

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**OSTEOPETROZİS TANILI HASTALARDA TCIRG1 VE
SNX10 GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Gamze KOÇAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2017-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**OSTEOPETROZİS TANILI HASTALARDA TCIRG1 VE
SNX10 GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Gamze KOÇAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2016-965 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu alışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 23/06/2017

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Zafer ÇETİN
SANKO Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Gamze KOÇAK

İmza

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU

İmza

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilimsel desteğini esirgemeyen, bana karşı pozitif enerjisi ve sabrı ile anlayış gösterip emek veren değerli danışman hocam Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim süresinde Anabilim Dalı Başkanımız olan, bu süre içerisinde bilgi ve deneyimlerini paylaşan hocam Sayın Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM'e,

Yüksek lisans eğitimimin son döneminde Anabilim Dalı Başkanımız olan Sayın Prof. Dr. İbrahim KESER'e,

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini aktaran, yol gösteren ve desteklerini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan, bilgi ve deneyimlerini paylaşan değerli arkadaşlarım Uzm. Dr. Mustafa Gökhan ERTOSUN ve Araş. Gör. Pınar BAHŐI'ye,

Yardım ve desteklerinden dolayı Araş. Gör. Elanur YILMAZ, Dr. Yunus ARIKAN, ve yüksek lisans öğrencisi Hakan AKKURT ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı asistanlarına,

Tez çalışmam süresince destek ve yardımları için Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı sekreterliğine; Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'ndeki ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ndeki hocalarıma ve çalışanlarına,

Hayatımın her anında maddi ve manevi emek veren, eğitim hayatımı her zaman destekleyen, kendi ayaklarım üzerinde güçlü durabilmeyi aşıl原因 ve benimle gurur duyan, benim de gurur duyduğum sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Amaç: Otozomal resesif osteopetrozis (ARO) kemik yıkımından sorumlu osteoklast hücrelerindeki bozukluğun neden olduğu yoğun ve kırılabilir kemik ile karakterize nadir bir genetik kemik hastalığıdır. Bu çalışmada, olguların sırasıyla %50 ve %4'ünden sorumlu olan *TCIRG1* ve *SNX10* mutasyonlarının araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Çalışmaya 12 olgu dahil edilmiş olup tanı yaşı 0-37 ay arasındadır. İki genin kodlayıcı ekzonları, periferal kandan DNA izolasyonunun ardından PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Sanger dizileme yöntemi ile dizilenen olgular NCBI veri tabanına göre mutasyon ve polimorfizmler açısından değerlendirildi.

Bulgular: Sonuç olarak 12 olgunun 4'ünde *TCIRG1* geninde 5 farklı mutasyon bulunmuştur. Bunlar, olgulardan birinde intron 6'da heterozigot olarak tanımlanan g.9483G>T (IVS6+1G>T) kesim bölgesi mutasyonu "splicing" ve diğer bir olguda ekzon 15'te homozigot olarak saptanan g.10170_10171delTG (p.V595LfsX74) mutasyonu bu çalışmada tanımlanmıştır. Bir diğer hastada birleşik heterozigot olarak ekzon 7'de bilinen bir g.9574_9599del26 (p.Met217fsX) 26 bç'lik delesyonu ve ekzon 12'de yine bilinen bir g.13698G>A (p.Gly458Ser) yanlış anlamlı mutasyonu bulunmuştur. İntron 18'de bilinen bir g.11240G>A (IVS18+1G>A) kesim bölgesi mutasyonu ise bir diğer olguda homozigot olarak gözlenmiştir. İki hastada ise ekzon 3'te olasılıkla benign olarak değerlendirilen g.7786C>T (p.Arg56Trp) değişimi heterozigot olarak saptanmıştır. *SNX10* geninde ise bir olguda ekzon 7'de g.85603C>G (p.Ser177=) değişimi heterozigot olarak saptanmıştır. *In silico* analizler sonucunda kesim bölgesine 7 nükleotid uzaklıkta bulunan bu değişimin olasılıkla hastalık yapıcı olabileceği tahmin edilmiştir. Bilinen polimorfizmlerden *TCIRG1* geninde IVS2+83T>C, IVS4+11A>G ve IVS7-14C>A; *SNX10* geninde ise IVS2+36T>A ve IVS3-84G>A bulunmuştur.

Sonuç: Sonuç olarak çalışmamızda *TCIRG1* mutasyonlarına bakıldığında araştırmaya dahil edilen 12 olgunun 4'ünde (%30) en az bir hastalık yapıcı mutasyon saptanmıştır. Daha fazla sayıda hastayı ve ilgili diğer genleri içeren ileri çalışmalar hastalığın genetik etiolojisinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Anahtar kelimeler: osteopetrozis, *TCIRG1*, *SNX10*, mutasyon analizi

ABSTRACT

Objective: Autosomal recessive osteopetrosis (ARO) is a rare genetic bone disease characterized by dense and fragile bone, caused by a defect in osteoclasts responsible for bone destruction. In this study, we aimed to investigate the mutations in *TCIRG1* and *SNX10* that are responsible for 50% and 4% of the cases respectively.

Method: 12 cases aged between 0 and 37 months were included in the study. In line with this purpose, coding exons of these two genes were amplified by using PCR after DNA isolation from peripheral blood. All amplicons were sequenced by Sanger sequencing. The obtained results were evaluated according to the NCBI database.

Results: As a result, five different mutations of the *TCIRG1* gene were found in four of 12 unrelated cases. These include two novel mutations namely g.9486G>T (IVS6+1G>T) splice-site mutation in intron 6 that is described in one of the patients as heterozygous and g.10170_10171delTG mutation (p.V595LfsX) in exon 15 of the gene which is identified in another patient in the homozygous state. A compound heterozygosity of known mutations g.9574_9599del26 (p.Met217fsX) deletion in exon 7 and g.13698G>A (p.Gly458Ser) missense mutation in exon 12 was found in another patient. A known g.11240G>A (IVS18+1G>A) splice-site mutation was also observed as homozygous in another patient. In *TCIRG1*, g.7786C>T (p.Arg56Trp) missense mutation, which is indicated as likely benign according to ClinVar database, in exon 3 was heterozygous in two of the patients. In *SNX10*, g.85603C>G (p.Ser177=) variation in exon 7 was detected as heterozygous in a patient. This variation, which is 7 nucleotides far from the splice site is estimated to be “likely pathogenic” by *in silico* analyses. Of the known polymorphisms, IVS+83T>C, IVS4+11A>G and IVS7-14C>A in *TCIRG1* gene; IVS2+36T>A and IVS3-84G>A in *SNX10* gene were detected.

Conclusion: In conclusion, our study revealed that 4 of the 12 cases (30%) carry at least one mutation of *TCIRG1* gene. Further studies with more patients and other genes would help better understanding of genetic etiology of the disease.

Key words: osteopetrosis, *TCIRG1*, *SNX10*, mutation analysis

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kemik Dokusu	2
2.1.1. Osteoblastlar	2
2.1.2. Osteoklastlar	3
2.1.3. Kemik Yeniden Modellenmesi	3
2.2. Osteopetrozis	5
2.2.1. Otozomal Dominant Osteopetrozis (ADO)	6
2.2.2. Orta Tip Otozomal Resesif Osteopetrozis (IARO)	7
2.2.3. Malignant Otozomal Resesif Osteopetrozis (ARO)	7
2.2.4. Otozomal Resesif Osteopetrozis İle İlişkili Genler	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Hasta Materyallerinin Toplanması	17
3.2. Periferal Kandan DNA İzolasyonu	17
3.2.1. Kullanılan Solüsyonlar	17
3.2.2. İşlemler	18
3.3. DNA Miktarının ve Saflığının Analizi	19
	iii

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	19
3.4.1. Primer Dizaynı	19
3.4.2. <i>TCIRG1</i> Geni	21
3.4.3. <i>SNX10</i> Geni	26
3.5. PZR Ürünlerinin Kalitatif Analizi	29
3.5.1. Görüntüleme	29
3.6. PZR Ürünlerinin Temizlenmesi	29
3.7. DNA Dizi Analizi	30
3.7.1. DNA Dizi Analizi Reaksiyonu	30
3.8. Dizileme Reaksiyonu Ürünlerinin Temizlenmesi	30
3.9. Analiz	31
4. BULGULAR	32
4.1. <i>TCIRG1</i> ve <i>SNX10</i> Genleri Varyasyonları	32
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	52
EKLER	
EK-1. Aydınlatılmış Onam Formu	
ÖZGEÇMİŞ	71

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. İnsan otozomal resesif osteopetrozisin sınıflandırılması, genetiği ve klinik belirtileri	10
3.1. <i>TCIRG1</i> geninin primer dizileri ve PZR ürünlerinin büyüklükleri	20
3.2. Ekzon 2-3, ekzon 4-5, ekzon 10 ve ekzon 14'e ait PZR kimyasal koşulları	21
3.3. Ekzon 6-7-8'e ait PZR kimyasal koşulları	21
3.4. Ekzon 9'a ait PZR kimyasal koşulları	22
3.5. Ekzon 11-12-13'e ait PZR kimyasal koşulları	22
3.6. Ekzon 15'e ait PZR kimyasal koşulları	22
3.7. Ekzon 16-17-18'e ait PZR kimyasal koşulları	23
3.8. Ekzon 19-20'ye ait PZR kimyasal koşulları	23
3.9. <i>SNX10</i> geninin primer dizileri ve PZR ürünlerinin büyüklükleri	26
3.10. Ekzon 2, 3 ve 4'e ait PZR kimyasal koşulları	27
3.11. Ekzon 6 ve ekzon 7'ye ait PZR kimyasal koşulları	27
3.12. Ekzon 5'e ait PZR kimyasal koşulları	28
4.1. Çalışmaya dahil edilen olguların klinik tablosu	33
4.2. <i>TCIRG1</i> geninde saptanan mutasyonlar ve detayları	34
4.3. <i>SNX10</i> geninde saptanan mutasyonlar ve detayları	34
4.4. <i>TCIRG1</i> ve <i>SNX10</i> genlerinde saptanan benign/olasılıkla benign polimorfizmler ve detayları.	35
5.1. Otozomal resesif osteopetrozisli Türk olgularda saptanan mutasyonlar	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Osteoblast ve osteosit farklılaşması	2
2.2. Osteoklast farklılaşması	3
2.3. Kemik yeniden modellenmesi	4
2.4. Osteoklast işlev bozukluğu	8
2.5. <i>TCIRG1</i> geninin ekzonlarındaki mutasyonların dağılımı	14
2.6. <i>TCIRG1</i> geninin intronlarındaki mutasyonların dağılımı	14
2.7. <i>SNX10</i> geninin ekzonik ve intronik mutasyonların dağılımı	16
4.1. 4 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu	36
4.2. 8 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu	37
4.3. 8 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu	37
4.4. 8 numaralı hastanın anne ve babasında ileri primerle yapılan dizi analizi sonuçları	38
4.5. 7 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu	38
4.6. 7 numaralı hastanın baba ve annesinde ileri primerle yapılan dizi analizi sonuçları	39
4.7. 12 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu	39
4.8. 12 numaralı hastanın baba ve annesinde ileri primerle yapılan dizi analizi sonuçları	40
4.9. 2 numaralı hastada geri primerle yapılan dizi analizi sonucu	40
4.10. 2 ve 11 numaralı hastalarda ileri primerle yapılan dizi analizi sonuçları	41

4.11. 2, 4 ve 5 numaralı hastalarda ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu	41
4.12. 8 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu	41
4.13. 2, 4, 5 ve 9 numaralı hastalarda ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu	42
4.14. 4 ve 5 numaralı hastalarda geri primerle yapılan dizi analizi sonucu	42
4.15. 1, 2, 4, 5, 10 ve 11 numaralı hastalarda ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu	42
4.16. 12 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu	43
4.17. 3, 4 ve 8 numaralı hastalarda ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu	43
4.18. 1, 2, 9, 10 ve 11 numaralı hastalarda ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu	43

SİMGELER ve KISALTMALAR

AmAc	: Amonyum Asetat
ADOI	: Otozomal dominant osteopetrozis tip 1
ADOII	: Otozomal dominant osteopetrozis tip 2
ARO	: Malignant otozomal resesif osteopetrozis
KİT	: Kemik iliği transplantasyonu
bç	: Baz çifti
CAII	: Karbonik anhidraz 2
CLCN7	: Klorid kanal 7
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksirinükleotit trifosfat
dRTA	: Distal renal tübüler asidozis
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromid
HGMD	: İnsan Gen Mutasyon Veritabanı
IARO	: Orta tip otozomal resesif osteopetrozis
kb	: Kilobaz
KHCO₃	: Potasyum bikarbonat
LRP5	: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein 5
M	: Molar

mg	: Miligram
ml	: Mililitre
NaCl	: Sodyum klorür
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
ng	: Nanogram
NH₄Cl	: Amonyum klorür
OSTM1	: Osteopetrozis ilişkili transmembran protein 1
PLEKHM1	: Plekstrin homoloji domain M-ailesi üyesi 1
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PX	: Phox-homoloji
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
siRNA	: Küçük interferaz Ribonükleik asit
sn	: Saniye
SNX	: Sorting neksin
SNX10	: Sorting neksin 10
TBE	: Tris-Borat-EDTA
TCIRG1	: T-hücre immün regülatör 1
TNFSF11/RANKL	: Nükleer faktör κB ligand reseptör aktivatörü
TNSFRSF11A/RANK	: Nükleer faktör κB reseptör aktivatörü
V-ATPaz	: Vakuoler-tip H ⁺ -ATPaz
μl	: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Nadir genetik hastalıklardan olan otozomal resesif osteopetrozis formu kemik yoğunluğunda artış ile karakterize, yaşamın ilk aylarında ortaya çıkan ve genetik olarak heterojen (Sobacchi ve ark., 2001) bir kemik hastalığıdır. Kemik yıkımından sorumlu osteoklast hücrelerinin oluşumundaki bozukluklardan veya işlevsel bozukluklardan ortaya çıkmaktadır (Tolar ve ark., 2004). Çuvaş ve Kosta Rika gibi bazı popülasyonlarda daha sık görülmekle birlikte hastalığın frekansı 1/200 000-1/300 000'dir (Balemans ve ark., 2005). Antalya'da ise akraba evliliğinin oranı %40.7 olarak bildirilmiştir (Alper ve ark., 2004). Bu nedenle Türkiye'de ve özellikle Antalya bölgesinde otozomal resesif osteopetrozise yönelik yapılacak genetik çalışmalar önem taşımaktadır.

Otozomal resesif osteopetrozise neden olan sekiz gen bilinmektedir: *TCIRG1* (T-hücre immün regülatör 1), *CLCN7* (klorid kanal 7), *SNX10* (sorting neksin 10), *OSTM1* (osteopetrozis ilişkili transmembran protein1), *PLEKHM1* (plekstrin homoloji domain M-ailesi üyesi 1), *CAII* (karbonik anhidraz 2), *TNFSF11/RANKL* (nükleer faktör κB ligand reseptör aktivatörü) ve *TNSFRSF11A/RANK* (nükleer faktör κB reseptör aktivatörü). Vakaların %50'den fazlasından ise *TCIRG1* genindeki mutasyonlar sorumludur (Frattini ve ark., 2000; Kornak ve ark., 2000; Sobacchi ve ark., 2001; Del Fattore ve ark., 2008; Sobacchi ve ark., 2013). Bununla birlikte yeni çalışılmaya başlayan ve hastaların yaklaşık %4'ünde görülen *SNX10* geni mutasyonlarının araştırılması da önem taşımaktadır. Bu oran *RANK-*, *RANKL-* ve *OSTM1*-bağımlı alt tipler ile karşılaştırılabilir.

Nadir görülen bir hastalık olması, literatürde az sayıda çalışma olması ve Türkiye'de otozomal resesif osteopetrozisin genetik etiyolojisi üzerine geniş çaplı çalışma bulunmaması nedeniyle bu çalışmadan elde edeceğimiz sonuçlarla literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır. Nadir görülen bu hastalığın ve neden olan genlerin mutasyonlarının toplumumuz açısından bilinmesi hastalara ve aile bireylerine verilecek genetik danışmanın doğruluğu açısından da oldukça önem taşımaktadır.

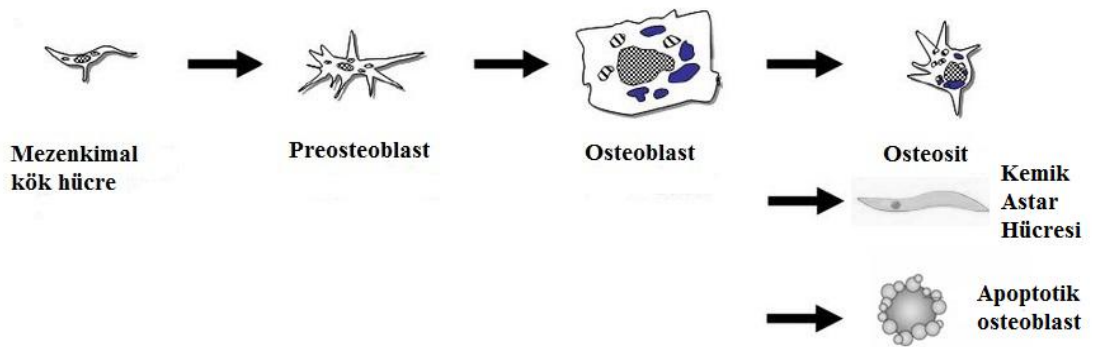
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

Kemik dokusu oldukça özelleşmiş sert bir dokudur (Segovia-Silvestre ve ark., 2009). Kemik dokusu kan hücrelerinin oluşturulması, yapısal destek, kalsiyum ve fosfat depolanması, iç organların korunması ve kaslar için tutunma bölgeleri gibi birçok fonksiyona sahiptir (Long ve Ornitz, 2013). Kemik dokusunda özelleşmiş bazı hücreler bulunmaktadır. Bunlar kemik yıkımından sorumlu osteoklastlar, kemik yapımından sorumlu osteoblastlar ve osteoblast hücrelerinin olgunlaşması sonucu oluşan kemik içinde gömülü osteositlerdir (Klein-Nulend ve ark., 1995; Tatsumi ve ark., 2007). Kemik yapımından sorumlu osteoblastlar mezenkimal kök hücre kaynaklı iken kemik yıkımından sorumlu osteoklastlar hematopoietik kök hücre kaynaklıdır.

2.1.1. Osteoblastlar

Osteoblastlar mezenkimal kök hücrelerden köken alan kübik şekilli kemik yapımında görev alan hücrelerdir. Kemik yüzeyinde yer almaktadırlar ve kemik matrisinin sentezi ve mineralizasyonundan sorumludurlar. Osteoblastlar kalsiyum bileşiklerinin çökmesini sağlayan alkalin fosfataz enzimine sahiptirler ve kollajen lifleri salgılamaktadırlar. Osteoprojenitörler denilen öncüllerin büyümesi, preosteoblastlara farklılaşma ve daha ileri olgun, kemik yapıcı osteoblastlara farklılaşma gibi bir dizi adım sonucu ortaya çıkmaktadırlar (Ducy ve ark., 2000; Manolagas, 2000).



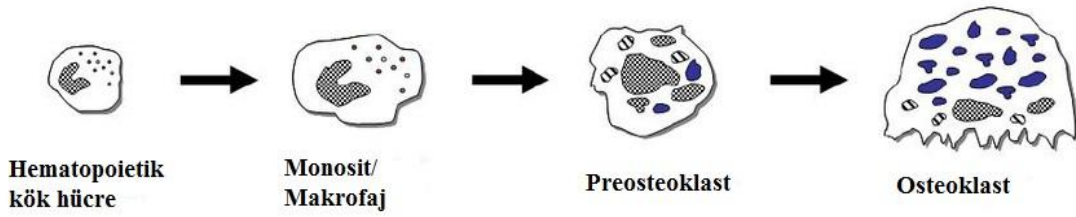
Şekil 2.1. Osteoblast ve osteosit farklılaşması. Mezenkimal kök hücrelerden farklılaşan preosteoblastlar daha ileri kemik yapıcı osteoblast hücrelerine farklılaşmaktadır. Osteoblastların mineralize olması ile de osteosit hücreleri oluşmaktadır (Marquis ve ark., 2009).

Kemik oluşumu tamamlandıktan sonra osteoblastlar ya kemik astar hücrelerine gelişecekler (yaklaşık %5) ya kalsiyum ve fosfat içeren veziküllerin salınımı ile

osteoid mineralize olacaklar (yaklaşık %25) (Ducy ve ark., 2000; Neve ve ark., 2011) ya da apoptoz ile ortadan kaldırılacaklardır (yaklaşık %70) (Manolagas, 2000).

2.1.2. Osteoklastlar

Osteoklastlar hematopoietik kök hücrelerden köken alan oldukça özelleşmiş çok çekirdekli dev hücrelerdir (Marks ve Walker, 1981; Roodman, 1999). 5-50 arası çekirdek içerebilmektedirler. Makrofaj koloni uyarıcı faktör (MCSF) ve osteoblastlar ve/veya osteositler tarafından sağlanan NF- κ B ligandın reseptör aktivatörü (RANKL) etkisi altında miyeloid prekürsörlerden farklılaşmaktadır (Kong ve ark., 1999; Boyle ve ark., 2003) (Şekil 2.2). Osteoklastlar katepsin K gibi enzimlerin ve asitin salgılanması ile kemik yıkımından sorumludurlar. Proton ve enzim salınımı direkt olarak resorpsiyon lakunasında gerçekleşmektedir (Boyle ve ark., 2003; Lacey ve ark., 2012; Boyce, 2013).



Şekil 2.2. Osteoklast farklılaşması. Hematopoietik kök hücrelerden köken alan monositler/makrofajların füzyonu ile oluşan preosteoklastlar, çok çekirdekli dev hücreler olan kemik yıkıcı osteoklast hücrelerine farklılaşmaktadır (Marquis ve ark., 2009).

Osteoklastların hiperaktivasyonu osteoporoz ve osteolitik kemik metastazı gibi kemik-dejeneratif bozukluklarına sebep olabilmektedir. Hipoaktivasyonu ise osteopetrozise sebep olabilmektedir. Osteoklastlar, kemik yıkımı için sabit aktin halkaları oluşturarak kemik yüzeyine sıkıca tutunmaktadır. Aktin halkaları tarafından çevrelenen alan boyunca sindirim asitleri ve proteazlar salgılamaktadırlar ve hücre içine ve apikal yüzeye endositoz/transitoz aracılığıyla degrade matriks bileşenlerini taşımaktadırlar. Böylece osteoklastlar kemik yeniden modellenmesini ve kemik yapı maddelerinin özellikle kalsiyum ve fosfatların geri dönüşümünü kolaylaştırmaktadır (Kong ve ark., 1999).

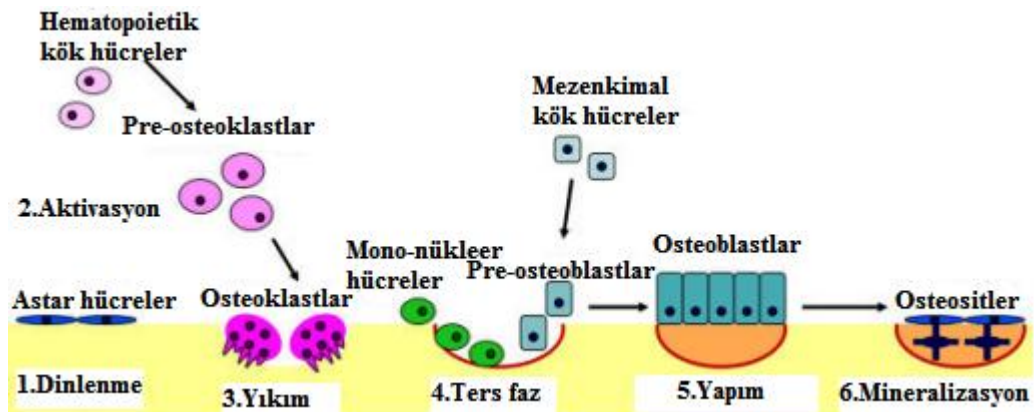
2.1.3. Kemik Yeniden Modellenmesi

İnsan iskeleti yaşam boyunca sürekli kemik yeniden modellenmesine uğrayan metabolik olarak aktif bir organdır (Raisz, 1999). Kemik yeniden modellenmesi sadece büyümeye ve mekanik gereksinimlere kemiğin yapı/güç adaptasyonu için

değil, mikro hasarın tamiri ve kalsiyum homeostasisinin devamı için de kritik bir süreçtir. Tüm osteoklast ve osteoblastlar temel bir yeniden modellenme biriminin oluşturulmasında birlikte yer almaktadırlar. Osteoklastlar kemiğin yıkımından ve uzaklaştırılmasından sorumlu iken osteoblastlar yıkılan kemiğin yerine yeni kemik oluşumundan sorumludur. Bu denge iskelet bütünlüğüne olanak vermektedir. Bununla birlikte belli fizyolojik ve patolojik durumlarda kemik yeniden modellenme basamaklarının dengesi bozulmaktadır. Bu durum azalan kemik gücü ve artan fragiliteye neden olmaktadır (Khosla ve Riggs, 2005).

Kemik yeniden modellenmesinin farklı amaçlar ile iki tipi öne sürülmüştür (Burr, 2002; Parfitt, 2002). İlk tipi stokastiktir ve başlıca kalsiyum homeostasisinin hormonal kontrol altında korunması içindir (Noble, 2003). İkinci tip ise mikro hasarın kaldırılması yönündedir ve dolayısıyla iskeletin mekanik özellikleri için esastır (Burr, 2002; Parfitt, 2002). Sağlıklı bir yetişkinde yeniden modellenme devamlı bir fizyolojik süreçtir ve kemik oluşumunun her zaman yeni sentezlenen kemik ile uzaklaştırılan kemiğin bütünlüğüne izin veren kemik yıkımını takiben gerçekleştiği görülmüştür (Takahashi ve ark., 1964; Hattner ve ark., 1965).

Kemik oluşumu, boşalan yıkım oyukları mono nükleer hücreler tarafından doldurulduğunda başlamaktadır (Takahashi ve ark., 1964; Hattner ve ark., 1965; Tran Van ve ark., 1982; Huffer, 1988; Mulari ve ark., 2004). Kemik yeniden modellenmesi altı aşamada incelenebilmektedir: dinlenme, aktivasyon, yıkım, ters faz, oluşum ve mineralizasyon (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kemik yeniden modellenmesi. Kemik yeniden modellenmesi osteoklast hücreleri tarafından kemik matriksinin yıkımı ile başlamaktadır. Mononükleer hücreler yıkılmış yüzeye osteoblastları getirecek sinyali sağlar. Osteoblastlar yıkılan kemiğin yerini doldurduktan sonra bazı osteoblastlar mineralize osteositlere farklılaşarak kemik yeniden modellenmesi tamamlanmaktadır (Kapinas ve Delany, 2011).

İnsan kemiğinde yeniden modellenme süreci, osteoblast veya osteoklastların ömründen (sırasıyla 3 ay ve 2-4 hafta) daha uzun olduğundan (yaklaşık 6-9 ay) (Kodama ve ark., 1993; Parfitt, 1994; Parfitt, 2002) yeni osteoklastlar ve osteoblastlar kemik iliğinde devamlı olarak öncüllerinden oluşturulmaktadır. Yeniden modellenme sayesinde ortalama tüm iskelet her 10 yılda kendini tamamen yenileyebilmektedir.

2.2. Osteopetrozis

Osteopetrozis, Yunanca 'osteo' 'kemik' ve 'petros' 'taş' kelimelerinden türetilmiştir. Osteopetrozis, 'mermer kemik hastalığı' ve 'Albers-Schönberg hastalığı' olarak da adlandırılmaktadır. Klinik olarak ilk kez radyolog Albers-Schönberg tarafından tanımlanmıştır (Segovia-Silvestre ve ark., 2009).

Sağlıklı durumda kemik yapımı ile yıkımı arasında sıkı bir denge bulunmaktadır. Öyle ki normal şartlar altında yıkılan kemik her zaman eşit miktarda yeni kemik ile doldurulmaktadır. Hormonal değişiklikler veya genetik defektler nedeni ile kemik yeniden modellenmesindeki terazi bozulabilmekte ve kemikte patolojik değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. Bu dengenin bozulması, yetersiz kemik yıkımından dolayı radyograflarda artan kemik yoğunluğu ve kırılabilirlik ile karakterize nadir bir hastalık olan osteopetrozise neden olmaktadır. Osteopetrozis kalıtsal osteosklerozun heterojen bir grubuna dahildir (Johnston ve ark., 1968). Osteopetrozis, azalan osteoklast sayısı ve/veya osteoklast fonksiyonunun zayıflamasından kaynaklanmaktadır. Kemik yıkımındaki bozukluklar genellikle kemik büyümesinde gerilikle ve kemiklerde anormal şekilde sonuçlanmaktadır (de Vernejoul, 2008). Sertleşmiş kemikler, kırılabilirler ve kırıklara eğilimlidirler (Neutzsky-Wulff ve ark., 2010). Osteopetrozis, sıklıkla kafatasının tabanındaki kemik kalınlaşmasından kaynaklanan kafatası sinirlerinin sıkıştırılması ile de ilişkilidir. Bu durum görme bozukluklarına ve işitme kaybına neden olabilmektedir (Sobacchi ve ark., 2013). Ayrıca hastalarda, osteoklastların gelişmekte olan diş çenesi üzerinden bir yıkım yolağından sorumlu olmasından dolayı diş bozuklukları da ortaya çıkabilmektedir (Helfrich, 2005). Kemikler daha kısa ve daha geniştir. Kemik iliği boşlukları daralmıştır. Bu durum sıklıkla immünolojik sorunlara neden olmaktadır.

Hastalığın şiddetine ve başlangıç yaşına göre otozomal dominant osteopetrozis (ADOI, ADOII), orta tip otozomal resesif osteopetrozis (IARO) ve malignant

otozomal resesif osteopetrozis (ARO) olmak üzere üç tipi bulunmaktadır. Malignant otozomal resesif formu sekiz alt tipten (OPTB) ve otozomal dominant formu ise iki alt tipten oluşmaktadır (OPTA).

2.2.1. Otozomal Dominant Osteopetrozis (ADO)

Otozomal dominant osteopetrozise tipik olarak geç ergenlik veya geç erişkinlik dönemlerinde tanı konulmaktadır ve radyografik olarak sandviç omurga görülmektedir. Otozomal dominant osteopetrozis resesif formundan daha yaygın olarak görülmektedir (Bollerslev, 1987).

Ana bulgular kırık sıklığı, gecikmiş işitme, özellikle diş apsesi ve çürükleri ile birlikte çeneyi etkileyen osteomyelit, skolyoz ve kalça osteoartrit gibi iskelet ile sınırlıdır (Bollerslev ve Andersen, 1989; Benichou ve ark., 2000; Waguespack ve ark., 2007). Kranial sinir sıkışması nadirdir; fakat duyma ve görme kayıpları bireylerin %5 civarını etkileyen önemli bir bulgudur. Bununla birlikte görece ılımlı klinik tablodan dolayı birçok hasta asemptomatiktir ve tesadüfi olarak radyografik kontrol ile tespit edilmektedir.

Klinik, biyokimyasal, histolojik ve biyomekanik seviyelerde otozomal dominant osteopetrozisi karakterize eden çalışmalar bu tipin ADOI ve ADOII olarak iki alt tipi olduğunu göstermiştir (Bollerslev ve Andersen, 1988; Bollerslev ve Andersen, 1989; Gram ve ark., 1991). Kemik biyopsilerine dayalı olarak, bu iki formun patojenezinin defektif kemik yıkımını direkt veya dolaylı olarak kapsadığı hipotezi öne sürülmüştür.

Tip 1 (ADOI) özelliği genelleşmiş, özellikle kafatasını etkileyen yaygın osteosklerozdur (Bollerslev ve Andersen, 1988). Tip 2 (ADOII) Albers-Schonberg tarafından 1904'te tanımlanmış (Segovia-Silvestre ve ark., 2009) en yaygın formdur ve tahmini prevalansı 5.5/100 000'dir (Benichou ve ark., 2000). ADOII radyografik olarak segmenter osteoskleroz ile ağırlıklı olarak vertebra omuru, iliak kanatlar (kemik içinde kemik görünümü) ve kafa tabanında (Bollerslev, 1989) açıkça görülmektedir.

Son yirmi yıl boyunca osteopetrozis araştırmaları kemik biyolojisi alanına anlamlı bir şekilde katkı sağlamıştır. 2000'li yıllarda ADOI'in *LRP5* (düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein 5)'te aktive edici bir mutasyon ile osteoblastların

artan aktivitesi sonucu ortaya çıktığı belirlenmiştir (Van Wesenbeeck ve ark., 2003). Böylece osteopetrozisin klasik bir formu olarak tanımlanamamaktadır; fakat bunun yerine *LRP5*-aktive edici bir kemik hastalığı veya yüksek kemik kütlesi fenotipi olarak kabul edilmektedir. Son zamanlarda yapılan bir genom araştırması bizi ADOII'ye neden olan kromozom 16p13.3'te lokalize bir gene götürmüştür (Benichou ve ark., 2001). Bu gen *CLCN7* genidir (Daniels ve ark., 2001). ADOII, *CLCN7* geninde bir fonksiyon kaybı mutasyonu ve osteoklastların azalan aktivitesi sonucu meydana gelmektedir. Gerçekten de klorid kanal, kemik dokunun osteoklast aracılı degradasyonu için gerekli ekstraselüler yıkım lakunasının asidifikasyonu için zorunludur (Kornak ve ark., 2001). Bununla birlikte, not edilmelidir ki *CLCN7*'deki bir mutasyon ADO klinik fenotipi ile sunulan hastaların %30'dan fazlasında kanıtlanmamıştır. Bu durum daha ileri lokus heterojenitesini yansıtmaktadır (Del Fattore ve ark., 2006; Del Fattore ve ark., 2008).

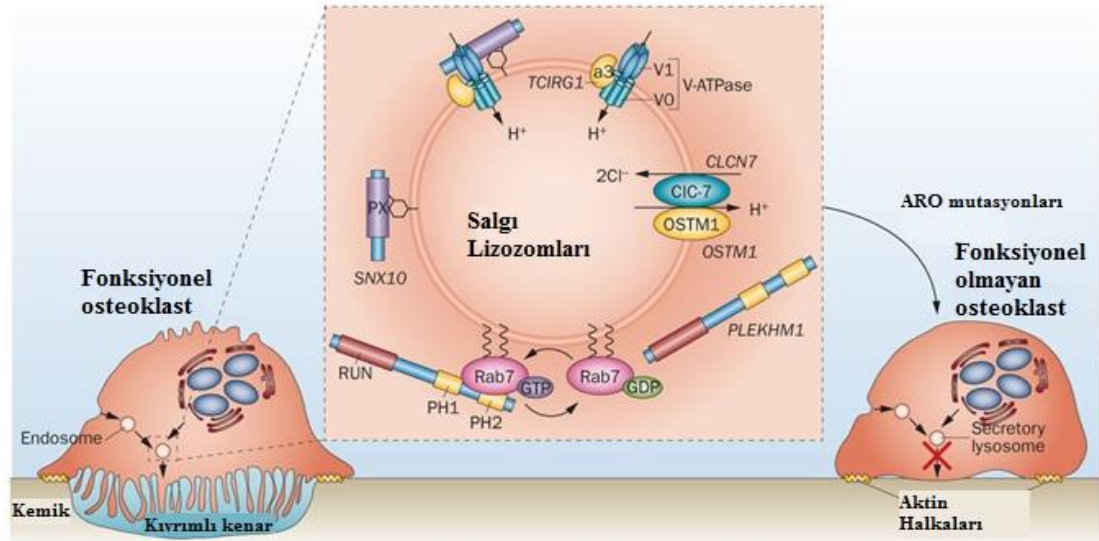
2.2.2. Orta Tip Otozomal Resesif Osteopetrozis (IARO)

Orta tip otozomal resesif osteopetrozis, dominant ve resesif formların ikisine de tam olarak uymaz. Ancak dominant formundan daha şiddetlidir. Çocukluk çağında ortaya çıkmaktadır. Bir orta tip otozomal resesif osteopetrozis formu beyin kalsifikasyonu ve renal tübüler asidozis ile ilişkili *CAII* genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu hastalarda mental retardasyon sıklıkla görülmektedir (Sly ve ark., 1985; McMahon ve ark., 2001; Cotter ve ark., 2005). *CLCN7* ve *PLEKHM1* genlerindeki fonksiyon kaybı mutasyonları da orta tip otozomal resesif osteopetrozise neden olmaktadır (Van Wesenbeeck ve ark., 2007). Bununla birlikte *TCIRG1* geninde rapor edilen resesif intronik patojenik hipomorfik varyantlar (Sobacchi ve ark., 2014; Palagano ve ark., 2015) hastalığın ılımlı bir formunu ortaya koymuştur. Bu varyantlar anormal bir kesip-ekleme sürecine neden olmuştur. Aynı zamanda sınırlı miktarda normal transkriptin de üretimi genellikle *TCIRG1*'deki patojenik varyantlarla ilişkili olan hastalığın şiddetini azaltmıştır (Sobacchi ve ark., 2014; Palagano ve ark., 2015).

2.2.3. Malignant Otozomal Resesif Osteopetrozis (ARO)

Malignant otozomal resesif osteopetrozis (ARO, OPTB), osteoklast işlev bozukluğu (Şekil 2.4) veya oluşumdan kaynaklanan kemik yıkımındaki eksiklikten oluşan şiddetli bir kemik hastalığıdır (Tolar ve ark., 2004). Malignant otozomal resesif

osteopetrozis klasik olarak yaşamın ilk aylarında açıkça görülen yaşamı tehdit edici bir durumdur. Sıklıkla yaşamın ilk üç ayında ortaya çıkmaktadır. Kemik yoğunluğundaki artış kırıklara ve osteomyelite eğilimli zayıf bir kemiğe neden olmaktadır. Değişen derecelerde boy kısalığı ile sonuçlanan kemiğin boyuna uzaması bozulmuştur (Al-Tamimi ve ark., 2008). Kemik iliği boşluğundaki şiddetli azalmaya neden olan yoğun kırılğan kemik; anemi, trombositopeni ve hepatosplenomegaliye neden olmaktadır (Frattini ve ark., 2003; Helfrich, 2003; Balemans ve ark., 2005). Genişleyen kemik körlük, sağırılık ve yüz felci ile sonuçlanan sinir foramenini daraltabilmektedir. Duyma kaybının ARO hastalarının %78'ini etkilediği tahmin edilmektedir (Dozier ve ark., 2005). Diş sürmesi defektleri ve şiddetli diş çürüğü de yaygın olarak ortaya çıkmaktadır. ARO'li çocuklar, tetanik nöbetler ve ikincil hiperparatiroidizm ile eşlik eden hipokalsemi geliştirme riskine sahiptirler. ARO'in en şiddetli bulgusu ise kemik iliği baskılanmasıdır (Stark ve Savarirayan, 2009). Tek etkili tedavi osteoklast hücrelerinin hematopoietik hücre orijinli olmasından dolayı kemik iliği transplantasyonudur (KİT) (Gerritsen ve ark., 1994).



Şekil 2.4. Osteoklast işlev bozukluğu. Osteoklastlarda meydana gelen bir patojenez sonucunda kemik yıkım işlevini kaybederek ARO (otozomal resesif osteopetrozis) meydana gelmektedir (Sobacchi ve ark., 2013).

Hastalığın tüm formları nadir olarak ortaya çıkmaktadır ve tüm dünyada görülmektedir. En nadir görülen formu olan malignant otozomal resesif osteopetrozisin (OPTB) yaklaşık frekansı 1/200 000-1/300 000'dir (Balemans ve ark., 2005). Bununla birlikte Kosta Rika'da OPTB1'in (*TCIRG1*) yüksek bir frekansı (3.4/100 000) görülmektedir (Fasth ve Porras, 1999; Phadke ve ark., 1999) ve kurucu etkisinden kaynaklanmaktadır (Sobacchi ve ark., 2001). Rusya'nın Çuvaş

popülasyonu da malignant OPTB'nin en yüksek frekansı ile (1/3879 yenidoğan) (Ginter ve ark., 2001) büyük ilgi görmektedir. Çuvaş popülasyonundaki böyle bir genetik farklılığın varlığı muhtemelen popülasyonun uzun üreme izolasyonundan ve genetik sürüklenmeden kaynaklanmaktadır (El'chinova ve Ginter, 2001; Ginter ve ark., 2001).

İki temel formu, osteoklastların varlığı veya yokluğu temelinde ayırt edilebilir (Tolar ve ark., 2004; Villa ve ark., 2009). Otozomal resesif osteopetrozis vakalarının büyük bir çoğunluğunu kapsayan osteoklast-zengin formunda olgun ancak fonksiyonel olmayan osteoklast normal sayıda mevcut iken, osteoklast-zayıf formunda osteoklast farklılaşmasındaki bir bozukluktan dolayı bu özelleşmiş hücreler yoktur. İnsanlardaki bu ikinci formun patojenezine şimdiye kadar *TNFSF11/RANKL* ve *TNFRSF11A/RANK* olarak isimlendirilen iki gen dahil edilmiştir (Sobacchi ve ark., 2007; Guerrini ve ark., 2008). Kemikte *TNFSF11* geni osteoblastlar ve stromal hücreler tarafından üretilen temel osteoklast farklılaşma faktörünü kodlamaktadır. Onun reseptörü olan *RANK* ise preosteoklastlar ve olgun osteoklastların yüzeyinde bulunan transmembran bir proteindir (Crockett ve ark., 2011).

2.2.4. Otozomal Resesif Osteopetrozis İle İlişkili Genler

Otozomal resesif osteopetrozis, genetik olarak heterojendir ve patojenezinde en az sekiz gen yer almaktadır: *TCIRG1*, *CLCN7*, *SNX10*, *OSTM1*, *PLEKHM1*, *CAII*, *TNFSF11/RANKL* ve *TNFRSF11A/RANK* (Tablo 2.1). Bu genlerden *TCIRG1*, *CLCN7*, *PLEKHM1*, *OSTM1*, *CAII* ve *SNX10* osteoklastların efektör fonksiyonunu sağlarken, *RANK* ve *RANKL* ise osteoklast oluşumu ve farklılaşmasında görev almaktadır (Sly ve ark., 1983; Frattini ve ark., 2000; Kornak ve ark., 2001; Chalhoub ve ark., 2003; Sobacchi ve ark., 2007; Van Wesenbeeck ve ark., 2007; Guerrini ve ark., 2008). Bununla birlikte tüm osteopetrozis vakalarının yaklaşık %25'inde hastalığa neden olan gen ve mutasyonlar henüz tanımlanamamıştır. Bu nedenle tanı ve klinik bulguların iyileştirilmesi için bu yeni genlerin tanımlanması oldukça önemlidir. Her genin normal osteoklast fonksiyonu için gerekli olması beklendiğinden yeni keşfedilen her gen osteoklast oluşumu ve aktivitesinin altında yatan moleküler mekanizmaların daha açık bir şekilde anlaşılmasına izin verecek ve yeni potansiyel terapötik hedefler sağlayacaktır (Ye ve ark., 2013).

Tablo 2.1. İnsan otozomal resesif osteopetrozisin sınıflandırılması, genetiği ve klinik belirtileri.

Gen	Sunum Yaşı (Yıl)	Büyüme Retardasyonu	Bozukluklar		Merkezi Sinir Sistemi Şiddeti ve Tipi	Osteoklastlar
			Hematolojik	Görme		
<i>TCIRG1</i>	<1	Orta-Şiddetli	Şiddetli	Orta-Şiddetli	Hiç-Orta (Hidrosefali)	Mevcut-Fonksiyonel değil
<i>CLCN7</i>	<1	Orta-Şiddetli	Orta-Şiddetli	Orta-Şiddetli	Hiç-Şiddetli (Hidrosefali, Nörodejenerasyon)	Mevcut-Fonksiyonel değil
<i>OSTM1</i>	<1	Orta-Şiddetli	Orta-Şiddetli	Orta-Şiddetli	Şiddetli (Nörodejenerasyon)	Mevcut-Fonksiyonel değil
<i>SNX10</i>	<1	Orta	Şiddetli	Şiddetli	Hiç-Hafif (Hidrosefali)	Mevcut-Fonksiyonel değil
<i>PLEKHM1</i>	1-10	Hiç-Hafif	Hiç	Hiç	Hiç	Mevcut-Fonksiyonel değil
<i>TNFRSF11A</i>	<1	Orta	Orta	Orta-Şiddetli	Hiç-Hafif (Hidrosefali)	Yok
<i>TNSFS11</i>	<1	Şiddetli	Orta	Orta-Şiddetli	Hiç	Yok
<i>CAII</i>	<1	Orta	Hiç-Orta	Hiç-Şiddetli	Orta-Şiddetli (Bazal ganglion kalsifikasyonu)	Mevcut-Fonksiyonel değil

Malignant otozomal resesif osteopetrozis hastalarının %50'si yıkım boşluğunun asidifikasyonu ve vezikül trafiği için esas olan vakuoler-tip H⁺-ATPaz (V-ATPaz) proton pompası osteoklast spesifik $\alpha 3$ alt ünitesini kodlayan *TCIRG1* geninde mutasyon taşımaktadır. *TCIRG1* geninde yanlış anlamlı, anlamsız, küçük delesyonlar/insersiyonlar, kesip-ekleme (splice) bölgesi mutasyonları ve geniş genomik delesyonları içeren mutasyonların geniş bir çeşitliliği tanımlanmıştır (Fratini ve ark., 2000; Kornak ve ark., 2000; Sobacchi ve ark., 2001; Michigami ve ark., 2002; Scimeca ve ark., 2003; Taranta ve ark., 2003; Susani ve ark., 2004; Mazzolari ve ark., 2009; Pangrazio ve ark., 2009; Phadke ve ark., 2010; Yuan ve ark., 2011; Pangrazio ve ark., 2012). Şimdiye kadar tanımlanan *TCIRG1*-yetersiz ARO hastalarında kemik defekti olan, önemli hematolojik bozukluklarla ve özellikle körlük gibi ikincil nörolojik defektlerle eşlik eden homojen bir sunum görülmektedir

(Sobacchi ve ark., 2014). Bu gende meydana gelen fonksiyon kaybı mutasyonları resorpsiyon lakunasının asidifikasyonunun bozulmasına neden olmaktadır. Böylece osteoklastlar yıkım fonksiyonlarını yerine getirememektedir. Otozomal resesif osteopetrozisin yaklaşık %10-15'inden sorumlu (Cleiren ve ark., 2001; Kornak ve ark., 2001; Frattini ve ark., 2003; Shin, 2004) *CLCN7* geni klorid kanal 7'nin dimer molekülü için monomer kodlamaktadır (Janssens ve Van Hul, 2002). Ayrıca bazı osteopetrozis tanılı hastalarda klorid kanal 7 molekülünün β -alt ünitesini kodlayan *OSTMI* (Lange ve ark., 2006), osteoklast farklılaşması ve proliferasyonundan sorumlu *RANKL/TNSF11* ve *RANK/TNFRSF11A* genlerinde meydana gelen fonksiyon kaybı mutasyonları da tanımlanmıştır. *CLCN7* ve *OSTMI*, kıvrımlı kenarda birlikte bir klorid kanal veya klorid/proton değiştirici oluştururlar ve asidifikasyonu kolaylaştırırlar (Kornak ve ark., 2001; Chalhoub ve ark., 2003). *PLEKHM1* genindeki mutasyonlar otozomal resesif osteopetrozisin daha ılımlı formlarına sebep olmaktadır (Van Wesenbeeck ve ark., 2007; Del Fattore ve ark., 2008). Renal tübüler asidozis ile ilişkili osteopetrozisin bir ılımlı formu ise karbonik anhidraz II (*CAII*) genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Sly ve ark., 1983).

SNX10 geninde ilk olarak 2012 yılında Aker ve arkadaşları tarafından malignan otozomal resesif osteopetrozisten sorumlu bir missense mutasyon tanımlanmıştır. Bu *SNX10* geninde daha sonraki yıllarda yeni mutasyonlar da tanımlanmaya başlamıştır. 2013 yılında Pangrazio ve arkadaşları tarafından üç nonsense mutasyon, evrimsel olarak korunmuş rezidülerde üç missense mutasyon ve son olarak da ekzon kesip-ekleme işlemini bozmaya eğilimli üç mutasyon tanımlanmıştır. *SNX10*'un şimdi tüm ARO'un %4'ünden sorumlu olduğu bilinmektedir (Pangrazio ve ark., 2013). *SNX10* aktivitesi membran trafiğinin ve endozom homeostasisinin düzenlenmesini sağlamaktadır (Coxon ve Taylor, 2008). Bu genin yapılan çalışmalar V-ATPaz ile ilişkide olduğunu göstermiştir. Golgiden V-ATPaz'ın veziküler tasnifinden veya kıvrımlı kenara hedeflenmesinden sorumludur. *SNX10* geninde meydana gelen mutasyonlar 'ikincil V-ATPaz eksikliği'ne neden olabilmektedir (Ye ve ark., 2013).

***TCIRG1* Geni**

TCIRG1 geni, kromozom üzerinde 11q13.4-13.5'te lokalizedir. *TCIRG1* geninden iki transkript sentezlenmektedir. OC116 transkripti, osteoklast-spesifik formdur ve 20 ekzondan kurulmaktadır. Vakuoler H^+ -ATPaz proton pompasının osteoklast spesifik a3 alt ünitesini eksprese etmektedir.

Osteoklastlar kemik yüzeyine yapışır, resorpsiyon boşluğunu kaplar ve spesifik bir membran-bağlı V-ATPaz kompleksini aktive eder. Kemığın mineralize ekstraselüler matriksinin yıkımı osteoklastların kıvrımlı membranları tarafından asit salınımını gerektirmektedir. Katepsin K içeren lizozomal enzimlerin daha sonraki salınımı organik matriks yıkımına neden olmaktadır (Frattini ve ark., 2003).

Yıkım boşluğunun asidifikasyonu için gerekli proton nakli a₃ alt ünite aracılığıyla kıvrımlı membrana demirli V-ATPaz proton pompası tarafından gerçekleştirilmektedir. V-ATPaz genelde lizozomlar, endozomlar ve salınım vezikülleri gibi birçok intraselüler kompartmanlarda pH regülasyonu için önemlidir. Böylece plasma membranına H⁺ iyonlarının ATP-sürücüsü tarafından taşınımı gerçekleştirilmektedir (Wada ve ark., 2013) V-ATPaz proton pompası bir membran periferik V1 domain ve bir membran geçişli V0 domaininden oluşan çok alt üniteli bir komplekstir. V1 domaini ATP hidrolizi için katalitik bölgelere sahiptir, V0 domaini ise proton translokasyonundan sorumludur (Stevens ve Forgac, 1997; Jefferies ve ark., 2008). a₃ alt ünite, fonksiyonel kemik yıkımı için kritik bir 7 transmembran proteindir ve V-ATPaz a₃-alt ünite ailesinin bir üyesidir (Manolson ve ark., 2003; Ogbureke ve ark., 2005).

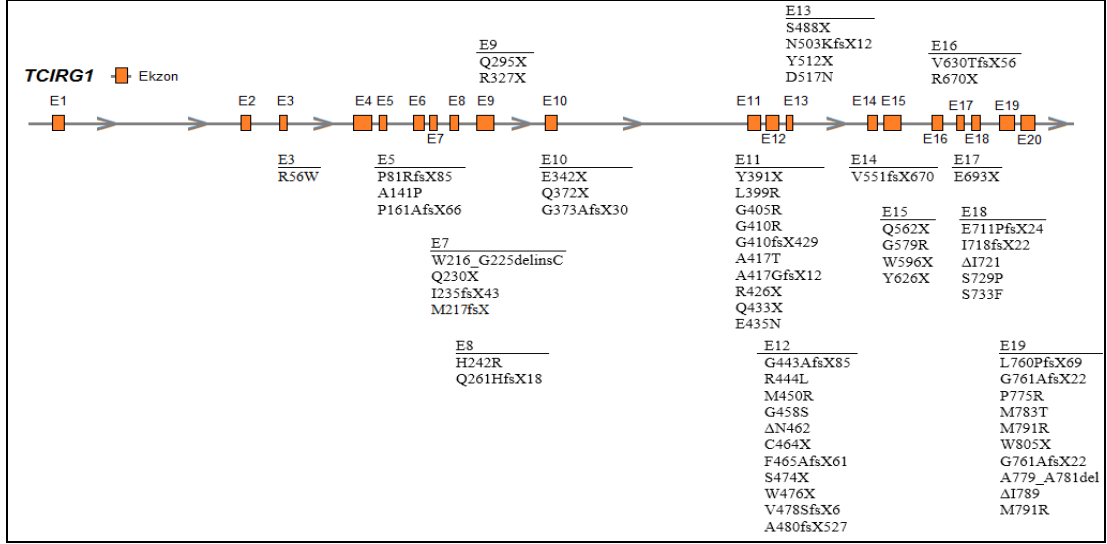
Bu proton pompa geni *TCIRG1* ve osteopetrozis arasındaki ilişki spontan osteopetrotik oc/oc fare modellerinde gerçekleştirilen çalışmalar ile gösterilmiştir (Banco ve ark., 1985; Frattini ve ark., 2000; Kornak ve ark., 2000). Osteopetrozis gelişiminin bir nedeni olarak bir vakuoler proton pompası alt ünitesini kodlayan *TCIRG1* geninin tanımlanması hem insanlarda hem de farelerde gerçekleştirilen çoklu mutasyonel çalışmalarla sağlanmıştır (Li ve ark., 1999; Frattini ve ark., 2000; Kornak ve ark., 2000; Sobacchi ve ark., 2001).

TCIRG1 genindeki patolojik mutasyonlar hem insanlarda hem de hayvan modellerinde defektif asidifikasyona ve kemik yıkımı eksikliğine neden olmaktadır (Frattini ve ark., 2000; Kornak ve ark., 2000; Taranta ve ark., 2003; Blair ve ark., 2004; Del Fattore ve ark., 2006; Moscatelli ve ark., 2013). *TCIRG1* mutasyonlarına sahip hastalarda ana hücrel fenotip, sağlıklı bireylerdeki osteoklastlarla karşılaştırıldığında kemik biyopsilerinde yıkım yapmayan osteoklastların daha yüksek sayıda olduğu bulunmuştur (Flanagan ve ark., 2000; Frattini ve ark., 2000; Taranta ve ark., 2003). *TCIRG1* geninde mutasyonlara sahip osteoklastların *in vitro*

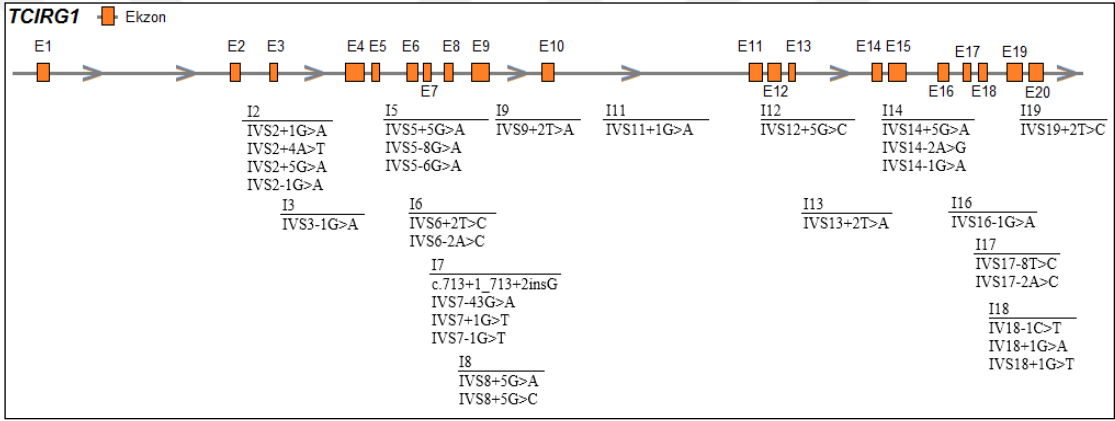
çalışmalarında normal gelişime karşın kemik yıkımı için gerekli asit salınımını ortadan kaldıran, osteoklastların kapasitesini sınırlayan proton salınım eksikliği gösterilmiştir (Blair ve ark., 2004).

TCIRG1 genindeki mutasyonlar tüm ARO vakalarının %50'den fazlasında bulunmaktadır (Frattini ve ark., 2000; Kornak ve ark., 2000; Sobacchi ve ark., 2001; Del Fattore ve ark., 2008; Sobacchi ve ark., 2013). Yanlış anlamlı, anlamsız, küçük delesyonlar/insersiyonlar, kesim bölgesi mutasyonları ve geniş genomik delesyonları içeren mutasyonların geniş bir çeşitliliği hem geniş serilerle ve hem de olgu sunumları ile gerçekleştirilen çalışmalarda tanımlanmıştır (Frattini ve ark., 2000; Kornak ve ark., 2000; Sobacchi ve ark., 2001; Michigami ve ark., 2002; Scimeca ve ark., 2003; Taranta ve ark., 2003; Susani ve ark., 2004; Del Fattore ve ark., 2006; Del Fattore ve ark., 2008; Mazzolari ve ark., 2009; Pangrazio ve ark., 2009; Phadke ve ark., 2010; Yuan ve ark., 2011; Pangrazio ve ark., 2012). HGMD (The Human Gene Mutation Database) verilerine göre tüm *TCIRG1* gen mutasyonlarının yaklaşık %30'u kesip-ekleme bölgesi mutasyonları, %37'si yanlış anlamlı/anlamsız mutasyonlar ve %30'u delesyon/insersiyonlardan oluşmaktadır. Şekil 2.5 ve Şekil 2.6'da *TCIRG1* geninde bulunan mutasyonların dağılımı gösterilmiştir.

Sobacchi ve arkadaşları 2014 yılında yaptığı bir çalışmaya kadar tüm *TCIRG1*-yetersiz ARO hastaları değişmeden önemli bir hematolojik bozukluk ve ikincil nörolojik eksiklik (ağırlıklı olarak körlük) ile eşlik eden kemik bozuklukları gibi homojen bir sunuş sergilemiştir. Ancak benign bir klinik resimle bir hastada *TCIRG1* geninde olağanüstü tanımlamada homozigot yeni bir mutasyon tanımlamışlardır. Bu muhtemelen normal transkriptin sınırlı bir sayıda üretilmesinden kaynaklanmaktadır. Translasyonel bakımdan bu bulgu gen terapi yaklaşımları dikkate alındığında, proteinin küçük bir miktarı klasik, şiddetli ARO fenotipini kurtarmak için yeterli olabilecektir (Sobacchi ve ark., 2014).



Şekil 2.5. *TCIRG1* geninin ekzonlarındaki mutasyonların dağılımı. Ekzonlar “E” ile ifade edilmiştir.



Şekil 2.6. *TCIRG1* geninin intronlarındaki mutasyonların dağılımı. İtronlar ‘I’ ile ifade edilmiştir.

Terapötik açıdan bakıldığında sağlıklı veya gen düzeltilmiş öncül hücrelerin neonatal transplantasyonu kullanılarak *TCIRG1* mutant oc/oc farede son çalışmalar kemik fenotipinin hematopoietik kök hücre hedefli gen terapi kullanılarak düzeltilebileceğini göstermektedir (Johansson ve ark., 2007; Flores ve ark., 2010).

***SNX10* Geni**

Son zamanlarda osteopetrozisin gen çalışmaları insan *SNX10* geninin hastalığın oluşumuna katkı sağlayan yeni bir hedef olduğunu ortaya koymuştur (Aker ve ark., 2012; Zhu ve ark., 2012; Megarbane ve ark., 2013; Pangrazio ve ark., 2013; Ye ve ark., 2013).

SNX10, bir fosfolipit bağlanma motifi PX (phox-homoloji) domaininin varlığı ile karakterize SNX (sorting nexin) protein ailesinin bir üyesidir. Bu protein ailesi, endositoz ve protein trafiğinde yer alan sitoplazmik ve membran ilişkili 33 proteinin

geniş ve farklı bir grubunu içermektedir (Worby ve Dixon, 2002; Cullen, 2008; Teasdale ve Collins, 2012). Fosfolipit bağlayıcı motif PX domaini, proteinlerin tasnifi ve membran trafiğinde protein-protein kompleksleri ve protein-lipit etkileşimleri oluşturma yeteneği kazandırmaktadır (Bravo ve ark., 2001; Yu ve Lemmon, 2001; Worby ve Dixon, 2002; Seet ve Hong, 2006).

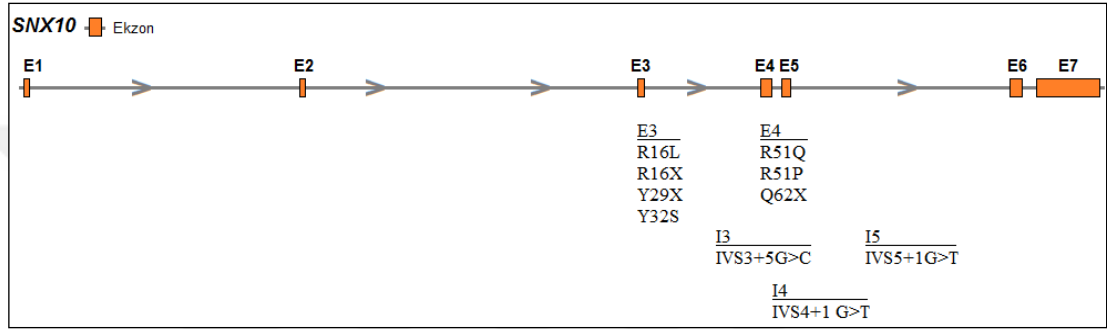
SNX10 geni, 7p15.2 kromozom bölgesinde lokalizedir ve kodlama yapan altı ekzondan oluşmaktadır. 224 aminoasitten oluşan *SNX10* proteinin 38-135 rezidülerinde PX domaini bulunmaktadır. Arg51 ve onun çevresindeki amino asitler evrim boyunca korunmuştur (Aker ve ark., 2012). *SNX10*, PX domaini ile proteinleri protein kargo tasnifi ve membran trafiğinde yer alan endozomlara hedefleyerek endozomal homeostaziyi düzenlemektedir (Worby ve Dixon, 2002).

SNX10 genindeki mutasyonlar osteoklast zengin osteopetrozise neden olmaktadır (Pangrazio ve ark., 2012). Bununla birlikte *in vitro* osteoklastogenesis deneyleri bir *SNX10* mutasyonuna sahip hastadan elde edilen kültürdeki osteoklastların kontrol kültürlerindekiinden daha az ve daha küçük olduğu (Aker ve ark., 2012) ve osteoklast farklılaşmasının da inhibe edildiği (Zhu ve ark., 2012) gösterilmiştir.

Bu zamana kadar ARO'li hastalardaki tüm *SNX10* mutasyonları proteinin tek fonksiyonel domaini olan PX motifinde tanımlanmıştır (Worby ve Dixon, 2002; Aker ve ark., 2012; Pangrazio ve ark., 2013). *SNX10*'un PX domainindeki birkaç mutasyonun düzenli yıkım fizyolojisini karıştırdığı ve hastalık başlangıcına neden olduğu rapor edilmiştir (Aker ve ark., 2012; Megarbane ve ark., 2013; Pangrazio ve ark., 2013). Kemik yıkıcı osteoklastlar, veziküler trafik yollarına son derece bağımlı olduklarından osteoklastik vezikül taşınımının bozulması yıkım aktivitesini ortadan kaldırmaktadır (Coxon ve Taylor, 2008).

SNX10'daki mutasyonlarla ilişkili osteopetrozis *TCIRG1*'deki mutasyonlardan kaynaklanan osteopetrozise oldukça benzemektedir. *SNX10*'un PX domaini, V-ATPaz'ın V1D alt ünitesi ile etkileşime girmektedir ve onun hücre içi trafiğini düzenlemektedir. Bu fonksiyonel ilişkinin kanıtlanması *SNX10*'un aşırı ekspresyonu ile indüklenen büyük vakuollerin birikmesini engellemek için V-ATPaz inhibitörlerinin yeteneği veya V-ATPazın "knock-down" edilmesi ile sağlanmıştır (Chen ve ark., 2012). Dahası *SNX10* ekspresyonunun küçük inhibe edici RNA'lar

(siRNA) ile “knock-down” edilmesi renal karsinoma hücrelerinde V-ATPaz lokalizasyonunu bozmaktadır (Chen ve ark., 2012). V-ATPaz, osteoklast fizyolojisinde temel rol oynamaktadır. V-ATPaz’ın alt ünitesi v1d’in *SNX10*’a bağlanabilmesi için, *SNX10*’un V-ATPaz’ı kıvrımlı kenara hedeflemede kritik rol oynadığı düşünülmektedir (Aker ve ark., 2012; Chen ve ark., 2012). *SNX10*’daki bir mutasyon yıkım lakunasının asidifikasyonunda bir bozukluk ile “ikincil V-ATPaz yetersizliği”ne neden olabilmektedir (Ye ve ark., 2013). Şekil 2.7’de *SNX10* genindeki ekzonik ve intronik mutasyonların dağılımı gösterilmiştir.



Şekil 2.7. *SNX10* geninin ekzonik ve intronik mutasyonların dağılımı. Ekzonlar ‘E’ ile, intronlar ‘I’ ile ifade edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Materyallerinin Toplanması

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda gelişme geriliği, kemik iliği yetmezliği, patolojik kırıklar, görme kaybı, ikincil nöbetler nedeniyle değerlendirilen; laboratuvar bulgularında anemi, bisitopeni, hipokalsemi, alkalin fosfat yüksekliği görülen ve radyolojik bulgularında kemiklerde skleroz, fraktür, kemik içinde kemik görünümü saptanarak osteopetrozis klinik tanısı konulan ve genetik bir çalışma yapılmamış olgular yazılı ve imzalı izin alınarak araştırmaya dahil edilmiştir. Çalışma kapsamına alınan olgulardan periferik kan örnekleri alınmıştır.

3.2. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Osteopetrozis klinik tanısı konularak araştırmaya dahil edilen hastalardan periferik kan örnekleri K3EDTA'lı tüplere alındı. Alınan kan örneklerinin DNA izolasyonları tuzla çöktürme yöntemi (salting-out) ile gerçekleştirildi.

3.2.1. Kullanılan Solüsyonlar

Eritrosit Liziz Tamponu (1 lt):

0.15 M NH₄Cl (Sigma)

10 mM KHCO₃ (Sigma)

0.5 M 4 ml EDTA (pH 7.4) (Sigma)

1 litre eritrosit liziz tamponu hazırlamak için 8.28 gram NH₄Cl, 1 gram KHCO₃ ve 4 ml EDTA toplam hacmi 1 litre olacak şekilde dH₂O'da çözüldü. Otoklavlanarak steril edildi ve +4 °C'de saklandı.

Lökosit Liziz (WBL) Tamponu (100 ml):

4 M NaCl (Merck)

0.5 M EDTA (Sigma)

100 ml WBL tamponu hazırlamak için 2.5 ml NaCl, 5 ml EDTA alınarak dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildi.

EDTA Çözeltisi (0.5 M, pH 7.4):

18.61 gram Na₂EDTA bir miktar dH₂O'da çözüldü. pH'ı NaOH ile ayarlandıktan sonra dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildi.

4 M NaCl Çözeltisi (100 ml):

23.4 gram NaCl tartıldı ve 100 ml dH₂O'da çözüldü.

Amonyum Asetat (AmAc) Çözeltisi (9.5M, 500 ml):

36.613 gram amonyum asetat (AmAc) (Sigma) tartıldı. 15 ml dH₂O'da çözüldükten sonra 50 ml'ye dH₂O ile tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildi.

% 10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS) Çözeltisi:

10 gram SDS (Boehringer Mannheim) 100 ml dH₂O'da çözüldü. 37 °C'de 1 gece inkübe edildikten sonra 0.22 µl'lik filtreden (costar) geçirilerek steril edildi.

Proteinaz K Çözeltisi (10 mg/ml):

10 mg Proteinaz K (Sigma) 1 ml dH₂O'da çözüldü ve -20 °C'de saklandı.

3.2.2. İşlemler

1. Her bireyden K3EDTA'lı tüplere 10 ml periferik kan örneği alındı.
2. 50 ml'lik santrifüj tüplerine 10 ml kan örneği aktarıldı.
3. Üzerine 30 ml eritrosit lizis tamponu ilave edildi ve vortekslenerek homojenize edildi.
4. -20 °C'de 20 dakika bekletildi.
5. -20 °C'den çıkarıldıktan sonra 1500 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası dökelti atıldı ve oluşan pelet el yardımı ile vurularak homojen hale getirildi.
7. Pelet üzerine tekrar 20 ml eritrosit lizis tamponu ilave edildi ve vortekslenerek homojen hale getirildi.
8. 1500 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası yine dökelti atıldıktan sonra oluşan pelet el yardımı ile vurularak homojen hale getirildi.
10. Pelet üzerine 9.5 ml WBL tamponu ve 100 µl proteinaz K (10 mg/ml) eklenip vortekslendi.
11. Aynı karışımın üzerine 500 µl %10'luk SDS ilave edildi.
12. Daha sonra tüpün ağzı parafimlenerek 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
13. Ertesi gün oda sıcaklığında yarım saat kadar bekletildikten sonra üzerine 9.5 M amonyum asetat çözeltisinden 3.7 ml eklendi.
14. Tamamen beyaz köpük oluşuncaya kadar elle vurularak karıştırıldı.
15. Daha sonra 5 000 rpm'de 25 °C'de 30 dakika santrifüj edildi.
16. Santrifüj sonrası oluşan üst faz 50 ml'lik yeni bir steril santrifüj tüpüne alındı.

17. Üzerine 1:2 oranında %96'lık soğuk etanol ilave edildi. DNA'nın görünür hale gelmesi için tüp yavaşça alt üst edilerek DNA'nın toplanması sağlandı.
18. DNA pipet ucu yardımıyla içinde 500 µl %70'lik etanol bulunan ependorf tüpüne alındı.
19. 13 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
20. Alkol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 200-500 µl steril dH₂O'da çözüldü ve -20 °C'de saklandı.

3.3. DNA Miktarının ve Saflığının Analizi

Elde edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık tayini nano drop 1000 (V.3.7) cihazı ile belirlendi. Bu DNA örnekleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için 10-20 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Elde edilen DNA örneklerinin ilgili bölgelerinin çoğaltılması PZR yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu yöntemde primer olarak adlandırılan 18-24 bç uzunlukta oligonükleotitler yardımıyla istenilen gen bölgesinin DNA polimeraz enzimi (yüksek ısıya dayanıklı Taq Polimeraz) kullanılarak *in vitro* çoğaltılması gerçekleştirilmektedir. *TCIRG1* ve *SNX10* genlerinin PZR yöntemi ile çoğaltılması GeneAmp[®] PCR System 9700 96-well cihazı ile gerçekleştirildi.

3.4.1. Primer Dizaynı

TCIRG1 geninin kodlama yapan tüm ekzonları (ekzon 2-20) ve intron-ekzon bağlantı bölgelerini de içerecek şekilde Taranta ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada belirtilen primer dizileri kullanılarak yapıldı (Taranta ve ark., 2003). *SNX10* geninin kodlama yapan ekzonlarını (ekzon 2-7) içeren primer çiftlerinin dizaynı NCBI (The National Center for Biotechnology Information) sitesinde yer alan primer3 ve BLAST yardımıyla dizayn edildi.

Tablo 3.1. *TCIRG1* geninin primer dizileri ve PZR ürünlerinin büyüklükleri.

PRİMERLER	Primer Dizileri (5'→3')	Ürün (bp)
Ekzon 2-3 <i>TCIRG1_2_3F</i> <i>TCIRG1_2_3R</i>	GTG CAC AGG TGC CCG TGG TT CCC AGA CTC TTC CTT TCA GA	720
Ekzon 4-5 <i>TCIRG1_4_5F</i> <i>TCIRG1_4_5R</i>	CTG GTG GCC GAT GGA GTT TG AGT TCC GGG CCT GAA GGA GG	620
Ekzon 6-8 <i>TCIRG1_6_8F</i> <i>TCIRG1_6_8R</i>	GGC CAG TGT GCC CAA TTG CC ACC TCC TGC ACC CAC CTC CG	729
Ekzon 9 <i>TCIRG1_9F</i> <i>TCIRG1_9R</i>	CGG AGG TGG GTG CAG GAG GT AGG CAA AGC CCA GGT GCA GG	486
Ekzon 10 <i>TCIRG1_10F</i> <i>TCIRG1_10R</i>	AGG GCA GAG CAG GGC TGA TC TCA GGC TCA CAC CCA CCC AG	374
Ekzon 11-13 <i>TCIRG1_11_13F</i> <i>TCIRG1_11_13R</i>	GGG TTC TTG ACT GCA GGC CA TCA CCA CCC ACG GAC ACT CC	676
Ekzon 14 <i>TCIRG1_14F</i> <i>TCIRG1_14R</i>	GCT GGC CCA TCT GCG CTC TG TGA GCT CCG GCA GCG TCT CC	717
Ekzon 15 <i>TCIRG1_15F</i> <i>TCIRG1_15R</i>	AGA TTT GGA GCC TGG CTG CC TCT TGC AGC TCC CAG TGG CC	498
Ekzon 16-18 <i>TCIRG1_16_18F</i> <i>TCIRG1_16_18R</i>	AGG TGT GCA CAG CAG GGA CG AGA GAA GCA ACC CGC CCA GC	549
Ekzon 19-20 <i>TCIRG1_19_20F</i> <i>TCIRG1_19_20R</i>	GTG CAG GGA GGG CTT CAG GC CCC TGC CAC CTG CCT CAG CTA	417

3.4.2. TCIRG1 Geni

TCIRG1 geni için kullanılan primer dizilerinin detayları Tablo 3.1’de verilmiştir.

TCIRG1 Geninin PZR Kimyasal Koşulları:

Tablo 3.2. Ekzon 2-3, ekzon 4-5, ekzon 10 ve ekzon 14’e ait PZR kimyasal koşulları.

Ekzon 2-3;Ekzon 4-5;Ekzon 10;Ekzon 14	1x
Taq DNA Polimeraz Tamponu (10x)	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
İleri Primer (10 pM)	1 µl
Geri Primer (10 pM)	1 µl
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0.2 µl
dH ₂ O	değişken
DNA (10-30 ng/µl)	3-5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.3. Ekzon 6-7-8’e ait PZR kimyasal koşulları.

Ekzon 6-7-8	1x
Taq DNA Polimeraz Tamponu (10x)	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
İleri Primer (10 pM)	1 µl
Geri Primer (10 pM)	1 µl
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0.2 µl
dH ₂ O	değişken
DNA (10-30 ng/µl)	3-5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.4. Ekzon 9'a ait PZR kimyasal koşulları.

Ekzon 9	1x
Taq DNA Polimeraz Tamponu (10x)	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2.5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
İleri Primer (10 pM)	1 µl
Geri Primer (10 pM)	1 µl
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0.2 µl
dH ₂ O	değişken
DNA (10-30 ng/µl)	3-5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.5. Ekzon 11-12-13'e ait PZR kimyasal koşulları.

Ekzon 11-12-13	1x
Taq DNA Polimeraz Tamponu (10x)	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP (10 mM)	0.8 µl
İleri Primer (10 pM)	1 µl
Geri Primer (10 pM)	1 µl
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0.15 µl
dH ₂ O	değişken
DNA (10-30 ng/µl)	3-5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.6. Ekzon 15'e ait PZR kimyasal koşulları.

Ekzon 15	1x
Taq DNA Polimeraz Tamponu (10x)	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
dNTP (10 mM)	0.8 µl
İleri Primer (10 pM)	0.8 µl
Geri Primer (10 pM)	0.8 µl
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0.2 µl
dH ₂ O	değişken
DNA (10-30 ng/µl)	3-5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.7. Ekzon 16-17-18'e ait PZR kimyasal koşulları.

Ekzon 16-17-18	1x
Taq DNA Polimeraz Tamponu (10x)	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
İleri Primer (10 pM)	1 µl
Geri Primer (10 pM)	1 µl
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0.2 µl
dH ₂ O	değişken
DNA (10-30 ng/µl)	3-5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.8. Ekzon 19-20'ye ait PZR kimyasal koşulları.

Ekzon 19-20	1x
Taq DNA Polimeraz Tamponu (10x)	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.8 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
İleri Primer (10 pM)	1 µl
Geri Primer (10 pM)	1 µl
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0.2 µl
dH ₂ O	değişken
DNA (10-30 ng/µl)	3-5 µl
Toplam	25 µl

PZR Sıcaklık Koşulları:

Ekzon 2-3:

96 °C'de	10 dk	} 38 döngü
96 °C'de	1 dk	
59 °C'de	1 dk	
72 °C'de	1 dk	
72 °C'de	7 dk	
4 °C'de	∞	

Ekzon 4-5; Ekzon 10:

96 °C'de	10 dk	
96 °C'de	1 dk	} 38 döngü
61 °C'de	1 dk	
72 °C'de	1 dk	
72 °C'de	8 dk	
4 °C'de	∞	

Ekzon 6-7-8:

96 °C'de	10 dk	
96 °C'de	1 dk	} 38 döngü
61 °C'de	1 dk	
72 °C'de	45sn	
72 °C'de	8 dk	
4 °C'de	∞	

Ekzon 9:

95 °C'de	5 dk	
95 °C'de	1 dk	} 40 döngü
66 °C'de	45 sn	
72 °C'de	45sn	
72 °C'de	5 dk	
4 °C'de	∞	

Ekzon 11-12-13:

95 °C'de	5 dk	
95 °C'de	1 dk	} 38 döngü
60 °C'de	1 dk	
72 °C'de	1 dk	
72 °C'de	7 dk	
4 °C'de	∞	

Ekzon 14:

95 °C'de	8 dk	}	38 döngü
95 °C'de	1 dk		
65 °C'de	1 dk		
72 °C'de	1 dk		
72 °C'de	7 dk		
4 °C'de	∞		

Ekzon 15:

95 °C'de	5 dk	}	40 döngü
95 °C'de	30 sn		
63.5 °C'de	30 sn		
72 °C'de	45 sn		
72 °C'de	7 dk		
4 °C'de	∞		

Ekzon 16-17-18:

94 °C'de	5 dk	}	38 döngü
94 °C'de	45 sn		
62.5 °C'de	45 sn		
72 °C'de	1 dk		
72 °C'de	7 dk		
4 °C'de	∞		

Ekzon 19-20:

94 °C'de	5 dk	}	38 döngü
94 °C'de	30 sn		
66 °C'de	30 sn		
72 °C'de	45 dk		
72 °C'de	7 dk		
4 °C'de	∞		

3.4.3. SNX10 Geni

SNX10 geninin dizayn edilen primer çiftlerinin dizilerinin detayları Tablo 3.9’ de verilmiştir.

Tablo 3.9. SNX10 geninin primer dizileri ve PZR ürünlerinin büyüklükleri.

PRİMERLER	Primer Dizileri (5’->3’)	Ürün (bç)
Ekzon 2 <i>SNX10_2F</i> <i>SNX10_2R</i>	TCT CTC TGC GCG TCT TTT CC TGG ATA CTG CTC CAA GCC AAG	700
Ekzon 3 <i>SNX10_3F</i> <i>SNX10_3R</i>	CTC CCA CCT CAG TGT TGC AT AGG AAC CAT CTT ACT AGT TCA TGT	483
Ekzon 4 <i>SNX10_4F</i> <i>SNX10_4R</i>	CCT GGG GCA ACA CTG CTT AT GAG GCC TTT CAT GGC CTA TAC C	533
Ekzon 5 <i>SNX10_5F</i> <i>SNX10_5R</i>	TAG GCC ATG AAA GGC CTC AGA GTC AGC TAA ACG CCC AGG TAA	606
Ekzon 6 <i>SNX10_6F</i> <i>SNX10_6R</i>	AGC TTC ATG TTT TTA CCC ACC TAA AGT GTG GAG GTG TGT GTG AAG	621
Ekzon 7 <i>SNX10_7F</i> <i>SNX10_7R</i>	AGT CTT CAC ACA CAC CTC CAC AAG TCA TTT CAT TGG AGG GCA A	642

SNX10 Geninin PZR Kimyasal Koşulları:

Tablo 3.10. Ekzon 2, ekzon 3 ve ekzon 4'e ait PZR kimyasal koşulları.

Ekzon 2;Ekzon 3;Ekzon 4	1x
Taq DNA Polimeraz Tamponu (10x)	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2.5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
İleri Primer (10 pM)	1 µl
Geri Primer (10 pM)	1 µl
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0.2 µl
dH ₂ O	değişken
DNA (10-30 ng/µl)	3-5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.11. Ekzon 6 ve ekzon 7'ye ait PZR kimyasal koşulları.

Ekzon 6;Ekzon 7	1x
Taq DNA Polimeraz Tamponu (10x)	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
İleri Primer (10 pM)	1 µl
Geri Primer (10 pM)	1 µl
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0.2 µl
dH ₂ O	değişken
DNA (10-30 ng/µl)	3-5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.12. Ekzon 5'e ait PZR kimyasal koşulları (High Fidelity).

Ekzon 5	1x
Tampon + MgCl ₂ (10x)	2.5 µl
DMSO	1 µl
dNTP (10 mM)	0.5 µl
İleri Primer (10 pM)	1 µl
Geri Primer (10 pM)	1 µl
Enzim Blend (5 U/µl)	0.16 µl
dH ₂ O	11.3 µl
DNA (10-30 ng/µl)	3 µl
Toplam	20 µl

PZR Sıcaklık Koşulları:

Ekzon 2, ekzon 3 ve ekzon 4:

95 °C'de	10 dk	} 40 döngü
95 °C'de	1 dk	
55 °C'de	1 dk	
72 °C'de	1 dk	
72 °C'de	8 dk	
4 °C'de	∞	

Ekzon 5:

95 °C'de	10 dk	} 40 döngü
95 °C'de	1 dk	
63 °C'de	1 dk	
72 °C'de	1 dk	
72 °C'de	8 dk	
4 °C'de	∞	

Ekzon 6 ve ekzon 7:

96 °C'de	10 dk	} 40 döngü
96 °C'de	45 sn	
60 °C'de	45 sn	
72 °C'de	45 sn	
72 °C'de	8 dk	
4 °C'de	∞	

3.5. PZR Ürünlerinin Kalitatif Analizi

Elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde (BioRad) yürütüldü. 10X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) tamponu (Newbioscience), 1X konsantrasyonunda olacak şekilde 1:9 oranında dH₂O ile seyreltildi. %2'lik agaroz jel hazırlamak için 2 gram agaroz (BioShop) 100 ml 1X TBE tamponunda çözüldü. 10 µl etidyum bromid (EtBr) ilave edildi. Elektroforez küvetine taraklar yerleştirildi ve sıvı agaroz jel döküldü. Polimerize olduktan sonra taraklar çıkarıldı ve jel içinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. 5'er µl PZR ürünleri 1 µl yükleme tamponu (Newbioscience) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Fragmentlerin uzunluklarını belirlemek amacıyla 100 bp marker (Solis Biodyne) da kuyucuğa yüklendi. PZR örnekleri 120 voltta 20 dakika yürütülerek analiz edildi.

Etidyum Bromid (EtBr) (10 mg/ml):

10 mg etidyum bromid (Sigma) tartılarak 1 ml dH₂O'da çözüldü.

3.5.1. Görüntüleme

Elektroforez ile yürütme işlemi sonrası PZR ürünlerinin fragment uzunlukları Syngene Transillüminatör sistemi ve yazılım programı ile görüntülendi.

3.6. PZR Ürünlerinin Temizlenmesi

PZR ürünlerinin bağlanmayan primerler ve dNTP'lerden temizlenmesi için GML ExoSAP-IT enzim karışımı kullanıldı. 10 µl PZR ürününe 2 µl ExoSAP-IT ilave edildi. GeneAmp[®] PCR System 9700 96-well cihazında temizleme reaksiyonu gerçekleştirildi.

ExoSAP-IT PZR koşulları:

37 °C'de 30 dakika

80 °C'de 15 dakika

4 °C'de ∞

3.7. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi otomatik Sanger yöntemi ile Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer cihazında gerçekleştirildi.

3.7.1. DNA Dizi Analizi Reaksiyonu

Reaksiyon Kimyasal Koşulları:

Big Dye™ v3.1	2 µl
5X Dizileme Tamponu	2 µl
İleri (F) ya da Geri (R) Primer	2 µl
dH ₂ O	2 µl
<u>PZR Ürünü</u>	<u>2 µl</u>
	10 µl

Reaksiyon Koşulları:

94 °C'de	4 dk	} 25 döngü
96 °C'de	10 sn	
50 °C'de	5 sn	
60 °C'de	4 dk	
4 °C'de	∞	

3.8. Dizileme Reaksiyonu Ürünlerinin Temizlenmesi

Reaksiyon ürünlerinin temizlenmesi işleminde sephadex (GML, Altendorf, Switzerland) kullanıldı. 1 gram sephadex 14 ml dH₂O'da 30 dakika çalkalanarak çözüldü. Hazır filtrelili-kolonlu tüplere (GML) 700 µl sephadex eklendi ve 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Kolon tüpüne geçen sıvı kısım atıldı. 10 µl dizileme reaksiyonu ürünleri kolonun ortasına gelecek şekilde yüklendi ve 5000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Temizlenmiş ürünü içeren, kolona geçen sıvı kısım plate kuyucuklarına yüklendi. Daha sonra Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer cihazına yüklendi.

3.9. Analiz

Verilerin analizinde Seqanalysis v.3.1 programı kullanıldı. Örneklerin elektroferogram görüntüleri ve çıktıları Chromas Lite v.2.1.1 programı kullanılarak elde edildi. Elde edilen dizilerin referans dizi ile karşılaştırılması NCBI Blast programı ile gerçekleştirildi (*TCIRG1* NCBI Refseq: NG_007878.1, *SNX10* NCBI Refseq: NG_033902.1).



4. BULGULAR

Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda osteopetrozis klinik tanısı konulan 12 olgu dahil edilmiştir (Tablo 4.1). Olgular Sanger yöntemi ile dizilenerek taranmıştır.

4.1. *TCIRG1* ve *SNX10* Genleri Varyasyonları

Dizileme analizleri sonucunda Tablo 4.2'de *TCIRG1* geninde ve Tablo 4.3'de *SNX10* geninde saptanan mutasyonların detayları ve *TCIRG1* ve *SNX10* geninde saptanan polimorfizmler Tablo 4.4'te detaylı olarak verilmiştir.



Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen olguların klinik tablosu.

Olgu No	Tanı Yaşı	Hematolojik Bulgular	Büyüme	Nöral Defektler	Dental Defektler	Radyografi Bulgusu	Baş ve Boyun	Abdomen	Aile Hikayesi
1	37 ay	Anemi, Kemik iliği yetmezliği, trombositopeni	Gelişme geriliği, kısa boy	Görülmektedir	-	Kafa kemiklerinde skleroz	Görme bozukluğu, frontal bası	Hepatosplenomegali, hipertelorizm	-
2	2 gün	Anemi, trombositopeni,	Gelişme geriliği, kısa boy	Nöbet	-	Şüpheli	-	Splenomegali, hipertelorizm	Akraba evliliği
3	20 gün	Anemi, trombositopeni	-	-	Yarık damak	Kafa ve uzun kemik şüpheli	Frontal bası	Hepatosplenomegali	-
4	3 ay	Anemi, lökopeni, nötropeni	Gelişme geriliği, kısa boy	Görülmektedir	-	-	Bilateral atrofi, frontal bası	Hepatosplenomegali	Akraba evliliği
5	4 ay	Anemi, trombositopeni	-	-	-	Periorbital dansite	Görme bozukluğu	-	Akraba evliliği
6	1 ay	Anemi, trombositopeni, lökopeni	-	-	-	-	-	Hepatosplenomegali	Akraba evliliği
7	5 ay	Anemi, trombositopeni, kemik iliği yetmezliği	Gelişme geriliği, kısa boy	Nöromotor gelişme geriliği	Görülmektedir	Vertebra skleroz, kemik içinde kemik, kemik kırıkları ve aşınma	Nistagmus, işitme kaybı, makrosefali, frontal bası	Hipertelorizm, hepatosplenomegali	Akraba evliliği
8	10 ay	Anemi, trombositopeni, nötropeni	-	-	-	Kemik içinde kemik	Nistagmus, strabismus, alın belirgin	-	-
9	2.5 ay	Anemi, trombositopeni	-	-	-	-	Bilateral atrofi	Hepatosplenomegali	Aynı köyde ve akrabalarda osteopetrozis
10	10 ay	Trombositopeni	-	-	Diş eti kanaması	Kafa skleroz, kemik içinde kemik	Frontal bası	-	-
11	5.5 ay	-	-	-	-	Kemik kırıkları ve aşınma	-	Hepatosplenomegali	Akraba evliliği
12	4 ay	Anemi	Gelişme geriliği	-	-	-	-	Hepatosplenomegali	Akraba evliliği ve 1. çocuk osteopetrozis

Tablo 4.2. *TCIRG1* geninde saptanan mutasyonlar ve detayları.

Hasta No	Nükleotit Değişimi (NG_007878.1,NM_006019.2)	Amino Asit Değişimi (NP_006010.2)	Ekzon/İntron	Alel	Anne	Baba	Kaynakça	Referans No
4	g.9483G>T c.630+1G>T	Anormal kesip- ekleme	İntron 6	Heterozigot	Çalışılmadı	Çalışılmadı	Bu çalışmada	Bu çalışmada
7	g.10170_10171delTG c.1778_1779delTG	p.V595LfsX74	Ekzon 15	Homozigot	Heterozigot	Heterozigot	Bu çalışmada	Bu çalışmada
8	g.9574_9599del26 c.649_674del26	Met217fsTer (M217fsX)	Ekzon7	Birleşik Heterozigot	Heterozigot	Normal	(Borthwick ve ark., 2003)	Varyasyon ID:5465 OMIM:604592. 0007
	g.13698G>A c.1372G>A	p.Gly458Ser(G458 S)	Ekzon 12		Normal	Heterozigot	(Pangrazio ve ark., 2012)	rs200851583
12	g.11240G>A c.2235+1G>A	Anormal kesip- ekleme	İntron 18	Homozigot	Heterozigot	Heterozigot	(Sobacchi ve ark., 2001)	Bulunmamakta dır

Tablo 4.3. *SNX10* geninde saptanan mutasyonlar ve detayları.

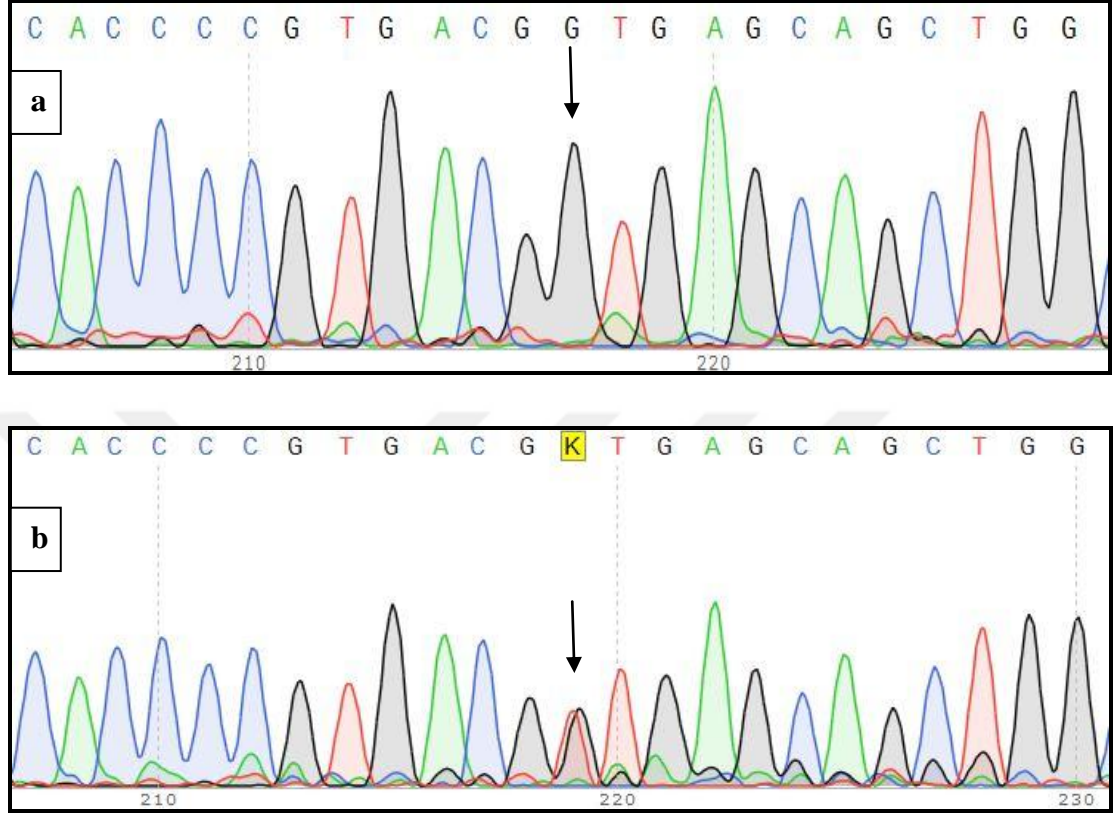
Hasta No	Nükleotit Değişimi (NG_033902.1,NM_001199835.1)	Amino Asit Değişimi (NP_001186764.1)	Ekzon/ İntron	Alel	Anne	Baba	Referans
2	g.85603C>G c.531C>G	p.Ser177=	Ekzon 7	Heterozigot	Çalışılmadı	Çalışılmadı	Bu çalışmada

Tablo 4.4. *TCIRG1* ve *SNX10* genlerinde saptanan benign/olasılıkla benign polimorfizmler ve detayları.

GEN	EKZON/ İNTRON	POLİMORFİZMLER	BENİGN/ OLASILIKLA BENİGN	HOMOZİGOT OLGULAR	HETEROZİGOT OLGULAR	MAF (1000 Genomes)	FREKANS	REFERANS
<i>TCIRG1</i>	İntron 2	g.7456T>C c.117+83T>C	Benign	8	2, 4, 5	C=0.2744/1374	% 20.8	rs7116924
<i>TCIRG1</i>	Ekzon 3	g.7786C>T c.166C>T	Olasılıkla benign	-	2, 11	T=0.0170/85	%8.3	rs36027301
<i>TCIRG1</i>	İntron 4	g.8859A>G c.417+11A>G	Benign	-	2, 4, 5, 9	G=0.2975/1490	% 16.6	rs3808974
<i>TCIRG1</i>	İntron 7	g.9780C>A c.714-19C>A	Benign	-	4, 5	A=0.1751/877	% 8.3	rs10896289
<i>SNX10</i>	İntron 2	g.54582T>A c.24+36T>A	Benign	1, 2, 4, 5, 10, 11	12	A=0.4115/49940	%54.1	rs3801891
<i>SNX10</i>	İntron 3	g.72531G>A c.112-84G>A	Benign	3, 4, 8	1, 2, 9, 10, 11	A=0.4479/2243	%45.8	rs2253569

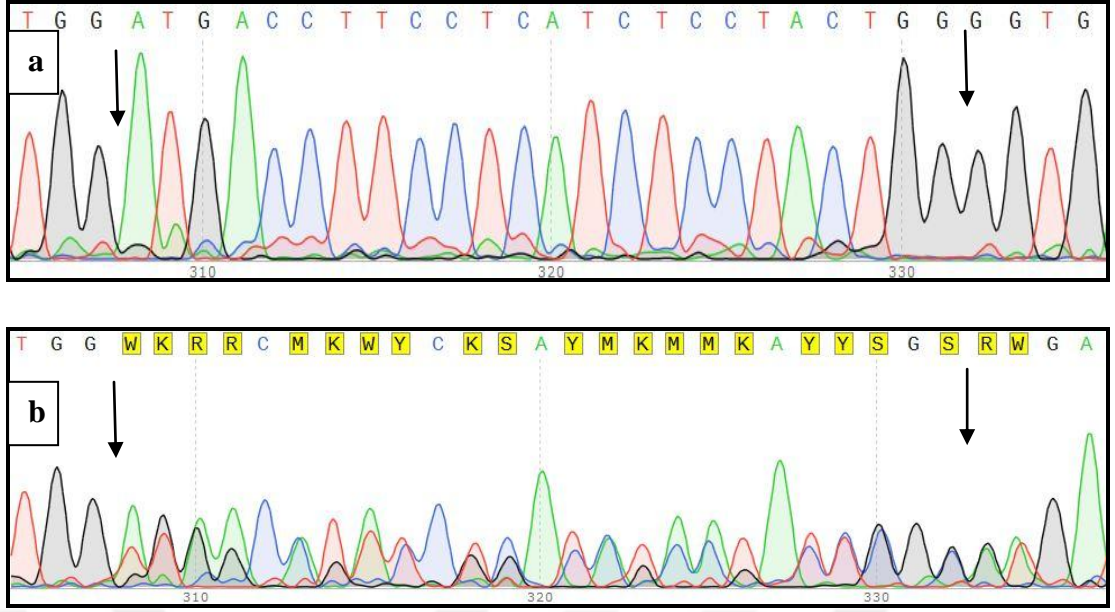
a) Mutasyonlar

Olgulardan birinde (olgu no: 4) intron 6'da daha önce bildirilmemiş g.9483G>T (IVS6+1G>T) kesim bölgesi mutasyonu heterozigot olarak (Şekil 4.1) saptanmıştır.

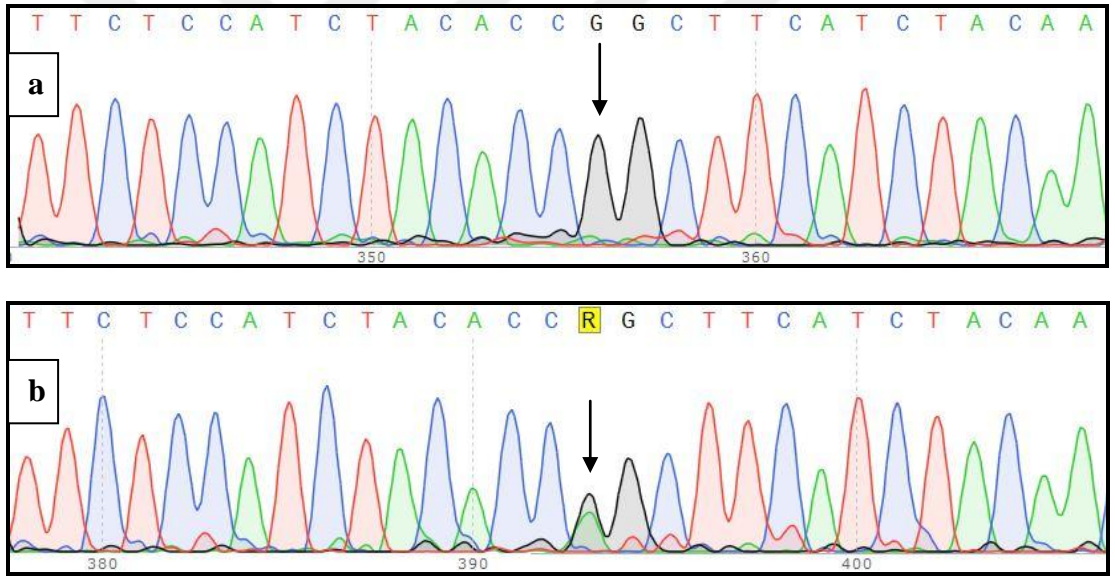


Şekil 4.1. a) Referans dizi ve b) 4 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni intron 6'da heterozigot olarak saptanan g.9483G>T (IVS6+1G>T) değişimi.

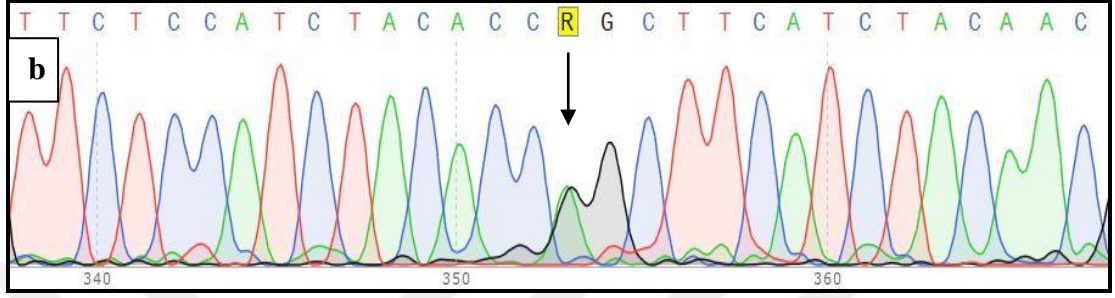
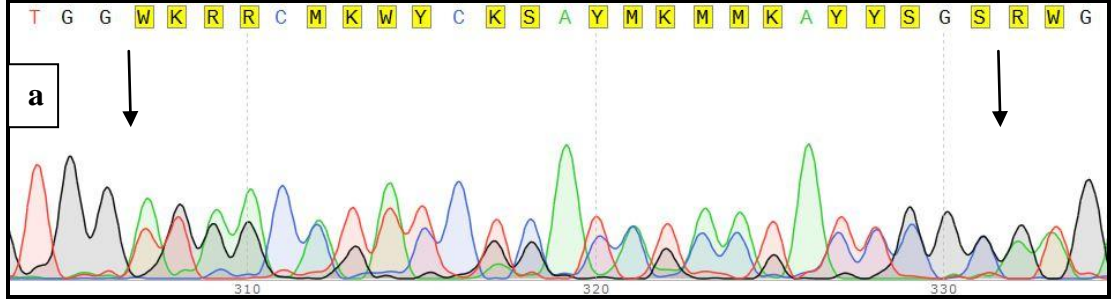
Olgulardan birinde (olgu no: 8) ekzon 7'de çerçeve kaymasına sebep olarak erken dur kodonu ile sonuçlanan g.9574_9599del26 (M217fsX) çerçeve kayması mutasyonu heterozigot olarak (Şekil 4.2) ve ekzon 12'de g.13698G>A (G458S) yanlış anlamlı mutasyonu heterozigot olarak (Şekil 4.3) saptanmıştır. Bu 26 bç'lik delesyon hastanın annesinde heterozigot iken, yanlış anlamlı mutasyon ise hastanın babasında heterozigot olarak (Şekil 4.4) saptanmıştır.



Şekil 4.2. a) Referans dizi ve b) 8 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni ekzon 7'de heterozigot olarak saptanan g.9574_9599del26 (M217fsX) delesyonu.

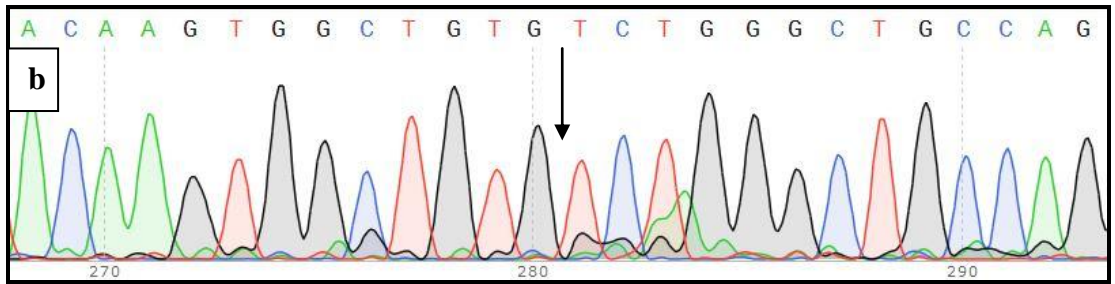
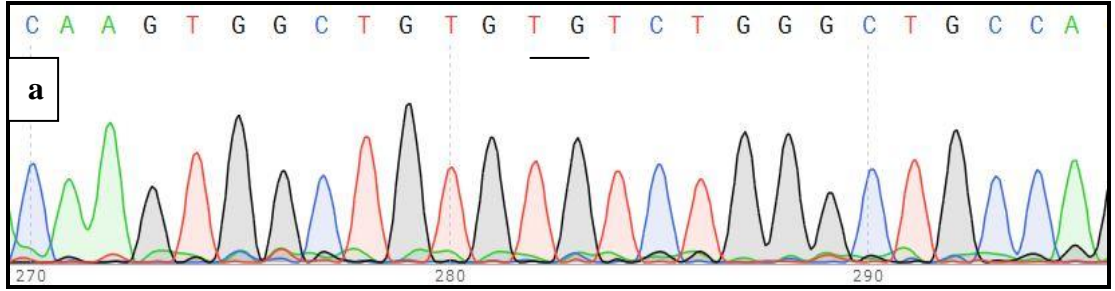


Şekil 4.3. a) Referans dizi ve b) 8 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni ekzon 12'de heterozigot olarak saptanan g.13698G>A (G458S) değişimi.

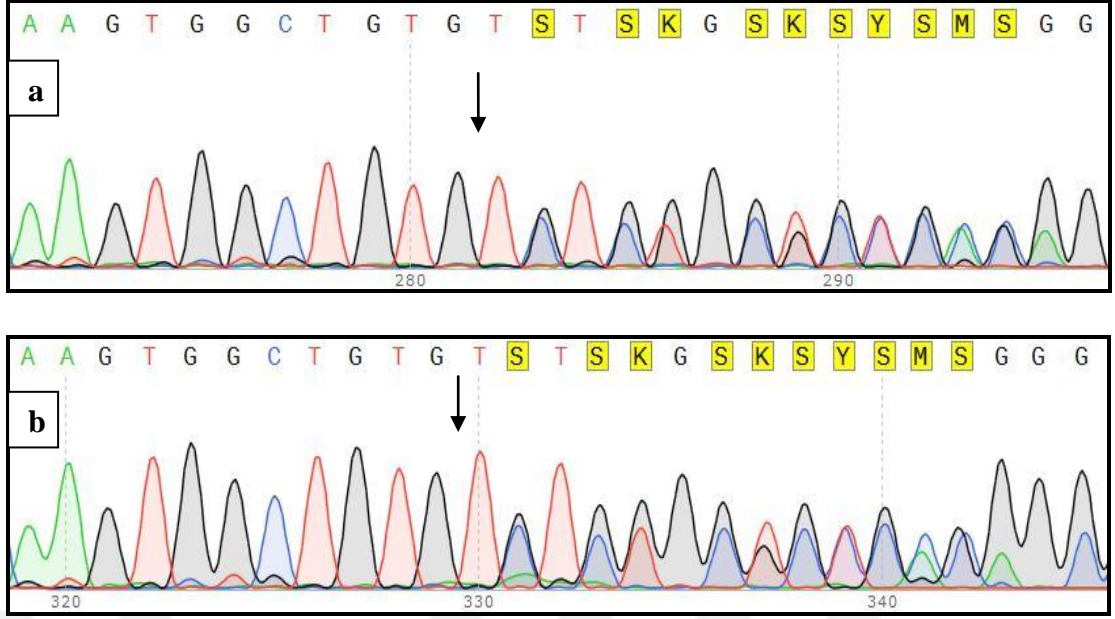


Şekil 4.4. a) 8 numaralı hastanın annesinde ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni ekzon 7’de heterozigot olarak saptanan g.9574_9599del26 (M217fsX) delesyonu. b) Hastanın babasında ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni ekzon 12’de heterozigot olarak saptanan g.13698G>A (G458S) değişimi.

Olgulardan birinde (olgu no: 7) ekzon 15’te daha önceden tanımlanmamış çerçeve kaymasına sebep olarak erken dur kodonu ile sonuçlanan g.10170_10171delTG (p.V595LfsX74) çerçeve kayması mutasyonu homozigot olarak (Şekil 4.5) saptanmıştır. Bu 2 bç’lik delesyon hastanın anne ve babasında heterozigot olarak (Şekil 4.6) saptanmıştır.

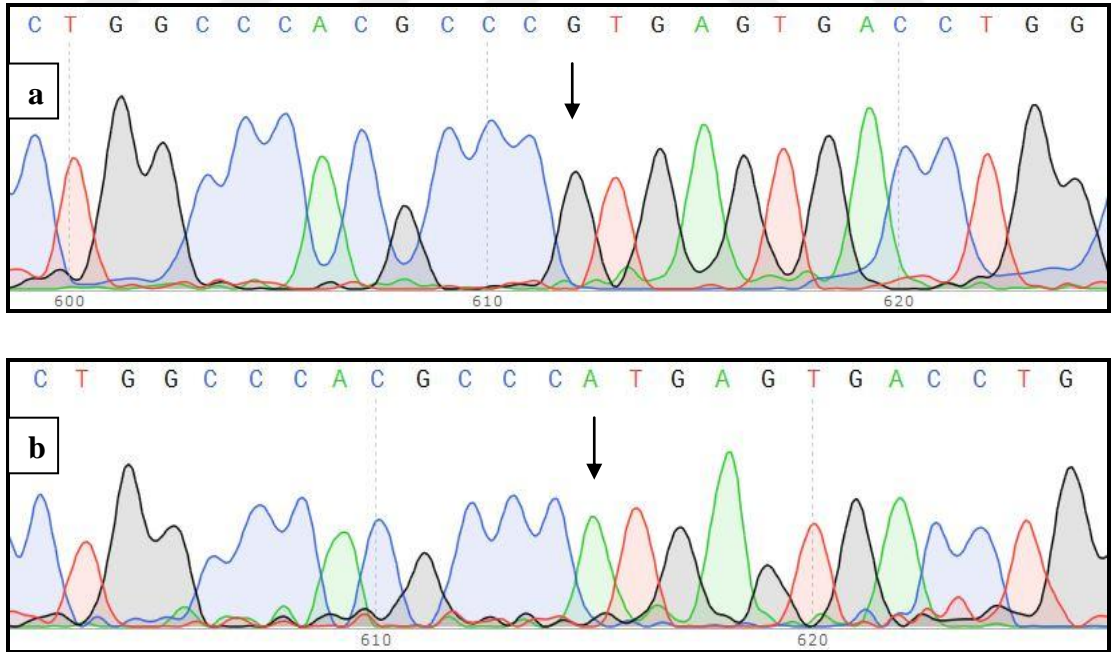


Şekil 4.5. a) Referans dizi ve b) 7 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni ekzon 15’te homozigot olarak saptanan g.10170_10171delTG (p.V595LfsX74) delesyonu.

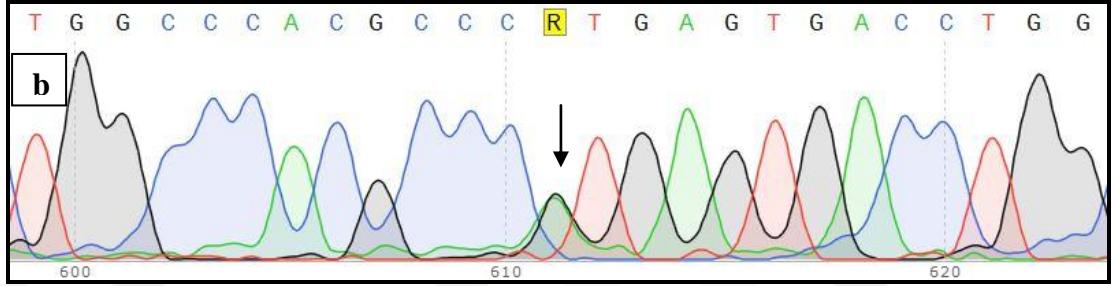
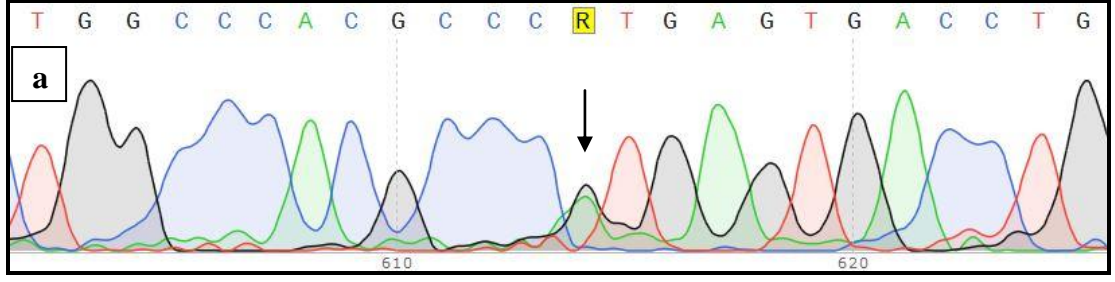


Şekil 4.6. 7 numaralı hastanın baba (a) ve annesinde (b) ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni ekzon 15'te heterozigot olarak saptanan g.10170_10171delTG (p.V595LfsX74) delesyonu.

Olgulardan birinde (olgu no: 12) intron 18'de g.11240G>A (c.2235+1G>A) kesim bölgesi mutasyonu homozigot olarak (Şekil 4.7) saptanmıştır. Bu kesim bölgesi mutasyonu hastanın anne ve babasında da heterozigot olarak (Şekil 4.8) saptanmıştır.

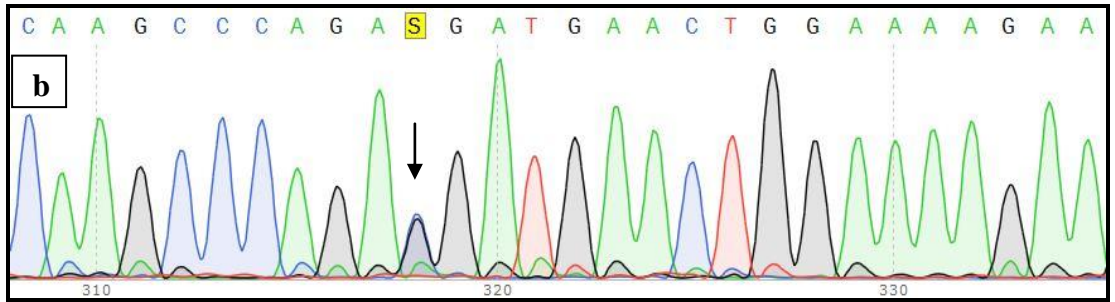
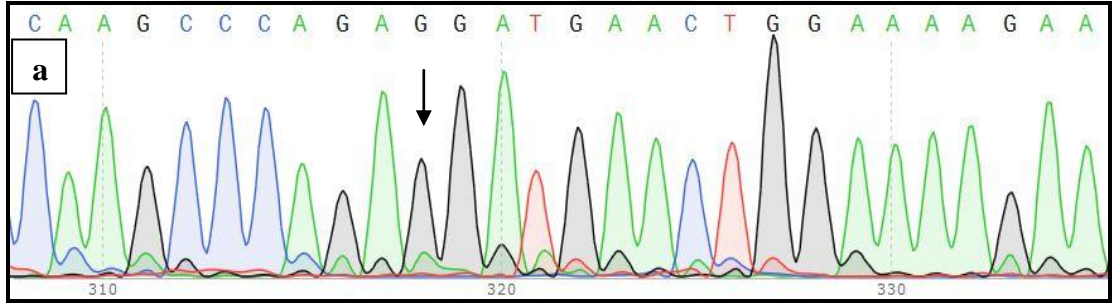


Şekil 4.7. a) Referans dizi ve b) 12 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni intron 18'de homozigot olarak saptanan g.11240G>A (IVS18+1G>A) değişimi.



Şekil 4.8. 12 numaralı hastanın baba (a.) ve annesinde (b.) ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni intron 18’de heterozigot olarak saptanan g.11240G>A (IVS18+1G>A) değişimi.

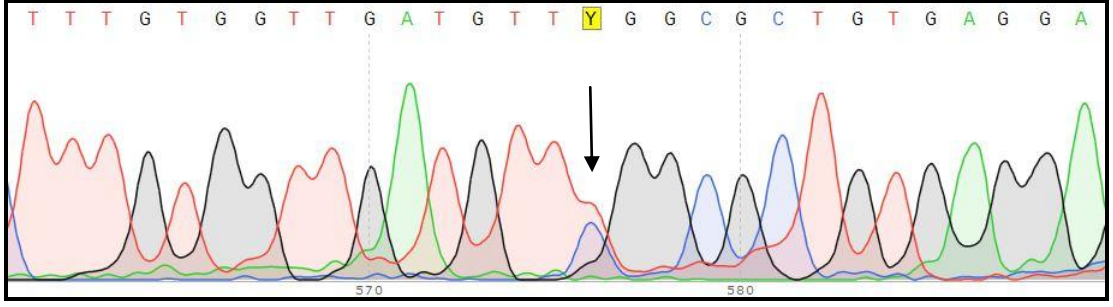
Olgulardan birinde (olgu no: 2) *SNX10* geni ekzon 7’de g.85603C>G (c.531C>G) kesim bölgesi değişimi heterozigot olarak (Şekil 4.9) saptanmıştır.



Şekil 4.9. a) Referans dizi ve b) 2 numaralı hastada geri primerle yapılan dizi analizi sonucu *SNX10* geni ekzon 7’de heterozigot olarak saptanan g.85603C>G (c.531C>G) kesim bölgesi değişimi.

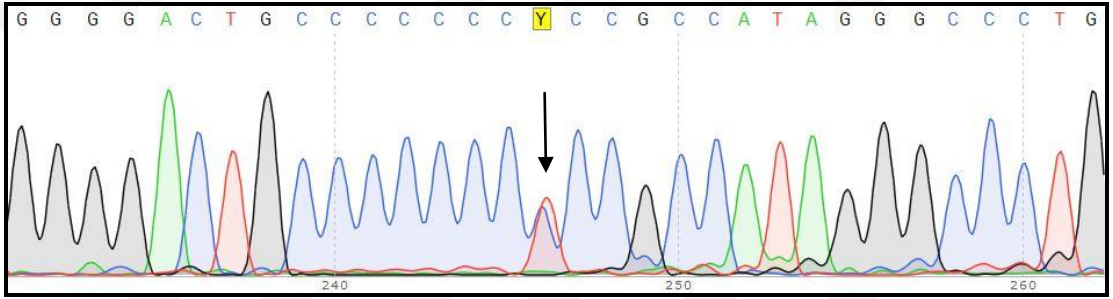
b. Polimorfizmler

Olguların ikisinde (olgu no:2 ve 11) ekzon 3’te g.7786C>T (Arg56Trp) olasılıkla benign olarak belirtilen varyasyon heterozigot olarak (Şekil 4.10) saptanmıştır.

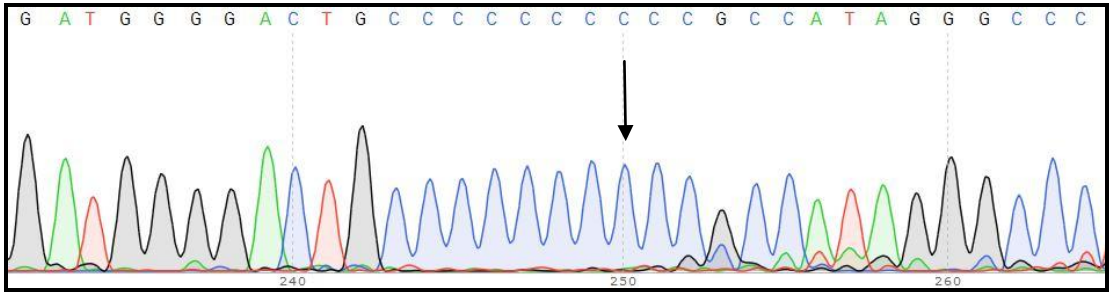


Şekil 4.10. 2 ve 11 numaralı hastalarda ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni ekzon 3'de heterozigot olarak saptanan g.7786C>T (Arg56Trp) değişimi.

TCIRG1 genine yönelik yapılan dizi analizi sonucunda intron 2'de g.7456T>C (IVS2+83T>C) polimorfizmi 3 olguda (olgu no:2, 4, 5) heterozigot olarak (şekil 4.11) saptanırken, 1 olguda (olgu no:8) homozigot olarak (şekil 4.12) saptanmıştır.

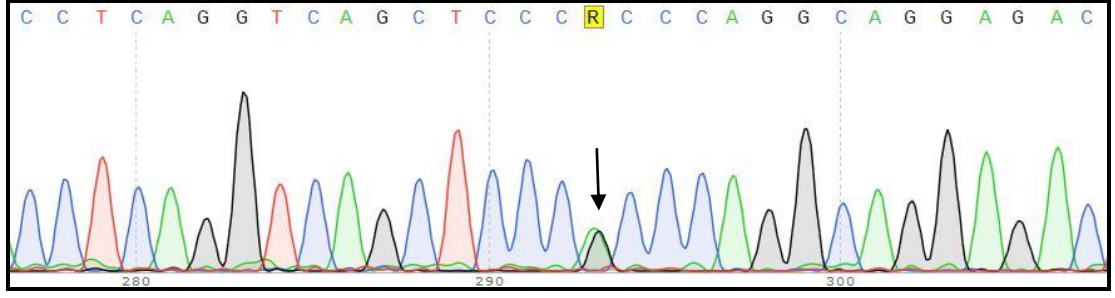


Şekil 4.11. 2, 4 ve 5 numaralı hastalarda ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni intron 2'de heterozigot olarak saptanan g.7456T>C (IVS2+83T>C) değişimi.



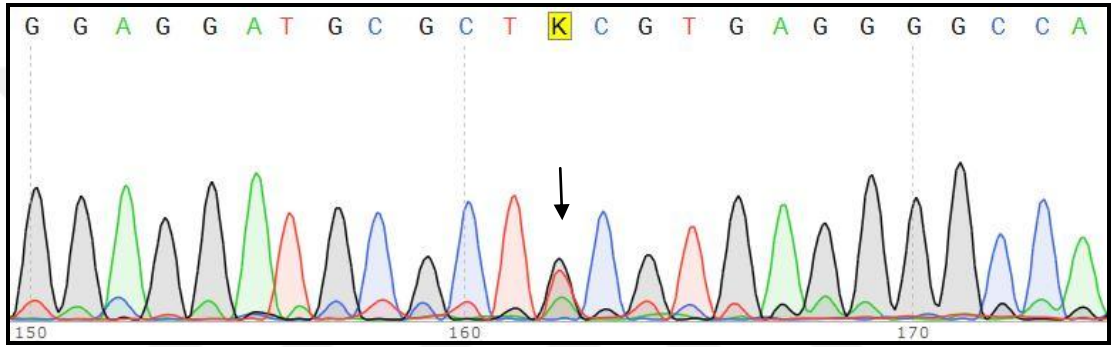
Şekil 4.12. 8 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni intron 2'de homozigot olarak saptanan g.7456T>C (IVS2+83T>C) değişimi.

4 olguda (olgu no:2, 4, 5 ve 9) intron 4'te g.8859A>G (IVS4+11A>G) polimorfizmi heterozigot olarak (Şekil 4.13) saptanmıştır.



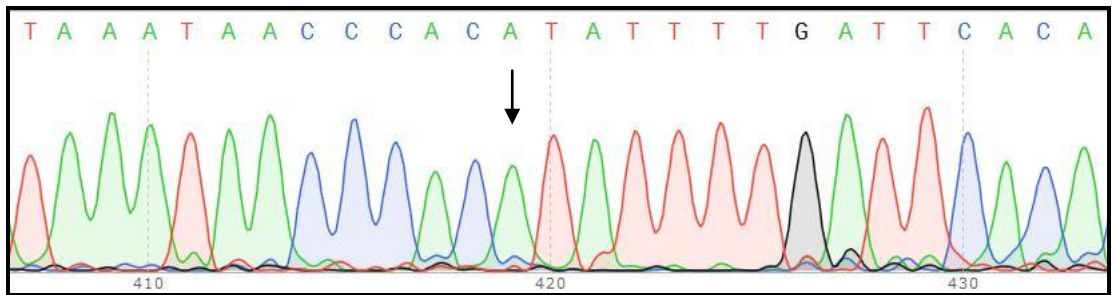
Şekil 4.13. 2, 4, 5 ve 9 numaralı hastalarda ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni intron 4'te heterozigot olarak saptanan g.8859A>G (IVS4+11A>G) değişimi.

Olgulardan ikisinde (olgu no: 4 ve 5) intron 7'de g.9780C>A (IVS7-19C>A) polimorfizmi heterozigot olarak (Şekil 4.14) saptanmıştır.

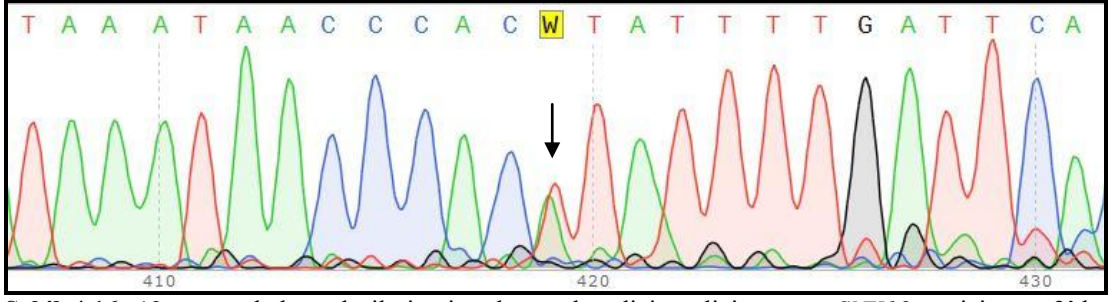


Şekil 4.14. 4 ve 5 numaralı hastalarda geri primerle yapılan dizi analizi sonucu *TCIRG1* geni intron 7'de heterozigot olarak saptanan g.9780C>A (IVS7-19C>A) değişimi.

SNX10 genine yönelik yapılan dizi analizi sonucunda intron 2'de g.54582T>A (IVS2+36) polimorfizmi 6 olguda (olgu no: 1, 2, 4, 5, 10, 11) homozigot olarak (şekil 4.15) saptanırken, 1 olguda (12) heterozigot olarak (şekil 4.16) saptanmıştır.

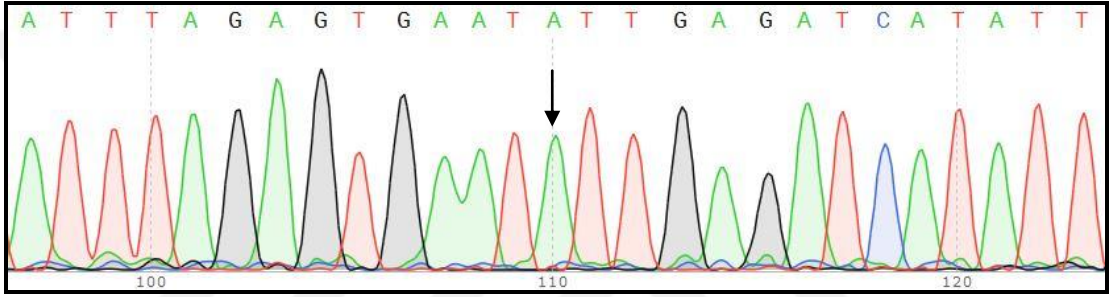


Şekil 4.15. 1, 2, 4, 5, 10 ve 11 numaralı hastalarda ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *SNX10* geni intron 2'de homozigot olarak saptanan g.54582T>A (IVS2+36) değişimi.

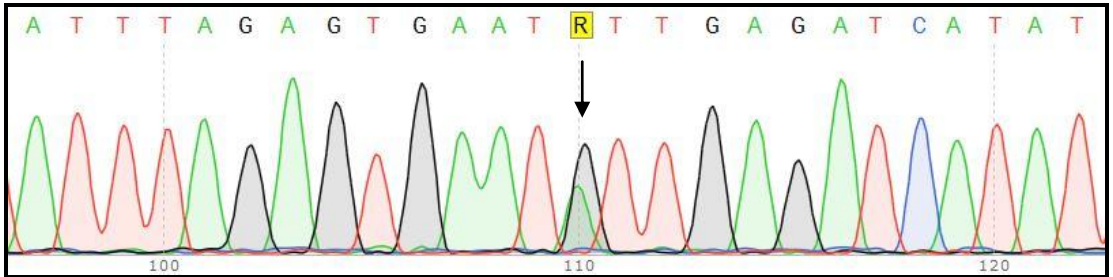


Şekil 4.16. 12 numaralı hastada ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *SNX10* geni intron 2’de heterozigot olarak saptanan g.54582T>A (IVS2+36) değişimi.

SNX10 geni intron 3’te g.72531G>A (IVS3-84) polimorfizmi 3 olguda (olgu no: 3, 4, 8) homozigot olarak (şekil 4.17) saptanırken 5 olguda (olgu no: 1, 2, 9, 10, 11) heterozigot olarak (şekil 4.18) saptanmıştır.



Şekil 4.17. 3, 4 ve 8 numaralı hastalarda ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *SNX10* geni intron 3’te homozigot olarak saptanan g.72531G>A (IVS3-84) değişimi.



Şekil 4.18. 1, 2, 9, 10 ve 11 numaralı hastalarda ileri primerle yapılan dizi analizi sonucu *SNX10* geni intron 3’te heterozigot olarak saptanan g.72531G>A (IVS3-84) değişimi.

5. TARTIŞMA

Otozomal resesif osteopetrozis, osteopetrozisin en bilinen formudur. Bu form osteoklast hücrelerindeki işlevsizlikten kaynaklanan kemik yıkımında bozukluklara neden olan bir form olup artan kemik yoğunluğu ile karakterizedir (Bliznetz ve ark., 2009; Sobacchi ve ark., 2014). Kemik yıkımındaki bozukluklar hastalığın en şiddetli klinik bulgusu olan anormal kemik iliği boşluğu oluşumunu ve diğer kemik iliği bozukluğuna bağlı semptomları ortaya çıkarmaktadır (Wilson ve Vellodi, 2000). Bununla birlikte kemik büyümesinde gerilik, kemiklerde anormal şekillenme (de Vernejoul, 2008), kemiklerde kırılmaya eğilim (Neutzsky-Wulff ve ark., 2010), kafatası kemiklerinin kalınlaşmasından kaynaklı sinirlerin sıkışması sonucu görme ve işitme kayıpları (Sobacchi ve ark., 2013) ve dental bozukluklar gibi fenotipik sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Helfrich, 2005).

Malignant otozomal resesif osteopetrozis yaşamın ilk aylarında ortaya çıkan, yaşamı tehdit edici nadir bir genetik kemik hastalığıdır (Tolar ve ark., 2004). Osteopetrozis formları arasında en nadir görülen bu formun frekansı 1/200.000-1/300.000'dir (Balemans ve ark., 2005). Bununla birlikte Kosta Rika'da kurucu etkisinden kaynaklanan (Sobacchi ve ark., 2001) OPTB1'in (*TCIRG1*) 3.4/100 000 olarak yüksek bir frekansı bulunmaktadır (Fasth ve Porras, 1999; Phadke ve ark., 1999). Yine Rusya'nın Çuvaş popülasyonunda uzun üreme izolasyonu ve genetik sürüklenmeden kaynaklanan (El'chinova ve Ginter, 2001; Ginter ve ark., 2001) en yüksek frekans (1/3879 yenidoğan) (Ginter ve ark., 2001) görülmektedir.

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda sınırlı sayıda Türk olguya ait genetik çalışma bulunduğu saptanmıştır. 2009 yılında Pangrazio ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bir Türk ARO hastasında *TCIRG1* geninde 1.3 kb'lık delesyon tanımlanmıştır. Frattini ve arkadaşlarının 2003 yılında *TCIRG1* ve *CICN7* genlerinde yaptığı çalışmada yine birçok ülkenin yanı sıra Türkiye'nin de yer aldığı bir çalışma bulunmaktadır. Sobacchi ve arkadaşlarının 2001 yılında *TCIRG1* geninde yaptığı çalışmada ise Türkiye'den bir hastada 'dur' kodonu oluşturan bir mutasyon ve osteopetroza, renal tübüler asidoza ve serebral kalsifikasyona sahip iki Türk kardeşte çerçeve kaymasına neden olan bir delesyon tanımlanmıştır. Tablo 5.1'de diğer

ülkelerle ortak yapılan çalışmalardaki Türk olgularda saptanan mutasyonlar verilmiştir.

Tablo 5.1. Otozomal resesif osteopetrozisli Türk olgularda saptanan mutasyonlar.

Gen	Mutasyon	Olgu Sayısı	Ekzon	Referans
<i>TCIRG1</i>	c.649C>T p.Gln433Ter(Q433X)	1 olgu (Homozigot)	11	(Sobacchi ve ark., 2001)
<i>TCIRG1</i>	g.8280_9560del	1 olgu (Homozigot)	11-12-13	(Pangrazio ve ark., 2009)
<i>TCIRG1</i>	c.649_674del26 [*] p.Met217fsTer(M217fsX)	1 olgu (Homozigot) 1 olgu (Heterozigot)	7	(Borthwick ve ark., 2003)
<i>SNX10</i>	c.152G>C p.Arg51Pro(R51P)	3 olgu (Homozigot)	4	(Pangrazio ve ark., 2013)
<i>CLCN7</i>	c.1792A>G p.Arg561Gln(R561Q)	1 olgu (Homozigot)	19	(Besbas ve ark., 2009)
<i>CAII</i>	c.82C>T p.Gln28Ter(Q28X)	1 olgu (Homozigot)	2	(Shah ve ark., 2004)
<i>CAII</i>	c.621delC p.Trp208fsX(W208X)	2 olgu (Homozigot)	6	(Shah ve ark., 2004)
<i>TNFRSF11A</i>	c.508A>G p.Arg170Gly(R170G)	2 olgu (Homozigot) 1 olgu (Heterozigot)	5	(Karkucak ve ark., 2014)
<i>TNFRSF11A</i>	c.838G>T p.Gly280Ter(G280X)	1 olgu (Homozigot)	9	(Guerrini ve ark., 2008)

*Çalışmamızda da olgu 8'de heterozigot olarak saptanan mutasyon.

Tablo 5.1’de belirtildiği üzere Türk hastalar üzerinde yapılan çalışmaların azlığı nedeniyle malignant otozomal resesif osteopetrozisin yaklaşık %50’sinden sorumlu *TCIRG1* ve yeni çalışılmaya başlayan *SNX10* genlerinin mutasyonlarının taranması ve genotip-fenotip korelasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Hastalık genetik olarak heterojendir (Sobacchi ve ark., 2013) ve bugüne kadar otozomal resesif osteopetrozis ile ilişkili sekiz gen bilinmektedir: *TCIRG1*, *CLCN7*, *CAII*, *TNFSF11/RANKL*, *TNSFRSF11A/RANK*, *OSTM1*, *PLEKHM1* ve *SNX10*. Olguların yaklaşık %25’inde ise hastalığa neden olan gen ve mutasyonlar henüz tanımlanmamıştır (Ye ve ark., 2013). Yaklaşık %50’den fazlası ise yıkım boşluğunun asidifikasyonunu sağlayan V-ATPaz’ın osteoklast spesifik $\alpha 3$ alt ünitesini kodlayan *TCIRG1* genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. HGMD verilerine göre bu gendeki mutasyonların yaklaşık %30’unu kesim bölgesi mutasyonları, %37’sini yanlış anlamlı/anlamsız mutasyonlar ve %30’unu ise delesyon/insersiyonlar oluşturmaktadır.

Türkiye’de özellikle akraba evliliğinin %40.7 olduğu (Alper ve ark., 2004) Antalya bölgesinde otozomal resesif osteopetrozis ile ilişkili %50’den daha yüksek mutasyon oranına sahip *TCIRG1* ve son zamanlarda dahil edilen %4 gibi bir mutasyon oranına sahip *SNX10* genindeki mutasyonları incelemek amacıyla Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı’nda osteopetrozis tanısı konulan 12 çocuk olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Aile hikayesine bakıldığında 8 numaralı olgu dışında, mutasyon bulunan olguların hepsi akraba evliliği hikayesine sahiptir. Mutasyon bulunan hastaların klinik bilgileri bulunmayan hastalarla karşılaştırıldığında klinik açıdan büyük bir farklılık ortaya koymamaktadır. Ayrıca literatürde *CLCN7* genindeki mutasyonların nöral defektlerle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ancak *TCIRG1* geninde mutasyon taşıyan olgularda da nöral defektler belirlenmiştir.

Bir olguda (olgu no:4) heterozigot olarak saptanan g.9483G>T (*IVS6+1G>T*) kesim bölgesi mutasyonu literatürde daha önce yer almayan yeni bir mutasyondur. İntron 6’nın kesim donör bölgesindeki korunmuş dizideki bu transversiyonun anormal kesip eklemeye neden olma ihtimali yüksektir.

Diğer bir olguda (olgu no:8) ekzon 7'de g.9574_9599del26 (c.649_674del26), p.Met217fsTer (M217fsX) 26 bç'lik delesyonu heterozigot olarak bulunmuştur. 26 bç'lik bu delesyon çerçeve kaymasına sebep olmaktadır. Amino asit pozisyonu 217'de metiyonin yerine erken dur kodonunun oluşması güdük protein sentezlenmesi ile sonuçlanmaktadır. Literatürde 2003 yılında osteopetrozis ve distal renal tübüler asidozisin (dRTA) her ikisinin de en belirgin olduğu akraba olan iki olgunun moleküler genetik araştırmalarının sunulduğu çalışmada, osteopetrozis için *TCIRG1* geninde p.Met217fsTer (M217fsX) 26 bç'lik delesyonu homozigot olarak, kardeşinde ise heterozigot olarak saptanmışlardır (Borthwick ve ark., 2003). Yapılan bir çalışmada ise c.648_674del27, p.Trp216_Gly225delinsCys ile sonuçlanan çerçeve kaymasına sebep olan 27 bç'lik bir delesyon saptanmıştır (Pangrazio ve ark., 2012). Tüm bu sonuçlar, bu bölgenin osteopetrozis için *TCIRG1* geninde hotspot bir bölge olabileceğini gündeme getirmektedir.

Yine aynı olguda (olgu no:8) ekzon 12'de g.13698G>A (c.1372G>A), 458. pozisyonda amino asit değişikliğine (G458S) sebep olan yanlış anlamlı mutasyonu heterozigot olarak saptanmıştır. Bu mutasyonu Polyphen değeri 1.00, SIFT skoru ise 0.00'dır. Tespit edilen bu varyantın *in silico* analizler sonucunda protein fonksiyonuna olan etkisinin zararlı olabileceği görülmektedir. Bu mutasyon Pangrazio ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada da hastalık yapıcı bir mutasyon olarak rapor edilmiştir (Pangrazio ve ark., 2012).

Bu olguda heterozigot olarak bulunan bu iki farklı mutasyonun birleşik heterozigotluğunun doğrulanması için olgunun anne ve babasına yönlendiğimizde, ekzon 7'deki g.9574_9599del26 (c.649_674del26), p.Met217fsTer (M217fsX) 26 bç'lik delesyon annede heterozigot olarak saptanırken, ekzon 12'deki g.13698G>A (c.1372G>A, p.Gly458Ser) yanlış anlamlı mutasyonu ise babada heterozigot olarak saptanmıştır. Olgumuzda saptanan M217fsX ve G458S mutasyonlarının birleşik heterozigotluğu literatürde ilk olup klinik bulguların değerlendirilmesi açısından önemlidir. Klinik tabloya bakıldığında olgumuz 10 aylıkken tanı almış olup anemi, trombositopeni, nötropeni, kemik içinde kemik görünümü, nistagmus, şaşılık ve belirgin bir alın gözlenmiştir.

Olgu 7'de ekzon 15'te bulunan homozigot g.10170_10171delTG (V595LfsX74) mutasyonu bu çalışmada saptanmıştır ve çerçeve kaymasına neden olarak erken dur

kodonu ile sonuçlanmaktadır. Homozigot olarak bulunan bu delesyonun 3. dereceden akraba olan anne ve babada heterozigot olarak bulunması akraba evliliklerinin çok sık olduğu (Alper ve ark., 2004) ülkemizde genetik danışmanlığın da önemini bir kez daha ortaya koymaktadır. 7 numaralı olguda saptadığımız delesyonun bulunduğu diziye çok yakın 3 amino asitin delesyonuna sebep olan 9 bç'lik farklı bir delesyon ExAC veritabanında rapor edilmiştir. Ancak 3 amino asidin delesyonu protein fonksiyonunu etkilememektedir.

Çalışmamıza dahil edilen 12 numaralı olguda g.11240G>A (IVS18+1G>A) kesim bölgesi mutasyonu homozigot olarak saptanmıştır. Bu mutasyon Sobacchi ve arkadaşları tarafından 2001 yılında rapor edilmiştir. İntron 18'in korunmuş dizisi olan donör kesim dizisinde meydana gelen bu transisyonel değişim anormal kesip ekleme sürecine neden olmaktadır.

Çalışmamızda ekzon 2-20 bölgeleri analiz edilen *TCIRG1* geninde iki olguda (olgu no: 2 ve 11) heterozigot olarak bulunan g.7786C>T, p.Arg56Trp (R56W) yanlış anlamlı mutasyonu ClinVar verilerine göre olasılıkla benign olarak belirtilmiştir.

SNX10 geninde bir olguda (olgu no: 2) heterozigot olarak saptanmış olan g.85603C>G (c.531C>G) değişimi MutationTaster tahmin programı ile analiz edilmiş olup hastalık yapıcı bir kesim bölgesi değişimi olduğu düşünülmektedir. Kesim bölgesine yedi nükleotit uzaklıktaki bu değişim amino asit değişimine sebep olmazken *in silico* analizler sonucunda kesip ekleme işlemi etkilediği düşünülmektedir. Bu değişim ilk kez bizim çalışmamızda saptanmış olup literatürde daha önce bildirilmemiş bir değişimdir. Daha önce ExAc veritabanına göre aynı nükleotit pozisyonunda c.531C>T (rs141563997) değişimi bildirilmiştir. Bu mutasyon da amino asit değişimine sebep olmazken MutationTaster tahmin programına göre hastalık yapıcı bir kesim bölgesi değişimidir. Bu çalışmada saptanan c.531C>G değişiminin klinik etkisinin kesin olarak belirlenebilmesi için ek analizlere ihtiyaç vardır. Bu olguda ayrıca *TCIRG1* geninde olasılıkla benign olarak belirtilen R56W mutasyonu da heterozigot olarak saptanmıştır. Bu iki ayrı gendeki mutasyonların etkileri daha ayrıntılı araştırılmalıdır.

Çalışmamızda saptanan *TCIRG1* mutasyonlarına bakıldığında araştırmaya dahil edilen 12 olgunun 4'ünde (%30) hastalık yapıcı mutasyon saptanmıştır. Çalışmada 2 kesim bölgesi mutasyonu (%30), biri 26 bç'lik diğeri ise 2 bç'lik olmak üzere 2

delesyon (%30) ve 1 aminoasit değişimine sebep olan yanlış anlamlı mutasyonu (%8) saptanmıştır.

TCIRG1 ve *SNX10* genlerinde bulunan tüm polimorfizmler daha önce rapor edilen polimorfizmlerdir. Olgu 4 çalışmamızda saptanan polimorfizmlerin tümünü (rs7116924, rs3808974, rs10896289, rs3801891, rs2253569) barındırmaktadır. Olgu 5 ise IVS3-84G>A (rs2253569) dışındaki tüm polimorfizmleri barındırırken olgu 1 sadece *SNX10* genindeki polimorfizmleri barındırmaktadır.

Çalışmamız sonucunda *TCIRG1* geninde 4 ailede 5 farklı hastalık yapıcı mutasyon bulunmuştur. Türk olgularla ilgili literatür incelendiğinde 1 büyük delesyon ve 2 farklı mutasyonun rapor edildiği saptanmıştır (Tablo 5.1). Bu bulgular *TCIRG1* geninde popülasyonumuzdaki heterojeniteyi yansıtmaktadır. Çalışmamızda incelenen olgu sayısı az olmakla birlikte herhangi bir yaygın mutasyon varlığı saptanmamıştır.

Yapılan literatür taraması sonucunda *TCIRG1* geninde mutasyonların ekzonlara dağılımı Şekil 2.5'te gösterilmiştir. *TCIRG1* geninin 1, 2, 4, 6 ve 20'inci ekzonlarında hiç mutasyon bildirilmemişken; 11, 12 ve 19'uncu ekzonlarda daha fazla sayıda mutasyon saptanmıştır. Bu ekzonların protein domainindeki pozisyonlarına bakıldığında helikal (transmembran) ve vakuolar domainlerde yer almaktadırlar.

Literatüre göre en az 13 hastada *TCIRG1* geninde büyük boyutlu delesyon saptanmıştır. Bu çalışmada uyguladığımız Sanger dizileme yöntemi PZR'ye dayandığı için büyük boyutlu yeniden düzenlemeleri gösterememektedir. Bizim çalışmamızda olgu 4'de *TCIRG1* geninde IVS6+1G>T mutasyonu ve olgu 2'de *SNX10* geninde c.531C>G mutasyonu heterozigot olarak bulunmuştur. İki olgunun da klinik bulguları dikkate alındığında büyük yeniden düzenlenmelerin de başka yöntemlerle değerlendirilmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmaya dahil edilen 12 olgunun 4'ünde *TCIRG1* geninde hastalık yapıcı mutasyonlar saptanmıştır. Olgulardan birinde (olgu 4) intron 6'da bulunan g.9483G>T (IVS6+1) kesim bölgesi mutasyonu heterozigot olarak saptanmıştır. Bu mutasyon daha önce rapor edilmemiş, ilk kez bizim çalışmamızda elde edilmiştir. Bu hastanın *TCIRG1* geninin başka bölgesinde ve *SNX10* geninde de başka bir mutasyon saptanmamıştır. Hastalığın fenotipe yansımaları değerlendirmek için otozomal resesif osteopetrozise neden olan diğer genlerin de araştırılması gerekmektedir.

Olgu 7'de *TCIRG1* ekzon 15'te homozigot olarak bulunan ve daha önce rapor edilmemiş, ilk defa bizim çalışmamızda elde edilen diğer bir yeni mutasyon olan g.10170_10171delTG (p.V595LfsX74) delesyonu hem hastalığın tanısı hem de literatüre katkı sağlaması açısından önem taşımaktadır. Çerçeve kaymasına neden olarak erken dur kodonu oluşumu ile sonuçlanan bu delesyonun fonksiyonel analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Ekzon 7'de heterozigot g.9574_9599del26 (c.649_674del26), p.Met217fsTer (M217fsX) 26 bç'lik delesyonu ve ekzon 12'de heterozigot g.13698G>A (c.1372G>A) değişimiyle 458. pozisyondaki glisinin serin amino asidine dönüşümüne (G458S) sebep olan yanlış anlamlı mutasyonunu taşıyan olgu 8'in anne ve babasının incelenmesi sonucunda, mutasyonların farklı allellerde olduğu bulunmuştur. Literatürde daha önce bu birleşik heterozigotluk durumu rapor edilmemiştir.

SNX10 geninde bir olguda (olgu no: 2) heterozigot olarak bulunan g.80577C>G (c.531C>G) kesim bölgesi değişimi ilk kez bizim çalışmamızda elde edilen, literatürde daha önce yer almayan bir değişimdir. Bu değişimin fonksiyonel etkisinin başka yöntemler ile araştırılması gerekmektedir. Ayrıca *TCIRG1* geninde de heterozigot olarak bulunan olasılıkla benign R56W mutasyonu ile olan ilişkisi ve etkisi de araştırılmalıdır.

Gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışmamız az sayıda hastada sekiz genden sadece ikisi taranarak yapılmıştır. Hasta sayısının artırılması ve tüm ilişkili genlere bakılması popülasyondaki otozomal resesif osteopetrozis mutasyonları hakkında

daha bilgi verici olacaktır. Böylece hastalığın fenotip-genotip korelasyonu da daha ayrıntılı incelenebilecektir. Ayrıca tüm osteopetrozis vakalarının yaklaşık %25'i henüz tanımlanmayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir. Bu nedenle bu sekiz gen dışı yeni genlerin belirlenmesi de hastalığın oluş mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Çalışmamızda kullandığımız yöntem PZR tabanlı bir yöntem olduğundan büyük boyutlu yeniden düzenlemeleri gösteremediğinden MLPA, yeni nesil dizileme gibi yöntemlerle daha detaylı analiz edilmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

Aker, M., Rouvinski, A., Hashavia, S., Ta-Shma, A., Shaag, A., Zenvirt, S., Israel, S., Weintraub, M., Taraboulos, A., Bar-Shavit, Z. ve Elpeleg, O. An SNX10 mutation causes malignant osteopetrosis of infancy. *J Med Genet* 2012; 49(4): 221-226.

Al-Tamimi, Y. Z., Tyagi, A. K., Chumas, P. D. ve Crimmins, D. W. Patients with autosomal-recessive osteopetrosis presenting with hydrocephalus and hindbrain posterior fossa crowding. *J Neurosurg Pediatr* 2008; 1(1): 103-106.

Alper, O. M., Erengin, H., Manguoglu, A. E., Bilgen, T., Cetin, Z., Dedeoglu, N. ve Luleci, G. Consanguineous marriages in the province of Antalya, Turkey. *Ann Genet* 2004; 47(2): 129-138.

Balemans, W., Van Wesenbeeck, L. ve Van Hul, W. A clinical and molecular overview of the human osteopetroses. *Calcif Tissue Int* 2005; 77(5): 263-274.

Banco, R., Seifert, M. F., Marks, S. C., Jr. ve McGuire, J. L. Rickets and osteopetrosis: the osteosclerotic (oc) mouse. *Clin Orthop Relat Res* 1985; (201): 238-246.

Benichou, O., Cleiren, E., Gram, J., Bollerslev, J., de Vernejoul, M. C. ve Van Hul, W. Mapping of autosomal dominant osteopetrosis type II (Albers-Schonberg disease) to chromosome 16p13.3. *Am J Hum Genet* 2001; 69(3): 647-654.

Benichou, O. D., Laredo, J. D. ve de Vernejoul, M. C. Type II autosomal dominant osteopetrosis (Albers-Schonberg disease): clinical and radiological manifestations in 42 patients. *Bone* 2000; 26(1): 87-93.

Besbas, N., Draaken, M., Ludwig M., Deren, O., Orhan, D., Bilginer Y. ve Ozaltin F. A novel CLCN7 mutation resulting in a most severe form of autosomal recessive osteopetrosis. *Eur J Pediatr* (2009) 168:1449–1454.

Blair, H. C., Borysenko, C. W., Villa, A., Schlesinger, P. H., Kalla, S. E., Yaroslavskiy, B. B., Garcia-Palacios, V., Oakley, J. I. ve Orchard, P. J. In vitro differentiation of CD14 cells from osteopetrotic subjects: contrasting phenotypes

with TCIRG1, CLCN7, and attachment defects. *J Bone Miner Res* 2004; 19(8): 1329-1338.

Bliznetz, E. A., Tverskaya, S. M., Zinchenko, R. A., Abrukova, A. V., Savaskina, E. N., Nikulin, M. V., Kirillov, A. G., Ginter, E. K.vePolyakov, A. V. Genetic analysis of autosomal recessive osteopetrosis in Chuvashiya: the unique splice site mutation in TCIRG1 gene spread by the founder effect. *Eur J Hum Genet* 2009; 17(5): 664-672.

Bollerslev, J. Osteopetrosis. A genetic and epidemiological study. *Clin Genet* 1987; 31(2): 86-90.

Bollerslev, J. Autosomal dominant osteopetrosis: bone metabolism and epidemiological, clinical, and hormonal aspects. *Endocr Rev* 1989; 10(1): 45-67.

Bollerslev, J.veAndersen, P. E., Jr. Radiological, biochemical and hereditary evidence of two types of autosomal dominant osteopetrosis. *Bone* 1988; 9(1): 7-13.

Bollerslev, J.veAndersen, P. E., Jr. Fracture patterns in two types of autosomal-dominant osteopetrosis. *Acta Orthop Scand* 1989; 60(1): 110-112.

Borthwick, K. J., Kandemir, N., Topaloglu, R., Kornak, U., Bakkaloglu, A., Yordam, N., Ozen, S., Mocan, H., Shah, G. N., Sly, W. S.veKaret, F. E. A phenocopy of CAII deficiency: a novel genetic explanation for inherited infantile osteopetrosis with distal renal tubular acidosis. *J Med Genet* 2003; 40(2): 115-121.

Boyce, B. F. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res* 2013; 92(10): 860-867.

Boyle, W. J., Simonet, W. S.veLacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423(6937): 337-342.

Bravo, J., Karathanassis, D., Pacold, C. M., Pacold, M. E., Ellson, C. D., Anderson, K. E., Butler, P. J., Lavenir, I., Perisic, O., Hawkins, P. T., Stephens, L.veWilliams, R. L. The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Mol Cell* 2001; 8(4): 829-839.

Burr, D. B. Targeted and nontargeted remodeling. *Bone* 2002; 30(1): 2-4.

Chalhoub, N., Benachenhou, N., Rajapurohitam, V., Pata, M., Ferron, M., Frattini, A., Villa, A.veVacher, J. Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human. *Nat Med* 2003; 9(4): 399-406.

Chen, Y., Wu, B., Xu, L., Li, H., Xia, J., Yin, W., Li, Z., Shi, D., Li, S., Lin, S., Shu, X.vePei, D. A SNX10/V-ATPase pathway regulates ciliogenesis in vitro and in vivo. *Cell Res* 2012; 22(2): 333-345.

Cleiren, E., Benichou, O., Van Hul, E., Gram, J., Bollerslev, J., Singer, F. R., Beaverson, K., Aledo, A., Whyte, M. P., Yoneyama, T., deVernejoul, M. C.veVan Hul, W. Albers-Schonberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the CLCN7 chloride channel gene. *Hum Mol Genet* 2001; 10(25): 2861-2867.

Cotter, M., Connell, T., Colhoun, E., Smith, O. P.veMcMahon, C. Carbonic anhydrase II deficiency: a rare autosomal recessive disorder of osteopetrosis, renal tubular acidosis, and cerebral calcification. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005; 27(2): 115-117.

Coxon, F. P.veTaylor, A. Vesicular trafficking in osteoclasts. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(5): 424-433.

Crockett, J. C., Mellis, D. J., Shennan, K. I., Duthie, A., Greenhorn, J., Wilkinson, D. I., Ralston, S. H., Helfrich, M. H.veRogers, M. J. Signal peptide mutations in RANK prevent downstream activation of NF-kappaB. *J Bone Miner Res* 2011; 26(8): 1926-1938.

Cullen, P. J. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(7): 574-582.

Daniels, R. J., Peden, J. F., Lloyd, C., Horsley, S. W., Clark, K., Tufarelli, C., Kearney, L., Buckle, V. J., Doggett, N. A., Flint, J.veHiggs, D. R. Sequence, structure and pathology of the fully annotated terminal 2 Mb of the short arm of human chromosome 16. *Hum Mol Genet* 2001; 10(4): 339-352.

de Vernejoul, M. C. Sclerosing bone disorders. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008; 22(1): 71-83.

Del Fattore, A., Cappariello, A.veTeti, A. Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone* 2008; 42(1): 19-29.

Del Fattore, A., Peruzzi, B., Rucci, N., Recchia, I., Cappariello, A., Longo, M., Fortunati, D., Ballanti, P., Iacobini, M., Luciani, M., Devito, R., Pinto, R., Caniglia, M., Lanino, E., Messina, C., Cesaro, S., Letizia, C., Bianchini, G., Fryssira, H., Grabowski, P., Shaw, N., Bishop, N., Hughes, D., Kapur, R. P., Datta, H. K., Taranta, A., Fornari, R., Migliaccio, S.veTeti, A. Clinical, genetic, and cellular analysis of 49 osteopetrotic patients: implications for diagnosis and treatment. *J Med Genet* 2006; 43(4): 315-325.

Dozier, T. S., Duncan, I. M., Klein, A. J., Lambert, P. R.veKey, L. L., Jr. Otologic manifestations of malignant osteopetrosis. *Otol Neurotol* 2005; 26(4): 762-766.

Ducy, P., Schinke, T.veKarsenty, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000; 289(5484): 1501-1504.

El'chinova, G. I.veGinter, E. K. [Malecot's parameters of isolation by distance and the degrees of endogamy in three regions of the Chuvash Republic]. *Genetika* 2001; 37(5): 684-689.

Fasth, A.vePorras, O. Human malignant osteopetrosis: pathophysiology, management and the role of bone marrow transplantation. *Pediatr Transplant* 1999; 3 Suppl 1: 102-107.

Flanagan, A. M., Sarma, U., Steward, C. G., Vellodi, A.veHorton, M. A. Study of the nonresorptive phenotype of osteoclast-like cells from patients with malignant osteopetrosis: a new approach to investigating pathogenesis. *J Bone Miner Res* 2000; 15(2): 352-360.

Flores, C., de Vries, T. J., Moscatelli, I., Askmyr, M., Schoenmaker, T., Langenbach, G. E., Ehinger, M., Everts, V.veRichter, J. Nonablative neonatal bone marrow transplantation rapidly reverses severe murine osteopetrosis despite low-level engraftment and lack of selective expansion of the osteoclastic lineage. *J Bone Miner Res* 2010; 25(9): 2069-2077.

Frattini, A., Orchard, P. J., Sobacchi, C., Giliani, S., Abinun, M., Mattsson, J. P., Keeling, D. J., Andersson, A. K., Wallbrandt, P., Zecca, L., Notarangelo, L. D., Vezzoni, P.veVilla, A. Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat Genet* 2000; 25(3): 343-346.

Frattini, A., Pangrazio, A., Susani, L., Sobacchi, C., Mirolo, M., Abinun, M., Andolina, M., Flanagan, A., Horwitz, E. M., Mihci, E., Notarangelo, L. D., Ramenghi, U., Teti, A., Van Hove, J., Vujic, D., Young, T., Albertini, A., Orchard, P. J., Vezzoni, P.veVilla, A. Chloride channel *CLCN7* mutations are responsible for severe recessive, dominant, and intermediate osteopetrosis. *J Bone Miner Res* 2003; 18(10): 1740-1747.

Gerritsen, E. J., Vossen, J. M., Fath, A., Friedrich, W., Morgan, G., Padmos, A., Vellodi, A., Porras, O., O'Meara, A., Porta, F.veet al. Bone marrow transplantation for autosomal recessive osteopetrosis. A report from the Working Party on Inborn Errors of the European Bone Marrow Transplantation Group. *J Pediatr* 1994; 125(6 Pt 1): 896-902.

Ginter, E. K., Kirillov, A. G.veRogaev, E. I. [Autosomal-dominant osteopetrosis in Chuvashiy]. *Genetika* 2001; 37(8): 1152-1155.

Gram, J., Antonsen, S., Horder, M.veBollerslev, J. Elevated serum levels of creatine kinase BB in autosomal dominant osteopetrosis type II. *Calcif Tissue Int* 1991; 48(6): 438-439.

Guerrini, M. M., Sobacchi, C., Cassani, B., Abinun, M., Kilic, S. S., Pangrazio, A., Moratto, D., Mazzolari, E., Clayton-Smith, J., Orchard, P., Coxon, F. P., Helfrich, M. H., Crockett, J. C., Mellis, D., Vellodi, A., Tezcan, I., Notarangelo, L. D., Rogers, M. J., Vezzoni, P., Villa, A.veFrattini, A. Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia due to *TNFRSF11A* (RANK) mutations. *Am J Hum Genet* 2008; 83(1): 64-76.

Hattner, R., Epker, B. N.veFrost, H. M. Suggested sequential mode of control of changes in cell behaviour in adult bone remodelling. *Nature* 1965; 206(983): 489-490.

- Helfrich, M. H. Osteoclast diseases. *Microsc Res Tech* 2003; 61(6): 514-532.
- Helfrich, M. H. Osteoclast diseases and dental abnormalities. *Arch Oral Biol* 2005; 50(2): 115-122.
- Huffer, W. E. Morphology and biochemistry of bone remodeling: possible control by vitamin D, parathyroid hormone, and other substances. *Lab Invest* 1988; 59(4): 418-442.
- Janssens, K. ve Van Hul, W. Molecular genetics of too much bone. *Hum Mol Genet* 2002; 11(20): 2385-2393.
- Jefferies, K. C., Cipriano, D. J. ve Forgac, M. Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Arch Biochem Biophys* 2008; 476(1): 33-42.
- Johansson, M. K., de Vries, T. J., Schoenmaker, T., Ehinger, M., Brun, A. C., Fasth, A., Karlsson, S., Everts, V. ve Richter, J. Hematopoietic stem cell-targeted neonatal gene therapy reverses lethally progressive osteopetrosis in oc/oc mice. *Blood* 2007; 109(12): 5178-5185.
- Johnston, C. C., Jr., Lavy, N., Lord, T., Vellios, F., Merritt, A. D. ve Deiss, W. P., Jr. Osteopetrosis. A clinical, genetic, metabolic, and morphologic study of the dominantly inherited, benign form. *Medicine (Baltimore)* 1968; 47(2): 149-167.
- Kapinas, K. ve Delany, A. M. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res Ther* 2011; 13(3): 220.
- Karkucak, M., Hafizoğlu, D., Sağ, Ş. Ö., Başaranoğlu, S. T., Görükmez, O., Kılıç, Ş. S., Gülten, T., Yakut, T., Kimya, Y. ve Gül D. Prenatal Diagnosis in a Family of TNFRSF11A (RANK) Gene Mutation Detection: A Case Report. *The Journal of Current Pediatrics* 2014; 2: 123-6
- Khosla, S. ve Riggs, B. L. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005; 34(4): 1015-1030, xi.
- Klein-Nulend, J., van der Plas, A., Semeins, C. M., Ajubi, N. E., Frangos, J. A., Nijweide, P. J. ve Burger, E. H. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J* 1995; 9(5): 441-445.

Kodama, H., Yamasaki, A., Abe, M., Niida, S., Hakeda, Y. & Kawashima, H. Transient recruitment of osteoclasts and expression of their function in osteopetrotic (op/op) mice by a single injection of macrophage colony-stimulating factor. *J Bone Miner Res* 1993; 8(1): 45-50.

Kong, Y. Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H. L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A. J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Mak, T. W., Boyle, W. J. & Penninger, J. M. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397(6717): 315-323.

Kornak, U., Kasper, D., Bosl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G. & Jentsch, T. J. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 2001; 104(2): 205-215.

Kornak, U., Schulz, A., Friedrich, W., Uhlhaas, S., Kremens, B., Voit, T., Hasan, C., Bode, U., Jentsch, T. J. & Kubisch, C. Mutations in the $\alpha 3$ subunit of the vacuolar H(+)-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis. *Hum Mol Genet* 2000; 9(13): 2059-2063.

Lacey, D. L., Boyle, W. J., Simonet, W. S., Kostenuik, P. J., Dougall, W. C., Sullivan, J. K., San Martin, J. & Dansey, R. Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11(5): 401-419.

Lange, P. F., Wartosch, L., Jentsch, T. J. & Fuhrmann, J. C. ClC-7 requires Ostm1 as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature* 2006; 440(7081): 220-223.

Li, Y. P., Chen, W., Liang, Y., Li, E. & Stashenko, P. Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat Genet* 1999; 23(4): 447-451.

Long, F. & Ornitz, D. M. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(1): a008334.

Manolagas, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21(2): 115-137.

Manolson, M. F., Yu, H., Chen, W., Yao, Y., Li, K., Lees, R. L.veHeersche, J. N. The $\alpha 3$ isoform of the 100-kDa V-ATPase subunit is highly but differentially expressed in large (≥ 10 nuclei) and small (≤ 10 nuclei) osteoclasts. *J Biol Chem* 2003; 278(49): 49271-49278.

Marks, S. C., Jr.veWalker, D. G. The hematogenous origin of osteoclasts: experimental evidence from osteopetrotic (microphthalmic) mice treated with spleen cells from beige mouse donors. *Am J Anat* 1981; 161(1): 1-10.

Marquis, M. E., Lord, E., Bergeron, E., Drevelle, O., Park, H., Cabana, F., Senta, H.veFaucheux, N. Bone cells-biomaterials interactions. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; 14: 1023-1067.

Mazzolari, E., Forino, C., Razza, A., Porta, F., Villa, A.veNotarangelo, L. D. A single-center experience in 20 patients with infantile malignant osteopetrosis. *Am J Hematol* 2009; 84(8): 473-479.

McMahon, C., Will, A., Hu, P., Shah, G. N., Sly, W. S.veSmith, O. P. Bone marrow transplantation corrects osteopetrosis in the carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Blood* 2001; 97(7): 1947-1950.

Megarbane, A., Pangrazio, A., Villa, A., Chouery, E., Maarawi, J., Sabbagh, S., Lefranc, G.veSobacchi, C. Homozygous stop mutation in the SNX10 gene in a consanguineous Iraqi boy with osteopetrosis and corpus callosum hypoplasia. *Eur J Med Genet* 2013; 56(1): 32-35.

Michigami, T., Kageyama, T., Satomura, K., Shima, M., Yamaoka, K., Nakayama, M.veOzono, K. Novel mutations in the $\alpha 3$ subunit of vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase in a Japanese patient with infantile malignant osteopetrosis. *Bone* 2002; 30(2): 436-439.

Moscatelli, I., Thudium, C. S., Flores, C., Schulz, A., Askmyr, M., Gudmann, N. S., Andersen, N. M., Porras, O., Karsdal, M. A., Villa, A., Fasth, A., Henriksen,

K. Richter, J. Lentiviral gene transfer of TCIRG1 into peripheral blood CD34(+) cells restores osteoclast function in infantile malignant osteopetrosis. *Bone* 2013; 57(1): 1-9.

Mulari, M. T., Qu, Q., Harkonen, P. L. & Vaananen, H. K. Osteoblast-like cells complete osteoclastic bone resorption and form new mineralized bone matrix in vitro. *Calcif Tissue Int* 2004; 75(3): 253-261.

Neutzky-Wulff, A. V., Sorensen, M. G., Kocijancic, D., Leeming, D. J., Dziegiel, M. H., Karsdal, M. A. & Henriksen, K. Alterations in osteoclast function and phenotype induced by different inhibitors of bone resorption--implications for osteoclast quality. *BMC Musculoskelet Disord* 2010; 11: 109.

Neve, A., Corrado, A. & Cantatore, F. P. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res* 2011; 343(2): 289-302.

Noble, B. Bone microdamage and cell apoptosis. *Eur Cell Mater* 2003; 6: 46-55; discussion 55.

Ogbureke, K. U., Zhao, Q. & Li, Y. P. Human osteopetroses and the osteoclast V-H⁺-ATPase enzyme system. *Front Biosci* 2005; 10: 2940-2954.

Palagano, E., Blair, H. C., Pangrazio, A., Tourkova, I., Strina, D., Angius, A., Cuccuru, G., Oppo, M., Uva, P., Van Hul, W., Boudin, E., Superti-Furga, A., Faletta, F., Nocerino, A., Ferrari, M. C., Grappiolo, G., Monari, M., Montanelli, A., Vezzoni, P., Villa, A. & Sobacchi, C. Buried in the Middle but Guilty: Intronic Mutations in the TCIRG1 Gene Cause Human Autosomal Recessive Osteopetrosis. *J Bone Miner Res* 2015; 30(10): 1814-1821.

Pangrazio, A., Caldana, M. E., Lo Iacono, N., Mantero, S., Vezzoni, P., Villa, A. & Sobacchi, C. Autosomal recessive osteopetrosis: report of 41 novel mutations in the TCIRG1 gene and diagnostic implications. *Osteoporos Int* 2012; 23(11): 2713-2718.

Pangrazio, A., Caldana, M. E., Sobacchi, C., Panaroni, C., Susani, L., Mihci, E., Cavaliere, M. L., Giliani, S., Villa, A. & Frattini, A. Characterization of a novel Alu-

Alu recombination-mediated genomic deletion in the TCIRG1 gene in five osteopetrotic patients. *J Bone Miner Res* 2009; 24(1): 162-167.

Pangrazio, A., Fath, A., Sbardellati, A., Orchard, P. J., Kasow, K. A., Raza, J., Albayrak, C., Albayrak, D., Vanakker, O. M., De Moerloose, B., Vellodi, A., Notarangelo, L. D., Schlack, C., Strauss, G., Kuhl, J. S., Caldana, E., Lo Iacono, N., Susani, L., Kornak, U., Schulz, A., Vezzoni, P., Villa, A.veSobacchi, C. SNX10 mutations define a subgroup of human autosomal recessive osteopetrosis with variable clinical severity. *J Bone Miner Res* 2013; 28(5): 1041-1049.

Parfitt, A. M. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994; 55(3): 273-286.

Parfitt, A. M. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002; 30(1): 5-7.

Phadke, S. R., Fischer, B., Gupta, N., Ranganath, P., Kabra, M.veKornak, U. Novel mutations in Indian patients with autosomal recessive infantile malignant osteopetrosis. *Indian J Med Res* 2010; 131: 508-514.

Phadke, S. R., Gupta, A., Pahi, J., Pandey, A., Gautam, P.veAgarwal, S. S. Malignant recessive osteopetrosis. *Indian Pediatr* 1999; 36(1): 69-74.

Raisz, L. G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 1999; 45(8 Pt 2): 1353-1358.

Roodman, G. D. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999; 27(8): 1229-1241.

Scimeca, J. C., Quincey, D., Parrinello, H., Romatet, D., Grosgeorge, J., Gaudray, P., Philip, N., Fischer, A.veCarle, G. F. Novel mutations in the TCIRG1 gene encoding the $\alpha 3$ subunit of the vacuolar proton pump in patients affected by infantile malignant osteopetrosis. *Hum Mutat* 2003; 21(2): 151-157.

Seet, L. F.veHong, W. The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761(8): 878-896.

Segovia-Silvestre, T., Neutzsky-Wulff, A. V., Sorensen, M. G., Christiansen, C., Bollerslev, J., Karsdal, M. A.veHenriksen, K. Advances in osteoclast biology resulting from the study of osteopetrotic mutations. *Hum Genet* 2009; 124(6): 561-577.

Shah, G. N., Bonapace, G., Hu, P. Y., Strisciuglio, P., ve Sly W. S. Carbonic Anhydrase II Deficiency Syndrome (Osteopetrosis with Renal Tubular Acidosis and Brain Calcification): Novel Mutations in CAII Identified by Direct Sequencing Expand the Opportunity for Genotype-Phenotype Correlation. *Mutation in Brief #737* (2004) Online

Shin, Y. J. Chloride channel CICN7 mutations in a Korean patient with infantile malignant osteopetrosis initially presenting with neonatal thrombocytopenia. *J Perinatol* 2004; 24(5): 312-314.

Sly, W. S., Hewett-Emmett, D., Whyte, M. P., Yu, Y. S.veTashian, R. E. Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(9): 2752-2756.

Sly, W. S., Whyte, M. P., Sundaram, V., Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D., Guibaud, P., Vainsel, M., Baluarte, H. J., Gruskin, A., Al-Mosawi, M.veet al. Carbonic anhydrase II deficiency in 12 families with the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *N Engl J Med* 1985; 313(3): 139-145.

Sobacchi, C., Frattini, A., Guerrini, M. M., Abinun, M., Pangrazio, A., Susani, L., Bredius, R., Mancini, G., Cant, A., Bishop, N., Grabowski, P., Del Fattore, A., Messina, C., Errigo, G., Coxon, F. P., Scott, D. I., Teti, A., Rogers, M. J., Vezzoni, P., Villa, A.veHelfrich, M. H. Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nat Genet* 2007; 39(8): 960-962.

Sobacchi, C., Frattini, A., Orchard, P., Porras, O., Tezcan, I., Andolina, M., Babul-Hirji, R., Baric, I., Canham, N., Chitayat, D., Dupuis-Girod, S., Ellis, I., Etzioni, A., Fath, A., Fisher, A., Gerritsen, B., Gulino, V., Horwitz, E., Klamroth, V., Lanino, E., Mirolo, M., Musio, A., Matthijs, G., Nonomaya, S., Notarangelo, L. D., Ochs, H.

D., Superti Furga, A., Valiaho, J., van Hove, J. L., Vihinen, M., Vujic, D., Vezzoni, P.veVilla, A. The mutational spectrum of human malignant autosomal recessive osteopetrosis. *Hum Mol Genet* 2001; 10(17): 1767-1773.

Sobacchi, C., Pangrazio, A., Lopez, A. G., Gomez, D. P., Caldana, M. E., Susani, L., Vezzoni, P.veVilla, A. As little as needed: the extraordinary case of a mild recessive osteopetrosis owing to a novel splicing hypomorphic mutation in the TCIRG1 gene. *J Bone Miner Res* 2014; 29(7): 1646-1650.

Sobacchi, C., Schulz, A., Coxon, F. P., Villa, A.veHelfrich, M. H. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9(9): 522-536.

Stark, Z.veSavarirayan, R. Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis* 2009; 4: 5.

Stevens, T. H.veForgac, M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13: 779-808.

Susani, L., Pangrazio, A., Sobacchi, C., Taranta, A., Mortier, G., Savarirayan, R., Villa, A., Orchard, P., Vezzoni, P., Albertini, A., Frattini, A.vePagani, F. TCIRG1-dependent recessive osteopetrosis: mutation analysis, functional identification of the splicing defects, and in vitro rescue by U1 snRNA. *Hum Mutat* 2004; 24(3): 225-235.

Takahashi, H., Epker, B.veFrost, H. M. Resorption Precedes Formative Activity. *Surg Forum* 1964; 15: 437-438.

Taranta, A., Migliaccio, S., Recchia, I., Caniglia, M., Luciani, M., De Rossi, G., Dionisi-Vici, C., Pinto, R. M., Francalanci, P., Boldrini, R., Lanino, E., Dini, G., Morreale, G., Ralston, S. H., Villa, A., Vezzoni, P., Del Principe, D., Cassiani, F., Palumbo, G.veTeti, A. Genotype-phenotype relationship in human ATP6i-dependent autosomal recessive osteopetrosis. *Am J Pathol* 2003; 162(1): 57-68.

Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S.veIkeda, K. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab* 2007; 5(6): 464-475.

Teasdale, R. D.veCollins, B. M. Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease. *Biochem J* 2012; 441(1): 39-59.

Tolar, J., Teitelbaum, S. L.veOrchard, P. J. Osteopetrosis. *N Engl J Med* 2004; 351(27): 2839-2849.

Tran Van, P., Vignery, A.veBaron, R. An electron-microscopic study of the bone-remodeling sequence in the rat. *Cell Tissue Res* 1982; 225(2): 283-292.

Van Wesenbeeck, L., Cleiren, E., Gram, J., Beals, R. K., Benichou, O., Scopelliti, D., Key, L., Renton, T., Bartels, C., Gong, Y., Warman, M. L., De Vernejoul, M. C., Bollerslev, J.veVan Hul, W. Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am J Hum Genet* 2003; 72(3): 763-771.

Van Wesenbeeck, L., Odgren, P. R., Coxon, F. P., Frattini, A., Moens, P., Perdu, B., MacKay, C. A., Van Hul, E., Timmermans, J. P., Vanhoenacker, F., Jacobs, R., Peruzzi, B., Teti, A., Helfrich, M. H., Rogers, M. J., Villa, A.veVan Hul, W. Involvement of PLEKHM1 in osteoclastic vesicular transport and osteopetrosis in incisors absent rats and humans. *J Clin Invest* 2007; 117(4): 919-930.

Villa, A., Guerrini, M. M., Cassani, B., Pangrazio, A.veSobacchi, C. Infantile malignant, autosomal recessive osteopetrosis: the rich and the poor. *Calcif Tissue Int* 2009; 84(1): 1-12.

Wada, K., Harada, D., Michigami, T., Tachikawa, K., Nakano, Y., Kashiwagi, H., Yamashita, S., Sano, T.veSeino, Y. A case of autosomal dominant osteopetrosis type II with a novel TCIRG1 gene mutation. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2013; 26(5-6): 575-577.

Waguespack, S. G., Hui, S. L., Dimeglio, L. A.veEcons, M. J. Autosomal dominant osteopetrosis: clinical severity and natural history of 94 subjects with a chloride channel 7 gene mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(3): 771-778.

Wilson, C. J.veVellodi, A. Autosomal recessive osteopetrosis: diagnosis, management, and outcome. *Arch Dis Child* 2000; 83(5): 449-452.

Worby, C. A.veDixon, J. E. Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(12): 919-931.

Ye, L., Morse, L. R.veBattaglini, R. A. Snx10: a newly identified locus associated with human osteopetrosis. *IBMS Bonekey* 2013; 2013(10).

Yu, J. W.veLemmon, M. A. All phox homology (PX) domains from *Saccharomyces cerevisiae* specifically recognize phosphatidylinositol 3-phosphate. *J Biol Chem* 2001; 276(47): 44179-44184.

Yuan, P., Yue, Z., Sun, L., Huang, W., Hu, B., Yang, Z., Hu, Y., Xiao, H., Shi, H., Zhou, Q.veWang, Y. Novel mutation of TCIRG1 and clinical pictures of two infantile malignant osteopetrosis patients. *J Bone Miner Metab* 2011; 29(2): 251-256.

Zhu, G. H., Qin, M. Q., Wang, B., Zhou, X., Yang, J., Jia, C. G., Wu, Y., Wang, X. S.veWu, M. Y. [Allogeneic stem cell transplantation for 8 patients with malignant infantile osteopetrosis in China]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2012; 50(11): 807-812.



EKLER

EK-1

Aydınlatılmış Onam Formu

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

a. Araştırmanın Adı:

Osteopetrozis tanılı hastalarda *TCIRG1* ve *SNX10* gen mutasyonlarının araştırılması

b. Araştırmanın İçeriği:

c. Araştırmanın Amacı:

Bu çalışmanın amacı malignant otozomal resesif osteopetrozisin yaklaşık %50'sinden sorumlu *TCIRG1* ve yeni çalışılmaya başlayan *SNX10* gen mutasyonlarının araştırılmasıdır. Nadir görülen bu hastalık ile ilgili genetik danışmanın verilebilmesi için bu hastalığa neden olan genlerin mutasyonlarının toplumumuz açısından bilinmesi ve hastalığın genetik etiyojisi açısından literatüre katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

d. Araştırmanın Nedeni:

() Bilimsel araştırma

(X) Tez çalışması

e. Araştırmanın Öngörülen Süresi: Satın alma işlemleri tamamlandıktan sonra 1 yıl.

f. Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı: 12 olgu.

g. Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler:

-Örneklerden DNA izolasyonu

-Araştırılacak genlere özgül tasarlanan primerlerle ilgili genlerin amplifikasyonu (PCR yöntemi ile)

-Amplifiye edilen bölgelerin DNA dizi analizi

2. Gönüllünün/Katılımcının Uygulama Sırasında Karşılaşabileceği Riskler ve Rahatsızlıklar:

Yukarıda açıklanan araştırma sırasında uygulanacak olan işlemlerin bana aşağıda belirtilen riskleri ve rahatsızlıkları getirebileceğinin bilincindeyim:

Diğer kan alma işlemlerinde olduğu gibi kan alınan yerde kızarma, şişme ve ağrı oluşabilir. Bunun dışında girişimsel bir işlem yapılmayacağı için herhangi bir risk veya zarar yoktur.

2. Gönüllüler/Katılımcılar İçin Araştırmadan Beklenen Yarar:

Osteopetrozis klinik özellikleri taşıyan olgularda hastalığın genetik etiolojisinin aydınlatılması.

4. Araştırma Konusundaki Soruların Cevaplandırılması:

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile haklarım konusunda bilgi almak için aşağıda belirtilen kişiyle bağlantı kurmam yeterli olacaktır.

5. Zararların Karşılanması:

Bu çalışmaya katıldığım için zarar göreceğim olursam, gerekli olan tıbbi bakımın sorumlu araştırmacı tarafından yerine getirileceği, uygulanan işleme bağlı olarak gelişebilecek her tür hasara (sakatlanma ve ölüm dahil) karşı güvencede olduğum, masraflarımıntarafından karşılanacağı bana bildirildi.

6. Araştırma Giderleri:

Araştırma kapsamındaki bütün işlemler için benden ya da bağlı olduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

7. Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma:

- Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.
- Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.
- Sorumlu araştırmacıya haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

d. Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle ya da araştırma prosedürüne bağlı olarak onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

8. Gizlilik:

Çalışma süresince tutulan bütün kayıtlar ve dosya bilgileri gerektiğinde,firması ve yöneticilerine ulaştırılacaktır. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler, verilere gereksinimi olan öteki ülkelerin hükümetlerine ve ilgili birimlerine iletilebilir. Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

9. Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye / katılımcıya verilmesi gereken bilgileri gösteren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün / katılımcının Adı- Soyadı:

Yaş ve Cinsiyeti:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacının Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı- Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gamze	Uyruğu	T.C.
Soyadı	KOÇAK	Tel no	+90 541 846 5949
Doğum tarihi	26.05.1992	e-posta	gamzekocak@akdeniz.edu.tr

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Muratpaşa Lisesi	2010
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi (Moleküler Biyoloji ve Genetik)	2014
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi (Tıbbi Genetik)	2017
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2015-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	68.75

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
“OSTEOPETROZİS TANILI HASTALARDA <i>TCIRG1</i> VE <i>SNX10</i> GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI” AU BAP TYL-2016-965.	Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)	1.5 yıl

Yayınlar ve Bildiriler:

The European Society of Human Genetics-MAY 27–30, 2017

“A novel mutation in *TCIRG1* gene in a Turkish patient with malignant autosomal recessive osteopetrosis” Poster Sunumu