

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OSTEOARTRİT TANISI KONMUŞ
HASTA BİREYLERDE
SMAD3 GEN MUTASYONLARININ ANALİZİ**

Mustafa SOYÖZ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
908-D-04 Proje numarası ile desteklenmiştir**

**Tez No:
2008-İSPARTA**

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı
 Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

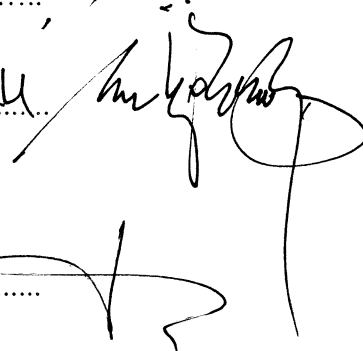
Tez Savunma Tarihi : 30/01/2008

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Nurten ÖZÇELİK
 Süleyman Demirel Üniversitesi



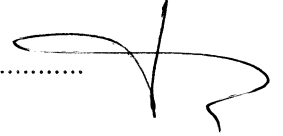
Üye

Prof. Dr. NURCAN İMİRZALIOĞLU
 (Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)
 KOCA TEPE ÜNİVERSİTESİ, AFYON



Üye

Doç. Dr. Selami AKKÜŞ
 (Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)
 Süleyman Demirel Üniversitesi, ISPARTA



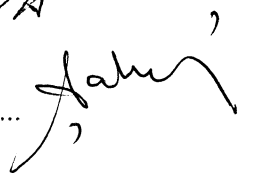
Üye

Doç. Dr. H. Ramazan YILMAZ
 (Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)
 Süleyman Demirel Üniversitesi, ISPARTA



Üye

Yrd. Doç. Dr. Nilüfer SAHİN CALAPOĞLU
 (Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)
 SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ, ISPARTA



ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlanmaktan onur duyduğum, doktora eğitimim ve doktora tez çalışmam süresince her zaman desteği, yardımları ve yönlendirmeleri ile yanımda olan değerli danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr.Nurten ÖZÇELİK'e,

Tez ve laboratuvar çalışmalarımda desteğini esirgemeyen, yönlendirmeleri ve yardımları ile tez çalışmalarıma büyük katkısı olan, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU'na,

Tez çalışmalarım sırasında destek veren tez izleme komitesi ve Fizik Tedavi Rehabilitasyon Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.Selami AKKUŞ'a, hasta ve kontrol gruplarının oluşturulmasında, çalışmaya katılan bireylerin kanlarının ve bilgilerinin toplanmasında büyük emeği olan Fizik Tedavi Rehabilitasyon Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Erdem İLGİN'e, istatistiksel değerlendirmelere katkılarından dolayı Yrd.Doç.Dr. Ersin USKUN' a,

Anabilim Dalımız Moleküler Biyoloji Laboratuvarının kurulmasında emeği geçenlere ve çalışma arkadaşlarıma, Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline ve bu çalışmaya mali destek veren Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine (908-D-04) teşekkür ederim.

Eğitim ve öğretim hayatımda maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen sevgili aileme ve desteği ile her zaman yanımda olan eşim Özgen SOYÖZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vii
TABLolar, ŞEKİLLER VE GRAFİKLER İNDEKSİ	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tek Gen Mutasyonları	5
2.1.1. Nokta Mutasyonları	6
2.1.1.1. Sessiz Mutasyonlar	6
2.1.1.2. Yanlış Anlamalı Mutasyonlar	7
2.1.1.3. Anlamsız Mutasyonlar.....	7
2.1.1.4. RNA Splays Mutasyonları	7
2.1.2. Delesyonlar ve İnsersiyonlar.....	8
2.1.2.1. Çerçeve Kayması Mutasyonları	8
2.1.2.2. Büyük Delesyon ve İnsersiyonlar	8
2.1.3. Trinükleotid Tekrar Artışları	8
2.2. Mutasyon Tarama Yöntemleri.....	9
2.2.1. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP)	9
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu / Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PCR/RFLP)	12
2.2.3. DNA Dizi Analizi.....	13
2.3. Osteoartrit	15
2.3.1. Etiyoloji ve Epidemiyoloji	15
2.3.2. Osteoartritin Sınıflandırılması	15
2.3.3. Osteoartrit Neden ve Nasıl Gelişir ?	16
2.3.4. Osteoartritin Patofizyolojisi	17
2.3.5. Osteoartritte Rol Oynayan Genetik Faktörler	18
2.3.5.1. Aile Çalışmaları	18
2.3.5.2. İkiz Çalışmaları	19
2.3.5.3. Osteoartrit Kalıtımında Aday Genler	20

2.4. TGF- β (Transforming Growth Factor β) Ailesi	22
2.4.1. Reseptör Kompleks Oluşumu	23
2.4.2. Reseptör Kompleksten Sinyal Akışı	25
2.4.2.1. SMAD Alt Grupları ve Fonksiyonları	26
2.4.2.2. SMAD Proteinleri Aracılığı İle Sinyal İletimi	27
2.4.2.3. SMAD'ların Hücre Çekirdeğindeki Lokalizasyonları ve Regülasyonları	29
2.4.2.4. Antagonistik SMAD'larla İnhibisyon	30
2.4.3. TGF- β ve Sinyal Yollarının Kondrosit Metabolizması Üzerine Etkileri Ve Osteoartrit Oluşumundaki Rollerini.....	31
2.4.4. Osteoartrit Oluşumunda Smad3 Gen Mutasyonlarının Önemi	33
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1. Materyal	35
3.1.1. Çalışma Grubu	35
3.1.2. Kimyasallar	36
3.1.3. Gereçler	37
3.1.4. Solüsyonlar	39
3.1.4.1. DNA İzolasyon Tamponları	39
3.1.4.2. Agaroz Jel Elektroferez Solüsyonları	42
3.1.4.3. Poliakrilamid Jel Elektroferez Solüsyonları	43
3.1.4.4. Jele Yükleme Tamponları	44
3.1.4.5. Gümüş Boyama Solüsyonları	45
3.2. Metod.....	46
3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu.....	46
3.2.1.1. İzole Edilen DNA'nın İntaklığı	47
3.2.1.2. Spektrofotometrede DNA Konsantrasyonunun Ölçümü	47
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	47
3.2.2.1. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel ile Kontrol Edilmesi	49
3.2.3. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) İşlemleri.....	50
3.2.3.1. % 12,5' luk (29:1) Poliakrilamid Jelin Hazırlanması	50
3.2.3.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi İçin Camların Hazırlanması ve Jelin Dökülmesi.....	50
3.2.3.3. PCR Ürünlerinin Yüklmesi ve Yürütülmesi.....	51

3.2.3.4 Gümüş Nitrat İle Boyama.....	51
3.2.4. DNA Dizi Analizi.....	52
3.2.5. PCR / RFLP İşlemleri.....	53
3.2.5.1. PCR/RFLP Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi.....	54
3.2.5.2. PCR/RFLP Ürünlerinin Analizi	54
3.2.6. İstatistik Analizleri	55
4. BULGULAR	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	72
ÖZET	82
SUMMARY	83
KAYNAKLAR.....	84

KISALTMALAR

OA	: Osteoartrit
TGF- β	: Transforming Growth Factor-beta
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
hnRNA	: Heterojen nuklear RNA
SSCP	: Tek zincir konformasyon polimorfizmi
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
DİP	: Distal interfalangeal eklemler
MZ	: Monozigotik
DZ	: Dizigotik
T β R-I	: TGF- β tip I reseptörleri
T β R-II	: TGF- β tip II reseptörleri
BMPR-I	: Bone Morphogenetic Protein Receptor-I
SARA	: Reseptör aktivasyonu için SMAD tutucu
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
MAP	: Mitogen-activated protein
Erk MAP	: Extracellular signal-regulated MAP
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
K/L	: Kellgren Lawrence
BMI	: Vücut kütle indeksi
OO	: Olasılıklar Oranı
GA	: Güven Aralığı
AC	: Eklem kıkırdağı
ECM	: Hücre dışı matriks
SBE	: SMAD bağlanma elemanı
PKC	: Protein Kinaz C
ERK	: Hücre dışı sinyal tarafından düzenlenen kinaz

TABLolar, ŞEKİLLER VE GRAFİKLER İNDEKSİ

Şekil 1. Tip I ve II TGF- β reseptör aileleri	24
Şekil 2. SMADlar ile TGF- β sinyal iletimi	25
Şekil 3. Omurgalı SMADlarının filogenetik ağacı ve şematik yapısı	26
Şekil 4. R- ve Co-Smadların aktivasyonu	28
Şekil 5. I-Smadların faaliyetlerinin mekanizması	30
Şekil 6. Osteoartritte genlerin rolü	33
Şekil 7. İntron 2'nin 59. pozisyonundaki nükleotid için Bme1390I tanıma bölgeleri	53
Şekil 8. <i>Smad3</i> geni 2. ekzonunun Bme1390I kesim ürünleri	55
Şekil 9. <i>Smad3</i> geninin 9 ekzonunun amplifikasyon ürünleri.....	57
Şekil 10. <i>Smad3</i> geninin 5. ekzonunun SSCP görüntüsü.....	57
Şekil 11. <i>Smad3</i> geninin 3.ekzonuna ait SSCP görüntüsü.....	58
Şekil 12 a-c. <i>Smad3</i> geninin 2. ekzonunun SSCP görüntüleri	58-59
Şekil 13a,b. Exon 2'nin 103. kodonundaki sessiz A→G transisyonu.....	61
Şekil 14 a-c. İntron 2'nin 59. nükleotidi dizi analiz sonuçları	62
Şekil 15. <i>Smad3</i> 'ün 2. Ekzonunun baz dizilimi	63
Şekil 16 a-e. Bant paternlerine karşılık gelen dizi analizi sonuçları.	63-65
Şekil 17a,b. Exon 3'ün 170. kodonundaki A→G transisyonu	66
Şekil 18. İntron 2'nin Bme1390I enzim kesim polimorfizmi agaroz jel görüntüsü.....	67
Tablo 1. Osteoartritte risk faktörleri	16
Tablo 2. Kromozomlar üzerinde osteoartrit için aday bölgeler	21
Tablo 3. <i>Smad3</i> geninin amplifikasyonu için gerekli primerler ve amplifikasyon ürünlerinin uzunlukları	48
Tablo 4. <i>Smad3</i> geni ekzonları için PCR karışımları	48
Tablo 5. <i>Smad3</i> geni ekzonları için PCR Şartları	49
Tablo 6. Primer osteoartritli hastaların klinik özellikleri	56

Tablo 7. <i>Smad3</i> geninin 2. ekzonunun SSCP analizinde gözlenen bant paternlerinin bireylere göre dağılımı	60
Tablo 8. Bme1390I enzim kesimi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip dağılımı	67
Tablo 9. Bme1390I enzim kesimi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki allel frekansları	68
Tablo 10. Bme1390I enzim kesimi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip ve allel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı	69
Tablo11. Osteoartrit başlama yaşı ve Bme1390I polimorfizmi genotip ve allel frekansları	70
Tablo12. Kellgren Lawrence skalası ve Bme1390I polimorfizmi genotip ve allel frekansları	71
Tablo13. <i>Smad3</i> geninin 103.kodonunda tek nükleotid polimorfizm genotip frekanslarının çalışılan merkezlere göre dağılımı	79
Grafik 1. <i>Smad3</i> geninin 2. ekzonunun SSCP analizinde görünen bant paternleri ve birey sayıları	60
Grafik 2. İtron 2'nin 59. nükleotidindeki genotipler ve frekansları	68

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eklem kıkırdağının harabiyeti ile karakterize bir hastalık olan osteoartrit (OA), insanları etkileyen eklem hastalıklarından en yaygın olanıdır. Osteoartrit, birçok faktörün etkisiyle oluşan bir hastalıktır. Yaşlanma, genetik, hormonal ve mekanik faktörler hastalığın ilerlemesinde rol alan temel unsurlardır (1). Araştırmalar genetik etkenlerin, osteoartrit gelişimine katkısının fazla olduğunu göstermektedir. Farklı aday genlerle yapılan çalışmalarda ise bu genlerden bir kısmının osteoartrit ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (2).

Normal bir eklemden hasardan çok tamir gerçekleşmekle beraber osteoartritli eklemden başlangıçta esas olan yıkımdır. Proteoglikan matrikste değişiklikler sonucu, su içeriğinde ve kondrosit aktivitesinde artışın ardından kıkırdak fibrilasyona uğrar. Bu bölgenin darbeyi absorbe edici etkisi azalır ve kıkırdak yüzeyi pürüzlü ve düzensiz hale gelir. Daha sonra sürtünme artar, yüzey incilir ve kıkırdak büyük olasılıkla kemik yüzeye kadar yırtılır. Bu durumda eklem vaskülariteyi artırarak ve yüzeyi yeniden şekillendirerek kendisini onarmaya çalışır. Eklem bölgesinin kıkırdak ve kemik kenarlarında kondrositler ve osteofitler oluşmaya başlar. Eklemi çevreleyen kemikte deskleroze alanlar ve kemik kistleri gibi değişiklikler ortaya çıkar. Varolan kemiksi trabeküler yapıyı güçlendirmek için yeni kemik dokusunun oluşmasıyla skleroz görülür. Eklem kıkırdağının olmadığı yerlerde intra-artiküler basıncın artması sonucu kemik kistleri oluşur. Artan intra-artiküler basınç bu şekilde eklemi çevreleyen kemiğin iliğine iletilir. Basınç eşitlenene kadar kistler genişlemeye devam eder (3).

TGF- β (Transforming Growth Factor β) ailesi gelişimi çok yönlü kontrol eden ekstraselüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubunu oluşturur. Hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahip TGF- β ailesi, çok sayıda yapısal olarak benzer polipeptid büyüme faktörleri içerir. TGF- β ailesi, organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostasisinde ve onarımında çok önemli rol oynar. Bu faktörlerin tümü, hücre içi sinyallerin düzenlenmesinde önemli bir yer tutar

(4). TGF- β ailesi üyeleri, transmembran proteinlerden olan serin/treonin kinaz aktivitesine sahip TGF- β reseptör ailesine sinyal iletirler. TGF- β reseptörleri, yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre Tip I ve tip II olmak üzere ikiye ayrılır (5). Tip II reseptörün aracılık yaparak tip I reseptörü aktive etmesi TGF- β sinyallerinin başlamasına neden olur. Aktive olan tip I reseptör, hücre çekirdeğine sinyal taşıyan SMAD proteinlerini fosforlar ve aktive eder. SMAD ailesine ait proteinler, tip I reseptör kinazların tanımlanmış ilk substratlarıdır ve reseptör sinyallerinin hücre çekirdeği içindeki hedef genlere iletiminde merkezi bir rol oynarlar (6).

Yapısal ve fonksiyonel etkenler göz önünde tutulduğunda, SMAD'lar üç ayrı alt gruba ayrılırlar: (a) Reseptör ile regüle edilen SMAD'lar (R-Smadlar); TGF- β ailesi reseptör kinazlarının direkt substratlarıdır. (b) Common-partner SMADlar (Co-Smadlar); R-Smadlarla birleşerek sinyal iletimine katılan SMAD'lar, ve (c) İnhibitör SMAD'lar (I-Smadlar); diğer iki grubun sinyal fonksiyonunu inhibe eden antagonist SMAD'lardır (7). R-Smadlarda kendi içlerinde iki gruba ayrılır, bunlar; BMP (Bone Morphogenetic Protein) Smadlar ve TGF- β /aktivin Smadlar. BMP Smadlar, Smad 1 ve birbirine yakın homologlardan Smad 5 ve Smad 8; BMPR-I' in substratları ve BMP sinyallerin aracılarıdır. TGF- β /aktivin Smadlar ise Smad 2 ve 3; T β R-I' in substratları ayrıca TGF- β ve aktivin sinyallerinin aracılarıdır. Memeli epitel hücrelerinde Smad 2 ve 3, gelişimin inhibisyonuna ve haberci genlerden TGF- β ve aktivinin transkripsiyonunun aktivasyonuna aracılık ederler (8, 9).

R-Smadlar sinyal iletimi görevlerini yerine getirmek için diğer bir SMAD'a ihtiyaç duyarlar. Omurgalılarda, bu grubun üyelerinden bilineni Co-Smadlar grubuna dahil Smad4 dür. Reseptör regüle eden SMAD'lar, benzer reseptörler tarafından fosforile olduğu zaman Smad4' le birleşirler (4, 8). Smad4, yapısı itibari ile R-Smadlarla benzer olmasına rağmen, agonistlerinden gelen yanıt ile normal olarak fosforile olamaz. Memeli hücrelerinde Smad2 veya 3'e bağlı gelişimi inhibe eden bir yanıt için Smad4 gereklidir. Ayrıca Smad4, TGF- β , aktivin ve BMP sinyal iletim yollarının da bir üyesidir (4).

İnsan Smad' larından 6 ve 7, SMAD' lardan yapısal olarak ayrı olan diğer bir alt gruptur ve inhibitör SMAD' lar olarak adlandırılırlar. Bilinen tek aktivitesi, R-Smadların sinyal fonksiyonunu inhibe etmesidir. Smad6 BMP sinyallerini inhibe ederken Smad7, TGF- β ve BMP sinyallerinin her ikisini inhibe edebilir (4, 7).

SMAD' lar serbest halde homo-oligomerler olarak bulunurlar. Reseptör kompleks ligandın bağlanmasıyla aktive olduktan sonra, tip I reseptör kinazlar spesifik SMAD' ları fosforile eder, fosforile olan SMAD' lar Smad4 ile birleşerek hücre çekirdeğine taşınırlar. Bu kompleksler çekirdek içinde yalnız veya DNA-bağlanma altbirimi ile birleşik halde bulunabilir ve spesifik promotör elemanlarına bağlanarak hedef genleri aktive eder (4, 7).

TGF- β ailesinin, kondrosit büyüme ve farklılaşmasında anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir (10). TGF- β ' lar çok farklı hücre tiplerinde üretilmesine rağmen kemikteki konsantrasyonları diğer dokulardan 100 kat daha fazladır, ve osteoblastlar yüksek konsantrasyonlarda TGF- β reseptörleri içerirler (11). TGF- β , inaktif öncül form olarak sentezlendiği için Latency-Associated Peptid'e (LAP) bağlı olarak bulunur. Eklem kıkırdığı da büyük miktarlarda latent TGF- β içerir (12, 13). Normal fizyolojik şartlarda kıkırdak içinde çok az miktarlarda plazminojen ve/veya plazminin yanında aktif TGF- β 1 bulunur. Patolojik durumlarda ise, örneğin kırıklarda, kondroprogenitör hücreler yüksek konsantrasyonlarda plazmine maruz kalır, kısa bir zaman aralığında da yüksek konsantrasyonlarda TGF- β 1 gözlenir (12).

TGF- β ailesi, proliferasyonu, eklem kondrositlerinde hücre dışı matriksi ve/veya farklılaşmasını kontrol eder. TGF- β tip I ve tip II reseptörlerinin etkileşiminin stratejik olarak aksaması, TGF- β ' ya gidecek spesifik hücresel yanıtı da değiştirebilir (14). Herhangi bir aksama olmaz ise tip I ve tip II reseptörlerinin etkileşimi ve Smad' lar aracılığı ile sinyal iletilir. Kıkırdakta proliferen olan kondrositlerde *Smad2*' nin ekspresyonu fazla olurken, *Smad3*' ün genelde olgunlaşan kondrositlerde eksprese olduğu görülmüştür. Smad4 genel olarak epifiziyal plağın bütün bölgelerinde eksprese olur ve inhibitör Smad' lar 6 ve 7, olgun kondrositleri bulunduran bütün kıkırdak bölgelerinde kuvvetli bir şekilde

ekspresse olur. Ayrıca TGF- β /Smad3 sinyalleri, kondrositlerin terminal hipertrofik farklılaşmasını inhibe eder ve eklem kıkırdağının bütünlüğünün korunması için gereklidir (15). Osteoartritli hastalarla yapılan mutasyon çalışmasında bir hastada *Smad3* gen mutasyonu tespit edilmiş ve *Smad3* genindeki mutasyonun insanda OA'e yatkınlık oluşturabilecek olası bir faktör olabileceği bildirilmiştir (1).

Bu çalışmanın temel amacı, daha çok kanser çalışmalarında araştırılan *Smad3* genindeki mutasyon veya polimorfik değişimlerin OA patogenezi ile ilişkisinin olup olmadığını araştırmaktır. Yaptığımız literatür araştırmalarında, Türkiye'de *Smad3* ile ilgili yapılmış çalışmaya rastlamadık, bu nedenle *Smad3* genindeki mutasyon veya polimorfizimlerin, Türk popülasyonu frekanslarının belirlenmesinde önemli olacağını düşünmekteyiz.

Ayrıca, bu tez çalışması Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji laboratuvarının alt yapısının oluşturulmasına katkıda bulunmuş ve mutasyon tarama yöntemlerinin uygulanabilmesine imkan sağlamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kural olarak kromozomlar ve üzerinde lokalize olan genler nesilden nesile değişmeden aktarılır. Böylece kalıtım materyali değişmeden, ancak zigotta yeni kombinasyonlarla, nesiller boyunca korunmuş olur. Bu kurala rağmen zaman zaman kalıtım materyalinde “mutasyon” olarak tanımlanan kalıcı değişiklikler meydana gelebilir (16). Mutasyon, nükleotid dizisindeki bir değişiklik veya genomik DNA’daki yeni bir yapılanma anlamına gelmektedir. DNA’nın yapısı daimi olarak değişir ve bu değişiklik hücre bölünmesi ile anne hücreden yavru hücrelere aktarılır.

Bir genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine allel adı verilir. Alleller yaygın olduğu zaman genel popülasyonun kromozomlarında %1’den daha fazla bulunur; bunlar da genetik polimorfizm olarak adlandırılır. Aksine, alleller %1’den daha az sıklıkta ise, nadir değişimler olarak adlandırılırlar ve zararlı mutasyonların birçoğu nadir değişimlerdir (17).

Mutasyonlar üreme hücrelerinde ve somatik hücrelerde gerçekleşebilirler. Sadece gametleri oluşturan üreme hücrelerinde gerçekleşen mutasyonlar bir jenerasyondan diğerine aktarılır ve kalıtsal bir hastalığın temelini oluşturabilir. Üreme hücrelerinde görülen mutasyonların yanı sıra somatik hücrelerde oluşan mutasyonlar da tıbben önemlidir. Mutasyonların çoğunluğu, somatik bölünme ile tek bir zigottan 10^{13} hücrenin oluşması esnasında gerçekleşir.

Mutasyonların, yararlı etkilerinin yanında zararlı etkileri de vardır. Mutasyonlar hayatın devamlılığı için, türlerin değişerek çevrelerine uyum sağlamalarına imkan veren varyasyonları oluştururlar. Diğer taraftan birçok kalıtsal hastalık genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Deri ve akciğer kanseri gibi hastalıklar da DNA mutasyonlarına sebep oldukları bilinen çevresel faktörlerin etkisi altında oluşur (18). Mutasyonlar üç gruba ayrılır; kromozom mutasyonları kromozom yapısındaki, genom mutasyonları kromozom sayısındaki değişiklikleri ifade eder. Tek gen mutasyonları ise tek bir gen içerisinde DNA’nın yapısında meydana gelen küçük değişikliklerdir.

2.1. Tek Gen Mutasyonları

Tek gen mutasyonu, bir gen içerisindeki DNA sekansının daimi değişimi ile oluşur ve bu değişiklik bir veya birden fazla nükleotidin bu sekansa ilave edilmesi veya çıkarılması ile gerçekleşir. *Nokta mutasyon (point mutation)*, DNA'da tek bir baz çiftinin değişmesi ile oluşan mutasyondur. Bunun yanı sıra mutasyonlar bir veya daha fazla baz çiftinin artması ve azalması yani *insersiyon* ve *delesyon* olayları ile de gerçekleşebilir. *Trinükleotid tekrar artışları* da yine genetik hastalıklara sebebiyet verebilen değişikliklerdir.

2.1.1. Nokta Mutasyonları

Nokta mutasyonları aynı zamanda *baz substitüsyonu* olarak da adlandırılmaktadır. Yer değiştirme olayına katılan bazlar dikkate alındığında, bir pirimidin bazının diğer bir pirimidinle (C↔T) veya pürin bazının diğer bir pürinle (A↔G) yer değiştirmesi olayı *transisyon* olarak ifade edilmektedir. Bu tip mutasyonlar *transversiyon* olarak adlandırılan ve bir pürin bazı ile bir pirimidin bazının yer değiştirmesini ifade eden mutasyonlardan daha yaygın görülürler.

Bir yapısal genin kodlama bölgesinde oluşan herhangi bir mutasyon bu gen tarafından kodlanan polipeptid zincirindeki aminoasit sekansı üzerinde değişik etkiler meydana getirir. Nokta mutasyonları, genlerin fonksiyonlarını engelleme veya ürünün fonksiyonunu bozma mekanizmalarına göre dört gruba ayrılır.

2.1.1.1. Sessiz Mutasyonlar (silent mutation)

Baz dizisindeki her nükleotid değişimi kodlanan protein üzerinde bir aminoasit değişimine neden olmaz. Bu tip mutasyonlarda değişikliğe uğrayan baz çifti yine aynı aminoaside karşılık gelen farklı bir kodonun oluşmasına neden olur ve sonuçta aminoasit sekansı değişmeden kalır. Sessiz mutasyonlar kodlama bölgelerindeki mutasyonların %23'üne karşılık gelmektedir.

2.1.1.2. Yanlış Anlamalı Mutasyonlar (missense mutation)

DNA dizisindeki tek bir nükleotid değişikliği bazların triplet yapısındaki kodu değiştirerek gen ürününde bir aminoasidin yerine diğerinin geçmesine neden olur. Bu tip mutasyonlar genin kodlanan bölümünde anlam değişikliğine yol açarak farklı bir aminoasidin polipeptid zincirinde yer almasına neden olur. Yanlış anlamalı mutasyonlar kodlama bölgelerindeki mutasyonların %73'ünü oluşturur.

2.1.1.3. Anlamsız Mutasyonlar (nonsense, chain termination mutation)

Normalde mRNA'nın translasyonu terminasyon kodonlarından (UAG, UGA ve UAA) birine ulaşıldığında biter. Terminasyon kodonu oluşturan mutasyonlar translasyonun prematüre olarak tamamlanmasına, terminasyon kodonunu ortadan kaldıran mutasyonlar ise translasyonun bir sonraki terminasyon kodonuna kadar devam etmesine neden olurlar. Eğer bir mutasyon üç "stop" kodonundan herhangi birinin oluşmasına neden oluyorsa anlamsız mutasyon olarak ifade edilir. Genelde bu mutasyonların transkripsiyon üzerine etkisi yoktur fakat kesilmiş translasyon ürünü Şekil ve fonksiyonel olarak anormal ve aynı zamanda da dayanıksız olur. Anlamsız mutasyonlar kodlama bölgelerindeki mutasyonların %4'ünü teŐkil eder.

2.1.1.4. RNA Splays Mutasyonları (RNA splicing mutation)

Transkripsiyon sonucunda sentezlenen iŐlenmemiŐ RNA "heterojen nuklear RNA (hnRNA)" olarak tanımlanır. RNA splicing mekanizması, hnRNA'dan intronların çıkarılarak ekzonların bir araya gelip bağlanmasıyla mRNA'nın oluşturulması Şeklinde gerçekleşir. Bu olayda intron/ekzon (akseptör tarafı) ve ekzon/intron (donor tarafı) hududunda spesifik nükleotid dizileri görev alır. RNA iŐlenmesi mutasyonları sonucunda alternatif donor veya akseptör taraflar ortaya çıkar ve bunlar RNA'nın iŐlenmesinde normal bölgelerle yarışır.

2.1.2. Delesyonlar ve İnsersiyonlar

2.1.2.1. Çerçeve Kayması Mutasyonları (frameshift mutation)

Delesyon veya insersiyonlar sadece birkaç baz çiftini kapsayabilirler. DNA zincirine katılan veya zincirden ayrılan bazların sayısı 3'ün katları olmadığında kodlama dizisindeki mutasyon, translasyondaki okuma çerçevesini mutasyonun olduğu noktadan itibaren karboksil ucuna kadar değiştirir. Bu tip mutasyonlar *çerçeve kayması mutasyonları* olarak adlandırılır. Bu mutasyonlar peptit zincirinin aminoasit dizisini büyük ölçüde değiştirmekle birlikte zincirin erken aşamada sonlanmasına da neden olabilir. Üç veya üçün katları şeklinde olan delesyon ve insersiyonlar ise yalnız mutasyonun olduğu bölgede aminoasit kaybına veya ilavesine neden olarak peptit zincirinin bir kısmını etkiler. Özellikle insersiyonlar önemli çerçeve kayması mutasyonlarına neden olur.

2.1.2.2. Büyük Delesyon ve İnsersiyonlar

Bir genin tamamını veya ardışık olan bir grup geni etkileyen delesyon veya insersiyonlardır. Büyük delesyonlar bir genin kodlayan kısmının tamamını ortadan kaldırabilir ve iki genin birleşerek füzyon protein oluşturmasına neden olabilir.

2.1.3. Trinükleotid Tekrar Artışları

Trinükleotid tekrar dizilerindeki tekrar sayılarının artması ile karakterize mutasyon mekanizmasıdır. Bu tür mutasyonların hastalığa neden olma mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte transkripsiyonu engellediği veya fonksiyonunu kaybetmiş proteinlerin sentezlenmesine neden olduğu ifade edilmiştir. Fragile-X sendromu, Kennedy's ve Huntigton hastalığı gibi kalıtsal hastalıklar trinükleotid tekrarların artışı sonucu ortaya çıkmaktadır (18).

2.2. Mutasyon Tarama Yöntemleri

Kalıtsal hastalıkların prenatal ya da postnatal tanısı, veya populasyonda taşıyıcı taraması yapılarak hastalıkların önüne geçilmesi, aileye ve bireye verilen hem maddi, manevi hasarın önlenmesinde hem de topluluklar için gen frekanslarının belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Tanıyı kolaylaştırmak için bugüne kadar, pek çok mutasyon tarama yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemler, süre, pratik uygulanabilirlik, maliyet gibi özellikleri göz önünde tutularak kullanılır (19).

Küçük delesyonlar, insersiyonlar ve nokta mutasyonları için tek zincir konformasyon polimorfizm analizi (SSCP) (20), heterodubleks analizi (HA) (21), denatüre edici jel elektroforezi (DGGE) (22), restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP), allel spesifik amplifikasyon (ASA) (23) ve DNA dizi analizi gibi çeşitli mutasyon tarama teknikleri tanımlanmıştır. Mutasyon taraması için kullanılacak, metodun seçiminde gözönüne alınabilecek başlıca kriterler şunlardır; hangi tip biyolojik materyalin kullanılacağı, hangi tip nükleik asitin analiz edileceği, saptanacak mutasyonun daha önceden bilinip bilinmediği, saptanacak potansiyel mutasyonların ne kadar fazla olduğu, kullanılacak metodun ne kadar güvenilir olduğu ve ne ölçüde standardize edilebileceği, testin nasıl uygulanacağı, rutin tanı için uygun olup olmadığı, testin maliyeti ve kalite değerlendirmesi (19) .

2.2.1. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP)

Tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP) analizi, bilinmeyen mutasyonların saptanması için kullanılan polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) bağlı bir mutasyon tarama yöntemidir. Bu yöntem nokta mutasyonlarının yanısıra küçük insersiyon ve delesyon mutasyonlarının saptanmasında tercih edilmektedir. Özellikle gen dizisi büyük olan proteinlerde dizi analizi yapılacak bölgeyi önceden saptamak amacı ile genin taranmasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir ve DNA dizi analizine iyi bir alternatiftir. Mutasyon saptama

oranı %80 ile %90 arasında değişmektedir. Bu analiz restriksiyon enzim analizini, blotting'i, proplar ile hibridizasyonu gerektirmediğinden hızlı ve pratik bir yöntemdir.

Bu yöntemde PCR ürünleri denatüre edilir ve denatüre edici olmayan poliakrilamid jelle uygulanır. Denatüre edilerek tek zincir haline getirilmiş DNA'ların zincir içi zayıf bağlarla kazandıkları yeni ikincil yapıları mutasyon sonucu değişebilir. Mutasyon sonucu oluşan bu ikincil yapıda oluşan konformasyon farkı o bölgenin elektroforezdeki hareketinde normal kontrol ile karşılaştırıldığında bir kaymaya, farklılığa neden olur. SSCP analizi genellikle tek iplikli DNA'daki konformasyon değişikliklerinden yararlanılarak mutasyonun varlığını tahmin etmekte kullanılmaktadır. Çift iplikli DNA'daki değişiklikleri göstermeyen bir yöntemdir.

Her SSCP analizi için optimal koşulların belirlenmesi gerekir. Analiz edilecek DNA parçasının büyüklüğü, jelin özellikleri (kullanılan poliakrilamid ile gliserol konsantrasyonu, denatüran ajan varlığı), elektroforez sırasında tercih edilen sıcaklık, elektroforez zamanı, PCR ürünlerinin denatürasyon yöntemi, mutasyonun tipi ve bulunduğu yer performansı etkiler.

SSCP analizinde en iyi sonuç, DNA 150-200 baz çifti uzunluğunda olduğu zaman elde edilir. Uzunluğu 150 baz çifti altında olan DNA fragmanlarında ikincil yapının oluşmasındaki güçlük nedeni ile SSCP analizinin duyarlılığı azalmaktadır. 200 baz çifti üzeri büyüklüğe sahip DNA'larda ise tek baz değişikliği ile daha az konformasyon değişikliği oluşacağı için bunun jelle görünmesi güçleşmekte ve büyük parçaların analizinde tespit edilen mutasyonların sayısı düşmektedir. Tek zincirli DNA'nın konformasyonu sıcaklığa hassastır. 17°C nin altı ve 23°C üzerindeki sıcaklıklar tek zincirli DNA'nın yarı stabil şekillerini bozabilmektedir. En iyi rezolüsyonu elde edebilmek için en çok tercih edilen oda sıcaklığıdır. Elektroforez sırasında jellerin ısıtılması önlenmelidir. 5V/cm voltajda 4W da ortalama 22°C de elektroforez yapıldığında jel fazla ısınmamakta ve jelin ısınma miktarı önemsiz olmaktadır. İçinden sıvı sirkülasyonu olan elektroforez sistemleri pahalı olmakla birlikte sıcaklığı

standardize ettikleri için uygun sistemlerdir. İyi bir sonuç için yeterli hava konveksiyonu da gereklidir.

SSCP analizinde DNA parçalarını ayırmak için sıklıkla kullanılan matriks akrilamiddir. Akrilamid/bisakrilamid oranı, toplam akrilamid ve gliserol yüzdesi, tampon içeriği jelin ayırma özelliğini belirler, en fazla tercih edileni, düşük çapraz bağlayıcı oranı ve %10 gliseroldür. Bazı SSCP'ler için yüksek yüzdeli jellerin kullanılması önerilmiştir. TEMED ve APS ile polimerize edilmiş, akrilamid benzeri hidrolink isimli jelin tek bir tipte gözenek büyüklüğüne sahip olduğu ve akrilamidden daha iyi rezolüsyon sağladığı belirtilmiştir. Yüksek rezolüsyon için ticari olarak bir çok özel jel matriksleri mevcuttur.

Şimdiye kadar rapor edilmiş jel uzunlukları 5-50 cm arasında değişmektedir. SSCP analizinde sonuçlar görsel değerlendirildiğinden iyi bir rezolüsyonun sağlanabilmesi için jelin boyutlarının uzun olması (yaklaşık 30x40 cm), elektroforez işlemlerinin düşük voltajda, uzun sürede yapılması ve ince bir jelin kullanılması gereklidir. Son yıllarda yapılan bir çok uygulamada standart sekans jelleri yerine mini jeller kullanılmıştır. Kısa jellerde keskin bant farklılıklarının gözlemlendiği bildirildiği halde %0,5 lik kayma farklılığının gözlenebilmesi için uzun elektroforezler tercih edilmelidir.

SSCP analizi için PCR ürünlerinin temiz ve spesifik olması gereklidir. Spesifik olmayan PCR ürünleri, kullanılmamış primerlerin varlığı, PCR siklus sayısının fazlalığı yanlış yorumlanabilecek bantlara neden olabilir. Genel olarak PCR ürünleri 96 °C de ısıtılarak denatüre edilir. Tek zincir haline gelmiş DNA lar hemen buz üzerine alınır ve hızla jele uygulanır. Örneğe güçlü denatüranların eklenmesi veya örneklerin 10-30 kat seyreltilmesi tek zincirlerin kendi kendine çift zincir oluşturmalarını en aza indirir. Denatüran olarak formamid, sodyum hidroksit, üre ve metil merkürük hidroksit kullanılabilir. Metil merkürük hidroksit toksiktir ama en etkili denatürandır. Özellikle ince jeller kullanıldığında denatüre edilmiş dilüe PCR ürünleri jele uygulandıkları noktada konsantre olurlar ve bir miktar renatürasyon gerçekleşir. Bu nedenle her zaman çift zincir DNA bantları tek zincir DNA bantlarından daha güçlü gözlenir. Tek zincir DNA bantlarının

daha iyi gözlenebilmesi için DNA'nın mümkün olduğunca sulandırılması gerekir. İnce jeller kullanıldığında tek zincir DNA'ların gözlenmesinde radyoaktif işaretleme, gümüş boyama ve etidyum bromide üstünlük sağlar.

Mutasyonun tipi ve bulunduğu yer SSCP analizinin duyarlılığını etkilemektedir. Mutasyon ikincil yapıya katılıyorsa SSCP analizinde mutasyon kolaylıkla saptanabilecektir. Eğer mutasyonun ikincil yapıyı oluşturmada rolü yoksa, mutasyon saptanmayabilir. Pürin içeriğinin daha fazla olduğu DNA tek zinciri jelde daha hızlı yürümekte ve daha belirgin değişiklikler göstermektedir. Guaninin Timine transversiyonu haricinde herhangi tip baz değişikliğinin sensitivite üzerine belirgin etkisi yoktur. Bir dizide heterozigot olarak bir değişim bulunuyorsa, bu dizinin SSCP analizi sonucunda dört farklı tek zincir DNA bandı oluşumu beklenir. Bunlar; normal allelin anlamlı ve anlamsız dizileri, ve mutant allelin anlamlı ve anlamsız dizileridir.

SSCP analizi özel bir ekipmana ihtiyaç göstermeyen bir yöntem olduğu için basit ve hızlı bir tarama yöntemidir. SSCP analizinde mobilite farklılıkları görsel olarak değerlendirilir. Bu yüzden standardizasyonu kısıtlı ve otomasyona geçirilmesi de zordur. Optimal koşullar büyük oranda ampirik olarak tanımlanmıştır. Bir fragmanın farklı koşullarda analiz edilmesi mutasyonların tespit edilebilme olasılığını artırır (19, 20, 24).

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu / Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PCR/RFLP)

PCR/RFLP yöntemi ile mutasyonun araştırılacağı gen bölgesi, mutasyonu içine alacak şekilde çoğaltılır. Uzunluğunu bildiğimiz genomik DNA parçası, bakılacak mutasyona özgü olan restriksiyon endonukleaz enzimi yardımıyla kesilir. Kesilen genomik DNA, parçalarının büyüklüğüne göre agaroz ya da poliakrilamid jelde elektroforez işlemi ile yürütülür. Jel tercih edilen yöntemle bağlı olarak, hazırlanmadan önce veya elektroforezden sonra etidyum bromür ile boyanıp ardından ultra viyole (UV) ışıkta görüntülenir. Kesim noktalarına göre

uzunlukları önceden bilinen parçalar değerlendirilerek mutasyonların varlığı ya da yokluğuna karar verilir.

Değerlendirme şu şekilde yapılır; hedef gen bölgesindeki nokta mutasyon, çoğaltılan DNA'da seçilen restriksiyon enziminin tanıma bölgesine özgülse mutasyonlu üründe kesim gerçekleşirken normal üründe kesim gerçekleşmez. Böylece kesilen ürünlere sahip bireyler mutasyonlu diğerleri normaldir. Tam tersine restriksiyon enziminin tanıma bölgesi mutasyona özgül değil de normal olan ürüne özgül ise kesim normallerde gerçekleşir, mutasyon olanlarda kesim gerçekleşmez. Değerlendirme, kesim olan ürünlere sahip bireyler normal, olmayanlar ise mutasyonludur şeklinde yapılır (25).

2.2.3. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi DNA'nin nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. Nükleotid dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik geliştirilmiştir. Bunlar Maxam-Gilbert kimyasal degradasyon yöntemi ile Sanger'in dideoksi enzimatik yöntemidir. Her iki yöntemin de dizi analizi yapılacak DNA'nın hazırlanması, reaksiyonlar ve yüksek voltaj jel elektroforezi olmak üzere üç ana aşaması bulunmaktadır.

a. Maxam-Gilbert Yöntemi: DNA parçası bir ucundan P32 ile işaretlenir. Bu işaretlenen DNA parçası dört örnek olarak bölünür. Her örneğe, DNA'daki bazlardan birisini tahrip edecek şekilde bir kimyasal madde eklenir. Daha sonra, piperidine kullanılarak, hasarlanmış nükleotidlerin bulunduğu yerlerden DNA yapısı fosfodiester bağlarından kırılır. Böylece P32 ile işaretlenmiş kısıklı-uzunlu parçalar elde edilmiş olur. Daha sonra elektroforez ve otoradyografi ile sonuç alınır.

b. Sanger DNA dizi analiz yöntemi: En sık kullanılan Sanger'in yöntemi olup, asimetric amplifikasyon ile elde edilmiş tek iplikçikli DNA; DNA Polimeraz enzimi ile ddNTP ve biri radyoaktif olarak işaretlenmiş dNTP kullanılır. Ortama radyoaktif P32, S35 veya P33 eklenir. İşaretleme primerlere yapılabileceği gibi,

ortama eklenen dNTP'lerden birisinin radyoaktif olması yeterlidir. Burada en önemli nokta Dideoksinükleotidlerin (ddTTP, ddCTP, ddGTP, ddATP) eklenmesidir. 2',3' Dideoksinukleosidtrifosfat' ların (ddTTP, ddCTP, ddGTP, ddATP), klasik dNTP'lerden farklılığı deoksiribozun 3' noktasında hidroksil grubunun bulunmamasıdır. Büyüyen/sentezlenen DNA zincirine, DNA polimerazlar aracılığı ile bağlanabilirler. Bu bağlanma 5' trifosfat grupları aracılığı ile olur. Fakat, 3' hidroksil grubunun olmaması nedeniyle, ardından gelen dNTP'ler ile fosfodiester bağının oluşması engellenir. Doğal olarak DNA zincirinin daha fazla uzaması imkansız hale gelir. ddNTP ile klasik dört dNTP bir reaksiyon karışımının içine konduğunda, DNA zincir uzaması için aralarında bir yarış olur, seyrek fakat spesifik sonlanmalar oluşur. Bu reaksiyon sonucunda, primer sonundan başlayıp; prematüre sonlanmaların olduğu bölgeler kadar uzunluktaki DNA parçaları ortaya çıkar. Dört farklı enzimatik reaksiyonda, dört farklı ddNTP kullanılarak (A,C,G,T için) birer reaksiyon elde edilir.

DNA dizi analizi süreci, tek iplikçikli DNA parçalarının hazırlanması; DNA dizi analizi tekniğinin uygulanması; DNA dizilerinin okunması-değerlendirilmesi ve ispatlayıcı tekrarlar biçimindedir. Eger dikkatli yapılırsa hata oranı %0.1'in altındadır. Bu hata oranına ulaşmak için; hedef DNA'nın her iki zincirine dizi analizi yapmak gereklidir (26, 27).

2.3. OSTEOARTRİT

2.3.1. Etyoloji ve Epidemiyoloji

Osteoartrit (OA) insanoğlunu binlerce yıldır etkileyen bir hastalıktır. Neolitik döneme kadar varan eski tarihlere ait iskelet kalıntılarında dahi OA bulgularına rastlanmıştır. Osteoartrit insanlarla sınırlı olmayıp özellikle köpekler ve atlar olmak üzere evcil hayvanlarda da birçok probleme yol açar (3). Dejeneratif eklem hastalığı olarak da anılan OA, eklem kıkırdağında progresif kayıp ve subkondral kemikte, eklemlerin kenarlarında reaktif değişiklikler ile karakterize romatizmal bir hastalıktır (28).

Osteoartritin eklem etki eden bir dizi farklı etken veya hastalığın son ürünü olduğu düşünülmektedir. Bütün eklemleri etkileyebilmesine rağmen en fazla etkilenen eklemler dizler, distal interfalangeal eklemler, başparmağın kökü, kalça ve omurganın faset eklemleridir. Kalça hariç bütün eklemlerde OA, kadınlarda erkeklere oranla daha sık görülür. Kalçada oran her iki cinsiyette de aynıdır (3).

2.3.2. Osteoartritin Sınıflandırılması

Halen çok iyi bir sınıflandırma sistemi olmamasına rağmen osteoartrit, çoğunlukla aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır.

- Tutulan eklem sayısı (örn. monoartiküler veya poliartiküler)
- Etiyoloji:
 1. primer- saptanmış bir neden yok
 2. sekonder- konjenital anomali veya travma öyküsü
- Klinik ve radyografik tablo (örn. İnflamatuvar, eroziv, kristal depolanması ve diğerleri)

Osteoartritin bir dizi sık görülen tablosu vardır. En sık görülenlerden biri orta-ileri yaşta bayanlarda diz ve ellerde görülen şeklidir. Heberden nodülleri ile

karakterize nodal OA, distal interfalangeal eklemlerde (DİP) görülür ve toplumda sıklığı en yüksek OA çeşididir. Genç erkeklerde sıklıkla kalçada görülen ve çoğunlukla displazi (düzensiz büyüme) ile ilişkili olan tek eklem osteoartriti görülür. Orta yaştaki erkeklerde ise daha çok diz osteoartriti görülür. Özellikle yaşlı hasta bayanlarda başta omuzlar, dizler ve kalçalar olmak üzere çok sayıda eklemi tutan şiddetli bir formu da görülebilir. Bu hastalar önemli derecede ağrı çekebilirler ve eklemlerinde sıklıkla apatit kristalleri içeren büyük efüzyonlar gelişebilir. Bu durum eklem etrafında kemik harabiyetinin yanında yumuşak doku hasarı ve kıkırdak kaybına da yol açabilir (3).

2.3.3. Osteoartrit Neden ve Nasıl Gelişir?

Belirli eklemlerde osteoartrit gelişimi ile ilgili bazı risk faktörleri bilinmektedir, ancak birçok hastalıkta olduğu gibi risk faktörlerinin olması mutlaka OA gelişmesini gerektirmez. Aksine görünürde herhangi bir risk faktörü olmayan kişilerde de hastalık oluşabilir. OA'e genetik yatkınlığı olduğu düşünülen bazı bireylerde eklem aşırı yük binmesi gibi tetikleyici faktörler OA gelişmesine neden olabilir. Bu faktörlerden bazıları tablo 1' de sıralanmıştır (3).

Tablo1. Osteoartritte risk faktörleri

Genel risk faktörleri	Spesifik risk faktörleri-anormal yüklenme
Genetik yatkınlık	Travma: Kırık, ligaman hasarı, menisküs yırtıkları
Obezite	Displazi
Artan yaş	Çocukluk kalça problemleri: Perthes hastalığı, kalça çıkığı, femur epifiz kayması
Menopozal östrojen kaybı	Kalça patolojisi
Kötü beslenme	Bacak boyunda eşitsizlik
Cinsiyet	Hipermobilite
	Eğilme ve taşıma ile ilgili meslekler

Herhangi bir birey için osteoartrit gelişme riski, bireyin kişisel yatkınlığı ve lokal mekanik risk faktörlerinin çok faktörlü karışımından ibarettir. Özellikle bayanlarda nodal el osteoartritin gelişmesinde kuvvetli bir genetik etkinin söz konusu olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Toplumdaki “yaygın OA” için genetik etkinin varlığı ancak son zamanlarda saptanmıştır. Bu bulgu diz, kalça, omurga ve elde OA gelişiminde kuvvetli bir genetik etkinin olduğunu düşündürmektedir. Kesin genler bilinmemekle birlikte ilk planda klinikle olan ilişki çok kuvvetli bir risk faktörü olarak pozitif aile hikayesinin (anne, baba veya kardeşlerde) saptanmasıdır (2).

2.3.4. Osteoartritin Patofizyolojisi

Uzun yıllar boyunca osteoartrit, ilerleyen yaş ile birlikte eklem yüzeylerinin kaçınılmaz harabiyeti sonucu gelişen saf bir dejeneratif lezyon-kullanma ve aşınma hastalığı olarak kabul edildi. Fakat günümüzde, kıkırdaktaki bozulmayı rejenerasyonun izlediği dinamik bir durum olarak kabul edilmektedir. Normal eklemlerde hasardan çok tamir gerçekleşmektedir (3).

Başlangıçta, eklem kıkırdağında bozulma ve yıkım olayları gerçekleşir. Proteoglikan matrikste değişiklikler sonucu, su içeriğinde ve kondrosit aktivitesinde artma neticesi ile kıkırdak fibrilasyona uğrar. Bu bölgenin darbeye karşı direnci azalır, kıkırdak yüzeyi pürüzlü ve düzensiz hale gelir. Sonra sürtünme artar ve kıkırdak büyük olasılıkla kemik yüzeye kadar yırtılır. Eklem vaskülariteyi arttırarak ve yüzeyi yeniden şekillendirerek kendisini onarmaya çalışır. Eklem bölgesinin kıkırdak ve kemik kenarlarında kondrositler ve osteofitler oluşmaya başlar. Bu eklemde artikulasyon için uygun alanı artırma ve belki de eklem stabilitesini sağlama çabası olabilir. Eklemi çevreleyen kemikte deskleroze alanlar ve kemik kistleri gibi değişiklikler ortaya çıkar. Varolan kemiksi trabeküler yapıyı güçlendirmek için yeni kemik dokusunun oluşmasıyla skleroz ortaya çıkar. Eklem kıkırdağının olmadığı yerlerde intra-artiküler basıncın artması sonucu kemik kistleri oluşur. Artan intra-artiküler basınç bu

şekilde eklemi çevreleyen kemiğin iliğine iletilir. Basınç eşitlenene kadar kistler genişlemeye devam eder (3, 29, 30).

Rejeneratif değişiklikler ortaya çıkarken kırıkdağın yıkım ürünlerinden oluşan debris, kemik hidroksiapatit kristalleri gibi materyallerle birlikte eklem aralığında depolanır. Parçalı sinovit alanları ve sinoviyal sıvı viskozitesinin artması ile kendini gösteren, patolojik ve klinik olarak enflamatuvar bir yanıtı neden olabilir. Bu enflamatuvar yanıt daha fazla doku yıkımına neden olabilir, sonuçta eklemde effüzyon gelişerek intra-artiküler basıncın yükselmesine neden olur. Bunun sonucu olarak eklem kapsülünde gerginlik ve kalınlaşma ortaya çıkar.

Sinoviyal sıvının OA patofizyolojisinde henüz çok iyi tanımlanmamış olsa da rolü vardır. Sinoviyal sıvı basit bir sıvı ya da yağ değildir. Biyolojik bir rolü vardır ve bütün besin maddelerinin taşınması için ortam görevi görür, sinoviyal membranla birlikte hormonal ve mesajcı işlevleri olabilir. Majör bileşeni, polimerize glikozaminoglikan olan hiyaluronandır. Normal bir eklemde moleküler ağırlığı fazladır. Bu moleküller sinoviyal sıvıya şok abzorbe edici ve lubrikan olarak rol oynamasını sağlayan bazı biyolojik özelliklerini verirler (3, 29, 30).

2.3.5. Osteoartritte Rol Oynayan Genetik Faktörler

Her ne kadar osteoartritin oluşumundaki çeşitli faktörler çok iyi tanımlansa da genetik faktörlerin bu hastalığın ortaya çıkmasında daha kuvvetli belirleyiciler oldukları bulunmuştur (2). OA'de rol oynayan genetik etkilere farklı kaynaklarda değinilmiş ve aile hikayesine dayanan epidemiyolojik çalışmalar, akraba ve ikiz çalışmaları, nadir genetik hastalıkların araştırılması esnasında farklı bulgular elde edilmiştir (2).

2.3.5.1. Aile Çalışmaları

Etyolojisi tamamen değerlendirilebilen OA, ilk olarak Stecher tarafından parmaklarda Heberden nodları bulunan ailelerde çalışılmıştır. Kellgren

tarafından İngiltere’de yapılan epidemiyolojik çalışmada ve Amerika’da yapılan bir diğer çalışmada, aile gruplarında el ve diz OA’i doğrulanmıştır (31, 32). Düşük prevalansından dolayı kalça osteoartritini aile topluluklarında çalışmak çok zordur. Bu nedenle son zamanlarda toplumsal tabanlı çalışmalarda kalça osteoartritine ait veriler yoktur. Buna rağmen hastalığın prevalansını araştırmak için çeşitli çalışmalar kurulmuş, total eklem değişikliği gerçekleşmiş hasta bireyin kardeşinin kontrole göre 2-3 kat daha fazla OA’e yakalanma riski taşıdığı belirtilmiştir (33-36). Lanyon ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise bu riskin 4.7 kat olduğu tespit edilmiştir (35).

2.3.5.2. İkiz Çalışmaları

Monozigotik (MZ) ve dizigotik (DZ) hasta ikizlerin karşılaştırılması ile yapılan çalışmalar, genetik faktörlerin etkilerini ve paylaşılan aile çevresini ayırmamıza olanak sağlar. MZ ikizler eş genlere sahiptir, herhangi bir varyasyon çevre şartlarına dayandırılmaktadır. DZ ikizler ise genlerin yaklaşık olarak yarısını paylaşırlar. Buna göre MZ ve DZ ikizlerde, genetik ve çevrenin katkılarını araştırmak mümkün hale gelmektedir (37). Klasik ikiz çalışmaları, popülasyonda herhangi bir hastalığın kalıtsal olup olmadığının belirlenmesinde kullanılan verimli bir yoldur (38). 48 - 70 yaş arası, el ve diz osteoartritli 120 dizigot ve 130 monozigot bayan ikizlerde yapılan klasik ikiz çalışmasında genetik ve çevresel faktörler değerlendirilmiş, bayanlarda el ve diz osteoartritinin radyografisinde çevresel ve demografik faktörlerden bağımsız olarak genetik faktörlerin etkisinin %39 ve 65 arasında olduğu gösterilmiştir (39). Çok miktarda ikiz örneklerle çalışılan bir diğer çalışmada kalçayı saran eklem boşluğunun daralmasının kalıtsal olduğu ve yaklaşık kalıtım oranının %60 olduğu bulunmuştur. Bu çalışmalarda elde edilen bulgular, omurga, diz, kalça ve el OA’nin değişik oranlarda kalıtsal olduğu yönündedir. Bu sonuçlara göre, toplumda OA’li hastaların en azından yarısının genetik faktörlerden etkilendiğini söyleyebiliriz (2).

2.3.5.3. Osteoartrit Kalıtımında Aday Genler

Bulgular osteoartritin büyük ölçüde kalıtsal bir hastalık olduğunu göstermiştir, bu noktadan sonra hangi genlerin bu hastalıkla ilişkili olduğu tartışılmaktadır. Kondrodisplaziler, spondyloepifizyal displazi ve kollajen II ve IX mutasyonları gibi OA'in oluştuğu kalıtsal hastalıklar ve bunlar için tanımlanan tek gen hasarlarının belirtildiği çalışmalardan ipuçları toplanmaktadır (40,41); aynı zamanda kalıtsal iskelet hastalıkları ile ilgili hayvan çalışmalarından (42); ve ailesel OA'e sahip nadir örneklerden de çeşitli ipuçları gelmektedir. Bazı aile çalışmalarında osteoartritden etkilenen bireylerde tip II prokollajen için COL2A1 geninde mutasyonlar gösterilmesine rağmen, bir diğer çalışmada OA'e sahip ailelerde hastalık lokusu ile ilişkisi olmadığı belirtilmiştir (43,44). Ailesel bir hastalık olan OA ile ilgili az miktarda ailesel çalışma yapılmış olmasından dolayı popülasyondaki genetik faktörlerin rolü etraflıca tartışılmamaktadır. Sonuçta, kollajen genindeki mutasyonların OA'in oluşumunda rol aldığına dair şimdilik elimizde çok az kanıt vardır (2).

Framingham çocuk çalışması verileri ile oluşturulan segregasyon analizi sonuçlarına göre doğal olarak hastalık gelişen bireylerin çocukları değerlendirilmiş, diz ve el OA'inde genetik katkının olduğu bulunmuştur (32).

Bağlantı çalışmaları, 2q, 9q, 11q, ve 16p kromozomları üzerindeki nicel özellik lokuslarını da (quantitative trait loci, QTL) aday kromozomal bölgeler arasına dahil etmiştir (tablo 2) (2). Bu kromozomlar üzerinde OA için aday genler normal kıkırdağın hücre dışı matriksinde bulunan molekülleri kodlarlar. Loughlin ve arkadaşları 481 ailenin bağlantı analizini kapsayan büyük bir çalışma yürütmüşlerdir, bu ailelerin her biri diz veya kalça eklemi ameliyatı geçiren ikizlerden birini içermektedir. Bu çalışmada ikiz bayanlar ve erkeklerin yanında karışık ikizler de kullanılmıştır. Elde edilen bilgilerin en başta anlamlı olmadığı fakat cinsiyete göre ayrıldığında kalça OA'ne sahip bayan deney grubunda tip IX kollajen genine (COL9A1) bağlantı olduğu tespit edilmiştir (2). Ondört aday genle yapılan linkaj analizlerinde en önemli on genden biri olarak tespit edilen

COL2A1 geninin ailesel kondrodizplazide rol oynadığı tespit edildiği gibi, bu genin OA'de de rol oynadığı görülmüştür. Buna ek olarak nodal OA'in, kollajen tip VI'nın α 3-zincirinin kodlandığı yer olan 2q23-35 kromozom bölgesi ile ilişkili olduğu açıkça gösterilmiştir (45). Osteoartrit ile ilişkili genler aşağıda verilmiştir;

- VDR (Vitamin D Reseptör geni)
- Col2A
- AGC1
- ER α (Östrojen reseptörü α geni)
- TGF β (Transforming Growth Factor- β geni)
- CRTM (Kıkırdak matriks proteini)
- CRTL (Kıkırdak ilişkili protein)
- A1ACT
- COL9A1
- COL11A1
- ANK

Tablo 2. Kromozomlar üzerinde osteoartrit için aday bölgeler (45).

Kromozom	Etkilenen Bölge	Fenotip
2q23-35	EI	Nodal OA
11q	Kalça, diz	Bayan OA
2q	Kalça, diz	Kalça OA
4q		Bayanlarda kalça OA
6p/6q		Kalça OA
11q		Bayan OA
16p/16q		Bayanlarda kalça OA
2q12-13		EI
4q26-27	DİP OA	
7p15-21	DİP OA	
X-cen	DİP OA	
4q35	Kalça	Kalça OA
6q-12-13	Kalça, diz	Bayanlarda kalça OA
6p21.3		Bayanlarda kalça OA
2q31	Kalça, diz	Ailesel kalça OA

2.4. TGF- β (Transforming Growth Factor β) AİLESİ

TGF- β (Transforming Growth Factor β) ailesi gelişimi çok yönlü kontrol eden ekstraselüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubunu oluşturur. Organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında çok önemli rol oynayan TGF- β ailesi, yapısal olarak ilişkili çok sayıda polipeptid büyüme faktörleri içerir, bunların her biri hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir (4).

TGF- β ailesi, hedef hücrenin uyarıya verdiği yanıtın çeşidine bağlı etkileri olan çok fonksiyonlu agonistlerdir. Örneğin, bu ailenin bir üyesi olan TGF- β 1, mezenşimal gelişimin düzenleyicisi olarak tanımlanmış ve bundan farklı olarak epitel hücrelerde antimitojen olduğu gözlenmiştir. Aktivinler, hipofiz fonksiyonunun hormonal düzenleyicileridir, bunun yanında kurbağalarda mezodermin oluşumuna katılırlar (4, 46).

TGF- β ve ilgili faktörler, iki tip reseptör olan serin/treonin protein kinazları bir araya getirerek gen ekspresyonunu düzenlerler. Bu kinazlardan biri diğerini fosforlar, fosforlanan kinaz SMAD proteinlerine dönüşür. SMAD'lar, hücre çekirdeği içine sinyal taşıyan ve özel olarak DNA'ya bağlanma kabiliyeti ile transkripsiyonel kompleks oluşturan orijinal bir protein ailesidir (4, 47). TGF- β ailesi üyeleri, transmembran protein ailesinden olan serin/treonin kinaz aktivitesine sahip TGF- β reseptörlerine sinyal iletirler. TGF- β reseptörleri, yapısal ve fonksiyonel özellikleri göz önünde tutularak Tip I ve tip II reseptörler olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır (5).

Protein kinaz bölgesinin hemen önünde çok iyi korunmuş 30 aminoasitlik bölge Tip I reseptörü diğerlerinden ayırır. Sahip olduğu SGGSGG dizileri nedeni ile bu bölge "GS bölgesi" olarak adlandırılır. GS bölgesi, tip 1 reseptör kinazların katalitik aktivitelerini veya substratlarla etkileşimini kontrol edebilen önemli bir düzenleyici bölgedir (48).

Tip I ve tip II reseptörlerin kinaz bölgeleri, serin/treonin protein kinaz bölgesinin dizileri ile uygunluk gösterir. Buna bağlı olarak, tip I reseptörler kendi substratlarını fosforlarken serin rezidüleri üzerinden SMAD proteinlerini fosforlar (49), tip II reseptörler ise kendilerini ve serin - treonin rezidüleri üzerindeki tip I reseptörleri fosforlar fakat tirozin rezidülerini fosforlamazlar (50).

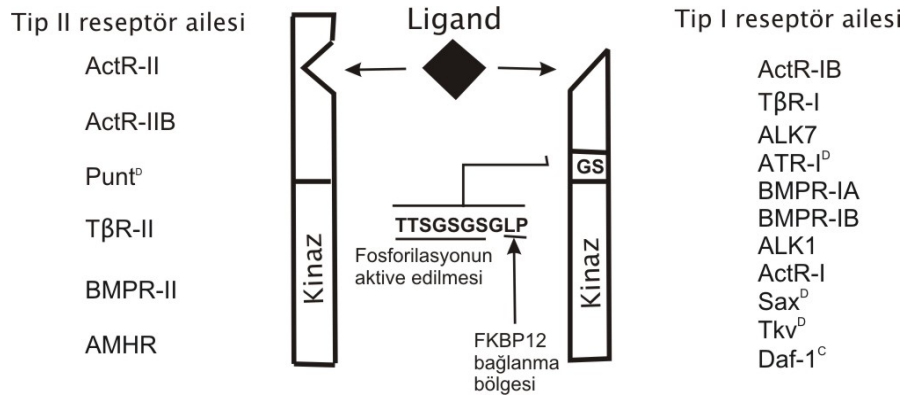
2.4.1. Reseptör Kompleks Oluşumu

TGF- β ve ilgili faktörler, tip I ve tip II reseptör çiftlerine bağlanır ve bunları birleştirerek sinyalin aktivasyonunu sağlarlar. Bilinen iki farklı ligand bağlanma çeşidi vardır. TGF- β ve aktivin reseptörleri için karakteristik olan birinci bağlanma ligandın tip II reseptöre direkt bağlanması ile gerçekleşir, daha sonra tip I reseptör ile bu kompleks (ligand-tip II reseptör) arasında etkileşim olur. Tip I reseptörler ligandı tanır ve tip II reseptöre bağlanır (51). İkinci bağlanma çeşidi ise BMP reseptörleri ve bu gruba dahil olanlar için tipiktir, tip I ve tip II BMP reseptörleri liganda beraber bağlanırlar (52). Öncelikle aktif, ligand-tip I / tip II reseptör kompleksi oluşur, tip II reseptör fosforilasyon ile tip I reseptörü aktive eder, daha sonra tip I reseptör sitoplazmadan hücre çekirdeğine sinyal ileten SMAD proteinlerini fosforlar (4, 6, 46).

Sinyaller, aktivatörü olan tip II reseptör (T β R-II) tarafından fosforlanmış TGF- β tip I reseptörlerinden (T β R-I) ortama verilir. Ligandın bağlanması tip I ve tip II reseptörlerinin heteromerik kompleks oluşturmasına yol açar (48, 53, 54). Ligandların dimerik yapısında, monomerlerden biri tip I reseptörlerden biri ile, diğer monomer ise tip II reseptörle birleşir, sonuçta heterotetramerik reseptör kompleksi oluşturulur (54). Bu kompleksin oluşması için sinyal gereklidir. T β R-I ve T β R-II kinazları içeren kimerik reseptörler farklı konfigürasyonlar oluşturabilirler, sinyal sadece tip I ve tip II reseptör kinazların bir araya gelmesiyle elde edilir (55).

Reseptör aktivasyonundaki en önemli basamak tetramerik reseptör kompleksin fosforilasyonudur. T β R-II deki belirli fosforilasyon bölgeleri reseptörün sinyal aktivitesini düzenler; Ser 213 ve Ser 409 un fosforilasyonu

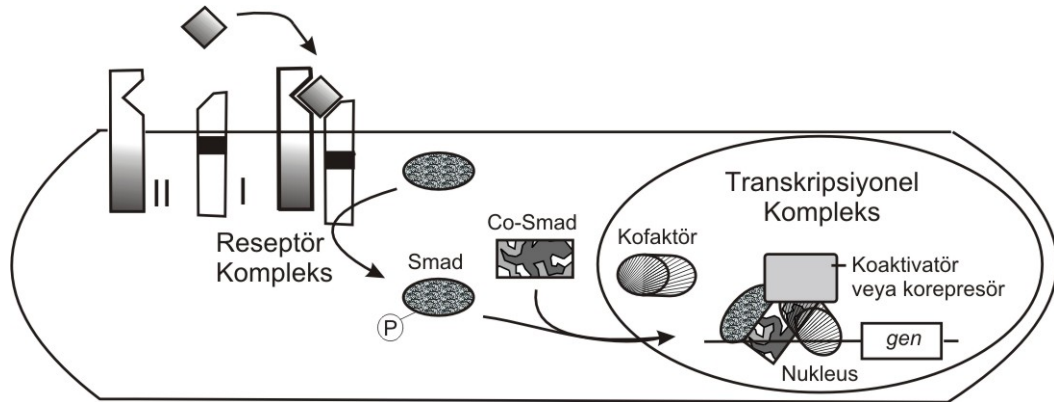
T β R-II aktivitesi için gereklidir, bunun yanında Ser 416'nın fosforilasyonu T β R-II sinyal iletimini inhibe eder (56). T β R-II ve aktivin tip IIB reseptörü özellikle tirozin rezidüleri üzerinde otofosforile olabildiği kadar serin ve treonin rezidüleri üzerinde de otofosforile olabilir, ve dolayısıyla çift özellikli kinazlar gibi fonksiyon görebilirler. T β R-I, T β R-II tarafından GS yapısı içindeki çeşitli rezidülerden fosforlanır, bu fosforlanma T β R-I kinazın aktivasyonunu sağlar (Şekil 1) (48). T β R-I, GS yapısının N-terminal bölümüne lokalize olmuş Ser 165 üzerinden fosforile olur. Ser 165'deki herhangi bir mutasyon tip I reseptörün daha güçlü sinyal vermesine yol açar, güçlü sinyallerde büyümenin inhibisyonunu ve matriks birikimini etkiler (6, 57).



Şekil 1. Tip I ve II TGF- β reseptör aileleri. Tip I reseptörde protein kinaz bölgesi GS bölgesinden önde gelir. T β R-I in karakteristik GS dizisi motifi üzerinde , fosforilasyon bölgesi ve FKBP12 bağlanma bölgesi. Omurgalılarıdaki üyeleri listelenmiştir. (Massague' J, 1998'den modifiye edilmiştir)

2.4.2. Reseptör Kompleksten Sinyal Akışı

Tip II reseptör aracılığı ile tip I reseptörün aktive edilmesi TGF- β sinyallerinin başlamasına neden olur. Aktive olan tip I reseptör, hücre çekirdeğine sinyal taşıyan SMAD proteinlerini fosforlar ve aktive eder. SMAD ailesine ait proteinler, tip I reseptör kinazların tanımlanmış ilk substratlarıdır ve reseptör sinyallerinin hücre çekirdeği içindeki hedef genlere iletiminde merkezi bir rol oynarlar (Şekil 2) (6).

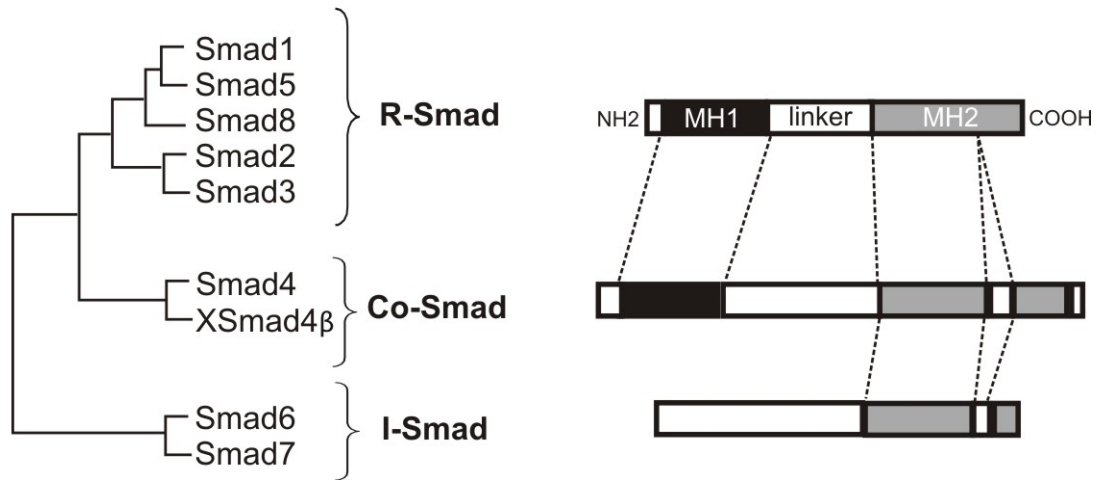


Şekil 2. SMADlar ile TGF- β sinyal iletimi: Temel sinyal mekanizması; Ligand reseptör kompleksle birleşir SMAD'ları fosforile eder ve SMADlar transkripsiyonel kompleksle birleşerek hedef genin sentezini kontrol ederler. (Heldin et al., 1997'den modifiye edilmiştir)

2.4.2.1. SMAD Alt Grupları ve Fonksiyonları

Yapısal ve fonksiyonel etkenler göz önünde tutulduğunda, SMAD'lar üç alt gruba ayrılır: (a) Reseptör ile regüle edilen SMAD'lar (R-Smadlar); TGF- β ailesi reseptör kinazlarının direkt substratlarıdır. (b) Common-partner SMADlar (Co-Smadlar); R-Smadlarla birleşerek sinyal iletimine katılan SMAD'lar, ve (c) İnhibitör SMAD'lar (I-Smadlar); R ve Co-Smadların sinyal fonksiyonunu inhibe eden antagonist SMAD'lardır (Şekil 3) (7).

R-Smadlarda kendi içlerinde iki gruba ayrılır, bunlar; BMP (Bone Morphogenetic Protein) Smadlar ve TGF- β / aktivin Smadlar. BMP Smadlar, Smad 1 ve birbirine yakın homologlardan Smad 5 ve Smad 8, BMPR-I' in (Bone Morphogenetic Protein Receptor-I) substratları ve BMP sinyallerin aracılardır. TGF- β /aktivin Smadlar ise Smad 2 ve 3, T β R-I' in substratları ayrıca TGF- β ve aktivin sinyallerinin aracılardır. Memeli epitel hücrelerinde Smad 2 ve 3, gelişimin inhibisyonuna, haberci genlerden TGF- β ve aktivinin transkripsiyonuna aracılık ederler (8, 9).



Şekil 3. Omurgalı SMADların filogenetik ağacı ve şematik yapısı. Toplam üç ayrı grup vardır: R-Smadlar, Co-Smadlar ve I-Smadlar. XSmad4 β hariç belirtilen bütün SMADlar insanlarda bulunur. (Itoh et al., 2000'den modifiye edilmiştir)

R-Smadlar sinyal iletimi görevlerini yerine getirmek için diğer bir SMAD'a ihtiyaç duyar. Omurgalılarda, bu grubun üyelerinden bilineni Co-Smadlar grubuna dahil Smad4 dır. Reseptör regüle eden SMAD'lar, benzer reseptörler tarafından fosforile olduğu zaman Smad4'lerle birleşirler (4, 8). Smad4'ün yapısı R-Smadlara benzemesine rağmen, agonistlerinden gelen yanıt ile normal olarak fosforile olamaz. Memeli hücrelerinde Smad2 veya 3'e bağlı gelişimi inhibe eden bir yanıt için Smad4 gereklidir. Ayrıca Smad4, TGF- β , aktivin ve BMP sinyal iletim yollarının da bir üyesidir (4).

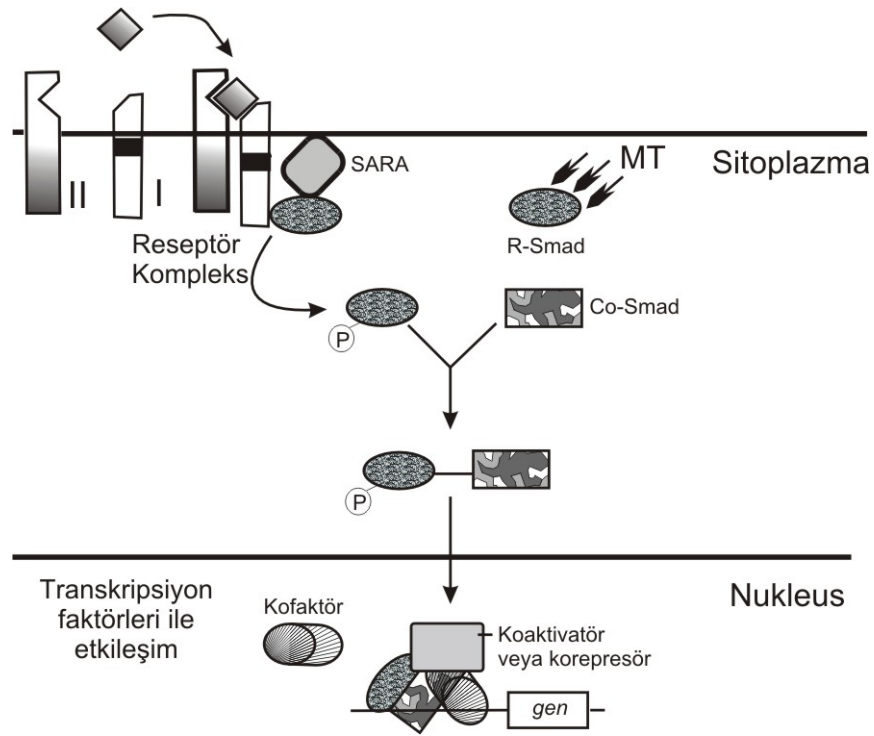
İnsan Smad'larından 6 ve 7, SMAD'lardan yapısal olarak farklı olan diğer bir alt grubu oluşturur ve inhibitör SMAD'lar olarak adlandırılırlar. Bilinen tek aktivitesi, R-Smadların sinyal fonksiyonunu inhibe etmesidir. Smad6, BMP sinyallerini inhibe ederken, Smad7, TGF- β ve BMP sinyallerinin her ikisini de inhibe edebilir (4, 7).

2.4.2.2. SMAD Proteinleri Aracılığı İle Sinyal İletimi

Bazal kısımda SMAD'lar homo-oligomerler olarak bulunurlar. Ligandın bağlanmasıyla reseptör kompleksin aktivasyonundan sonra tip I reseptör kinazlar spesifik SMAD'ları fosforile ederler, fosforile olan SMAD'lar daha sonra Smad4 ile birleşerek hücre çekirdeğine taşınırlar. Bu kompleksler çekirdek içinde yalnız veya DNA-bağlanma altbirimi ile birleşik halde bulunabilir ve spesifik promotor elemanlarına bağlanarak hedef genleri aktive eder (Şekil 4) (4, 7, 46, 57). SMAD' lar agonistlerinin uyarısıyla serin-fosforlarlar. Örneğin Smad1, BMP2 veya 4'ün (7) ; Smad2, TGF- β veya aktivinin (8); ve Smad3, TGF- β 'nın uyarısı ile serin fosforlarlar (4).

FYVE bölgesi içeren zara tutunmuş bir protein olan SARA (reseptör aktivasyonu için SMAD tutucu), reseptör aktivasyonu için gereklidir. SARA içindeki FYVE bölgesi iki tane çinko parmak motifi içerir, fosfotidilinositol-3-fosfata bağlanabilmesi, SARA'nın endozomal zara bağlanmasını da sağlar. SARA, R-Smadlarla etkileşime girer, R-Smadlar TGF- β 'nın SMAD bağlanma bölgesine ve SARA'nın C-uç bölgesine bağlanırlar. Smad2 ve Smad3 ün C-uç fosforilasyonu ile, tip I reseptör ve SMAD arasındaki afinite azaldığı gibi SMAD ile SARA arasındaki afinite de azalır. Bu olay TGF- β reseptör, aktif R-Smad ve SARA dan oluşan kompleksin ayrılmasıyla sonuçlanır (7, 57).

Reseptör tarafından fosforlanan SMAD'lar Smad4 ile birleşir, oluşan kompleks transkripsiyonun aktivasyonu için gereklidir (46, 58, 59). Smad1 ile Smad4 ün birleşmesine cevap olarak BMPR-I'in aktivasyonu gerçekleşir (8, 49), Smad1'in, Smad2 ve 3 ile birleşmesi, T β R-I veya ActR-IB aktivasyonu ile sonuçlanır (8). Yapısal faktörler ve Smad4 ün L3 kıvrımındaki mutasyonların gözlemleri baz alındığında, Smad4 ün Smad2 ile birleşme kabiliyetinin ortadan kalktığı gözlenmiştir, burada Smad4 ün L3 kıvrımının R-Smadlarla birleşmeye aracılık yaptığı açıktır. SMAD L3 kıvrımı, iki farklı etkileşime karışmaktadır: (a) R-Smad'larda iken reseptörlerle etkileşim ve (b) Smad4'de iken reseptör tarafından aktive olan SMAD'larla etkileşim (4).



Şekil 4. R- ve Co-Smadların aktivasyonu. Ligandın indüklediği heteromerik kompleks oluşumu ve tip I ve tip II reseptörlerinin aktivasyonunun ardından R-Smadlar fosforlanır ve Co-Smadlar ile heteromerik kompleks oluştururlar, bu kompleks hücre çekirdeğine taşınır, hücrenin çeşidine göre hedef genin ekspresyonu burada kontrol edilir. Aktive edilmemiş SMADlar, mikrotübüllere (MT) birleşik olarak sitoplazma içinde tutulabilirler. SARA; reseptör aktivasyonu için SMAD tutucu. (Itoh et al., 2000'den modifiye edilmiştir)

2.4.2.3. SMAD'ların Hücre Çekirdeğindeki Lokalizasyonları ve Regülasyonları

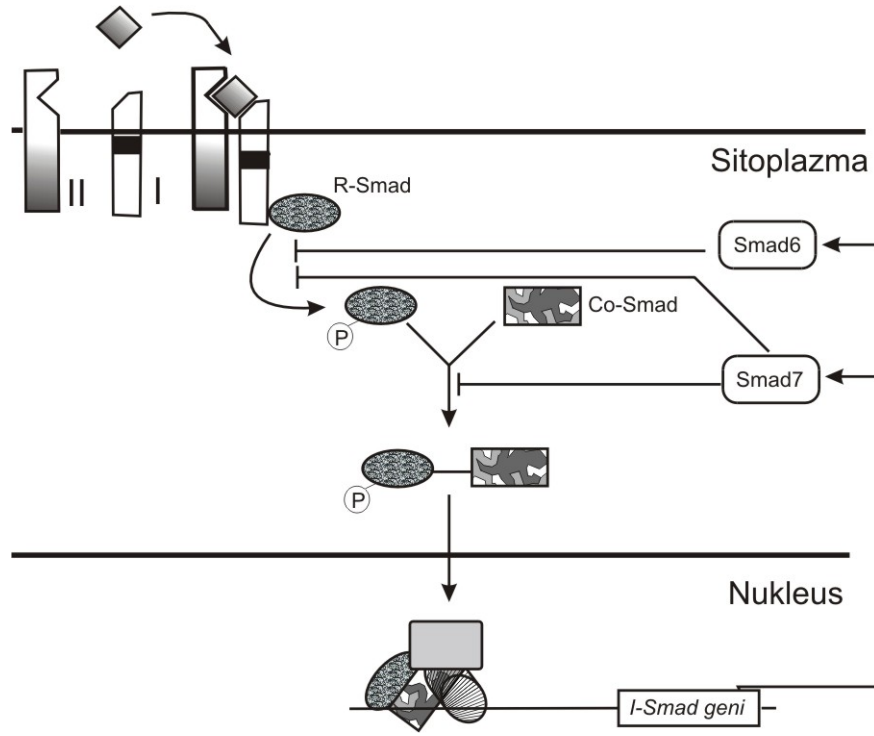
Reseptör tarafından aktiflenen SMAD'ların nüklear translokasyonları, agonistlerin indüklediği fosforilasyon ve Smad4'le birleşme kinetiği ile gerçekleşir. Smad4, TGF- β veya BMP'ye cevap olarak hücre çekirdeğine transloke olur ve translokasyon Smad1 ve 2 nin varlığında gerçekleşir. Reseptör aktive eden SMAD' lar Smad4'e sitoplazmada bağlanır ve Smad4'ü hücre çekirdeği içine taşırlar (46, 57, 60).

TGF- β ailesi sinyal iletiminin en önemli araçları olan SMAD'lar, sinyal iletimini hücrenin durumuna göre tamamlamak ve adapte etmek için farklı tipte

düzenleme mekanizmalarına maruz kalırlar. Düzenleme mekanizmalarından bir tanesi, bağlantı bölgesindeki MAP (mitogen-activated protein)-kinaz alanlarının fosforlanmasıyla SMAD'ların hücre çekirdeği içindeki birikiminin inhibe edilmesidir. Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve hepatosit büyüme faktörü gibi agonistler Erk MAP kinazı (Extracellular signal-regulated MAP-kinases) aktive ederek Smad1'in bağlantı bölgesinde dört PXSP motifindeki serinlerin hızlı bir şekilde fosforilasyonuna yol açarlar. Bu fosforilasyon Erk MAP kinaz tarafından katalizlenir ve Smad1'in fosforilasyonu BMP-reseptör aracılığı ile fosforilasyonundan bağımsız olarak gerçekleşir. Erk aracılığı ile fosforilasyon Smad1'in hücre çekirdeğindeki birikimini inhibe eder, ayrıca Smad1 ile Smad4 ün birleşmesini de engeller. Smad1' in hücre çekirdeğinde birikimine bağlı olan BMP uyarılarının antagonisti, Erk MAP-kinaz yolunun atıvasyonudur. Diğer R-Smad'larında bağlantı bölgelerinde MAP-kinaz fosforilasyon alanları mevcuttur. MAP kinazlar ile SMAD'ların regülasyonu, TGF- β sinyal iletiminin düzenlenmesinde gereklidir (4). Ayrıca Smad3, hücre döngüsünü düzenleyen moleküllerin transkripsiyonel kontrolünü de sağlar (47).

2.4.2.4. Antagonistik SMAD'larla İnhibisyon

I-Smadlar (İnhibitör Smadlar) aktif tip I reseptör ile hızlı bir şekilde etkileşime girerler, böylece R-Smadların aktif tip I reseptöre geçişini engellerler (Şekil 5) (7). Smad6 ve 7, R-Smad'larla gerçekleşen sinyal iletiminin inhibitörleridir. Ekspresyon olmadığı zaman Smad6, BMP ve kısmen TGF- β sinyal iletimini inhibe eder, Smad7'de TGF- β ve BMP sinyal iletiminin her ikisini de inhibe edebilir. Smad6'nın çok düşük konsantrasyonları bile kurbağa embriyolarında ve memeli hücrelerinde BMP sinyal iletiminin spesifik inhibitörüdür.



Şekil 5. I-Smadların faaliyetlerinin mekanizması. TGF- β /Smad sinyal iletiminin negatif regülasyonu I-Smadlar ile gerçekleşebilir. I-Smadlar, R-Smadların aktivasyonunu veya Smad4 ile oluşturacakları heteromerik kompleks oluşumunu engelleyerek aktivitelerini gösterebilirler. (Itoh et al., 2000'den modifiye edilmiştir)

İnhibitör Smad'lar, negatif geri bildirim sürecine katılarak TGF- β yanıtının şiddetini ve süresini düzenlerler. Böylece TGF- β nın yanıtıyla *Smad7* ekspresyonu hızlı bir şekilde artar. *Smad6* ve *7* ekspresyonu damar endotel hücrelerinde ani stresle artar, bu uyarı da muhtemelen otokrin TGF- β 'ya aracılık eder. Smad6 ve 7'nin inhibitör etkisinin açıklanmasında önerilen mekanizmalardan birine göre, I-Smadlardan her biri farklı TGF- β reseptör ailesine bağlanırlar ve reseptör-regüle eden SMAD'ların fosforilasyonunu engellerler (4).

2.4.3. TGF- β ve Sinyal Yollarının Kondrosit Metabolizması Üzerine Etkileri Ve Osteoartrit Oluşumundaki Rollerini

Kıkırdak temel olarak su ve spesifik hücre dışı matriksten oluşmuştur, bu bileşenler kıkırdağa elastik ve viskoz bir yapı sağlar. Hücre dışı matriksin temel bileşenleri, tip II kollajen ve agrekan olarak bilinen yüksek moleküler ağırlıklı proteoglikanlardır. Kollajen, dokunun gerilme direncine duyarlıdır ve agrekanların polianyonik kısımları (glikozaminoglikan bölümü) su moleküllerini tutar, böylece viskoelastikiyeti sağlanmış olur. Kondrositler, hücre dışı matrikste bulunan tek kıkırdak hücre tipidir, ve bunlar aktivitelerine göre farklı yapılar sergilerler (61).

Osteoartritte kıkırdağın kaybı için temel matriks üyelerini parçalayan proteinazların ekspresyonu gereklidir. Kollajenaz, jelatinaz, agrekanaz gibi matriks metalloproteinazları (MMPs), kıkırdağın çıkarılmasının artışı ile ilişkili özel enzimatik aktiviteler gösterirler. Bu MMPs'ler sinoviyal hücrelerden ve kondrositlerden köken alırlar. Eklem yüzeyindeki yüzeysel fibrilasyon, artan denatürasyonla ve kollajen fibrillerinden tip II kollajenin kaybı ile ilişkilidir, bu durum gerilme özelliklerinin azalmasına neden olur. Fibrillerin hasarı agrekanların kaybına yol açar, fakat aynı zamanda eklem birleşme yüzeyindeki fibriller ile ilişkili olan küçük proteoglikanlar dekorin ve biglikanlarında kaybına neden olur. Bu moleküllerin kaybı tip II kollajenlerin kollajenazlar ile ve agrekanların agrekanaz ile kesilmesinin artışıyla ilişkilidir. OA verileri enflamasyonlu sitokinlerin eklem dokusundaki yıkılmada işe karışan temel katabolik sistem olduğunu kuvvetli bir şekilde destekler. Bu kavram, interlekin-1 (IL-1)'in erken ve geç fazda çok önemli sitokinler olduğuna da uyar, tümör nekrozis faktör- α 'da (TNF- α), OA'in enflamasyon bileşenlerinde önemli bir rol oynar. Diğer sitokinler, osteoartritlik eklemdeki regülatör (IL-6, IL-8) veya inhibitör (IL-4, IL-10, IL-13, interferon- γ) enflamasyon sürecinde salınır. IL-1 ve TNF- α 'nın her ikisi de OA sinoviyal membranında, sinoviyal sıvısında ve kıkırdakta artan miktarlarda bulunur. Anabolik büyüme faktörleri ve katabolik sitokin sentezi

ve/veya bioaktivitesi arasındaki dengesizlik kırıkta onarım hatasında önemlidir. Bununla birlikte kondrosit metabolizmasının aktivasyonu ile sonuçlanan dejeneratif hastalıklarda onarım sürecinin gerçekleşebileceğine dair bazı kanıtlar bildirilmiştir. Kondrositler hücre dışı matriksin hasarına karşılık normal olarak bölünerek proliferasyona uğramazlar, multiselüler kondrosit klonları oluşur ve hastalığın erken safhalarında büyük miktarlarda kollajen ve agrekanlar oluşur. Bu nedenle kırıkta onarım sürecinde sistemik veya lokal büyüme faktörlerinin önemli rol oynaması muhtemeldir. Kırıkta lezyonlarının sürekli restorasyonu için gerekli olan bütünleyici kırıkta onarımı yara iyileştirici süreç olarak kabul edilebilir (61).

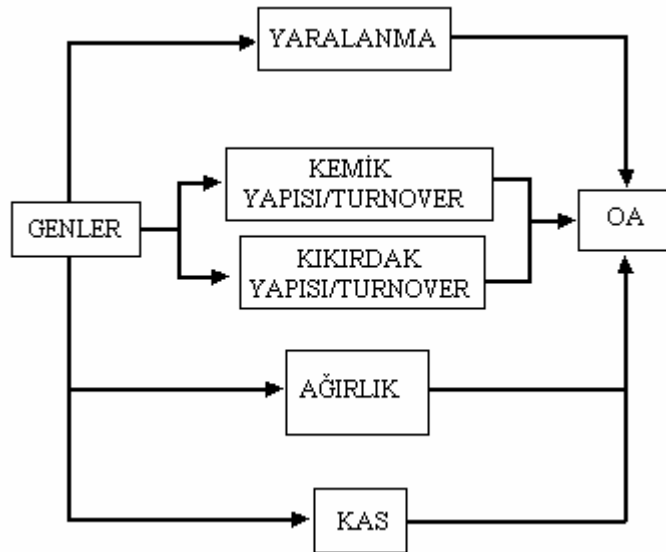
TGF- β ailesi üyelerinin, kondrosit büyüme ve farklılaşmasında anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu grup yalnızca beş tane TGF- β (TGF- β 1-5) içermez, bunun yanında kemik morfogenetik proteinlerinin (10) aktiviteleri, mullerian inhibiting substances inhibitörleri, büyüme ve farklılaşma faktörlerini içerir (62). TGF- β 'lar çok farklı hücre tiplerinde üretilmesine rağmen kemikteki konsantrasyonları diğer dokulardan 100 kat daha fazladır, ve osteoblastlar yüksek konsantrasyonlarda TGF- β reseptörleri içerirler (11).

2.4.4. Osteoartrit Oluşumunda *Smad3* Gen Mutasyonlarının Önemi

Birçok çalışma Transforming Growth Factor- β (TGF- β)'nin sinyal fonksiyonunun, kemiğin oluşumunda, yeniden şekillenmesinde ve devamlılığını sağlamasında önemli bir düzenleyici görevi olduğunu göstermiştir. TGF- β /Smad3 sinyalleri kondrositlerin terminal hipertrofik farklılaşmasını inhibe eder ve eklem kırıktağının bütünlüğünün korunması için gereklidir. Bu mekanizma, *Smad3* geninin 8.ekzonu hasara uğratılan homozigot mutant bir farede gösterilmiş ve bu farede insan osteoartrite benzer dejeneratif eklem hastalığı geliştiği belirtilmiştir. Ayrıca Smad2 ve Smad3'ün kondrositlerin olgunlaşması esnasında TGF- β sinyallerine inhibitör etkiler oluşturan önemli araçlar olarak rol aldığı tespit edilmiştir (15). OA'lı hastalarla yapılan mutasyon çalışmalarında bir

hastada Smad3 gen mutasyonu tespit edilmiş ve Smad3 genindeki mutasyonun insan OA'ne yatkınlık oluşturabilecek bir olası faktör olabileceği bildirilmiştir (1).

Sonuç olarak osteoartritin epidemiyolojik çalışmaları, hastalığın toplumdaki şiddetinin, genetik ve çevresel risklerin katkılarının belirlenmesine izin verir. Ayrıca bu çalışmalar bize bireysel risk faktörlerinin önemini değerlendirilmesine de katkıda bulunur. Genel popülasyonda genler, OA için en önemli risk faktörüdür. Şekil 6'da şematik olarak osteoartritde genlerin rolünü göstermektedir.



Şekil 6. Osteoartritde genlerin rolü

Genler kompleks bir şebekeye etki ederler, buradaki mekanizmada, bir hasar oluşumu ve hasarın önlenmesi; hasara yanıt; vücut ağırlığı; kas kütlesi; kemik yapısı ve kemik turnover'ı veya, kıkırdak yapısı ve kıkırdak turnover'ı veya sinerjistik olarak her ikisi de rol oynayabilir (2). Açıkça görülüyor ki OA'in kalıtımı oldukça kompleks ve bu karmaşık yapının çözülmesi için genlerin, yeni yolların ve hedef ilaçların bulunması gereklidir. İleride osteoartritdeki genetik unsurun çok iyi anlaşılması için fenotip, cinsiyet ve hastalık bölgesine dikkat çekilen kapsamlı bir linkaj çalışmasına ihtiyaç vardır. Yine tanımlanmamış tek nükleotid

polimorfizimleri veya spesifik aday genler gibi genetik markırların yeterli bir şekilde tanımlanması için çok iyi ve kapsamlı topluluk çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Yapılan çalışmalar genetik etkenlerin, OA'in gelişimine katkıda bulunduğu bildirmiştir. Farklı aday genlerle yapılan çalışmalarda, bu genlerden bazılarının OA ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. TGF- β sinyal iletiminde aracı rolü oynayan Smad3 proteini kodlayan Smad3 geni, OA'li hastalar üzerinde yapılan mutasyon analizinde araştırılmış ve bir hastada Smad3 gen mutasyonu tespit edilmiştir. Bu alanda yurt dışında yapılan tek bir çalışmaya ulaşabilmemiz ve kıkırdak dejenerasyonu altında yatan moleküler mekanizmanın tanımlanmasına katkıda bulunabileceği düşüncesiyle bu çalışmanın önemli olacağı kanaatindeyiz.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çalışma Grubu

Tez çalışması için, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastahanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Polikliniğine başvuran toplam 179 bireyden toplanan periferik kan örnekleri kullanıldı. Hasta ve kontrol olmak üzere iki deney grubu oluşturuldu: (I) Kontrol Grubu; uluslararası osteoartrit kriterleri dışında kalan 87 gönüllü birey., (II) Hasta Grubu; Uluslararası kriterlere göre primer diz osteoartriti tanısı konmuş 92 gönüllü hasta birey.

Popülasyondaki çeşitliliği azaltmak için Isparta ve çevresinde yaşayan bireyler değerlendirmeye alındı. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'nda fiziksel muayene ile tanı konulan ve radyografi ile doğrulanan primer osteoartrit vakaları çalışmaya dahil edildi.

OA değerlendirmesinde yaygın olarak kullanılan Kellgren (63) skalası kullanıldı ve 1, 2, 3, 4 olarak skorlandı. Buna göre 1 ve 2 orta şiddette, 3 ve 4 şiddetli olarak değerlendirildi. Ayrıca radyografide osteofit bakımından da değerlendirme yapılarak skorlandı (0-3). Hastaların tutulan eklem sayıları da değerlendirmeye alındı.

Hasta grubuna dahil edilen bireylerin, yaş, boy, kilo, ilk belirtilerin görüldüğü yaş gibi özellikleri de ayrıca sorgulandı. Kontrol bireyler belirlenirken, hasta grubunun yaş ortalamasına yakın olmasına özen gösterildi.

Kontrol ve hasta grubuna katılan gönüllü bireylerden 9 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan periferik kan DNA izolasyonu için kullanıldı. Çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındı. Ayrıca çalışmaya katılan her gönüllü için hasta onay formları dolduruldu.

3.1.2. Kimyasallar

Kimyasal Adı	Marka	Katalog No
Sodyum EDTA (Na ₂ EDTA) (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O)	Amresco	0105-1KG
Tris base (Trizma baz) (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Amresco	0826- 1KG
Sodyum klorür (NaCl)	Merck	1.06404.1000
Trizma hydrochloride (Tris HCl) (C ₄ H ₁₁ NO ₃ .HCl)	Amresco	0234-500G
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	J.T.Baker	0070
Proteinaz K	Amresco	0706-100MG
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck	8.22050.1000
Amonyum asetat (NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂)	Acros	169880010
Etil alkol (C ₂ H ₅ OH)	Tekel	-
<i>Tsg</i> DNA Polimeraz	BioBasic	D0081
Deoxynucleotide Triphosphates (dNTP)	Larova	0090
Oligonucleotide primer	MWG Biotech	-
Bromophenol blue (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	J.T.Baker	1369
Xylene Cyanole (C ₂₅ H ₂₇ N ₂ O ₆ S ₂ Na)	Merck	1.10590.0005
Orange G	Merck	1.15925.0025
Formamid	J.T.Baker	7042
Etidium bromide (C ₁₂ H ₂₀ N ₃ Br)	Amresco	X328-10ML
Acrylamide (C ₃ H ₅ NO)	Amresco	0341-1KG
Bisacrylamide(NN-Metilenebisacrylamide) (C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂)	Amresco	0172-250G
Amonyum persulfat (APS) ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Riedel-de Haen	11222
N,N,N,N-Tetramethylehylediamine (TEMED)	Merck	1.10732.1000
Boric acid (BH ₃ O ₃)	J.T.Baker	0501
Etilen-diaminetetra-aceticacide(EDTA)	Serva	12278

Yağmur kaydırıcı (Rain away)	Serva	42500
γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane	Acros	216551000
Glacial Asetik asid ($C_2H_4O_2$)	Merck	1.0063.2500
Gümüş nitrat ($AgNO_3$)	Merck	1.01510.0050
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Amresco	0585
Formaldehide (CH_2O)	J.T.Baker	7041
Sodyum Tiosulfat ($Na_2S_2O_3$)	J.T.Baker	0320
Sodyum hidroksit ($NaOH$)	Amresco	0583
Hidroklorik asid (HCl)	J.T.Baker	6081
Agaroz	PeqLab	207013
Restriksiyon enzimi Bme1390I	Fermentas	ER1422
DNA Markır 100 kb	Fermentas	SM0339
DNA Markır 50 kb	Fermentas	SM0373

3.1.3. Gereçler

Adı	Marka	Ülke
10 mL EDTA'lı tüp	Greiner	Almanya
50 mL Falkon Tüp	Corning	Almanya
Ependorf tüpler	Corning	Almanya
Otomatik pipet seti	Boeco	Almanya
Otomatik Pipet Uçları	Boeco	Almanya
Buzdolabı	Beko	Türkiye
Hassas terazi	Metter Toledo	İsviçre
Manyetik karıştırıcı	IKA	Brezilya

pH metre	Hanna	Portekiz
Otoklav	Hirayama	Japonya
Laminair flow	Esco	Singapur
Deiyonize su cihazı	Milipore DI	Fransa
Ultrapure Saf Su Cihazı	Milipore Simplicity	Fransa
Etüv	Binder	Fransa
Etüv	Nüve	Türkiye
Vortex	Elektro-Mag	Türkiye
Yüksek devirli soğutmalı santrifüj	Hettich	Almanya
Spektrofotometre	Shimadzu	Japonya
Derin Dondurucu (-35)	Bosch	Almanya
Buz makinesi	Hoshizaki	Japonya
Termocycler	PeqLab	Almanya
Yatay elektroforez düzeneği	CLP	ABD
Doğru akım güç kaynağı (400 volt)	CLP	ABD
Ultraviole transillüminatör	UltraLum Inc.	ABD
Dikey elektroforez düzeneği	Biorad	Almanya
Doğru akım güç kaynağı (3000 volt)	Biorad	Almanya
Orbital sallayıcı	EI Yapımı	Türkiye
Nagadoskop	EI Yapımı	Türkiye

3.1.4. Solüsyonlar

3.1.4.1. DNA İzolasyon Tamponları

1. Nuclei Lizis Tamponu (pH:8.2)

Protokol:

10 mM	Tris base
400 mM	NaCl
2 mM	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

1.21 gr	Tris base
23.4 gr	NaCl
0.74 gr	Na ₂ EDTA

800 ml deiyonize suda çözüldü. pH:8.2'ye ayarlandı. Son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 25 dakika otoklavlandı. +4°C'de saklandı.

2. Proteinaz K Seyreltme Tamponu (pH:8.0)

Protokol:

0.05 M	Tris HCl
0.9 mM	CaCl ₂

Hazırlanışı:

0.788 gr	Tris HCl
9.99 gr	CaCl ₂

80 ml deiyonize suda çözüldü. pH:8.0'a ayarlandı. Son hacim 100 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 25 dakika otoklavlandı. +4°C'de saklandı.

3. Proteinaz K Çözeltisi (10 mg/ml)*Protokol:*

100 mg	Proteinaz K
10 ml	Proteinaz K seyreltme tamponu

Hazırlanışı:

100 mg Proteinaz K 10 ml Proteinaz K seyreltme tamponunda çözülerek Proteinaz K çözeltisi hazırlandı. İşlem buz üzerinde yapıldı. Proteinaz K çözeltisi 1000 µl olacak şekilde 1.5 ml'lik ependorf tüplere bölündü ve -20°C'de saklandı.

4. %10 (w/v)'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Solüsyonu*Protokol:*

10 gr	SDS
90 ml	dH ₂ O

Hazırlanışı:

Solüsyon 68°C'de ısıtılarak çözüldü. Son hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Whatman filtreden süzildükten sonra oda ısısında saklandı.

5. Amonyum Asetat (9 M = sature) Çözeltisi*Protokol:*

74 gr	Amonyum asetat
	dH ₂ O

Hazırlanışı:

20 ml steril dH₂O içerisinde 74 gr amonyum asetat çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı. Whatman filtreden süzildükten sonra +4°C'de saklandı.

6. 0.1 M Na₂EDTA (pH:8.0) Çözeltisi*Protokol:*

37,22 gr	Na ₂ EDTA
	dH ₂ O

Hazırlanışı:

700 ml dH₂O içinde 37.22 gr Na₂EDTA çözüldü. 10 M'lık NaOH ile pH:8.0'a ayarlandı. Son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 25 dakika otoklavlandı. +4°C'de saklandı.

7. 1 M Tris HCl (pH:7.4) Çözeltisi*Protokol:*

157,6 gr	Tris HCl
	dH ₂ O

Hazırlanışı:

800 ml dH₂O'da 157,6 gr Tris HCl çözüldü. pH:7.4'e ayarlandı. Son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 25 dakika otoklavlandı. +4°C'de saklandı.

8. TE Tamponu*Protokol:*

10 mM	Tris HCl
1 mM	Na ₂ EDTA
	dH ₂ O

Hazırlanışı:

5 ml	1 M Tris HCl
5 ml	0.1 M Na ₂ EDTA

490 ml steril dH₂O içerisine daha önceden ayrı ayrı hazırlanmış çözeltilerden 5'er ml ilave edilerek hacim 500 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 25 dakika otoklavlandı. +4°C'de saklandı.

3.1.4.2. Agaroz Jel Elektroforez Solüsyonları

1. TAE Elektroforez Tamponu (pH: 8.0-8.5)

50X Stok Solüsyon Hazırlanışı

Protokol:

242 gr	Tris base
37,2 gr	Na ₂ EDTA.2H ₂ O
57,1 ml	Glacial asetik asid dH ₂ O

Hazırlanışı:

800 ml dH₂O'da tümü çözülür. Manyetik karıştırıcı üzerinde bir taraftan karıştırılarak içerisine atılan NaOH pelletleri ile pH'sı ayarlandı. Son hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

Çalışma solüsyonu olarak, dH₂O ile sulandırılmış *1X solüsyonu* kullanıldı.

2. Yükleme Tamponu

Protokol:

% 95 (w/v)	Formamid
% 0,5 (w/v)	Bromfenol mavisi
% 0,5 (w/v)	Ksilen siyanol

Hazırlanışı:

95 ml formamid, 0,5 g ksilen siyanol ve 0,5 gr bromofenol blue toplam hacim 100 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü. Çözelti +4°C' de saklandı.

3. 10X Orange G Yükleme Tamponu

Hazırlanışı:

20 gr sukroz, 40 ml distile suda çözüldü, üzerine 100 mg Orange G eklendi ve son hacim 50 ml'ye distile su ile tamamlandı. Çözelti +4°C' de saklandı.

3.1.4.3. Poliakrilamid Jel Elektroforez Solüsyonları

1. 0.5 M Na₂EDTA (pH:8.0)

Protokol:

226,1 gr	Na ₂ EDTA
	dH ₂ O

Hazırlanışı:

700 ml dH₂O içerisinde 226,1 gr Na₂EDTA çözüldü. 10 M NaOH'den ~50 ml ilave ederek pH:8.0'a ayarlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 25 dakika otoklavlandı. +4°C'de saklandı.

2. TBE Elektroforez Tamponu (pH:8.3)

10X Stok Solüsyon Hazırlanışı

Protokol:

0.9 M	Tris base
0.9 M	Borik asid
20 mM	Na ₂ EDTA
	dH ₂ O

Hazırlanışı:

108 gr	Tris base
55 gr	Borik asid
40 ml	0.5 M Na ₂ EDTA

800 ml dH₂O'da tamamı çözüldü. pH'sı ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Çalışma solüsyonu olarak, dH₂O ile sulandırılmış 1X solüsyonu kullanıldı.

3. %40'luk (29:1) Akrlamid-Bisakrilamid Solüsyonu

Protokol:

58 gr	Akrlamid
2 gr	Bisakrilamid
	dH ₂ O

Hazırlanışı:

120 ml dH₂O içerisinde tümü çözüldükten sonra hacim 150 ml'ye tamamlandı. Saklandığı cam şişenin dışı ışık almayacak şekilde alüminyum folye ile sarıldı. +4°C'de saklandı.

4. %10 (w/v)'luk Amonyum Persülfat (APS) Solüsyonu*Protokol:*

Amonyum persülfat (APS)
dH₂O

Hazırlanışı:

0,1 gr amonyum persülfat üzerine 1 ml dH₂O ilave edildi. Vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra çok bekletmeden kullanıldı. Her çalışmada taze olarak hazırlandı.

5. Yapıştırıcı Solüsyon (Sticky Solution)*Protokol:*

9,9 ml	%96'lık Etanol
5 ml	Glacial Asetik Asid
5 ml	γ -methacryloxypropyl-trimethoxysilane

Hazırlanışı:

Tamamı bir tüp içerisinde, vorteks yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra +4°C'de saklandı.

3.1.4.4. Jele Yükleme Tamponları**1. Denatüran Yükleme Tamponu (Denaturen Loading Buffer)***Protokol:*

%95 (w/v)	Formamid
20 mM	EDTA
%0,05 (w/v)	Bromfenol mavisi
%0,05 (w/v)	Ksilen siyanol

Hazırlanışı:

9,5 ml	Formamid
0,4 ml	0,5 M EDTA
0,005 gr	Bromfenol mavisi
0,005 gr	Ksilen siyanol

Tümü bir tüp içerisinde ilave edildi. Solüsyonun homojen olabilmesi için vorteks yardımıyla karıştırıldı. Kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

3.1.4.5. Gümüş Boyama Solüsyonları**1. %10'luk Asetik Asit***Protokol:*

150 ml	Glacial asetik asid
1350 ml	dH ₂ O

2. %0,1'lik Gümüş Nitrat Solüsyonu*Protokol:*

%0,1 (w/v)	Gümüş nitrat
%0,078 (v/v)	Formaldehit (%39'luk)

Hazırlanışı:

1 gr	Gümüş nitrat
2 ml	Formaldehit

1000 ml distile su içerisinde 1 gr gümüş nitrat ilave edilerek karıştırıldı. Kullanılmadan hemen önce içerisinde 2 ml formaldehit eklendi. Bu işlemler manyetik karıştırıcı üzerinde yapıldı.

3. Sodyum Karbonat Solüsyonu*Protokol:*

%3,4 (w/v)	Sodyum karbonat
%0,0078 (v/v)	Formaldehit
%0,0005 (w/v)	Sodyum tiyosülfat

Hazırlanışı:

34 gr	Sodyum karbonat
2 ml	Formaldehit
0,005 gr	Sodyum tiyosülfat

1000 ml distile su içerisine 34 gr sodyum karbonat ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı üzerinde tamamıyla çözünmesi sağlandı. Solusyon soğuması için buzdolabına kaldırıldı. Kullanılmasına birkaç dakika kala buzdolabından alındı ve içerisine 2 ml formaldehit ve 0,005 gr sodyum tiyosülfat eklendi. Kullanım sıcaklığı $\sim 10^{\circ}\text{C}$ idi. Soğuk olan solusyon bantların daha uzun zamanda görünür hale gelmelerini sağlayarak işlemlerin daha kontrollü ilerlemesine yardımcı oldu.

3.2. Metod**3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu**

DNA, 9 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan periferik kandan tuzla çöktürme yöntemi ile izole edildi (64) . EDTA'lı kan 50ml'lik falcon tüplere boşaltıldı ve üzerine 40ml buzdolabında bekletilen soğuk ultrapure distile su eklenerek eritrositlerin parçalanması için 10 dakika bekletildi. 2500 rpm'de 15' santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlandıktan sonra pellet üzerine 3ml nükleus lizis tampon, 200 μl %10'luk SDS ve 150 μL proteinaz K (10 mg/mL) eklenerek bir gece (O/N) 37°C 'lik etüvde bekletildi. Etüvden çıkartılan tüplere 1-1,5 mL 9M amonyum asetat çözeltisi eklenerek iyice çalkalanıp 10dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe alındı ve üzerine 3 katı kadar hacimde ($\sim 30\text{ml}$) %96'lık soğuk ($\sim 20^{\circ}\text{C}$) etanol döküldü. Tüp hafifçe alt-üst edilerek DNA'nın presipite olması sağlandı. Presipite olan DNA pipet ucuyla alınarak %70'lik soğuk ($\sim 20^{\circ}\text{C}$) etanolde yıkandı ve 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Eppendorf tüp içine alınan DNA 65°C 'lik etüvde 20 dakika kurutulduktan sonra üzerine 400 μL TE tamponu ilave edilerek içerisinde çözüldü.

3.2.1.1. İzole Edilen DNA'nın İntaklığı

İzole edilen DNA'ların 1/50 dilüsyonları hazırlandı. Her bir DNA'nın sağlamlığı %0,4'lük agaroz jelde elektroforez edilerek kontrol edildi. 1/50 dilüsyon DNA'dan 2 µL alınarak 8 µL deiyonize distile suyun içerisine ilave edildi. Jele yüklenmeden önce üzerine 5 µL loading buffer ilave edildi ve tamamı jele yüklenerek 60 Voltta yürütüldü. Transilimünatör üzerinde jele bakıldığında DNA'ların tümü aynı hizada ve tek bant olarak görüldü (18).

3.2.1.2. Spektrofotometrede DNA Konsantrasyonunun Ölçümü

İzole edilen DNA'ların 1/100 dilüsyonları hazırlandı ve 260 nm ve dalga boyundaki absorbans değerleri okundu. 1 OD'nin 50 µg/mL DNA miktarına eşitliğinden gidilerek 260 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerinden örneklerdeki DNA konsantrasyonu hesaplandı. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılmak üzere DNA'lar steril deiyonize su ile 50 ng/µL olacak şekilde sulandırıldı (18).

DNA konsantrasyonu = $(OD)_{260} \times \text{Sulandırma katsayısı} (100) \times 50\mu\text{L/mL}$ (çift zincirli DNA'lar için OD değeri)

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Smad3 geninin kodlayan bölgelerini tarayabilmek için 9 ekzonun amplifikasyonu yapıldı. Amplifikasyonu için gerekli primerler ve amplifikasyon ürünlerinin uzunlukları tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Smad3 geninin amplifikasyonu için gerekli primerler ve amplifikasyon ürünlerinin uzunlukları (65, 66)

		Uzunluk (bp)
Exon 1	sense	cgcccgcgccctcccag
	antisense	actccctccctctctctccctcttc
Exon 2	sense	Ttccctctttctgcccctc
	antisense	agaccagcaccaaagtcccc
Exon 3	sense	Tttggctgctggctggcatc
	antisense	gccacaggactgatgtcgg
Exon 4	sense	cagaccacctccttctgattcc
	antisense	agagcatgaccctgcatgactg
Exon 5	sense	ggtttctttctgctgtgtggg
	antisense	tagaggggggtccagttgtgtg
Exon 6	sense	gctgggacaccaatgacc
	antisense	ggggaatggagccaccccat
Exon 7	sense	gggcattgtgggtgtgagcaaag
	antisense	tccagcatcctaggcatgcactcg
Exon 8	sense	ctgctttatccaggaggggag
	antisense	ctgatgtaggcagcaccataac
Exon 9	sense	acccaccccttccctatttc
	antisense	cctcccctaccatactgatgtctc

9 ekzonun PCR şartları, Fukushima ve arkadaşlarının (66) metodu modifiye edilerek optimizasyonu sağlandı. PCR karışımı hazırlama işlemleri buz üzerinde yapıldı. Ekzonlar için hazırlanan PCR karışımı tablo 4'de görülmektedir. PCR karışımı hazırlandıktan sonra Termal cyler cihazı her ekzon için programlanarak amplifikasyon gerçekleştirildi. Ekzonlar için PCR programları tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 4. Smad3 geni ekzonları için PCR karışımları

		Ekzon 1	Ekzon 2	Ekzon 3-9
İÇERİK	Konsantrasyon	1X İçin Miktar µl	1X İçin Miktar µl	1X İçin Miktar µl
Tampon	10X	2,5	2,5	2,5
MgSO ₄	20mM	2	2	2
dNTP	2,5 mM	2	2	2
Primer (İleri)	10 pmol/µl	1,5	2	1,5
Primer (Geri)	10 pmol/µl	1,5	2	1,5
Tsg DNA Pol	5u/µl	0,3	0,2	0,2
DNA	DNA 50 ng/µl	3	3	3
dH ₂ O		12,2	11,3	12,3
	TOPLAM	25	25	25

Tablo 5. *Smad3* geni ekzonları için PCR Şartları

DERECE °C	SÜRE (Dakika)	
94	4	1 döngü
94	1	30 döngü
* Bağlanma	1	
72	1	
72	4	1 döngü

	* Derece °C
Ekzon 1, 6	61
Ekzon 2, 7, 9	56
Ekzon 3	60
Ekzon 4, 5, 8	59

3.2.2.1. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel ile Kontrol Edilmesi

PCR sonrası amplifikasyon ürünlerinin % 1'lik jelde kontrolü yapıldı. 14 x 10 cm boyutunda jel tabağına sahip midi yatay elektroforez cihazı kullanılarak amplifikasyon ürünleri yürütüldü (18).

%1' lik 0,5 cm kalınlığında agaroz jel çözeltisi hazırlamak için 0,84 gr agaroz, 84 ml 1X TAE tamponu içinde çözelti berrak oluncaya kadar ısıtıcı manyetik karıştırıcı üzerinde çözüldü. Çözelti berraklaştıktan sonra ısı 50-60 °C ye kadar soğutuldu. Üzerine 10 mg/mL etidium bromid çözeltisinden 1 µl eklenerek karıştırıldı. Elektroforez tabağının her iki tarafı kağıt bant ile kapatıldıktan sonra tarak yerleştirildi ve jel çözeltisi tabağa boşaltıldı. Agaroz çözeltisi oda ısısında 40-45 dakika polimerleşme için bırakıldı.

Elektroforez tankı yeterli miktarda 1X TAE tamponu ile dolduruldu. Polimerleşen jelden tarak çıkartıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi. 8 µl PCR örneği 4 µl 1X yükleme tamponu ile karıştırılarak, jel üzerinde tarağın oluşturduğu kuyucuklara yüklendi. Ayrıca amplifikasyon ürünlerinin doğruluğunu saptamak için 100 bç.'lik DNA markırı ilk kuyucuğa 1µl olarak yüklendi. 80 V'da

45 dakika yürütüldü ve daha sonra UV transilimünatörde görüntülenerek PCR ürünleri kontrol edildi.

3.2.3. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) İşlemleri

3.2.3.1. % 12,5' luk (29:1) Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

Protokol:

15 ml	%40'lık Akrlamid-Bisakrilamid (29:1)
5ml	10XTBE tamponu
350 µl	%10 APS
35 µl	TEMED
30ml	Distile su

Hazırlanışı:

%40'lık Akrlamid-Bisakrilamid (29:1), 10XTBE tamponunun üzerine yaklaşık 15 ml distile su ilave edildi. Manyetik karıştırıcı üzerinde tamamıyla erimeleri beklendikten sonra son hacim yine distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Jelin camlar arasına dökülmesinden hemen önce ilk olarak %10 APS ve ondan da yaklaşık 30 saniye sonra TEMED ilave edildi.

3.2.3.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi İçin Camların Hazırlanması ve Jelin Dökülmesi

SSCP analizi için 20 x 40 cm boyutlarında sekans elektroforez düzeneği kullanıldı. Elektroforez düzeneğinin kulaklı ve düz cam olarak ifade ettiğimiz camları %70'lik etil alkol ile üç kez silindi. Kulaklı cama yağmur kaydırıcı damlatılarak homojen bir şekilde tüm yüzeye yayılması için gazlı bez veya kağıt havlu yardımıyla iyice ovuldu. Düz cama ise jelin yapışarak üzerinde kalması için yapıştırıcı solüsyondan yaklaşık 500 µl damlatıldı ve aynı şekilde o da cam üzerine yayıldı. Daha sonra her iki cam üzerindeki bu maddelerin fazlalıklarını

almak üzere yine üçer kez camlar %70'lik alkol ile silindi, üzerlerinde hiç toz kalmamsına özellikle dikkat edildi. Düz camın uzun iki kenarına ve alt kenarına 0,4 mm kalınlığındaki spacerlar konuldu. Kulaklı camın hazırlanan yüzeyi spacerların üzerine denk gelecek şekilde kapaklandı. Camlar her üç kenarlarından klempeler yardımıyla birbirlerine sıkıca tutturuldu. Diğer tarafta hazırlanan %12,5' luk poliakrilamid jel 50 ml'lik bir enjektör yardımıyla açık olan üst köşeden ağır ağır, hava kabarcığı kalmayacak şekilde iki camın arasına döküldü. Dökme işlemi tamamlandıktan sonra köpek dişli tarak düz tarafı içte kalacak şekilde camlar arasına yerleştirildi ve 1-1,5 saatliğine donmak üzere bırakıldı.

3.2.3.3. PCR Ürünlerinin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

İki cam arasına dökülen jel polimerize olduktan sonra üstteki tarak çıkartıldı. Camlar elektroforez düzeneğindeki yerine yerleştirildikten sonra elektroforezin alt ve üst hazneleri 1XTBE tamponu ile dolduruldu. Düzenek kapatıldı ve güç kaynağı çalıştırıldı. Jel 30-45 dakika süre ile 1100 voltta ön elektroforez işlemine tabi tutuldu. Süre bitiminde güç kaynağı durduruldu. Köpek dişli tarağın yerleştirileceği bölge, üreden ve jel parçacıklarından temizlendikten sonra tarak yerleştirilerek kuyucuklar oluşturuldu.

Üzerlerine 2,5 µl yükleme tamponlarının ilave edildiği PCR ürünleri 95°C'de 10 dakika denatüre edilerek anında buz üzerine alındı. Örneklerden 8,5 µl alınarak kuyucuklara yüklendi. Örnekler 1100 voltta, değişen sürelerde yürütüldüler.

3.2.3.4 Gümüş Nitrat İle Boyama

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra güç kaynağı kapatıldı. İki cam arasındaki jel elektroforez düzeneğindeki yerinden alındı. Jelin yapışık olarak bulunduğu camla kulaklı cam olarak tarif ettiğimiz ve üzerinde yapışmayı önleyici maddenin sürülmesi olduğu cam birbirinden ayrıldı. Jelin üzerinde

bulunduğu cam %10'luk asetik asit çözeltisi içerisinde, orbital karıştırıcı üzerinde 30 dakika çalkalanarak jelin fikse olması sağlandı. Fiksasyon işleminden sonra jel iki kez 3'er dakika distile su ile yıkandı. 2 ml formaldehit ilave edilen % 0.1'lik gümüş nitrat solüsyonu jelin üzerine döküldü. Jel gümüş nitrat solüsyonu içerisinde 30 dakika orbital karıştırıcı üzerinde çalkalandı. Gümüş nitrat döküldükten sonra yaklaşık 5 saniye süreyle jel distile su ile yıkama işleminden geçirildi. Jelin üzerine 0,005 gr sodyum tiyosülfat ve 2 mL formaldehit içeren %3,4'lük soğuk sodyum karbonat çözeltisinin ilk etapta yarısı dökülerek bantların görünür hale gelmesi sağlandı. Bantlar görünür hale geldikten sonra çözeltinin geride kalan kısmı jelin üzerine döküldü. Bantların görünür hale getirilmesi işlemi esnasında sürekli olarak camın bulunduğu kap hafif hareketlerle çalkalandı. Bantlar koyulaşınca cam %10'luk asetik asit solüsyonu içerisine alındı ve 2-3 dakika orada tutularak boyama işlemi durduruldu. Jel son olarak 3-5 dakika çeşme suyunda bekletildikten sonra kurumaya bırakıldı.

Jeller kuruduktan sonra, görünen bant paternleri Nagadoskop üzerinde incelendi.

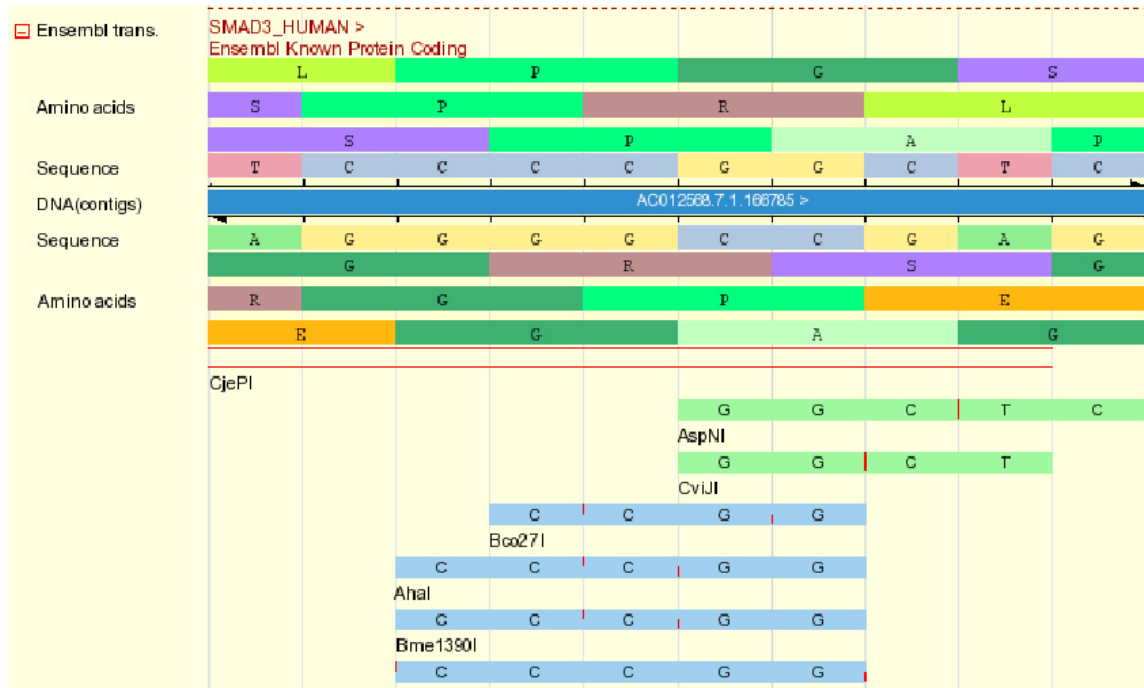
3.2.4. DNA Dizi Analizi

SSCP değerlendirmelerinde Exon 2 ve Exon 3 için farklı bant paterni gördüğümüz numunelerin DNA dizi analizleri yapılmasına karar verildi. Dizi analizlerinin, manuel metoddan daha güvenli olması sebebiyle otomatik dizi analiz cihazında yaptırılması düşünüldü ve bu amaçla ODTÜ Teknokentte bulunan REFGEN firmasına dizi analizi için numuneler gönderildi. SSCP için kullanılan PCR karışımı ve şartları kullanılarak amplifikasyon yapıldı ve dizi analizi için kullanıldı. PCR ürünlerinin temizlenme işlemi yapıldıktan sonra ABI 3100 DNA Analizörü kullanılarak dizi analizleri yapıldı. FinchTV bilgisayar programı ile sonuçlar gözlemlendi.

3.2.5. PCR/RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu / Parça Uzunluk Polimorfizmi) İşlemleri

Ekzon 2'nin amplifikasyonu için kullandığımız primerler, bir miktar intronik bölgeyi de amplifiye etmekteydi. Dizi analizinde yüksek oranda değişim gördüğümüz bölge intron 2'nin 59. bazına karşılık gelmekteydi. SSCP için kullanılan PCR karışımı ve şartları PCR/RFLP yöntemi içinde aynen kullanıldı.

İntron 2'nin 59. bazındaki varyantın belirlenmesi için bu bölgeye özgü Bme1390I restriksiyon enzimi kullanıldı. Bu enzimin bölgeye özgüllüğü www.ensembl.org sitesinden bulundu (şekil 7). Ürün ile gelen enzim kesim protokolü kullanıldı. Enzim kesim karışımı; 10 µL PCR ürünü, 18 µL ultrapure distile su, 2µL 10X O Buffer, 1,5 µL Bme1390I. Enzim kesim karışımı hazırlandıktan sonra 16 saat 37 °C 'de inkübe edildi.



Şekil 7. İntron 2'nin 59. pozisyonundaki nükleotid için Bme1390I tanıma bölgeleri. CCCGG dizisi tanıma bölgesi, CC / NGG enzimin tanıma bölgesinin kesimi.

3.2.5.1. PCR/RFLP Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

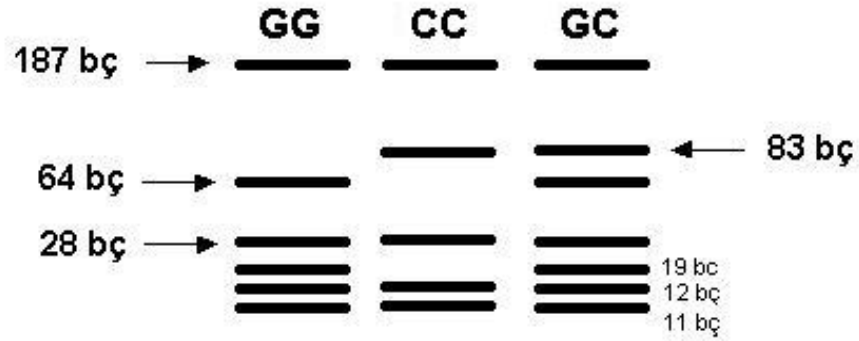
Enzim kesimi yapılan amplifikasyon ürünleri, % 2,5 'luk jelde görüntülendi. 14 x 10 cm boyutunda jel tabağına sahip midi yatay elektroforez cihazı kullanılarak amplifikasyon ürünleri yürütüldü.

%2,5' lik 0,75 cm kalınlığında agaroz jel çözeltisi hazırlamak için 3,15 gr agaroz, 126 ml 1X TBE tamponu içinde çözelti berrak oluncaya kadar ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde çözüldü. Çözelti berraklaştıktan sonra ısı 70-80 °C ye kadar soğutuldu. Üzerine 10 mg/mL etidium bromid çözeltisinden 3 µl eklenerek karıştırıldı. Elektroforez tabağının her iki tarafı kağıt bant ile kapatıldıktan sonra tarak yerleştirildi ve jel çözeltisi tabağa boşaltıldı. Agaroz çözeltisi oda ısısında 40-45 dakika polimerleşme için bırakıldı.

Elektroforez tankı yeterli miktarda 1X TBE tamponu ile dolduruldu. Polimerleşen jelden tarak çıkartıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi. 16 µl PCR/RFLP örneği 6 µl 10X Orange G yükleme tamponu ile karıştırılarak, jel üzerinde tarağın oluşturduğu kuyucuklara yüklendi. Enzim kesimi ürünlerinin uzunluklarını saptamak için 50 bç.'lik DNA markırı ilk kuyucuğa 1ml olarak yüklendi. Ayrıca kesim ürünlerinin doğruluğunu belirlemek amacıyla dizi analizinde normal, heterozigot ve homozigot bireylerde internal kontrol olarak kullanıldı. 80 V'da 40 dakika yürütüldü ve daha sonra UV transilimünatörde görüntülendi.

3.2.5.2. PCR/RFLP Ürünlerinin Analizi

349 bç uzunluğundaki amplifikasyon ürünümüzün enzim kesimi sonunda görünecek bant paternleri şekil 8'de şematik olarak gösterilmiştir. Bireylerin genotipi normal (GG) ise 187 ve 64 bç büyüklüğünde bantlar gözlenirken, 28, 19, 12 ve 11 bç. uzunluğundaki kesim ürünleri küçük boyutta olduğundan jelde ayırt edilemez. Homozigot varyantlar (CC) ise 187 ve 83 bç uzunluktaki bant paternlerini verir. Heterozigot bireylerde (GC) ise 187, 83 ve 64 bç uzunluğundaki bantları elde ederiz.



Şekil 8. *Smad3* geni 2. ekzonunun Bme1390I kesim ürünleri

3.2.6. İstatistik Analizleri

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS 10.0 paket programı kullanıldı. Tanımlayıcı analizler, paket programı kapsamındaki “descriptive” fonksiyonu ile yapıldı. İsimsel değişkenler yüzde frekans olarak, sayısal değişkenler “ortalama \pm standart sapma” olarak verildi. Osteoartrit hastaları ve kontrol populasyonun genotip ve allel frekans karşılaştırmalarında standart “kikare” ve “Fisher Exact” testleri kullanıldı. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Primer Diz Osteoartritli Hastaların Klinik Bulguları

Primer diz osteoartritin sınıflandırmasında hastalığın ilk görüldüğü yaş önemlidir. Çalışmamızda hastalığın başlama yaşı dikkate alındı ve ortalama 55 olarak bulundu. İstatistiki değerlendirmeler için 55 yaş altı erken dönem, 55 yaş üstü ise geç dönem olarak belirlendi.

Kellgren Lawrence (K/L) skalası radyografi üzerinde hastalığın şiddetini göstermektedir. Buna göre hastalardan elde edilen radyografik bulgular orta şiddetli (K/L 1 veya 2) ve şiddetli (K/L 3 veya 4) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Osteofitlere göre yapılan sınıflandırmada ise; 0= osteofit yok, 1= çok küçük osteofit, 2= anlamlılığı kesin olan osteofit, orta büyüklükte, 3= büyük osteofit olarak nitelendirildi. Çalışmaya katılan primer diz OA'li hastaların klinik özellikleri tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Primer diz osteoartritli hastaların klinik özellikleri

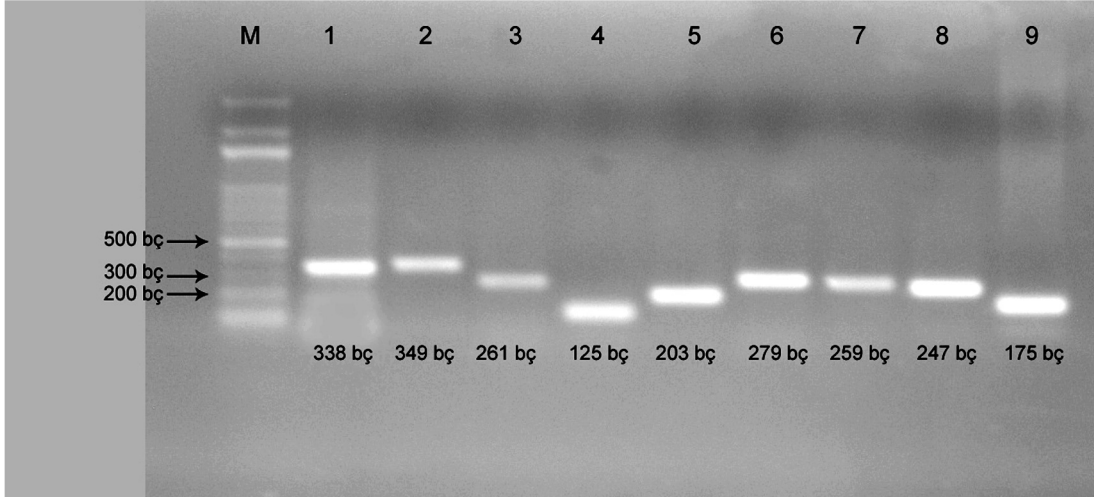
Özellikler	Bulgular
Yaş (yıl)	62,1 ± 8,7
Erkek/Kadın (n)	19/73
İlk görülme yaşı (yıl)	55,0 ± 7,8
Vücut kütle indeksi (kg/m ²)	29,5 ± 4,5
Kellgren Lawrence skalası (n): 2/3/4	28/49/10
Osteofit (n): 0/1/2/3	3/26/32/26

4.2. Smad3 Geninin 9 Ekzonunun Amplifikasyon Sonuçları

Primer diz osteoartrit tanısı konmuş 40 hasta ve 40 kontrol bireyin *Smad3* geninin 9 ekzonu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. Literatürde verilen bağlanma derecelerinde ürün elde edemediğimiz için PCR koşulları her ekzon için ayrı ayrı optimize edildi. Amplifikasyon ürünleri mutasyon taraması yapılmadan önce % 1'lik agaroz jelde 100 bç.'lik DNA markır ile elektroforetik

olarak incelendi ve ürün bantları kontrol edildi. Agaroz jel elektroforezinin UV altında görüntüsü Şekil 9'da verildi.

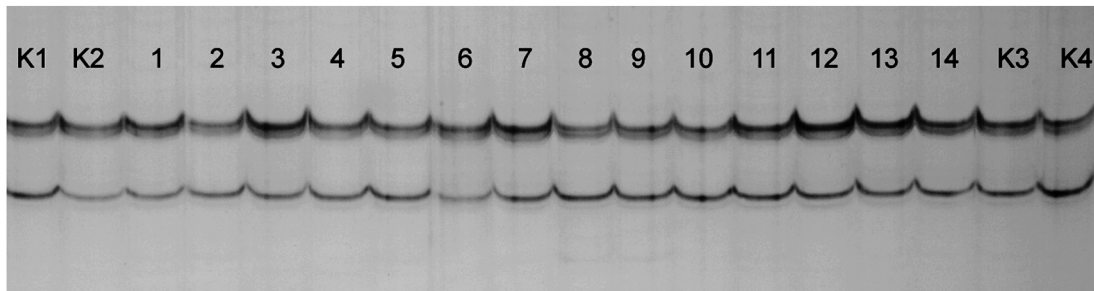
Şekil 9. *Smad3* geninin 9 ekzonunun amplifikasyon ürünleri.



4.3. *Smad3* Geninin 9 Ekzonunun SSCP Analiz Sonuçları

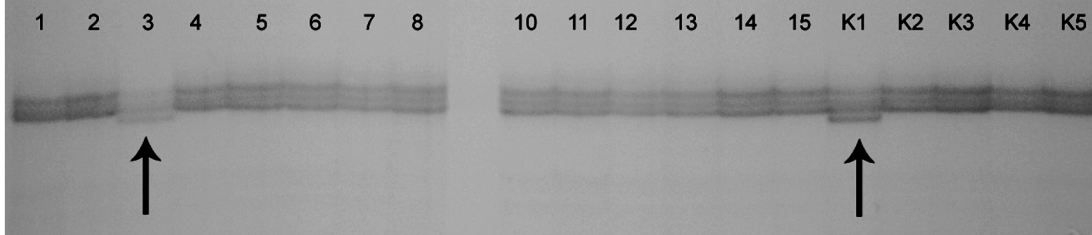
Tez projesinde belirlediğimiz, osteoartrit tanısı konmuş 40 hasta ve 40 kontrol bireyin *Smad3* geninin 9 ekzonu mutasyon tarama yöntemlerinden tek nükleotid konformasyon polimorfizmi (SSCP) analizi ile tarandı. Analiz sonucunda 1, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9. ekzonlar için farklı bir bant paterni gözlenmedi. Şekil 10'da 5. ekzonun SSCP görüntüsü örnek olarak verilmiştir. Bulgularımızı doğrulamak amacıyla, aynı bireylere farklı voltaj ve sürelerde SSCP analizleri yapıldı, bu analizlerin sonucunda da herhangi bir bant kayması gözlenmedi.

Şekil 10. *Smad3* geninin 5. ekzonunun SSCP görüntüsü



Ekzon 3'de normallerden farklı olarak 3, 24, 36 ve K1 no'lu bireylerde bant kaymaları tespit edildi. Bant kaymaları 4 bireyde de aynı karakterdeydi. 3 ve K1 no'lu bireylerin SSCP görüntüleri şekil 11'de verildi.

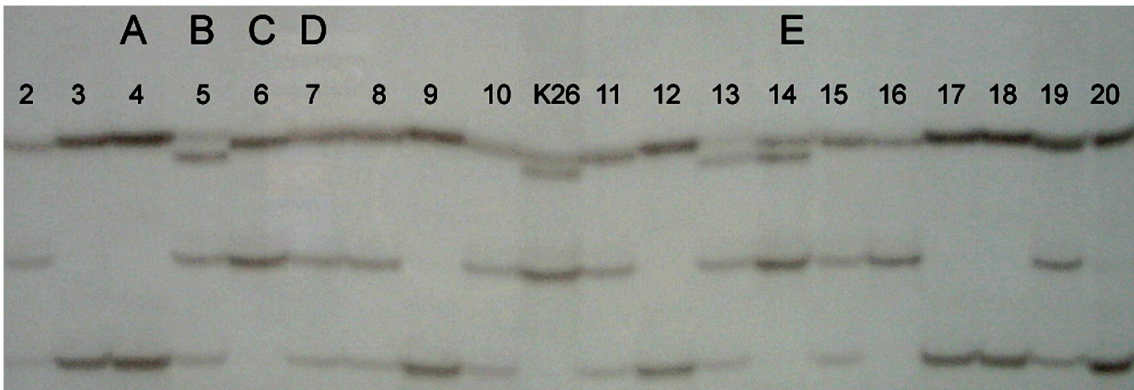
Şekil 11. *Smad3* geninin 3.ekzonuna ait SSCP görüntüsü. 3 ve K1 no'lu bant kaymaları oklarla gösterilmiştir.



K: Kontrol grubunu simgelemektedir.

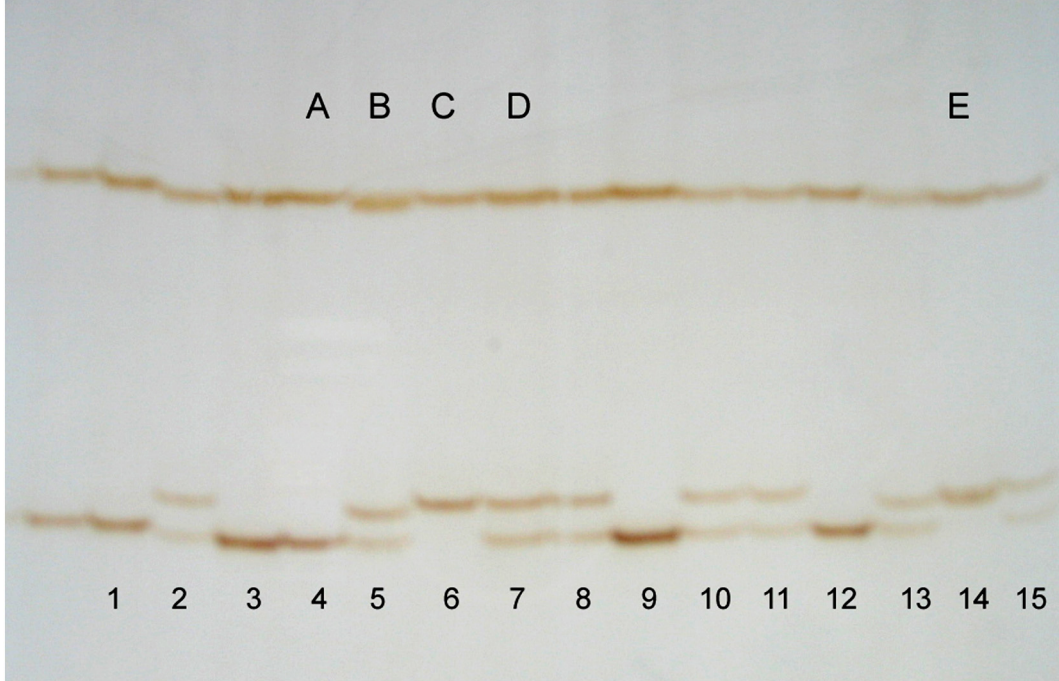
Ekzon 2'de ise beş farklı bant paterni gözlemlendi. A, B, C, D, E olmak üzere ayrı ayrı kodlanan bant paternleri şekil 12a' da gösterilmiştir. Bant paternlerini doğrulamak amacıyla, şartlarımızı değiştirdik ve SSCP analizlerini tekrarladık (şekil 12b, c). Bu analizler sonucunda da bant paternlerini aynı şekilde gözlemledik. Bant paternlerinin bireylere göre dağılımı tablo 7'de, bant paternleri ile birey sayıları ise Grafik 1'de gösterilmiştir.

Şekil 12 a. *Smad3* geninin 2. ekzonunun SSCP görüntüleri. Beş farklı bant paterni A, B, C, D ve E olarak gösterilmiştir.

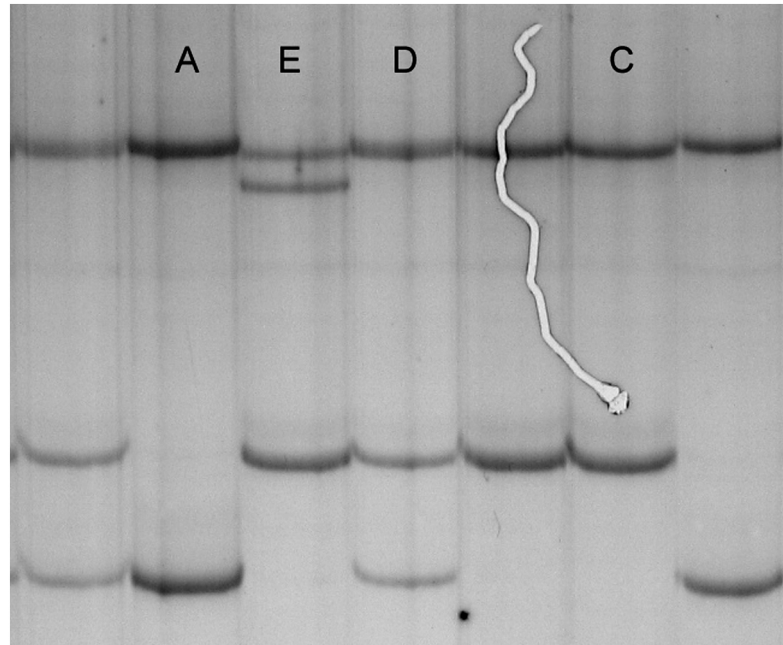


K: Kontrol grubunu simgelemektedir.

Şekil 12b. *Smad3* geninin 2. ekzonunun tekrarlanan SSCP analizi görüntüleri. Beş farklı bant paterni A, B, C, D ve E olarak gösterilmiştir.

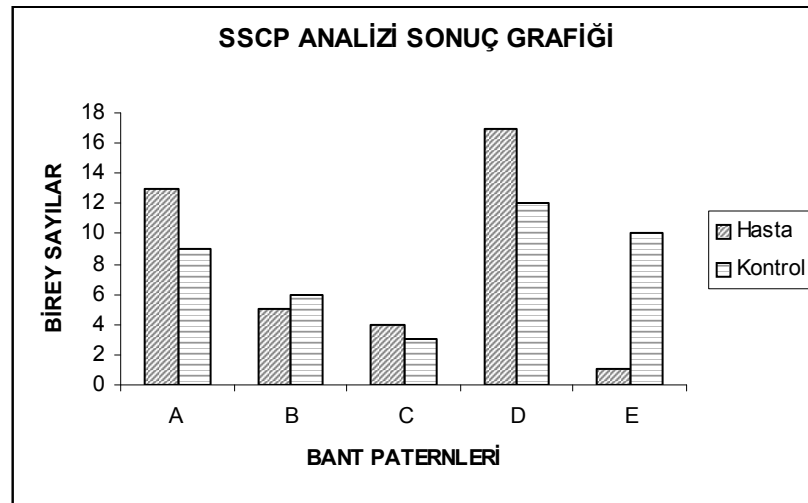


Şekil 12c. *Smad3* geninin 2. ekzonunun tekrarlanan SSCP analizi görüntüleri.



Tablo 7. *Smad3* geninin 2. ekzonunun SSCP analizinde gözlenen bant paternlerinin bireylere göre dağılımı.

Gözlenen Bant Paternleri		SSCP Analizi Yapılan Bireyler	Toplam	
A	Hasta	1 – 3 – 4 – 9 – 12 – 17 – 18 – 20 – 22 – 23 – 25 – 28 – 34	13	22
	Kontrol	K1 – K6 – K9 – K10 – K11 – K15 – K21 – K29 – K36	9	
B	Hasta	5 – 13 – 24 – 26 – 27	5	11
	Kontrol	K4 – K5 – K14 – K16 – K33 – K39	6	
C	Hasta	6 – 16 – 32 – 39	4	7
	Kontrol	K2 – K13 – K18	3	
D	Hasta	2 – 7 – 8 – 10 – 11 – 15 – 19 – 21 – 29 – 30 – 31 – 33 – 35 – 36 – 37 – 38 – 40	17	29
	Kontrol	K3 – K7 – K8 – K17 – K19 – K23 – K25 – K30 – K31 – K43 – K44 – K45	12	
E	Hasta	14	1	11
	Kontrol	K12 – K26 – K27 – K28 – K24 – K32 – K35 – K37 – K41 – K42	10	

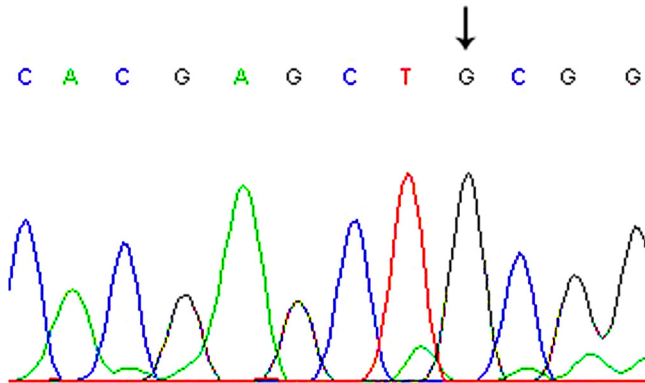


Grafik 1. *Smad3* geninin 2. ekzonunun SSCP analizinde görünen bant paternleri ve birey sayıları.

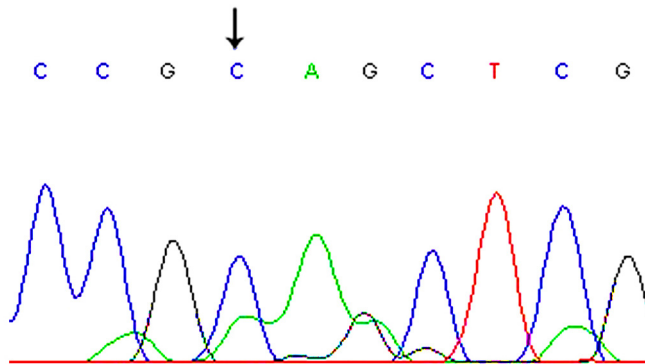
4.4. Smad3 Geninin 2. ve 3. Ekzonunun Dizi Analiz Sonuçları

4.4.1. Ekzon 2' nin Dizi Analiz Sonuçları

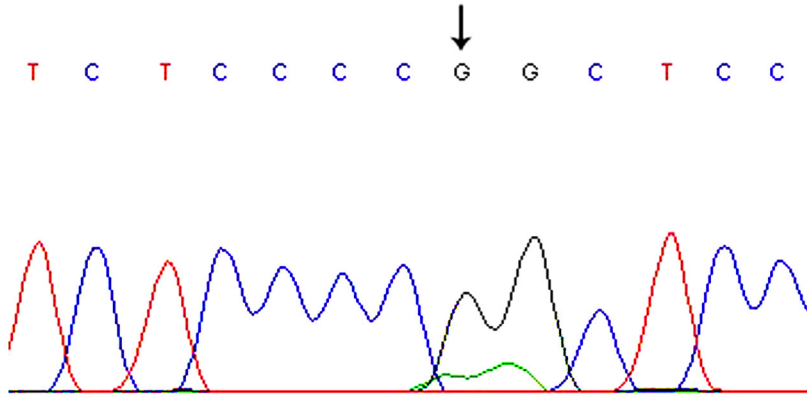
SSCP analizinde gözlemlendiğimiz beş farklı bant paternine ait numunelerden örnekler seçilerek dizi analizi yapıldı. Dizi analizi 1, 2, 3, 5, 6, 11, 28, 30, 34, K1, K2, K4, K5, K6, K14, K19, K26 no'lu bireylerin DNA örneklerine yapıldı. Dizi analizi yapılan bireylerde iki ayrı bölgede baz değişimi gözlemlendi. Bunlardan exon 2'nin 103. kodonundaki sessiz A→G transisyonu olarak saptandı (Şekil 13 a,b). Bu bölgede CTG ve CTA/CTG genotipi belirlendi, fakat CTA genotipi gözlemlenmedi. İkinci baz değişimi ise intron 2'nin 59. pozisyonundaki G→C transisyonu olarak belirlendi (Şekil 14a,b,c). Bu bölgelerin doğrulanması için iki yönlü dizi analizi yapıldı. Exon 2 için çoğaltılan bölgenin baz dizilimi ve değişen bazlar şekil 15'de verilmiştir.



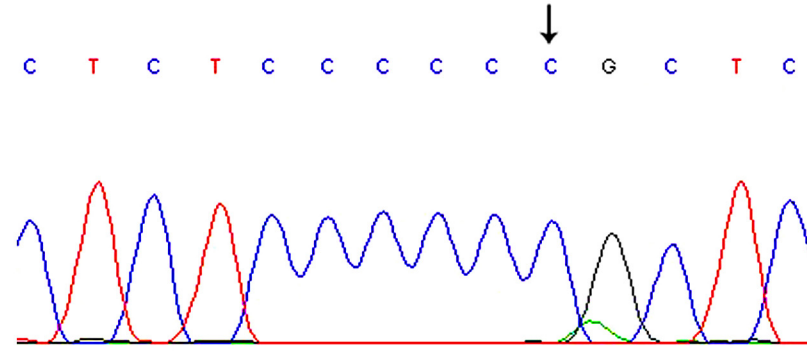
Şekil 13a. Exon 2'nin 103. kodonundaki sessiz A→G transisyonu



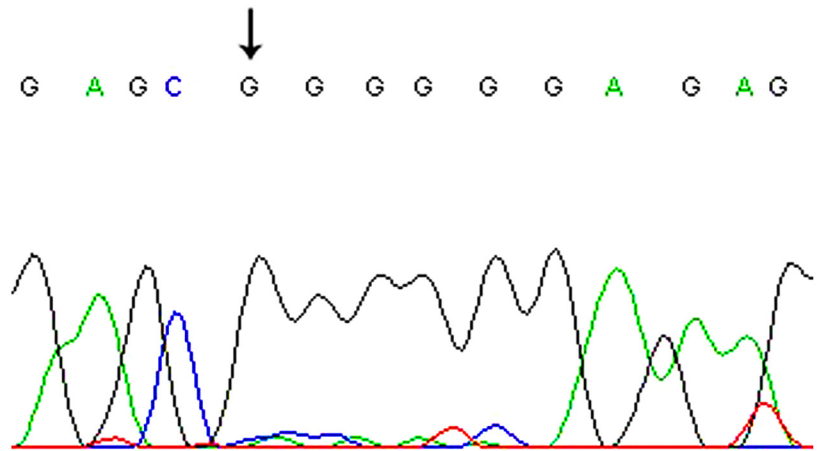
Şekil 13b. Exon 2'nin 103. kodonundaki sessiz A→G transisyonunu doğrulamak için ters dizi analizi



Şekil 14a. Intron 2'nin 59. nükleotidi normal.



Şekil 14b. intron 2'nin 59. pozisyonundaki G→C transversiyonu



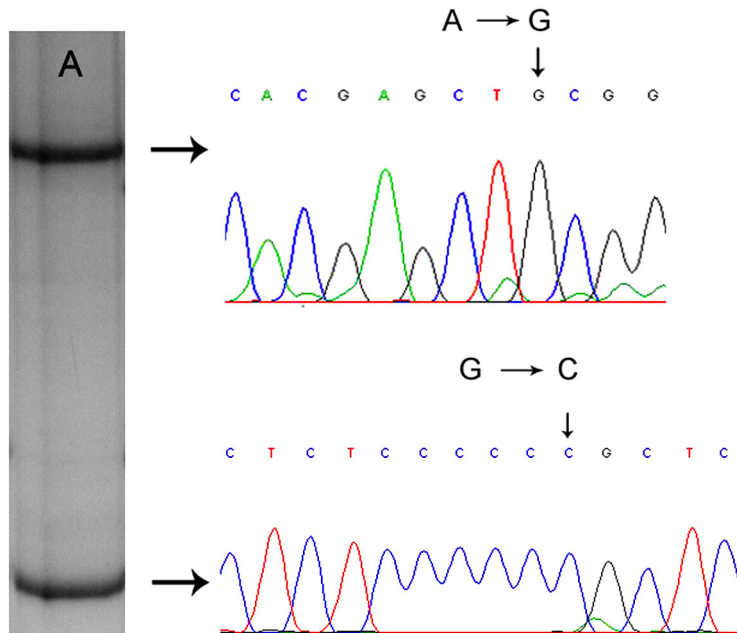
Şekil 14c. intron 2'nin 59. pozisyonundaki G→C transversiyonu için yapılan ters dizi analizi

ttccctctctttctgcccctccccgtcctggcagGTCCCTGGATGGCCGGTTGCAGGTGTC
CCATCGGAAGGGGCTCCCTCATGTCATCTACTGCCGCCTGTGGCGATGGC
CAGACCTGCACAGCCACCACGAGCT**A*****CGGGCCATGGAGCTGTGTGAGTTC***
GCCTTCAATATGAAGAAGGACGAGGTCTGCGTGAATCCCTACCACTACCAG
AGAGTAGAGACACCAG**g*****tatgctgcctggcctgcctgtggggacagcaggtgccaggggtcatcac***
ctctcccc**g*****ctccccatcccccgaggggtctgcggtgcacttgggggtc******ggggactttgggtgctggct***

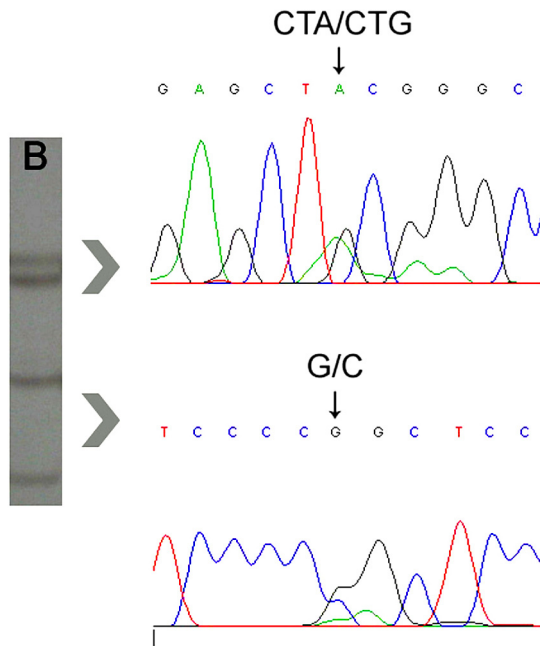
Şekil15. *Smad3*'ün 2. Ekzonunun baz dizilimi. Eğik ve kalın harfler primer dizileri, Küçük harfler intronik bölge dizilerini, büyük harfler ekzonik diziyi ifade etmektedir. Değişen bazlar çerçeve içinde gösterilmiştir.

4.4.1.1. SSCP'de Gözlenen Bant Paternlerinin Dizi Analiz Sonuçları İle Karşılaştırılması

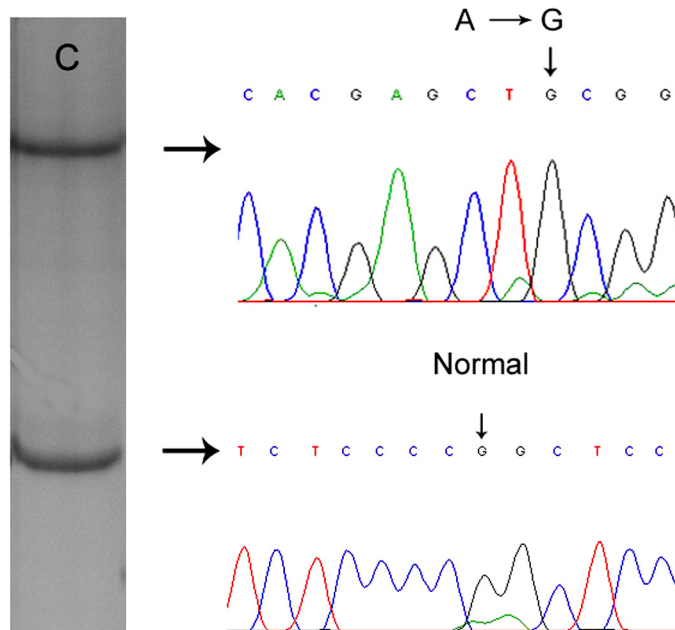
SSCP'de gözlemlediğimiz beş farklı bant paterninin dizi analiz sonuçları ile uyum gösterdiği belirlendi. SSCP'de üstte görünen bant, kodon 103'deki değişime, altta görünen bant ise intron bölgesinde yer alan 59. bazdaki değişime karşılık gelmektedir. Bu bant paternleri ve dizi analiz sonuçlarının karşılaştırması şekil 16'da verilmiştir.



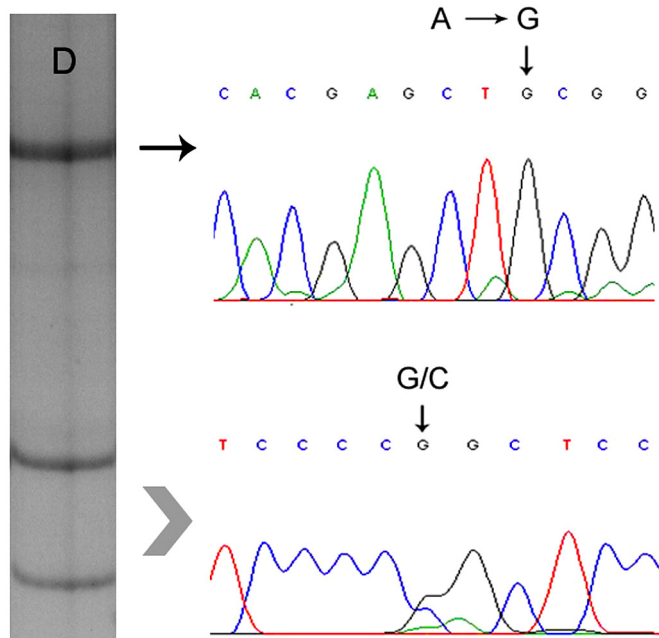
Şekil 16a. A bant paternine karşılık gelen dizi analiz sonuçları.



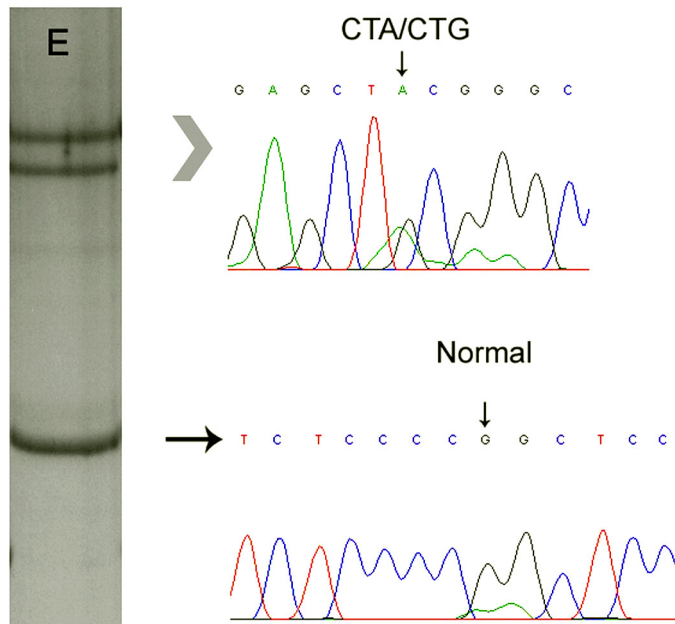
Şekil 16b. B bant
paternine karşılık gelen
dizi analiz sonuçları.



Şekil 16c. C bant
paternine karşılık
gelen dizi analiz
sonuçları.



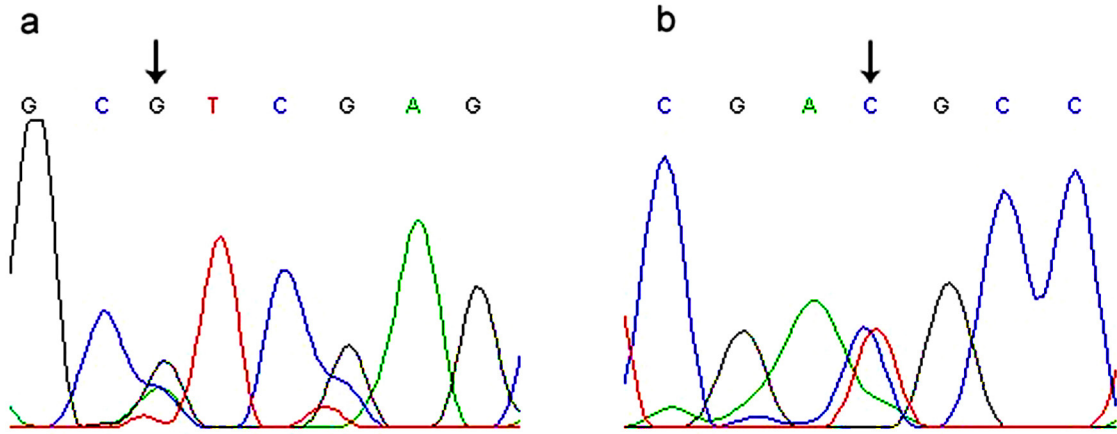
Şekil 16d. D bant paternine karşılık gelen dizi analiz sonuçları.



Şekil 16e. E bant paternine karşılık gelen dizi analiz sonuçları.

4.4.2. Ekzon 3' ün Dizi Analiz Sonuçları

Ekzon 3'de dört bireyde de görülen bant paterni aynı olduğu için hastalardan 3, kontrolden de K1 no'lu bireylerin dizi analizleri yapıldı. Dizi analiz sonuçlarında *Smad3* geninin 170. kodonunun ikinci pozisyonunda A → G transisyonu olduğu tespit edildi (şekil 17). Bu transisyon sonucu izolösin (CAT) aminoasidinin yerine valin aminoasidinin (CGT) geçtiği belirlendi.

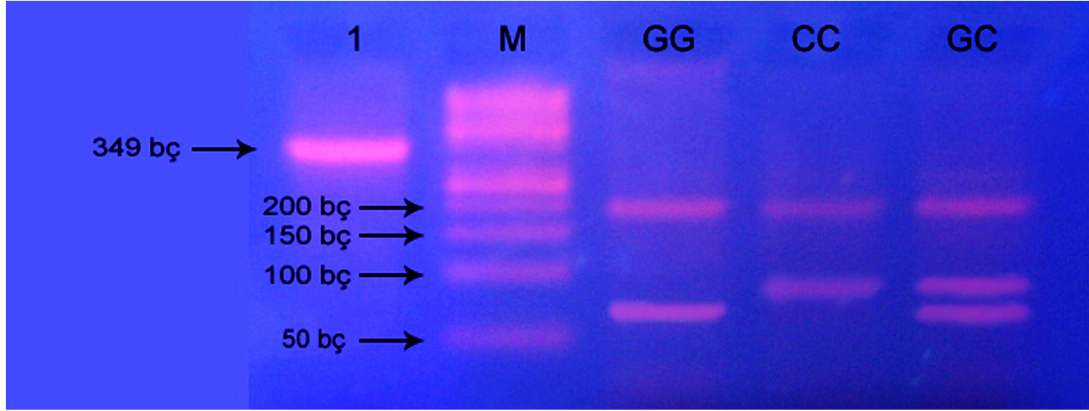


Şekil17a. Ekzon 3'ün 170. kodonundaki A→G transisyonu. b. exon 3'ün 170. kodonundaki A→G transisyonunu doğrulamak için ters dizi analizi.

4.5. İntron 2'nin 59. Pozisyonundaki G → C transversiyonunun RFLP Yöntemi ile Taranması

İntron 2'nin 59. pozisyonundaki G → C transversiyonu Bme1390I enzimi kullanılarak parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile tarandı. Enzim kesimi için 92 hasta birey ve 87 kontrol birey olmak üzere toplam 179 bireyin DNA örnekleri kullanıldı. Şekil 18'de enzim kesimi yapılan bireylerin DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü ve tablo 8'de Bme1390I enzim kesimi sonuçları verilmiştir. Ayrıca grafik 2'de hasta ve kontrol bireylerin intron 2 Bme1390I enzim kesim polimorfizmi genotipleri gösterilmiştir.

Şekil 18. İntron 2'nin Bme1390I enzim kesim polimorfizmi agaroz jel görüntüsü.

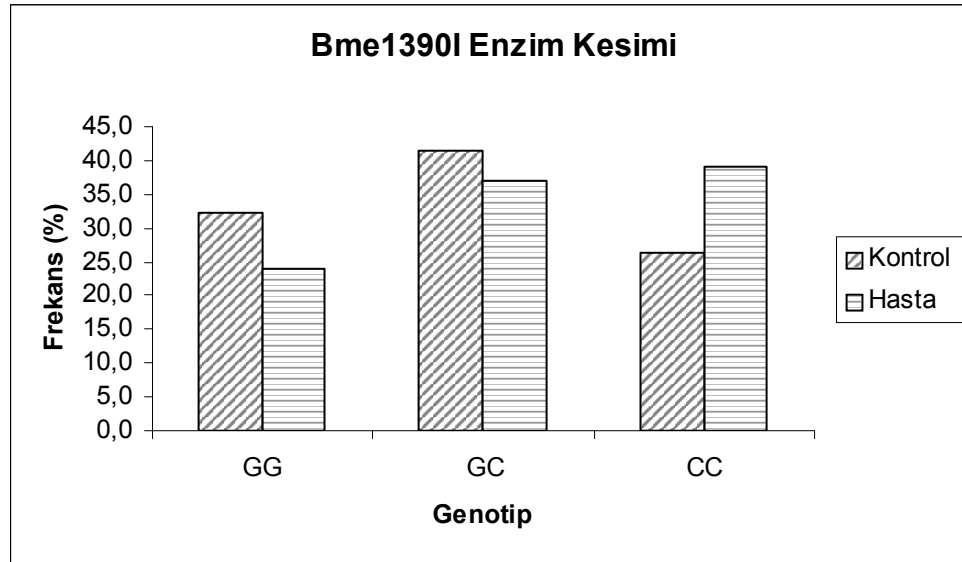


M: 50 bç DNA markırı; 1: Enzim kesimi yapılmayan amplifikasyon ürünü; GG genotipinin enzim kesim ürünleri 187 bç ve 64 bç; CC genotipinin enzim kesim ürünleri 187 bç ve 83 bç; GC genotipinin enzim kesim ürünleri 187 bç, 83 bç ve 64 bç.

Tablo 8. Bme1390I enzim kesimi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip dağılımı.

Genotip	Kontrol		Hasta		Toplam	
	Birey Sayısı	Frekans (%)	Birey Sayısı	%	Birey Sayısı	%
GG	28	32,2	22	23,9	50	27,9
GC	36	41,4	34	37,0	70	39,1
CC	23	26,4	36	39,1	59	33
	87		92		179	
	$P= 0,173$					

P: P değeri.



Grafik 2. İtron 2'nin 59. nükleotidindeki genotipler ve frekansları.

İtron 2'nin Bme1390I polimorfizmi allel frekansı açısından değerlendirildiğinde, OA hastaları ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi (Olasılıklar Oranı (OO)= 1,525, %95; Güven Aralığı (GA)=1,005-2,314; $P= 0,030$) (Tablo 9). Buna rağmen genotip ayrımı göz önüne alındığında istatistiksel açıdan herhangi bir anlam bulunamadı ($P=0,17$).

Tablo 9. Bme1390I enzim kesimi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki allel frekansları.

Allel	Kontrol		OA		P	OO (95% GA)	Toplam	
	Sayı	(%)	Sayı	%			Sayı	%
G	92	52,9	78	42,3	0,030	1,525 (1,005-2,314)	170	47,4
C	82	47,1	106	57,7			188	52,6

P : Kontrol ve hasta bireylerin Fisher's exact test ile karşılaştırmaları sonucu p değeri. OO: Olasılıklar Oranı. GA: Güven Aralığı

Tablo 10'da görüldüğü gibi, intron 2'nin Bme1390I polimorfizminin allel frekansı, hasta grubundaki kadın ve erkekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (OO= 2,21, %95 (GA)= 1,07-4,56; $P= 0,02$). Ancak genotip frekansında istatistiksel olarak herhangi bir anlam bulunamadı. Ayrıca, erkekler ve kadınlar ayrı ayrı değerlendirmeye alındığında da farklılık görülmedi.

Tablo 10. Bme1390I enzim kesimi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip ve allel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı.

Genotip	Kontrol		Hasta		Allel	Kontrol		Hasta	
	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın		Erkek	Kadın	Erkek	Kadın
GG	15 (35,7)	13 (28,9)	7 (36,8)	15 (20,5)	G	47 (56)	45 (50)	22 (57,9)	56 (38,4)
GC	17 (40,5)	19 (42,2)	8 (42,1)	26 (35,7)					
CC	10 (23,8)	13 (28,9)	4 (21,1)	32 (43,8)	C	37 (44)	45 (50)	16 (42,1)	90 (61,6)
	42	45	19	73		84	90	38	146
	$P^a = 0,97$ $P^c = 0,76$ $P^b = 0,25$ $P^d = 0,15$					<u>OO (95% GA)</u> 0,92 (0,42-2,00) $P^a = 0,50$ 1,61 (0,95-2,73) $P^b = 0,05$ 1,27 (0,70-2,31) $P^c = 0,26$ 2,21 (1,07-4,56) $P^d = 0,02$			

P^a : Kontrol ve Hasta grubu erkek bireylerin karşılaştırılması sonucu p değeri, P^b : Kontrol ve Hasta grubu kadın bireylerin karşılaştırılması sonucu p değeri, P^c : Kontrol grubunda kadın ve erkek bireylerin karşılaştırılması sonucu p değeri, P^d : Hasta grubunda kadın ve erkek bireylerin karşılaştırılması sonucu p değeri. OO: Olasılıklar Oranı. GA: Güven Aralığı. Parantez içinde yüzde frekanslar verilmiştir.

OA başlama yaşını değerlendirmek için, 55 yaş altı bireyler erken dönem, 55 yaş üstü ise geç dönem olarak belirlendi. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, başlama yaşı ve intron 2 Bme1390I polimorfizmi allel ve genotip frekansları arasında herhangi bir anlam bulunamadı (Tablo 11).

Tablo11. Osteoartrit başlama yaşı ve Bme1390I polimorfizmi genotip ve allel frekansları.

Genotip	OA Başlama Yaşı		Allel	OA Başlama Yaşı	
	Erken	Geç		Erken	Geç
GG	6 (15,8)	13 (26,0)	G	29 (38,2)	42 (42,0)
GC	17 (44,7)	16 (32,0)		C	47 (61,8)
CC	15 (39,5)	21 (42,0)			
	$P^a = 0,37$		OO (95% GA) 0,85 (0,46-1,57) $P^b = 0,36$		

P^a : Genotip frekanslarının p değeri, P^b : Allelik frekansların p değeri
OO: Olasılıklar Oranı. GA: Güven Aralığı. Parantez içinde yüzde frekanslar verilmiştir

Kellgren Lawrence (K/L) skalası 3 – 4 olan hastalar radyografik olarak şiddetli OA, 1 – 2 olanlar orta şiddetli OA olarak tanımlanmaktadır. Tablo 12’de görüldüğü gibi orta şiddetli ve şiddetli OA hastalarının Bme1390I polimorfizmleri genotip frekansı, kontrol bireyler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P^a = 0,18$; $P^b = 0,24$). Allel frekansları kontroller ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında ise şiddetli OA hastaları ile kontrol grubu Bme1390I polimorfizmi arasında anlamlı bir fark bulunurken ($P^d = 0,037$), orta şiddetli OA hastaları ve kontroller arasında fark yoktu ($P^c = 0,053$).

Çalışmaya katılan bireylerin vücut kütle indeksi (BMI) 25’in altında olanlar normal, 25’in üstünde olanlar ise kilolu olarak değerlendirildi. Bme1390I polimorfizmi, normal ve kilolu bireyler arasında karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($P = 0,31$). Aşırı kilolu (BMI>30) bireyler normal bireylerle değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P = 0,22$). Bunun yanında hasta ve kontrol grupları arasında da BMI açısından bir ilişki gözlenmedi ($P = 0,30$).

Tablo12. Kellgren Lawrence skalası ve Bme1390I polimorfizmi genotip ve allel frekansları.

Genotip	K/L Skalası		Allel	K/L Skalası	
	Orta	Şiddetli		Orta	Şiddetli
GG	6 (21,4)	14 (23,7)	G	22 (39,3)	49 (41,5)
GC	10 (35,7)	21 (35,6)		C	34 (60,7)
CC	12 (42,9)	24 (40,7)			
	$P^a = 0,18$ $P^b = 0,24$		OO (95% GA) 0,58 (0,31-1,07) $P^c = 0,053$ 0,63 (0,40-1,02) $P^d = 0,037$		

P^a : K/L skalasına göre orta şiddetli OA hastaları ile kontrol bireylerin genotip frekanslarının p değeri, P^b : K/L skalasına göre şiddetli OA hastaları ile kontrol bireylerin genotip frekanslarının p değeri P^c : K/L skalasına göre orta şiddetli OA hastaları ile kontrol bireylerin allelik frekansların p değeri, P^d : K/L skalasına göre şiddetli OA hastaları ile kontrol bireylerin allelik frekansların p değeri OO: Olasılıklar Oranı. GA: Güven Aralığı. Parantez içinde yüzde frekanslar verilmiştir. K/L: Kellgren Lawrence

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kondrositleri ve hücre dışı matriksi (ECM) içeren eklem kıkırdağının azalan hacmi ve organizasyon bozukluğu OA'li eklemde temel özelliğidir (67). Kondrositlerin yetersiz miktarda uyarı (sitokin sinyalleri) alması hasara neden olur ve çoğunlukla OA ile sonuçlanır (68).

TGF- β 1 konsantrasyonundaki değişiklikler olgunlaşma sürecindeki sağlıklı tavşan dizinde ve osteokondral hasar ile spontan onarıma maruz kalan erişkin hayvanlarda araştırılmış, TGF- β 1 konsantrasyonunun genç hayvanlarda yüksek ve yenilenme kapasitesinin çok iyi olduğu bildirilmiş, ancak erişkin tavşanların osteoartritik değişimlere daha yatkın olduğu görülmüştür (69).

Kondrosit gelişiminin regülasyonu ve matriks gen transkripsiyonu üzerine TGF- β 'nin etkisi iki farklı sinyal yolu ile gerçekleşmektedir (44). Rat eklem kondrositlerinde TGF- β , mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz I' i (MEK I) spesifik olarak aktive eder ve daha sonra hücre dışı sinyal tarafından düzenlenen kinaz (ERK) yolunu uyarır. Bu MAPK yolunun aktivasyonu TGF- β 1 için mitojenik yanıt olur (70). MEK-ERK yolu da TGF- β ile aktive olur ve PKC tarafından transaktivasyonu gerçekleşir (71).

TGF- β /Smad3 sinyalleri, kondrositlerin terminal hipertrofik farklılaşmasını inhibe eder ve eklem kıkırdağının bütünlüğünün korunması için gereklidir. *Smad3*'ün ekzon8'i hasara uğratılan homozigot mutant bir farede insan OA'ne benzer dejeneratif eklem hastalığı geliştiği bildirilmektedir. Smad proteinlerinin kondrosit metabolizması üzerine TGF- β etkilerinde aracı rolü oynadığı araştırılmış, Smad2 ve Smad3'ün kondrosit olgunlaşmasında TGF- β 1 sinyallerine inhibitör etkiler oluşturan önemli araçlar olarak rol aldığı tespit edilmiştir (15).

R-Smadlar, yüksek derecede korunmuş iki globuler domain içerir, MH1 ve MH2 olarak adlandırılan bu domainler, çok çeşitlilik gösteren bağlantı (linker) bölgesi ile birleştirilirler. MH1 domaini DNA'ya bağlanır, bunun yanında MH2 domaini de fosforilasyonunun aktivasyonu için reseptörlere bağlanır, MH2'nin

bağlandığı bu reseptörler, hücre çekirdeğine taşınmada gerekli nukleoporinler ve transkripsiyonun düzenlenmesinde gerekli çok sayıda yardımcı proteinler olabilmektedir (72).

Çok sayıda serin ve treonin rezidüsü içeren bağlantı bölgesindeki farklılıklar, R-Smadların çok yönlü sinyal girişi ile düzenlenmesine olanak sağlar. Smad1'in bağlantı bölgesi, MAPK ve Smad2/3 prolin-directed kinazlar için fosforilasyon alanları içerir. Erk MAPK'da bu bölgelerin fosforilasyonuna aracılık eder. Siklin dependent kinaz 2 ve 4'ün, Smad2 ve 3'ün linker bölgesi ile N-terminal ucunun fosforilasyonlarına aracılık ettikleri, ayrıca p38MAPK ve JNK'nın (Jun N-terminal Kinaz) da Smad2/3'ün linker bölgesinin fosforilasyonunun yanında transkripsiyonel aktivitesini de düzenledikleri bildirilmiştir. R-Smadların bağlantı bölgesi, transkripsiyonel aktivasyon bölgesinin yanında ubiquitinasyon bölgesine de sahiptir (72).

Smad proteinlerinin transkripsiyonel aktivasyonu üzerine yapılan araştırmalar, multiple proteinlerin ve çeşitli promotor elemanların rol aldığı karmaşık bir yapıyı göstermiştir. PCR tabanlı rastgele-oligonükleotid seçim metodu kullanıldığında, 8 bç'lik palindromik DNA dizisi 5'-GTCTAGAT-3' Smad-bağlanma elemanı (SBE) olarak tanımlanmış ve geniş DNA mutagenesis çalışmalarında SBE'nin Smad3 ve Smad4 için optimal DNA bağlanma dizisi olduğu doğrulanmıştır (73).

Smad3 MH1 domaini, SBE dizisi içeren 16 bç DNA'ya bağlanma kabiliyetine sahiptir. Bilinen katlanma yapılarına çok az benzerlik gösteren bir katlanma Smad MH1 domaini içerisinde gösterilmiştir. MH1 domaini içerisinde yeni DNA-bağlanma motifi olarak tanımlanan 11-rezidü β -hairpin, DNA bazları ve major kıvrımdaki fosfat iskeleti ile özel bağlantılar oluşturmaktadır. Smad MH1 domaininin DNA ya bağlanma aktivitesinde su moleküllerinin çok önemli bir rol oynadığı ve Smad bağlanma elemanı, MH1 domaini, spesifik bazlar ve fosfatazlar arasındaki bağlantılara aracılık ettiği bildirilmiştir. MH1 domainine bağlı çinko atomu DNA bağlanma aktivitesinde önemli bir yer tutar. EDTA ile çinkonun uzaklaştırılması azalan DNA bağlanma aktivitesi ile sonuçlanır (73).

Transkripsiyon faktörleri ile etkileşime ek olarak Smad3, transkripsiyon faktörü gibi etki eden nuklear reseptörlerden, vitamin D reseptörü (VDR) ve androjen reseptörü (AR) ile de birebir etkileşime girebilir. Smad3 ün aşırı ekspresyonu VDR'nin transaktivasyon fonksiyonunu uyarır. Buna ek olarak TGF- β 1 ve vitamin D, osteokalsin promotörlerinin aktivasyonunu VDR'nin aracılığı ile sağlar ve VDR fonksiyonu için *Smad3* gereklidir (74).

Yukarıdaki bilgiler göz önünde tutulduğunda, TGF- β sinyal iletim yolu ve bu yolun aracı moleküllerinden Smad3'ün kıkırdak metabolizmasında önemli rol oynadığı görülmektedir. TGF- β 'nin büyüme hormonu olması, araştırmacıları daha çok kanser çalışmaları üzerine yoğunlaştırmıştır, OA patogenezindeki rolü ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Osteoartrit çalışmalarında bazı genlerin OA ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Özellikle kıkırdak bileşenlerini oluşturan proteinleri kodlayan genler ilk etapta aday genler listesine alınmış ve bunlar üzerine çalışmalar yürütülmüştür. Kıkırdak bileşenlerini kodlayan genlerin yanında, bu genlerin aktivitesini kontrol edecek molekülleri kodlayan genlerin de osteoartritde önemli rolü olacağını düşünmekteyiz. Bu amaçla TGF- β sinyal iletim yolundaki aracı molekül olan *Smad3* genindeki mutasyonların veya polimorfizimlerin hastalıkla ilişkisi olabileceğini düşündük.

SSCP yöntemi ile taradığımız *Smad3* geninin 2. ve 3. ekzonlarda bant kaymaları tespit ettik. Ekzon 3'de hasta grubundan 3, kontrol grubundan da 1 bireyde farklı bant paterni gözledik. SSCP sonuçlarını yorumlayabilmek için bant kayması görülen bireylerde yapılan dizi analizi sonucunda *Smad3* geninin 170. kodonunda 2. pozisyonundaki adenin yerine guanin geçtiğini ve farklı bant paterni tespit edilen bireylerin tümünün heterozigot karakterde olduğunu tespit ettik. Sonuçta izolösini kodlayan "CAT" kodonu, A→G transisyonu sonucu valin aminoasidini kodlayan "CGT" tripletine dönüşmüştür. 170. kodon *Smad3* geninin çok önemli fosforilasyon alanları içeren bağlantı bölgesinde yer alır. Çok sayıda serin ve treonin rezidüsü içeren bu bağlantı bölgesindeki farklılıklar, R-Smadların çok yönlü sinyal girişi ile düzenlenmesine olanak sağlamaktadır (72).

Bugüne kadar yaptığımız literatür çalışmalarında, exon 3 üzerindeki bu varyantın yayınlanmadığını gördük. Araştırmalarımızın sonucunda, bu varyantın tek nükleotid polimorfizim (SNP) veri bankasına “rs35874463” kodu ile kayıtlı olduğunu tespit ettik. Buradaki verilere göre, tamamı kadınlardan oluşan bir popülasyon taraması esnasında 32 birey değerlendirilmiş ; allel frekansları A: 0,938 ve G: 0,062 olarak belirlenmiş, genotip frekansları ise A/A: 0,875, A/G: 0,125 olarak verilmiştir (75). Çalışmamızda ise A/G genotipine sahip bireylerin 3’ü kadın, 1’i erkekti. Genotip ve allel frekanslarını hesap etmek için, SSCP yapılan hasta ve kontrol grupları birleştirilerek 80 birey değerlendirmeye alındı. Sonuçlarımıza göre, allel frekansı; A: 0,975, G: 0,025, genotip frekansı A/A: 0,95, A/G: 0,05 olarak bulundu. Türk popülasyonu için ilk defa verilen ekzon 3’deki tek nükleotid polimorfizim frekansının kullanılmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

Yaptığımız araştırmalarda, bulduğumuz SNP ile ilgili herhangi bir bağlantı çalışmasına rastlamadık. Bulgularımıza göre *Smad3* geni ekzon 3 bölgesindeki polimorfizimin, primer diz osteoartriti ile ilişkisi olabileceğini düşünüyoruz. *Smad3* geninin genomik yapısını ve kolon kanserinde gen üzerindeki farklılıkları yayınlayan Arai ve arkadaşları ile yine kolon kanserinde *Smad3* genini çalışan Fukushima ve arkadaşları, SNP ile ilgili bir bulguya rastlamamışlardır (65, 66). *Smad3* geni, Çin popülasyonunda 32 OA’li hasta ve 50 kontrol bireyle çalışılmış, bir hastada, ekzon 4’de 197. kodonda tek nükleotid mutasyonu bulunmuş ve mutasyon OA ile ilişkilendirilmiştir (1). Bulgularımızda ekzon 4 bölgesinde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Bulgulardaki farklılıkların, mutasyonların ve SNP’lerin popülasyonlara göre çeşitlilik göstermesinden kaynaklandığı düşüncesindeyiz.

Smad3’ün 3. ekzonunda tespit ettiğimiz transisyonun, proteinin fosforlama kabiliyetini azaltabileceği veya üç boyutlu yapısındaki değişiklik ile, ilgili proteinlerle etkileşimini engelleyebileceği kanaatindeyiz. Bütün bu değişimler hedef genin ekspresyonunu azaltabilir veya arttırabilir. Hasta grubunda üç bireyde gözlemediğimiz A → G transisyonunun, hastalıkla doğrudan ilişkili

olabileceği düşüncesi ile kontrol grubunda A→G transisyonuna rastladığımız bireyin tekrar muayenesi yapıldı. Hastada, diz ağrılarının yeni başlamasına rağmen radyografik bulgular OA olarak değerlendirilmesi için yeterli değildi. SNP bulduğumuz kontrol grubundan K1 no'lu bireyin takibi devam etmektedir.

Ekzon 2' nin SSCP analizi sonucunda beş farklı bant paterni tespit ettik. Bant paternlerindeki farklılığın ekzon 2 içerisinde birden fazla mutasyon veya polimorfizm ile ortaya çıkabileceğini düşündük. Bant paternlerinin çalışmaya katılan bireylere göre dağılımını incelediğimizde E bant paternine sahip bireylerin 10'unun kontrol, birinin ise hasta birey olduğunu tespit ettik. Diğer bant paternlerindeki kontrol ve hasta birey sayıları ise birbirine yakındı. *Smad3* geninin ikinci ekzonunun SSCP analizinde E bant paternine sahip bireylerin kontrol olma olasılığının yüksek olması, bu bireylerin genotiplerinin normale en yakın olma olasılığını akla getirdi. SSCP sonuçlarının en doğru şekilde değerlendirilebilmesi için 17 numuneye ekzon 2 için DNA dizi analizi yapıldı. Dizi analizi sonucunda ekzon 2'nin 103. kodonunda A→G transisyonu ve intron 2'nin 59. pozisyonunda G→C transversiyonu tespit edildi. Amplifiye ettiğimiz ekzon 2 bölgesinde iki farklı polimorfizimin bulunması, SSCP analizindeki beş farklı bant paternini açıklıyordu. Bu polimorfizimlerin, heterozigot veya homozigot olmalarına göre de bant çeşitliliği ortaya çıkıyordu.

CTA tripleti tarafından kodlanan *Smad3* geninin 103. kodonundaki A→G transisyonu sonucu CTG ve CTA/CTG genotiplerinin oluştuğu görüldü. CTA tarafından kodlanan lösin aminoasidinin, CTG kodonuyla da kodlanması nedeniyle buradaki transisyon sessiz mutasyondur. Dizi analizi sonuçlarına göre normal CTA genotipinin hasta ve kontroller arasında bulunmadığı görüldü. Kolon kanseri ve *Smad3* geni ile yapılan çalışmalarda da 103. kodondaki sessiz A→G transisyonu tespit edilmiş, bunlardan yalnızca bir tanesinde normal CTA (%2), %76'sında homozigot CTG, %22'sinde ise heterozigot CTA/CTG genotipi bulunmuştur (65).

103. kodonda bulduğumuz sessiz A→G transisyonu, *Smad3* yapısal elemanlarından MH1 domaini içerisinde bulunur. MH1 domaini diziyeye özgül DNA

bağlanma özelliği olan bölgedir ve Smad3 proteinin fonksiyonunda önemli bir yere sahiptir (73). Ayrıca MH1 domaini, MH2 domainin fonksiyonunu negatif olarak düzenleme yeteneğine sahiptir. Buradaki sessiz transisyonda aminoasit değişikliği olmadığı için MH1 domaini içerisinde ne yönde bir etkiye sahip olduğunu tahmin etmemiz güçtür. A→G transisyonunun Smad3 fonksiyonunu ne şekilde etkilediği, sinyal iletim mekanizması üzerinde yapılacak ileri araştırmalar ile tespit edilebilecektir.

SNP veri tabanını taradığımızda, 103. kodondaki sessiz A→G transisyonunun “rs1065080” kodu ile kodlandığını tespit ettik ve değişik popülasyon frekanslarına ulaştık. Verilere göre G alleli frekansı, A allele göre daha fazla ve G/G genotip frekansında %70 - %100 arasında değişmektedir. Tablo 13’de çeşitli popülasyonlar için SNP frekansları verilmiştir.

Tablo13. *Smad3* geninin 103.kodonunda tek nükleotid polimorfizm genotip frekanslarının çalışılan merkezlere göre dağılımı.

Çalışan Merkez	Kişi sayısı (2n)	Gözlenen Genotip Frekansı		
		A/A	A/G	G/G
WICVAR	60	0.067	0.233	0.700
PERLEGEN	48			1.000
PERLEGEN	46		0.261	0.739
PERLEGEN	48	0.083	0.250	0.667
ABI	120	0.017	0.183	0.800
ABI	90	0.067	0.267	0.667
ABI	90	0.022	0.378	0.600
ABI	120	0.017	0.200	0.783
APPLERA	74	0.027	0.270	0.703

http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/SnpInfo.cgi?SNP_ID=IMS-JST040779

Smad3 geni üzerinde bulduğumuz diğer polimorfizm ise intron 2 bölgesinin 59. pozisyonunda G→C transversiyonudur. SSCP analizindeki bant çeşitliliği incelendiğinde alttaki bantın üç farklı patern verdiğini gördük ve dizi analiz sonuçları ile değerlendirdiğimizde bu polimorfizimin frekansının hasta ve

kontrol genotipleri arasında farklı olabileceğini düşündük. Hasta ve kontrol sayısını arttırarak bu polimorfizimin genotip ve allel frekanslarını tespit etmeyi amaçladık. SSCP analizinin zahmetli ve yavaş ilerlemesi, dizi analizinin ise masraflı olduğunu göz önünde tutarak, bu polimorfizimi belirlemek için hızlı tarama yöntemi geliştirdik. “www.ensembl.org” web adresinden ilgili gen bölgesinin dizisine ulaştık ve buradaki enzim kesim bölgelerini değerlendirdik. Sonuçta “CC / NGG” tanıma bölgesine sahip Bme1390I enzimi ile 59. pozisyonundaki G→C transversiyonunu tespit edebileceğimizi düşündük. Amplifiye ettiğimiz bölge içerisinde Bme1390I enzimi için normal genotipte (GG) altı farklı tanıma bölgesi bulunurken, homozigot (CC) beş farklı tanıma bölgesi vardı, böylece G→C transversiyonu ile bir tanıma bölgesinin kaybolduğunu tespit ettik.

Bme1390I enzim kesim metodunu laboratuvarımızda uygulamaya başladıktan sonra, SSCP analizi yaptığımız 40 hasta ve 40 kontrol birey sayılarını 92 hasta ve 87 kontrol olmak üzere toplam 179 bireye çıkartarak intron 2'nin 59. pozisyonundaki G→C transversiyonunu hızlı bir şekilde taradık. Allel frekansı bakımından değerlendirdiğimizde C allelinin OA'li hasta grubunda, kontrol grubuna göre farklı olduğunu gördük ($p=0,030$). Ancak allel frekansı anlamlı olmasına rağmen genotip frekansı anlamlı bulunmadı. Farklı genlerle yapılan bağlantı çalışmalarında da allel ve genotip frekansları arasında farklılık tespit edildiği belirlendi. Örneğin, Kore popülasyonunda ER- α geninde BtgI polimorfizminin araştırıldığı bir çalışmada, OA ve kontrol bireyler arasında allel frekansı anlamlı fakat genotip frekansı anlamlı bulunmamış ve allel frekansı dikkate alınmıştır (76). Bu çalışma, Isparta popülasyonunda primer diz osteoartriti ile *Smad3* geni Bme1390I polimorfizmi arasında bağlantı olduğunu ortaya koyan ilk çalışmadır.

Arai ve arkadaşları, Japon popülasyonunda 50 sağlıklı birey ile yaptıkları çalışmada, sağlıklı bireylerdeki genotip frekansını; G/G: %42, G/C:%40, CC: %18 olarak bulmuşlardır (65). Verilerimize göre kontrol bireylerde genotip frekansları; G/G: %32,2 G/C:%41,4, CC: %26,6 olarak belirlenmiş ve genotip

frekansları açısından, Japon popülasyonu verileri ile bulgularımız arasında farklılıklar olduğu görülmüştür. Isparta ve yöresinde primer OA'li hasta grubunun C/C genotip frekansı (%39,1) ile Japon popülasyonunun C/C (%18) genotipi arasında iki kat daha fazla fark olduğu gözlemlendi. Isparta ve yöresindeki çalışmamız için ortalama genotip frekansı ise G/G: %27,9 G/C:%39,1, CC: %33 olarak belirlendi.

Bme1390I polimorfizminin allel ve genotip frekansı cinsiyete göre değerlendirildiğinde, hasta grubundaki kadın ve erkekler arasında allel frekansı istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,02$), C alleli frekansı kadın hastalarda, erkeklere göre daha fazlaydı. Elli yaş altında erkeklerde OA prevalansı daha yüksek iken, menopozal östrojen kaybı ile birlikte elli yaşından sonra prevalans kadınlarda daha yüksek olmaktadır. Çoğu zaman menopoza yakın veya hemen menopoz sonrasında OA gelişimi etyolojinin hormonal bir temele dayandığını göstermektedir (3). Bulgularımız, cinsiyetin önemli bir risk faktörü olduğu primer OA'de, Bme1390I polimorfizmi ve cinsiyet arasındaki farklılıklarında ortaya koymuştur, özellikle hasta ve kontrol kadın bireylerin C/C genotipi arasındaki farklılık dikkat çekicidir.

Primer diz OA'li hasta grubu için OA başlama yaş ortalaması 55 olarak bulundu ve bu değer altı erken, üstü geç başlangıç olarak değerlendirildi. Başlama yaşı ve intron 2 Bme1390I polimorfizmi allel ve genotip frekansı arasında herhangi bir anlam bulunamadı. Yaşa bağlı olarak artan osteoartrit, tamir mekanizmaları yanıtının ve nöromusküler fonksiyonun azalması sonucunda eklem bütünlüğünün muhafaza edilememesi ve hasarlanma olasılığının yükselmesi gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir (3). Tüm bu süreçleri hızlandıran aday bir gen, belki de yaş ve OA arasındaki bağlantıyı açıklayabilir.

Osteoartrit teşhisinde ve radyografik olarak şiddetinin belirlenmesinde Kellgren Lawrence (K/L) skalası önemli bir yer tutar (63). Çalışmamıza K/L skalası 2 ve üzeri olan bireyler dahil edildi 2= orta şiddetli, 3 ve 4 şiddetli olarak tanımlandı. Şiddetli OA hastaları ve kontrol grubu ile Bme1390I polimorfizmi allel

frekansı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($P=0,037$) bulunurken, genotip frekansı açısından farklılık yoktu. Orta şiddetli OA hastaları ile kontrol grubu arasında ise istatistiksel bir fark bulunamadı. C allel frekansının radyografik olarak şiddetli OA hastalarında farklı olması, C allelinin hastalığın şiddeti ile ilişkili olabileceğini düşündürdü. Biliyoruz ki, sadece bir faktör hastalığı ortaya çıkarmaya veya şiddetini belirlemeye yetmez. Çünkü osteoartrit multifaktöriyel bir hastalıktır ve çevre şartları da hastalığın oluşmasında ve ilerlemesinde önemli bir yer tutar. Örneğin, eğilme ve taşıma ile ilgili meslek grubu OA için risk altındadır ve genetik faktörlerin etkisi ile hastalığın şiddeti ortaya çıkabilir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan uzun süreli Framingham çalışması ve buna bağlı çalışmalar, diz OA'i ile ileri yaşlarda OA için zemin hazırlayan obezite arasında önemli bağlantılar bulmuşlardır. Obezitenin neden olduğu mekanik yüklenme kıkırdak bozulmasına yol açabilir ve ayrıca aşırı yağ dokusu anormal hormon seviyeleri oluşturabilir. Bunun sonucunda, yıllar içerisinde diz OA'i gelişimi ortaya çıkabilir (3). Çalışmamıza katılan bireylerin boy ve kilo değerleri alınarak vücut kütle indeksleri (BMI) hesap edildi. Vücut kütle indeksleri 25'in altında olanlar normal, üstünde olanlar kilolu kabul edildi. Normal ve kilolu bireyler arasında Bme1390I polimorfizmi değerlendirildiğinde, genotip ve allel frekansları bakımından anlamlı bir fark bulunamadı. Ayrıca hasta ve kontrol gruplarında, BMI'nin OA ile ilişkisi değerlendirildiğinde farklılık olmadığı görüldü. Çalışma grubuna katılan bireylerin ortalama BMI değeri $29,5\pm 4,5$ olarak hesaplandı. Kore'de osteoartrit ile yapılan bir çalışmada araştırmaya katılan bireylerin ortalama BMI değeri $25,2\pm 2,9$ arasında verilmiştir (1). Kore popülasyonunda OA ve obezite arasındaki ilişkinin genetik faktörlerden daha az olduğu söylenebilir.

Bir çok çalışmada TGF- β sinyallerinin, eklem kıkırdağının normal yapısının korunmasında önemli bir role sahip olduğu bildirilmiş ve özellikle TGF- β 1'in insan OA'i ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. (77). Önceki çalışmalar, *Smad3* kaybını, immün yanıtın bozulması, azalan kemik yoğunluğu ve kolon kanseri ile

ilişkilendirmiştir. *Smad3* gen mutasyonu taramalarında en çok insan kanserleri çalışılmış ve başarısızlıkla sonuçlanmıştır (65, 66, 1). *Smad3* ve OA ilişkisini ortaya koyan ilk çalışmada, bir hastanın 4. ekzonunda aminoasit değişimi ile sonuçlanan tek baz mutasyonu tespit edilmiş ve *Smad3* geni insan OA'ı için muhtemel predispozan faktör olarak gösterilmiştir. *Smad3* gen mutasyonunun düşük frekansından dolayı, TGF- β /*Smad3* sinyal iletiminin insan OA'den sorumlu majör yol olamayacağı da bildirilmiştir (1).

Sonuç olarak, Isparta ve yöresinde yaygın olarak görülen osteoartrit *Smad3* genindeki herhangi bir mutasyon veya polimorfizm ile bağlantısını araştırdığımız bu çalışmada, SSCP analizinde tanımladığımız farklı bant paternlerinden yola çıkarak, dizi analizi ile tek nükleotid polimorfizmleri tespit edildi ve OA ile ilişkisi araştırıldı. Tanımladığımız tek nükleotid polimorfizimlerinden biri için hızlı tarama metodu geliştirerek, allel frekansı açısından OA ile ilişkisini ortaya koyduk, Türk popülasyonu frekansını belirlemek için çalışmamızın bir ilk adım olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca, *Smad3* proteini fonksiyonunda önemli bir yer tutan, exon 3 tarafından kodlanan bağlantı bölgesinde tanımladığımız SNP'in osteoartrit ile ilişkili olabileceğini ilk defa ortaya koyduk. Bundan sonraki hedefimiz bu bölge için hızlı tarama metodu geliştirerek hastalıkla ilişkisini tespit etmek ve Türk popülasyonu frekansını belirlemektir. Bunun yanında, TGF- β sinyal iletim yolundaki diğer aracı proteinleri kodlayan genleri tarayarak osteoartrit hastaları için TGF- β sinyal iletim yolu haplotipini ortaya koymayı amaçlıyoruz.

ÖZET

Osteoartrit Tanısı Konmuş Hasta Bireylerde Smad3 Gen Mutasyonlarının Analizi

Eklem kıkırdağının harabiyeti ile karakterize bir hastalık olan osteoartrit (OA), insanları etkileyen eklem hastalıklarından en yaygın olanıdır. Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) sinyal yolunun aracı molekülü olan Smad3, kondrositlerin olgunlaşma sürecinde inhibitör etkiler oluşturur. Primer diz osteoartriti ve *Smad3* gen mutasyonları arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla, primer diz OA'li hasta (n=40) ve kontrol bireylerde (n=40) *Smad3* geni, polimeraz zincir reaksiyonu-tek zincir konformasyon polimorfizim (PCR-SSCP) analiziyle mutasyonlar açısından tarandı. SSCP'de farklı bant paterni gözlenen bireylere dizi analizi yapıldı, intron 2'nin 59. pozisyonunda G→C transversiyonu, 103. kodonda sessiz A→G transisyonu ve 170. kodonun ikinci pozisyonunda A→G transisyonu olmak üzere üç farklı tek nükleotid polimorfizimi (SNP) tespit edildi. 170. kodondaki A→G transisyonu, üçü hasta biri kontrol olmak üzere toplam dört bireyde bulundu. İtron 2'nin 59. pozisyonundaki G→C transversiyonu, Bme1390I enzimi kullanılarak parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile primer diz OA'li hasta (n=92) ve kontrol (n=87) grubunda tarandı. G/C allel frekansları değerlendirildiğinde OA hastaları ve kontrol grubu ($P= 0,030$) ile şiddetli OA hastaları ve kontrol grubu ($P= 0,037$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunurken genotip frekansları açısından farklılık tespit edilmedi. C allel frekansının radyografik olarak şiddetli OA hastalarında farklı olması, C allelinin hastalığın şiddeti ile ilişkili olabileceğini gösterdi. *Smad3* geninde ilk defa OA ile ilişkilendirilen bir bölgeyi tespit ettiğimiz ve bu bölgenin frekanslarının hızlı bir şekilde çalışılması için Bme1390I enzim kesim metodu geliştirdiğimiz çalışmamızın, osteoartrit ile ilgili çalışmalara ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

Anahtar Sözcükler: Mutasyon, Osteoartrit, Smad3, Tek nükleotid polimorfizmi (SNP), Transforming Growth Factor-beta (TGF- β)

SUMMARY

Mutation Analysis Of The Smad3 Gene In Patients With Osteoarthritis

Osteoarthritis (OA) is the most common degenerative arthritis, which is characterized by breakdown of articular cartilage. The Smad3 protein that is the mediator of the transforming growth factor- β (TGF- β) signals, has inhibitor effects on chondrocyte maturation. To investigate *Smad3* gene mutations for its associations with primary knee OA, we screened *Smad3* gene for mutations with polymerase chain reaction-single stranded conformation polymorphism (PCR-SSCP) in patients with primary knee OA (n=40) and control (n=40) individuals. We performed DNA sequencing on individuals whose were distinct band patterns determined with PCR-SSCP, three different single nucleotide polymorphism (SNP) are determined, G \rightarrow C transversion in 59th position of intron 2, silent A \rightarrow G transition in codon 103 and A \rightarrow G transition in codon 170. A \rightarrow G transitions in codon 170 were found in three patient and one control. G \rightarrow C transversions in 59th position of intron 2 were analyzed with restriction fragment length polymorphism (RFLP) method by using Bme1390I restriction in patients with primary knee OA (n=92) and control (n=87) group. When G/C allele frequencies compared, a significant difference was observed between primary knee OA and control groups (p=0,030) and between control and severe primary knee OA groups (p=0,037). However, the genotype distributions did not exhibit a significant difference between OA patients and control individuals. The significant difference of C allele frequency in radiographic severe OA patients may exhibit association with the severity of OA. We demonstrated a region on *Smad3* gene related with OA and used Bme1390I enzyme restriction method developed just for to help to study faster this region's frequencies for the first time. So we thought that from now on this study will help of related OA studies.

Key words: Mutation, Osteoarthritis, Smad3, Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Transforming Growth Factor-beta (TGF- β)

KAYNAKLAR

1. Yao JY, Wang Y, An J, Mao CM, Hou N, Lv YX, Wang YL, Cui F, Huang M, Yang X. Mutation analysis of the Smad3 gene in human osteoarthritis. *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 714-17.
2. Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004;12:39-44.
3. Hosie G., Dickson J. Managing osteoarthritis in primary care. Ed. Kirazlı Y. Blackwell Science 2000. pp 4-18.
4. Massague´, J. TGFb signal transduction. *Annu. Rev. Biochem* 1998; 67: 753–91.
5. Mathews LS, Vale WW. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 1991; 65:973-82.
6. Heldin C-H, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465–71.
7. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000; 267(24):6954-67.
8. Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 1996; 383:832-6.
9. Suzuki A, Chang C, Yingling JM, Wang XF, Hemmati-Brivanlou A. Smad5 induces ventral fates in *Xenopus* embryo. *Dev Biol.* 1997;184(2):402-5.
10. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 1998;346:26–37.
11. Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, et al. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *J Cell Biol* 1987;105:457–63.
12. Pedrozo HA, Schwartz Z, Robinson M, Gomes R, Dean DD, Bonewald LF, et al. Potential mechanisms for the plasmin-mediated release and activation of latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of growth plate chondrocytes. *Endocrinology* 1999;140:5806–16.
13. Pedrozo HA, Schwartz Z, Gomez R, Ornoy A, Xin-Sheng W, Dallas SL, et al. Growth plate chondrocytes store latent transforming growth factor (TGF)-beta 1 in their matrix through latent TGF-beta 1 binding protein-1. *J Cell Physiol* 1998;177:343–54.
14. Hall FL, Benya PD, Padilla SR, Carbonaro-Hall D, Williams R, Buckley S, et al. Transforming growth factor-beta type-II receptor signalling: intrinsic/associated casein kinase activity, receptor interactions and functional effects of blocking antibodies. *Biochem J* 1996;316:303–10.
15. Ferguson CM, Schwarz EM, Reynolds PR, Puzas JE, Rosier RN, O’Keefe RJ. Smad2 and 3 mediate transforming growth factor-beta 1-induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology* 2000;141:4728–35.

16. Özçelik N. Tıbbi Biyoloji 2.Baskı. Isparta 2005; 184
17. Nussbaum RL, McInnes RR, Wilalrd HF. Thompson&Thompson Tıbbi Genetik. 6. Baskı. Bölüm 6 Çev. Emre S. Güneş Kitapevi, 2005; 87.
18. Şahin N. Non-Sendromik Otozomal Resesif İşitme Kaybının Görüldüğü Türk Ailelerinde Linkage Analiz Yöntemi ile *MYO7A*, *MYO15*, *SLC26A4* ve *TMPRSS3* Genlerine Bağlantının Araştırılması. 2002. Karadeniz Teknik Üniversitesi Doktora Tezi, Trabzon.
19. Nal N. Ailesel Hiperkolesterolemili Hastalarda LDL Reseptör Geninin 3 Numaralı Ekzonundaki Mutasyonların SSCP Yöntemi ile Taranması. 2000. Akdeniz Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, Antalya.
20. Orita H., Suzuki Y., Sekiya T. Rapid and sensitive detection point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5; 874-79.
21. White M.B., Carvalho M., Derse D. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 1992; 12; 301-6.
22. Lerman L.S., Silverstein K., Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 1987; 155; 482-01.
23. Özgül RK. Kalıtsal Hastalıklarda SSCP ve HA teknikleri ile Mutasyonların Hızlı Taranması.1998. Bilim Uzmanlığı Tezi.
24. Sinici İ., Özkara HA. SSCP Analizinde Çift İplikli DNA Polimorfizmi. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2001; 26; 135-42.
25. Yiğit S. Bölgemizdeki Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) Hastalarında Mutasyon Noktalarının ARMS, RFLP ve Strip Yöntemiyle Taranması. 2006. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Doktora Tezi, Samsun.
26. Rapley R. PCR Sequencing Protocols (Methods in Molecular Biology). Volume 65. Humana Press, New Jersey, 1996.
27. http://www.medicine.ankara.edu.tr/internal_medical/pediatrics/mol-gen/index.php?PgId=71 Ankara Ün. Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik.
28. Simonet SW. Genetics of primary generalized osteoarthritis. *Molecular Genetics and Metabolism* 2002; 77: 31-34.
29. Knecht S, Vanwanseele B, Stussi E. A review on the mechanical quality of articular cartilage – Implications for the diagnosis of osteoarthritis. *Clinical Biomechanics* 2006; 21: 999–1012.
30. Garstang SV, Stitik TP: Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Am J Phys Med Rehabil* 2006;85: S2–S11.
31. Hirsch R, Lethbridge-Cejku M, Hanson R, Scott WW Jr., Reichle R, Plato CC, et al. Familial aggregation of osteoarthritis: data from the Baltimore Longitudinal Study on Aging. *Arthritis Rheum* 1998;41:1227–32.

32. Felson DT, Couropmitree NN, Chaisson CE, Hannan MT, Zhang Y, McAlindon TE, et al. Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1998;41:1064–71.
33. Lindberg H. Prevalence of primary coxarthrosis in siblings of patients with primary coxarthrosis. *Clin Orthop* 1986;203:273–5.
34. Chitnavis J, Sinsheimer JS, Clipsham K, Loughlin J, Sykes B, Burge PD, et al. Genetic influences in end-stage osteoarthritis. Sibling risks of hip and knee replacement for idiopathic osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79:660–4.
35. Lanyon P, Muir K, Doherty S, Doherty M. Assessment of a genetic contribution to osteoarthritis of the hip: sibling study. *BMJ* 2000;321:1179–83.
36. Ingvarsson T, Stefansson SE, Hallgrimsdottir IB, Frigge ML, Jonsson H Jr., Gulcher J, et al. The inheritance of hip osteoarthritis in Iceland. *Arthritis Rheum* 2000;43:2785–92.
37. Cicuttini FM, Spector TD. What is the evidence that osteoarthritis is genetically determined? *Baillieres Clin Rheumatol* 1997;11:657–69.
38. MacGregor AJ, Spector TD. Twins and the genetic architecture of osteoarthritis [editorial]. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:583–8.
39. Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* 1996;312:940–3.
40. Olsen BR. Mutations in collagen genes resulting in metaphyseal and epiphyseal dysplasias. *Bone* 1995; 17(2 Suppl):45S–49S.
41. Cicuttini FM, Spector TD. Genetics of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 665–667.
42. Li Y, Olsen BR. Murine models of human genetic skeletal disorders. *Matrix Biol* 1997;16:49–52.
43. Osaki M, Tsukazaki T, Yonekura A, Miyazaki Y, Iwasaki K, Shindo H, et al. Regulation of c-fos gene induction and mitogenic effect of transforming growth factor-beta 1 in rat articular chondrocyte. *Endocr J* 1999;46:253–61.
44. Bogdanovicz P, Vivien D, Felisaz N, Léon V, Pujol J-P. An inositolphosphate glycan released by TGF-beta mimics the proliferative but not the transcriptional effects of the factor and requires functional receptors. *Cell Signal* 1996;8:503–9.
45. Brandi ML, Gennari L, Cerinic MM, Becherini L, Falchetti A, Masi L, Gennari C, Reginster JY. Genetic markers of osteoarticular disorders: facts and hopes. *Arthritis Res.* 2001;3(5):270-80.
46. Shi Y, Massague´ J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113:685–700.
47. Liu F. Smad3 phosphorylation by cyclin-dependent kinases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17:9-17.
48. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994; 370:341-7.

49. Kretzschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 1997; 11(8):984-95.
50. Souchelnytskyi S, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *EMBO J* 1996;15(22):6231-40. Erratum in: *EMBO J* 1997;16(19):6055.
51. Bassing CH, Yingling JM, Howe DJ, et al. A transforming growth factor β type I receptor that signals to activate gene expression. *Science* 1994; 263:87-89.
52. Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, et al. Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem* 1996; 271:21345-52.
53. Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 1995; 15:3479-86.
54. Yamashita H, ten Dijke P, Franzen P, Miyazono K, Heldin CH. Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1994; 269(31):20172-8.
55. Luo K, Lodish HF. Signaling by chimeric erythropoietin-TGF-beta receptors: homodimerization of the cytoplasmic domain of the type I TGF-beta receptor and heterodimerization with the type II receptor are both required for intracellular signal transduction. *EMBO J* 1996;15(17):4485-96.
56. Luo K, Lodish HF. Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J* 1997;16(8):1970-81.
57. ten Dijke P, Hill C.S. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.* 2004; 29:265-73.
58. Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 2002; 23(6):787-823.
59. Levy L, Hill CS. Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF-{beta}) target genes and distinguishes TGF-{beta}-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(18):8108-25.
60. Liu F, Pouponnot C, Massague J. Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev* 1997; 11(23):3157-67.
61. Grimaud E, Heymann D, Redini F. Recent advances in TGF- β effects on chondrocyte metabolism potential therapeutic roles of TGF- β in cartilage disorders. *Cytokine&Growth Factor Reviews.* 2002;13: 241-57.
62. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, Mc Carthy TL. Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr Rev* 1994;15:27-39.
63. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1957;16(4):494-502.

64. Miller S.A and et al. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1998: 218.
65. Arai T, Akiyama Y, Okabe S et al: Genomic structure of the human Smad3 gene and its infrequent alterations in colorectal cancers. *Cancer Lett* 1998; 122: 157–63.
66. Fukushima T, Mashiko M, Takita K, et al. Mutational analysis of TGF-beta type II receptor, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6 and Smad7 genes in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2003 ;22(2):315-20
67. Schon S, Huep G, Prante C, Muller S, Christ R, Hagen FW. et al. Mutational and functional analyses of xylosyltransferases and their implication in osteoarthritis. *OsteoArthritis and Cartilage* 2006;14(5):442-8.
68. Holzmann J, Brandl N, Zemmann A, Schabus R, Marlovits S, Cowburn R, Huettinger M. Assorted effects of TGFb and chondroitinsulfate on p38 and ERK1/2 activation levels in human articular chondrocytes stimulated with LPS. *OsteoArthritis and Cartilage* 2006;14(6):519-25.
69. Fava R, Olsen N, Keski-Oja J, Moses H, Pincus T. Active and latent forms of transforming growth factor beta activity in synovial effusions. *J Exp Med* 1989;169:291–6.
70. Yonekura A, Osaki M, Hirota Y, Tsukazaki T, Miyazaki Y, Matsumoto T, et al. Transforming growth factor-beta stimulates articular chondrocyte cell growth through p44/42 MAP kinase (ERK) activation. *Endocr J* 1999;46:545–53.
71. Hirota Y, Tsukazaki T, Yonekura A, Miyazaki Y, Osaki M, Shindo H, et al. Activation of specific MEK–ERK cascade is necessary for TGF- β signaling and crosstalk with PKA and PKC pathways in cultured articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:241–8.
72. Sapkota G, Knockaert M, Alarcón C. et al. Dephosphorylation of the Linker Regions of Smad1 and Smad2/3 by Small C-terminal Domain Phosphatases Has Distinct Outcomes for Bone Morphogenetic Protein and Transforming Growth Factor- β Pathways. *The Journal Of Biological Chemistry* 2006; 281 (52): 40412–19.
73. Chai J, Wu J , Yan N, Massague J, Pavletich NP, Shi Y. Features of a Smad3 MH1-DNA Complex. *The Journal Of Biological Chemistry* 2003; 278 (22): 20327–31.
74. Brown KA, Pietenpol JA, Moses HL. A Tale of Two Proteins: Differential Roles and Regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-b Signaling. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007;101:9–33.
75. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_gff.cgi?back=on&reportId=41160a516a159f909a80d36e836de187&countInd=0&countGeno=0&z=1&type=&pg=2.
76. Jin SY, Hong SJ, Yang HI, Park SD, Yoo MC, Lee HJ, et al. Estrogen receptor-alpha gene haplotype is associated with primary knee osteoarthritis in Korean population. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(5):415-21.
77. Yamada Y, Okuizumi H, Miyauchi A et al: Association of transforming growth factor beta1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 452– 60.