

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SCLEROSTEOSİS ÖN TANILI BİR AİLEDE *SOST* GENİ MUTASYON ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YELDA BİRİNCİ

TEMMUZ -2007

TRABZON

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SCLEROSTEOSİS ÖN TANILI BİR AİLEDE SOST GENİ MUTASYON ANALİZİ

YELDA BİRİNCİ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 30.07.2007

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 27.07.2007

Tezin Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Ersan KALAY

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Ersan KALAY

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. İlknur TOSUN

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

TEMMUZ- 2007

TRABZON

ÖNSÖZ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimim ve tez hazırlığım süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Anabilim Dalı Başkanı, sayın Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL'e, çalışmanın her aşamasında bilgisini ve desteğini esirgemeyen sayın danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Ersan KALAY'a, çalışmayı klinik yönden değerlendiren sayın Prof. Dr. Refik ÇAYLAN'a, hastaların radyolojik bulgularını değerlendiren sayın Doç. Dr. Polat KOŞUCU'ya, hastaların diş muayenesini yapan sayın Yrd. Doç. Dr. Saadettin KAYIPMAZ'a, eğitimime katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri sayın Doç. Dr. Fahri UÇAR ve sayın Doç. Dr. Figen CELEP'e, teşekkür ederim.

İki yıl boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim sayın Fatmagül YENİSEY ve sayın Tülay KÖSEAHMET'e, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım Doktora öğrencisi sayın Bayram TORAMAN'a ve diğer asistan arkadaşlarıma, hayatın tüm zorluklarına rağmen bana her türlü eğitim ve öğrenim olanağını sunan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca, çalışmayı "Sclerosteosis ön tanılı bir ailede *SOST* geni mutasyon analizi" adlı proje ile destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Yelda BİRİNCİ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.WNT Sinyal Sistemi	8
2.2. Wnt Sinyal Sistemi Temel Bileşenleri	8
2.3. Wnt Sinyal Sisteminin Hedef Genleri	9
2.4. Wnt Sinyal Sistemi Çalışma Mekanizması	9
2.4.1. Wnt Sinyali Olmadığı Durumda	9
2.4.2. Wnt Sinyali Olduğu Durumda	10
2.5. Sclerostin Proteini ve Wnt Sinyal Sistemi	10
2.6. Sclerostin ve BMP Sinyal Sistemi	11
3. MATERYAL METOD	12
3.1. MATERYAL	12
3.1.1. Çalışma Grubu	12
3.1.2. Kimyasallar	14
3.1.3. Gereçler	15
3.1.4. Solüsyonlar	16
3.1.4.1. DNA İzolasyon Tamponları	16
3.1.4.2. Agaroz Jel Elektroforez Solüsyonları	17
3.1.4.3. Poliakrilamid Jel Elektroforez Solüsyonları	18
3.1.4.4. Yükleme Tamponu	19
3.1.4.5. Gümüş Boyama Solüsyonları	19

3.2. METOD	20
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	20
3.2.2. DNA'nın Spektrofotometrede Konsantrasyonunun Ölçümü	21
3.2.3. Aday Lokalizasyon Yaklaşımı	21
3.2.3.1. Bağlantı Analizi İçin PCR Reaksiyonu	23
3.2.3.2. PCR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Kontrolü	24
3.2.3.3. Denatürant Poliakrilamid Jel Elektroforezi	24
3.2.4. DNA Dizileme Analizi	26
3.2.4.1. DNA Dizi Analizi İçin DNA Örneklerinin PCR İle Çoğaltılması	26
3.2.4.2. PCR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Yürütülmesi	28
3.2.4.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	28
3.2.4.4. Döngü Dizileme Reaksiyonu	29
3.2.4.5. Etanol Presipitasyonu İle PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu	30
3.2.5. ARMS İle p.Trp124Stop Mutasyonun Aile İçindeki Dağılımının Gösterilmesi	31
3.2.5.1. ARMS İçin PCR	31
3.2.5.2. ARMS Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Yürütülmesi	32
4. BULGULAR	33
4.1. Klinik Bulgular	33
4.1.1. Fizik Muayene Bulguları	33
4.1.2. Radyolojik Bulgular	35
4.1.3. Biyokimyasal Bulgular	35
4.2. SOST Genine Bağlantının Gösterilmesi	39
4.3. SOST Geni Mutasyon Analizi	41
4.4. p.Trp124Stop Mutasyonun Aile İçindeki Dağılımının ARMS İle Gösterilmesi	42
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	48
7. ÖZET	50
8. SUMMARY	51
9. KAYNAKLAR	52

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bağlantı analizinde kullanılan STR markırları	23
Tablo 2. <i>SOST</i> geninin iki ekzonu ve ekzon-intron bağlantı bölgelerininin amplifikasyonunda kullanılan primerler	26
Tablo 3. c.371G→A mutant allelinin aile bireylerindeki dağılımının ARMS metodu ile belirlenmesinde kullanılan primerler	31

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>SOST</i> geninin 17. kromozomun 17q21.31 bölgesindeki lokalizasyonu.	7
Şekil 2. Wnt sinyal sistemi modellenmesi.	10
Şekil 3. Sclerostin proteini ve Wnt sinyal sistemi.	11
Şekil 4. Sclerosteosis ön tanılı bireylerin yer aldığı aile ağacı.	13
Şekil 5. <i>SOST</i> geni bağlantı analizinde kullanılan STR markırları ve kromozom üzerindeki lokalizasyonları.	22
Şekil 6. VI:9 numaralı bireye ait yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı temporal kemik tomografisi.	36
Şekil 7. VI:11 numaralı bireye ait yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı temporal kemik tomografisi.	37
Şekil 8. Sclerosteosisli hastalarda el fotoğrafları ve grafileleri.	38
Şekil 9. Bağlantı analizi sonucu elde edilen bireysel haplotiplerin aile ağacı üzerinde gösterimi.	40
Şekil 10. <i>SOST</i> geninin iki ekzonu ve ekzon-intron bağlantı bölgelerinin PCR ile Amplifikasyonu.	41
Şekil 11. <i>SOST</i> geni mutasyon analizi.	42
Şekil 12. p.Trp124Stop mutasyonun çalışmaya dahil olan aile bireylerindeki dağılımının ARMS ile gösterilmesi.	42

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sclerosteosis hastalığı (OMIM 269500); osteoblastların hiperaktivasyonu sonucu özellikle kafatası ve alt çene kemiklerinde aşırı büyüme ile karakterize, otozomal resesif geçişli bir “*craniotubular hyperosteosis*” hastalığıdır. Sclerosteosis hastalığının prevalansı Güney Afrika popülasyonunda yaklaşık 1/75.000 olup, Sclerosteosis hastalarının ortalama yaşam süreleri 33 yıl olarak bildirilmiştir (1, 2).

Sclerosteosis hastalığının en belirgin özellikleri: Kalvaryumda kalınlaşma, mandibulada aşırı büyüme ve tübüler kemiklerin korteksinde kalınlaşmadır. Genişleyen kafa kemiklerinin, kranial sinirleri sıkıştırması sonucu; yüz felci, işitme ve görme kayıpları oldukça sık görülen klinik bulgulardır (3, 4, 5, 6). Sclerosteosis hastalığına ait spesifik bulgulardan birisi de yüksek intrakranial basınçtır. Kafatasının hiperosteosizi ve sklerosteosizi sonucu kalvaryum ve kafa tabanının kalınlaşmasına bağlı olarak intrakranial hacim azalmaktadır. Yine kemiklerin aşırı büyümesi nedeniyle serebral kan akışı ve serebrosipinal sıvının geri emiliminde bozulmalar meydana gelmektedir. Bütün bu etkenler sonucunda intrakranial basınç git gide artmaktadır. Foramen magnum kafa kemiklerindeki kalınlaşma sonucunda daralmakta ve medulla oblongatayı sıkıştırıp ani ölümlere neden olabilmektedir (5). Sclerosteosis hastalığına spesifik diğer klinik bulgular; unilateral olarak gözlenen baş parmak ve orta parmağın bir deri ile birleşmesi olarak tanımlanan kutanöz sindaktilisi ve gigantizm (devleşme) olarak tanımlanan uzun bir boy ve iri bir vücut yapısıdır (4).

2001 yılında birbirinden bağımsız iki grup tarafından Sclerosteosis hastalığından sorumlu gen 17. kromozomun 17q12-q21 bölgesinde lokalize *SOST* geni olarak tanımlanmıştır (7, 8). *SOST* (NM_025237.2); iki ekzonlu bir gen olup 213 amino asitlik Sclerostin (NP_079513.1) proteinini kodlamaktadır. Sclerostin proteini, Wnt ve Bmp sinyal sistemlerine antagonist (zıt etkili) olarak çalışmaktadır (9, 10). Wnt ve Bmp sinyal sistemleri kemik oluşumunun düzenlenmesi ve kontrol edilmesinde görevli sinyal sistemleridir. Sclerostin proteini sentezlenmediğinde bu sinyal sistemleri sürekli aktif

durumda kalmaktadır. Böylece kemik yapımının ara vermeden devam etmesine neden olmaktadır. Sonuç olarak, kemiklerde aşırı büyüme ile seyreden Sclerosteosis veya Van Buchem hastalıkları ortaya çıkmaktadır (9, 10).

Günümüze kadar, *SOST* geni ile ilişkili olarak 6 farklı mutasyon tanımlanmıştır (6, 7, 8, 11, 12, 13). Bu mutasyonlardan üçü nonsense, ikisi splicing bölge mutasyonu ve biri de genin downstream tarafında, enhancer bölgesini tutan 52 kb'lik bir delesyondur. Bu mutasyonlardan dördü: p.Q23X, p.W124X, p.R126X ve IVS1 +3A→T Sclerosteosis hastalarında gösterilmiştir (7, 8). Van Buchem hastalarında ise IVS1 +1G→C ve genin downstream tarafındaki enhancer bölgesini tutan 52 kb'lik delesyon gösterilmiştir (6, 11, 12, 13).

Sclerosteosis hastalığı ender görülen bir hastalık olduğundan Sclerosteosis hastalarına tanı konulmasında güçlük yaşanmakta ve sık sık benzer bulgular gösterilen Van Buchem hastalığı ile karıştırılmaktadır. *Craniotubular hyperosteosis* hastalıkları arasında klinik olarak Sclerosteosis hastalığına en fazla benzeyen hastalık Van Buchem (*Hyperostosis corticalis generalisata*) hastalığıdır. Bu iki hastalığı birbirinden ayıran bulgular; Sclerosteosis hastalığına spesifik olan yüksek intrakranial basınç, el anomalileri ve gigantizm (devleşme) bulgularıdır (6).

Çalışmanın amacı; 2003 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniği'nde Sclerosteosis ön tanısı almış iki hastaya *SOST* geni mutasyon analizi yapılarak Sclerosteosis tanısının kesinleştirilmesidir. Bunun için hastalarda öncelikle, bağlantı analizi ile *SOST* genine bağlantı gösterilmesi ve daha sonra *SOST* geninde DNA dizi analizi yapılarak sorumlu mutasyonun tanımlanması amaçlanmıştır.

Sclerosteosis hastalığı otozomal resesif geçiş gösterdiği için ortaya çıkması, ancak iki taşıyıcının bir araya gelmesi ile mümkün olmaktadır. Bu da, Sclerosteosis hastalığının taşıyıcılarının tespit edilmesini zorlaştırmakta ve hastalığın sinsice yayılmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda, aile bireylerinden alınan bilgilere göre halen hayatta 42 bireyi bulunan altı kuşaklı bir aile incelenmiştir. Ailede Sclerosteosis ön tanısı almış iki kardeş, ikinci derece akraba evliliği sonucunda dünyaya gelmiştir. Çalışmamızın diğer bir amacı ise ailedeki taşıyıcıların belirlenmesidir. Taşıyıcıların belirlenmesi sonucunda aileye genetik danışma imkanı verilebilecektir. Bu yönü ile bakıldığında çalışmamızın insan sağlığına sağlayacağı katkının önemli olduğuna inanmaktayız.

Ülkemizde literature geçmiş herhangi bir Sclerosteosis vakası bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu çalışma, toplumumuzda Sclerosteosis hastalığının genetik etiolojisinin aydınlatılmasında bir ön çalışma niteliğindedir.

2. GENEL BİLGİLER

Sclerosteosis hastalığı (OMIM: 269500); osteoblastların hiperaktivasyonu sonucu özellikle kafatası ve alt çene kemiklerinde aşırı büyüme ile karakterize otozomal resesif geçişli bir “*craniotubular hyperosteosis*” hastalığıdır. Bu güne kadar; Japonya, Almanya, İspanya, Amerika, Senegal ve Brezilya’dan Sclerosteosis vakası bildirilmesine rağmen bu hastaların büyük bir bölümü Güney Afrikalı ve 17.yy da Hollanda’dan Güney Afrikaya göç eden Flemenk kökenli Güney Afrikalılarıdır. Sclerosteosis hastalığının prevalansı Güney Afrika popülasyonunda yaklaşık 1/75.000 olup hastaların ortalama yaşam süresi 33 yıldır (1, 2, 14, 15).

Sclerosteosis hastalığı ilk defa 1929 yılında Osteopetrosis hastalığı olarak tanımlanmıştır (16). Osteopetrosis veya diğer adıyla “*Albers-schönberg*” hastalığı; osteoklastların kemik yıkılımındaki yetersizliği sonucu artmış kemik dansitesiyle karakterize bir hastalıktır. Osteopetrosis konjenital bir hastalık olup bazen sporadik bazen de kalıtsal bir hastalık olarak ortaya çıkmaktadır (17, 18). Kalıtsal formları genellikle otozomal resesif kalıtım kalıbına uygun olmakla birlikte, nadir olarak otozomal dominant formları da bulunmaktadır (19, 20). Sclerosteosis hastalığının Osteopetrosis hastalığı olup olmadığı uzun yıllar tartışılmıştır (21). 1937 yılında akraba evliliği sonucu dünyaya gelmiş 2 kardeşte benzer tartışmalı bir vaka rapor edilmiştir. Daha sonra 1958 yılına kadar Osteopetrosis olup olmadığı tartışılan benzer vakalar bildirilmiştir (23-25). 1958 yılına gelindiğinde Sclerosteosis hastalığı, Osteopetrosis hastalığının sindaktili gösteren bir başka morfolojik varyantı olarak tanımlanmıştır. Sclerosteosis hastalığı, Osteopetrosis hastalığının morfolojik bir varyantı olarak gösterilmiş ve sindaktili haricinde dört farklı özellik açısından Osteopetrosis hastalığından ayrılmıştır: 1. Atrofik distal falankslar, 2. Metakarpal ve metatarsal gövdelerinde kalınlaşma, 3. Kafatası kemeri, yüz kemikleri ve alt çene kemiğinde kalınlaşma, 4. Bazı vakalarda köprücük kemiğinde kalınlaşma (26).

1967 yılına gelindiğinde bu hastalık Osteopetrosis hastalığından tamamen ayrılmış ve “*Sclerosteosis*”adında yeni bir hastalık olarak tanımlanmıştır (27). Daha sonra, çeşitli araştırmacıların raporları hastalığın tanımlanmasına katkıda bulunmuştur ve 1988 yılında Sclerosteosis, nadir görülen otozomal resesif geçişli bir hastalık olarak “*craniotubular hyperosteosis*” grubuna dahil edilmiştir (28-37).

Sclereosteosis hastalığının en belirgin klinik bulguları arasında; kalvaryumda kalınlaşma, mandibulada aşırı büyüme ve tübüler kemiklerin korteksinde kalınlaşma sayılabilir. Büyük oranda asimetrik alt çene genişlemesi ve buna bağlı olarak mid-fasiyal hipoplazisi sonucunda yüzde şekilsel bozulmalar görülür. Alt çenenin aşırı büyümesi genellikle çocukluk döneminde fark edilir ve yetişkinlik boyunca ilerler. Kalvarianın aşırı büyümesi sonucunda adım adım alının yükselmesi, gözlerin hipertelorizmi (gözler arası mesafenin artması), proptozisi (göz küresinin tümüyle öne ve aşağı doğru yer değiştirmesi) ve yassılaştırmış burun kökü yüzdeki şekilsel bozulmaların diğer nedenleridir. Sclerosteosis hastalarının diş yapıları genellikle normaldir (1, 5, 32, 38).

Sclerosteosis hastalığında genişleyen kafa kemiklerinin, kafa sinirlerini sıkıştırması sonucu; yüz felci, işitme ve görme kayıpları meydana gelmektedir. Yüz felçleri 4 yaş civarında görülmeye başlayan ve hastaların % 82'sinde görülen yaygın bir bulgudur. Yüz felçleri başlangıçta tekrarlayan tek taraflı olarak görülürken ilerleyen dönemlerde çift taraflı ve kalıcı yüz felcine dönüşmektedir (1, 32).

Sclerosteosis hastalığında sıklıkla görülen bir diğer bulgu da işitme kaybıdır. İşitme kaybı 6 yaş civarında ortaya çıkar ve genç yetişkin dönemde ilerlemeye devam eder. İşitme kayıplarına neden olan en büyük etken; sürekli devam eden kemik gelişimi sonucunda, temporal kemiğin boyutlarında artış ve aşırı skleroz meydana gelmesidir. Bu artışa bağlı olarak dış kulak kanalında, orta kulak boşluğunda, internal akustik meatusta ve fasial sinir kanalında daralma gerçekleşir. Temporal kemiğin tutulması ile başlangıçta ses iletiminin engellenmesi olarak görülen belirtiler daha sonra tamamiyle ses algılanmasının kaybına dönüşür (1, 5).

Görme kayıpları Sclerosteosis hastalığının ilerleyen dönemlerinde sıklıkla görülen, geç bir bulgudur. Optik kanalın daralmasına bağlı olarak optik sinirlerin sıkışması sonucu gelişen görme kaybı tek taraflı veya çift taraflı olabilir (5).

Sclereosteosis hastalığının spesifik bulgulardan birisi de yüksek intrakranial basıncıdır. Kafa kemiklerinin aşırı kalınlaşması nedeniyle serebral kan akışı ve serebrosinal sıvının geri emiliminde bozulmalar meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak intrakranial sıvı hacmi artmakta bu da intrakranial basıncın artışına neden olmaktadır. Bunun sonucunda erken çocukluk döneminde sıklıkla şiddetli baş ağrıları görülmektedir. Sclerosteosis hastalarında yüksek intrakranial basınç 5 yaş civarında fark edilir. Bu bulgu, hastalığın erken teşhisine olanak sağlamaktadır (1, 5).

Sclerosteosis hastalığının en trajik bulgusu; herhangi bir yaşta meydana gelebilen ani ölümlerdir. Kafa kemiklerinin kalınlaşmasına bağlı olarak daralan foramen magnumun medulla oblongatayı ani olarak sıkıştırması sonucu ani ölümler meydana gelebilmektedir (1, 32).

Sclereosteosis hastalığına ait en spesifik bulgu iki parmağın bir deri vasıtasıyla birleşmesi olarak tanımlanan kutanöz sindaktilisidir. Bu bulgu; hastalığın doğuştan fark edilebilmesine olanak sağlar ve hastaların % 76'sında görülebilmektedir. Genellikle tek taraflı, işaret parmağı ve orta parmak arasında görülürken, nadir olarak üçüncü ve dördüncü parmaklar arasında da görülebilir. Etkilenmiş parmaklarda, terminal falankslarda radial deviasyon sıklıkla görülür. Seyrek olarak görülen diğer bir karakteristik bulgu da tek taraflı veya çift taraflı olan indeks parmağın orta falanksında hipoplazi veya aplazi ile birlikte radial deviasyondur. Ayrıca tırnaklarda displazi veya apilazi görülebilen diğer el anomalileridir (1, 5).

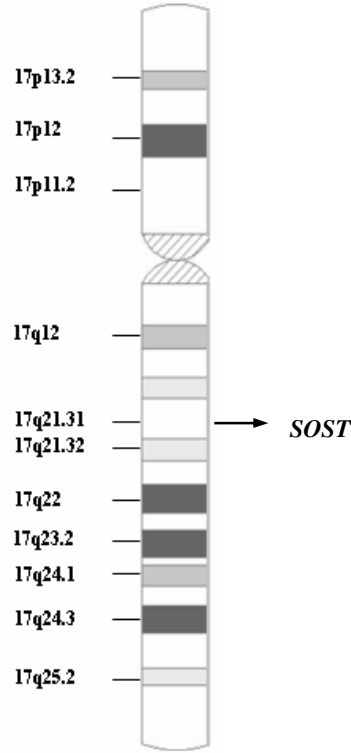
Sclerosteosis hastalarında, normal insanlara oranla, değişken ama sıklıkla görülen diğer bir bulgu ise gigantizm (devleşme) olarak adlandırılan daha uzun bir boy ve iri bir vücut yapısıdır. Sclerosteosis hastalarının vücut ağırlıkları oldukça fazla olmasına rağmen obez değildirler. Sclerosteosis hastalarında görülen bu aşırı vücut ağırlığının kaynağı kemiklerin boyutlarındaki artıştır (1, 32).

Sclerosteosis hastalığında nadir olarak görülen bir bulguda koklama sinirlerinin geçtiği kanalın daralması sinirleri sıkıştırması sonucu gelişen anosmiadır (koku almama) (5).

Sclerosteosis hastalarında bazen, alt çenenin aşırı genişlemesi ve dişlerin aynı hizada olmamasından kaynaklanan konuşma bozuklukları görülür. Konuşma bozukluklarında, facial sinirin etkilenmesi sonucu oluşan yüz felci ve ağzın tam olarak kapanmaması önemli bir etkidir (1).

Sclerosteosis hastalığına benzer bir şekilde; osteoblastların hiperaktivasyonu sonucu aşırı kemik büyümesi ile karakterize olan başka bir “craniotubular hyperosteosis” hastalığı da Van Buchem Hastalığı'dır (OMIM 239100). Van Buchem hastalığı; ilk kez 1955 yılında Van Buchem F.S.P tarafından keşfedilmiş olup orjinal ismi “Hyperostosis Corticalis Generalisata Familiaris”dir (40). Van Buchem hastalığının klinik bulguları Sclereosteosis hastalığına benzer olarak; kafatası ve alt çene kemiklerinde kalınlaşma, kafa sinirlerinde sıkışma, yüz felci, sağırılık ve görme bozukluklarıdır. Bu benzer klinik bulgular iki hastalığın birbirinden ayrılarak kesin tanısının konulmasında oldukça güçlük yaratır. Bunun yanısıra, yüksek intrakranial basınç, el anomalileri ve devleşme bulguları Sclerosteosis hastalığına özgü olup, bu iki hastalığın birbirinden ayrılmasını sağlamaktadır (4).

1999 yılında Sclerosteosis tanısı almış iki ailede yapılan genetik haritalama sonucunda Sclereosteosis hastalığının 17. kromozomun 17q12-q21 bölgesine bağlantı gösterdiği rapor edilmiştir (4). 2001 yılında ise birbirinden bağımsız iki grup tarafından Sclereosteosis hastalığından sorumlu gen 17. kromozomun q kolunda 17q12-q21 bölgesinde lokalize *SOST* geni olarak tanımlanmıştır (Şekil 1) (7, 8).



Şekil 1. *SOST* geninin 17. kromozomun 17q21.31 bölgesindeki lokalizasyonu.

SOST, iki ekzonlu bir gen olup 213 aminoasitlik Sclerostin proteinini (NP_079513.1) kodlamaktadır. Sclerostin proteini; 24 kDa molekül ağırlığına sahip, ilk 23 aminoasit dizisinde sekresyon sinyali taşıyan bir propeptittir. Sclerostin proteini; 8 sistein ve 1 glisin olmak üzere toplam 9 korunmuş aminoasit bulundurduğu için “sistein-düğüm motif” proteini olarak sınıflandırılmıştır (7, 8).

Günümüze kadar *SOST* geninde 6 farklı mutasyon tanımlanmıştır (6, 7, 8, 11, 12). Bu mutasyonların 4 tanesi Scleosteosis hastalarında tanımlanırken 2 tanesi de Van Buchem hastalarında gösterilmiştir. p.Gln24X, p.Arg126X, p.Trp124X nonsense mutasyonları ve IVS1+3A→T splicing mutasyonu Scleosteosis hastalarında gösterilmiştir (7, 8).

SOST geninde tanımlanan diğer iki mutasyon Van Buchem hastalarında gösterilmiştir (6, 11, 12, 13). Bunlardan birisi *SOST* geninin downstream bölgesindeki enhancer bölgesini tutan 52 kb’lik delesyondur (12). Diğer mutasyon ise IVS1 +1G→C bir splicing bölge mutasyonudur (11). Transgenik farelerde yapılan çalışmalarda *SOST* geninin -35 downstream bölgesinde oluşturulan delesyonun, genin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (42). Bu iki hastalıktan; Van Buchem hastalığı Scleosteosis hastalığına oranla daha ılımlı klinik bulgular göstermektedir. Bununla birlikte bugüne kadar bu hastalık nedeniyle ölen herhangi bir vaka bildirilmemiştir. Şimdiye kadar yaklaşık 20 vaka bildirilmiştir (15).

Sclerosteosis hastalığı *SOST* geninde mutasyon olduğunda ve Sclerostin proteini sentezlenemediğinde meydana gelen bir hastalıktır. Sclerostin proteini korunmuş 8 sistein ve 1 gilislin aminoasiti yönünden diğer sistein düğüm motifi proteinleri olan *CNV* gen ailesi proteinleri ve gonodotropin proteinlerine benzerlik gösterir (8). Diğer taraftan Sclerostin proteini 80-167. aminoasitleri arasında bulunan korunmuş 6 sisteince zengin bölge açısından; dan, cerberus/cer1, gremlin/drm, prdc, caronte ve dante proteinlerini içeren Dan protein ailesine benzerlik göstermektedir (7). Sclerostin proteinin fonksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda Sclerostin proteininin, kemik metabolizmasında önemli bir kontrol noktası olan Wnt sinyal sistemine antagonist (zıt etkili) olarak çalıştığı gösterilmiştir. Sclerostin proteininin yokluğunda Wnt sinyal sistemi baskılanamamakta ve hiperaktivasyonu sonucu sürekli kemik yapımı olmaktadır (9, 10).

2.1. Wnt Sinyal Sistemi

Memelilerde pek çok hücrenin proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde görev alan önemli bir sinyal sistemidir (43, 44). Son yıllarda yapılan çalışmalarda Wnt sinyal sisteminin memelilerde kemik yoğunluğunun düzenlenmesinde merkezi bir rol üstlendiği gösterilmiştir (45). Wnt protein ailesi, sisteince zengin glikoproteinlerdir ve ihtiva ettikleri sisteince zengin bölgeler CRD (cystein rich domain) sayesinde hücre yüzey reseptörlerine bağlanabilen Wnt sinyal sistemi ligandları olarak görev alırlar. Bugüne kadar insan genomunda 19 Wnt geni belirlenmiştir (46). Wnt sinyal yolunda ligand olarak salgılanan Wnt proteinleri osteoblastlar tarafından salgılanırlar ve osteoblastların farklılaşmasının düzenlenmesinde görev alırlar (47).

2.2. Wnt Sinyal Sistemi Temel Bileşenleri

Wnt sinyal yolunda hücre yüzey koreseptörü olarak görev alan Lrp5/6; LDL (low density lipoprotein) protein ailesine ait reseptör proteinlerdir (47). Wnt sinyal sisteminin diğer hücre yüzey reseptörü frizzled proteinleridir (47). Bu proteinler 7 domainli transmembran proteinleridir. Wnt sinyal yolunda anahtar molekül olarak çalışan β -catenin; hücre membranında adhezyon proteinleri olan kadherinlerde yer alır ve hücre iskeletindeki aktin filamentleri ile bağlanarak hücre şekillenmesi, adhezyon ve hücre göçünde görev alır (47). β -catenin Wnt sinyal sistemindeki görevi hücre çekirdeğindeki Lef/Tcf transkripsiyon faktörlerine bağlanmak ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatmaktır. GSK3- β (glycogen synthase kinase-3 β); bir çok farklı sinyal yolunda görev alan serin-tirozin kinazlardır. β -catenin, APC ve Axin gibi Wnt bileşenlerini fosforile ederek proteozomlar tarafından yıkılır. APC (adenomatous polyposis coli) tümör baskılayıcı bir proteindir ve β -catenin proteozomal yıkım kompleksine olan afinitesini

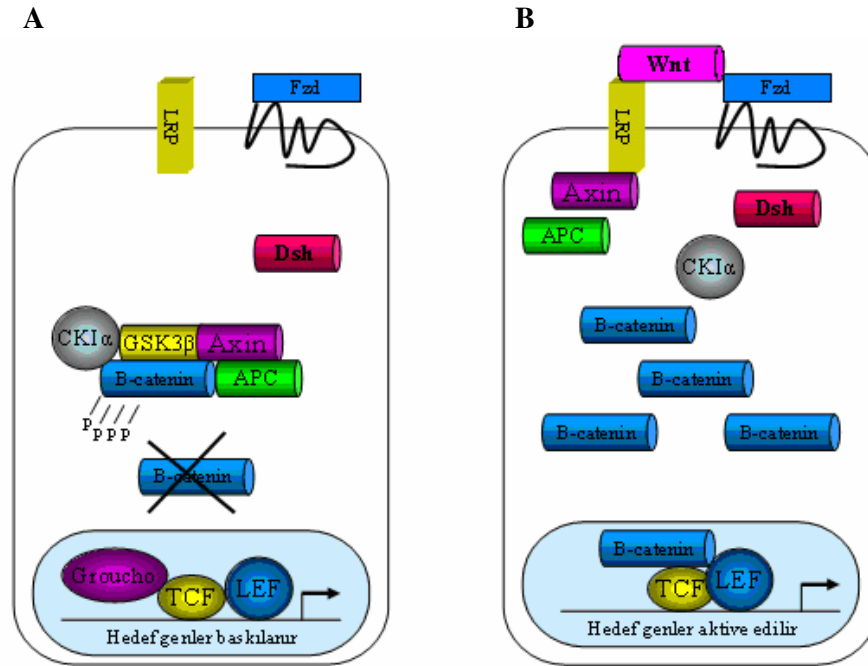
artırarak β -catenin'in stoplazmada yıkımına yardımcı olur. Dishevelled (Dsh); Wnt sinyali yolunda β -catenin'in proteozomlarla yıkılmasını düzenleyen bir sitoplazmik sinyal proteindir (47). Lef/Tcf transkripsiyon faktörleri (Lymphoid Enhancer Factor / T-Cell Factor); Wnt sinyali yolunun hedef genlerinin transkripsiyonunu sağlayan moleküllerdir.

2.3. Wnt Sinyal Sisteminin Hedef Genleri

Wnt sinyali sisteminin hedef genleri: insan kolon kanseri ile ilgili genler, c-myc gen ailesi genleri başta olmak üzere çoğu hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenleyen genlerdir (46).

2.4. Wnt Sinyal Sisteminin Çalışma Mekanizması

Wnt sinyali sisteminin aktivasyonu, sinyal yolunda anahtar molekül olan β -catenin'in hücre içersindeki lokalizasyonu ve seviyesi ile düzenlenir (Şekil 2).



Şekil 2. Wnt sinyali sistemi modellenmesi. **A.** Wnt ligandı olmadığı durumda Wnt sinyali sisteminin hedef genleri baskılanır, **B.** Wnt ligandı olduğu durumda Wnt sinyali sisteminin hedef genleri aktive edilir.

2.4.1. Wnt Sinyali Olmadığı Durumda

Eğer Wnt sinyali yolunu aktifleştirecek bir Wnt sinyali ligandı yok ise; Dsh inaktif, GSK-3 β ise aktif durumdadır.

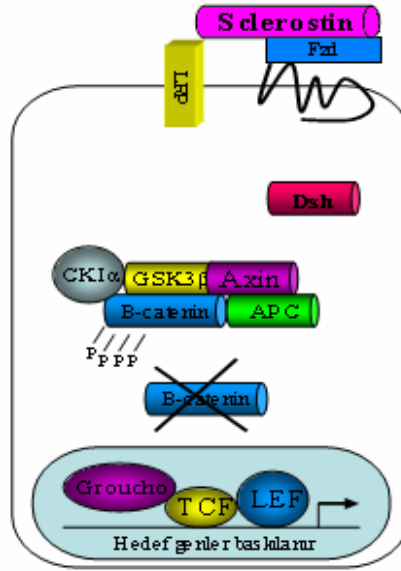
Sitoplazmadaki GSK3 β , CKI (casein kinase), Axin ve bir tümör baskılayıcı faktör olan APC bir kompleks oluşturarak β -catenin'in spesifik aminoasitinin N-terminaline bağlanırlar, β -catenin'in fosforillenmesini ve F-box proteozomu ve E2 ligazları için hedef haline gelmesini sağlarlar (47). Sitoplazmadaki β -cateninler proteozomlar ile yıkılarak sitoplazmadaki β -catenin seviyesi düşürülür böylece hiçbir β -catenin molekülü hücre iskeletinde aktin filamentlerine ve hücre adhezyonunda görevli kadherin moleküllerine bağlanamaz (59). β -catenin'in degradasyonu da, hücre çekirdeğinde “*Tcf/Lef*” grubu transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanarak Wnt sinyal yolunun hedefi olan genlerin transkripsiyonlarını baskılamalarına neden olur (48). Böylece Wnt sinyal sisteminin hedef genlerinin transkripsiyonu gerçekleşmez.

2.4.2. Wnt Sinyali Olduğu Durumda

Wnt proteini Fzd resöptörü ve LRP5/6 koreseptörlerine bağlanarak bir kompleks oluştururlar. Bu kompleks LRP5/6'nın intracellüler kısmını fosforile ederek Axin'in de bu moleküle kenetlenmesini sağlar (47). Axin Lrp5/6'ya bağlandıktan sonra Dsh vasıtasıyla GSK3 β 'ın aktivitesi baskılanır. Bu durum *GSK3 β -CKI-Axin-APC* kompleksinin oluşumunu engeller ve β -catenin'in fosforilasyonunu ve degradasyonunu inhibe eder. Böylece sitoplazmada β -catenin konsantrasyonu artar. Stoplazmada fazlaca birikmiş olan β -catenin'in bir süre sonra Wnt sinyal sisteminin hedeflediği genleri aktive etmek için hücre çekirdeğine geçer (47). Normalde bu hedef genler nükleusta inaktif durumda bulunurlar. β -catenin nükleusta *Lef/Tcf* transkripsiyon faktörleri ile etkileşir. β -catenin *Lef/Tcf* transkripsiyon faktörlerinin “Groucho” korepresörlerinin yerine geçer. β -catenin ve *Lef/Tcf* birleşmesi ile oluşan heterodimer, transkripsiyon koaktivatörleri ile birlikte DNA'ya bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonu başlatır (47).

2.5. Sclerostin Proteini ve Wnt Sinyal Sistemi

Sclerostin proteini, kemik metabolizmasında önemli bir kontrol noktası olan Wnt sinyal sistemine antagonist (zıt etkili) olarak çalışır. Sclerostin proteini Lrp5/6 yüzey koreseptörlerine bağlanarak Wnt sinyal ligandının, Wnt sinyal sistemi yüzey reseptörlerine bağlanmasını engeller. Böylece β -catenin sitoplazmada degradasyona uğrar ve hedef genlerin transkripsiyonu gerçekleşmez Aksi durumda, *SOST* geninde herhangi bir mutasyon olduğunda Sclerostin proteini sentezlenemez ve Wnt sinyal sistemi hiperaktif bir şekilde çalışarak, osteoblastların hiperaktivasyonuna neden olur. Böylece kemik yapımı ara vermeden devam eder ve sonuç olarak da kemiklerde aşırı büyüme ile seyreden Sclerosteosis ve Van Buchem hastalıklarının oluşumuna neden olur.(9, 10).



Şekil 3. Sclerostin proteini ve Wnt sinyal sistemi.

Sclerostin proteini; homolog yapıda olduğu diğer sistein düğüm motif proteinleri gibi kemik oluşumunda kontrol görevi gören BMP sinyal sistemine antagonist olarak çalışmaktadır.

2.6. Sclerostin ve BMP Sinyal Sistemi

BMP sinyal sistemi; pek çok doku ve organda hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve morfogenezini düzenlemek suretiyle embriyogenezis ve morfogeneziste görev alan bir sinyal sistemidir (49).

Yapılan çalışmalarda Sclerostinin; osteoblastların aktivite ve farklılaşmalarında önemli rolü olan BMP sinyal sistemi antagonisti olduğu bildirilmiştir (50). Sclerostin; osteositlerden, BMP'nin transkripsiyonunu negatif regüle ederek, osteoblastların proliferasyonu, farklılaşması ve aynı zamanda olgun osteoblastların aktivasyonunu kontrol etmek üzere salınır. Bu yüzden sclerostinin yokluğu veya fonksiyon mutasyonu BMP lerin negatif regülasyon kaybına neden olacağından hayat boyunca kemiklerde aşırı büyüme görülecektir (50).

Sclerostin proteini BMP antagonistidir fakat klasik BMP antagonistlerinden farklıdır. Sclerostinin BMP reseptörlerine afinitesi diğer BMP antagonistlerine oranla daha azdır. Bu yüzden de reseptörlere bağlanmak için bir aracı moleküle ihtiyaç duyar (39). Sclerostinin henüz bilinmeyen kemik oluşumunu uyarıcı bir büyüme faktörünü etkilemek suretiyle BMP yanıtlarını inhibe etmesi önerilen bir başka modeldir (39).

3. MATERYAL METOD

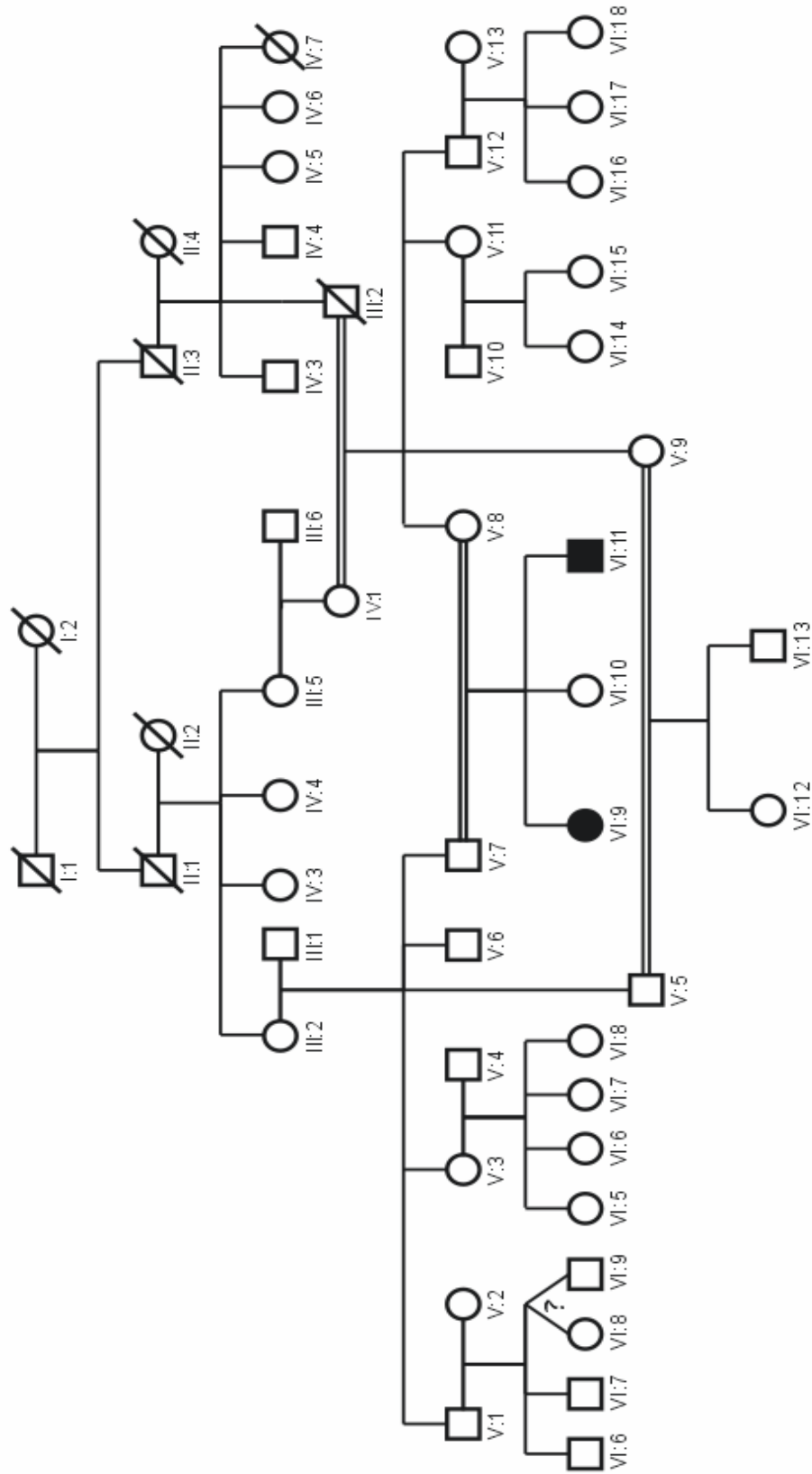
3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma Kasım 2006-Temmuz 2007 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dallarında gerçekleştirildi.

Çalışma grubu; Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniği'nde Sclerosteosis ön tanısı almış iki kişinin bulunduğu altı kuşaklı ve aile bireylerinden alınan bilgilere göre halen hayatta 42 bireyin bulunduğu bir ailedir (Şekil 4). Çalışmanın ilk aşamasında *SOST* genine yönelik aday lokalizasyon yaklaşımıyla bağlantı analizi yapıldı. Sclerosteosis hastalığı otozomal resesif kalıtım gösterdiği için bağlantı analizinde, yalnızca etkilenmiş bireylerin yer aldığı çekirdek aile değerlendirmeye alındı. Bu aile; iki Sclerosteosis tanısı almış kardeş (VI:9 ve VI:11), bir sağlıklı kardeş (VI:10) ve anne-baba'dan (V:7, V:8) oluşmaktaydı. Anne ve baba arasında akraba evliliği bulunmaktaydı.

Çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.



Şekil 4. Sclerosteosis ön tanı bireylerin yer aldığı aile ağacı.

3.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, kitler ve sarf malzemeler değişik firmalardan temin edildi.

Acrylamide (C ₃ H ₅ NO)	Merck, 8.00830.1000
NN-Metilenbisacrylamide (C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂)	Sigma, M-2022
Agaroz	Applichem, A2114.0100
Amonyum persulfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma, 9164
Sodyum klorür (NaCl)	Merk, 1.01540.0500
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merk, 1.06462
Sodyum dodesil sulfat (SDS)	Merk, 822050
Glacial asetik asit (C ₂ H ₄ O ₂)	Merk, 1.00056.2500
Hidroklorik asit (HCl)	Merk, 1.00314.2500
Bromfenol mavisi (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	Merk, 1.08122.0005
Xylene cyanol (C ₂₅ H ₂₇ N ₂ O ₆ S ₂ Na)	Merk, 1.12007.2500
Trizma hydrochloride (C ₄ H ₁₂ ClNO ₃)	Merck, 1.01547.0100
Trizma baz (Tris-base) (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Applichem, A2264.1000
İzopropanol (%100)	Sigma I-9516
Etil alkol (C ₂ H ₅ OH)	Tekel, Türkiye
Etidium bromide (C ₁₂ H ₂₀ N ₃ Br)	Sigma, E-7637
Etilene-diaminetetra-acetic acide (EDTA)	Sigma, E-5134
Deoxynucleotide Triphosphates (dNTP)	Invitrogen, ABD
<i>Taq</i> DNA polimeraz	Fermantas, MBI
Expand long template PCR kiti	Roche, Almanya
Oligonucleotide primer	Invitrogen
Proteinaz K	Promega, V3021
ΦX174 DNA / <i>Hinf</i> I markır	Promega, E3511
Amonyum klorür (NH ₄ Cl)	Merck, 1.01145.1000
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Merk, 1.06398.1000
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Merck, 910TA654681
Gümüş nitrat (AgNO ₃)	Sigma, S-6506
GenomeLab™ methods development kit	Beckman Coulter, ABD
Borik asit (H ₃ BO ₃)	Merk, 1.00160
QIAquick gel extraction kit	QIAGEN, Almanya

Formaldehide (CH ₂ O)	Sigma, F-8775
Yağmur kaydırıcı	ABD
γ-methacryloxypropyltrimethoxysilane	Promega, Q421A
N,N,N,N- tetramethylethyleneamide (TEMED)	Merk, 1.10732.0010

3.1.3. Gereçler

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler değişik firmalardan sağlandı. Bazı cihazları yerli firmalara imal ettirilmiştir.

Yatay elektroforez düzeneği	Max FILL, İngiltere
Dikey elektroforez düzeneği	Owel, ABD
Doğru akım güç kaynağı (3000 volt)	CONSORT E833, Belçika
Yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 6820, Almanya
Vorteks	IKA, ABD
Ultraviole transillüminatör	Vilbert Lourmat, Fransa
Poloroid kamera	Gel Cam, İngiltere
Termocycler	Techne TC-512, İngiltere
Otomatik pipet seti	Gilson, Fransa
Orbital sallayıcı	El yapımı
Eppendorf tüpler	Axygene, ABD
Polaroid kamera filmleri	Sigma, ABD
Hassas terazi	Mettler Toledo AB204-S, İsviçre
pH metre	Hanna , Portekiz
Spektrofotometre	Shumatsu, Japonya
Manyetik karıştırıcı	IKA, ABD
Buz makinesi	Scotman, İngiltere
Mikrodalga fırın	Beko, Türkiye
Distile su cihazı	CFL 2004, Almanya
Pastör fırını	Memmert, Almanya
Otoklav	Medexport, Rusya
Derin dondurucu (-35)	Bosch Türkiye
Buz dolabı	Arçelik, Türkiye
Etüv	Memmert, Almanya

3.1.4. Solüsyonlar

3.1.4.1. DNA izolasyon tamponları

1. Eritrosit Lizis Tamponu (pH: 7.4)

10x stok solüsyonu hazırlanışı:

83 gr NH_4Cl (155mM)

10 gr KHCO_3 (10mM)

20 ml Na_2EDTA (0.5 M) 500 ml deiyonize suda çözüldü pH

7.4'e ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121 ° C' de 1 atm. basınçta 25 dk otoklavlandı.

1x çalışma solüsyonu hazırlanışı:

10x stok solüsyonundan 50 ml alınıp deiyonize su ile 500 ml tamamlandı. 121 ° C' de 1 atm. basınçta 25 dk otoklavlandı.

2. Nuclei Lizis Tamponu (pH 7.5)

10 mM Tris-HCl

400 mM NaCl,

10 ml Na_2EDTA

Hazırlanışı:

0.787 g Tris HCl

11.70 g NaCl

0.74 g 0.1M Na_2EDTA 300 ml deiyonize suda çözüldü. pH 7.5'e

ayarlandıktan sonra son hacim 500 ml'ye tamamlandı. 121 ° C' de 1 atm. basınçta 25 dk otoklavlandı.

3. Proteinaz K Çözeltisi (20mg/ml)

Proteinaz K çözeltisi, 20 mg Proteinaz K tartılarak 1ml deiyonize suda çözüldü. Proteinaz K çözeltisi 250 µl olacak şekilde 1,5 ml'lik eppendorf tüplere bölündü ve -20 ° C' de saklandı.

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

10 gr SDS deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanarak 68 ° C'de ısıtılarak çözüldü. Solüsyon oda ısısında saklandı.

5. Sodyum Klorür (6M)

58.4 g NaCl 30 ml deiyonize su içinde çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlandı.

6. 0.1M Na₂EDTA (pH 8.0)

37,22 g Na₂EDTA 700 ml deiyonize su içinde çözüldü. 10 M'lik NaOH ile pH 8.0'a ayarlandı. Deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121 ° C' de 1 atm. basınçta 25 dk otoklavlandı. 4°C' de saklandı.

7. 1M Tris-HCl

157.6 g Tris-HCl 800 ml deiyonize suda çözüldü. pH 7.4'e ayarlandı. Deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121 ° C' de 1 atm. basınçta 25 dk otoklavlandı. 4°C' de saklandı.

8. TE Tamponu

10 mM	Tris HCl
1 mM	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

1 mM	Tris HCl (pH 7.4)
0.1M	Na ₂ EDTA (pH 8.0) ayrı ayrı hazırlanır. Her ikisinden 5'er ml alınır.

Üzerine 490 ml steril deiyonize su ilave edilerek 500 ml'ye tamamlanır. 121 ° C' de 1 atm. basınçta 25 dk otoklavlandı. 4°C' de saklandı.

3.1.4.2. Agaroz Jel Elektroforez Solüsyonları

1. TAE Elektroforez Tamponu (pH~ 8.5)

50x stok solüsyon hazırlanışı:

242 g	Tris base
37.2 g	Na ₂ EDTA-2H ₂ O

57.1 ml Glasial asetik asit deiyonize su kullanılarak 800 ml'de çözüldü. NaOH peleti kullanıldı pH ayarı yapıldı. Deiyonize su ile son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Çalışma solüsyonu olarak deiyonize su ile 1x olarak sulandırıldı.

1x çalışma solüsyonu hazırlanışı:

40 mM Tris asetat
2 mM EDTA

2. Etidium Bromide Solüsyonu:

10 mg/ml olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Işıktan muhafazalı olarak saklandı.

3.1.4.3. Poliakrilamid Jel Elektroforez Solüsyonları

1. 0.5M Na₂EDTA (pH 8.0)

186.1 g Na₂EDTA 700 ml deiyonize su içinde çözüldü. 10M'lık NaOH ile pH 8.0'a ayarlandı (yaklaşık 50 ml). Son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121 ° C' de 1 atm. basınçta 25 dk otoklavlandı. 4°C' de saklandı.

2. TBE Elektroforez Tamponu (pH~ 8.5):

10x stok solüsyon hazırlanışı:

108 g Tris base
55 g Boric aside
40 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

deiyonize su kullanılarak 800 ml'de çözüldü. pH ayarı yapıldıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Çalışma solüsyonu olarak deiyonize su ile 1x olacak şekilde sulandırıldı.

1x çalışma solüsyonu hazırlanışı:

89 mM Tris base
89 mM Borik asit
2 mM EDTA

3. %10'luk (w/v) APS (Amonyum Persulfat)

0.1 g Amonyum persulfat üzerine 1 ml dH₂O eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı. Her çalışmada taze olarak hazırlandı.

4. Yapıştırıcı Solüsyon

9.9 ml	Etanol (%96)
50 µl	Glasiyal asetik asit
50 µl	γ-methacryloxypropyl-trimethoxysilane

Falkon tüp içersinde karıştırılarak 4°C' de saklanır.

3.1.4.4. Yükleme Tamponu

Denatüre Yükleme Tamponu (6x)

Formamide	%95
Xylene cyanole	%0.5
Bromfenol mavisi	%0.5

Deiyonize su ile hazırlandı ve 4°C' de saklandı.

3.1.4.5. Gümüş Boyama Solüsyonları

1. %10'luk Asetik asit:

1350 ml	Distile su
150 ml	Glasiyal asetik asit

2. % 0.1'lik Gümüş Nitrat Solüsyonunun Hazırlanması:

Gümüş nitrat	% 0.1 (v/w)
Formaldehite	% 0.078 (v/v)

Hazırlanışı:

1 lt	Distile su
1 g	Gümüş nitrat
2 ml	Formaldehit (% 39'luk)

Formaldehit kullanılmadan hemen önce ilave edilir.

3. Sodyum Karbonatın (Developer) Hazırlanması:

Sodyum karbonat	%3.4 (v/w)
Formaldehite	% 0.078 (v/v)

Hazırlanışı:

1 lt	Distile su
34 g	Sodyum karbonat
2 ml	Formaldehit (% 39'luk)

Formaldehit kullanılmadan hemen önce ilave edilir. Solüsyon buz üzerinde soğutulduktan sonra kullanılır. Kullanma sıcaklığı yaklaşık 10 °C' dir.

3.2. Metod

Sclerosteosis hastalığından sorumlu gen, *SOST* geni olarak tanımlanmıştır (3, 4). Bundan dolayı çalışmada öncelikle aday lokalizasyon yaklaşımından hareketle, V:7, V:8, VI:9, VI:10 ve VI:11 numaralı bireylerden oluşan çekirdek ailede bağlantı analizi yapılarak *SOST* genine bağlantı olup olmadığı araştırıldı. Bağlantı analizi *SOST* genine komşu 6 STR (short tandem repeat) markırı kullanılarak yapıldı. Bağlantı gösterildikten sonra *SOST* geninin, kodlayan bölgeleri ve ekzon–intron bağlantı bölgeleri PCR yöntemiyle amplifiye edildi. PCR ürünleri agaroz jelden kesilip alınarak *QIAquick Gel Extraction Kit* ile saflaştırıldı. PCR ürünlerinin nükleotid dizilimi *dideoksi sonlandırma yöntemi* olarak bilinen DNA dizileme yöntemi kullanılarak sekanslandı. PCR ile çoğaltılan gen bölgesine ait ürün saflaştırıldıktan sonra floresan işaretli dideoksinükleotidler ile döngüsel sekanslama (döngü dizileme) yapılarak otomatik sekans cihazında (Beckman Coulter) sekanslandı. Elde edilen dizileme sonuçları *SOST* geninin Gen Bankasından alınmış olan referans dizisi ile karşılaştırıldı. *SOST* geninde tanımlanan baz değişiminin ailedeki dağılımı ARMS (Amplification Refractory Mutation System) ile gösterildi.

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

DNA, 10 ml'lik EDTA'lı kandan izole edildi. EDTA'lı kan 50 ml'lik falkon tüplere boşaltıldı ve üzerine 40 ml eritrosit lizis tamponu eklenerek buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Daha sonra 2500 rpm'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Pellet üzerine tekrar 40 ml eritrosit lizis tamponu eklendi ve kuvvetlice çalkalandı. Ortamdaki eritrositleri parçalayıp uzaklaştırmak için yapılan bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandıktan sonra, pellet üzerine sırasıyla 4 ml nüklei lizis tamponu, 150 µl proteinaz K (20 mg/ml), 425 µl %10'luk SDS eklenerek 37 °C'lik etüvde bir gece (O/N) bırakıldı. Etüvden çıkartılan tüpler oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek soğutuldu. Tüplerin üzerlerine 1,4 ml 6M NaCl eklenerek 10 saniye kuvvetlice çalkandı. Oda sıcaklığında 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe aktarılarak oda sıcaklığında 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe alındı. Süpernatant üzerine 3 katı kadar %96'lık etil alkol döküldü. Etil alkol dökülen tüp hafifçe alt-üst edildi ve bu şekilde DNA'nın presipite olması sağlandı. Presipite olan DNA pipet ucuyla 1.5 ml'lik eppendorf tüpe alınarak üzerine 500 µl %70'lik soğuk etil alkol eklendi ve alt-üst edilerek santrifüjde 15.000 rpm'de 45 saniye çevrilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Hızlı santrifüj işlemi tekrarlandı ve tüpte kalan etil alkol pipet ucu ile alındı. 65

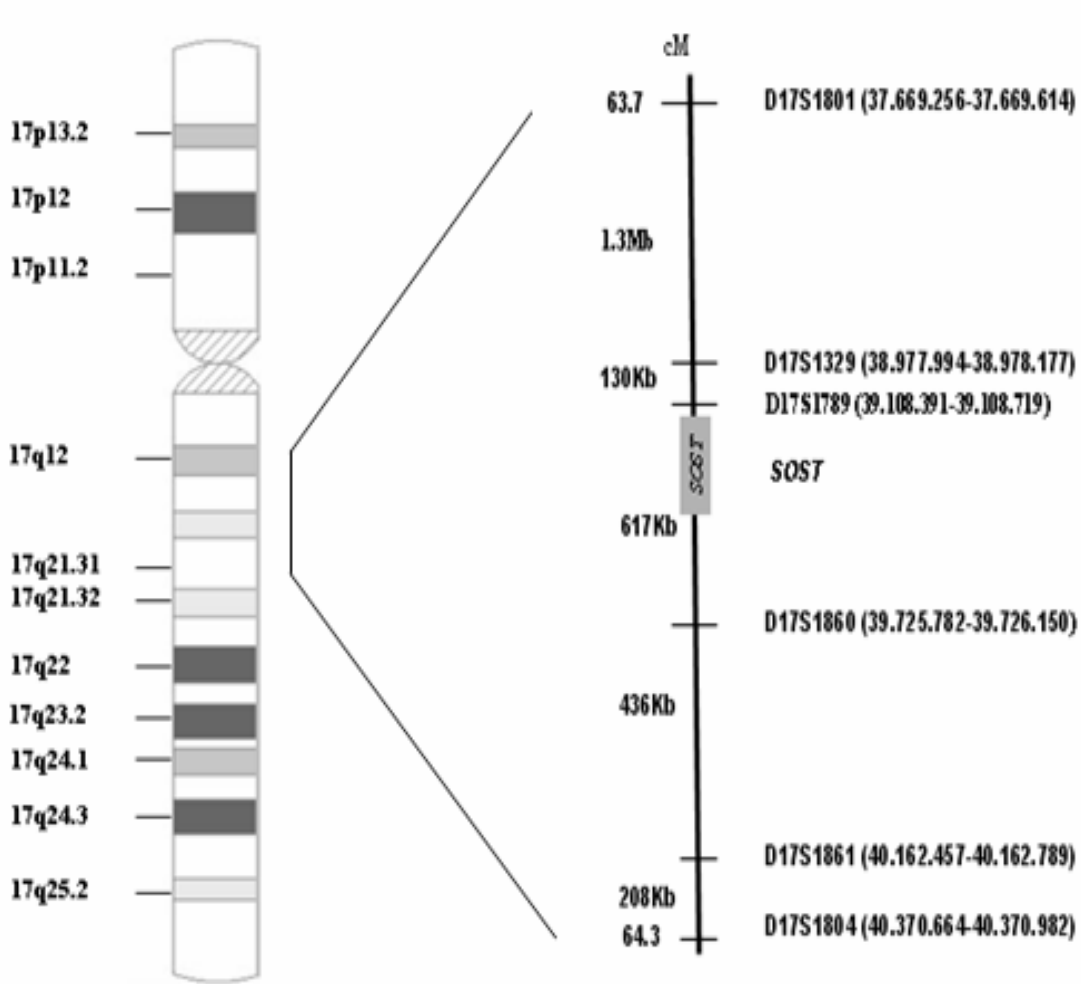
C'lik etüvde DNA 20 dakika kurutulduktan sonra üzerine 500 µl TE eklendi ve çözünmesi için bir gece oda sıcaklığında bekletildi (51).

3.2.2. DNA'nın Spektrofotometrede Konsantrasyonunun Ölçümü

İzole edilen DNA'ların 1/50 dilüsyonları hazırlandı ve 260 nm dalga boyundaki absorban değerleri okundu. 1 OD'nin 50 ng/µl DNA miktarına eşitliğinden gidilerek 260 nm dalga boyunda okunan absorban değerlerinden, örneklerdeki konsantrasyonu hesaplandı. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmak üzere DNA'lar steril deiyonize su ile 50 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı (52).

3.2.3. Aday lokalizasyon yaklaşımı

Sclerosteosis hastalığından sorumlu *SOST* geni, 17. kromozomun 17q21.31 bölgesinde lokalizedir (53). Çalışmamızda öncelikle çalışmada yer alan ailede, hastalığın *SOST* geni ile birlikte kalıtılıp kalıtılmadığının aday lokalizasyon yaklaşımı ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Sclerosteosis hastalığı otozomal resesif geçişli bir hastalık olduğundan 42 bireyden oluşan tüm aile yerine Sclerosteosis tanısı almış bireylerin yer aldığı çekirdek aile değerlendirilmeye alınmıştır. Hasta iki kardeş, anne, baba ve normal bir kardeşten oluşan çekirdek ailede *SOST* geninin bulunduğu 17. kromozomun 17q21.2-17q21.31 bölgesinde 0.6 cM'luk *SOST* geni ve lokalize olduğu bölge D17S1801, D17S1329, D17S1789, D17S1860, D17S1861 ve D17S1804 markırları ile tarandı (Şekil 4). *SOST* genine komşu olan STR marker bilgilerine ulaşmak için "UCSC Human Genom Browser" internet adresi kullanıldı (53). Bağlantı analizinde kullanılan markırların baz dizileri, başlangıç ve bitiş yerleri, ürün uzunlukları ve heterojeniteleri Tablo 1'de verildi. Bağlantı analizinde kullanılan 6 STR markırı seçilirken heterojenitelerinin yüksek olmasına özen gösterildi.



Şekil 5. *SOST* geni bağlantı analizinde kullanılan STR markırları ve kromozom üzerindeki lokalizasyonları.

Tablo 1. Bağlantı analizinde kullanılan STR markırları (Mb: Mega baz)

Markır isim	Markır baz disisi (5'→3')	Lokalizasyon (Mb)	Maksimum heterozigotluk	PCR ürünü
D17S1801F	ATCCTCCCACCTCAGC	37.6	0.64	235-245 bp
D17S1801R	ATGAAAAATGAAATTACAAACAATC			
D17S1329F	GACTCTGAAGGTAAAGAGCA	38.9	0.80	183 bp
D17S1329R	CTCCCCTGCCTTGGGAGTAG			
D17S1789F	ATTGNCCTGGCTTCTG	39.1	0.70	167-211 bp
D17S1789R	GGCTGGAGCAGGGACT			
D17S1860F	GCGCAATCTCAGGTCA	39.7	0.78	195-215 bp
D17S1860R	ACCACCGTGTCTGGCTA			
D17S1861F	AGGGGCAGCAGTCCTGTA	40.1	0.83	94-116 bp
D17S1861R	ACATCATCCTGAAATCTAATGGG			
D17S1804F	GCTTCCCTATTTAGACATTAGGTT	40.3	0.74	221-239bp
D17S1804R	ATCGCACCATTGCACTC			

3.2.3.1. Bağlantı Analizi İçin PCR Reaksiyonu

PCR reaksiyonu, 25 µl toplam hacimde 200 µl'lik tüplerde yapıldı. DNA polimeraz enzimi olarak *Fermentas Taq DNA polimeraz* enzimi kullanıldı. Bir PCR reaksiyonu karışımı için kullanılan bileşen miktarları ve PCR reaksiyonun gerçekleştiği optimum koşullar şu şekildeydi.

PCR master mix	1 Reaksiyon
PCR 10X reaksiyon tamponu	2.5µl
MgCl ₂ (25mM)	1.4 µl
dNTP (10mM)	0.4 µl
Primer Forward (10pm/ µl)	1 µl
Primer Reverse (10pm/ µl)	1µl
Taq DNA Polimeraz (5U/ µl)	0.2 µl
Genomik DNA (50ng/ µl)	2 µl
Deiyonize Su	16.5 µl
Toplam	25 µl

PCR Koşulları

İlk denatürasyon	94 °C	5dk	} 40 Döngü
Denatürasyon	94 °C	30sn	
Bağlanma	52 °C	45sn	
Uzama	72 °C	45sn	
Son uzama	72 °C	5dk	
Sakalama	4 °C	∞	

3.2.3.2. PCR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Kontrolü

8 µl PCR ürünü üzerine 3 µl yükleme tamponu ilave edildi. Hazırlanan karışımın tamamı TAE tamponu ile hazırlanan %2'lik agaroz jelde 100 voltta 30 dakika yürütülerek PCR reaksiyonunun olup olmadığı, olmuş ise PCR ürün bantlarının spesifikliği kontrol edildi.

3.2.3.3. Denatürant Poliakrilamid Jel Elektrofrez

1. Denatürant Poliakrilamid Jel Elektrofrez İçin Camların Hazırlanması

PCR ürünlerinin analizi 35X45 cm ölçülerinde sekans elektrofrez düzeneği kullanıldı. Kulaklı ve düz camlar %70'lik Etil alkol ile üçer kere silindi. Kulaksız cama 0.5 ml yapıştırıcı solüsyon döküldü ve cama homojen bir şekilde dağılması için gazlı bezle iyice yayıldı. Kulaklı cama yağmur kaydırıcı dökülerek homojen bir şekilde dağılması için gazlı bez ile iyice ovuldu. Her iki camda gazlı bez veya kağıt havlu kullanılarak %70'lik etil alkol ile üçer kere daha silinerek yapışkan solüsyonun ve yağmur kaydırıcının fazlası camların yüzeyinden alındı. Camların iki yanına ve alt kısmına 0.4 mm spacerlar konularak klemples ile tutturuldu.

2. % 6.6'lık Denatürant Poliakrilamid Jelin Hazırlanması ve Dökülmesi

Bağlantı analizinde, % 6.6'lık denatüran poliakrilamid jel kullanıldı. Akrilamid-bisakrilamid oranı 19:1 olarak ayarlandı. Jele denatüran olarak üre konuldu. Her bir jelin hazırlanmasında:

Akrilamid	3.72g
Bis akrilamid	0.198gr
10x TBE tamponu	6ml
Üre	25.2gr
dH2O	----- karışımı hazırlandı.

Karışım üre, akrilamid ve bis akrilamid tamamen çözünene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Jel dökülmeden hemen önce üzerine

350 µl	APS (%10'luk) (taze hazırlanmış)
35 µl	TEMED ilave edildi.

Toplam 60 ml hazırlanan jel 50 ml'lik enjektörle daha önce hazırlanan camların arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Tarak yerleştirilerek klempleser ile tutturuldu ve polimerleşmesi için bir saat beklendi.

3. PCR Ürünlerinin Poliakrilamid Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

İki cam arasına dökülen jel polimerleştikten sonra tarak ve alt spacer çıkartıldı. Camların üzerine bulaşmış olan ve tarak yerleştirilecek bölmedeki jel kalıntıları musluk suyu ile yıkanarak iyice temizlendi. Alt spacerın oluşturduğu boşluk ve elektroforez cihazının alt haznesi 1xTBE tamponla dolduruldu, jel elektroforez cihazına yerleştirildi. Cihazın üst haznesi 1xTBE tamponla dolduruldu. Üzerine 5 µl yükleme tamponu ilave edilen PCR ürünlerinin 8 µl'si kuyucuklarına yüklendi. Örnekler 65 watta (yaklaşık 1300-1600 Volt), PCR ürünlerinin uzunluğuna bağlı olarak 1.5-3 saat yürütüldü.

4. Gümüş Nitrat İle Boyama

- i.* Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra güç kaynağı kapatıldı ve jel camlarla birlikte düzenekten alındı. Jelin yapışmış olduğu kulaksız cam tutularak kulaklı cam kenarında hafifçe zorlanarak kaldırıldı.
- ii.* Jelin yapışmış olduğu cam distile su ile hazırlanmış %10'luk asetik asit içinde 30 dakika orbital karıştırıcıda çalkanarak fiske edildi. Fiksasyon işlemi tamamlandıktan sonra jel üç kez 3 dakika süre ile distile su ile yıkandı. Jel taze hazırlanmış % 0.1'lik gümüş nitrat solüsyonunda 30 dakika çalkandı.

- iii. Jel, gümüş nitrattan sonra jelin yapışmış olduğu uzun camın arka yüzeyi distile su ile hızlıca yıkandı.
- iv. Jelin üzerinde %3.4 (w/v) sodyum karbonatın yarısı döküldü. Bantlar görünür hale gelince sodyum karbonat boşaltılıp geride kalan taze sodyum karbonat jelin üzerine döküldü. Bantlar koyulaşınca fiksasyon için jel %10'luk asetik aside alındı.
- v. %10'luk asetik asit içerisinde 2-3 dakika tutularak boyama işlemi durduruldu.
- vi. Jel çeşme suyunda yaklaşık 5-6 dakika yıkandı ve değerlendirmeye alındı (54).

3.2.4. DNA Dizileme Analizi

SOST geninin kodlayan ve ekzon–intron bağlantı bölgelerini kapsayan bölgelerin amplifiye edebilecek sekans primerleri dizayn edildi. Amplifikasyonda kullanılan primerler sekans analizi içinde kullanıldı. Amplifikasyonda kullanılan primerlerin nükleotid dizileri ve PCR ürünlerinin büyüklükleri Tablo 2’de verildi. Daha sonra PCR ile amplifiye edilen bölgeler %2’lik agaroz jelden saflaştırılarak DNA dizi analizi reaksiyonunda kullanıldı.

Tablo 2. *SOST* geninin iki ekzonu ve ekzon-intron bağlantı bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan primerler

Ekzon No	Forward Primer 5'→3'	Reverse Primer 5'→3'	PCR ürünü
Ekzon 1	SOST_Ex1F	SOST_Ex1R	397 bp
Baz Dizisi	GCTGGCATGAAGCAGAGAG	CCAAGCCTCCCAAAGAGAAG	
Ekzon 2	SOST_Ex2F	SOST_Ex2R	599 bp
Baz Dizisi	GAGACAGGCTTGGCAAAG	CGCAGAGGACAGAAATGTGG	

3.2.4.1. DNA Dizi Analizi İçin DNA Örneklerinin PCR İle Çoğaltılması

SOST geni mutasyon analizi için VI:9 numaralı hasta bireyde ve kontrol olarak bir sağlıklı bireyde *SOST* geni DNA dizi analizi yapıldı. *SOST* geninin birinci ekzonu SOST_Ex1F ve SOST_Ex1R primer çifti ile amplifiye edildi (Tablo 2). Amplifikasyon 25 µl toplam hacimde 200 µl’lik tüplerde yapıldı. DNA polimeraz enzimi olarak *Fermentas Taq DNA polimeraz* enzimi kullanıldı.

SOST geni birinci ekzonunun, *SOST_Ex1F* ve *SOST_Ex1R* primerleri ile amplifikasyonunda, bir PCR reaksiyon karışımı için kullanılan bileşen miktarları ve PCR reaksiyonun gerçekleştiği optimum koşullar şu şekildeydi.

PCR master mix	1X
PCR 10x reaksiyon tamponu	2.5µl
MgCl ₂ (25mM)	2 µl
dNTP (10mM)	1 µl
Primer forward (10pm/ µl)	1 µl
Primer reverse (10pm/ µl)	1µl
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0.2 µl
Genomik DNA (50ng/ µl)	2 µl
Deiyonize su	15.3 µl
Toplam	25 µl

PCR Koşulları

İlk denatürasyon	94 °C	5 dk	} 35 Döngü
Denatürasyon	94 °C	30 sn	
Bağlanma	56 °C	45 sn	
Uzama	72 °C	30 sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	
Saklama	4 °C	∞	

SOST geni ikinci ekzonunun, *SOST_Ex2F* ve *SOST_Ex2R* primerleri ile *Expand Long Template PCR System, Roche kiti* kullanılarak amplifiye edildi.

Kitin protokolüne uygun olarak PCR reaksiyonu 50 µl hacimde hazırlandı. Bir PCR reaksiyon karışımı için kullanılan bileşen miktarları ve PCR reaksiyonun gerçekleştiği optimum koşullar şu şekildeydi.

PCR Mix	1X
dNTP (10mM)	2.5 µl
10X PCR buffer(1,2,3)	5 µl
Primer forward (10pmol/ µl)	2.5 µl
Primer reverse(10pmol/ µl)	2.5 µl
DNA (25ng/ µl)	4 µl
Enzim mix	0.75 µl
dH ₂ O	32.75 µl
Toplam	50 µl

PCR Koşulları

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	
İlk denatürasyon	94	2 dk	
Denatürasyon	94	10 sn	10 Döngü
Bağlanma	55	30 sn	
Uzama	68	45 sn	
Denatürasyon	94	15 sn	25 Döngü
Bağlanma	55	30 sn	
Uzama	68	45 sn	
Son Uzama	68	7 dk	
Saklama	4	∞	

3.2.4.2. PCR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Yürütülmesi

25 µl PCR ürünü üzerine 7 µl yükleme tamponu ilave edilerek TAE tamponu ile hazırlanan %2'lik agaroz jelde 100 voltta 40 dakika yürütüldü. PCR reaksiyonunun olup olmadığı, olmuş ise PCR ürün bantlarının spesifikliği kontrol edildi.

3.2.4.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünlerinin temizlenmesi *QIAquick Gel Extraction, Kit, GmbH, Germany* kullanılarak yapıldı

- i. PCR ürünleri bir bistürü yardımı ile jelden kesilerek 1.5 ml'lik eppendorf tüplere konuldu. Jelin kesimi sırasında mümkün olduğunca PCR bantlarının dışına çıkmamaya dikkat edildi.
- ii. Eppendorf tüplerin üzerine 300 µl Buffer QG eklenerek 10 dakika 50 °C su banyosunda rengi sarı oluncaya kadar çözdürüldü. Jelin iyice çözünmesi için 2-3 dakikada bir tüpler altüst edildi.
- iii. Karışım kolumn tüplerine aktarılarak 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- iv. Son kalan jel kalıntılarını temizlemek için, kolumnun altta kalan kısmı dökülerek üzerine 500 µl Buffer QG eklendi ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- v. Tüplerin üzerine 700 µl PE Buffer eklendi ve 2-5 dakika bekletildikten sonra 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- vi. Alt kısım uzaklaştırıldıktan sonra tüpler ikinci kez 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- vii. Kolumn tüplerinin membranlı kapakları 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarılarak üzerlerine PCR ürünlerinin bant yoğunluklarına göre 30-50 µl EB Buffer (10mM Tris-Cl, ph. 8.5) eklendi ve 1 dakika bekletildikten sonra 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- viii. Eppendorfa geçen PCR ürünlerinden 2 µl'si %2'lik agaroz jelde 100 voltta 20 dakika yürütülerek kontrol edildi.

3.2.4.4. Döngü dizileme reaksiyonu

DNA dizi analizi için yapılan döngü dizileme reaksiyonu *Genome LabTM Methods Development Kit ,Dye Terminator Cycle Sequencing* kiti kullanılarak yapıldı.

- i. Döngü dizileme PCR Premixi aşağıdaki şekilde hazırlandı.

PCR Premix	
10X PCR Buffer	200µl
dNTP Mix	100µl
ddTTP	200µl
ddGTP	100µl
ddCTP	200µl
ddATP	200µl
Toplam	1100µl

ii. Döngü dizileme PCR reaksiyonu son hacim 20 µl olacak şekilde hazırlandı.

Premix	12 µl
Primer (10pmol/ µl)	1,5 µl
PCR ürünü	1 µl
dH ₂ O	5.5 µl
<hr/>	
Toplam	20µl

PCR Koşulları

96 °C	20sn	}	30 Döngü
50 °C	20sn		
60°C	4dk		
4 °C	∞		

3.2.4.5. Etanol Presipitasyonu İle PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

i. PCR ürünleri 500 µl 'lık tüplere aktarılır. Aşağıda gösterildiği şekilde hazırlanan 5 µl stop solüsyonu/glikojen karışımı tüplerin üzerine eklendi.

2 µl	3M NaC ₂ H ₃ O ₂ pH.5.2
2 µl	100mM Na ₂ -EDTA pH.8.0
1 µl	20 mg/ml Glikojen

iii. 60 µl %96'lık soğuk Etanol (-20 °C) eklenerek vortekslendi ve 14.000 rpm'de 15dk +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant pipet yardımıyla dikkatlice uzaklaştırıldı.

iv. Pellet üzerine 200 µl %70'lik soğuk(-20 °C) etanol eklenerek +4 °C'de minimum 2 dakika 15.000 rpm'de santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrar edildi. Süpernatant pipet yardımıyla dikkatlice uzaklaştırıldı.

v. Tüpler ters çevrilerek 10 dakika oda sıcaklığında kurutuldu.

vi. Tekrar suspande edilerek, *BECKMAN COULTER,USA* sekans cihazına yerleştirildi.

3.2.5. ARMS İle p.Trp124Stop Mutasyonun Aile İçindeki Dağılımının Gösterilmesi

SOST geninin ikinci ekzonunda tespit edilen c.371G→A mutasyonunu çalışmaya katılmayı kabul eden 14 aile bireyindeki dağılımı, ARMS (amplification refractory mutation system) yöntemi ile belirlendi. ARMS için normal diziyeye spesifik *SOST_NSP* primeri, mutant diziyeye spesifik *SOST_MSP* primeri ve *SOST_C* forward primer olmak üzere 3 adet primer dizayn edildi (Tablo 3). Normal veya mutant dizinin amplifikasyonundan elde edilen PCR ürünü 181bp'dir.

Tablo 3. c.371G→A mutant allelinin aile bireylerindeki dağılımının ARMS metodu ile belirlenmesinde kullanılan primerler

Primer adı	Primer baz dizisi 5'→3'	PCR ürünü
<i>SOST_NSP</i>	ATGCAGCGGAAGTCGGGCCCACTAGGTCGCCAAC	
<i>SOST_MSP</i>	ATGCAGCGGAAGTCGGGCCCACTAGGTCGCCAAT	181 bp
<i>SOST_C</i>	TGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTTC	

3.2.5.1. ARMS İçin PCR

PCR, 25 µl toplam hacimde 200 µl'lik tüplerde yapıldı. Reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı. PCR reaksiyonu master mixi bileşenlerinin son hacimdeki konsantrasyonları: 10x reaksiyon tamponunun (100 mM Tris-HCl (pH 8.8, 500 mM KCl, % 0.8 (v/v) Nonidet P40) son konsantrasyonu 50mM KCl, 10mM Tris-HCl , (25mM) MgCl₂, son konsantrasyonu 1.5mM, (10mM) dNTP son konsantrasyonu 200 µM, her bir primerden (10pm/ µl) son konsantrasyonu 0.2 pm/ µl, (25ng/ µl) genomik DNA son konsantrasyonu 2ng/ µl ve Taq Polimeraz son konsantrasyonu 0.02U/ µl olacak şekilde hazırlandı. Normal dizinin amplifikasyonu için ilk siklus 94 °C'de 5 dakika denatürasyon, 35 döngü olan ikinci siklus 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 61 °C'de 35 saniye primer bağlanması (annealing), 72 °C'de 1dakika sentez (extension), Son sentez siklusu 72 °C'de 5 dakika ve 4 °C'de saklama şeklinde yapıldı. Mutant dizinin amplifikasyonu için ilk siklus 94 °C'de 5 dakika denatürasyon, 35 döngü olan ikinci siklus 94 °C'de 30 saniye

denatürasyon, 59 °C'de 45 saniye primer bağlanması (annealing), 72 °C'de 1 dakika 20 saniye sentez (extension), son sentez siklusu 72 °C'de 5 dakika ve 4 °C'de saklama şeklinde yapıldı.

3.2.5.2. ARMS Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Yürütülmesi

25 µl PCR ürünü üzerine 7 µl yükleme tamponu ilave edilerek TAE tamponu ile hazırlanan %2'lik agaroz jelde 100 voltta 40 dakika yürütüldü. Ultraviyole ışığı altında c.371G→A mutant allelinin aile bireylerindeki dağılımı görüntülendi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

4.1.1. Fizik Muayene Bulguları

Uzun zamandır devam eden baş ağrısı ve tekrarlayan yüz felci şikayeti ile 2003 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniği'ne gelen hasta Prof. Dr. Refik ÇAYLAN tarafından muayene edildi. Hastanın kafaya ait yüksek çözünürlüklü temporal kemik tomografisinde belirgin bir şekilde, kranial kemiklerde kalınlaşma ve skleroz artışı buna bağlı olarakta internal akustik kanallarda fasial kanallarda, foramen rotundum ve foramen ovale'de daralma izlendi. Bu bulgular ışığında hastada Van Buchem hastalığı olabileceği düşünüldü, daha sonra aile ile ilgili detaylı araştırma yapıldığında anne baba arasında ikinci derece akrabalık olduğu ve iki çocuklarının daha bulunduğu belirlendi. Diğer kardeşlerde hastaneye çağrılarak muayene edildi ve yüksek çözünürlüklü temporal kemik tomografisi ve el düz röntgen filmleri çekildi. Yapılan muayene ve tetkikler sonucunda en küçük kardeşte de benzer bulgular gözlemlendi ve enteresan olarak sol elinde 2. ve 3. parmaklar arasında hafif derecede kutanöz sindaktilisine rastlandı. Bu bulgular eşliğinde ve ailedeki akrabalık dikkate alınarak hastalara Sclerosteosis ön tanısı konuldu.

Hastalar dört yıl sonra 2007 yılında ikinci kez Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniği'ne davet edildi. Hastalara yapılan muayene ve tetkikler sonucunda VI:9 numaralı bireyde (11 yaş) yaşının daha büyük olması ile uyumlu olarak ilerlemiş bir Sclerosteosis tablosu görüldü. Hastanın ailesinden alınan bilgilere göre hasta ilk defa 3.5 yaşında tek taraflı geçici fasial paralizis geçirdiği ve son 7.5 yıl içerisinde 7-8 kez tek ve değişken taraflı periferik tipte fasial paralizis geçirdiği öğrenildi. Halen hastanın sağda periferik tipte "House-Brackman skalası"na göre grade 4 fasial paralizisi ve solda grade 3 fasial paralizisi bulunduğu

belirlendi. Her iki taraftaki fasial paralizis sekelleri nedeniyle hastanın yüzünde tipik mid-fasial hipoplazi gözlenmekteydi. Solda ağız kenarında mürküler sinkinezi mevcuttu. Genişlemiş ve prognatik mandibula, yüksek alın, hastada görülen Sclerosteosis hastalığına özgü diğer klinik bulgulardı. Burun kökü basıktı, os nasale genişlemiş ve palpasyonda düzensiz olarak ele gelmekteydi. Burun tipi infantil ve septal kartilajda gelişme azlığı görülmekteydi. VIII, IX, X, XI ve XII'inci sinirlerin fonksiyonları normaldi. Gözlerde hipertolerizm, görülen diğer bir fiziksel bulguydu. Hastaya yapılan saf ses odyometri testinde, hastanın işitmesi normal olarak değeriendirildi.

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniği'nde hastaya yapılan genel görme muayenesi sonucunda herhangi bir görme kaybı tespit edilmedi.

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Oral Diagnoz ve Radyoloji Anabilim Dalı Polikliniği'nde hastanın çene ve diş yapısı incelendiğinde; köşeli çene yapısı, yer yer lamina dura kaybı, maloklüzyon, alt ve üst çene boyutlarında artma, mandibula korteksinde kalınlaşma gözlendi. Ayrıca erupsiyonda gecikme, alt ve üst çenede buzlu cam görüntüsü ve birinci molar dişlerde hipotaurodontizm tespit edilen diğer klinik bulgularıydı.

İndeks hastalardan VI:11 numaralı birey (7 yaş) VI:9 numaralı birey ile benzer klinik bulgular göstermesine rağmen tutulum VI:9 numaralı birey kadar ileri aşamada değildi. İlk etapta hastada dikati çeken bulgular; köşeli alt çene ve fasial paralizisi sekelleri sonucu oluşan maske yüz görüntüsüydü. Hastanın ailesinden alınan bilgilere göre; hasta ilk kez 3.5 yaşında tek taraflı periferik tipte fasial paralizisi geçirmiş olup fasial paralizisi, şimdiye kadar 4-5 kez tek ve değişken taraflı olarak tekrarlamıştı. Hastada şu anda bilateral, iyileşmiş, grade 2 periferik tipte fasial paralizisi mevcuttu. Ağız kenarı mürküler sinkinezik ovaldı . Burun kökü basık ve palpasyonda os nasale, geniş ve hafif düzensiz olarak ele gelmekteydi. Yine diğer kardeşte olduğu gibi VIII, IX, X, XI ve XII'inci kranial sinirlerin fonksiyonları normaldi. Yapılan saf ses odyometri testine göre hastanın sol kulağında 2000-4000 Hz frekanslarında hafif derecede sensörinöral işitme kaybı tespit edildi.

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniği'nde hastaya yapılan genel görme muayenesi sonucunda herhangi bir görme kaybı tespit edilmedi.

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Oral Diagnoz ve Radyoloji Anabilim Dalı Poliklini'nde diş ve çene yapısı ile ilgili yapılan muayene ve tetkikler sonrasında, dişlerde sayı, şekil, doku açısından herhangi bir anomali gözlenmedi.

4.1.2. Radyolojik Bulgular

VI:9 ve VI:11 numaralı bireylere çekilen yüksek çözünürlüklü temporal kemik tomografisinde kranium ve kafa tabanını oluşturan tüm kemik yapılarında belirgin derecede diffüz sklerotik kalınlaşma izlenmekte olup kafa tabanı düzeyinde foramenlerin belirgin bir şekilde daralmış olduğu görüldü. Fasial sinir kanalı bilateral mastoid segmentte daralma gözlemlendi. Bilateral dış kulak yolu, orta kulak boşluğu ve iç kulak elemanları (koklea ve semisirküler kanallar) normal yapıdaydı. İnternal akustik kanalda her iki bireyde de daralma görülürken bu daralma VI:9 numaralı bireyde daha belirgindi (Şekil 6, 7).

Hastalara çekilen el kemiklerinin düz röntgen filmleri sonucunda; VI:9 nolu bireyde sağ elde hafif sol elde daha belirgin olarak radial deviasyon ve tübüler kemiklerde genişleme görülmekteydi (Şekil 8-A/B).

VI:11 numaralı bireyde görülen el anomalileri daha belirgin şekildedeydi. Sağ el 2. metakarpal ve falankslarda belirgin radial deviasyon, sol elde 2. ve 3. parmaklar arasında hafif kutanöz sindaktilisi mevcuttu . Bunun yanı sıra sol elde; 2. ve 5. metakarpal ve falankslarda belirgin radial deviasyon ve 3. parmağın falankslarında palmar deviasyon izlenmekteydi. Ayrıca, hastanın sol elinde simian çizgisi bulunmaktaydı (Şekil 8-C/D).

4.1.3. Biyokimyasal Bulgular

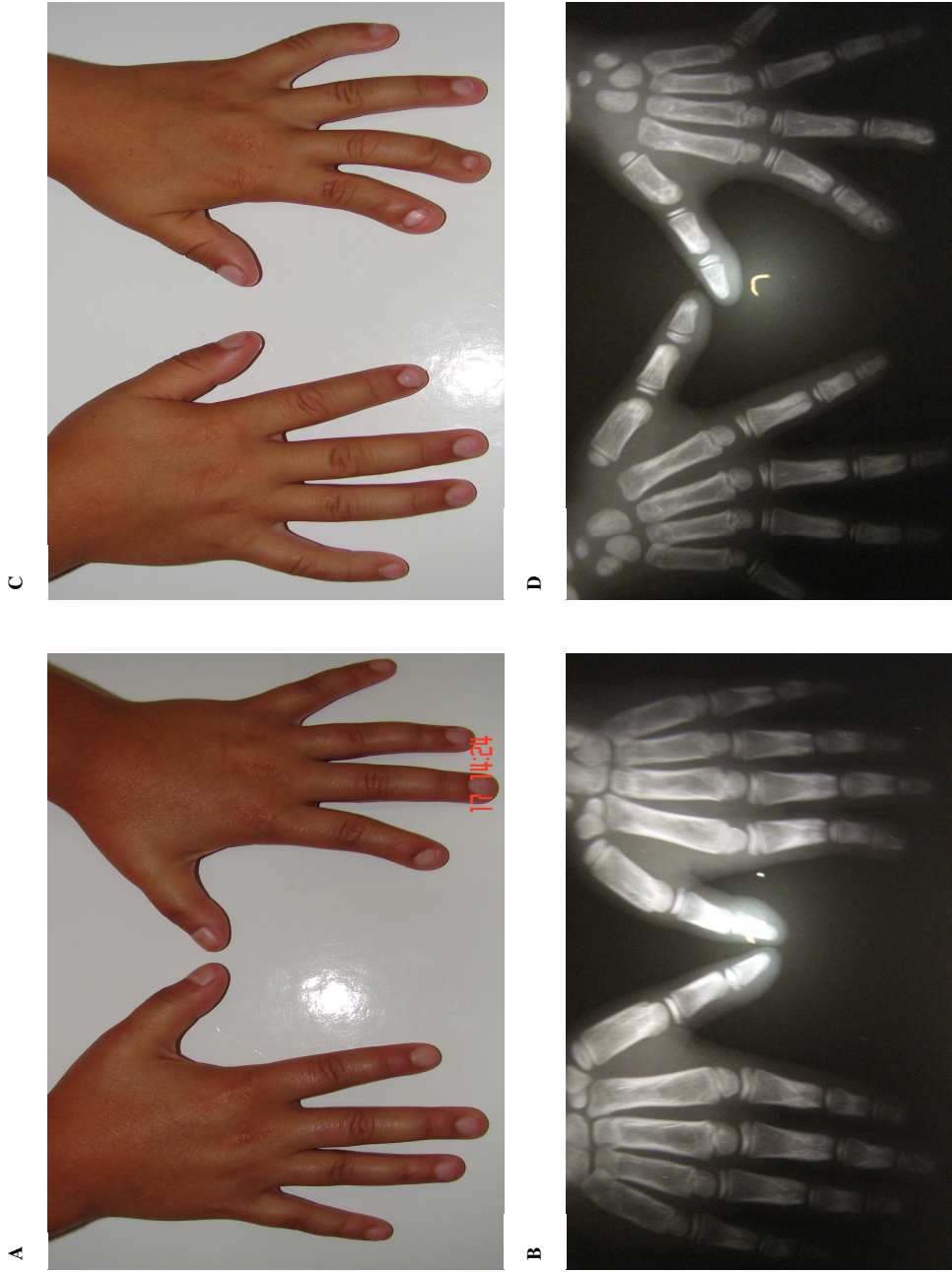
VI:9 ve VI:11 numaralı bireylere yapılan rutin biyokimyasal testler sonucunda hastalarda herhangi bir anormallik izlenmedi. Bunun yanı sıra, kanda alkalın fosfataz seviyesi ölçümü sonucu, VI:9 numaralı bireyde 880 U/L, VI:11 numaralı bireyde 696 U/L olarak belirlendi.



Şekil 6. VI:9 numaralı hastaya ait yüksek çözünürlüklü temporal kemik tomografisi.



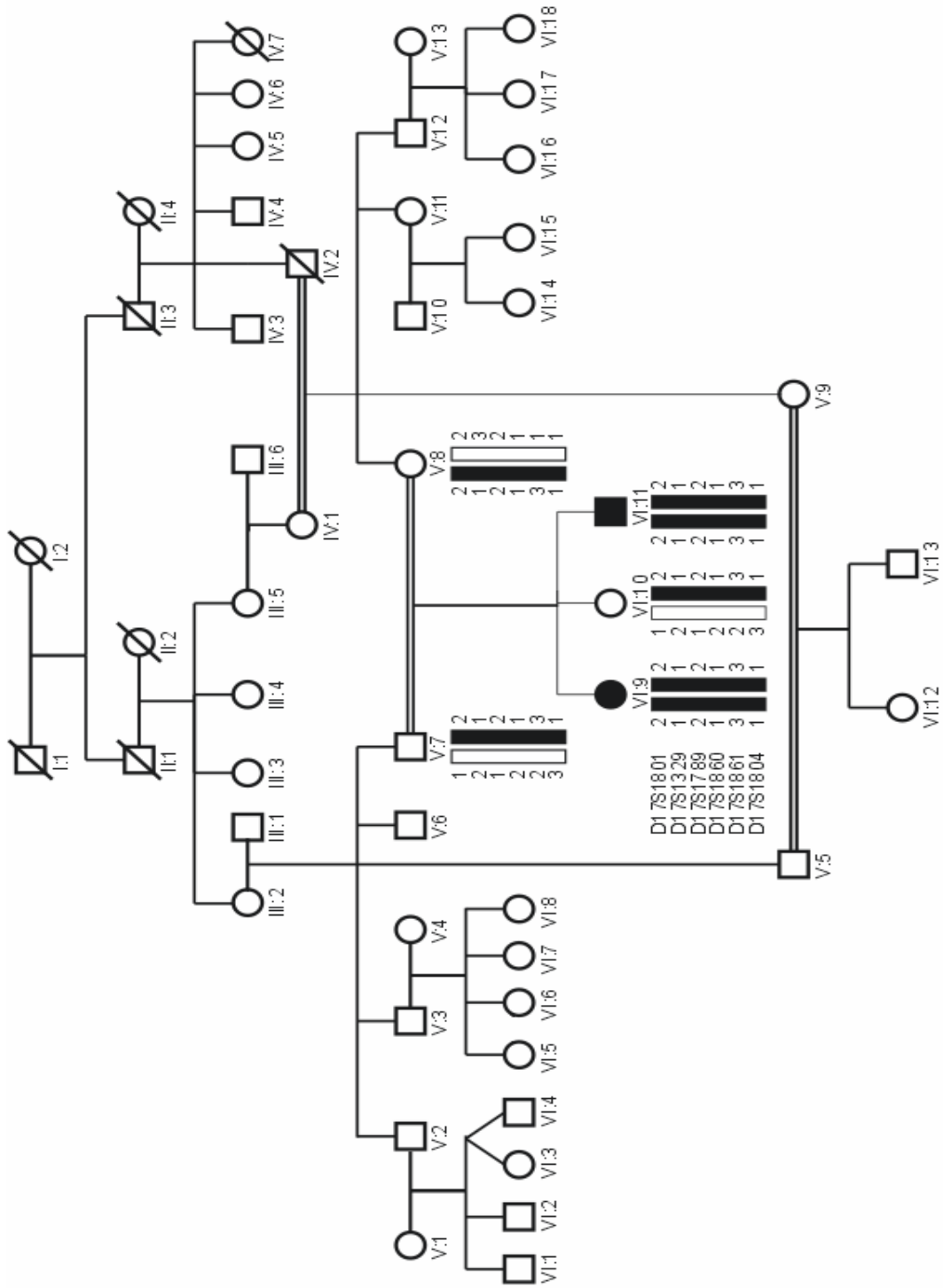
Şekil 7. VI:11 numaralı hastaya ait yüksek çözünürlüklü temporal kemik tomografisi.



Şekil 8. Sclerosteosisli hastalarda el fotoğrafları ve grafileri: **A.** VI:9 numaralı bireye ait sağ ve sol el fotoğrafı, **B.** VI:9 numaralı bireye ait sağ ve sol el düz röntgen filmi, **C.** VI:11 numaralı bireye ait sağ ve sol el fotoğrafı, **D.** VI:11 bireye ait sağ ve sol el düz röntgen filmi.

4.2. *SOST* Genine Bağlantının Gösterilmesi

Çalışmamızda, altı kuşaklı ve aile bireylerinden alınan bilgilere göre halen hayatta 42 bireyi bulunan bir aile incelenmiştir (Şekil 3). Ailede Sclerosteosis ön tanısı almış olan iki birey (VI:9 ve VI:11), ailedeki V:7 ve V:8 numaralı bireylerin yapmış olduğu akraba evliliği sonucunda dünyaya gelmiştir. Sclerosteosis hastalığı otozomal resesif kalıtım gösterdiği için bağlantı analizi yapılırken yalnızca etkilenmiş bireyler, ekilenmiş bireylerin normal kardeşi ve anne-baba'dan oluşan çekirdek aile değerlendirmeye alındı (Şekil 9). *SOST* genini içine alan 17. kromozomun 17q12-q21 bölgesindeki altı STR markırı (*D17S1801*, *D17S1329*, *D17S1789*, *D171860*, *D17S1861*, *D17S1804*) ile yaklaşık 0.6 cM 'luk bölgede etkilenmiş bireyler için homozigotluk araştırılmıştır. Bağlantı analizi sonucunda her iki hasta bireyin de altı farklı STR markırı için homozigot olduğu, mutant olarak kabul edilen kromozomun hem anne-baba'da hem de normal kardeşte heterozigot olarak bulunduğu tespit edildi (şekil 9). Mutant kromozomun aile içindeki dağılımı otozomal resesif kalıtım kalıbı ile uyumlu olup elde edilen sonuç hastalığın *SOST* geni ile kalıtıldığını destekler nitelikte idi.

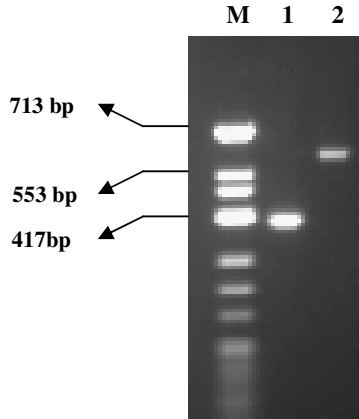


Şekil 9. Bağlantı analizi sonucu elde edilen bireysel haplotiplerin aile ağacı üzerinde gösterimi.

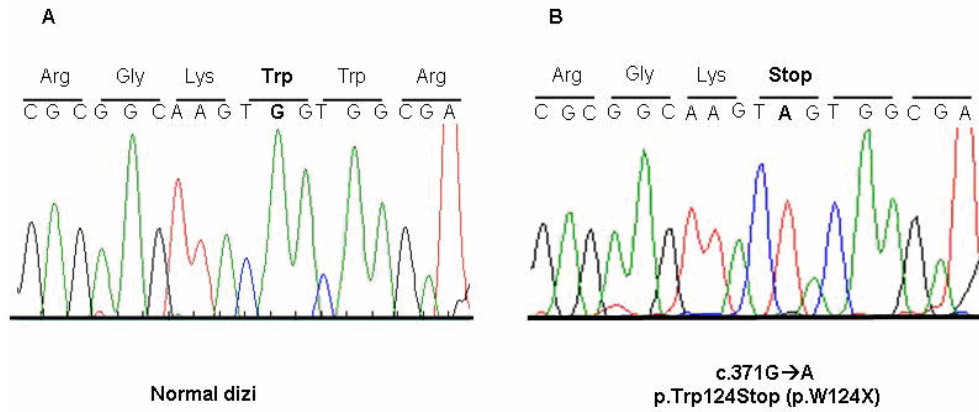
4.3. *SOST* Geni Mutasyon Analizi

Bağlantı analizi sonucunda hasta bireylerde *SOST* genine homozigot bağlantı gösterilmesinin ardından *SOST* geninde meydana gelen değişimleri tespit etmek için *SOST* genine DNA dizi analizi yapıldı. DNA dizi analizi için Sclerosteosis tanısı almış, VI:9 nolu bireyin genomik DNA'sı kullanıldı. *SOST* geninin protein kodlayan dizisi ve exon-intron bağlantı bölgelerini içine alacak şekilde tasarlanan primerler ile genin her iki ekzonu ayrı ayrı amplifiye edildi. Birinci ekzonun amplifikasyonundan 397 bp ve ikinci ekzonun amplifikasyonundan 599 bp'lik ürünler elde edildi (Şekil 10). Agaroz jelde yürütülen PCR ürünleri jelden kesilip alınarak saflaştırıldı, aynı primerler kullanılarak sekans reaksiyonu gerçekleştirildi ve takiben örnekler temizlenerek otomatik sekansırda yürütüldü.

DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesinde *SOST* geninin ikinci ekzonunda 371. pozisyonundaki guaninin bazının adenin bazı ile yer değiştirmesiyle oluşan bir 371G→A transisyonu görüldü. Bu transisyon, sclerostin proteininin 124. pozisyonundaki triptofan amino asidini stop kodonuna dönüştürmekteydi (Şekil 11). *SOST* geninde belirlenen değişimin normal bir *SOST* gen dizisinde kontrol edilebilmesi için sağlıklı bir bireyde *SOST* geni DNA dizi analizi yapıldı. Hasta bireyde görülen değişime normal bireyde rastlanmadı.



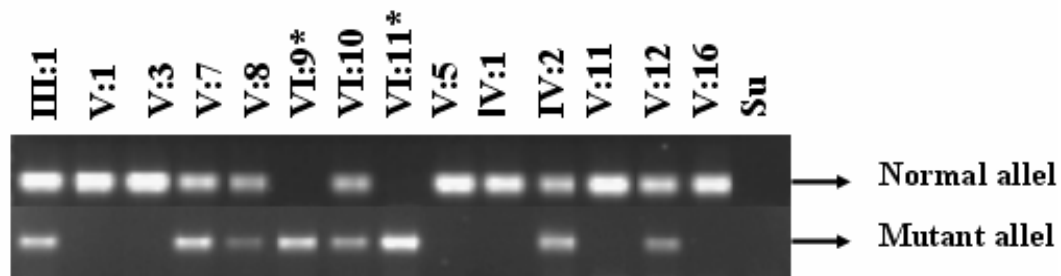
Şekil 10. *SOST* geninin iki ekzonu ve ekzon-intron bağlantı bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu. **1:** Ekzon 1'in amplifikasyonundan elde edilen 397 bp'lik PCR ürünü, **2:** Ekzon 2'in amplifikasyonundan elde edilen 599 bp'lik PCR ürünü. **M:** ΦX174 DNA / *Hinf*I Markır.



Şekil 11. *SOST* geni mutasyon analizi. **A.** Kontrol bireye ait kromotogram. **B.** VI: 9 numaralı hasta bireyde c.371G→A mutasyonunu gösteren kromatogram.

4.4. p.Trp124Stop Mutasyonun Aile İçindeki Dağılımının ARMS İle Gösterilmesi

Çalışmamıza konu olan ailede, etkilenmiş bireylerden birinde yapılan *SOST* geni DNA dizi analizi sonucunda, Sclerosteosis hastalığından sorumlu mutasyon olarak belirlenen p.Trp124stop mutasyonunun, ailede çalışmaya dahil olan bireylerdeki dağılımı ARMS yöntemi ile gösterildi (Şekil 12). Buna göre; III:1, V:7, V:8, VI:10, IV:2, V:12 numaralı bireylerin c.371G→A mutasyonunu heterozigot olarak taşıdıkları görüldü. Diğer taraftan V:1, V:3, V:5, IV:1, V:11, VI:16 numaralı bireylerin ise bu mutasyonu taşımadıkları ve her iki kromozomlarında da normal allel bulduklarını görüldü. Hastalığın ailedeki kalıtımı ile uyumlu olacak şekilde yalnızca VI:9 ve VI:11 numaralı bireylerde c.371G→A mutasyonu homozigot olarak görüldü. ARMS kullanılarak elde edilen sonuç gerek hastalığın aile içindeki dağılımı ile gerekse bağlantı analizinden elde edilen sonuçlar ile tam olarak uyumluydu.



Şekil 12. p.Trp124Stop mutasyonun çalışmaya dahil olan aile bireylerindeki dağılımının ARMS ile gösterilmesi. Üst panel normal allel dağılımını, alt panel mutant allel dağılımını göstermektedir. * : Hasta bireyler.

5. TARTIŞMA

Sclerosteosis hastalığı otozomal resesif geçişli ölümcül bir kalıtsal hastalıktır (2). Bugüne kadar yaklaşık 80 Sclerosteosis vakası bildirilmiştir. Bu vakalardan 70'ten fazlasını Hollanda kökenli Güney Afrikalılar oluşturmaktadır (15). Diğer bildirilen Sclerosteosis vakaları; Amerika, Almanya, Japonya, Brezilya, Senegal ve İspanya asıllıdır.

Sclerosteosis hastalarında görülen tipik fiziksel bulgular; kalınlaşmış kafatası, yüksek alın, genişlemiş ve prognatik mandibula, basık burun kökü, genişlemiş burun kemiği, gözlerde hipertolarizm ve proptozistir. Çalışmada yer alan her iki hastanın klinik bulguları ve fenotipik görünümüleri Sclerosteosis hastalığının genel tablosuyla uyumludur. Sclerosteosis hastalığında kemik yapımı sürekli olarak devam etmektedir. Bu nedenle yaş ilerledikçe hastalığın seyri de ağırlaşmaktadır. Bu yüzden iki kardeşten büyük olanda görülen klinik bulguların küçük kardeşe oranla belirgin olarak ağırlaşmış olduğu gözlenmektedir.

Sclerosteosis hastalığının seyri; aşırı kemikleşme sonucunda kafa kemiklerinin giderek kalınlaşması ve buna bağlı olarak kafadaki kanalların gittikçe daralması şeklindedir (5). Hastalara yaptığımız bilgisayarlı temporal kemik tomografisi analizi sonucunda büyük kardeşte daha ileri derecede olmak üzere her iki hastada da kranium ve kafa tabanını oluşturan tüm kemik yapılarında belirgin derecede diffüz sklerotik kalınlaşma ve kafa tabanındaki foramenlerinde daralma görülmüştür. Ayrıca fasial sinir kanalı ve bilateral mastoid segmentte daralma izlenmiştir.

Bugüne kadar bildirilen verilere göre Sclerosteosis hastalarının yaklaşık % 82'sinde akut ve tekrarlayan yüz felçleri görülür. Yüz felçleri 4 yaş civarında görülmeye başlar ve başlangıçta tekrarlayan tek taraflı olarak görülürken ilerleyen dönemlerde kalıcı ve çift taraflı yüz felcine dönüşürler (1, 32). İncelenen her iki hastada da tek ve değişken taraflı periferik tipte fasial paraliz mevcuttur. Fakat büyük kardeşte kalıcı fasial paralizler olmasına rağmen küçük kardeşte henüz kalıcı paralizler izlenmemektedir. Etkilenmiş iki

kardeş, fasial paraliz açısından karşılaştırıldığında; yaşı daha büyük olan kardeşin kalıcı fasial paralizlerinin daha belirgin ve ilerlemiş olması hastalığın zamanla seyirinin artarak ağırlaşması ile uyumlu bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Kafa kemiklerinin kalınlaşmasına bağlı olarak gelişen diğer spesifik bulguda yüksek intrakranial basınçtır. Sclerosteosis hastalarında yüksek intrakranial basınç 5 yaş civarında fark edilir ve şiddetli baş ağrıları ile kendini gösterir (1). Çalışmada değerlendirilen her iki hastanın baş ağrısı şikayetleri intrakranial basıncın artmasının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir (1).

Sclerosteosis hastalığında sıklıkla görülen bir diğer bulgu da işitme kaybıdır. İşitme kaybı çocukluk döneminde 6 yaş civarında ortaya çıkar ve genç yetişkin dönemde ilerlemeye devam eder. Bu güne kadar bildirilen verilere göre işitme kaybı, Sclerosteosis hastalarının %82'sinde görülen yaygın bir bulgudur (1). Hastaları işitme yönünden incelediğimizde; büyük kardeşte işitme kaybı gözlenmemiş ve işitmesi normal olarak değerlendirilmiştir. İnternal akustik kanalda radyolojik olarak belirgin derecede daralma olmasına rağmen, işitmesinin normal olması, kanaldaki daralmanın geçen fasial, işitme ve denge sinirlerinin fonksiyonunu etkileyecek kadar ilerlemediği şeklinde değerlendirilmiştir. Hastadaki fasial paralizisler ise fasial sinirin temporal kemik içinden geçerken etkilenmesi sonucu oluştuğu şeklinde yorumlanmıştır. Enteresan olarak küçük kardeşe yapılan işitme testinde sol kulakta yüksek frekanslarda hafif derecede sensörinöral işitme kaybı tespit edilmiştir. Büyük kardeşte internal akustik kanalda radyolojik olarak daha belirgin derecede daralma olmasına rağmen işitmesinin normal olması küçük kardeşteki işitme kaybının başka dış etkenler sonucu oluştuğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Sclerosteosis hastalığına ait diğer bir bulgu da el anomalileridir. Bunlar genellikle iki parmağın bir deri vasıtasıyla birleşmesi olarak tanımlanan kutanöz sindaktilisidir. Sindaktili, Sclerosteosis hastalarının % 76'sında görülen yaygın bir bulgudur (1). Etkilenmiş parmaklarda, terminal falankslarda radial deviasyon sıklıkla görülür. Ayrıca tırnaklarda displazi veya apilazi görülen diğer el anomalileridir (1, 5). İncelenen hastaların her ikisinde de benzer olarak tübüler kemiklerde kalınlaşma ve farklı parmakların falankslarında deviasyon görülmüştür. Ek olarak küçük kardeşte sol elde 2. ve 3. parmaklar arasında hafif kutanöz sindaktilisi, 3. parmağın falankslarında palmar deviasyon ve simian çizgisi mevcuttur. El anomalileri Sclerosteosis hastalığı için spesifik bir bulgu olup hastalığın erken tanısında ve Van Buchem hastalığından ayrılmasındaki en

önemli ayırt edici özelliktir (4). Bu nedenle, çalışmada yer alan hastalarda görülen el anomalileri hastaların Sclerosteosis tanısını almasında büyük etken olmuştur.

Optik sinirlerin atrofisine bağlı olarak gelişen görme kayıpları, Sclerosteosis hastalığının ilerleyen dönemlerinde sıklıkla görülen, geç bir bulgudur (5). Hastalarımıza yapılan görme muayenesi sonucunda her iki hastada görme kaybı gözlenmemiştir. Bu bulgu hastaların henüz çocukluk döneminde olmaları ile ilişkilendirilmiştir.

Sclerosteosis hastalarının diş yapıları genellikle normaldir (1). Hastalarımıza yapılan genel diş muayenesinde, dişlerde sayı, şekil, doku açısından literatür ile uyumlu olarak herhangi bir anomali gözlenmemiştir.

Sclerosteosis hastalarında bazen alt çenenin aşırı genişlemesi ve dişlerin aynı hizada olmamasından kaynaklanan konuşma bozuklukları görülür. Konuşma bozukluklarında, 7. kafa sinirinin sıkışarak yüz felci ve dengesiz dil kapaması oluşturması da önemli bir etkidir (1). Her iki hastamızda da konuşma bozuklukları görülmektedir. Büyük kardeşte, konuşma bozukluğunun fasial paralizis sekelleri ve maloklüzyondan (alt ve üst çenenin düzgün bir şekilde kapanmaması nedeniyle dişlerin karşılıklı olarak optimum çiğneme pozisyonuna gelememesi) kaynaklandığı düşünülmektedir. Küçük kardeşteki konuşma bozukluğunun ise fasial paralizis sekelleri sonucu ağız ve dudakların ses çıkaracak uygun pozisyonu alamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bugüne kadar Sclerosteosis hastalarına yapılan endokrin ve biyokimyasal testlerde herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır. Bunun yanısıra bazı Sclerosteosis hastalarında alkalik fosfataz seviyesi yüksek çıkmıştır. Fakat bu bulgu Sclerosteosis hastalığı için genel bir bulgu olarak kabul edilmemiştir (11, 39). Hastalarımıza yapılan biyokimyasal testler sonucunda literatürle uyumlu olarak herhangi bir anormal değer kaydedilmemiştir. Hastalarımızın her ikisinde de alkalik fosfataz seviyesi yüksek çıkmıştır ancak hastalar çocukluk çağında olduğundan ve kemik gelişimleri fazla olduğundan bu veri anormal olarak değerlendirilmemiştir.

Bu güne kadar *SOST* geninde 6 farklı mutasyon tanımlanmıştır (6, 7, 8, 11, 12, 13). Çalışmamızda, Sclerosteosis öntanısı almış iki Türk hastada yaptığımız *SOST* geni mutasyon analizi sonucunda literatürde tanımlanmış *SOST* geni mutasyonlarından farklı olarak yeni bir p.Trp124X nonsense mutasyonu tespit edilmiştir. *SOST* geninin ikinci ekzonunun 371. pozisyonundaki guanin bazının adenin bazına dönüşmesi (c.371G→A) ile Sclerostin proteininin 124. pozisyonunda bulunan triptofan amino asit kodonu stop kodonuna dönüşerek erken sonlanma kodonu (premature termination kodon) oluşmasına

neden olmuştur. Daha önce Brezilyalı bir ailede *SOST* geninde p.Trp124X mutasyonu bildirilmiştir (8). Her iki mutasyon da 124. pozisyondaki triptofan amino asidini kodlayan kodonun stop kodonuna dönüşmesine neden olur ancak, Türk hastalarda tespit edilen mutasyon, kodlayan bölgedeki 371. guanin bazının adenin bazına dönüşmesi iken Brezilyalı ailelerde tespit edilen mutasyon 372. guanin bazının adenin bazına dönüşmesi şeklindedir. Her iki mutasyon farklı mutasyonlar olmasına rağmen mutasyonların arka arkaya gelen bazların değişimi ile oluşması ve her iki mutasyon sonucunda transkriptin erken sonlanması aklı *SOST* geninin bu bölgesinin sıcak nokta (hot spot) olup olmadığını getirmektedir. Yine Amerikalı bir ailede bildirilen p.Trp126X mutasyonu bu düşüncüyü destekleyici niteliktedir (8). Görüldüğü üzere; Türk hastalarda belirlenen yeni mutasyon ile daha önce bildirilen mutasyonlar göz önüne alındığında, *SOST* geninin ikinci ekzonunda c.371G→A, c.372G→A, c.376C→T nonsense mutasyonlarının kümelendiği bu bölgenin *SOST* geni için, mutasyonlara açık bir mutasyonel sıcak nokta olduğunu düşündürmektedir.

Şu ana kadar literatürde tanımlanmış *SOST* geni mutasyonlarından üçü nonsense, ikisi splicing bölge mutasyonu ve biri de genin downstream tarafında enhancer bölgesini tutan 52 kb'lik bir delesyondur. Bu mutasyonlardan dördü: p.Q23X, p.W124X, p.R126X ve IVS1 +3A→T Sclerosteosis hastalarında gösterilmiş, IVS1 +1G→C ve genin downstream bölgesindeki enhancer bölgesini tutan 52 kb'lik delesyon olmak üzere diğer ikisi Van Buchem hastalarında gösterilmiştir (6, 11, 12, 13). Bu mutasyonlardan üçü erken sonlanma kodonu oluşturan nonsense mutasyon, ikisi ise çerçeve kaymasına (Frame-shift) neden olan splicing bölge mutasyonlarıdır. Yaptığımız çalışmada tespit ettiğimiz yeni nonsense mutasyonu ile *SOST* geninde görülen nonsense mutasyon sayısı 4'e çıkmıştır. *SOST* geninde meydana gelen nonsense mutasyonlar ile sclerostin proteinini kodlayan kodonlardan biri erken sonlanma kodonuna dönüşmektedir. Diğer taraftan üzerinde erken sonlanma kodonu bulunduran transkriptlerin, nonsense mediated decay (NMD) olarak adlandırılan ve transkriptlerin hızlı bir şekilde yıkılmasına neden olan bir sistemle yıkıldığı bilinmektedir (55, 56, 57). Bu bilgi ışığında, tespit ettiğimiz nonsense mutasyon sonucunda sclerostin proteini sentezinde erken sonlanan transkriptin, NMD sistemi ile yıkıldığı ve sclerostin proteininin sentezlenemediği düşünülmektedir. Nonsense mutasyonlar sonucunda; erken sonlanan transkriptlerden kısmi fonksiyona sahip olabilecek kısa proteinlerin oluşma olasılığı da vardır (58). Fakat, bu olasılık hastalığın ağır seyri ile uyumsuzdur. Eğer bu mutasyon sonucunda kısmen de olsa fonksiyon gösteren bir

sclerostin proteini sentezlenseydi hastalığın, allelik varyantı olan Van Buchem hastalığında olduğu gibi daha hafif seyretmesi beklenirdi.

Van Buchem hastalığında gösterilen *SOST* geninin downstream tarafındaki 52 kb'lık delesyonun, *SOST* geninin enhancer bölgesini kaybına neden olduğu ve buna bağlı olarak genin ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir. Bu mutasyon sonucunda; az miktarda da olsa bütün özelliklerini koruyan fonksiyonel sclerostin proteini sentezlenmekte ve kemik metabolizmasındaki fonksiyonunu minimal seviyede de olsa yerine getirmektedir. Bu nedenle de Van Buchem hastalığı ağır nörolojik bulgular göstermeyerek Sclerosteosis hastalığından daha hafif seyretmektedir (12,13). Sclerosteosis hastaları ortalama 33 yaşına kadar yaşamaktayken bu güne kadar Van Buchem hastalığından ölen herhangi bir vaka bildirilmemiştir.

Wnt ve Bmp sinyal sistemleri kemik oluşumunun düzenlenmesi ve kontrol edilmesinde görevli sinyal sistemleridir. Wnt ve Bmp sinyal sistemlerinin aktif olması durumunda kemik yapımı sürekli devam etmektedir. Sclerostin proteini Wnt ve Bmp sinyal sistemlerinin antagonisti olarak çalışarak bu sinyal sistemlerinin baskılanmasını ve kemik oluşumunun kontrollü bir şekilde devam etmesini sağlamaktadır. Bu çalışmada gösterilen nonsense mutasyonu Sclerostin proteininin sentezlenmesini engelleyerek Wnt ve Bmp sinyal sistemleri üzerindeki baskıyı kaldırmaktadır. Bunun sonucunda Wnt ve Bmp sinyal sistemleri hiperaktif bir şekilde çalışarak aşırı kemik oluşumuna neden olmaktadır. Çalışmamızda belirlenen nonsense mutasyonun etkilenmiş bireylerde hastalıktan sorumlu mutasyon olduğu düşünülmektedir (9, 10, 39).

Çalışmamız sonucunda tespit ettiğimiz c.371G→A mutasyonunun, 2001 yılında Brezilyalı hastalarda bildirilen c.372G→A mutasyonu ile çok yakın olması ve her ikisinin de sclerostin proteininin aynı kodonunda erken sonlanma kodonu oluşturması akla her iki hasta grubunun klinik bulgularının birbirine yakın olması gerektiğini getirmektedir. Ancak, her iki hasta grubuna ait klinik bulgular karşılaştırılmış ve belirgin bir sonuç elde edilememiştir.

Türkiye'de henüz bildirilmiş bir Sclerosteosis vakası yoktur. Çalışmamız, Sclerosteosis hastalığının genetik etiyojisi ile ilgili ülkemizde yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışma ile Sclerosteosis ön tanısı almış bir ailede *SOST* geninde yeni bir mutasyon gösterilerek hastalığın tanısının konulmasına katkı sağlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen aile bireylerinde taşıyıcılık belirlenmiş ve isteyenlere genetik danışma alma imkanı sağlanmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma ile Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniği ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Sclerosteosis ön tanısı almış iki kardeşin bulunduğu bir ailede *SOST* geni mutasyon analizi yapılmıştır. Mutasyon analizi sonucunda literatürde daha önce bildirilmemiş olan yeni bir *SOST* geni mutasyonu tespit edilmiştir. Bu mutasyon, *SOST* geninin 371. pozisyonundaki guanin bazının adenin bazına dönüşümü (c.371G→A) ve bunun sonucu olarak da genin kodladığı proteinin 124. pozisyonundaki triptofan aminoasidini kodlayan kodonunun stop kodonuna dönüşmesi ile oluşan p.Trp124X mutasyonudur. Çalışmada yer alan hasta bireylerde homozigot olarak görülen bu mutasyon hastalıktan sorumlu mutasyon olarak gösterilmiş ve hastalara kesin tanı konulmasına katkı sağlanmıştır.

İndeks ailede sorumlu mutasyon tespit edildikten sonra c.371G→A mutant allelinin aile içindeki dağılımı çalışmaya katılan bütün aile bireylerinde ARMS ile gösterilmiştir. Böylece, ailedeki taşıyıcı bireyler belirlenmiş ve çalışmaya dahil edilen bireylere istedikleri taktirde genetik danışma alma imkanı tanınmıştır.

Belirlediğimiz yeni mutasyon ile daha önce bildirilen mutasyonlar göz önüne alındığında, *SOST* geninin ikinci ekzonunda c.371G→A, c.372G→A, c.376C→T nonsense mutasyonlarının kümelendiği bu bölgenin *SOST* geni için bir mutasyonel sıcak nokta olduğu önerilmiştir.

Sclerosteosis hastalığı ağır seyreden ve henüz tedavisi mevcut olmayan ölümcül bir hastalıktır. Ve hastaların ortalama yaşam süreleri 33 yıldır. Hastalar çocukluk döneminden başlamak üzere şiddetli baş ağrısı, yüz felci, işitme kaybı ve görme kaybı gibi sorunlarla karşı karşıya kalmaktadır. Sclerosteosis hastalığı ender görülen bir hastalık olduğu için tanı konmada zorluklar yaşanmaktadır. Sclerosteosis hastalığı klinik bulgular yönünden sıklıkla Van Buchem hastalığı ile karıştırılmaktadır. Bu yönü ile bakıldığında, çalışmamızın sonucunun hastalığın tanısının koyulmasına katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Çalışmanın devamında, ailenin yaşamış olduğu bölgede geniş bir alan çalışması yapılarak aile ile kan bağı olan bütün bireylerin saptanması ve gönüllü olan bireylerde taşıyıcılığın belirlenmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

Yaptığımız çalışma, Türkiye’de Sclerosteosis hastalığının genetiği ile ilgili yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışma ile ender görülen ve ölümcül bir hastalık olan Sclerosteosis hastalığı hakkında bilgi ve deneyim sahibi olunmuştur. Edinilen bilgi ve deneyimin ülkemizdeki diğer ilgili birimlerle paylaşılarak toplumumuzdaki taşıyıcıların belirlenmesi ve ülkemizde hastalığa ait mutasyon profilinin oluşturulması önerilmektedir.

7. ÖZET

Sclerosteosis hastalığı (OMIM: 269500); osteoblastların hiperaktivasyonu sonucu özellikle kafatası ve alt çene kemiklerinde aşırı büyüme ile karakterize otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Bu hastalıktan sorumlu gen 17. kromozomun 17q21.31 bölgesinde lokalize *SOST* genidir (NM_025237.2). Bu gen iki ekzonlu bir gen olup sclerostin proteinini (NP_079513.1) kodlamaktadır. Günümüze kadar *SOST* geninde 6 farklı mutasyon gösterilmiştir.

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı işbirliği ile yürütülen bu çalışmada Sclerosteosis ön tanısı almış iki bireyde sorumlu mutasyonun belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, aday lokalizasyon yaklaşımı ile bağlantı analizi yapıldı ve hasta bireylerde *SOST* genine homozigot bağlantı gösterildi. Bu gendeki sorumlu mutasyonu tespit etmek amacıyla *SOST* geni DNA dizi analizi ile tarandı. Dizi analizi sonucunda daha önce literatürde yayınlanmamış yeni bir nonsense mutasyonu c.371G→A (p.Trp124Stop) tespit edildi. İlgili mutasyonunun çalışmaya dahil olan bütün aile bireylerindeki dağılımı, bir mutasyon tarama yöntemi olan “Amplification Refractory Mutation System” (ARMS) ile gösterildi ve taşıyıcılar belirlendi.

8. SUMMARY

Mutation Analysis of The *SOST* Gene In A Family With Sclerosteosis

Sclerosteosis (OMIM: 269500) is an autosomal recessive disorder characterized with overgrowth of especially skull and mandible resulting in hyperactivation of osteoblasts. The gene responsible for the disease is *SOST* (NM_025237.2) and localised at 17q21.31 region of the 17. chromosome. *SOST* gene contains two exons and encodes sclerostin protein (NP_079513.1). So far 6 different mutations have been identified in *SOST* gene.

In this study which was cooperated by Otorhinolaryngology and Medical Biology Departments of Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, it was aimed to determine the mutation responsible for disease in two individuals who were prediagnosed with Sclerosteosis. For this purpose, linkage analysis was performed with candidate localisation approach and the homozygote linkage was shown the *SOST* gene in affected individuals. In order to determine the mutation responsible for the disease, *SOST* gene was scanned by DNA sequencing analysis and a new nonsense mutation c.371G→A (p.Trp124Stop) was identified unpublished in the literature. Relevant mutation's segregation among all family members included in this study was shown by "Amplification Refractory Mutation System" (ARMS) which was one of the mutation scanning methods and carriers in the family were determined.

9. KAYNAKLAR

1. Hamersma, H., Gardner, J., Beighton, P.: The natural history of Sclerosteosis. *Clin. Genet.*, 63:192-197, 2003.
2. Balemans W. and Van, Hul, W.: Human genetics of *SOST*. *J. Musculoskelet Neuronal Interact. Review.*, 6(4):355-356, 2006.
3. Gorlin, R.J., Cohen, M.M., Hennekam, R.C.M.: Syndrome of the head and neck. Oxford university pres., 296-297, 2001.
4. Balemans, W., Van Den Ende, J., Freire Paes-Alves, A., Dijkers, F.G., Willems, P.J., Vanhoenacker, F., de Almeida-Melo, N., Alves, C.F., Stratakis, C.A., Hill, S.C., Van Hul, W.: Localization of the gene for sclerosteosis to the van Buchem disease-gene region on chromosome 17q12-q21. *Am. J. Hum. Genet.*, 64(6):1661-9, 1999.
5. Nager, G.T., Stein, S.A., Dorst, J.P., Holliday, M.J., Kennedy, D.W., Diehn, K.W., Jabs, E.W.: Sclerosteosis involving the temporal bone: clinical and radiologic aspects. *Am. J. Otolaryngol.*, 4:1-17, 1983.
6. Balemans, W., Patel, N., Ebeling, M., Van Hul, E., Wuyts, W., Lacza, C., Dioszegi, M., Dijkers, F.G., Hildering, P., Willems, P.J., Verheij, J.B., Lindpaintner, K., Vickery, B., Foernzler, D., Ve Van Hul, W.: Identification of a 52 kb deletion downstream of the *SOST* gene in patients with van Buchem disease. *J. Med. Genet.*, 39(2):91-7, 2002.
7. Brunkow, M.E., Gardner, J.C., Van Ness, J., Paeper, B.W., Kovacevich, B.R., Proll, S., Skonier, J.E., Zhao, L., Sabo, P.J., Fu, Y., Alisch, R.S., Gillett, L., Colbert, T., Tacconi, P., Galas, D., Hamersma, H., Beighton, P. ve Mulligan, J.: Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the *SOST* gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am. J. Hum. Genet.*, 68(3):577-89, 2001.
8. Balemans, W., Ebeling, M., Patel, N., Van Hul, E., Olson, P., Dioszegi, M., Lacza, C., Wuyt, W., Van Den Ende, J., Willems, P., Paes-Alves, A.F., Hill, S., Bueno, M., Ramos, F.J., Taccani, P., Dikker, F.G., Stratakis, C., Lindpaintner, K., Vickery, B., Foernzler, D., Van Hul, W.: Increased bone density in Sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (*SOST*). *Hum. Mol. Genet.*, 10:537-43, 2001.

9. Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S.E, Wu, D.: Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J. Biol. Chem.*, 280(20):19883-7, 2005.
10. Semenov, M., Tamai, K., He, X.: SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 280(29):26770-5, 2005.
11. Balemans, W., Cleiren, E., Siebers, U., Horst, J., Van, Hul.: W.A generalized skeletal hyperostosis in two siblings caused by a novel mutation in the SOST gene. *Bone*, 36(6):943-7, 2005.
12. Staehling-Hampton, K., Proll, S., Paeper, B.W., Zhao, L., Charmbley, P., Brown, A., Gardner, J.C., Galasa, D., Schatzman, R.C., Beighton, P., Papapoulos, S., Hamersma, H., Brunkow, M.E.: A 52 kb deletion in the SOST-MEOX1 intergenic region on 17q12-q21 is associated with Van Buchem Disease in the Dutch population. *Am. J. Med. Genet.*, 110:144-52, 2002.
13. Loots, G.G., Kneissel, M., Keller, H., Baptist, M., Chang, J., Collette, N.M., Ovcharenko, D., Plajzer-Frick, I., Rubin, E.M.: Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res.*, 15:928-935, 2005.
14. Beighton, P. and Hamersma, H.: Sclerosteosis in South Africa. *S.Afr.Med.J.*, 55:783-788, 1979.
15. "GeneReviews", <http://www.geneclinics.org>. Last update: 2 February, 2007.
16. Hirsch, I.S.: Generalized osteitis fibrosa. *Radiology.*, 13:44-84, 1929.
17. Hannart, E: Über die Genetik der einfach-rezessiven Formen der Marmorknochenkrankheit und zwei entsprechende Stammabume aus der Schweiz. *Helvetica Pediatrica Acta*, 3:113, 1948.
18. Thompson, J.: Osteopetrosis in Successive Generations. *Archives of Disease in Childhood*, 24:143, 1949.
19. Mcpeak, C.N.: Osteopetrosis Report of Eight Cases Occuring in Three Generations Of One Family. *American Journal of Roentgenology and Radium Therapy*, 36:816, 1936.
20. Nussey, A. M.: Osteopetrosis. *Archives of Disease in Childhood*, 13:161, 1938.

21. Kretzmar, J. H., Roberts, R.A: Case of Albers-Schönberg disease. *Br.Med. J.* 1:837-38, 1936.
22. Falkoner, A.W., Ryrie, B.J.: Report on a familial type of generalized osteosclerosis. *Med. Pres.*, 195:12-14, 1937.
23. Higinbotham, N. L., Alexander, S.F.: Osteopetroses, four cases in one family. *Am. J. Surg.*, 53:444-454, 1941.
24. Kelley, C.H., Lawlah, J.W.: Alber-Schönberg disease- a familial study. *Radiology*, 47: 507-513, 1937.
25. Pietruschka, G.: Weitere Mitteilungen über die Marmorkrankheit. (Albers-Shönberg 'sche Krankheit) nebst Bemerkungen zur Differential Diagnose. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, 132: 09-525, 1958)
26. Truswell, A.S.: Osteopetrosis with syndactyly, a morphologic variant of Albers-Schönberg disease. *J. Bone. Joint. Surg.*, 40:208-218, 1958.
27. Hansen, H.G.: Sklerosteose, in *Handbuch der Kinderheilkunde*, vol. 6, Opitz J, Schmid F., (Eds) Berlin, New York, 351-355, 1967.
28. Klinworth, G.K.: The neurologic manifestations of Osteopetrosis. (Albers-Schönberg disease). *Neurology*, 13:512-519, 1963.
29. Witkop, C.J.: Genetik disease of the oral cavity, In: Tiecke R.W. (ed.). *Oral Pathology*, New York, McGraw-Hill, 1965.
30. Sugiura, Y., Yasuhara, T.: Sclerosteosis. *J. Bone Joint. Surg.* 57A:273-276, 1955.
31. Beighton, P., Cremin, B.J., Hamersma, H.: Radiology of Sclerosteosis. *Br. J. Radiol.*, 49:934-939, 1976.
32. Beighton, P., Durr, L., Hamersma, H.: The clinical features of Sclerosteosis. *Ann. Intern. Med.*, 84:393-397, 1976.
33. Beighton, P., Davidson, J., Durr, L., et. al.: Sclerosteosis an autosomal recessive disorder. *Clin. Genet.*, 11:1-7, 1977.
34. Beighton, P., Cremin, B.J.: *Sclerosing Bone Dysplasias*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 1980.

35. Cremin, B.J.: Sclerosteosis in children. *Pediatr. Radiol.* 8:173-177, 1979.
36. Epstein, S., Hamersma, H., Beighton, P.: Endocrine function in Sclerosteosis. *S. Afr. Med. J.*, 55:1105-1110, 1979.
37. Beighton, P.: Sclerosteosis. *J. Med. Genet.*, 25:200-203, 1988.
38. Stephen, L.X.G., Hamersma, H., Gardner, J., Beighton, P.: Dental and oral manifestations of Sclerosteosis. *Int. Dent. J.*, 51:7-10, 2001.
39. Van, Bezooijen, R.L., ten, Dijke, P., Papapoulos, S.E., Lowik, C.W.: SOST/ Sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16(3):319-27, 2005.
40. Van, Buchem, F.S.P., Hadders, H.N., Ubben, S.: An uncommon familial systematic disease of the skeleton, hyperosteosis corticalis generalisata familiaris. *Acta. Radiol.*, 44:109-19, 1955.
41. Beighton, P., Barnard, A., Hamersma, H., Van, Der, A., Wouden.: The syndromic status of sclerosteosis and Van Buchem Disease. *Clin. Genet.*, 25:175-81, 1984.
42. Kneissel, M., Keller, H.J., Baptist, M., Rubin, E.M.: Van Buchem disease mouse models and genomic comparison reveal a bone –specific enhancer regulating sclerosteosis causing gene *SOST*. Proceedings of the abstract 27th Annual Meeting American Society of Bone and Mineral Research (<http://www.asbmr.org/meeting/abstracts.cfm>).
43. Wodarz, A. And Nusse, R.: Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 14:59-88, 1998.
44. Preifer, M. and Polakis, P.: Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis-a look outside the nucleus. *Science.*, 287 (5458):1606-9, 2000.
45. Johanson, M.L., Harnish, K., Nusse, R., Van Hul, W.: LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone. *J. Bone. Miner. Res.*, 19(11):1749-57, 2004.
46. Wnt internet sayfası: <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>, Last update: 1 August, 2007.
47. Glass, D.A., Karsenty, G.: Molecular bases of the regulation of bone remodeling by canonical Wnt signaling pathway. *Curr. Top. Dev. Biol. Review.*, 73:43-84, 2006.

48. Tufan, A.Ç.: Endokondral Kemikleşme ve Wnt Sinyal Yolları. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı.
49. “www.RnDSystems.com”, R&D Systems Cell Biology Focus, spring, 2006.
50. Winkler, D.G., Sutherland, M.K., Geohegan, J.C., Yu, C., Hayest, T., Skonier, J.E., Shpektor, D., Johanas, M., Kovacevich, B.R., Staehling-Hampton, K., Appleby, M., Brunkow, M.E., Latham, J.A.: Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *Embo. J.*, 22(23):6267–6276, 2003
51. Miller, S.A., D.D., Polesky, H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acides Research*, 16(3);1215, 1988.
52. Heptinstall, J., Rapley, R.: Spectrophotometric analysis of nucleic acids. In the *nucleic Acide Protocols Handnbook*. Rapley, R. (Ed.), Totowa, New Jersey, Human Press Inc., 2000, pp. 57-60
53. “UCSC Human Genom Browser”, <http://www.genome.ucsc.edu/>
54. Slatko, B. E., And Albrigh, M.: Denaturing gel electrophoresis for sequencing. In *current protocols in molecular biology, Comprehensive protocols for sequencing gels* (ed. F.M. Ausubel et al.), Gree Publishing Associates and Jhon Wiley and Sons, New York, 1993, pp. 7.6.1-7.6.13
55. Behm-Ansmant, I.I., Zaurralde, E.: Quality control of gene expression: a stepwise assembly pathway for the surveillance complex that triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Genes. Dev.*, 15;20(4):391-8, 2006.
56. Hillman, R.T., Green, R.E., Brenner, S.E.: An unappreciated role for RNA surveillance. *Genome. Biol.* 5(2):8, 2004.
57. El-Bchiri, J., Buhard, O., Penard-Lacronique, V., Thomas, G., Hamelin, R., Duval, A.: Differential nonsense mediated decay of mutated mRNAs in mismatch repair deficient colorectal cancers. *Hum. Mol. Genet.*, 15;14(16):2435-42, 2005.
58. NCBI Books “www.ncbi.nlm.nih.gov”. Anthony, J. F. G., William, M. G., Jeffrey, H. M., Richard, C. L.: *Modern Genetic Analysis*, pp.7.1.
59. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R.: beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO. J.*, 16(13):3797-804, 1997.