek %2'lik agaroz jelinde yürütülüp görüntüldü. Temizlenen örneklerin otomatik DNA dizi analizi Lontek, İstanbul tarafından gerçekleştirildi.

Bulgular

GNAI2 geninin 193 numaralı kodonunda polimorfizm olasılığının incelenmesi: GNAI2 geninin 193. kodonunda polimorfizm olasılığının araştırılması için; PF ve PR primerleri kullanılarak, 523 baz çifti büyüklüğündeki bölge Polimeraz Zincir Tepkimesiyle Yöntemler bölümünde belirtilen koşullarda çoğaltıldı. GNAI2 geninin 193 numaralı kodonunu içeren 523 baz büyüklüğündeki bölge; gliserolsüz poliakrilamid, gliserollü poliakrilamid ve MDE jellerinde incelendi. 22 ve 28 numaralı örneklerde gliserolsüz ve gliserollü poliakrilamid ve gliserollü MDE jellerinde mutasyon olduğu düşünülen örnekçeye rastlandı (Şekil 1).



Şekil 2. Otomatik DNA dizi analizi. GNAI2 genindeki C20151T mutasyonu okla gösterilmiştir.

Örneklerin otomatik DNA dizi analizi

Ek bantların bulunduğu 22 ve 28 numaralı örneklerin ve kontrol amacıyla rastgele seçilen iki örneğin PZT ürünleri Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde temizlenip otomatik DNA dizi analizine gönderildi. Bu örneklerin hiç birinde 193 numaralı kodonda bir mutasyona rastlanmadı ancak 22 ve 28 numaralı örneklerde GNAI2 geninin beşinci ve altıncı eksonlarının arasındaki intronun 45. nükleotidinde C/T (C20151T) mutasyonu olduğu görüldü (Şekil 2). C20151T mutasyonunun isimlendirmesi 1. eksonun ilk nükleotidi 1. nükleotid kabul edilerek yapıldı. Buna göre C/T mutasyonu 20151. nükleotidde gerçekleşmektedir.

Tartışma

Bir genin bir popülasyonda iki veya daha fazla alel ile temsil edilmesine polimorfizm denir. Bir genin polimorfik sayılması için popülasyondaki sıklığının %1'den fazla olması gerekir. İnsan genomunda bulunan polimorfizmlerin çoğu tek nükleotid polimorfizmleridir (TNP). İlaçlara verilen yanıtların, hastalıklara yatkınlığın veya direncin ve patojenlere karşı gösterilen direncin bireyler arasında farklılık göstermesinde polimorfizmlerin rolü olabileceği gösterilmiştir (16). G proteinlerinin alt birimlerini ve G proteini kenetli reseptörleri kodlayan genlerde de polimorfizmler belirlenmiş ve bu polimorfizmlerin G proteinin ve ilgili reseptörün işlevini değiştirerek pseudohipoparatiroidizm tip Ib, hipertansiyon, renal yetmezlik gibi hastalıkların oluşumuna neden olabilecekleri gösterilmiştir (17-23).

Türk hastalarla yapılan bir çalışmada, 22 hipofiz tümörünün 6'sında G proteini mutasyonu saptanmıştır (14). Bu mutasyonların biri GNAI2 proteinini kodlayan gende bulunmuştur. Ancak, daha önce yayımlanan çalışmalarda GNAI2'nin 179 ve 205 numaralı kodonlarında mutasyon olduğu rapor edilmişken, bu çalışmada G α 'nın 193 numaralı kodonunda tek nükleotid değişikliği belirlenmiştir (AAG/AGG). Tekrarlayan bir somatotrof adenoma örneğinde belirlenen

bu mutasyon sonucu lizin amino asidi, arjinine dönüşmüştür. Bu iki yüksüz amino asit arasındaki yer değişiminin protein işlevinde farklılık yaratma olasılığı düşük olsa da, GNAI2'nin henüz tam açıklanamamış hücre içi işlevlerinin olduğu göz önüne alınarak, bu mutasyonun polimorfizm olma olasılığı incelenmeye değer bulunmuştur.

Bu amaçla, çalışmada 45 DNA örneği GNAI2 proteininin 193 numaralı kodonunu da içerecek şekilde PZT ile çoğaltıldı, PZT ürünleri SSCP yöntemiyle incelendi. MDE ve poliakrilamid jellerinde yürütülen örneklerin ikisinde farklı örnekçe belirlendi. Örneklerin otomatik DNA dizi analizi sonucu, akraba iki bireyin DNA örneklerinde GNAI2 geninde C20151T mutasyonu belirlendi; ancak, 193 numaralı kodonda bir değişiklik saptanmadı. SSCP yöntemiyle incelenen ve farklı örnekçeye rastlanmamış

örnekler arasından rastgele seçilmiş iki örneğin kontrol amacıyla yapılan otomatik DNA dizi analizlerinde ne 193 numaralı kodonda ne de 5 ve 6 numaralı eksonlar arasındaki intron bölgesindeki 45 numaralı nükleotitte mutasyona rastlanmadı. Bulgularımız GNAI2 geninin 193 numaralı kodonunda polimorfizm varlığını desteklemektedir. 193 numaralı kodonda polimorfizmin belirlenmesinde kesin sonuca ulaşmak ve yeni belirlenen mutasyonu nitelemek için çalışmanın daha fazla örnekle tekrarlanması uygundur.

Teşekkür

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (SAĞ-20/131102). DNA örnekleri için Dr. E. Dağlı, Dr. F. Karakoç, Dr. B. Karadağ ve Dr. A. Tolun'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Hepler JR., Gilman AG. G-proteins. Trends Bioch Sci 1992; 17: 383-387.
2. Rens-Domiano S, Hamm HE. Structural and functional-relationships of heterotrimeric G-proteins. FASEB J 1995; 9: 1059-1069.
3. Küçükkaya B, Kan B. Heterotrimerik G proteinleri. Turk J Biochem 2007; 32: 39-50.
4. Koelle MR. A new family of G-protein regulators - The RGS proteins. Curr Opin Cell Biol 1997; 9: 143-147.
5. Shenker A. Activating mutations in G protein-coupled signaling pathways as a cause of endocrine disease. GGH J 1996; 12: 33-38.
6. Spiegel AM. Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. Annu Rev Physiol 1996; 58: 143-170.
7. Radhika V, Dhanasekaran N. Transforming G proteins. Oncogene 2001; 20: 1607-1614.
8. Lania A, Mantovani G, Spada A. G protein mutations in endocrine diseases. Eur J Endocrinol 2001; 145: 543-559.
9. Shi MM. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. Clinical Chem 2001; 47: 164-172.
10. Siffert W. G protein polymorphisms in hypertension, atherosclerosis, and diabetes. Annu Rev Med 2005; 56: 17-28.
11. Bachmann HS, Lieb B, Bonnet U, et al. Influence of the 393T>C polymorphism of the GNAS1 gene on the intensity of opiate withdrawal. Pharmacopsychiatry. 2011; 44: 159-160.
12. Klenke S, Siffert W. SNPs in genes encoding G proteins in pharmacogenetics. Pharmacogenomics. 2011; 12: 633-654.
13. Gutkind JS. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. J Biol Chem 1998; 273: 1839-1842.
14. Kan B, Esapa C, Sipahi T, et al. G protein mutations in pituitary tumors: a study on Turkish patients. Pituitary 2003; 6: 75-80.
15. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 2766-2770.
16. Chakravarti A. Single nucleotide polymorphisms.. to a future of genetic medicine. Nature 2001; 409: 822-823.
17. Bastepe M, Pincus JE, Sugimoto T et al. Positional dissociation between the genetic mutation responsible for pseudohypoparathyroidism type Ib and the associated methylation defect at exon A/B: evidence for a long-range regulatory element within the imprinted GNAS1 locus. Hum Mol Genet 2001; 10: 1231-1241.
18. Sedlacek K, Fischer M, Erdmann J, et al. Relation of the G protein beta(3)-subunit polymorphism with left ventricle structure and function. Hypertension 2002; 40: 162-167.
19. Garcia SI, Porto PI, Dieuzeude G. et al. Thyrotropin-releasing hormone receptor (TRHR) gene is associated with essential hypertension. Hypertension 2001; 38: 683-687.
20. Stanton T, Inglis G.C, Padmanabhan S, Dominiczak AF, Jardine AG, Connell JMC. Variation at the beta-1 adrenoceptor gene locus affects left ventricular mass in renal failure. J Nephrol 2002; 15: 512-518.
21. Fukunaga K, Ishii S, Asano K et al. Single nucleotide polymorphism of human platelet-activating factor receptor impairs G-protein activation. J Biol Chem 2001; 276: 43025-43030.
22. Mason DA, Moore J, Green SA, Liggett S B. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta(1)-adrenergic receptor. J Biol Chem 1999; 274: 12670-12674.
23. Small KM, Brown KM, Forbes SL, Liggett SB. Polymorphic deletion of three intracellular acidic residues of the alpha(2B)-adrenergic receptor decreases G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and desensitization. J Biol Chem 2001; 276: 4917-4922.