

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**OSTEOGENEZİS İMPERFEKTA HASTALARINDA YENİ NESİL
DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN TARANMASI VE
BİLİNMEYEN GENLERİN ARAŞTIRILMASI**

LEYLA ELKANOVA

**DANIŞMAN
PROF. DR. BEYHAN TÜYSÜZ**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

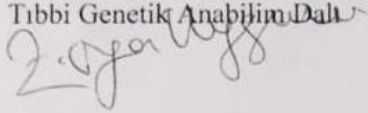
DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Doktora öğrencisi Leyla ELKANNOVA tarafından Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ'ün danışmanlığında hazırlanan "Osteogenezis İmperfekta Hastalarında Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi İle İlişkili Genlerin Taranması ve Bilinmeyen Genlerin Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 05.08.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

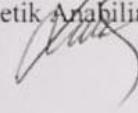
Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ
İ.Ü. Cerrahpaşa Çocuk Sağ. ve Has. A.D.
Genetik B.D.



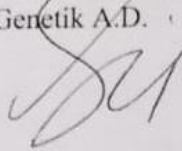
Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı



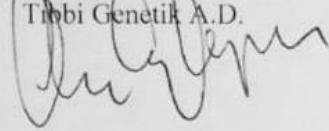
Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Doç. Dr. Güzde YEŞİL
Bezmialem V. Üniversitesi Tıp Fak.
Tıbbi Genetik A.D.



Prof. Dr. Okay ÇAĞLAYAN
İstanbul Bilim Üniversitesi
Tıbbi Genetik A.D.



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, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Leyla Elkanova



İTHAF

Zamansız kaybettiğim kuzenim **Raşid'e**

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca sonsuz katkı ve desteğini esirgemeyen, en zor zamanlarımda hep yanımda olan, bana destek veren değerli hocam Prof. Dr. Beyhan Tüysüz'e

Tez çalışmalarım boyunca birlikte çalışma fırsatı yakaladığım, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım İstanbul Üniversitesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Z. Oya Uyguner'e ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı başkanı Doç. Dr. Gözde Yeşil'e

Eğitimim boyunca hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, her zaman destekleyen, her birinin ayrı ayrı emeği olan tüm Çocuk Genetik Anabilim Dalı çalışanları Dr. Dilek Uludağ, Elif Yılmaz, Buşra Kasap, İbrahim Bayrak, Emir Keresteci ve Elif Şenel'e

Türkiye'de bulunduğum zaman zarfında her daim yanımda olup, desteklerini her zaman hissettiğim dostlarım Asuman Çelebi, Ceren Orhan, Yeşim Kesim'e

Ömür boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme

Sonsuz teşekkürler ederim.



Bu alışma, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: 17S278, Proje Başlığı:
Osteogenezis İmperfekta Hastalarında Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi İle İlişkili Genlerin
Taranması Ve Bilinmeyen Genlerin Araştırılması

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BEYAN	3
İTHAF	4
TEŞEKKÜR	5
İÇİNDEKİLER.....	7
TABLolar LİSTESİ	10
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	11
1. GİRİŞ VE AMAÇ	18
2. GENEL BİLGİLER.....	21
2.1. KEMİK YAPISI	21
1.1.1.KEMİK YAPISI	21
1.1.1.1.OSTEOBLAST	21
1.1.1.2.OSTEOSİTLER.....	22
1.1.1.3.OSTEOKLASTLAR	22
1.1.2. İNORGANİK MATRİKS VE KEMİK METABOLİZMASININ DÜZENLENMESİ	22
1.1.2.1.PARATİROİD HORMONU (PTH).....	23
1.1.2.2.KALSİTONİN.....	23
1.1.2.3. D VİTAMİNİ	23
1.1.2.4. DİĞER FAKTÖRLER	23
2.2. KEMİĞİN YENİDEN DÜZENLENMESİ	23
1.2.1.KEMİK YENİDEN DÜZENLENMESİNİN REGÜLASYONU	25
1.2.1.1.Insulin-like Growth Factor I ve II (IGF1 & IGFII)	25
1.2.1.2.Transforming Büyüme faktörü-beta (TGFβ) ve Kemik morfogolik proteini (BMP)	25
1.2.1.3.TROMBOSİT KAYNAKLI BÜYÜME FAKTÖRÜ (PDGF).....	25
1.2.1.4.FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ (FGF)	25
2.3. ORGANİK MATRİKS.....	26
2.3.1. KOLLAJEN tip 1 proteininin yapısı	26
2.3.2. TİP 1 KOLLAJENİN SENTEZİ VE TRANSLASYON SONRASI MODİFİKASYONU (OLGUNLAŞMASI VE ŞEKİLLENMESİ).....	27

2.3.2.1. KOLLAJEN TIP I BİYOSENTEZİNE GENEL BAKIŞ.....	27
2.3.3. TRANSLASYON SONRASI MODİFİKASYON (CRTAP/P3H1/PIIB)	30
2.3.4. KOLLAJEN ÇAPRAZ BAĞLARI OLUŞTURMASINDA VE KATLANMASINDAKİ GÖREVLİ PROTEİN	30
2.3.4.1. SERPINH1	30
2.3.4.2. FKBP10.....	30
2.3.4.3. PLOD2.....	30
2.3.5. KOLLAJENİN İŞLENMESİ /KESİLMESİNDE BMP1 DEFEKTLERİ.....	31
2.3.5.1. BMP1.....	31
2.3.6. OSTEOLAST GELİŞİMİ VE İŞLEVİNDEKİ DEFEKTLER.....	31
2.3.6.1. SP7.....	31
2.3.6.2. WNT1.....	32
2.3.6.1. SPARC	32
2.3.7. ENDOPLAZMİK RETİKULUM İLİŞKİLİ PROTEİNLER.....	33
2.3.7.1. CREB3L1	33
2.3.7.2. MBTPS2.....	33
2.3.7.3. TMEM38B	33
2.3.8. KEMİK MİNERALİZASYONUNDA DEFEKTLER (IFITM5 ve SERPINF1)	33
2.3.8.1. IFITM5	33
2.3.8.2. SERPINF1	33
2.3.8.3. SEC24D.....	34
2.3.8.4. P4HB	34
2.3.1. OSTEONEZİS İMPERFEKTA'NIN SINIFLANDIRILMASI.....	34
2.3.2. Oİ'DE KEMİĞİN PATOLOJİSİ.....	36
2.4. OSTEONEZİS İMPERFEKTANIN PATOGENEZİ	37
2.4.1. KOLLAJEN MOLEKÜLÜNDE DEFEKTLER	37
2.4.1.1. COL1A1 ve COL1A2 GEN MUTASYONLARI VE GENOTİP/FENOTİP İLİŞKİSİ.....	37
2.4.2. KEMİK MİNERALİZASYONUNDA DEFEKTLER.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	52
3.1.1. KLİNİK DEĞERLENDİRMELER.....	52
3.1.2. MOLEKÜLER YÖNTEMLER.....	54
3.1.2.1. DNA ELDESİ.....	54

3.1.2.2. <i>COL1A1</i> ve <i>COL1A2</i> Genlerin Yeni Nesil Dizileme Tabanlı Taranması.....	56
3.1.2.3. Yeni Nesil Dizileme Tabanlı Panel-Gen Testi	63
3.1.2.4. YND İLE SAPTANAN DEĞİŞİMLERİN SANGER DİZİLEME İLE DOĞRULANMASI.....	65
3.1.2.5. MLPA ÇALIŞMASI.	69
3.1.2.6. TÜM EKZOM DİZİLEME ISLAK VE VE KURU LABORATUAR ÇALIŞMALARI.....	71

4.

.....	73
4.1.1. <i>COL1A2</i> GEN MUTASYONU OLAN HASTALAR.....	96
4.1.2. OTOZOMAL RESESİF TIPLERDE AİLE AĞACI VE SANGER ANALİZİNE ÖRNEKLER.....	100
TARTIŞMA.....	106
KAYNAKLAR.....	115
ETİK KURUL KARARI.....	123
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	124
ÖZGEÇMİŞ.....	125

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Osteogenezis imperfektaya neden olan genler, kalıtım şekli ve kliniğin ağırlığı	41
Tablo 3-1: <i>COL1A1</i> geni tüm ekzonlarını içeren primer dizileri ve PZR ürün boyutları	57
Tablo 3-2: <i>COL1A2</i> geni tüm ekzonlarını içeren primer dizileri ve PZR ürün boyutları	58
Tablo 3-3: PZR Thermal Döngü Programı	61
Tablo 3-4 : Panel-gen testinde yer alan genler, ilişkili Oİ fenotipleri, kalıtım paternleri.....	63
Tablo 3-5: PZR Termal Döngü Programı	66
Tablo 4-1. <i>COL1A1</i> ve <i>COL1A2</i> mutasyon tipi ile Oİ klinik tipin ilişkisi	104
Tablo 4-2: Otozomal resesif genlerde mutasyon tipi ile Oİ klinik tipin ilişkisi.....	105

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1-1: Kemiğin yeniden düzenlenmesi (13).....	24
Şekil 1-2 FGFR1-3'ün osteoblast farklılaşmasındaki rolü (17). <i>FGFR3'ün osteogenez üzerindeki etkisi belirsizdir (noktalı çizgilerle işaretlenmiştir.)</i>	26
Şekil 1-3. Tip I kollajenin yapısı (18). Tip I kollajen iki pro- α 1 ve pro- α 2 zincirinden oluşur. Her biri tekrarlanan Gly-X-Y üçüzlerini içeren 1014 amino asidin büyüklüğünde 'üçlü sarmal' yapısındadır. Heliks yapısı kesintisiz Gly-Xaa-Yaa tripletlerden oluşur, X genellikle proline ve Y hidroksiprolin olmak üzere, iki ucunda kısa N- ve C-propeptid bölgeleri içermektedir. Her alfa zinciri boyunca, majör ligand bağlanma bölgeleri (MLBR) olarak bilinen diğer kollajen molekülleri veya hücre dışı matris proteinleri ile etkileşimi için önemli olan bölgeler bulunmaktadır.....	27
Şekil 1-4. Kollajen tip I biyosentezine genel bakış (FS Van Dijk1 ve DO Sillence, 2014)...	29
Şekil 1-5. Tip I Kollajen Biyosentezindeki aşamalar (18).	31
Şekil 1-6. Osteogenezis imperfekta'da kemik oluşumu ve mineralizasyonun düzenlenmesi.	32
Şekil 1-7. Farklı klinik fenotipler prokollajen tip I proteini boyunca belirli pozisyonlardaki mutasyonlarla ilişkilidir.....	40
Şekil 2-1. Varyanta ulaşmak için izlenen iş akışı.....	71
Şekil 4-1. Mutasyon sıklığının genlere göre dağılımı	73
Şekil 4-2. <i>COL1A1</i> geninde varyantların dağılımı.....	82
Şekil 4-3. <i>COL1A2</i> geninde varyantların dağılımı.....	82
Şekil 4-4. Aile ağacı, indeks II'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.1128delT (p.Gly377AlafsTer164).	83
Şekil 4-5. Aile ağacı, indeks II'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.2299G>A (p.Gly767Ser) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması;	83
Şekil 4-6. Aile ağacı, indeks II-1'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.959G>T (p.Gly320Val) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba I-1'de ve anne I-2'da mutasyon saptanmadı.....	84
Şekil 4-7. Aile ağacı, indeks III-3'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.2471G>C (p.Gly824Ala) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-3'de ve anne II-4'da mutasyon saptanmadı.....	84

Şekil 4-8. Aile ağacı, indeks III-3'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.607G>C (p.Gly203Arg) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-1'de ve anne II-2'da mutasyon saptanmadı.....	85
Şekil 4-9 Aile ağacı, indeks IV-3'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.588+1G>A (IVS7 ds G-A +1) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba III-3'de ve anne III-18'da mutasyon saptanmadı.....	85
Şekil 3-10 Aile ağacı, indeks III-1'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.3531+1G>A (IVS 48 ds G-A +1) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-3'de ve anne II-4'de mutasyon saptanmadı.....	86
Şekil 4-11 Aile ağacı, indeks IV-1'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.608G>T (p.Gly203Val) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba III-7'de ve anne III-10'de mutasyon saptanmadı.....	86
Şekil 4-12 Aile ağacı, indeks III-3'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.2340_2343+delCAAGGTGA heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Anne II-4'de ve baba II-5'de mutasyon saptanmadı.....	87
Şekil 4-13. Aile ağacı, indeks IV-2 ve IV-3'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.2715 delC (p.Gly906Alafs*202) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba III-1'de yabancı, anne III-3'de mutasyon saptandı.	87
Şekil 4-14. Aile ağacı, indeks III-5'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.1930-1G>T heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-5'de yabancı, anne II-4'de mutasyon saptandı....	88
Şekil 4-15. Aile ağacı, indeks V-1'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.3076G>T (p.Arg1026Ter) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Anne IV-1'de mutasyon saptanmadı.	88
Şekil 4-16. Aile ağacı, indeks III-4'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.1792C>T (p.Arg598Term) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-6'de mutasyon saptandı, Anne II-7'de bu variant gözlenmedi.	89
Şekil 4-17. Aile ağacı, indeks III-5'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.4391T>C (p.Leu1464Pro) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-1'de ve Anne II-4'de bu variant gözlenmedi.	89
Şekil 4-18. Aile ağacı, indeks III-4'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.3505G>A (p.G1169S) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması.	90
Şekil 4-19 Aile ağacı, indeks V-1'de saptanan <i>COL1A1</i> : IVS2-1G>C (c.299-1G>C) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Mutasyonun Anne IV-1'den kalıtıldığı gösterildi. Baba IV-5'de bu variant gözlenmedi.	90

Şekil 4-20. Aile ağacı, indeks III-5'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.1128delT (p.Gly377AlafsTer164) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Mutasyonu III-2, III-4 kardeşlerinde taşıyıcılığı gösterildi.	91
Şekil 4-21. Aile ağacı, indeks II-1'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.237G>A (p.Asp1413Asn) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba I-1'de ve anne I-2'de mutasyon saptanmadı.....	91
Şekil 4-22. Aile ağacı, indeks III-4'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.1155+1G>C heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Anne II-6'de ve baba II-8'de mutasyon saptanmadı.	92
Şekil 4-23. Aile ağacı, indeks III-3'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.2299G>A (p.Gly767Ser) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması.	92
Şekil 4-24. Aile ağacı, indeks IV-1'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.814G>T (p.Gly272Cys) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Anne III-4'de saptanan mutasyon, baba III-3'de gözlenmedi.	93
Şekil 4-25. Aile ağacı, indeks III-2'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.1012G>C (p.Gly338Arg) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-1'de mutasyon saptandı, Anne II-4'de bu variant gözlenmedi.	93
Şekil 4-26. Aile ağacı, indeks IV-1'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.1155+3_1155+6delAAGT heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba III-2'de mutasyon saptandı.....	94
Şekil 4-27. Aile ağacı, indeks IV-1'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.2854C>T (p.Gln952Ter) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-6'de ve anne II-11'de mutasyon saptanmadı.....	94
Şekil 4-28. Aile ağacı, indeks II-1'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.770G>T (p.Gly257Val) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Baba I-1'de ve Anne I-2'de mutasyon saptanmadı.....	95
Şekil 4-29. Aile ağacı, indeks II-4'de saptanan <i>COL1A1</i> : c.613C>G (p.Pro205Ala) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması.	95
Şekil 4-30 Aile ağacı, indeks II-3'de saptanan <i>COL1A2</i> : c.2252G>T (p.Gly751Val) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba I-1'de ve anne I-2'de mutasyon saptanmadı.....	96
Şekil 4-31. Aile ağacı, indeks V-1'de saptanan <i>COL1A2</i> : c.577G>A (p.Gly193Ser) heterozigot mutasyon saptandı; Baba IV-2'de klinik ile uyumlu olarak taşıdığı gösterildi...	96

Şekil 4-32. Aile ağacı, indeks III-1’de saptanan COL1A2: c.1801G>A (p.Gly601Ser) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Anne II-6’de saptanan mutasyon, baba II-3’de gözlenmedi.	97
Şekil 4-33. Aile ağacı, indeks II-1’de saptanan COL1A2: c.982G>A (p.Gly328Ser) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması.	97
Şekil 4-34. Aile ağacı, indeks II-1’de saptanan COL1A2: c.2960_2968dupTTGGTCCTGp.Val987_Pro989dup heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Anne I-1’de ve baba I-2’de mutasyon gözlenmedi.	98
Şekil 4-35. Aile ağacı, indeks II-1’de saptanan COL1A2: c.982G>A (p.Gly328Ser) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Anne I-1’de mutasyon gözlenmedi. İndekse ait MLPA (P271-100R (COL1A1) prob ile normal sonuç) analiz görüntüleri.	98
Şekil 4-36. Aile ağacı, indeks IV-1’de saptanan COL1A2: c.1801G>A (p.Gly601Ser) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba III-3’de ve anne III-11’de mutasyon saptanmadı.	99
Şekil 4-37 Aile ağacı, indeks II-5’de saptanan COL1A2: c.2791G>A (p.Gly931Arg) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Anne I-2’de mutasyon saptanmadı.	99
Şekil 4-38 Aile ağacı, indeks III-4’de saptanan CRTAP: c.460G>C (p.A154P) homozigot mutasyonun Sanger doğrulaması.	100
Şekil 4-39. Aile ağacı, indeks II-4’de saptanan P3H1(LEPRE1): c.635G>A (p.Gly212Glu) homozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Saptanan varyan açısından Kardeş II-7 homozigot, Kardeş II-8 heterozigot olarak saptandı.	100
Şekil 4-40. Aile ağacı, indeks VI-1’de saptanan P3H1(LEPRE1): c.635G>A (p.Gly212Glu) homozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Saptanan varyan açısından Baba V-3’de ve anne V-4’de heterozigot taşıyıcılığı gösterildi.	101
Şekil 4-41 Aile ağacı, indeks VI-2’de saptanan SERPINF1: c.619_621del p.207_207del homozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Saptanan varyan açısından Baba V-3’de ve anne V-4’de heterozigot taşıyıcılığı gösterildi. Fetus IV-3’de mutasyon heterozigpt olarak saptandı.	101
Şekil 4-42. Aile ağacı, indeks VI-1’de saptanan SERPINF1: c.620T>G (p.Leu207Arg) homozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Saptanan varyan açısından Baba V- heterozigot taşıyıcılığı gösterildi.	102

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ALP:	Alkalen Fosfataz
ATM:	Amplicon Tagment Mix
BMP:	Kemik Morfogenetik Protein
BMP1:	Kemik Morfogenetik Protein 1
BRIL:	Bone-Restricted Interferon Induced Transmembrane-like protein
BRKS1:	Bruck sendromu tip I
BSP:	Kemik Sialoprotein
CSR:	Kalsiyum Algılayıcı Reseptör
DEXA:	Dual-Energy-X ray-Absorptiometry
Dİ:	Dentinogenezis İmperfelta
DLX5:	Distal-Less Homeobox 5
DMP1:	Dentin Matriks Proteini
ECM:	Ekstraselüler matris
EDS:	Ehlers-Danlos Sendromu
ER:	Endoplazmik Retikulum
FGF:	Fibroblast Büyüme Faktörü
IGF:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri
IGFI:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü I
IGFII:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü II
MAF:	Allel Frekansı
MKH:	Mezenkimal Kök Hücre
MLPA:	Multipleks Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu
MM:	Metaloproteinaz
NPM:	Nextera Master Mix
NT:	Neutrale Tagment Buffer
OCN:	Osteokalsin
OD:	Otozomal Dominant
Oİ:	Osteogenezis imperfekta
OMIM:	Online Mendelian Inheritance in Man
OPG:	Osteoprotegerin
OR:	Otozomal Resesif
OSX:	Osterix

PDGF:	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PEDF:	Pigment-Epitel Türevli Faktör
PTH:	Paratiroid Hormonu
rER:	Granüllü Endoplazmik Retikulum
RUNX2:	Runt-iliskili Transkripsiyon Faktörü 2
SNV:	Tek Nükleotid Varyant
SOST:	Sklerostin
TD:	Tagment DNA buffer
TED:	Tüm Ekzom Dizileme
TGF β :	Transforme Büyüme Faktörü- β
YND:	Yeni Nesil Dizileme

ÖZET

OSTEOGENEZİS İMPERFEKTA HASTALARINDA YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN TARANMASI VE BİLİNMEYEN GENLERİN ARAŞTIRILMASI

Osteogenezis imperfekta (OI) tekrarlayan kemik kırıkları ile karakterize kemiğin sık görülen kalıtsal hastalığıdır. Klinik ve genetik olarak oldukça heterojendir. Tip-1 kollajeni kodlayan genlerdeki heterozigot mutasyonlar sonucu oluşan klasik dört tipin yanı sıra, son yıllarda çoğunluğu otozomal resesif olarak kalıtılan yeni tipleri tanımlanmıştır. Bu çalışmanın amacı OI hastalarında yeni nesil dizileme teknolojisi ile *COL1A1/COL1A2* ve otozomal resesif genlerin incelenmesi ve bilinmeyen genlerin tüm ekzom dizileme (TED) yöntemi ile araştırılmasıdır. OI tanılı 79 hasta çalışmamıza dahil edildi. Hastalarımızın 47'si erkek ve 32'si kadın idi. Öncelikle *COL1A1/COL1A2* genleri dizilendi ve *COL1A1* genindeki del/dup'lar MLPA yöntemleri ile incelendi. OI ile ilişkili genlere özgün tasarlanmış bir Panel-gen analizi yapıldı. Biyoinformatik analizler sonucunda hastalıkla ilişkilendirilen değişiklikler ve segregasyon analizleri sanger yöntemi ile konfirme edildi. Hastalığa neden olan gen bulunamayan 10 hastada TED yapıldı. Akraba evliliği ailelerin %40,5'inde mevcuttu. Hastaların %57'de *COL1A1/COL1A2* genlerinde heterozigot mutasyon, %22,8'inde otozomal resesif kalıtımla ilişkili genlerde (*P3H1*, *FKBP10*, *CRTAP*, *SPARC*, *SERPINF1*) biallelik homozigot mutasyon bulundu, %20,2'sinde ise mutasyon bulunamadı. *COL1A1/COL1A2* genlerde mutasyon oranı (%75,5'i *COL1A1*, %24,5'i *COL1A2*) literatüre göre düşüktü. Bunun nedeni otozomal resesif tiplerin daha fazla olmasıydı. *COL1A1/COL1A2* genlerinde bilinen mutasyon oranı %71, yeni mutasyon oranı %29 idi. Bu genlerdeki protein sentezini durduran mutasyonların (%18) hafif fenotipe (tip 1), glisin serin dönüştüren missense mutasyonların (%20) ağır fenotipe yol açtığı gözlemlendi. Otozomal resesif kalıtım gösteren hastalarda ise orta/ağır klinik mevcuttu. Bu çalışma sonucunda ülkemizde OI'ya neden olan genlerin sıklığının, mutasyon tiplerinin ve fenotiple ilişkisinin belirlenmesi, hastalığa özgü genetik tanı algoritmasının oluşturulabilmesinde ve hastalara doğru genetik danışma verilmesinde önemli katkılar sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Osteogenezis imperfekta, Yeni Nesil Dizileme, *COL1A1*, *COL1A2*

ABSTRACT

SCREENING OF GENES ASSOCIATED WITH OSTEOGENESIS IMPERFECTA BY NEXT-GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGY AND INVESTIGATION OF UNKNOWN GENES

Osteogenesis imperfecta (OI) is the most common genetic bone disorder characterized by recurrent bone fractures and low bone mass. It is clinically and genetically heterogeneous disorder. The aim of this study is screening of mutations in COL1A1/COL1A2 genes; identifying other OI related mutations with OI-specific targeted panel-gene testing. It is also aimed to discover novel genes with whole exome sequencing (WES) in patients who do not have any mutations in known OI genes. 79 patients diagnosed with OI were included in our study. Mutations and large deletion-duplications in COL1A1/COL1A2 genes were investigated with NGS and MLPA methods, respectively. Targeted panel-gene sequencing specific to OI related genes was performed. To discover novel genes, WES was performed in 10 patients. 47 patients were male and 32 were female. Consanguinity rate was 40,7%. We identified heterozygous mutations in COL1A1/COL1A2 genes in 57% patients and homozygous mutations in recessively inherited genes in 22.8% patients and no mutations were found in 20.2%. In our study, mutation rate in COL1A1/COL1A2 genes were lower than previously reported patients due to the high ratio of consanguinity and recessively inherited types of disease in our patient group. The variants that truncate COL1A1/COL1A2 protein synthesis (18%) resulted in milder phenotype (type 1) whereas missense mutations which convert glycine to serin resulted in severe phenotype (20%). Patients with recessive form had severe or moderate phenotype. In conclusion, this study revealed mutation rates among OI patients in our country and has made significant contributions to the algorithm of molecular diagnosis of disease.

Key Words: Osteogenesis imperfecta, NGS, COL1A1, COL1A2.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Osteogenezis imperfekta (OI), kollajen tip 1'nin sentezinde veya işlenmesinde bozukluktan kaynaklanan kemiğin sık görülen kalıtsal hastalığıdır. "Cam Kemik Hastalığı" olarak da bilinen hastalık, tekrarlayan kırıklar, düşük kemik kitlesi, iskelet deformasyonları, boy kısalığı ile gibi iskelet bulgularıyla karakterizedir. Ayrıca mavi sklera, işitme kaybı, dentinogenezis imperfekta (DI), solunum yetmezliği ve kalp kapak disfonksiyonu görülebilir (1).

Osteogenezis imperfekta, yaklaşık 15.000-20.000 doğumda 1'de görülen nadir bir hastalıktır, klinik ve moleküler olarak çok heterojendir (4). Perinatal letal tiplerinin yanı sıra, sadece osteopeni ile seyreden hafif tipleri olduğu gibi, hastalığın ağır tiplerinde, yaş ilerledikçe küçük travmalarla ortaya çıkan kırıkların oluşturduğu deformiteler, boy kısalığı ve yürüme bozukluğunun sonucu ciddi fiziksel engellilik gelişir.

Osteogenezis imperfekta'nın ilk sınıflandırılması Looser ve ark. (2) tarafından 1906 yılında yapılmıştı; konjenita (doğumda kırıkların varlığı) ve tarda (geç başlangıçlı) olarak iki tipe ayrılmıştı. Daha sonra 1979'da Silience tarafından (3) klinik ve radyografik ölçütlere göre yapılan sınıflandırmada hastalar deformite olmayan, mavi skleralı hafif formu (tip 1), perinatal letal, ağır (tip 2), uzun kemik deformiteleri ile seyreden, ilerleyici, ağır (tip 3) ve orta şiddetli, beyaz skleralı (tip 4) olarak dört grup altında toplanmıştır. Klasik 'Silience' sınıflamasının güncellenmiş formu yaygın olarak kullanılmaktadır.

Hastaların en az %90'ında, tip-1 kollajen molekülünü kantitatif ve kalitatif değiştiren heterozigot mutasyonlar bulunur ve OI tip 1 kollajenopati olarak da tanımlanır (4). Tip I kollajen kemik dışında deri, tendon, diş ve skleralarda da bulunur. *COL1A1* ve *COL1A2* genleri tarafından kodlanan tip-1 kollajen proteini iki pro α 1 ve bir pro α 2 zinciri içeren üçlü sarmal bir molekül olan prokollajenin olgunlaşması ile oluşur. Son yıllarda hastalıkla ilişkili yeni genler keşfedilmiş ve çoğunluğu otozomal resesif (OR) kalıtmı olan çok sayıda yeni OI formları tanımlanmıştır. Bugün Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) veri tabanında 5'i otozomal dominant (OD), bir tanesi X'bağlı resesif, 13'sü OR kalıtım gösteren 19 tipi bulunmaktadır. OI'nin yeni tiplerinden sorumlu bu genler translasyon sonrası modifikasyonda rol oynar ve esas olarak tip-1 kollajenin şekillenmesini sağlarlar.

Otozomal resesif kalıtılan tiplere neden olan genlerin kodladığı proteinler, kollajen tip1 proteinin sekresyonunda, şekillenmesinde ve matrikse yerleşmesinde şaperon olarak görev alırlar, ayrıca osteoblastların fonksiyonunu veya farklılaşmasını kontrol ederler, intraselluler kalsiyum seviyelerini ayarlarlar. Fonksiyonlarına göre bu genler beş gruba ayrılmıştır (2):

- A. Tip 1 kollajenin sentezi, yapısı ve işlenmesi ile ilişki genler: *COL1A1 COL1A2, BMP1*
- B. Tip 1 kollajenin şekillenmesi ilişkili olanlar, *CRTAP, PPIB, TMEM38B, LEPRE1, P4HB*
- C. Tip 1 kollajenin katlanması ve çapraz bağlanması üzerine etkili olanlar: *PLOD2, SERPINH1, FKBP10*
- D. Mineralizasyon bozukluğu neden olanlar: *SERPINF1, IFITM5*
- E: Osteoblast gelişiminde defekte neden olanlar: *Osterix (SP7), WNT1, CREB3L*

Bu çalışmanın amacı Oİ olgularında hastalığın tüm alt gruplarına ait bilinen genlerdeki mutasyonları taramak, mutasyon saptanmayan olgularda tüm ekzom dizileme (TED) yöntemi ile bilinmeyen yeni genleri tanımlamaktır.

Bu amaçla, klinik olarak tanı konulmuş Oİ olgularında;

- *COL1A1* ve *COL1A2* genlerinde mutasyon bakılması,
- İkinci aşamada özgün tasarlanmış bir Panel-Gen'de, yeni nesil dizileme (YND) teknolojisi ile Oİ ilişkili diğer genlerin incelenmesi,
- Üçüncü aşamada MLPA ile *COL1A1* ve *COL1A2* genlerinde büyük delesyon ve duplikasyon tipi mutasyonların araştırılması,
- Bu yöntemlerle mutasyonların dışlandığı ailelerde TED yöntemi ile analiz yapılması, kalıtım modeline ve yolak genlerine uygun biyoinformatik yaklaşımla daha önce bu hastalıkla ilişkilendirilmemiş olan yeni genlerin varlığının belirlenmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK YAPISI

Kemikler iskelet sisteminin ana yapıtaşıdır. Kaslarla beraber vücudun hareketini ve duruş şeklini düzenler, hayati organların korunmasını sağlar, kemik iliğinin hemopoezinde rol oynar ve kalsiyum, fosfor ve magnezyum gibi mineralleri depolanması için ortam sağlar. Kemik ayrıca, büyüme faktörleri ve insülin benzeri büyüme faktörleri (*IGF*), transforme büyüme faktörü- β (*TGF β*) ile kemik morfogenetik proteinleri (*BMP*) gibi sitokinler için bir rezervuar görevi görür, vücudun asit-baz dengesini korumaya yardımcı olur. Kemik gücü büyük ölçüde kemik kütlesine (kemik gücünün % 50-70'i) bağlıdır, ancak materyal özellikleri, geometri ve mikro yapı da önemlidir.

Kemik yapısı, kemik hücreleri olan **osteosit, osteoblast, osteoklast** ve % 60-70'i inorganik matriks (mineral), %5-8'i su ve %20-30'u ise organik matriksten oluşur. Organik matriksin **%90'ı kollajen, %10'u ise** nonkollajen proteinler olan proteoglikanlar, glikoproteinler, alkalin fosfataz, fibronektin, osteopontin, sialoprotein, osteokalsin, osteonektin ve diğer proteinleri içerir (5).

1.1.1.KEMİK YAPISI

1.1.1.1.OSTEOBLAST

Mezenkimal kök hücrelerden (MKH) oluşan osteoblastlar kemik matriksinin sentezinden ve mineralizasyondan sorumludur. MKH'nin osteoblastlara farklılaşması Runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (*RUNX2*) dahil olmak üzere, distal-less homeobox 5 (*DLX5*) ve Osterix (*OSX*) genlerin ekspresyonu ile regüle edilmektedir. *RUNX2* genel olarak osteoblast farklılaşmasında ana bir gen olarak tanımlanır ve alkalin fosfataz (*ALP*), osteokalsin (*OCN*), kemik sialoprotein (*BSP*) ve tip I kollajen'nin (*COL1A1/COL1A2*) kodlayanlar diğer osteoblast ile ilişkili genleri düzenlediği gösterilmiştir (6). Kemik morfogenetik proteinlerini (*BMP*'ler) ve WNT sinyal yolağının proteinlerini ekspresyonu, MKH'lerin osteoblastlara etkileşimi düzenler.

Osteoblastlar kemik matrisini iki aşamada sentezler. İlk önce kollajenlerden (esas olarak tip I kollajen), kollajen olmayan proteinlerden (osteokalsin, osteonektin, kemik sialoprotein II ve osteopontin gibi) ve decorin ile proteoglikanlardan oluşan organik bir matriksin salgılanmasıdır. Daha sonra, fosfat ve kalsiyum iyonlarından oluşan kompleksi,

hidroksiapatit ile matriksinin mineralizasyonu meydana gelir. Yeni oluşan matriksin içine yerleşen osteoblastlar osteositlerin oluşumuna yol açarlar.

1.1.1.2.OSTEOSİTLER

Osteoblast/osteosit geçişi sırasında morfolojik ve ultra-yapısal değişiklikler meydana gelir. *BSPII*, *OCN*, *ALP* ve *COL1A1/A2* gibi genler baskılanırken sklerostin (SOST) ve dentin matriks proteini (DMP1) yüksek oranda eksprese edilir.

Osteoblastlarla kıyaslandığında osteositlerde, granüllü endoplazmik retikulum (ER) ve golgi aparatı gibi organeller sayıca azalır ve çekirdeğin sitoplazmaya göre oranı artar. Plazma zarının uzantıları (filopodia) katılmış kemikte kanaliküller adı verilen kanallarda gelişir ve yayılır. Bu filopodia, osteositlerin birbirleriyle ve aynı zamanda osteoblastlar gibi diğer hücre tipleriyle prostaglandinler gibi küçük sinyal moleküllerinin aracılığıyla iletişimini sağlar. Hücre-hücre iletişimi, osteositler filopodialarının ve kemik kanalikülleri arasındaki interstisyel sıvının akışıyla da sağlanır. Bu işlem sayesinde osteositlerin mekanik sensör olarak işlev gördükleri ve doğrudan kemik rezorpsiyonu veya oluşum süreçleri olduğu düşünülmektedir (7).

1.1.1.3.OSTEOKLASTLAR

Osteoklastlar, hemopoetik kök hücrelerden kaynaklanan çok çekirdekli hücrelerdir. Kritik bir osteoklastogenez düzenleyici RANK ligandıdır (RANKL). RANKL osteoblastlar, osteositler ve stromal hücreler tarafından salgılanır ve osteoprotegerin (OPG) tarafından düzenlenir. OPG, RANKL'e bağlanır ve RANK reseptöre bağlanmasını önler, bu nedenle osteoklastogenez inhibe olur. Osteoklastlar Howship'in lakuna denilen rezorpsiyon boşluklarda bulunur ve mineralleşmiş kemiğin emilmesinde işlev görürler. Burada, mineralize kemik matriksini çözen asitli bir pH oluşturarak hidrojen iyonları salgırlar. Katepsin K ve matriks metalloproteazlar gibi hidrolitik enzimler de organik matriks bileşenlerini sindirmek için salınır (7).

1.1.2. İNORGANİK MATRİKS VE KEMİK METABOLİZMASININ DÜZENLENMESİ

Vücut kalsiyumunun %99 ve fosforun %85'i kemiklerde bulunur. Kemik mineral metabolizmasının düzenlenmesi, paratiroid hormonu (PTH), kalsitonin ve D vitamini, gastrointestinal (GI) kanalda, böbreklerde ve kemikte osteoblastlar ve osteoklastlar ile etkileşimi sonucu oluşur (8).

1.1.2.1. PARATIROID HORMONU (PTH)

Paratiroid hormonu, hücre yüzeyindeki kalsiyum algılayıcı reseptörlerden (CSR) izlenen düşük serum kalsiyum seviyelerine cevap olarak paratiroid bezlerinden salgılanır. PTH, serum, kalsiyum ve fosfor seviyelerini kemik, böbrekler ve GI sistemindeki etkileriyle düzenler. Kemikte PTH, etkilerini osteoblastlar ve dolaylı olarak RANK-OPG yolu ile osteoklastik kemik emiliminin uyarılması ve mineralize kemik dokusundan kalsiyum ve fosfat salgılaması yoluyla gösterir.

Böbreklerde PTH, kalsiyumun emilimini artırır ve fosfatın emilimini inhibe eder. PTH ayrıca, 25-hidroksivitamin D1-alfa-hidroksilazın yukarı doğru düzenlenmesi ve ardından kalbinden yoluyla kalsiyum emilimiyle böbreklerde aktif D vitamini üretimini artırarak, GI kanalındaki kalsiyum emilimini artırır (9).

1.1.2.2. KALSİTONİN

Kalsitonin, hiperkalsemiye cevap olarak tiroid bezinden salgılanır. Başlıca işlevi osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunu inhibe etmektir ve ayrıca böbreklerde kalsiyum ve fosforun rezorpsiyonunun azalması ile sonuçlanır.

1.1.2.3. D VİTAMİNİ

D vitaminin aktif metaboliti, 1,25 dihidroksivitamin D, osteoid mineralizasyonu için bir mineral substratı sağlayarak, gastrointestinal kanaldaki kalsiyum ve fosfatın emilimini artırır. Ayrıca osteoklast aktivitesini arttırmak için PTH ile birlikte hareket eder. Ayrıca D vitamini bazı kemik proteinlerinin, özellikle osteokalsin, tip I kollajen ve alkalik fosfatın transkripsiyonunu da düzenler (10).

1.1.2.4. DİĞER FAKTÖRLER

Yukarıda açıklanan hormonlara ek olarak, birçok başka hormon kemik metabolizmasında rol oynar. Bunlar arasında iskelet gelişimini etkileyen ve kemik kütlesinin korunmasına yardımcı olan östrojen ve testosteron gibi gonadal steroidler; iskelet büyümesini ve olgunlaşmasını destekleyen büyüme hormonları, insülin ve androjenler; ve osteoblastlar tarafından osteoid sentezini ve mineralleşmesini uyarabilen ve osteoklast sayısını artırabilen tiroid hormonları.

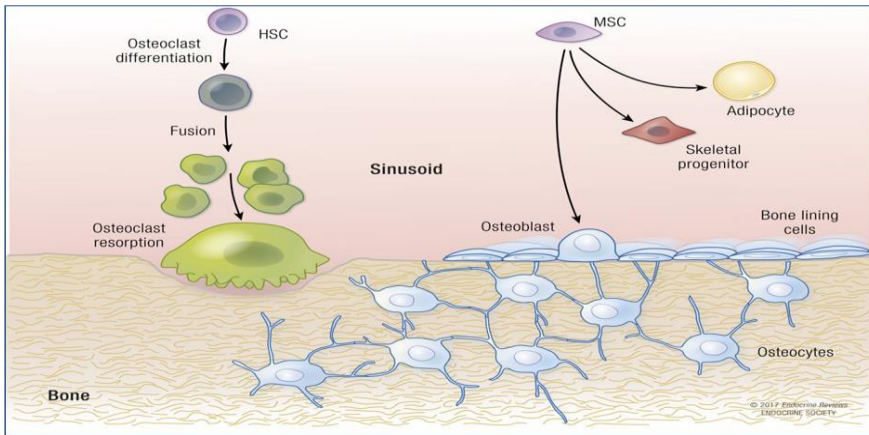
2.2. KEMİĞİN YENİDEN DÜZENLENMESİ

Büyüme ve gelişme esnasında iskelet normal boyutuna ve şekline ulaşırken bir bölgede kemik yıkımı olurken başka bir bölgede kemik yapımı olmakta ve bu “modelling”

olarak tanımlanmaktadır. Modelleme, kemiklerin fizyolojik veya mekanik etkilere yanıt verdiği süreçtir. Bu işlem kemik büyüklüğü ve şeklindeki değişikliklerden sorumludur ve büyüme sırasında iskelet kütlelerinde uygun bir şekilde artmasını sağlar. Modelleme için, osteoblastların ve osteoklastların ayrı kemik yüzeylerinde bağımsız etkisi olması gerekir. Kemik modelleme erişkinlerde yapılan remodellemeye daha az sıklıkta görülür (11).

Kemik yeniden düzenlenmesi (remodelling) işlemi, olgun iskeletteki kemik kütlelerini korurken kemik dokusunun değişimini sağlar. Sırasıyla osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonunun ve oluşumunun koordinasyonunu gerektirir. Remodelling, sitokinler, hormonlar, kemokinler ve mekanik stimülasyon dahil olmak üzere birçok yerel ve sistemik faktörden etkilenir. Eski kemiğin küçük bölümlerinin sürekli olarak rezorpsiyonu, yeni sentezlenmiş matris (osteoid) ile değiştirilmesini ve ardından matriksin mineralizasyonunu ile yeni kemiğin oluşumunu sağlar (Şekil 2). Remodellingi etkileyen bilinen yerel kontrol faktörleri arasında RANK/RANKL osteoklast oluşumunun düzenlenmesi, kemik oluşumunu engelleyen osteolitlerde sklerostin (SOST) üretimi, ve makrofajlar ile lenfositler dahil olmak üzere kemik ve immün hücrelerinde Wnt sinyalleşmesidir (12).

Remodelling süreci, kırıklar gibi yaralanmalardan sonra kemiklerin geri kazanılmasını kontrol eder, ayrıca normal aktivite sırasında meydana gelen mikrohasar birikimini önler, belki de sıvıdaki kayma gerilimindeki değişiklikler sayesinde, osteositler tarafından sinyallerin iletimini uyarır.



Şekil 2-1: Kemik yeniden düzenlenmesi (13).

1.2.1.KEMİK YENİDEN DÜZENLENMESİNİN REGÜLASYONU

Kemik gelişimi için hayati önem taşıyan BMP ve TGF- β gibi birçok büyüme faktörleri kemik remodellingin için lokal regülasyonda önemli rol oynar. Kemik oluşumundaki ana sinyal yolları:

1.2.1.1.Insulin-like Growth Factor I ve II (IGF1 & IGFII)

İnsülin benzeri Büyüme Faktörü I ve II (IGF1 ve IGFII), karaciğerde ve osteoblastlarda sentezlenen polipeptitlerdir. Osteoblastların sayısını ve fonksiyonunu artırarak kemikteki kollajen üretimini artırırlar. Osteoblastların sayısını ve fonksiyonunu artırarak kemikteki kollajen üretimini artırırlar. IGFII, embriyogenez sırasında özellikle önemlidir. *IGFI* ve *IGFII*'nin ekspresyonu, büyüme hormonu, östrojen, progesteron (ekspresyonu artıran) ve glukokortikoidlerle (ekspresyonu inhibe eden) düzenlenir. IGF1 ve IGFII, kemik remodeling aktivitesini etkileyebilecek olan kendi bağlayıcı proteinlerine (IGFBP) bağlanır (14).

1.2.1.2.Transforming Büyüme faktörü-beta (TGF β) ve Kemik morfogenezik proteini (BMP)

TGF β /BMP sinyalizasyonu hem embriyonik dönemde iskeletin gelişmesinde hem de kemik homeostazında temel bir rol oynar. TGF β /BMP sinyalleri, metalloproteinaz (MM) gibi kemik parçalayıcı enzimleri inhibe eder, osteoklast farklılaşmasını ve aktivitesini azaltır ve osteoblast farklılaşmasını kuvvetle destekler (15).

1.2.1.3.TROMBOSİT KAYNAKLI BÜYÜME FAKTÖRÜ (PDGF)

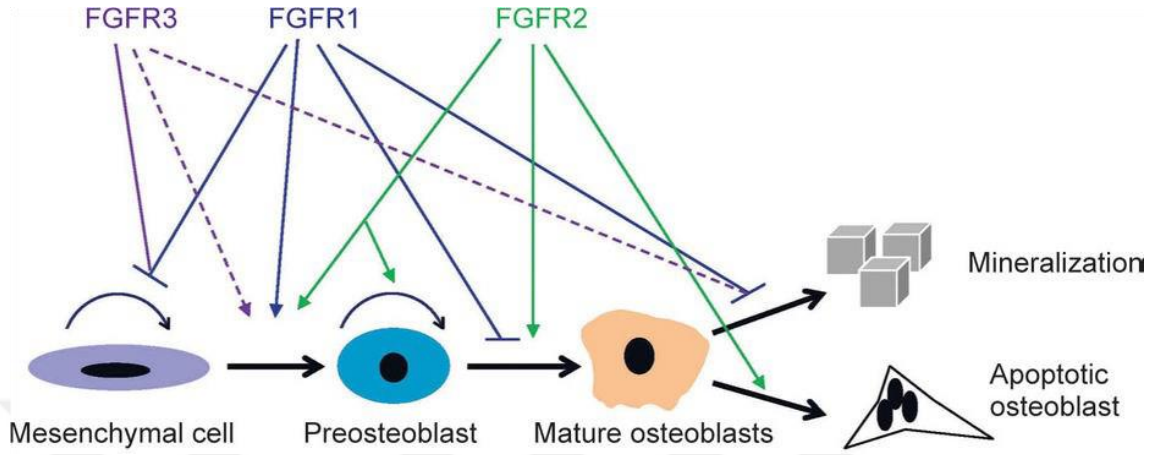
PDGF, osteoblast veya osteoprogenitör hücre (MSC) aktivitesini uyarır ve kemik kırılmasının ardından regüle edildiği bilinmektedir. PDGF'nin osteoklastların osteoblastların kemotaksisini kontrol etmesine izin vererek kemiklerin yenilenmesine yardımcı olduğuna inanılıyor, ancak bunun gerçekleştiği kesin mekanizma hala araştırılmaktadır (16).

1.2.1.4.FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ (FGF)

FGF/fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR) sinyal yolu kemik gelişimi, homeostazın korunması ve fosfat seviyelerinin düzenlenmesi için gereklidir. Çok sayıda *FGF* ve *FGFR* de kırık onarımı sırasında ifade edilir (17).

FGFR1'in mezenkimal progenitörlerin osteoblastlara ayrılmasını teşvik ettiği, ancak MSC proliferasyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir. Aynı zamanda osteoblastların

olgunlaşmasını ve mineralleşmesini de engeller. FGF2'nin osteoblast farklılaşmasını ve kemik oluşumunu pozitif olarak modüle ettiği, oysa FGF3 sinyallemesinin etkileri konusunda çelişkili veriler bulunduğu düşünülmektedir (Şekil 2-2).



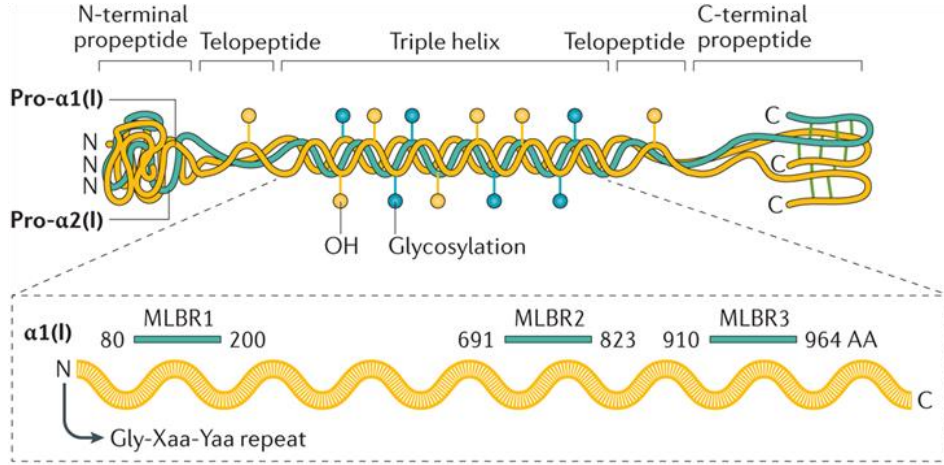
Şekil 2-2 FGFR1-3'ün osteoblast farklılaşmasındaki rolü (17). *FGFR3'ün osteogenez üzerindeki etkisi belirsizdir (noktalı çizgilerle işaretlenmiştir.)*

2.3. ORGANİK MATRİKS

Kemik organik matriksinin, %90'i tip I kollajen geri kalanı ise proteoglikan, glikoproteinler ve sialoproteinler gibi proteinlerden oluşur.

2.3.1. KOLLAJEN tip 1 proteininin yapısı

Kemikteki proteinin ana bileşeni olan tip I kollajen, osteoblastlar tarafından salgılanır. Tip I kollajen, üçlü bir sarmal yapıya monte edilmiş iki pro- $\alpha 1$ zincirinden ve bir pro- $\alpha 2$ zincirinden oluşan heterotrimerdir. Pro- $\alpha 1$ ve pro- $\alpha 2$ zincirleri sırasıyla *COL1A1* ve *COL1A2* genleri tarafından kodlanır. Hem pro- $\alpha 1$ hem de pro- $\alpha 2$ zincirleri, kısa spiral olmayan telopeptid bölgeleri ve globular karboksil ve amino terminal propeptitleri (C- ve N-propeptitleri) ile çevrili üçlü sarmal bölge olarak bilinen tekrarlayan Gly-X-Y tripletlerini içeren büyük bir 1014 amino asitlik molekülü oluşturur.



Şekil 2-3. Tip I kollajenin yapısı (18). Tip I kollajen iki pro- $\alpha1$ ve pro- $\alpha2$ zincirinden oluşur. Her biri tekrarlanan Gly-X-Y üçüzlerini içeren 1014 amino asidin büyüklüğünde 'üçlü sarmal' yapısındadır. Heliks yapısı kesintisiz Gly-Xaa-Yaa tripletlerden oluşur, X genellikle proline ve Y hidroksiprolin olmak üzere, iki ucunda kısa N- ve C-propeptid bölgeleri içermektedir. Her alfa zinciri boyunca, majör ligand bağlanma bölgeleri (MLBR) olarak bilinen diğer kollajen molekülleri veya hücre dışı matris proteinleri ile etkileşimi için önemli olan bölgeler bulunmaktadır.

Gly-X-Y tripletlerinde, tek bir hidrojen atomundan oluşan glisin amino asidi, tip I kollajen proteininin temelidir. Üç alfa zincirinin bağlanması ve sıkı katlanmasını sağlar. Gly-X-Y tekrarında, X'in genellikle prolin olduğu ve Y'in sıklıkla hidroksiprolin olduğu bilinmektedir. Her alfa zinciri boyunca, diğer kollajen molekülleri veya hücre dışı matris proteinleri, özellikle proteoglikanlar ile etkileşim için önemli olan bölgeler bulunmaktadır. Ana ligand bağlanma bölgeleri (MLBR) olarak adlandırılan bu bölgeleri kodlayan *COL1* gen mutasyonlarının ağır klinik oluşturduğu düşünülmektedir. Bu da normal kemik homeostazı için proteoglikan-kollajen etkileşimlerinin önemi olduğunu göstermektedir (19).

2.3.2. TİP 1 KOLLAJENİN SENTEZİ VE TRANSLASYON SONRASI MODİFİKASYONU (OLGUNLAŞMASI VE ŞEKİLLENMESİ)

2.3.2.1. KOLLAJEN TİP I BİYOSENTEZİNE GENEL BAKIŞ

Tip I kollajenin basit üçlü sarmal yapıdan oluşmasına rağmen, prokollajende olgu kollajen yapımı ve fibril yapısına girmesi çok basamaklı ve oldukça karmaşıktır.

Bu süreç;

- translasyon sonrası değişiklikler,
- çapraz bağlanma,
- katlama,

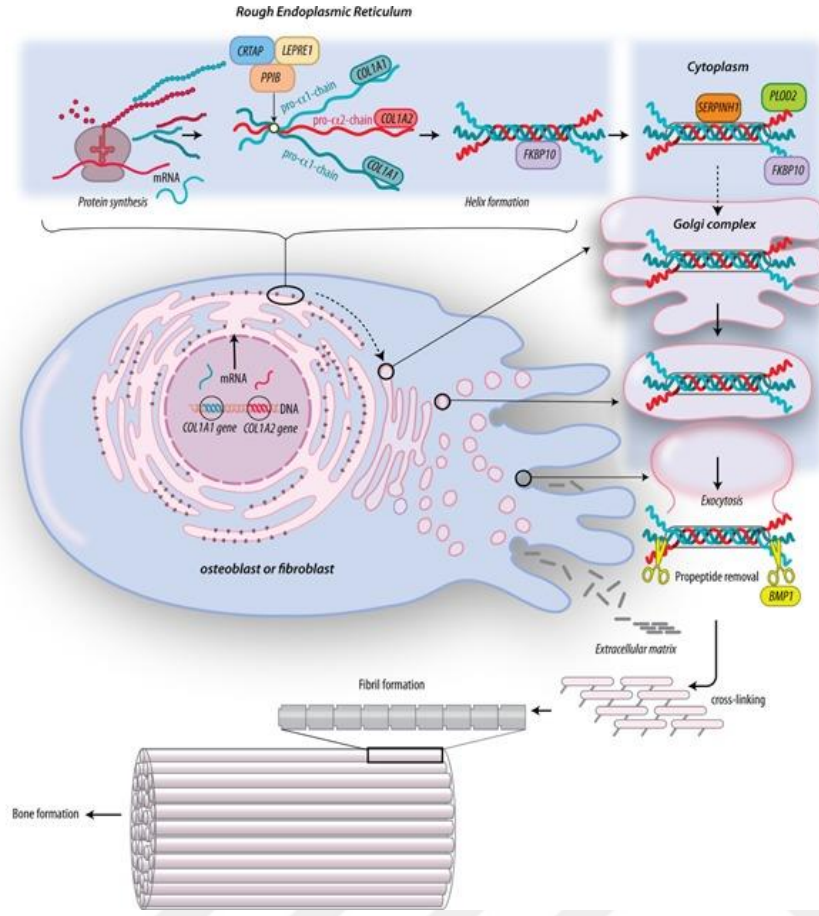
- **taşıma,**
- **salgılama ve kalite kontrolü basamaklarından oluşur** ve bu işlemlerde görev alacak çok çeşitli proteinlere gereksinim duyulur.

Nukleusta meydana gelen kollajen genlerinin transkripsiyonundan sonra, mRNA sitoplazmaya taşınır ve translasyon için ribozomlarla etkileşime girer. Translasyon gerçekleşikten sonra pre-pro-poliipeptitler olarak adlandırılan zincirleri granüllü endoplazmik retikulumda (rER) işlenir.

Pre-pro-poliipeptidin pro-kollajene dönüşmesi için üç ana değişiklikleri içeren translasyon sonrası işlem den geçirilir:

1. N-terminalindeki sinyal peptidin çıkarılması.
2. Lizin ve prolin kalıntılarının hidroksilasyonu.
3. Seçilen hidroksil gruplarının lizin üzerinde glikozilasyonu.

Hidroksillenmiş ve glikolize edilmiş üç pro- α -zincirleri hizalanır, bir fermuar şeklinde katlanarak üçlü sarmal konfigürasyonunda birleşir. Bundan sonra pro-kollajen molekülü son modifikasyonlar için golgi aparatına taşınır, hücre dışı matrikse ekzositozundan sonra C ve N-propeptitlerin ayrılması kollajen tip I'in oluşumuna yol açar. Ardından, kollajen tip I moleküllerinin çapraz bağlanması fibrillerin oluşumuna yol açar. Lizil oksidaz, lizin ve hidroksilizinlere etki eder, tropokollajen molekülleri arasında kovalent bağlanma ile kollajen fibrilini oluşturur (20).



Şekil 2-4. Kollajen tip I biyosentezine genel bakış (FS Van Dijk1 ve DO Sillence, 2014)

COL1A1 ve *COL1A2*'nin **translasyonu granüllü endoplazmik retikulumda oluşur** ve $\alpha(I)$ zincirlerinin post-translasyonel modifikasyonu gerçekleşir. Burada C-propeptid alanları içindeki zincir tanıma sekansı, iki pro- $\alpha1$ ve bir pro- $\alpha2$ zincirinin hizalanmasını sağlar (21,22). Üç C-propeptid arasındaki etkileşimlerin hizalanması ve stabilizasyonu zincirler arası disülfid bağları ile kolaylaştırılmaktadır (23). Üç adet polipeptid zinciri (2 adet $\alpha1(I)$ ve 1 adet $\alpha2(I)$) birbiri etrafında dolanarak üçlü bir sarmal oluşturur. Sarmal oluşumu polipeptid zincirlerinin karboksi ucundan başlayarak amino ucunda sonlanır.

Zincir montajı sırasında lizin ve prolin kalıntılarının **hidroksilasyon** ile modifikasyonu meydana gelir. Gly-Xaa-Yaa tekrarının Y pozisyonundaki prolinler P4H1 protein tarafından, hidroksile olurken, X pozisyonundaki spesifik prolinler P3H1 ve P3H2 ile hidroksile edilirler. Bazı lizin kalıntıları lizil hidroksilazlar (LH1 ve LH2) ile hidroksile edilir ve oluşan hidroksilizinlerin **glikolizasyonu** sırasıyla gerçekleşir. (24,25). Propeptidin

C-terminal propeptidin sentezinden sonra, zincir içi disülfid bağları oluşturur ve ER zarına bağlı kalır. Üçlü sarmalın oluşması için gerekli zincirlerin seçilmesi ve birleştirilmesi, ER membranına bağlı C-propeptitlerinin difüzyonu ile gerçekleşir. Zincirleri doğru sıraya yerleştiren ve üçlü sarmal oluşumunu başlatan üçlü sarmal oluşumuna yönelik bir çekirdek oluşur. Disülfid izomeraz proteini, katlama çekirdeğini stabilize eden zincirler arası disülfid bağ oluşumunu katalize eder.

2.3.3. TRANSLASYON SONRASI MODİFİKASYON (CRTAP/P3H1/PPIB)

Üçlü sarmal oluşumu C-terminal ucundan N-terminal ucuna doğru ilerler bu aşamada prolin ve bazı lizin kalıntılarının hidroksilasyonu hala devam etmektedir. Bu aşamada, *CRTAP*, *LEPRE1* ve *PPIB* genleri tarafından kodlanan Crtap, prolil-3-hidroksilaz ve peptidil-prilil-izomeraz (cyclophilin B) proteinleri tip 1 kollajen proteinini hidroksile ederek kararlı bir yapıya ulaşmasını sağlar. Bu üç component, ER’de 1:1:1 oranında 3-prolil hidroksilaz kompleksini oluşturmaktadır. Prolil-3-hidroksilaz enzimi kompleksi tip-1 kollajende $\alpha 1$ (I) ve $\alpha 1$ (II)-zincirinde prolin 986’sının ve $\alpha 2$ (I) -zincirinde prolin 707’sinin hidroksilliyerek üçlü sarmal yapının kararlılığını oluşturmaktadır (26,27).

2.3.4. KOLLAJEN ÇAPRAZ BAĞLARI OLUŞTURMASINDA VE KATLANMASINDAKİ GÖREVLİ PROTEİN

2.3.4.1. SERPINH1

Isı şok proteini olan Hsp47, *SERPINH1* geni tarafından kodlanır, üçlü sarmal prokollajenin N-ucuna bağlanarak ER’deki **prokollajen katlanmasını** sağlar ve stabilize eder ayrıca doğru katlanmış kollajeni golgi’ye transport etmekte yardımcı olur.

2.3.4.2. FKBP10

Diğer bir ER-yerleşik chaperone proteini, *FKBP10* tarafından kodlanan Fkbp65, tip I prokollajen ile etkileşime girer (28). Fkbp65’in prokollajen taşınması ve Plod2 proteini ile etkileşime girerek Plod2’ni moleküler katlanması için önemli olduğu düşünülmektedir (29).

2.3.4.3. PLOD2

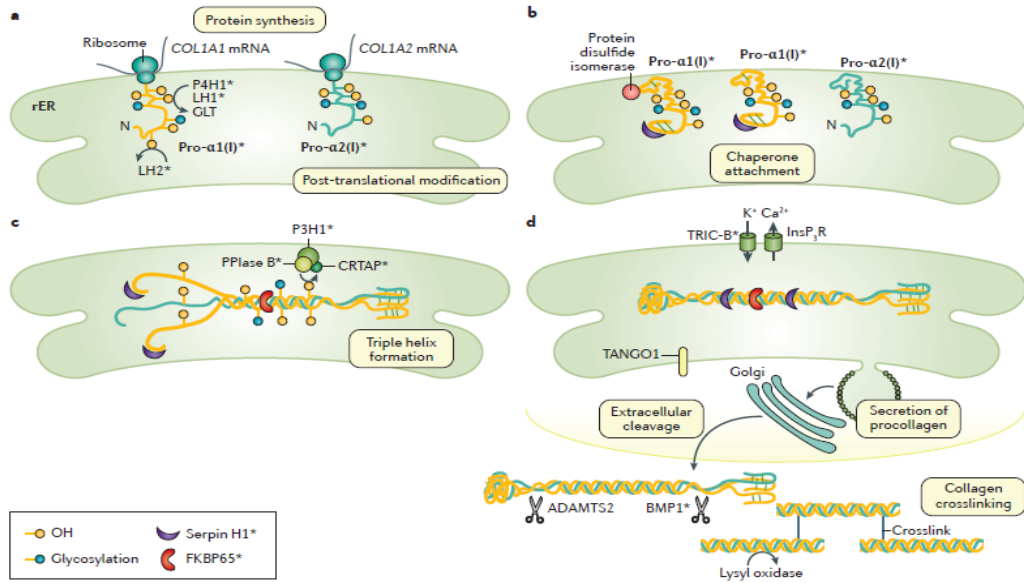
Kollajen proteininin kemikteki stabilitesinin korumasında, telopeptidlerdeki ve üçlü sarmalda bulunan Lys87 ve Lys930 pozisyonunda lizil ve hidroksilizil çapraz bağlarının oluşmasından sorumludur. Lizil hidroksilaz 2 enzimi (LH2), telopeptitte bulunan lizinin hidroksilasyonundan sorumludur ve *PLOD2* geni tarafından kodlanmaktadır.

2.3.5. KOLLAJENİN İŞLENMESİ /KESİLMESİNDE BMP1 DEFEKTLERİ

2.3.5.1. BMP1

Ekzozitoz yoluyla hücre dışı matrikste salgılandıktan sonra prokollajenin propeptitleri, kemik morfogenetik protein 1, BMP-1, C- terminal propeptidin prokollajen tip I'den proteolitik olarak kesilmesinden sorumlu ve ADAMTS enzim ailesinin N-proteinaz aktivitesini kullanarak globüler N ve C propeptitlerinin uzaklaştırılmasıyla olgun tip I kollajene işlenir.

Böylece kollajen moleküllerinin fibril oluşumu başlar ve bu fibriller, üçlü sarmaldaki bazı lizin ve hidroksilizin kalıntılarının telopeptitlerin lizil oksidazlar tarafından oksitlenmesi sonucu çapraz bağ oluşumuyla stabilize edilir. Fibriller, Tip I kollajen liflerini oluşturmak için yanıl ve füzyon yoluyla büyür (30) (31). (Şekil 2-5).



Şekil 2-5. Tip I Kollajen Biyosentezindeki aşamalar (18).

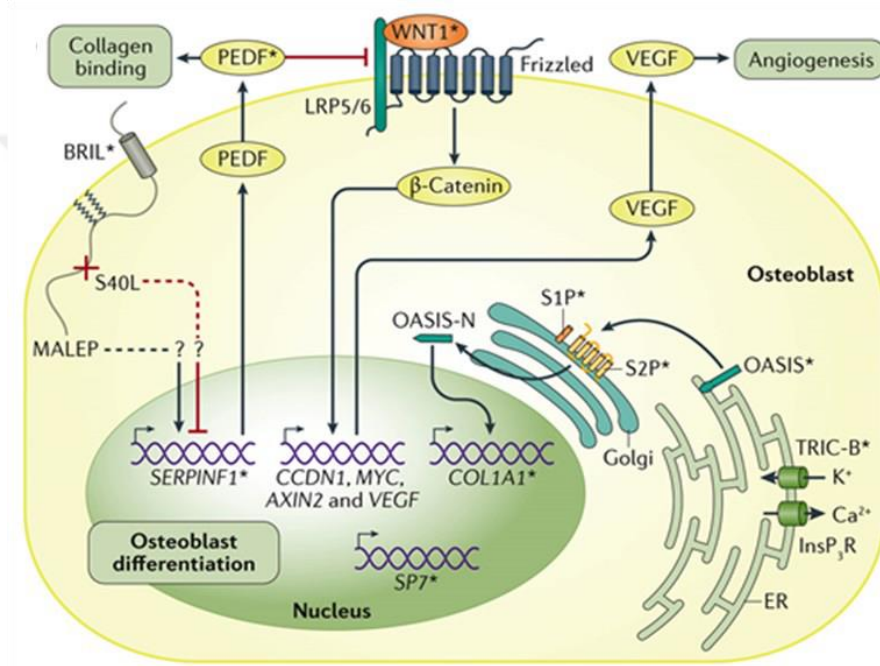
2.3.6. OSTEOLAST GELİŞİMİ VE İŞLEVİNDEKİ DEFEKTLER

2.3.6.1. SP7

SP7/OSX geni spesifik protein 7 yada osteriks'i kodlamaktadır. Bu protein bir transkripsiyon faktörü olup, osteoblast farklılaşması ve osteosit maturasyonunda rol oynamaktadır.

2.3.6.2. WNT1

Resesif Oİ'nin, WNT gen ailesinin bir üyesi olan *WNT1* ile de ilişkili olduğu bildirilmektedir. Wnt proteinleri, regülatör ligandlar olarak işlev görür. WNT sinyali, hücre çoğalması, göçü, kemik, kalp, kas ve diğer dokuların farklılaşması ve bakımı dahil olmak üzere birçok gelişimsel ve düzenleyici süreç için önemlidir. Bu protein osteoblast fonksiyonlarında ve kemik gelişiminde rol oynamaktadır (32). WNT sinyal proteinlerinde, kemik kütlesini etkileyen mutasyonlar, şimdiye WNT yolağıyla ilişkilendirilmiştir (Şekil 2-6).



Şekil 2-6. Osteogenesis imperfecta'da kemik oluşumu ve mineralizasyonun düzenlenmesi.

WNT1 osteoblast farklılaşmasında yer alan genleri *LRP5/6*, *Frizzled* ve kanonik β -katenin sinyal yolu ile transkripsiyonunu uyarır. Endopeptidaz S2P (MBTPS2) golgi'de bulunur. ER stres zamanlarında düzenlenmiş intramembran proteoliz (RIP) vasıtasıyla OASIS gibi düzenleyici proteinleri ayırır. TMEM38B/TRIC-B, ER içindeki kalsiyum akışını düzenler. Güçlü bir anjiyogenez inhibitörü olan pigment epitelinden türetilmiş faktör (*SERPINF1* tarafından kodlanan PEDF) kemik oluşumu ve yeniden şekillenmesinde rol oynar. Mineralleşmeyi düzenlemek için kemikle sınırlı interferon kaynaklı transmembran protein benzeri protein (BRIL) ile çapraz bağlantı kurar. Kesik çizgiler, bilinmeyen yolları temsil eder (18).

2.3.6.1. SPARC

Salgılanan protein, asidik, sistein bakımından zengin, tip I kollajen dahil hücre dışı matris proteinlerini bağlayan bir glikoproteindir. Esas olarak, kemikteki osteoblastlar dahil, yüksek hücre dışı matriks üretimine sahip hücrelerde ifade edilir ve kemikteki kollajenin kalsifiye olması için gereklidir.

2.3.7. ENDOPLAZMİK RETİKULUM İLİŞKİLİ PROTEİNLER

2.3.7.1. CREB3L1

CREB3L1 geni ise osteoblast seviyesinde ağırlıklı olarak işlev gören ER-stres transducer OASIS proteinini kodlamaktadır. OASIS'in kollajen matriks oluşumunda yer alan genlerin *TGFβ* tarafından aktivasyonu için de gerektiği bilinmektedir (33) ve OASIS -/- farelerde şiddetli osteopeni ve spontan kırıklar gözlenmektedir (34).

2.3.7.2. MBTPS2

MBTPS2 tarafından kodlanan site-2 metaloproteazının (S2P) substratları golgi'de bulunur ve OASIS ile birlikte ER stresi durumunda düzenleyici proteinlerin kesilmesinde görevlidir (Şekil 1-6).

2.3.7.3. TMEM38B

TMEM38B proteini (TRIC-B), ER'da hücre içi intrasellüler depolardan kalsiyum akışını sağlayan bir trimerik katyon kanal proteinidir (Şekil 1-6) ve knockout fare modelinde perinatal ölüme yol açmaktadır (35,36). TMEM38B/TRIC-B kaybına bağlı kalsiyum akışının bozulmasına, ER stresine, artmış BiP'ye ve kollajen sentezindeki düzensizliğe neden olmaktadır (37).

2.3.8. KEMİK MINERALİZASYONUNDA DEFEKTLER (IFITM5 ve SERPINF1)

2.3.8.1. IFITM5

Ifitm5 (bone-restricted interferon induced transmembrane-like protein-BRIL) kemik formasyonunda görev alan ve mineralizasyondan sorumlu olan bir proteindir.

2.3.8.2. SERPINF1

Serpinf1, güçlü bir anjiyogenez inhibitörü olan çok işlevli proteindir ve kemik oluşumu ve yeniden şekillenmesinde rol oynayan 50-kDa ağırlığındaki pigment-epitel türevli faktörü (*PEDF*) kodlar (38). *PEDF* fonksiyonunun kaybına yol açan *SERPINF1*'deki mutasyonların spesifik klinik fenotipi OI tip VI'dır (39).

Hasta osteoblastları kullanılarak yapılan çalışmalar, mutasyonunun hücre içi SERPINF1 düzenlemesini uyardığını ve mineralleşmenin bozulmasına yol açtığını gösterilmiştir (40). Bu bulgu, BRIL ve PEDF'nin osteoblast gelişimi, kemik oluşumu ve mineralizasyon sırasında etkileşime girdiği fikrini desteklemektedir (Şekil 1-6).

2.3.8.3. SEC24D

SEC24D geni, COPII kompleksinin bir parçasını kodlar. Kollajen molekülleri dahil olmak üzere, proteinler, ER'dan çıktıklarında COPII taşıma veziküllerine paketlenir.

2.3.8.4. P4HB

Bu gen, prolyl 4-hidroksilaz beta alt birimini kodlar, prokollajenin prolin kalıntılarının hidroksilasyonunda ve ER'da prokollajen alfa zincirlerinin birikmesinin önlenmesinde bir şaperon olarak görev alır (41).

2.3.1. OSTEOGENEZİS İMPERFEKTA'NIN SINIFLANDIRILMASI

Osteogenez imperfekta (OI), kollajen tip I'nin sentezinde veya işlenmesinde bozukluktan kaynaklanan birçok sistemi ve organı etkileyen sistemik bir bağ dokusu hastalığıdır. Tekrarlayan kemik kırıklarına karşı artan duyarlılık ve düşük kemik yoğunluğu ile karakterizedir. Diğer belirtiler arasında mavi sklera, cilt ve eklem gevşekliği, dentinogenez, imperfekta, kısa boy ve yetişkinlikte işitme kaybı yer alır. OI hastaların yaklaşık yarısında, orta kulak içindeki patolojinin kaynaklanan, genellikle iletken tipi işitme kaybı geliştirir. Daha hafif belirtiler arasında solunum yetmezliği, aort kök genişlemesi ve kapak yetersizliği, kolay morarma, fitikler ve aşırı terleme bulunur (1).

Bebeklik döneminde tespit edilebilen OI, yaklaşık 15.000–20.000 doğumda 1 oranında görülür. Klinik bulgular, neredeyse asemptomatik formdan en şiddetli tiplere kadardır. Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nden yapılan araştırmalar, 10.000 doğumda 0.3-0.7 olan osteogenezis imperfektanın doğum sıklığını bulmuştur. Bu doğum kohort analizleri, ağır osteogenezis imperfekta tiplerini yansıtır ve doğumdan sonra belirgin hale gelen daha hafif tipleri içermez. Danimarka'da popülasyona dayalı bir çalışma, 1997 ve 2013 yılları arasında yıllık 10.000 doğumda 1.5 yıllık osteogenezis imperfekta insidansı bulunmuştur. Finlandiya'da yapılan popülasyon araştırmaları, çoğu fenotipik olarak hafif osteogenez imperfekta tip I ve tip IV'te fenotipik olarak daha ılımlı olan 10.000 kişi başına yaklaşık 0.5 oranında bir prevalans olduğunu tahmin etmektedir. Bu doğum kohortu ve popülasyon anketleri klinik bulgulara dayandığından OI insidansı yaklaşık 10.000 kişi başına 1'dir. Çoğu hasta için heterozigot *COL1A1* veya *COL1A2* mutasyonları bulunmaktadır. Cinsiyetler arasındaki prevalansta bir farklılık yoktur.

Her bir resesif geninin katkısı popölasyona baēlıdır. Kuzey Amerika ve Avrupa popölasyonlarında, 3'-hidroksilasyon kompleksi, *CRTAP*, *P3H1* ve *PPIB* (4) bileşenlerini kodlayanlar en yaygın iken, *SERPINF1* ve *FKBP10*'un Arap popölasyonlarında daha yaygındır (35). İrlandalı gezginlerde ise *P3H1* geninde birkaç tekrarlayan mutasyon tespit edilmiştir; c.232delC; p.Gln78Serfs *30 (42) ve Afrika kökenlilerde c.1080 + 1G> T (43). Etkilenen ailelerde prognostik bilgilerin iyileştirilmesi ve genetik danışmanlık/risk değerlendirmesi umuduyla OI'de genotip ve fenotip arasındaki ilişkiyi belirlemek için büyük çaba sarf edilmiştir.

Şiddetli otozomal resesif OI genlerinin çoğunda mutasyonlarla ilişkili fenotiplerin prevalansı ve fenotip spektrumu halen net değildir ve heterozigot taşıyıcıların fenotipi iyi tanımlanmamıştır. Bu nedenle, bu genler yeni araştırmalar için iyi adaylardır.

Oİ genetik temelin anlaşılması, resesif tipler için nedensel genlerin tanımlanması ile 2005'ten bu yana hızla genişledi. Kemik displazisine yol açan hücresel ve hücre dışı mekanizmaları incelemek için kapsamlı araştırmalar devam etmektedir. Oİ'nin moleküler nedenlerinin belirlenmesinden önce gelen sınıflaması genetik, radyolojik ve klinik kriterlere dayanmaktadır. Bu sınıflandırmada tanınan dört tip (tip I-IV) o zamandan beri tip I kollajen miktarını veya primer yapısını doğrudan değiştiren *COL1A1* veya *COL1A2*'deki otozomal dominant mutasyonlara baēlıdır. Bununla birlikte, Oİ'nin kollajen ile ilişkili bir bozukluk olarak anlaşılması; klinik özellikler, kemik histolojisi, kalıtım tipleri ve genetik nedenlere dayanarak fonksiyonel olarak ilişkili 19 alt tipte Oİ'yi daha spesifik olarak tanımlamayı mümkün kılmıştır. Bu nedenle, Oİ histolojik farklılıklar ve fenotipik özellikler (V ve VI tipleri), genlerdeki mutasyonların otozomal resesif kalıtım kalıpları (VII-IX tipleri), katlanma ve çapraz bağlanma kollajenine (X - XII) ve osteoblast farklılaşma ve fonksiyon defektlerine (XIII - XVIII tipleri) göre sınıflandırılır.

Sillence tarafından yapılan klasik sınıflamaya göre Oİ spektrumunda dört ayrı sendrom tiplendirilmektedir(3):

Tip I – Hafif formdur. Mavi sklera, erken işitme kaybı, yürümenin başlamasıyla ortaya çıkan hafif-orta şiddette kırıklar ile karakterizedir. Kırıklar çocukluk döneminde sıktır, ergenlik ile azalır, deformite yoktur. Yürümede sorun yoktur.

Tip II – Perinatal lethal, mavi sklera, sivri burun, ince cilt, yumuşak kafatası, uzun kemiklerde çok sayıda kırık, boncuk kosta, şiddetli multipl intrauterin kırıklar, kalp ve akciğer yetmezliği ile ilk aylarda ölüm görülür.

Tip III – ağır formdur. Doğumda fark edilen kısa ve eğri ekstremiteler, ciddi boy kısalığı, mikrognați ve frontal bossingle karakterize üçgen yüz, gri sklera, ciddi osteoporozis, intrauterin kırık, skolyoz, dentinogenezis imperfekta görülür. Hastalar yaş ilerledikçe oluşan ciddi deformiteler nedeniyle yürüyemez hale gelirler. Prognoz iyi değildir.

Tip IV – Klinik orta derecededir, kırıklar tip 1 den daha ciddidir: beyaz sklera, işitme kaybı, kifoz, skolyoz bulunur. Kırıklar intrauterin dönemde başlayabilir, puberte ile azalır.

1979'dan beri klinik ve radyografik kriterlere dayanan Sillence sınıflandırması hem hekimler hem de araştırmacılar için yararlı olmuştur. Nadir ve resesif Oİ tiplerinden sorumlu olan gen sayısı hızlı bir şekilde arttıkça, çeşitli alternatif sınıflamalar önerilmiştir (4,44,45). Şimdi ise Tip I kollajendeki birincil defektleri olan vakalara Sillence tarafından belirlenen sınıflamasını ve daha sonra tip I kollajenle etkileşime giren moleküllerdeki patojen tipler için Oİ'nin genetiğine dayanan bir sınıflandırma tercih edilmektedir. Bununla birlikte, genetik nedenlerini araştırılması etkilenen bireylerin daha sonraki tedavi ve takibi için hayati önemi taşımaktadır.

2.3.2. Oİ'DE KEMİĞİN PATOLOJİSİ

Oİ'nin ana özelliği, düşük kemik kütlesi ve artmış kemik kırılabilirliğidir. “Kırılabilirlik” karakteristiğine yol açan kemik dokusu hipermineralizasyonu, Oİ'nin temel bir özelliğidir ve bunu diğer erken başlangıçlı kemik kırılabilirlik bozukluklarından ayırır.

Makro düzeyde, kollajen defekti olan bireyleri, kortikal incelme ve azalmış trabeküler kemiği gösterir. Artmış osteoblastlar ve osteoklastlar ve daha sonra artan kemik döngüsü gözlenir, ancak osteoblast seviyesinde birikmiş kemik azalır ve osteoblast sayıları ile telafi edilmez, böylece kemik kütlesi azalır.

Fibril seviyesinde, kollajen organizasyonundaki defekt sonucu olarak artan veya değişken fibril çapı ve fibril 'bükülmesine' karşı artan yatkınlık, artan mineral ve su içeriği ile ilişkili düzensiz bir matris oluşturur. Genellikle Oİ kemiğinde daha küçük olan mineral trombositleri, genellikle hipermineralizasyon ile sonuçlanan sıkı bir şekilde paketlenir. Moleküler seviyede, kollajen moleküllerinin enzimatik olmayan çapraz bağlanmasında, doku sertliğine ilave olarak bir artış da gözlenir. Bu çok seviyeli değişiklikler sonucu Oİ kemiği normal mekanik gerilme stresine karşı cevap veremez ve kırılmaya yatkınlık oluşur. Bu da kemikte bulunan büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin varlığını, hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını ve matriks mineralleşmesini etkiler (46).

2.4. OSTEOGENEZİS İMPERFEKTANIN PATOGENEZİ

2.4.1. KOLLAJEN MOLEKÜLÜNDE DEFEKTLER

2.4.1.1. COL1A1 ve COL1A2 GEN MUTASYONLARI VE GENOTİP/FENOTİP İLİŞKİSİ

Oİ Tip II, III ve IV, kollajen tip I monomerinde yapısal veya fonksiyonel bir defekte neden olan ve dominant negatif mekanizmaya sahip olan mutasyonlardan kaynaklanır. *COL1A1* ve *COL1A2*'deki mutasyonlar Osteogenezis Imperfecta veritabanında tarif edilmiştir ve şu anda rapor edilen 1.600'den fazla Oİ varyantı bulunmaktadır (<http://www.le.ac.uk/genetics/collagen>) (1). Mutasyonlar genellikle kantitatif ve kalitatif olarak iki kategoriye ayrılır.

Oİ vakalarının büyük çoğunluğu (~% 80 -% 85) otozomal dominant kalıtmı tip I kollajende heterozigot bir mutasyona sahiptir (1). Genellikle hasta çocuk ailede ilk Oİ vakasıdır. *De novo* mutasyonlar oldukça sıktır ve muhtemelen kollajenin kodladığı dizisinin yüksek CpG içeriği ile ilişkilidir (47). Tekrarlayan otozomal dominant *IFITM5* mutasyonunun, c.-14C> T, Oİ vakalarının% 4-5'ini oluşturduğu bildirilmektedir (48).

Oİ vakalarının *COL1A1/COL1A2* dışındaki çeşitli gendeki mutasyonlar yaklaşık % 20'sini oluşturduğu bilinmektedir (49).

Mutasyonların sonucu, normal yapıya sahip kollajen tip I'in sadece miktarının azalması (haployetmezlik) ile, Oİ tip1 hafif formu ortaya çıkar; genellikle de, *COL1A1*'deki mRNA instabilitesine ve fonksiyon kaybına yol açan (null allel) heterozigot varyantlardan kaynaklanır. Çerçeve kaymasına ve nonsense mutasyonlara yol açan küçük delesyon/duplikasyonlar 'null' allellerinin yaygın bir nedenidir (50). Nadir görülen tüm gen delesyonları da tarif edilmiştir (51). *COL1A1*'deki bazı splice bölge ve C-propeptid mutasyonları da haployetmezliğine yol açabilmektedir. *COL1A2*'de bulunan heterozigot "null" aleller henüz tarif edilmemiştir ve normalden ayırt edilemeyen bir fenotiple sonuçlandığı düşünülmektedir.

Nadir görülen otozomal resesif kalıtılan Ehlers-Danlos sendromunun kardiyak valvüler tipi, *COL1A2* genindeki homozigot 'null' mutasyonlardan kaynaklanır; sadece pro- α 1 zincirlerinden oluşan Tip I kollajen, pro- α 2 zincirlerinin yokluğunda, kemik bütünlüğünü neredeyse normal bir şekilde monte edilip korunabildiği düşünülmektedir (52,53).

Eğer mutasyon kollajenin miktarını değil de yapısını bozan mutasyonlar ise daha ciddi klinik tipleri ortaya çıkar ve anormal bir protein (dominant negatif etki) üretimi ile sonuçlanan mutant ve normal alfa zincirlerinden oluşan kollajen tip I toplanması ile karakterize edilir. Kalitatif mutasyonlar, fibrillogenesezi bozar ve genellikle, kemik matrisi üzerindeki artan etkileri nedeniyle kantitatif değişikliklerden daha büyük bir fenotipik etkiye sahiptir (19,54).

En sık rastlanan mutasyonlar, katlanmayı bozan, zincirin yayılmasını yavaşlatan ve proteinin aşırı modifikasyonuna yol açan üçlü sarmal alandaki glisin kalıntısını değiştirilmesidir. Glisin amino asidin Serine dönüşmesi, kollajen tip I alfa 1 ve alfa 2 zincirlerinin üçlü sarmal bölgelerindeki en yaygın görülen mutasyon tipidir, bununla birlikte daha şiddetli bir fenotipe yol açmaktadır. Kollajen tip I üçlü sarmalının Gly-X-Y dizisini bozan herhangi bir mutasyon, kollajen fonksiyonunun bozulmasına neden olur. Bu tür mutasyonlar, üçlü sarmal oluşumunu, stabilitesini ve hücre dışı matris ile etkileşimlerini bozar. Splice bölgenin değişmesi, ekzon atlama, delesyon/duplikasyon ve C-terminal propeptidinde değişiklikler sonucu kalitatif mutasyonlara yol açmaktadır (Şekil 2-5). Alfa 2 zincirinin C-terminal ucundaki mutasyonlar, ekstremitte anomalileri ve intrakranial kanamayla ilişkilidir.

Genel olarak, fenotipin şiddeti, etkilenen alfa zincirine, mutasyonun pozisyonuna, değişmekte olan amino asidine veya bu üç değişkenin kombinasyonuna bağlıdır. Üçlü sarmal alanındaki mutasyonlar, glisin amino asidinin değişmesine neden olan nokta mutasyonlar ve splice site bölgenin değişimine neden olan mutasyonlar olarak iki gruba ayrılır. Glisin kalıntılarının, yüklü bir yan zincire sahip olan amino asitlerle (aspartik asit, glutamik asit ve arginin) ve dallanmış bir polar olmayan yan zincire sahip olan valin ile değiştirilmesi, alanine göre, genellikle ciddi bir fenotipe neden olur. Bu modelin gelişmesi, mutasyon sayısının artması ile sonuçlanır (19). Zincirin $\alpha 1$ 'de, sadece ölümcül mutasyonların tanımlandığı iki bölge vardır (amino asit pozisyonları 691-823 ve 910-964). Bunlar, moleküller arası çapraz bağlanma ve fibriller zincirinin etkileşiminde rol oynadığını gösteren ana ligand bağlama bölgelerine tekabül eder. A2 zincirindeki sekiz ölümcül bölge, proteoglikan bağlanması için gerekli alanlara karşılık gelen kümelerde meydana gelir. Bu durum fibrillerin matris ile etkileşiminin önemini göstermektedir (55).

Splice site alanındaki değişiklikler, zincir montajında bir gecikmeye ve daha sonra prokollajen trimerin aşırı modifikasyonuna neden olmaktadır (56).

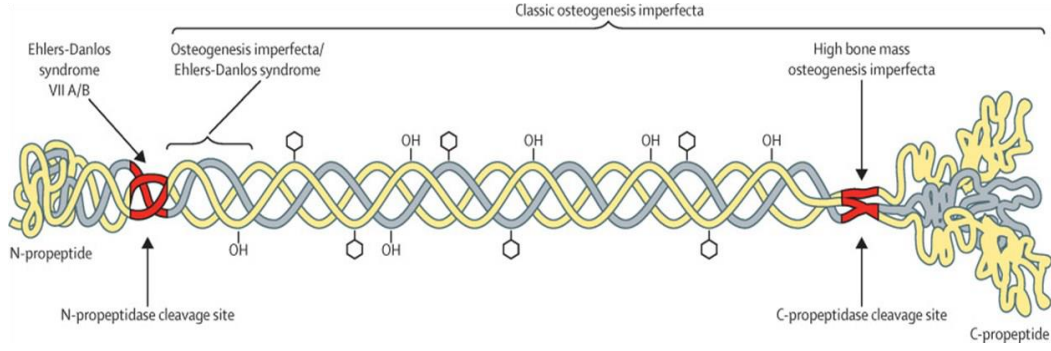
Heliks bölgedeki glisin olmayan sübstitüsyonların fenotipik etkisinin ve birçok değişikliğinin patojenitesini tahmin edilmesi daha zordur. Fakat arjinin amino asidi sisteine dönüşmesinde klasik Ehlers-Danlos Sendromu (EDS) (57), infantil kortikal hiperostozis (Caffey disease) (58) ve erken yetişkinlik döneminde arteriyel rüptür yatkınlığı olan EDS (59) ile ilişkili olarak bildirilmiştir. Ayrıca üçlü sarmal alanın ilk 120 amino asidini etkileyen mutasyonun mavi sklera görünmesine yol açtığı da kaydedilmiştir.

Heliks dışındaki mutasyonlar çeşitli fenotiplerde tanımlanmıştır (Şekil 2-5). C-propeptid domaini mutasyonlarının zincir düzeneğini geciktirdiği ve aşırı modifiye edilmiş (ancak stabil) prokollajen salgılanmasını azalttığı gösterilmiştir. Bu alandaki mutasyonlar hafif Oİ'de (60) ve yüksek kemik kütlesi ile karakterize Oİ varyantında tarif edilmiştir (61).

Pro- $\alpha 1$ veya pro- $\alpha 2$ bölünme tanıma bölgelerindeki mutasyonlara bağlı olarak C-propeptidin tutulmasının, yüksek kemik kütlesi ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (62). Bu bölgedeki mutasyonların, yüksek bir kemik kütlesi varyantı Oİ'ye neden olduğu kesin mekanizma hala belirlenmemiştir. Bu bölgedeki mutasyonların neden olduğu hem C-propeptidinin tutulmasının hem de aşırı modifiye edilmiş moleküllerin varlığının, klasik Oİ'den farklı olarak kemiğin mineralizasyon yoğunluğunun artırılması ile karakterizedir. C-propeptid domainleri ayrıca ekstraselüller matristeki sinyal molekülleri olarak işlev görür, bu nedenle de mineralizasyonu etkiler.

N-propeptidindeki mutasyonlar, 'null' bir alel ile sonuçlananlar dışında, sinyal peptidi bölünme bölgesini etkileyen bir mutasyon haricinde henüz tanımlanmamıştır (63). Dolayısıyla bu domaindeki mutasyonlar ile ilişkili bir fenotip bilinmemektedir. Ekzon 6'da yer alan proteaz bölünme bölgesini etkileyen mutasyonlar, bölünme veriminin azalması ve N-propeptidin tutulması ile sonuçlanan, artrokolasik EDS ile ilişkilidir. Örtüşen EDS/Oİ fenotipi, bitişik N-propeptid bölünme bölgesinin ikincil yapısı ve üçlü sarmalın üzerindeki etkileri nedeniyle pro- α -zincirinin ilk 90 amino asitindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Bu hastalar kemik kırılabilirliğinin yanı sıra EDS semptomlarını da gösterirler (64). Dermatosparatik EDS, N-proteinaz enzim geni *ADAMTS2*'deki mutasyonlara bağlı olarak hem pro- $\alpha 1$ hem de pro- $\alpha 2$ N-propeptitlerinin bölünmemesinden kaynaklanır.

Tip I kollajen genlerindeki mutasyonlarla ilişkili olduğu bildirilen geniş fenotip spektrumu, bu hastalıkta genotipe bakarak fenotipik sonucun öngörülmesindeki zorluğu göstermektedir.



Şekil 2-7. Farklı klinik fenotipler prokollajen tip I proteini boyunca belirli pozisyonlardaki mutasyonlarla ilişkilidir.

Üçlü heliks boyunca ve C-propeptid alanlarındaki mutasyonlar, Osteogenesis Imperfecta (OI) ile ilişkilidir. OI/Ehlers-Danlos sendromunun örtüşen fenotipik varyantı, N-propeptid bölgesindeki amino asit varyasyonlardan kaynaklanır. N-propeptid bölünme bölgesindeki mutasyonlar artrokolajik Ehlers-Danlos sendromuna (EDS VII) neden olur. Yüksek kemik kütleli OI varyantları, C-propeptid ayrılma bölgesindeki mutasyonlarla ve C-propeptid alanı içindeki yanlış-mutasyonlarla ilgili olarak tarif edilmiştir. C-propeptid bölünme bölgesindeki mutasyonlar ve C-propeptid alanındaki missense mutasyonlarla ilişkilidir. Hexagons- hidroksil lisin bağlı şeker molekülleri. OH- Prolin veya lisin kalıntılarına bağlı hidroksil grubu (65).

OTOZOMAL RESESİF TİPLERİ VE YENİ SINIFLAMA

Başlangıçta otozomal dominant kalıtım tip I ve IV için ve tip II ve III için resesif kalıtım olarak düşünüldü. Ardından, tip I kollajen (*COL1A1* ve *COL1A2*) kodlayan genlerdeki dört Oİ tipindeki dominant mutasyonların tanımlanması ile, Oİ'nin otozomal dominant bir hastalık olduğu kabul edildi. Bazı ailelerde ağır Oİ (tip II/III)' nüksü germline mozaizmden kaynaklandığı ve %10'dan daha az bir risk olduğu öne sürülmüştür (66). Daha sonraki verilere göre, ciddi Oİ vakalarının çoğunun *COL1A1* ya da *COL1A2*'deki *de novo* dominant mutasyonlardan kaynaklandığını ve hasta bir çocuğa sahip olan çiftlerin %16'sında somatik mozaizim gözlemlendiğini doğrulamaktadır (67). Sillence sınıflaması 21. yüzyılın başında V, VI ve VII tipleri olarak adlandırılan orta ila şiddetli fenotiplerin üç farklı klinik grup şeklinde genişletildi (68,69,70). Bu tipler, farklı klinik, histolojik bulgular ve veya bilinmeyen genetik etiyolojiye bağlı olarak tanımlanmıştır:

Tablo 2-1. Osteogenezis imperfektaya neden olan genler, kalıtım şekli ve kliniğin ağırlığı

Oİ Tipi	Gen(Protein)	Kalıtım	Klinik
KOLLAJENİN SENTEZİ VE YAPISI BOZUKLUĞU			
I	<i>COL1A1</i> (Kollajen Tip 1)	OD	Hafif
II	<i>COL1A1/COL1A2</i> (Kollajen Tip 1)	OD	Letal
III	<i>COL1A1/COL1A2</i> (Kollajen Tip 1)	OD	Ağır
IV	<i>COL1A1/COL1A2</i> (Kollajen Tip 1)	OD	Orta
KEMİK MİNERALİZASYON BOZUKLUĞU			
V	<i>IFITM5 (BRIL)</i>	OD	Orta/Ağır
VI	<i>SERPINF1 (PEDF)</i>	OR	Ağır
KOLLAJENİN MODİFİKASYON BOZUKLUĞU			
VII	<i>CRTAP (CRTAP)</i>	OR	Ağır/Letal
VIII	<i>LEPRE1 (P3H1)</i>	OR	Ağır/Letal
IX	<i>PPIB (CyPB)</i>	OR	Orta/Letal
KOLLAJENİN İŞLENME VE ÇAPRAZ BAĞLANMA BOZUKLUĞU			
X	<i>SERPINH1 (HSP47)</i>	OR	Ağır/Letal
XI	<i>FKBP10 (FKBP65)</i>	OR	İlerleyici
XII	<i>BMP1 (BMP1/mTLD)</i>	OR	Ağır
OSTEOBLAST FARKLILAŞMASI VE İŞLEVİ BOZUKLUĞU			
XIII	<i>SP7 (OSX)</i>	OR	Ağır
XIV	<i>TMEM38B (TRIC-B)</i>	OR	Orta/Letal
XV	<i>WNT1 (WNT1)</i>	OR/OD	Orta/Ağır
XVI	<i>CREB3L1 (OASIS)</i>	OR	Ağır
XVII	<i>SPARC (osteonectin)</i>	OR	Orta/Ağır
XVIII	<i>FAM46A</i>	OR	
IX	<i>MBTPS2 (S2P)</i>	XR	Orta/Ağır

2.4.2. KEMİK MİNERALİZASYONUNDA DEFEKTLER

RESESİF TİPLER VE GENOTİP/FENOTİP İLİŞKİSİ

Tip V: Oİ, kırılma veya ameliyat sonrası hiperplastik kallus oluşumu, önkolun kemiklerarası zarlarının kalsifikasyonu ve polarize ışık altında lamellerin ağ benzeri görünümü ile karakterize edilir (68). Otozomal dominant kalıtmı *IFITM5* mutasyonu ile ortaya çıkar. Etkilenen bireyler orta ile şiddetli arasında değişen iskelet deformitesi gösterir (71). Oİ vakalarının yaklaşık %5'ini oluşturur. Etkilenen tüm bireyler aynı tekrarlayan mutasyona sahiptir. Oldukça değişken fenotip ile prognozu orta derecedir. Klasik triad, radyografilerde hipertrofik kallus, kalın metafizi ve önkol interosseus zarının ossifikasyonunu içerir. Ayrıca radyal kafanın yüksek çıkık/subluksasyon sıklığı görülür.

Bağlantı analizi ve tüm ekzom dizilemesi sonucu, *IFITM5* geninin 5'-UTR bölgesinde tek bir mutasyonun hastalık sebebi olduğu tespit edilmiştir (alternatif ismi kemikle sınırlı interferon ile indüklenen transmembran protein benzeri, *BRIL*). c.-14C>T mutasyonunun, proteinin amino ucuna beş amino asit (Met-Ala-Leu-Glu-Pro) içeren bir dizi eklenmesine sebep olan yeni bir çerçeve içi başlangıç kodonu oluşturduğu transfeksiyon çalışmaları ile doğrulanmıştır. *BRIL*, gen ekspresyonu ve protein lokalizasyonunun iskelet dokusu ile sınırlı olması nedeniyle, bu mutasyonun muhtemelen kemik oluşumunun düzensizliğine yol açtığını düşündürmektedir (72,73). Özellikle, altta yatan mekanizmanın aydınlatılması daha fazla çalışmayı gerektirse de, hiperplastik kallus oluşumuna ve membranların ossifikasyonuna yol açan bir “fonksiyon kazancı”nın söz konusu olduğu öne sürülmektedir.

Oİ tip V'li 42 kişiden oluşan bir çalışmada, bu tek mutasyon için bile önemli fenotipik değişkenlik bildirilmiştir (74). Bu bulgu, 12 aileden 17 kişinin etkilendiği bir diğer çalışmada da ailelerin içinde ve arasında belirgin bir fenotipik değişkenlik gözlemlendiği diğer kohortta da doğrulanmıştır (48).

IFITM5 genindeki bir diğer tanımlanan mutasyon, c.119C>T, p.(Ser40Leu) atipik şiddetli Oİ'ye yol açmaktadır. Fenotipik ve histolojik bulgular Oİ tip VI'yi düşündürmektedir, *SERPINF1* analizi negatif sonuçlanmıştır.

Tip VI: *SERPINF1* gen mutasyonu ile oluşan bu tipte, etkilenen bireyler doğumda normal görünür ve 1 yaş civarında ilk kırığı ortaya çıkar. Daha sonra, giderek artan sayıda kırıklar, ciddi eğrilme ve skolyoz ile deformiteler oluştur. Ligament gevşekliliği, femoral bowing, modere-ciddi skolyozis, kemik biopsisinde lamellerin fish scale görünümü

mevcuttur. Sklera, diş ve işitme normaldir. Etkilenen bireyler bifosfonat tedavisine iyi cevap vermezler. Prognoz orta derecededir.

Oİ tip VI'lı bireyler doğumda sağlıklı, fakat 4-18 ay arasında belirgin şekilde uzun kemik kırıkları, şiddetli vertebral kompresyon kırıkları ve düşük kemik mineral yoğunluğu ortaya çıkmaktadır. Karakteristik histolojik bulgular, düşük mineralizasyona sahip osteoid ve düzensiz kemik matriksi ile "balık pulu" görünümündedir (69,75).

Tip VII: Otozomal resesif kalıtım gösteren, prenatal başlangıçlı ağır tipidir. İskeletin tutulumu ve klinik tablosu II ve III Oİ tiplerine benzer. Yenidoğan döneminde kırıklar, büzüşmüş ve eğri uzun kemikler, ciddi boy kısalığı, rizomeli, koksa vara ve beyaz sklera karakteristik bulgulardır. Prognozu ağırdır. Etkilenen çocukların çoğu, solunum yetmezliği nedeniyle yaşamın ilk 5 yılı içinde kaybedilirler.

Quebec'te akraba evliliği olan ailede, tip VII olarak adlandırılan farklı bir Oİ tipi tanımlanmıştır (70) ve fenotipten sorumlu genin *CRTAP* olduğu belirlenerek Oİ'den sorumlu genler ile ilgili bilginin genişletilmesinde kilit rol oynamıştır (76). Bu ailedeki en belirgin klinik özellikler: şiddetli rizomelia ve koksa vara varlığıdır. Dentinogenezis imperfekta, ligament gevşekliği veya işitme bozukluğu tespit edilmemiştir ve skleraların minimal seviyede mavimsi olduğu belirtilmiştir. Etkilenen bireylerin, intron 1'deki bir c.472-1021C>G *CRTAP* mutasyonu için homozigot oldukları ve bu değişimin kriptik kırılma bölgesi yaratarak 73bp uzunluğundaki dizinin ekzona dahil edilmesine sebep olduğu tespit edilmiştir.

Rapor edilen *CRTAP* mutasyonlarının çoğu, proteinin yokluğunu veya seviyelerinde belirgin bir azalmaya sebep olan işlevsel bir bozukluğa yol açmaktadır. *CRTAP* eksikliği ile ilişkili fenotipler, rizomelik kısalma, uzun kemiklerin eğriliği ve gri/beyaz sklera dahil ciddi şekilde deformiteden ölümcül olabilen spektruma yayılmaktadır. İskelet anomalileri genellikle doğum öncesi ve erken yenidoğan döneminde tespit edilebilir. Görece makrosefali de ortaya çıkabilir (77).

CRTAP genindeki homozigot mutasyonların tanımlanması ile Oİ tip VII'de resesif kalıtım olduğu doğrulanmıştır (76,78). Ardından, *P3H1* ve *PPIB* genlerinde resesif olarak kalıtılan fonksiyon kaybı mutasyonları tanımlanmıştır (78,79,80). *P3H1* ve *PPIB* genlerindeki mutasyonlar, sırasıyla Oİ Tip VIII ve IX ile ilişkilendirilmiştir. Bugüne kadar Oİ ile ilişkili genlerin sayısı 19'dur ve tip I kollajen biyosentezinde, mineralizasyon ve osteoblast gelişimi ve kemik homeostazında yer alan genleri kapsar (Tablo 1-1).

TipVIII: Oİ Tip VII'e benzer ağır tipidir. *LEPRE1* mutasyonu ile ortaya çıkar. Bu tipte çok geniş fontanel, yuvarlak yüz, beyaz sklera, grafide yaygın osteopeni, wormian kemik, platispondili, kifoskolyoz, ince uzun kemikler, radyal, tibial ve femoral bowing, bulböz metafiz, uzun falank ve kısa metafizler ile karakterizedir.

Mutasyonlar genellikle işlevsiz bir allel ile sonuçlanır ve *CRTAP* ile ilişkili Oİ ile örtüşen ölümcül fenotipten orta derecede deformiteye kadar etkilere yol açabilir. Kemiğin aşırı eksik mineralizasyonuna, büyüme eksikliğine ve kemik kırılma eğilimine yol açmaktadır (2). *P3H1*'de founder mutasyonu olan c.1080+1G>T, Batı Afrikalılarda %1.5 ve Afrikalı Amerikalılarda %0.4 sıklığında bildirilmiştir. Sık rastlanan 232delC; p.Gln78Serfs*30 mutasyonu İrlandalı göçmenlerde gözlenmemiştir (81).

Tip IX: Rhizomeli yokluğu dışında, çoğu VII/VIII tiplerine benzer belirtilerle ölümcül olan çok az sayıda vaka kaydedilmiştir. Daha şiddetli tip IV Oİ'ye benzer şekilde hafif fenotiplerle iki olgu bildirilmiştir. Skleraları beyaz, dişleri normal, rizomasi yoktur.

PPIB, *P3H1/CRTAP/CyPB* kompleksindeki üçüncü protein olan siklofilin B proteinini (CyPB) kodlar. Bu gende sınırlı sayıda mutasyon bildirilmiştir. Fakat bunların, prolin 1164'ün 3'-hidroksilasyonunda azalmaya ve tip I kollajenin aşırı modifikasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (77). *PPIB* ile ilişkili Oİ için klinik bulgular perinatal ölüm ile rizomelia olmadan orta şiddette veya uzun kemiklerin şiddetli deformitesine kadar değişebilir (67). İlginç bir şekilde, Oİ'ye yol açan mutasyonlar, 3'-hidroksilasyon kompleksini kodlayan her üç gende de tanımlanmış olmasına rağmen, prolin 1164'ün kendisini etkileyen varyantlar henüz tanımlanmamıştır.

Oİ Tip X ve XI, *SERPINH1* ve *FKBP10* genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (82,83,84).

Tip X: Klinik ağırdır, Oİ Tip III'e benzer. *SERPINH1*'deki missens mutasyonların neden olduğu iki resesif Oİ vakasında üçgen yüz, göreceli makrosefali, mavi sklera, mikrognați, kısa eğri uzuvlar, ince kaburgalar ve çoklu kırıkları içeren klinik özellikler bildirilmiştir (83,85). *SERPINH1* geninde çerçeve kayması mutasyonu saptanan bir olguda hidranensefali bildirilmiştir (86). Ayrıca rapor edilen üç hastada, makrosefali, yüksek ve belirgin alın, yüzünde orta hat hipoplazisi, mavi sklera, DI, eklem gevşekliliği ve skolyoz bulguları tanımlanmıştır. Bu makaledeki iki proband yenidoğan döneminde dönemde pulmoner komplikasyonlardan kaybedilmiştir.

Tip XI: Eklem gevşekliği ve skolyoz ile birlikte şiddetli deforme edici tipidir. Osteogenezis imperfekta ile epidermolizis büllozanın birlikte olduğu tiptir. *FKBP10* gen mutasyonu ile ortaya çıkar. *FKBP10* geni aynı adlı proteini kodlamaktadır. Bu proteinin kollajen katlanmasında rol alan önemli bir şaperon fonksiyonu vardır. 2010 yılında *FKBP10* gen mutasyonları ilk önce Oİ'da tanımlanmıştır (28). Kısa süre sonra aynı gen, büyük eklemlerde konjenital kontraktürler, az sayıda kırıklar ve osteopenia ile birlikte seyredilen Bruck sendromu tip I (*BRKS1*) ile ilişkilendirilmiştir (87). Bu genlerin protein ürünleri, HSP47 ve FKBP65, üçlü sarmal prokollajen moleküllerinin doğru şekilde katlanmasında rol oynar ve kollajene özgün şaperon fonksiyonu ile kollajen sentezine yardım ederler. Oİ sınıflamasında yakın zamanda tanımlanan osteoblast farklılaşmasını ve fonksiyonunu değiştiren mutasyonlardır.

FKBP10 genindeki yeni mutasyonlar ilk olarak, Alanay ve ark. tarafından orta derecede şiddetli Oİ beş akraba evliliği Türk ailesinden oluşan bir kohort ve ilerleyici deformasyonlu Oİ'ye sahip Meksikalı bir aile rapor edilmiştir (82). Buna karşı olarak, diğer araştırmacılar tarafından bildirilen vakalar Bruck sendromlu hastalardır (29,87).

Bu gende mutasyona sahip bireyler arasında aile içi fenotip varyasyonları - bazı bireyler Bruck sendromuna sahipken diğerleri Oİ geliştirdikleri – bildirilmiştir (88).

FKBP10 ve *PLOD2* mutasyonlarının aile içi ve farklı aile bireyleri arasındaki geniş fenotip spektrumuna yol açması, Bruck sendromu ile Oİ fenotiplerinin örtüştüğünü ve Bruck sendromunun ayrı bir hastalık olmaktan çok Oİ'nin bir alt tipi olarak değerlendirilmesi gerektiğini desteklemektedir. Ayrıca, *FKBP10* ve *PLOD2* mutasyonlarına sahip bireyler arasındaki örtüşen fenotip, bu iki proteinin fonksiyonel etkileşimine bağlı telopeptid lizil hidroksilasyonunun bir sonucu olabilir.

Fenotip örtüşmesini destekleyen bir başka bulgu, Yuik Eskimolarında tespti edilen p.(Tyr293del) founder mutasyonudur. Bu mutasyon, bir otozomal dominant konjenital kontraktür bozukluğu olan Kuskokwin sendromuna neden olmaktadır. Özellikle alt gövdeyi etkileyen ve progresif olan kontraktürlere ek olarak, etkilenen bireylerin osteopenik veya osteoporotik omurlar, kısa boy ve çoğunda hafif travma sonucu kırıkları olduğu bildirilmiştir (89).

Helikal bölgedeki lisil hidroksilasyonu etkileyen *PLOD1* mutasyonları, kifoskoliyotik Ehlers Danlos Sendromu ile ilişkilidir. Bu durum, hiperekstan ve kırılğan cilt, kolay morarma, hiper mobil eklemler, kas hipotonisi ve ilerleyici skolyoz ile karakterizedir.

Optik glob rüptürü riskinde artış olan skleral kırılabilirlik da belirgindir, ancak kemik kırılabilirliği mevcut değildir.

Tip XII: *SP7* genin sorumlu olduğu bu tip, tekrarlayan kırık, kemik deformasyonları, jeneralize osteoporoz, DI olmadan dişlerin gecikmeli çıkması, beyaz sklera olan bir çocukta rapor edilmiştir. *SP7/OSX* geni spesifik protein 7 ya da osteriks'i kodlamaktadır. Bu protein bir transkripsiyon faktörü olup, osteoblast farklılaşması ve osteosit maturasyonunda rol oynamaktadır. Bu genin mutasyonları ise Oİ Tip-XII ile ilişkilendirilmiştir (90).

Yakın zamana kadar, *SP7*'deki bir homozigot çerçeve kayması mutasyonu, proteinin üçüncü çinko-parmak motifi dahil olmak üzere son 81 amino asidinin kaybıyla sonuçlanan tek bir resesif Oİ vakasında rapor edilmiştir. Etkilenen birey, kırık, hafif kemik deformasyonları ve beyaz sklera içeren orta derecede şiddetli Oİ'ye sahip olarak tanımlanmıştır ve mutant proteinin, ölümcül bir fenotipe yol açmayacak düzeyde fonksiyon gösterebildiği düşünülmüştür (90). Kısa boylu, osteoporozlu ve hafif darbe kırıkları olan kardeş bireylerde tespit edilen c.946C> T; p.(Arg316Cys) mutasyon, orta veya ileri derecede işitme kaybına yol açabilmekte ve *SP7* ile ilişkili Oİ'nin ayırt edici bir özeliği olabileceği gösterilmektedir (91).

Tip XIII: *BMP1* gen mutasyonu ile oluşan bu tipte ağır kemik deformasyonları, osteoporoz, multipl kırıklar, kifoskolyoz ve umbilikal fıtığı görülmektedir. Boy kısalığı ve rizomeli tipiktir, ayrıca hafif mavi sklera, dişler normaldir. Etkilenen bazı kişilerde yüksek kemik yoğunluğu DEXA z-skoru vardır.

Kemik morfogenetik protein 1 (*BMP1*), astacin ailesinin bir üyesi olan multidomain metalloproteazdır ve büyüme faktörlerinin aktivasyonu, polipeptitlerin yıkımı ve hücre dışı proteinlerin işlenmesinden sorumludur. *BMP1*, C-propeptidin prokollajen tip I'den proteolitik olarak kesilmesinden sorumludur. Bu işlem, kollajen fibrillerinin kendiliğinden birleşmesini indükler ve böylece lif oluşumunu ve matris bütünlüğünü etkiler. *BMP1* ayrıca bazı TGFβ ailesi proteinlerinin dolaylı aktivasyonu yoluyla dorsal-ventral patern oluşumunu da etkilediği bilinmektedir (92).

BMP1/mTLD ayrıca, küçük lösinden zengin proteoglikanlardan (SLRP'ler) olan biglikan, decorin ve osteoglikanın N-terminal peptitlerini de uzaklaştırır, ve bu proteoglikanlar da lizil oksidaz ve lizil oksidaz benzeri proteinlerin öncül formlarını aktive ederek moleküller arası çapraz kovalent bağların oluşmasını ve kollajen fibrillerinin boyutu ve yapısını etkiler. *BMP1* geninin sinyal peptidindeki bir mutasyonun, kemik mineral

yoğunluğunda bir artışla ilişkili kemik kırılabilirliği ile ortaya çıkan resesif Oİ bildirilmiştir. Bu p.Gly12Arg değişimi, zebra balıklarında belirgin bir şekilde azalmış posttranslasyonel N-glikosilasyona neden olmaktadır, BMP1'in bozuk aktivitesine ve sekresyonuna yol açtığı tespit edilmiştir (92,93).

Buna karşılık, proteaz bölgesindeki bir missens p(Phe249Leu) mutasyonun, tekrarlayan kırıklara, genel kemik deformitesine, osteopeniye ve Wormian kemiklerin oluştuğu hafif Oİ'ye yol açtığı raporlandırılmıştır. Mutant proteinin in-vivo'da proteolitik aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (94). Rapor edilen bu durumlar arasındaki fenotipik farklılık, özellikle sinyal peptidi mutasyonunun, tip I kollajen C-propeptidindeki mutasyona sahip hastalardaki gecikmiş sekresyona bağlı yüksek kemik kütlesi fenotipine benzer olması nedeniyle, iki mutasyonun farklı fonksiyonel sonuçlara yol açtığı düşünülebilir. Diğer mutasyonlar tanımlandıkça, bu gendeki mutasyonlar ile tip I kollajen C-propeptidindeki mutasyonlar arasındaki ilişki ve bunların fonksiyonel sonuçları daha belirgin hale gelecektir.

Tip XIV: İlk olarak Bedevi popülasyonunda kurucu *TMEM38B* gen mutasyonu olarak tanımlanmıştır. Uzun kemiklerde hafif bowing ve kırıklar ile birlikte orta derece fenotipi bildirilmiştir. Skleralar mavi olabilir, işitme ve dişler normaldir. Akraba evliliği İsraili Bedevi ve Suudi ailelerde *TMEM38B* genindeki hastalığa yol açan mutasyonların tanımlanması resesif Oİ ile ilişkili biyokimyasal mekanizmaları daha da genişletmiştir.

Tip XV: *WNT1* gen mutasyonu ile ortaya çıkan Oİ OD ve OR forma ayrılır. Heterozygosit durumu osteoporoz ile sonuçlanır; homozigozite ilerleyici kemik kırılabilirliği, uzun kemik deformitesi, osteopeni, kısa boy ve kifoskolyoz ile ciddi Oİ'ye neden olur. WNT sinyal proteinlerinde, kemik kütlesini etkileyen mutasyonlar, şimdiye kadar sadece kanonik WNT yolağıyla ilişkilendirilmiştir (Şekil 2-6), ancak tüm genom ilişkilendirme çalışmaları, kanonik ve kanonik olmayan WNT ligand genlerinde ortak tek nükleotid polimorfizmlerinin osteoporozla yakınlıkla ilişkilendirmiştir. *WNT1*'deki mutasyonlar, daha önce Oİ tip IV klinik tanısı almış üç aileden 4 kişide tanımlanmıştır. Bu bireylerin fenotipi birden fazla uzun kemik kırığı, çoklu vertebra sıkışma kırığı ve kısa boy içermektedir. Wnt1 knockout farelerde beyin gelişiminde ciddi anomaliler tanımlanmıştır ve hasta grupta da nörolojik bulgular gözlenmemekle beraber, akraba evliliği ailenin iki kardeş çocuğunda kas hipotonisi tespit edilmiştir (95).

Diğer *WNT1* mutasyonları, Oİ tip III'ten ayırt edilemeyen orta derecede şiddetli, ilerleyici fenotiplere sahip dört aileden etkilenen yedi kişide tanımlanmıştır. Etkilenen

bireyler, tekrarlayan kırıklar, kemik deformitesi ve kısa boy ile başvurmuştur, ancak işitme ve diş oluşumunun etkilenmediği bildirilmiştir. Bu ailelerin üçünde, etkilenen bireylerin gelişimsel gecikme yaşadıkları bildirilmiştir. Fakat bunun sadece *WNT1*'deki mutasyonlara bağlı olup olmadığı net değildir (96). *WNT1*'in kanonik WNT sinyal yolağındaki rolünün fonksiyonel doğrulanması, ekspresyon vektörleri ve çift lusiferaz reporter deneyleri kullanılarak Keupp ve arkadaşları tarafından sağlanmıştır. Mutasyonların homozigot fonksiyonel kaybının WNT/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonunun neredeyse tamamen bozulmasıyla sonuçlandığı ve sebep olduğu fenotip, orta ile ileri derecede deformasyona sahip bireylerde gözükken Oİ ile uyumludur (97). *WNT1*'in kemik homeostazındaki kilit rolü, hem fonksiyon kazanımı hem kaybının modellendiği fare deneylerinde Joeng ve ark. yaptığı deneylerin sonuçlarıyla desteklenmiştir. Elde ettikleri sonuçlar, farelerde fonksiyon kaybının, azalmış kemik kütlesi ve primer olarak azalmış osteoblast aktivitesi ile ilişkili hafif darbe kırıklarla sonuçlandığını göstermiştir. Buna karşılık, işlev kazandıran mutasyonlar (aşırı ifade), mTORC1 sinyal yolağı üzerinden osteoblast sayılarını arttırmaktadır (98).

Otozomal dominant erken başlangıçlı osteoporoz, heterozigot *WNT1* mutasyonuna bağlı fonksiyon kaybı olan bazı ailelerde bildirilmiştir. Etkilenen bireylerin klinik özellikleri düşük KMY ve kırıklar içermektedir (97,99,100). Bu, WNT sinyal yolağındaki mutasyonların, mutasyonun dominant veya resesif bir şekilde kalıtılmasına bağlı olarak değişen kemik kırılabilirlik fenotiplerine yol açtığını doğrulamaktadır. Ayrıca Oİ ile ilişkili genlerin osteoporoz gibi diğer kemik kırılabilirlik bozuklukları için etkileri olabileceğini vurgulamaktadır.

Tip XVI: *CREB3L1* geninden sorumlu tipi iki kardeşte bildirilmiştir. Birinde birden fazla ekstremite kırığı vardır. İkinci kardeşte, 19 gebelik haftasında ince kaburgalar ve eğri humerus ve femur kemik kırıkları ile seyredildi. Bu gendeki Oİ ile ilişkili olan mutasyon, tüm *CREB3L1* genini kapsayan bir homozigot delesyonu olan iki kardeşte tanımlanmıştır (101). Kardeşlerin intrauterin kırıklardan ciddi şekilde etkilendiği bildirilmiştir.

Daha yakın zamanda, bir c.934_936delAAG: p.(Lys312del) *CREB3L1* mutasyonu bir diğer akraba evliliği ailede tanımlanmıştır. Mutasyon, OASIS proteininin DNA-bağlanma bölgesini bozmakta ve salgılanan proteinleri ER ve Golgi arasında hareket ettiren COPII kompleksinin bir bileşeni olan *SEC24D*'nin aktivasyonu sağlanamamaktadır. C.934_936delAAG:p.(Lys312del) için homozigot olan bireyler, çoklu intrauterin kırıklara

ve düşük kafatası mineralizasyonuna sahipken, heterozigot bireylerde mavi sklera, osteopeni ve tekrarlayan kırıklar mevcuttur (102).

Tip XVII: *SPARC* geninde homozigot mutasyonla ortaya çıkar. Doğumda normal olan ve daha sonra vertebra kompresyonları, kas hipotonisitesi ve eklem hipermobilitesi, ciddi kemik kırıkları ve kifoskolyoz geliştiğini iki kişide bildirdi. Knockout fareler, intervertebral disk dejenerasyonu ve azalmış kas kütlesi ile birlikte ilerleyici osteoporoza yol açan kusurlu kemik oluşumuna sahiptir (103). *SPARC* genindeki mutasyonların neden olduğu otozomal resesif Oİ, iki kadın hastada tam ekzom dizilemesi ile tanımlanmıştır. Fenotipleri, doğumda belirgin bir iskelet anomalisine sahip olmadığı, ancak ilerleyici ciddi kemik kırılabilirliği geliştirmeleri ile Oİ tip VI'ya (*SERPINF1* mutasyonlarıyla ilişkili) benzemektedir (104). Bugüne kadar başka *SPARC* ile ilişkili Oİ vakası bildirilmemiştir.

Tip XVIII: Yeni bilinen *FAM46A(TENT5A)* geninde homozigot mutasyonla ortaya çıkan tipidir. Yaşamın ilk yıllarında çoklu kırıklar, uzun kemiklerde bowing, wormian kemikler, vertebra kompresyonu, mavi sklera ile karakterizedir (131).

Tip XIX: *MBTPS2 (S2P)* genden sorumlu, X'e bağlı kalıtılan tipidir. Kaburgaların ve uzun kemiklerin doğum öncesi kırıkları, üst ve alt ekstremitelerin bowing, generalize osteopeni, kifoskolyoz, pektal deformiteler ve kısa boy ile karakterizedir. *MBTPS2* geninde missens mutasyonlar, 2 geniş soyağacında, X'e bağlı orta ila şiddetli Oİ formunda tanımlanmıştır. Etkilenen bireylerden alınan kemik biyopsisi, $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ zincirlerinin lizin 87 hidroksilasyonunun düşük, düzensiz kollajen çapraz bağlanması ve kırılabilir kemik yapısına işaret etmiştir. Zorunlu taşıyıcı dişilerde etkilenme bildirilmemiştir, LP/HP oranının normal olması kemik metabolizması üzerinde minimum etkisi olduğunu göstermektedir (105).

Oİ GENETİK TANI ALGORİTMASI

Oİ vakalarının büyük çoğunluğu (yaklaşık %90) otozomal dominant kalıtmı tip I kollajen iki genindeki (*COL1A1* ve *COL1A2*) heterozigot bir mutasyonlara sahiptir (1). Oİ'nin genetik teşhisi için kademeli yaklaşım bulunmaktadır. Genel olarak ilk adım *COL1A1* ve *COL1A2* genlerin sekans analizi ile dışlanması önerilmektedir ve bazı durumlarda Oİ için yeterli bir test olabilir. Bu testini geçerli olduğu durumlar, Tip I kollajen ile ilgili varyantların sebep olduğu bilinen spesifik Oİ tipine özgü fenotipin ortaya çıkmasıdır; ayrıca *COL1A1* ve *COL1A2* ile sınırlandırılmasının anlamlı olduğu başka sebep, Oİ'nin şüphesinin düşük olduğu ve olası bir tanı olarak Oİ'yi ekarte etmek için yapılmasıdır. Bu aşamalı yaklaşım hala bazı klinik durumlar için uygun görünüp kullanılmaktadır (106). Bununla

birlikte yeni nesil dizileme platformlarının ve yüksek yoğunluklu array'in ortaya çıkması, Oİ dahil Mendelian bozuklukları ile ilişkili 100'den fazla genin hızlı bir şekilde tanımlanmasını sağlamıştır (107).

Oİ ile ilişkili yeni genler keşfedilmesi 2005'den bu yana hızla gelişmiş, ve şuanda OMIM veritabanında 19 tipi bulunmaktadır. Bu tür genetik olarak heterojen hastalıkların moleküler teşhisi, yeni nesil dizileme yoluyla hastalık genlerinin paralel olarak test edilmesiyle büyük ölçüde kolaylaştırılmaktadır. Bununla birlikte, spesifik hastalıklar için küçük gen panellerinden, ekzom ve hatta genom dizilimini içeren daha geniş panellere yönelik farklı yaklaşımlar uygulanmaktadır. Aday genler, genellikle işlevi doğrudan veya dolaylı olarak araştırılan özelliğin gelişimsel veya düzenleyici süreçlerini etkileyen genlerdir. Oİ'de bu genler, iskelet gelişimi ve homeostazında rol oynadığı bilinen biyolojik yollardaki genler olabilir. Uygun bir yolla tespit edilen varyantların anlamlandırılması, protein fonksiyonu üzerindeki etkisini doğrulamak için fonksiyonel çalışmalar gerektirse de, diğer gendeki varyantların anlamlandırılmasından daha kolay olacaktır.

Nadir durumlarda, dizileme ile tespit edilemeyecek kadar büyük olan patojenik kopya sayısı varyantları Oİ hastalarda bulunabilir. Bu tür varyantlar Oİ olan bireylerde yaklaşık %1 veya daha az patojenik varyantları temsil eder ve bugüne kadar en fazla *COL1A1* veya *COL1A2*'de bildirilmiştir (diğer Oİ ile ilişkili genlerde de görülebilmelerine rağmen). Bu nedenle, delesyon/duplikasyon analizini, eğer dizi analizi ile nedensel bir değişim tanımlayamazsa, özellikle Oİ Tip 1 hastalar için bir sonraki adım olarak ya da dizi analizi ile eşzamanlı bir test olarak multipleks ligasyona bağlı prob amplifikasyonu (MLPA) yöntemi kullanılır (106).

Akraba evliliği olan üç ailede Oİ vakasında homozigot bölgeleri tanımlamak için yüksek yoğunluklu tek nükleotid varyant analizi (SNV) ve ardından hedefli ekzom sekanslama çalışma sonucu *TMEM38B* geni keşfedilmiştir (35,36). Benzer şekilde, akraba evliliği bir aileden etkilenen tek bir bireyde, homozigot haritalama ve daha sonra aday gen dizilemesi yaklaşımı kullanılarak, *SP7* geni mutasyonu tanımlanmıştır (90). Dört kuşaklı bir ailede bağlantı analizi ve tüm ekzom dizilemesi, Oİ tip V'den sorumlu *IFITM5*'teki dominant mutasyonunun tanımlanmasını sağlamıştır (72). Bununla birlikte, etkilenen bireylerin sayısının az olduğu akraba evliliği olmayan aileler için veya görünürde *de novo* vakalar için, hastalıkla ilişkili genin tanımlanması, özellikle Oİ gibi genetik ve fenotipik heterojeniteye sahip hastalıklarda daha problemli olabilmektedir. Tüm ekzom dizilemesi ile tanımlanan

varyantların sayısı, etnik kökene bağı olarak ortalama 80.000'den fazla olabilir. Bu verileri filtrelemek, analiz ve çıktıların yorumlanması zor olabilir (108). Yaygın polimorfizmlerin dışlanması için verilerin filtrelemesinin ardından bile, çalışma tasarımına ve kullanılan filtreleme stratejisine bağı olarak birkaç yüz olası patojenik varyant tespit edilebilir. Sporadik vakalar için trio (proband ve ebeveynleri) analizi, *de novo* varyantlarını saptamaya yardımcı olabilir, ancak bir *de novo* varyantının, her kuşakta haploid genomda 108 bazda 1 oluşan varyant düşünülürse, hastalık sebebi olup olmadığına karar vermek çok zordur. Genel olarak, ekzom veri analizinde hali hazırda söz konusu hastalıkla ilişkili olduğu bildirilen genlerdeki varyantlar ilk adım olarak analiz edilmektedir (109).

Son zamanlarda Oİ ile ilişkili gen sayısının gen keşif teknolojisindeki son gelişmelerin bir sonucu olarak artmasına rağmen, Oİ hastalarının ~%5'inde sorumlu gen bilinmemektedir. Hem genetiğinin hem de altta yatan Oİ patogenezi mekanizmasının aydınlatılması, yeni ve gelişmiş tedaviler için hayati öneme sahiptir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

ÇALIŞMA GRUBU

Bu çalışma kapsamına 1993-2018 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Çocuk Genetik Bilim Dalı'nda tanı almış, takip ve tedavisi süren 79 aileden 47'si erkek (%58,8), 32'si kız (%41,2) birer hasta olmak üzere toplam 79 Osteogenezis imperfekta'lı indeks olgu alınmıştır.

Çalışma İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 83045809-604.01.02/ 01.11.2016 sayı ve tarihli kararı ile kabul edilmiştir.

Bu çalışmada klinik olarak tiplendirilmiş Oİ olgularında,

- Öncelikle *COL1A1* ve *COL1A2* genlerinde mutasyon dışlanması
- İkinci aşamada özgün tasarlanmış Panel-Gen'de, yeni nesil dizileme (YND) teknolojisi ile ilişkili genler incelenmesi
- Üçüncü aşamada, patolojik varyant saptanmayan olgularda MLPA yöntemi ile *COL1A1* ve *COL1A2* genlerinde büyük delesyon ve duplikasyon tipi mutasyonların araştırılması
- Bu yöntemlerle mutasyonların dışlandığı ailelerde TED yöntemi ile analiz yapılmış, kalıtım modeline ve yolak genlerine uygun biyoinformatik yaklaşımla daha önce bu hastalıkla ilişkilendirilmemiş olan yeni genlerin varlığı araştırılması planlanmıştır.

Genetik incelemeler İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Genetik, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

YÖNTEMLER

3.1.1. KLİNİK DEĞERLENDİRMELER

Klinik olarak Oİ tanısı almış hastaların Genetik Poliklinik dosyaları geriye dönük olarak tarandı. Hastaların öncelikle temel bilgileri kaydedildi (yaş, cinsiyet vs). Tüm hastaları klinik olarak sınıflayabilmek için aşağıdaki veriler Form 1 deki excel dosyasına kaydedildi.

Başlangıç Yaşı: Hastalığın kliniğinin ilk ortaya çıktığı yaş olarak kabul edilir. Bu yaş genellikle ilk kırığın meydana geldiği zamandır. Doğumda kırıkları olan hastaların başlangıç yaşı 1. gün olarak kabul edildi.

Akrabalık ve Aile Öyküsü: Anne-baba arasında akrabalık durumu araştırılır. Tüm hastaların sağlıklı anne/baba ve kardeşleri muayene edildi. İşitme testleri ve DEXA (Dual-Energy-Xray-Absorptiometry) sonuçları değerlendirildi. Aile öyküsünde tekrarlayan travmasız kırık kliniği olan, mavi sklera ve işitme kaybı olan hasta yakınları araştırma kapsamına alındı. Aile öyküsünün varlığı; en az bir aile yakınında Oİ, işitme kaybı veya erken yaşta osteopeni olması durumunda pozitif olarak işaretlenir. Aile bireylerinin tıbbi öyküleri, akrabalık ilişkileri ile kalıtım modeli belirlendi (OR, OD, XL).

Kırık Sayısı ve Lokalizasyonu: Hastalığın ağırlığının değerlendirilmesi için son muayene tarihindeki toplam kırık sayıları kaydedildi. Çok fazla sayıda kırık olduğu için kırık sayısını hatırlamayan ve sayısız kırığı olduğunu beyan eden hastalarda kırık sayısı multipl olarak değerlendirildi. Kırık lokalizasyonu için ekstremiteler, kosta, klavikula, skapula kırıkları ayrı ayrı sorgulanıp kaydedildi.

Ağrı- Yürüme: Hastaların kemik ağrıları ve yürüyebilme kapasiteleri sorgulandı. Yürümesi olan hastalar pozitif, olmayan hastalar negatif olarak kabul edildi.

Zihinsel gelişim: Gelişimsel geriliği olan hastalar Denver Gelişim Testi veya VISC-R testi ile değerlendirildi.

Fıtık varlığı ve lokalizasyonu: Oİ bir bağ dokusu hastalığı olduğundan bazı vakalara fıtık eşlik edebilir. Fizik muayene kayıtları veya anamnezden hastaların fıtık öyküleri sorgulandı. Göbek, inguinal fıtık varlığı araştırılır ve varsa kaydedildi.

Hipermobiliteler: Eklem esnekliği varlığı fizik muayene verilerinden kaydedildi.

Ekstremitelerde eğrilik (Bowling): Kırık haricinde genellikle küçük yaşlarda görülen ekstremiteler eğrilikleri sorgulandı. Kırıklara bağlı ortaya çıkan eğrilikler bu bölüme kaydedildi.

Sklera: Sklera rengi beyaz, gri, hafif mavi ve mavi olarak değerlendirildi.

İşitme: İşitme kaybı olan hastalarda ağırlığı ve lokalizasyonu değerlendirildi.

Dentinogenezis İmperfekta: Diş muayenelerinde dentinogenezis imperfekta olup olmadığı kaydedildi.

Boy kısalığı: Boy ölçümleri değerlendirilir. -2standart deviasyon (SD) altındaki olgular (Olçay Neyzi ve ark.) boy kısalığı olarak kabul edildi.

Fontanel: Ölçümler genellikle santimetre (cm) olarak kaydedildi. Bazı hastalarda ise geniş, çok geniş olarak kaydedildi.

Platispondili: Ön-arka ve yan vertebragrafileri değerlendirilir. Vertebralarda yassılaşma ve derecesi değerlendirildi.

Boncuk Kosta: Ön-arka vertebra grafilerinde kosta bileşkelerindeki büyüme kaydedildi.

Wormian Kemik: Lateral kafa grafilerinde oksipital bölgede bulunan wormian (kurtçuk) kemikler değerlendirildi.

Metafiz: Burada hastaların ekstremitte grafilerinde metafiz genişliği değerlendirildi.

Osteogenezis imperfekta hastalarının klinik olarak tiplendirilmesi yukarıdaki parametrelerden elde edilen veriler ışığında Van Dijk ve Sillence tarafından 2014 yılında yapılan sınıflamaya göre aşağıdaki şekilde yapıldı.

Tip1: Kırıkların postnatal başlangıçlı olduğu, ekstremitte deformitesi olmayan normal boyda olan hastalar esas alındı, ayrıca otozomal dominant kalıtım göstermesi, mavi sklera ve işitme kaybı olması bu grubu destekleyen özelliklerdi.

Tip 2: Perinatal letal ağır tip. İntrauterin başlangıçlı kırıklar ve doğumda çok sayıda kırık nedeniyle oluşan ciddi boy kısalığı, ekstremitte deformitesi ve boncuk kosta görünümü, mavi sklera ve kötü prognozu olması tanı koydurucu bulgulardı.

Tip3: Doğumda fark edilen kısa ve eğri ekstremiteler, ciddi boy kısalığı, üçgen yüz ve mavi sklera bulguları olanlar bu grupta tiplendirildi.

Tip 4: Tip 1 den daha ciddi klinik, beyaz sklera, hafif-orta derecede boy kısalığı ve deformiteleri olan hastalar bu gruba dahil edildi.

Tip-5: Grafide intraosseoz kalsifikasyon olanlar bu gruba alındı.

3.1.2. MOLEKÜLER YÖNTEMLER

3.1.2.1. DNA ELDESİ

-Manuel DNA İzolasyon Yöntemi İçin Gerekli Çözeltiler

10 X Lysis Buffer (LB) Hazırlanışı

1 lt için;

NH₄Cl: 87.4 gr

KHCO₃: 10 gr.

EDTA: 2 ml

Her bir kimyasal uygun miktarlarda tartıldı ve yeterli miktarda distile su içinde çözüldü. Çözelti üzerine distile su eklenip hacmi 1L'ye tamamlandı ve otoklavlandı. 1X Lysis Buffer hazırlamak için ise; 50 ml 10X LB filtre edilerek boş bir şişeye konuldu ve üzerine 450 ml distile su eklendi. Otoklavlandı.

White Blood Lysis –WBL- Tamponu Hazırlanışı

4M NaCl 10ml

0,5M EDTA, pH 8.0 20ml

Distile su ile 400ml'ye tamamlandı ve otoklavlandı.

Amonyum Asetat Çözeltisi (9,5M) Hazırlanışı

500 ml için;

366,13g amonyum tartıldı ve 100 ml distile suda çözüldü. Distile su ile hacmi 500'ml'ye tamamlandı ve filtrelendi.

Tris HCl Hazırlanışı

12.11gr Tris Bazı ve 4.2µl HCl çözeltisi siteril şişeye konuldu. Distile su ile 100ml.2ye tamamlandı.

0.5 M EDTA Hazırlanışı

93.06gr EDTA tartıldı. Şişeye konuldu. Üzerine 350ml distile su eklendi. 20gr NaOH tartıldı ve şişeye eklendi. pH 8'e ayarlandı. Üzerine total çözelti 500 ml olacak şekilde distile su eklendi ve otoklavlandı.

Tris-EDTA Tamponu (pH 8,0) Hazırlanışı

1ml Tris HCl ve 100µl EDTA 50ml'lik falkona konuldu ve otoklavlanmış distile su ile karışımın hacmi 50ml'ye tamamlandı.

%10 SDS Hazırlanışı

10gr SDS tartıldı, 100ml distile su ilave edildi ve filtrelendi.

H₂O₂ Hazırlanışı

%3'lük H₂O₂'den 30ml alınıp, distile su ile 300ml'ye tamamlandı. Işık görmeyecek şekilde muhafaza edildi.

Proteinaz K Hazırlanışı

Toz halindeki 100mg Proteinaz K üzerine 1ml distile su eklendi. Çözülmesi sağlandı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

-Kandan DNA İzolasyon Yöntemi

Oİ'li hastalardan periferik venöz kan örnekleri steril 10 ml K3EDTA'lı tüplere alındı. Kandan DNA'nın manuel yöntem ile izolasyonu için aşağıdaki aşamalar sırası ile takip edildi.

- 1- 10 ml kan falkon tüpe aktarıldı, üzerine 1:3 oranında Lysis buffer (1XLB) (30 ml) eklendi, tüp çalkalandı ve 15 dakika +4 °C'de bekletildi.
- 2- Sogutmalı santrifüjde 1500 rpm de 10°C'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 3- Süpernatant atıldı. Üzerine 10 ml 1XLB eklendi. Vortekslendi, 1500 rpm de 10°C'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 4- Süpernatant atıldı. Süspanse hale getirilen pelet üzerine 5 ml WBL eklendi, iyice vorteks yapıldı. Üzerine 80 µl %10'luk SDS ve 50 µl Proteinaz K eklendi. Tüpler yavaşça karıştırıldı. 37°C'de 1 gece veya 56°C'de 3 saat (55 °C'de gece boyu olması lazım) inkübe edildi.
- 5- İnkübasyon sonrası her bir örneğe 9,5M'lik amonyum asetat çözeltisinden 4 ml ilave edildi. Tüpler iyice çalkalandı ve -20°C'de 30 dakika bekletildi. Sogutmalı santrifüjde 4400 rpm'de 10°C'de 50 dakika santrifüj edildi.
- 6- Çöken kısmın yerinden oynatılmamasına dikkat ederek süpernatant temiz bir falcona aktarıldı. Üzerine 1:2 oranında saf etil alkol ilave edildi. DNA tüpün yukarisına çıkana kadar bekletildi.
- 7- Mikropipet ucuyla DNA alındı, eppendorf tüp içine aktarıldı. DNA'nın kurumasi beklendi ve DNA miktarına göre 100-300µl arası TE ilave edildi. DNA'nın TE içerisine düşmesi sağlandı.
- 8- Bir gece oda sıcaklığında bekletildi. DNA örneklerinin yoğunlukları (ng/µl) ve absorbsiyon ölçümleri (A260/280) spektrofotometrede ölçüldü (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). Çalışma yapıłana kadar DNA örnekler -20 °C'de saklandı.

3.1.2.2. COL1A1 ve COL1A2 Genlerin Yeni Nesil Dizileme Tabanlı Taranması

Oİ'li hasta kanlarından DNA saflaştırma işlemi ardından Oİ ile ilişkili olan COL1A1 ve COL1A2 genlerinin protein kodlayan ekzonlarını ve ekzon-intron sınır bölgelerini içeren primerler tasarlandı (Tablo 3 ve 4). Thermal Cycler cihazında PZR amplifikasyon işlemi yapıldıktan sonra PZR ürünlerin (amplikon) pürifikasyonu ve pürifiye PZR ürünlerinin NanoDrop ile konsantrasyon ölçümleri yapıldı. Yeni nesil dizileme tabanlı COL1A1 ve

COL1A2 gen çalışması Miseq Illumina platformu ile gerçekleştirildi. Dizileme işleminde her amplikondan yaklaşık olarak 4nM konsantrasyonda olacak şekilde 1XTE tampon ile seyreltildi. MiSeq platformunda dizileme yapılacak olan aynı konsantrasyondaki tüm amplikonlar Illumina MiSeq'in protokolüne göre birleştirildi.

Tablo 3-1: *COL1A1* geni tüm ekzonlarını içeren primer dizileri ve PZR ürün boyutları

GEN (EKZON)	PRİMER DİZİ	PZR ÜRÜN (BÇ)
<i>COL1A1</i> (1)	F-5'-GTCGGAGCAGGAGGCAC-3' R-5'-CATCCACGTCTCGTTTTAAGC-3'	289
<i>COL1A1</i> (2-5)	F-5'-TTTGAGGAAAGAAGAACGGG-3' R-5'-TGAAGGGTATGTGAGAGTTTCC-3'	995
<i>COL1A1</i> (6-8)	F-5'-TCCTCAGTGCCGTCTTCTG-3' R-5'-CAGGCCTGGGAGTTCTTC-3'	696
<i>COL1A1</i> (9-10)	F-5'-TTACCTCTTCCCTTCAATCCC-3' R-5'-CCTAAATGAAGCCCAAGTGC-3'	741
<i>COL1A1</i> (11-13)	F-5'-GCACTTGGGCTTCATTTAGG-3' R-5'-CCTCCATCTTGCCCCTG-3'	719
<i>COL1A1</i> (14-16)	F-5'CAAGATGGAGGCCTGGG-3' R-5'-GGGAACAGGGAGACATGAAC-3'	580
<i>COL1A1</i> (17-20)	F-5'-AGAGGCAAGGTTGGGTTTC-3' R-5'-CCTTTCTGGATTTCCCTCAG-3'	751
<i>COL1A1</i> (21-24)	F-5'-AGGAACCCCTGACACTGGAG-3' R-5'-GGACCCTAAGGATGGGAGG-3'	891
<i>COL1A1</i> (25)	F-5'-ATTGTCCTGTCTGCCTCCC-3' R-5'-CCCAGGACTCCTTCAAGTCTC-3'	225
<i>COL1A1</i> (26-29)	F-5'-GAGGCCCTGGCTTCTCAC-3' R-5'-TCTGATTAGCTAGGAGCGGG-3'	706
<i>COL1A1</i> (30-32)	F-5'-GAAGGACCGTGCTTTCCAG-3' R-5'-GATTCAAAGCAGGCAGAGATG-3'	781
<i>COL1A1</i> (33-35)	F-5'-TATAGGTCACCTCCTTGCCC-3' R-5'-TGACGCCTTTGTCCTCATTC-3'	734

<i>COL1A1</i> (36-39)	F-5'-CCCCAGGTAGTGGAAACTCC-3' R-5'-CAGAGAGCAGCACAGGGAC-3'	866
<i>COL1A1</i> (40-43)	F-5'-GTGTGCAGAGCTGGGGAG-3' R-5'-GCCTCTAAGGAGGCCTGAAG-3'	880
<i>COL1A1</i> (44-46)	F-5'-CCCAGCCTCAGCCTTCC-3' R-5'-CAAAGGGTGCCTGGGTC-3'	805
<i>COL1A1</i> (47-48)	F-5'-CCTCCAGAGCTGGGGTTG-3' R-5'-CACATATGGGCATGGGGAC-3'	615
<i>COL1A1</i> (49-50)	F-5'-CATATGGTGCTGGCTGCTC-3' R-5'-AGGGCACTATGGCCTGG-3'	859
<i>COL1A1</i> (51)	F-5'-CTCTCTCCATCACTCCCACG-3' R-5'-TTCAGTTTGGGTTGCTTGTC-3'	287

Tablo 3-2: *COL1A2* geni tüm ekzonlarını içeren primer dizileri ve PZR ürün boyutları

GEN (EKZON)	PRİMER DİZİ	PZR ÜRÜN (BÇ)
<i>COL1A2</i> (1)	F-5'-AGGTGATACCTCCGCCG-3' R-5'-GTGCCCTCCCATCTAACCTC-3'	196
<i>COL1A2</i> (2)	F-5'-TTGCTATTGATCCATGAAGTGA-3' R-5'-AAGGCAGCCAGAAAGGTTTT-3'	235
<i>COL1A2</i> (3)	F-5'-ACACCAAAATGGAAGCTGTTT-3' R-5'-AAACATCAAAGCTACTTTATTTTATGC-3'	249
<i>COL1A2</i> (4)	F-5'-TGTTCACTGGAAATTACTTCTTAGG-3' R-5'-AAATTGCCAGTTCCTGTAGTTTC-3'	176
<i>COL1A2</i> (5)	F-5'-TGCACATAGAAAGGTCTGAACAAC-3' R-5'-TGGAAGAATTATCCCTTAACTGC-3'	289
<i>COL1A2</i> (6)	F-5'-CATTGCCCTCTTTTAAATAACAAC-3' R-5'-AAATGGCGTGGTAAAATGTG-3'	255
<i>COL1A2</i> (7-10)	F-5'-TCTGACCCCAGCCAACAC-3' R-5'-GCTAGTTTTAGCAACTATCTTATAGGC-3'	831

<i>COL1A2</i> (11-12)	F-5'-TTTGGAGGGAAGAAGTCACTG-3' R-5'-TTTTGGAGGTCATGGGG-3'	769
<i>COL1A2</i> (13-15)	F-5'-TCTGTGTGTCTGGCATAATTG-3' R-5'-TGGAGCCTTCAAAAGACCTC-3'	826
<i>COL1A2</i> (16-17)	F-5'-CAACTTCAATCTTCTGCCATTG-3' R-5'-CCCATACTCCACCTTTGTTTTTC-3'	791
<i>COL1A2</i> (18-20)	F-5'-AGAATGAAGATGGGGTCAAAG-3' R-5'-GCTGGAGAAACTGGAATGAG-3'	872
<i>COL1A2</i> (21-23)	F-5'-AGGGTGAGCCCGTAAGTAGC-3' R-5'-CCAGGTGTGATTTGCTCAGA-3'	907
<i>COL1A2</i> (24-25)	F-5'-TTCAGTTAATCTAAGGCTTGAGTATG-3' R-5'-GAGTTTGGTAAAATTTGGCTACAG-3'	746
<i>COL1A2</i> (26-27)	F-5'-CAAGCAGGATTCAACATTGC-3' R-5'-GAGATGGCCAGTTTGAGGAC-3'	821
<i>COL1A2</i> (28-29)	F-5'-CAGCTAGACAACAGTGGTGACATAC-3' R-5'-CAGTGGGGTATTAAACAGGGG-3'	513
<i>COL1A2</i> (30)	F-5'-TGCCAGGTTTATTTCACTCTTTC-3' R-5'-TGGCTTTAAGGAGAAAGCAC-3'	226
<i>COL1A2</i> (31)	F-5'-GCTCGGAAGCTACACAAATG-3' R-5'-AAGGGTCTACTTATTCCAGGCAG-3'	256
<i>COL1A2</i> (32)	F-5'-TGTCTAGCTAGCTGTTTAAATTGG-3' R-5'-AAAACCTGGGCATCCTTGTG-3'	278
<i>COL1A2</i> (33)	F-5'-TGCTTCAGGAGAGTGACGG-3' R-5'-TCATAGACCCAGGAGAGAAAGG-3'	450
<i>COL1A2</i> (34)	F-5'-CAAGGTTCACTTTTGATGATACG-3' R-5'-TCTTTGGGACTAGGGAAGGC-3'	183
<i>COL1A2</i> (35-37)	F-5'-CCTCCCAGTTCTTTGAGCATC-3' R-5'-GCACTTGACGGATATATATTTAATTGG-3'	556
<i>COL1A2</i> (38)	F-5'-AGAGATGCGGGAATGATCC-3' R-5'-TGAACCTGAATCTCAAAAGTTTCC-3'	266

COL1A2 (39)	F-5'-CCAAAACAAAGAAATTCCCATC-3' R-5'-AGAAGCCAGGCCTTTTGG-3'	191
COL1A2 (40)	F-5'-CTTTGCTGCTCTCTTCCAGG-3' R-5'-GCAATACTCATCAACAAATAGATGC-3'	331
COL1A2 (41)	F-5'-CTTCAAGCCAAACCTGTGTTATC-3' R-5'-GTCACATTTGAAGTGGCAGC-3'	247
COL1A2 (42-44)	F-5'-TTTTGGAGGGGAAGGTTAGC-3' R-5'-AGTCAGAAGTGAAGCCCACG-3'	867
COL1A2 (45-46)	F-5'-GAGTGGGGAGGGGTATCTTG-3' R-5'-GCAGTGAAAATATGAAAATCCTTC-3'	670
COL1A2 (47-48)	F-5'-AAAGAGCCCCACTTTACATTTTC-3' R-5'-GGGTTGTCAAAGTTGTCTTGG-3'	516
COL1A2 (49)	F-5'-CTGCCATGGATGTCTCTCAC-3' R-5'-ATGGAACTAATTTTGAAAAGCTC-3'	392
COL1A2 (50)	F-5'-AGAATCTGTGTTCTGCTCAATG-3' R-5'-AAATGCAGATAATTAACAAACAGTCC-3'	318
COL1A2 (51)	F-5'-GTTTGACTCTTAGTATCTGAGTCCTTC-3' R-5'-TCATTCTTCTGTTCTTTTAACCCC-3'	417
COL1A2 (52)	F-5'-CACATGCCAAACAGTGGTTC-3' R-5'-TGTGCAGAAGAAATGGAAGG-3'	356

Genomik DNA'nın Etiketlenmesi

Bu aşamada Nextera Transpozazlar kullanılarak genomik DNA parçalandı ve adaptör dizileri ile etiketlendi.

İşlem öncesinde ATM (Amplicon tagment mix), TD (Tagment DNA buffer), NT (Neutraline tagment buffer) ve herbir örnek için DNA örneği 0,2 ng/μl olacak şekilde hazırlandı. ATM, TD ve DNA buz üzerinde çözöldükten sonra altüst edildi, vortekslendi ve quick spin yapıldı. NT oda ısısında partikülleri vortekslenerek yok edildi. Her pool için 0,2ml'lik ependorf tüp içerisine 10 μl TD buffer + 5μl DNA+ 5μl ATM eklenerek 5 kez pipetaj yapıldı. 20°C sıcaklıkta 280Xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Thermal cycler cihazında 55°C'de 5 dakika inkübe edildi. Sıcaklık 10°C'ye ulaşınca hızlıca nötralizasyon basamağına geçildi. 5μl NT eklendi, 5 kez pipetaj yapıldı ve 20°C sıcaklıkta 280Xg'de 1 dakika santrifüj

edildi. Daha sonra 5 dakika oda ısısında bekletildi. 25µl tagged ve nötralize olan gDNA ile PZR aşamasına geçildi.

PZR amplifikasyonu

Bu adım sınırlı döngü sayısı içeren PZR programı kullanarak parçalanmış DNA'yı arttırır. PZR, bir önceki aşamadaki etiketlenmiş DNA'ya Index 1, Index 2 ve adaptör dizilerini ekler.

Oda sıcaklığında NPM (Nextera master mix), İndeks 1 primer ve İndeks 2 primerleri çözüldü. 15µl NPM ve 5'er µl indeks 1-2 adaptörler doğrudan 25µl gDNA üzerine eklendi. 20°C sıcaklıkta 280Xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra Tablo 2-3'te gösterilen PZR döngü programında amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3-3: PZR Thermal Döngü Programı

72°C	3 dakika	1 siklus
95°C	30 saniye	1 siklus
95°C	10 saniye	
55°C	30 saniye	12 döngü
72°C	30 saniye	
72°C	5 dakika	
10°C	geceboyu	

Kütüphanelerin Temizlenmesi

Bu adımda kütüphane DNA'sını saflaştırmak ve kısa kütüphane parçalarını kaldırmak için AMPure XP boncukları kullanıldı.

Amplifikasyon işleminden sonra PZR ürünleri 20°C sıcaklıkta 280Xg'de 1 dakika santrifüj edildi, üzerine 90µl AMPure XP boncukları eklendi ve oda ısısında 5 dakika bekletildi. Manyetik stand üzerine alındı ve 2 dakika bekletildi. Daha sonra çepere dokunmadan maksimum miktarda süpernatant uzaklaştırıldı. Manyetik stand üzerinde iken 100µl %80'lik

etanol eklendi, 30 saniye bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. 15 dakika manyetik stand üzerinde kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminden sonra 52,5µl RSB eklendi, pipetaj yapıldı ve 96'lık plate içine yerleştirildi. 2 dakika oda ısısında bekletildi. 40µl süpernatant 0,2ml'lik ependorfa alındı ve Qubit ile ölçümü yapıldı. Bu aşamadan sonra ürünler -15°C/-20°C'de bir hafta bekletilebilir.

Phix Hazırlama

10N NaOH seyreltilerek taze 0.2N NaOH hazırlandı. Mikrosantrifüj tüpü içerisinde 5µl (4nM) DNA örneği ile 5µl (0.2N) NaOH birleştirildi. Karışım vorteksle kısaca karıştırılıp 1 dakika boyunca 280xg santrifüj edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika denatüre olması için inkübasyona bırakıldı. Denatüre olan 10µl DNA örneği buzları önceden çözölmüş olan 990µl HT1 tamponu (Hybridization buffer) ile karıştırıldı ve 1mM NaOH ile 20pM denatüre kütüphane elde edildi ve karışım bir sonraki aşamaya kadar buzda bekletildi.

360µl 20 pM denatüre DNA ile 540µl buzları çözölmüş HT tamponu birleştirilerek 8pM'e seyreltilti. Sekanslama esnasında kullanılmak üzere PhiX kontrol kütüphanesi hazırlandı. 2µl (10nM) PhiX kütüphanesi ile 3µl 10mM Tris-Cl ve pH 8.5'te %0.1 Tween 20 ile karıştırılarak 4nM PhiX kütüphanesi hazırlandı. 5µl 4nM PhiX kütüphanesi ile 5µl 0.2N NaOH birleştirildi. 2nM PhiX karışımı kısaca vorteks ile karıştırılarak 1 dakika boyunca 280xg santrifüj edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika denatüre olması için inkübasyona bırakıldı. Denatüre olan 10µl PhiX kütüphanesi ile buzları önceden çözölmüş olan 990µl HT1 tamponu ile karıştırıldı ve 1mM NaOH konsantrasyonunda 20pM denatüre PhiX kütüphanesi elde edildi. 20pM PhiX kütüphanesinden 62.5µl alınarak 37.5µl buzları çözölmüş HT1 tamponu karıştırılarak 12.5µl PhiX kütüphanesi elde edildi. Son aşama olarak 33µl 12.5µl PhiX kütüphanesi ile 627µl denatüre DNA örneği birleştirildi ve vorteksle karıştırılarak yüklemeye hazır hale getirildi.

Dizi Analizi

Birleştirilen ve Illumina MiSeq'e yüklenen DNA örneği SeqPilot (JSI medical systems GmbH, version 4.1.2) yazılımı ile analiz edildi. Elde edilen ampikon sayıları grafik haline getirildi. Her ampikonun okuma sayısı ile pleks içi ve pleksler arası ortalama okuma sayıları hesaplandı. Ampikon okuma sayılarının birbirleri ile uyumuna yine pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları hesaplanarak bakıldı. Pleks içi okuma sayılarının standart sapması hesaplandı ve pleks içi aritmetik ortalamasına bölünerek pleks içi varyasyon katsayıları elde edildi. Aynı şekilde pleksler arası okuma sayılarının tümü

alınarak standart sapma hesaplandı ve tüm okuma sayılarının aritmetik ortalamasına bölünerek pleksler arası varyasyon kat sayıları elde edildi.

3.1.2.3. Yeni Nesil Dizileme Tabanlı Panel-Gen Testi

Yeni nesil dizileme tabanlı panel-gen çalışması Illumina NextSeq500 platformunda yapıldı.

Hedef Genlerin Belirlenmesi

OMIM veritabanı kullanılarak, Oİ'nin tüm fenotipleri ile ilişkili olan 21 gen seçildi (Tablo 2-4). Belirlenmiş bu hedef bölgelere özel prob setleri DesignStudio Myİllumina ile tasarlandı.

Tablo 3-4 : Panel-gen testinde yer alan genler, ilişkili Oİ fenotipleri, kalıtım paternleri

GEN	FENOTİP	KALITIM	OMIM
<i>COL1A1</i>	Klasik Tip 1,2,3,4	OD	166200
<i>COL1A2</i>	Klasik Tip 1,2,3,4	OD	166220
<i>IFITM5</i>	Tip 5	OD	610967
<i>SERPINF1</i>	Tip 6	OR	613982
<i>CRTAP</i>	Tip 7	OR	610682
<i>LEPRE1</i>	Tip 8	OR	610915
<i>PPIB</i>	Tip 9	OR	259440
<i>SERPINH1</i>	Tip 10	OR	613848
<i>FKBP10</i>	Tip 11	OR	259450
<i>SP7</i>	Tip 12	OR	613849
<i>BMP1</i>	Tip 13	OR	614856

<i>TMEM38B</i>	Tip 14	OR	615066
<i>WNT1</i>	Tip 15	OR	615220
<i>CREB3L1</i>	Tip 16	OR	613982
<i>SPARC1</i>	Tip 17	OR	610682
<i>LRP5</i>	Oküler OI	OR	259770
<i>P4HB</i>	Cole-Carpenter Sendromu 1	OD	112240
<i>SEC24D</i>	Cole-Carpenter Sendromu 2	OR	616294
<i>PLOD2</i>	Bruck Sendromu 2	OR	609220
<i>PLS3</i>	Osteoporozis, osteopenia	XLD	300910
<i>MBTPS2</i>	Osteoporozis, osteopenia	XLR	301014

Kütüphane Hazırlanması, Zenginleştirilmesi

Kütüphane hazırlanması Nextera Rapid Capture Custom Enrichment Kit (Illumina) kullanılarak, firmanın protokollerine uygun olarak yapıldı. Nextera tabanlı kütüphane hazırlığı için 50 ng gDNA'dan adaptör etiketli kütüphaneler oluşturuldu. Transpozazlar kullanılarak gDNA parçalandı ve adaptör etiketler ile her bir DNA etiketlendi.

0,2 ng/μl DNA örnekleri ATM (Amplicon tagment mix), TD (Tagment DNA buffer) ve NT (Neutraline tagment buffer) ile karışım hazırlandı, vortekslendi. Her pool için 0,2ml'lik ependorf tüp içerisine 10 μl TD buffer + 5μl DNA+ 5μl ATM eklenerek 5 kez pipetaj yapıldı. 20°C sıcaklıkta 280Xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Thermal cycler cihazında 55°C'de 5 dakika inkübe edildi. Sıcaklık 10°C'ye ulaşınca hızlıca nötralizasyon basamağına geçildi. 5μl NT eklendi, 5 kez pipetaj yapıldı ve 20°C sıcaklıkta 280Xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra 5 dakika oda ısısında bekletildi. Oluşturulan etiketli ve nötralize gDNA kütüphane havuzu tek zincirli olarak denatüre edildi ve Hızlı Yakalama hibridizasyonu için hedeflenen bölgeye tamamlayıcı olan biyotin etiketli proplar kullanıldı. Hedeflenen bölgelere hibritlenen biyotinlenmiş proplara bağlanabilen Streptavidin boncukları eklendi.

Streptavidin boncukların manyetik geçirgenliği, hedeflenen bölgeleri zenginleştirilmesini sağladı. Daha sonra zenginleştirilmiş DNA fragmanları boncuklardan ayrıştırıldı ve zenginleştirme özgüllüğünü arttırmak için ikinci bir Hızlı Yakalama turu gerçekleştirildi.

Dizi Analizi

NextSeq500 sisteminde özel zenginleştirme örneklerinden üretilen sekans verileri, BAM dosya formatında BaseSpace Core App (BWA hizalaması ve GATK sağlayan BWA Enrichment App v2.0 varyant arama ve IsaacTM Enrichment App v2.0,) kullanılarak analiz edildi.

Her hastada bulunan varyantlar; allel frekansı (MAF) $<1\%$ altında olacak şekilde, 1000 Genom Projesi veri tabanından, UCSC ve RefSeq veritabanlarından filtrelendi. Filtrelemeler sonrası amino asit değişikliğine neden olmayan nükleotit değişiklikleri ve ekzon sınırına 10 bp'den uzak olan intronik varyantlar ilk aşamada değerlendirme dışı bırakıldı. Tüm homozigot, birleşik heterozigot, heterozigot ve hemizigot varyantlar görüntülendi. Varyant isimlendirmeleri, dbSNP ve HGMD veri tabanlarıyla karşılaştırılarak yapıldı. Varyantlar kodlanan proteine etkisi, türler arasındaki korunmuşluk, ekspresyon paternlerine göre değerlendirildi. Ayrıca bu varyantlar, mutasyon çeşitlerine göre öncelikle stop kodon, çerçeve kayması, kırılma hatası ve missense mutasyonlar olarak sınıflandırıldı.

3.1.2.4. YND İLE SAPTANAN DEĞİŞİMLERİN SANGER DİZİLEME İLE DOĞRULANMASI.

Sanger dizileme öncesi ilişkili genler ile ilgili primerler tasarlandı. Primerlerin tasarlaması aşamasında seçilen primerlerin;

- dbSNP veritabanında önceden saptanmış herhangi bir SNP veya tekrarlayan dizi içermemesine,

- İleri ve geri primerlerin bağlanma ısılarının ($\pm 2-5^{\circ}\text{C}$ fark) birbirlerine yakın olmasına,

- İçerdiği AT ve CG nükleotid dağılımlarının eşit olmasına,

- 18–24 nükleotid içermesine ve

- Gendeki beklenen mutasyonların analiz edilebilmesini sağlayacak bölgeleri kapsamına özen gösterildi. Primer özgünlükleri UCSC Genome Bioinformatics (<https://genome.ucsc.edu/index.html>)’ den “in silico PZR” interaktif sistemi ile test edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Her bir PZR reaksiyonu;

1X tampon solüsyonu [10X (NH₄)₂SO₄] (Thermo Scientific),

25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific),

% 0-10 DMSO (Biomatik Corporation), (Her PZR’de kullanılmaz. GC oranı yüksek ise kullanılması tercih edilir.)

200 µM dNTP (Thermo Scientific),

0,2/0,5 µM ileri ve geri primerler

0.5 U Taq polimeraz enzimi (Thermo Scientific) karışımı içerisine gDNA 200 ng olacak şekilde eklendi ve bidistile su (dH₂O) ile 50 µl’ye tamamlanarak hazırlandı. Tüm çalışmalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Her bölge için yapılan PZR deneyinde DNA içermeyen kontrol PZR (negatif kontrol) kullanıldı. PZR döngü programı Tablo 2-5’de gösterildiği gibi ayarlandı.

Tablo 3-5: PZR Termal Döngü Programı

Denatürasyon	95°C de	10 dk	1 döngü
	95°C de	30 sn	
Bağlanma	64°C -52°C	30 sn	40 döngü
	70°C	45-90 sn	
Uzama	70°C	10 dk	1 döngü

PZR işlemi termal döngü cihazlarında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrasında PZR örnekleri %2’lik agaroz jelde 120 V’de 20 dk yürütülerek UV’de görüntülendi ve kayıt edildi.

PZR Ürün Saflaştırılması

PZR ürünlerinin dizi analizi öncesi saflaştırılması 2 farklı yöntem ile yapıldı.

Spin Kolon Yöntemi ile Saflaştırma

Saflaştırma işlemi kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi (High Pure PZR Product Purification Kit, Roche 11732676001). 50 µl PZR ürünü üzerine 250µl Bağlanma Tamponu eklendi. Karışım oda ısısında filtreli tüp içerisine aktarıldı. 13000 rpm’de 60 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken solüsyon atıldı. Filtreli tüpe 500 µl yıkama solüsyonu eklendi. 13000 rpm’de 60 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken solüsyon atıldı. Tüp üzerine 200 µl yıkama solüsyonu eklendi. 13000 rpm’de 60 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı. Filtre steril 1.5 ml’lik ependorf tüpe aktarılarak içerisine 50 µl Elüsyon Tamponu eklendi. 13000 rpm’de 60 sn santrifüj edildi. 1.5 ml’lik ependorf içindeki PZR ürününden 5 µl alınarak agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında bantlar kontrol edildi. Ürünler bir sonraki işleme kadar +4°C’de karanlıkta bir ortamda saklandı.

Enzimatik Yöntem ile Saflaştırma

Saflaştırma işlemi için; Rapid Alkaline Fosfataz (04898133001-Roche) ve Exonuclease-I (Lot:00173016-Thermo Scientific) enzimleri kullanıldı. Termal döngü cihazında; 37 °C de 30 dak. , 85°C de 15 dak. ardından 4°C’de PZR ürünleri saflaştırıldı. Daha sonra bu ürünler cihazdan alınarak bir sonraki işleme kadar +4°C’de karanlıkta saklandı.

DNA Dizi Analizi

PZR ile çoğaltılan ve daha sonra saflaştırılan ampliconların dizi analizi, ABI3500 otomatik sekiz kapilerli elektroforezinde (Applied Biosystem) gerçekleştirildi.

Dizi PZR Reaksiyonu

5X tampon solüsyonu olan BigDye (PZR için gerekli kimyasalları içerir), BigDye v3.1 (ddNTP’ler ve AmpliTaq DNA polimeraz içerir), primer [PZR’de kullanılan primerlerden biri ya da iki çifti (*dizi okuma kalitesi için seçilir*)], saflaştırılmış PZR ürünü karıştırıldı ve final hacim 10µl olacak şekilde dH₂O ilave edildi. Plate (plate - USA Scientific-800-522-8477) üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde örnek yükleme yapıldı. Karışım termal döngü cihazına alındı. Toplam 25 döngüde; 96°C’de 10 sn denatürasyon, 50°C’de 5 sn bağlanma ve 60°C’de 4 dk sonlanma basamakları ile program oluşturuldu. Dizi reaksiyonu tamamlandıktan sonra ürünler cihazdan alındı.

Dizi PZR Reaksiyonu Ürünlerinin Saflaştırılması

Kullanılmayan primer ve diğer reaktiflerin arındırılması için; plate içerisinde ki ürün başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat, 1 µl %2'lik glikojen ve 25 µl %100 soğuk etanol eklendi. Plate koruyucu yapışkan bantla kapatılarak oda ısısında 15 dk. bekletildi. 3810rpm'de 45 dk. santrifüj edildi. Plate üzerindeki koruyucu bant açıldı, plate ters çevrilerek 1100rpm'de 30 sn kısa santrifüj edildi. Her bir kuyucuğa 35µl %70'lik soğuk etanol eklendi. Plate tekrar koruyucu bant ile kapatıldı ve 3460 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Plate üzerindeki koruyucu yapışkan bant kaldırıldı ve plate ters çevrilerek 1170rpm'de 60 sn kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 10µl HiDi formamid (Highly Deionized Formamid) eklendi. Örnekler 95 °C'de 5 dk. denatüre edildi ve 2 dk. buz üzerinde bekletildi.

Elektroforez Cihazına Yükleme

Örnekleri içeren plate ABI3500 cihazına yerleştirildi, sırasıyla yürütme işlemi ve kalibrasyonu yapılmış dizileme boya seti olan Dyeset seçildi. Yürütme voltajı: 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı: 15 kVolts, injeksiyon voltajı:1,6 kVolts, yürütme süresi:2.520 sn, ön yürütme süresi:180 sn, injeksiyon zamanı:8 sn ve veri gecikmesi (data delay): 250 sn'ye ayarlanarak ürünler yürütüldü.

Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kapiller Elektroforez sonrası alınan fasta dosyası ABI Sequencing Analysis v5.4 yazılım ve SeqScape v.3.0 (34) programlarında analiz edildi. SeqScape v.3.0 programında analiz aşamasına geçmeden önce programa referans dizi yüklendi. Tanıtılan transkriptin ekzon ve intron bölgeleri program içerisinde gösterildi. Fasta formatına alınan örnek dizisi programa yüklendi ve analiz işlemine geçildi. Bu işlemten sonra, örnek dizisinin hedef gen bölgesi üzerindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu (ileri ya da geri primer veya her ikisi), saflaştırma kalitesi, dizilenen baz sayısı, görüntülenen pik kalitesi, pik yüksekliği ve arka alan kirlilikleri kontrol edildi. Kontrol aşamasında herhangi bir aksaklık varsa çalışma PZR aşaması ya da yeterli örnek mevcutsa, dizi saflaştırma aşamasından itibaren tekrar edildi. SeqScape v.3.0 programında, elde edilen örnek dizisi ile referans dizi karşılaştırılarak tanımlanmış değişimler NCBI Entrez SNP, ENSEMBL GeneSNPView ve HGMD gibi veritabanları kullanılarak programda işaretlendi. Elde edilen sonuçlar yeni nesil dizileme sonrası elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

3.1.2.5. MLPA ÇALIŞMASI.

PZR işlemi termal döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Ardından kapiller elektroforez cihazında fragmanlar yürütüldü.

DNA Denatürasyonu ve Prob Karışımı ile Hibridizasyon

Denatürasyon öncesinde DNA yoğunluğu 25-30 ng/μl olacak şekilde TE tamponu içerisinde seyreltildi. Çalışmaya başlamadan SALSA Prob miks ve SALSA MLPA tamponu kit içerisinde çıkarılarak oda ısısında çözülmesi sağlandı. Seyreltilmiş DNA çözeltisinden her örnek için 5μl DNA PZR tüplerine alındı ve termal döngü cihazında 98°C’de 5 dak. denatüre edildi. Her bir örnek için 1,5 μl MLPA tampon ve 1,5 μl prob olmak üzere karışım hazırlandı. 3 μl karışım 25°C’de beklemeye alınan tüplere dağıtıldı ve pipetaj yapılarak iyice karışması sağlandı. 95°C de 1 dk prob denatürasyonundan sonra 37°C’de 16 saat hibridizasyon işlemi için bekletildi. Hibridizasyon sonrası doğrudan ligasyon işlemine geçildi.

Ligasyon Aşaması

Ligasyon aşamasına başlamadan önce Ligasyon tamponu A ve Ligasyon tamponu B’nin oda ısısında çözülmesi sağlandı. Her bir örnek için 25μl dH₂O, 3μl tampon A, 3μl tampon B ve 1μl Ligaz 65 enzimi eklenerek karışım hazırlandı. Termal döngü cihazı 54°C’de bekleme basamağına getirildi, her bir tüpe 32μl ligasyon karışımı eklendi ve 15 dk bekletildi. Elde edilen ligasyon ürünü 4°C ’de saklandı.

PZR Aşaması

Çalışma öncesinde SALSA PZR tamponu ve SALSA PZR primeri (FAM boyalı) dondurucudan çıkarılarak çözülmesi sağlandı. Her bir örnek karışımı için tüp içine 7,5μl dH₂O, 2μl SALSA PZR primeri ve 0,5μl SALSA polimeraz enzimi eklendi ve iyice pipetle karıştırılarak homojen olması sağlandı. Ligasyon ürünlerinin üzerine bu karışımdan 10’ar μl eklendi. PZR karışımı hazırlanırken, primerler floresan işaretli olduğundan ışıktan korunmasına dikkat edildi. PZR aşaması; 35 döngü ile 95°C de 30 saniye, 60°C de 30 sn, 72°C de 60 sn, 72°C de 20 dk ve 4°C’de bekleme aşamalarını içermekteydi. PZR işlemi sonrası kapiller elektroforezine yükleme ve fragmanların yürütülmesi aşamasına geçildi.

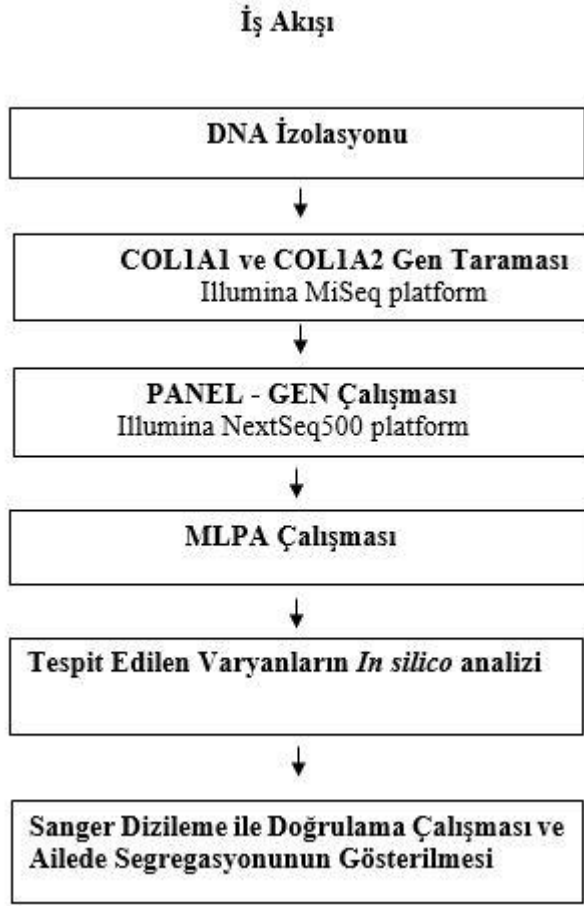
Kapiler Elektroforez Cihazı İle Fragmanların Yürütülmesi

Boş bir tüp içerisine her bir örnek başına 0.2 μl LIZ size standard (Liz-500, Lot:0904226, Applied Biosystems) ve 9.5 μl formamid (Highly Deionized - HiDi) konularak

kariştırıldı. ABI3500 cihazı plate kuyularına ayrı ayrı her bir örnek karişımından 9,7 µl dağıtıldı. Karişım üzerine 0,3 µl PZR reaksiyon ürünü olgu numaralarına göre dağıtıldı. Plate kuyucuklarının üzeri kapatılarak plate santrifüjünde 4000rpm’de 2 dk çevrilerek dibe çökmesi sağlandı. Plate ABI3500 cihazına yerleştirildi ve cihaz yürütme ayarları düzenlenerek fragman platformunda yürütme işlemine geçildi. Yürütme voltajı; 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı; 15 kVolts, injeeksiyon voltajı: 1,6 kVolts, yürütme süresi: 2.520 sn, ön yürütme süresi: 180 sn, injeeksiyon zamanı: 8 sn ve veri gecikmesi süresi: 250 sn. FSA formatındaki ham veri Coffalyser.net (v.1400701.0000) programı kullanılarak değerlendirildi.

Veri Analizi

FSA formatında elde edilen fragmanlar Coffalyser.Net (MRC-Holland) programına tanıtılarak aktarıldı. Coffalyser.net programının gerekli analiz ayarları (prob türü, örnek türü, kitin lot numarası ve analiz türü) yapılarak örnekler yüklendi. Sırasıyla referans örnekler seçildi, fragman analizi, karişılaştırmalı istatistiksel analiz yapıldı, kopya sayısı değişiklikleri tanımlandı. Prob ligasyon bölgesindeki varyasyonların dışlanması amacıyla tek ekzonla sınırlı delesyon ve duplikasyon durumlarında Sanger yöntemiyle dizileme yapıldı.



Şekil 3-1. Varyanta ulaşmak için izlenen iş akışı.

3.1.2.6. TÜM EKZOM DIZILEME ISLAK VE VE KURU LABORATUAR ÇALIŞMALARI

COL1A1 ve *COL1A2* genlerinde ve Oİ spesifik tasarlanmış panel gen testinde mutasyon saptanmayan olgulardan otozomal resesif kalıtım düşünülen 10 olguya tüm ekzom dizileme analizi yapıldı. Tüm ekzom dizileme analizinin ıslak ve kuru laboratuvar çalışmaları için hizmet alımı yapıldı.

Tüm ekzom dizileme verilerinin yorulanması: H19 referans genoma hizalanmış ve anotasyon basamakları tamamlanmış olan varyantlardan nonsinonim kodlayan bölge mutasyonları, hastalığın kalıtım modeli, allel sıklığı ($MAF \leq 10^{-3}$), varyantın gen ve/veya proteini etkileme olasılığı ve *in silico* tahmin analizleri (SIFT, PolyPhen, MutationTaster, Provean CPV/*CompansatedGeneticVariants*) gözönüne alınarak incelendi. Güncel bilimsel gelişmelere göre varyant sınıflandırmaları ‘sınıf 1-patojenik’; ‘sınıf 2-muhtemelen

patojenik'; 'sınıf 3- önemi bilinmeyen varyant /VUS'; 'sınıf 4-muhtemelen benign'; 'sınıf 5-benign'; 'sınıf 6; hastalık ilişkili varyant' olarak yapıldı.

Oİ ile ilişkili bilinen genler, kemik gelişimi ile ilişkili sinyal yolak genleri, transkripsiyon faktörleri, yapısal genler ve diğer model organizmalarda gösterilen ancak insan fenotipi bilinmeyen genler önceliklendirildi.

Bilinen genlerde mutasyon tespit edilmeyen hastalarda aday genler için yolak analizleri, model organizma bilgileri (MGI), STRING ve GeneMania gibi in silico analizler ile, detaylı literatür ve veri tabanı taramalarından yararlanılarak gerçekleştirildi.

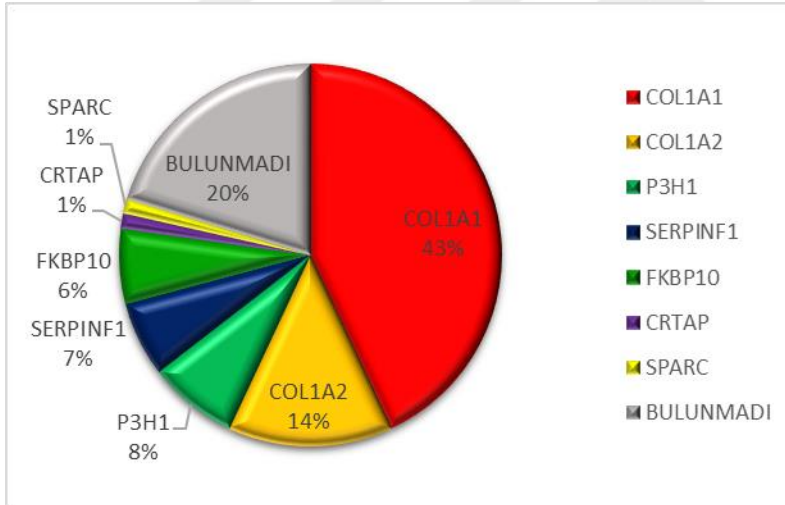


4. BULGULAR

Yetmiş dokuz indeks olgumuzun 47'si (%58,8) erkek, 32'si (%41,2) kadındı. Ortalama tanı yaşı $4,16 \pm 6,38$ yaş idi. Çalışma grubumuzda akraba evliliği oranı % 40,5 idi.

4.1.Hastalığa yol açan genlerin sıklığına göre dağılımı:

Hastaların 45'inde (%57) *COL1A1* (%75.5) ve *COL1A2* (%24.5) genlerinde heterozigot mutasyon, %23'ünde otozomal resesif kalıtımla ilişkili genlerde homozigot mutasyon bulundu. Bunlar 6 hastada *P3H1*, 5 hastada *FKBP10*, 5 hastada *SERPINF1* ve birer hastada *CRTAP* ve *SPARC* gen mutasyonu şeklinde idi. Hastaların 16'sında (%20,2) ise mutasyon bulunamadı. Sorumlu genlerin yüzdelerinin dağılımı Şekil 4-1 ve Tablo 4-1'de görülmektedir.



Şekil 4-1. Mutasyon sıklığının genlere göre dağılımı

Tablo 4.1: Hastalarda saptanan tüm gen mutasyonlarının dağılımı

Oİ tipi	Sorumlu gen	Mutasyon				
		Het/hom	Bilinen	Yeni	Toplam	%
1	<i>COL1A1</i>	Het	24	10	34	43
2	<i>COL1A2</i>	Het	9	2	11	14
3	<i>SERPINF1</i>	Hom	-	5	5	6,3
4	<i>CRTAP</i>	Hom	-	1	1	1,3
5	<i>P3H1</i>	Hom	-	6	6	7,6
6	<i>FKBP10</i>	Hom	1	4	5	6,3
7	<i>SPARC</i>	Hom	-	1	1	1,3
8	Bulunmayan				16	20,2

4.2. Hastalarda saptanan mutasyonların genlere, mutasyon tipine, mutasyonun ailedeki segregasyonu ve hastalığının klinik tipe göre dağılımının incelenmesi

Mutasyon saptanan genler, mutasyon tipi ve ailedeki segregasyonu ve hastalığının klinik tipe göre dağılımı Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

COL1A1/A2 mutasyonu olan hastalar % 67 (n = 30) ailede ilk olgu idi, %33’de hastalık ebeveynden kalıtılmıştı (n = 15). ***COL1A1*** mutasyonu olan aile sayısı 34 idi. Bilinen mutasyon oranı % 71 (n = 24), yeni mutasyon oranı %29 (n = 10) idi. Bu hastaların % 65 (n = 22) ailede ilk olgu idi, %35’de hastalık ebeveynden kalıtılmıştı (n = 12). Oİ tiplere göre % 71 (n = 24) hasta tip 1, % 5 (n = 2) hasta tip 2 ile uyumlu, %21 (n = 7) tip 3, %3 (n = 1) tip 4 ile uyumlu bulundu.

COL1A2 mutasyonu olan aile sayısı 11 idi. Bilinen mutasyon oranı % 73 (n = 8), yeni mutasyon oranı % 27 (n = 2). Bu hastaların % 73 (n = 8) ailede ilk olgu idi, %27 hastalık ebeveynden kalıtılmıştı (n = 3). Oİ tiplere göre % 55 (n = 6) hasta tip 1, %27 (n = 3) tip 3, %18 (n = 2) tip 4 ile uyumlu bulundu.

Otozomal resesif Oİ tipleri ile bulunan *P3H1* mutasyonu olan aile sayısı 6 olup, Oİ tiplere göre bir olgu Oİ tip 1, üç olgu tip 3, 2 olgu tip 4 fenotipi ile uyumlu bulundu. *SERPINF1* mutasyonu olan aile sayısı 5 olup, Oİ tiplere göre bir olgu Oİ tip 1, üç olgu tip 3, ve 1 olgu tip 4 ile uyumlu bulundu. *FKBP10* mutasyonu olan aile sayısı 5 idi, bunlarda 1 olgu Oİ tip 1, bir olgu tip 3 ve 3 olgu tip 4 ile uyumlu bulundu. *CRTAP* mutasyonu olan aile sayısı 1 Oİ tip 3 ile uyumlu, ve *SPARC* gen mutasyonlu 1 ailede olgu Oİ tip 3 ile uyumlu saptandı. Mutasyon bulunmayan aile sayısı 16 idi.

Otozomal dominant kalıtım gösteren *COL1A1/A2* genlerinde heterozigot mutasyonu olan 45 aileden sadece 4 ailede akraba evliliği varken , otozomal resesif kalıtılan tiplerden 13 ailenin 10'da akraba evliliği vardı.

COL1A1/A2 mutasyonu olan 45 ailede 33 hasta ailedeki tek olgu iken, 12 ailede vertikal kalıtım gösteren etkilenmiş birden fazla kişi vardı.

COL1A1 ve *COL1A2* mutasyonu olan hastalar %42 (n = 19) ailede ilk olgu idi, % 36 hastalık ebeveynden kalıtılmıştı (n = 16) ailedeki olgu sayısı 65 idi.

Otozomal resesif kalıtım gösteren gen mutasyonu olan 19 aileden dördünde etkilenmiş kardeş öyküsü vardı (Tablo 4.2).

Hastaların %52,3 (n = 33) tip 1, %3,2 (n = 2) tip 2, % 30,2 (n = 19) tip 3, %14,3 (n = 9) tip 4 fenotiple uyumlu idi.

Tablo 4.2: Tüm hastaların mutasyon tipleri, mutasyonun ailedeki segregasyonu ve hastalığının klinik tipe göre dağılımı

Ha sta No	Mutasyon	Mutasyon tipi	Anne	Baba	A.E.	Ailede olgular	Oİ klinik tipi
COL1A1							
1	IVS2-1G>C (c.299-1G>C)	Splice Varyant	Mut	Norm	Var	Var	1
2	c.588+1G>A (IVS7 ds G-A +1)		Norm	Norm	Var	Yok	1
3	IVS17+1G>C (c.1155+1G>C)		Norm	Norm	Yok	Yok	3
4	c.3531+1G>A (IVS48 ds G-A +1)		Norm	Norm	Yok	Yok	1
5	c.370-2A>G		Norm	Norm	Yok	Yok	1
6	c.1155+3_1155+6delAAGT		Norm	Mut	Yok	Var	1
7	c.1930-1G>T		Mut	Norm	Yok	Var	1
8	c.2397+7A>C		Norm	Norm	Yok	Yok	3
9	c. 579delT (p.Gly194ValfsTer71)	Stop Varyant	Mut	Norm	Yok	Var	1
10	c.1128delT (p.Gly377AlafsTer164)		Norm	Mut	Yok	Var	1
11	c.1792C>T (p.R598*)		Norm	Mut	Yok	Var	1
12	c.1128delT (p.Gly377AlafsTer164)		-	-	Yok	Yok	1
13	c.4051C>T (p.Gln1351*)		Norm	Mut	Yok	Var	1
14	c.2068 delC (p.Pro691Leu*75)	Gly'ni değiştiren variant	Mut	Norm	Yok	Var	1
15	c.2715 delC (p.Gly906Alafs*202)		Mut	Norm	Yok	Var	1
16	c.607G>C (p.Gly203Arg)		Norm	Norm	Yok	Yok	3
17	c.608G>T (p.Gly203Val)		Norm	Norm	Yok	Yok	1
18	c.814G>T (p.Gly272Cys)		Mut	Norm	Yok	Yok	1
19	c.959G>T (p.Gly320Val)		Norm	Norm	Yok	Yok	1
20	c.1588G>A (p.Gly530Ser)		Mut	Norm	Yok	Yok	2
21	c.2299G>A (p.Gly767Ser)		-	-	Yok	Yok	3
22	c.2299G>A (Gly767Ser)		-	-	Yok	Yok	3
23	c.2471G>C (p.Gly824Ala)		Norm	Norm	Yok	Yok	3
24	c.3505G>A (p.Gly1169Ser)		Norm	Norm	Yok	Yok	1

25	c.4237G>A (Asp1413Asn)		Norm	Norm	Yok	Yok	2
26	c.2854C>T (p.Gln952Ter)		Norm	Norm	Yok	Yok	1
27	c.1012G>C (p.Gly338Arg)		Norm	Mut	Yok	Var	3
28	c.770G>T (p.Gly257Val)		Norm	Norm	Yok	Yok	1
29	c.613C>G (p.Pro205Ala)		-	-	Yok	Yok	1
30	c.3076C>T (p.Arg1026Ter)		Norm	-	Yok	Yok	1
31	c.4391T>C (Leu1464Pro)	Diğer variant	-	-	Yok	Yok	4
32	c.4391T>C (Leu1464Pro)		Norm	Norm	Yok	Yok	1
33	c.2340_2343+delCAAGGTGA		Norm	Norm	Yok	Yok	1
34	COL1A1 DELESYON	Tüm gen - delesyonu	-	-	Yok	Yok	1
COL1A2							
35	c.739-2A>G splice heterozigot	Splice variant	Norm	Norm	Var	Yok	3
36	c.3581_3587del (p.Tyr1194PhefsTer33)	Stop Variant	Norm	Norm	Var	Yok	1
37	c.2252G>T (p.Gly751Val)		Norm	Norm	Yok	Yok	4
38	c.577G>A (p.Gly193Ser)		-	Mut	Yok	Var	1
39	c.2791G>A (p.Gly931Arg)		Mut	-	Yok	Var	4
40	c.1801G>A (Gly601Ser)	Gly'ni değiştiren variant	Mut	Norm	Yok	Yok	3
41	c.982G>A (p.Gly328Ser)		Norm	-	Yok	Yok	3
42	c.982G>A (p.Gly328Ser)		-	-	Yok	Yok	1
43	c.1801G>A (p.Gly601Ser)		Norm	Norm	Yok	Yok	1
44	c.1477G>A (p.Gly493Arg)		Norm	Norm	Yok	Yok	1
45	c.2960_2968dupTTGGTCCTGp.Val987_ Pro989dup	Diğer variant	Norm	Norm	Yok	Yok	1
OR gen							
46	P3H1: c.635G>A (p.Gly212Glu)		Het	Het	Var	Yok	1
47	P3H1: c.635G>A (p.Gly212Glu)		Het	-	Yok	Var	3

48	<i>P3H1</i> : c.446T>G (p.Leu149Arg)	-	-	Yok	Yok	3
49	<i>P3H1</i> : c.446T>G (p.Leu149Arg)	-	Het	Var	Yok	4
50	<i>P3H1</i> : c.446T>G (p.Leu149Arg)	-	-	Var	Var	3
51	<i>P3H1</i> : c.446T>G (p.Leu149Arg)	-	Het	Var	Var	4
52	<i>SERPINF1</i> :c.619_621del (p.207_207del)	Het	Het	Var	Yok	3
53	<i>SERPINF1</i> :c.730_732delATG (p.Met244del)	Het	Het	Var	Yok	3
54	<i>SERPINF1</i> : c.80dupA (p.E27fs)	Het	Het	Var	Yok	1
55	<i>SERPINF1</i> :c.188dupA (p.Y63_D64delinsX)	Het	Het	Var	Yok	4
56	<i>SERPINF1</i> : c.620T>G (p.Leu207Arg)	-	Het	Var	Yok	3
57	<i>FKBP10</i> :c.321_353del (p.M107_L117del)	Het	Het	Var	Yok	1
58	<i>FKBP10</i> :c.889_890insTGATGGAC (p.L297fs)	Het	Het	Var	Yok	4
59	<i>FKBP10</i> :c.890_897dupTGATGGAC (p.Gly300Ter)	-	-	Var	Yok	3
60	<i>FKBP10</i> :c.831dupCp.Gly278ArgfsTer95	-	-	Var	Yok	4
61	<i>FKBP10</i> :c.890_897dupTGATGGAC (p.Gly300Ter)	-	-	Var	Yok	4
62	<i>CRTAP</i> : c.460G>C (p.Ala154Pro)	-	-	Var	Yok	3
63	<i>SPARC</i> c.884 A>T (p.Lys295Met)	-	-	Yok	Yok	3

4.2.1.COL1A1 ve COL1A2 genlerindeki heterozigot mutasyonların tiplerine göre dağılımı

Hastaların 45’de (%57) *COL1A1/A2* genlerinde mutasyon saptandı, bunların %75.5 *COL1A1*, %24.5 ise *COL1A2* geninde idi.

COL1A1/A2 gen mutasyonu saptanan 45 aileden 41’nde farklı mutasyon vardı. *COL1A1* geninde toplam 34 ailede 31 farklı mutasyon bulundu, 3 ailede mutasyonlar aynıydı. *COL1A2* genlerinde 11 aileden 10’nda farklı mutasyon vardı. *COL1A1* gen mutasyonu olan hastalarda aile ağacı ve sanger analiz örnekleri (şekil 4-4, şekil 4-5, şekil 4-6, şekil 4-7, şekil 4-8, şekil 4-9, şekil 4-10, şekil 4-11, şekil 4-12, şekil 4-13, şekil 4-14, şekil 4-15, şekil 4-16, şekil 4-17, şekil 4-18, şekil 4-19, şekil 4-20, şekil 4-21, şekil 4-22, şekil 4-23, şekil 4-24,

şekil 4-25, şekil 4-26, şekil 4-27, şekil 4-28, şekil 4-29)’de gösterildi. *COL1A2* gen mutasyonu olan hastalarda aile ağacı ve sanger analiz örnekleri ise (şekil 4-30, şekil 4-31, şekil 4-32, şekil 4-33, şekil 4-34, şekil 4-35, şekil 4-36, şekil 4-37)’de gösterildi

COL1A1/A2 genlerinde stop kodon oluşturan nonsense veya çerçeve kayması tipinde 8 farklı mutasyon (*COL1A1*, n = 7; *COL1A2*, n = 1) bulunurken, splice bölgesi mutasyonları (*COL1A1*, n = 8; *COL1A2*, n = 1) 9 hastada mevcuttu (Tablo 4-2 ve Tablo 4-3; Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

Hastaların 25’nde saptanan missense mutasyonların 21’i üçlü sarmal alandaki glisin kalıntısını değişmesine sebep olan missense mutasyondur. (*COL1A1*, n = 13; *COL1A2*, n=8).

Bir hastada *COL1A2* geninde küçük delesyon, diğer bir hastada ise MLPA yöntemi ile tüm *COL1A1* genin içeren heterozigot delesyon olarak belirlendi.

Tablo 4-3: *COL1A1* ve *COL1A2* genlerindeki heterozigot mutasyonların tiplerine göre dağılımı

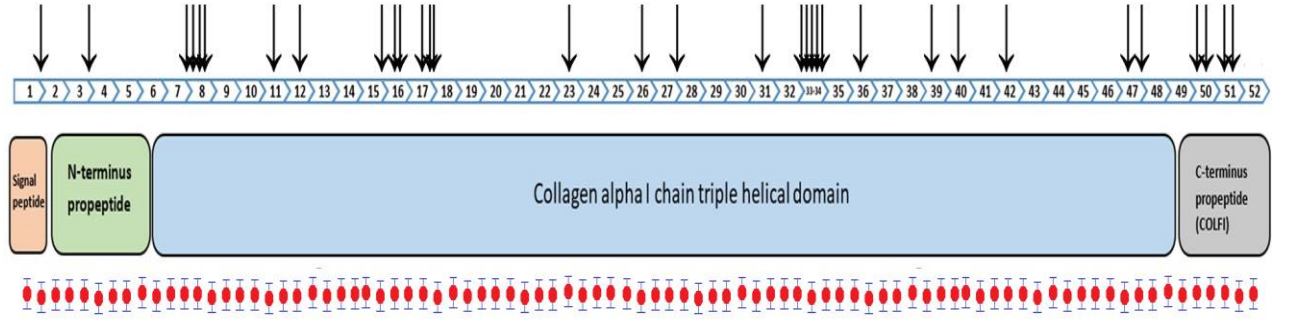
<i>COL1A1</i>			<i>COL1A2</i>		Toplam
	Bilinen	Yeni	Bilinen	Yeni	
Missense:					
Glisin değişimi	10	3	7	1	21
Diğer	4	-	-	-	4
Nonsense	5	2	-	1	8
Splice Site	4	4	1	-	9
İndel/dup	-	1	1	-	2
Büyük delesyon	1	-	-	-	1
Toplam	24	10	9	2	45

COL1A1/A2 genlerinde mutasyonların lokalizasyonu Tablo 4-4’de gösterildi. *COL1A1* ve *COL1A2* genler için hotspot mutasyonlar bulunmadı (Şekil 4-2 ve Şekil 4-3).

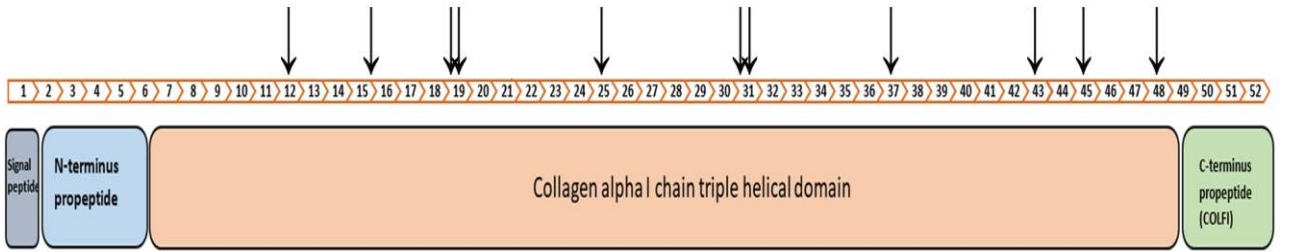
Tablo 4-4: COL1A1/COL1A2 genlerde mutasyonların gen üzerindeki lokalizasyonuna göre dağılımı

Ha sta No	Mutasyon	Mutasyon tipi	Exon/intron
COL1A1			
1	IVS2-1G>C (c.299-1G>C)	Splice Varyant	Intron 2
2	IVS7 ds G-A +1 (c.588+1G>A)		Intron 7
3	IVS17+1G>C (c.1155+1G>C)		Intron 17
4	IVS48 ds G-A +1 (c.3531+1G>A)		Intron 47
5	c.370-2A>G		Intron 4
6	c.1155+3_1155+6delAAGT		Intron 17
7	c.1930-1G>T		Intron 28
8	c.2397+7A>C		Intron 34
9	c. 579delT (p.Gly194ValfsTer71)	Stop Varyant	Ekzon 16
10	c.1128delT (p.Gly377AlafsTer164)		Ekzon 17
11	c.1792C>T (p.R598*)		Ekzon 26
12	c.1128delT (p.Gly377AlafsTer164)		Ekzon 17
13	c.4051C>T (p.Gln1351*)		Ekzon 50
14	c.2068 delC (p.Pro691Leu*75)		Ekzon 31
15	c.2715 delC (p.Gly906Alafs*202)		Ekzon 39
16	c.607G>C (p.Gly203Arg)	Gly'ni değiştiren varyant	Ekzon 8
17	c.608G>T (p.Gly203Val)		Ekzon 8
18	c.814G>T (p.Gly272Cys)		Ekzon 12
19	c.959G>T (p.Gly320Val)		Ekzon 15
20	c.1588G>A (p.Gly530Ser)		Ekzon 23
21	c.2299G>A (p.Gly767Ser)		Ekzon 33
22	c.2299G>A (Gly767Ser)		Ekzon 33
23	c.2471G>C (p.Gly824Ala)		Ekzon 36
24	c.3505G>A (p.Gly1169Ser)		Ekzon 47

25	c.4237G>A (Asp1413Asn)		Ekzon 50
26	c.2854C>T (p.Gln952Ter)		Ekzon 40
27	c.1012G>C (p.Gly338Arg)		Ekzon 16
28	c.770G>T (p.Gly257Val)		Ekzon 11
29	c.613C>G (p.Pro205Ala)		Ekzon 8
30	c.3076C>T (p.Arg1026Ter)		Ekzon 42
31	c.4391T>C (Leu1464Pro)	Diğer varyant	Ekzon 51
32	c.4391T>C (Leu1464Pro)		Ekzon 51
33	c.2340_2343+delCAAGGTGA		Ekzon 33
34	COL1A1 DELESYON	Tüm gen delesyonu	Tüm gen
35	c.739-2A>G splice heterozigot	Splice varyant	İntron 15
36	c.3581_3587del (p.Tyr1194PhefsTer33)	Stop Varyant	Ekzon 48
37	c.2252G>T (p.Gly751Val)		Ekzon 37
38	c.577G>A (p.Gly193Ser)		Ekzon 12
39	c.2791G>A (p.Gly931Arg)		Ekzon 43
40	c.1801G>A (Gly601Ser)	Gly'ni değiştiren varyant	Ekzon 31
41	c.982G>A (p.Gly328Ser)		Ekzon 19
42	c.982G>A (p.Gly328Ser)		Ekzon 19
43	c.1801G>A (p.Gly601Ser)		Ekzon 31
44	c.1477G>A (p.Gly493Arg)		Ekzon 25
45	c.2960_2968dupTTGGTCCTGp. Val987_Pro989dup	Diğer varyant	Ekzon 45



Şekil 4-2. *COL1A1* geninde varyantların dağılımı. Oklar gen üzerinde varyantların dağılımını göstermektedir. Kırmızı işaret tüm gen delesyonunu göstermektedir.



Şekil 4-3. *COL1A2* geninde varyantların dağılımı.

4.2.2. OTOZOMAL RESESİF KALITILAN Oİ NEDEN OLAN GENLERDE BELİRLENEN HOMOZİGOT MUTASYONLARIN DAĞILIMI

Hastalarda 18'sinde otozomal resesif kalıtılan Oİ neden olan 13 farklı homozigot mutasyon saptandı. Otozomal resesif tiplerde aile ağacı ve sanger analiz örnekleri (Şekil 4-38, şekil 4-39, şekil 4-40, şekil 4-41, şekil 4-42)'de gösterildi.

Bunlar sıklık sırasına göre; altı hastada *P3H1* geninde homozigot mutasyon saptandı bunlardan 4 ailede aynı mutasyon varken, diğer 2 ailede de benzer mutasyon vardı.

Beş hastada *SERPINF1* geninde birbirinden farklı biallelik mutasyon mevcuttu.

Beş hastada *FKBP10* geninde 4 farklı biallelik mutasyon vardı, 2 ailede aynı mutasyon bulundu.

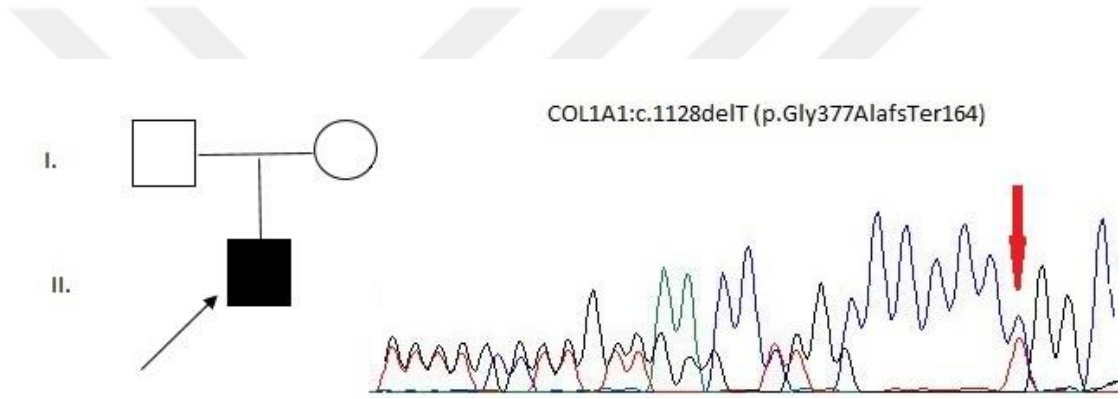
Bir hastada *CRTAP* ve diğer bir hastada ise *SPARC* geninde homozigot mutasyon bulundu.

4.3. COL1A1/A2 GEN VE OTOZOMAL RESESİF TIPE NEDEN OLAN GENLERDE MUTASYON BULUNAN OLGULARIN AİLE AĞACI VE SANGER METODU İLE YAPILAN DİZİLEME VE SEGREGASYON ANALİZLERİNDEN ÖRNEKLER

3.3.1. COL1A1 GEN MUTASYONU OLAN HASTALAR

1. Olgu 12.

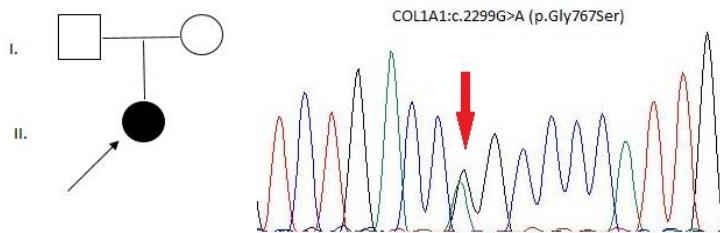
İndeks II'de saptanan COL1A1: c.1128delT (p.Gly377AlafsTer164). Yuva çocuğu olduğundan dolayı, ailede segregasyon analizi yapılamadı.



Şekil 4-4. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

2. Olgu 21.

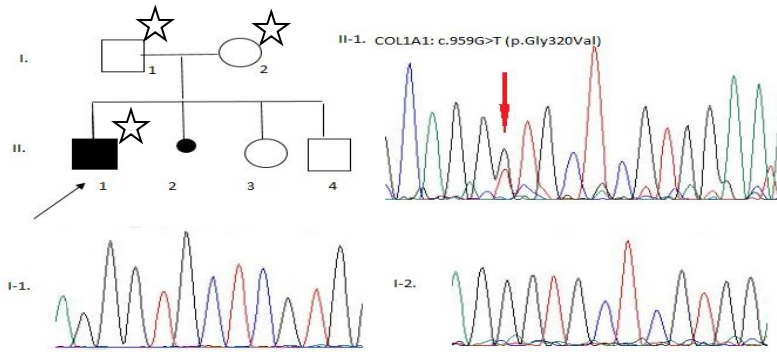
İndeks II'de saptanan COL1A1: c.2299G>A (p.Gly767Ser) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Yuva çocuğu olduğundan dolayı, ailede segregasyon analizi yapılamadı.



Şekil 4-5. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

3. Olgu 19.

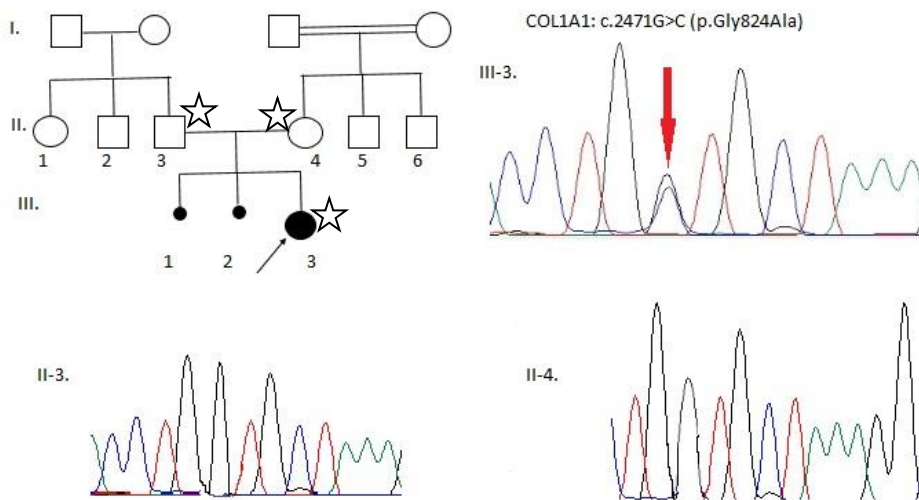
İndeks II-1’de saptanan *COL1A1*: c.959G>T (p.Gly320Val) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba I-1’de ve anne I-2’da mutasyon saptanmadı. Mutasyon *de novo* olarak değerlendirildi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-6. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

4. Olgu 23.

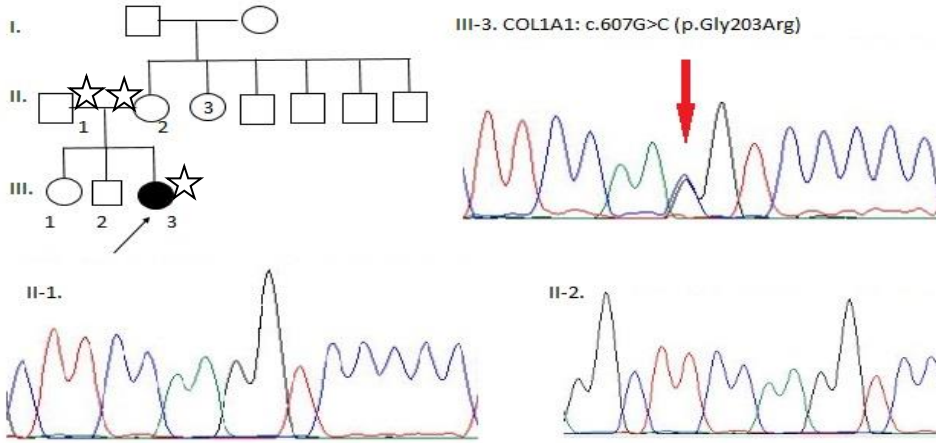
İndeks III-3’de saptanan *COL1A1*: c.2471G>C (p.Gly824Ala) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-3’de ve anne II-4’da mutasyon saptanmadı. Mutasyon *de novo* olarak değerlendirildi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-7. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

5. Olgu 16.

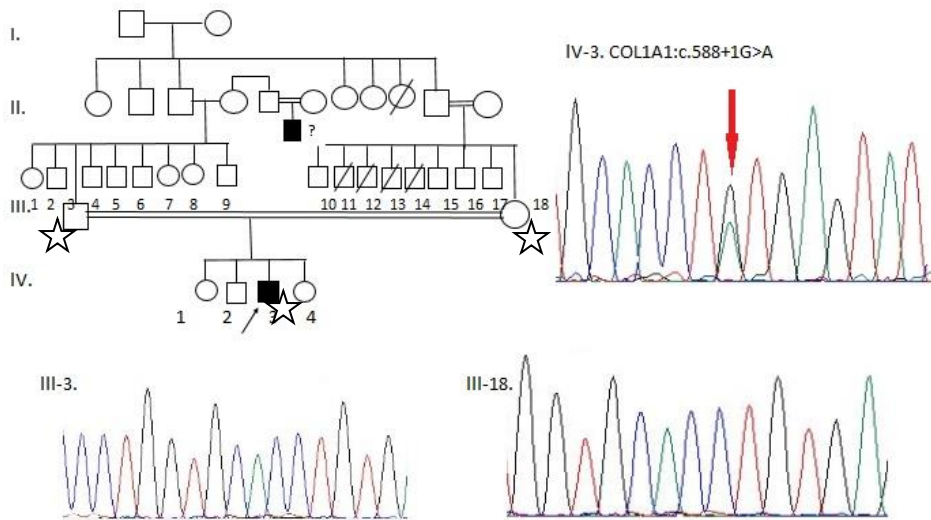
İndeks III-3'de saptanan *COL1A1*: c.607G>C (p.Gly203Arg) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-1'de ve anne II-2'da mutasyon saptanmadı. Mutasyon *de novo* olarak değerlendirildi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-8. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

6. Olgu 2.

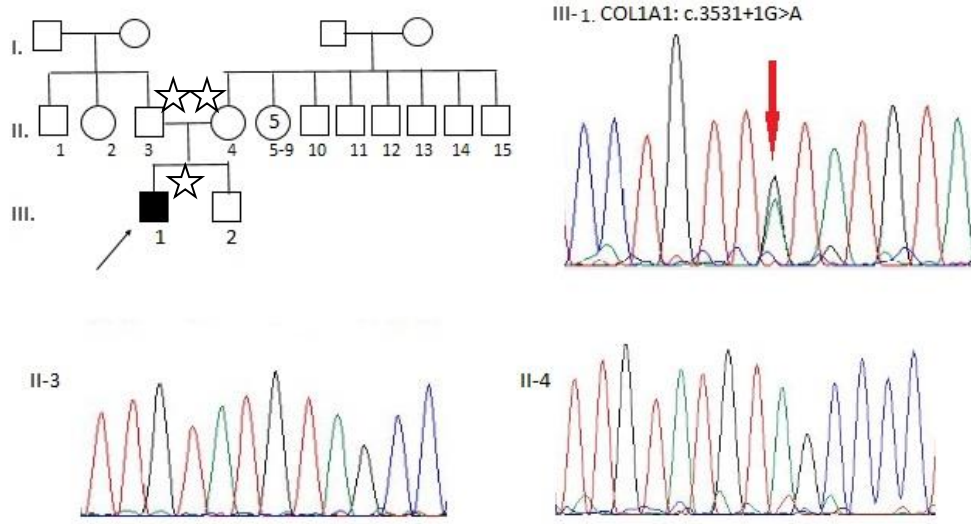
İndeks IV-3'de saptanan *COL1A1*: c.588+1G>A (IVS7 ds G-A +1) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba III-3'de ve anne III-18'da mutasyon saptanmadı. Mutasyon *de novo* olarak değerlendirildi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-9. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

7. Olgu 4.

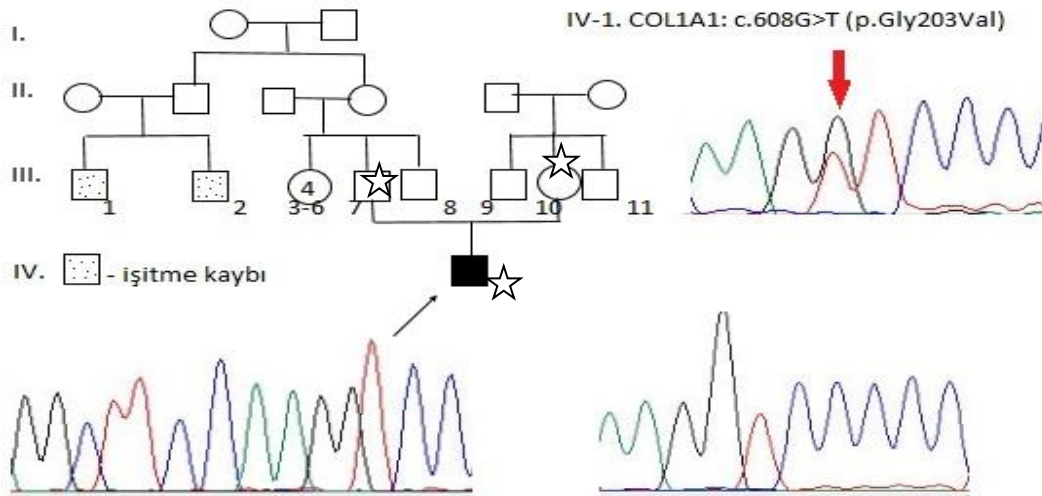
İndeks III-1'de saptanan *COL1A1*: c.3531+1G>A (IVS 48 ds G-A +1) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-3'de ve anne II-4'de mutasyon saptanmadı. Mutasyon *de novo* olarak değerlendirildi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-10. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

8. Olgu 17.

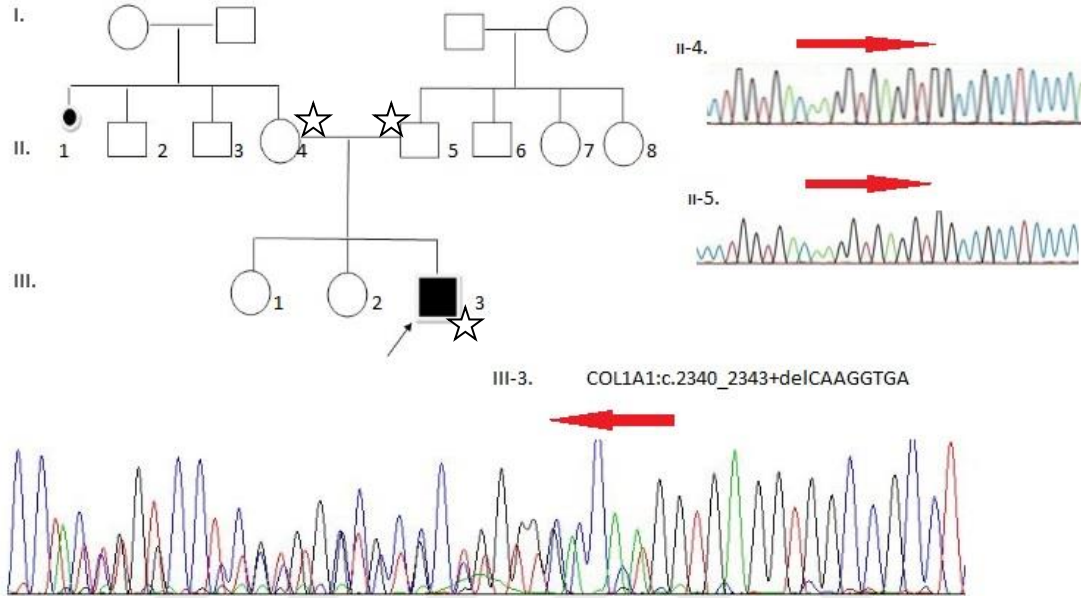
İndeks IV-1'de saptanan *de novo* *COL1A1*: c.608G>T (p.Gly203Val) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba III-7'de ve anne III-10'de mutasyon saptanmadı. Mutasyon *de novo* olarak değerlendirildi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-11. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

9. Olgu 33.

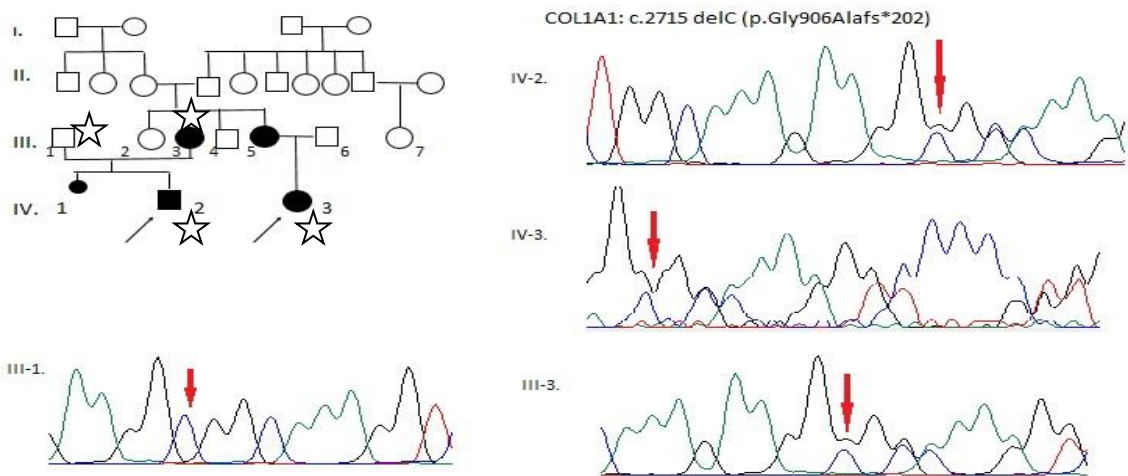
İndeks III-3'de saptanan *COL1A1*: c.2340_2343+delCAAGGTGA heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Anne II-4'de ve baba II-5'de mutasyon saptanmadı. Mutasyon *de novo* olarak değerlendirildi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-12. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

10. Olgu 15.

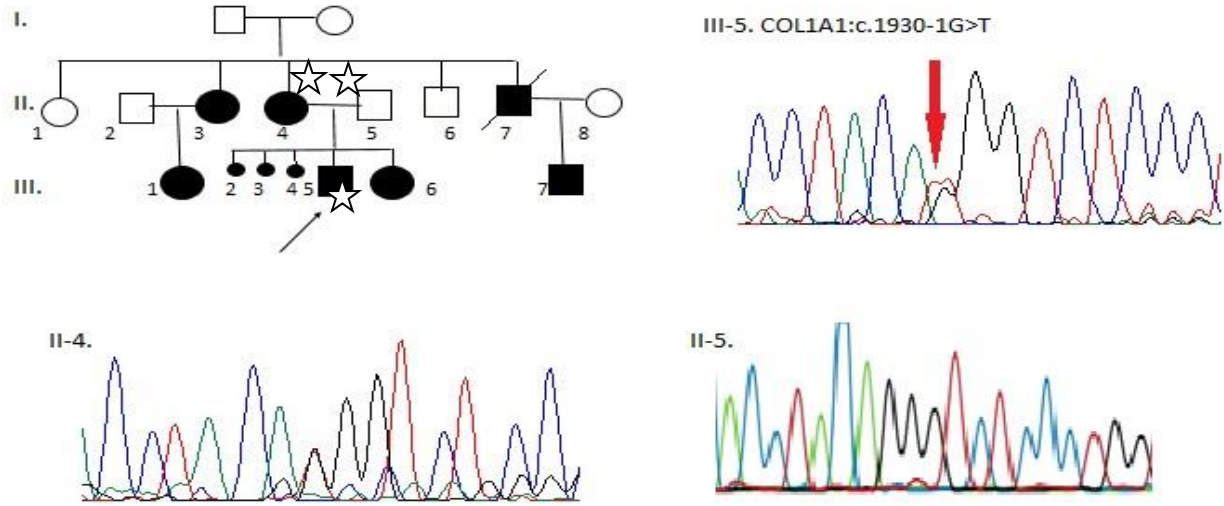
İndeks IV-2 ve IV-3'de saptanan *COL1A1*: c.2715 delC (p.Gly906Alafs*202) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba III-1'de yabancı, anne III-3'de mutasyon saptandı. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-13. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

11. Olgu 7.

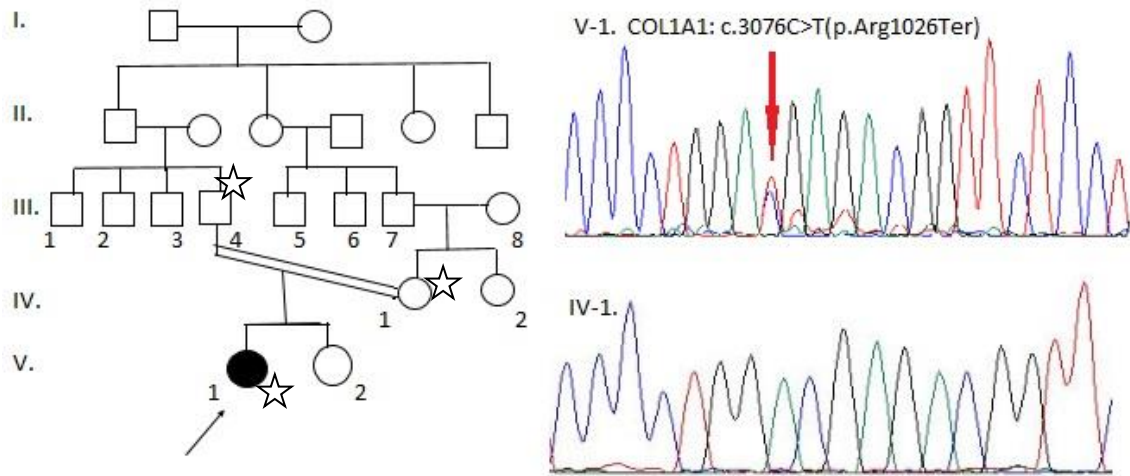
İndeks III-5’de saptanan *COL1A1*: c.1930-1G>T heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-5’de yabancı, anne II-4’de mutasyon saptandı. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-14. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

12. Olgu 30.

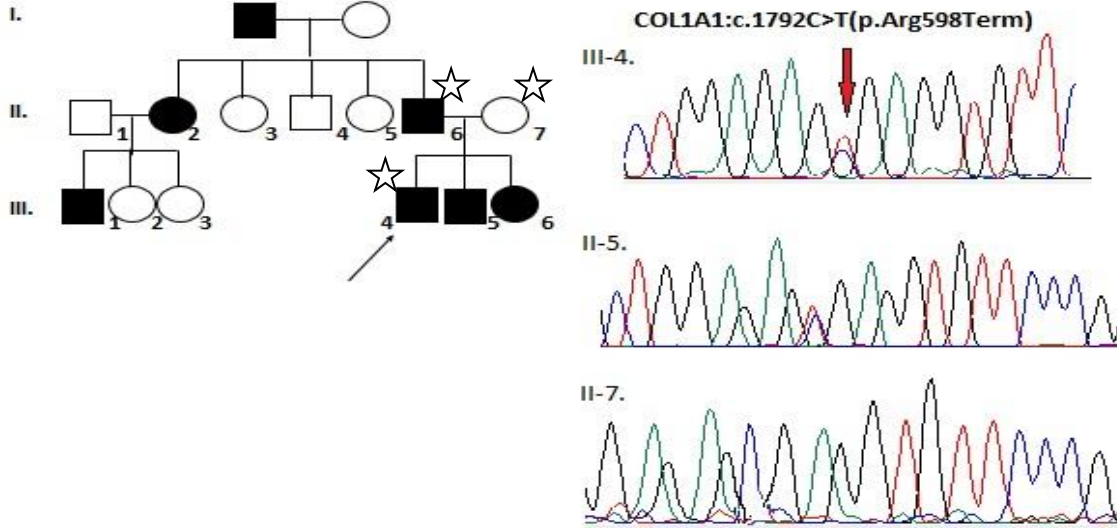
İndeks V-1’de saptanan *COL1A1*: c.3076C>T (p.Arg1026Ter) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Anne IV-1’de mutasyon saptanmadı. Baba III-4’de çalışma devam ediyor. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-15. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

13. Olgu 11.

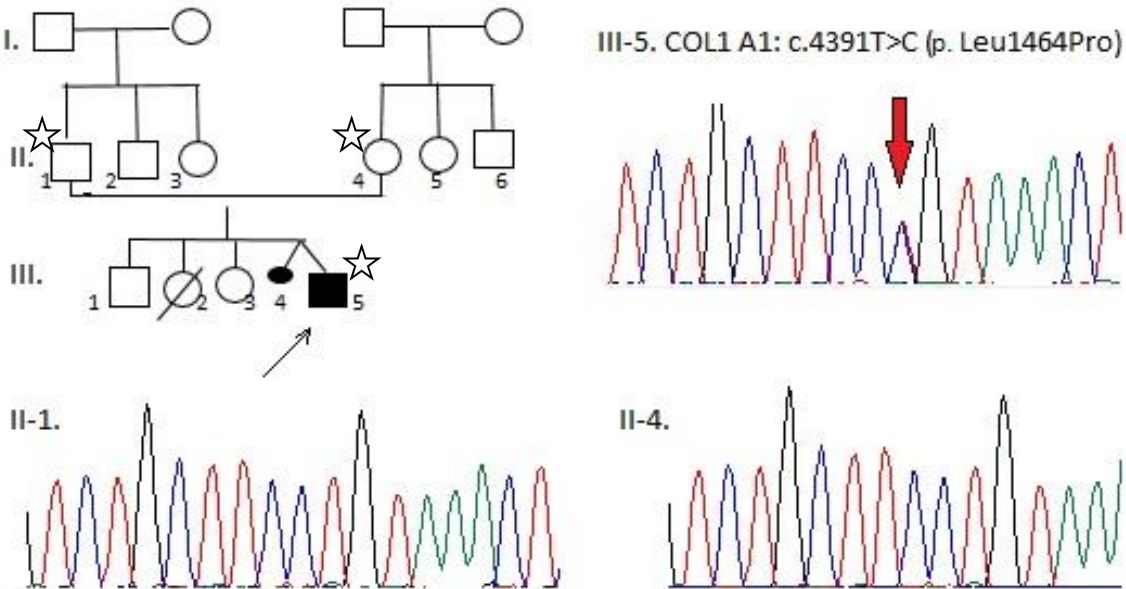
İndeks III-4'de saptanan *COL1A1*: c.1792C>T (p.Arg598Term) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Üç jenerasyonda görülen mutasyon, Baba II-6'dan kalıtıldığı gösterildi, Anne II-7'de bu variant gözlenmedi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-16. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

14. Olgu 32.

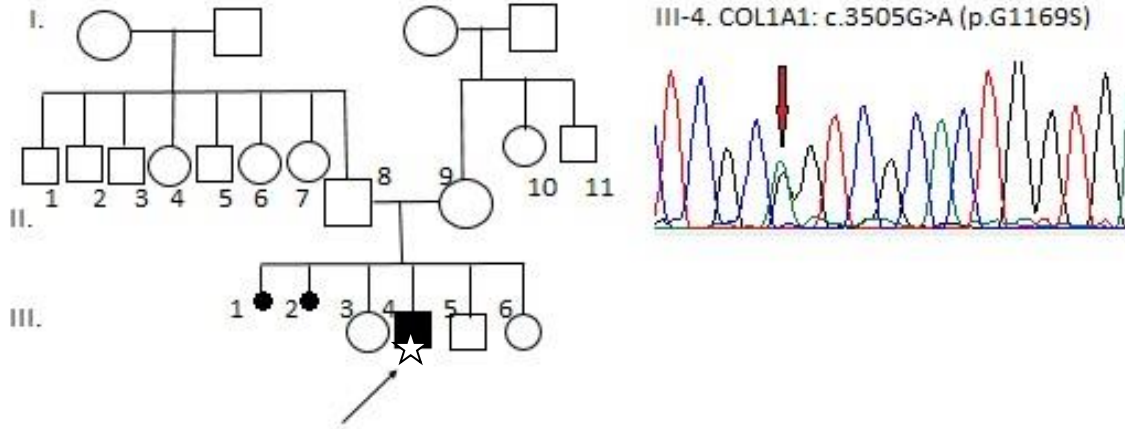
İndeks III-5'de saptanan *COL1A1*: c.4391T>C (p.Leu1464Pro) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-1'de ve Anne II-4'de bu variant gözlenmedi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-17. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

15. Aile 24.

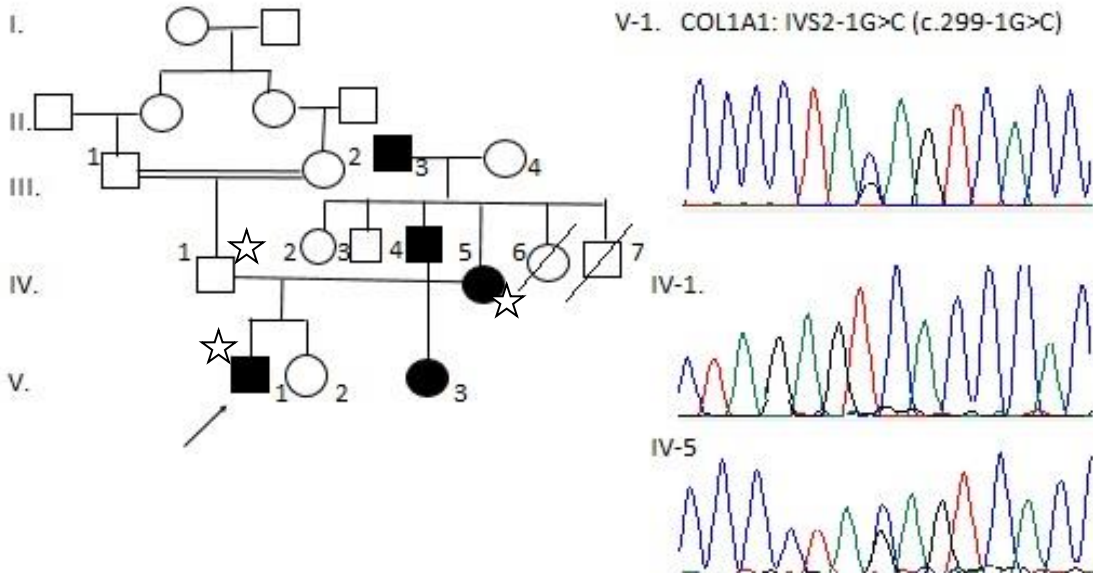
İndeks III-4’de saptanan *COL1A1*: c.3505G>A (p.G1169S) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-18. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

15. Olgu 1.

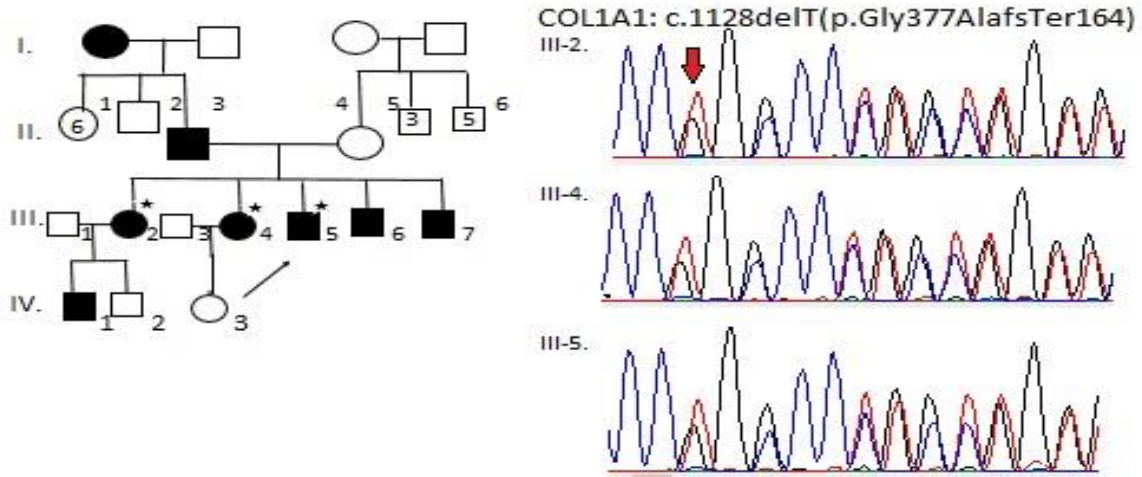
İdeks V-1’de saptanan *COL1A1*: IVS2-1G>C (c.299-1G>C) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Mutasyonun Anne IV-1’den kalıtıldığı gösterildi. Baba IV-5’de bu variant gözlenmedi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-19. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

16- Olgu 10.

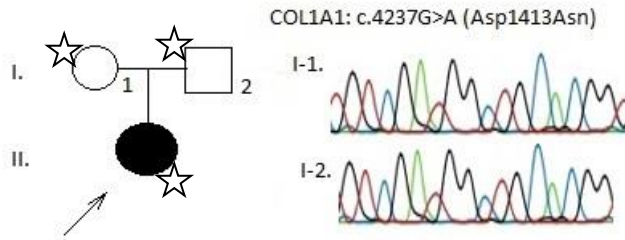
İndeks III-5’de saptanan *COL1A1*: c.1128delT (p.Gly377AlafsTer164) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Mutasyonu III-2, III-4 kardeşlerinde taşıyıcılığı gösterildi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-20. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

17. Olgu 25.

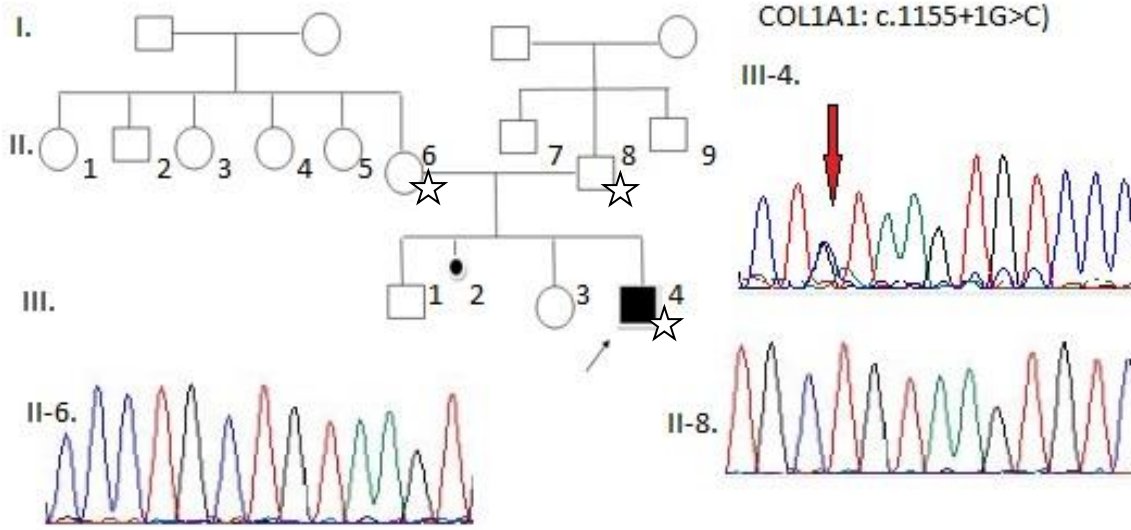
İndeks II-1’de saptanan *COL1A1*: c.237G>A (p.Asp1413Asn) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba I-1’de ve anne I-2’de mutasyon saptanmadı. İndeks olgu II-1’de mutasyon Miseq platformunda saptandı. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-21. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

18. Olgu 3.

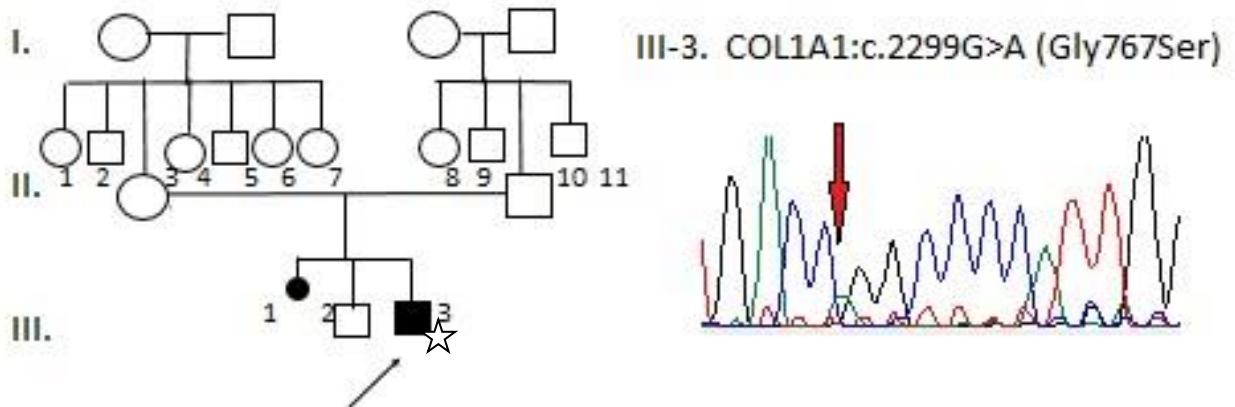
İndeks III-4'de saptanan *COL1A1*: c.1155+1G>C heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Anne II-6'de ve baba II-8'de mutasyon saptanmadı. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-22. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

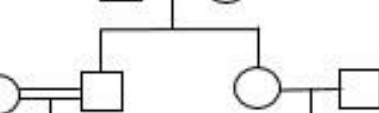
19. Olgu 22.

İndeks III-3'de saptanan *COL1A1*: c.2299G>A (p.Gly767Ser) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



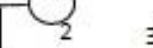
Şekil 4-23. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

20. Olgu 18.

I. 

IV-1. COL1A1: c.814G>T (Gly272Cys)

III-3. 

III-4. 

21. Olgu 27.

COL1A1: c.1012G>C (p.Gly338Arg)

I.

II. 1 2 3 4 5 6

III. 1 2

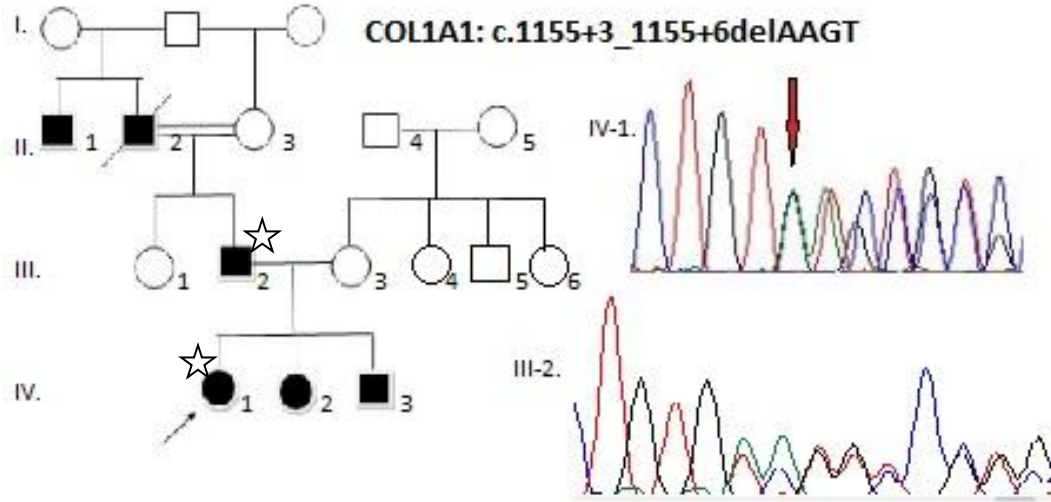
II-1.

II-4.

III-2.

22. Olgu 6.

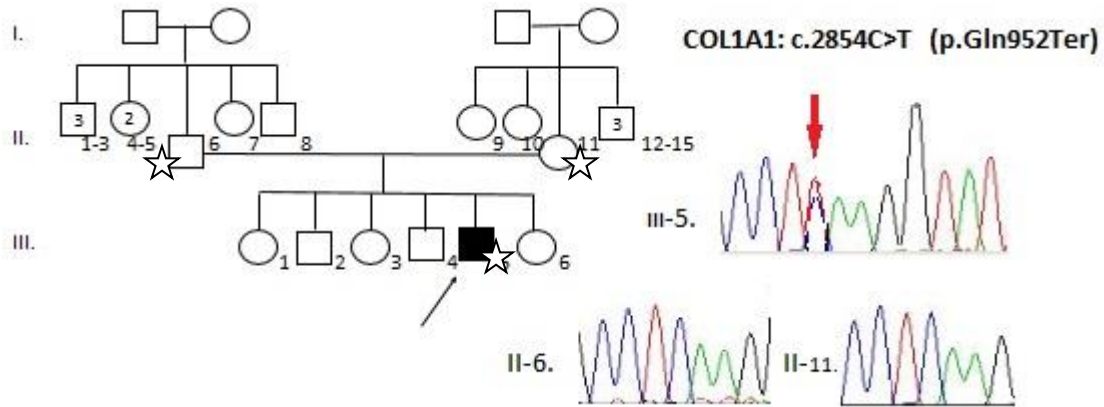
İndeks IV-1'de saptanan *COL1A1*: c.1155+3_1155+6delAAGT heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba III-2'de mutasyon saptandı. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-26. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

23. Olgu 26.

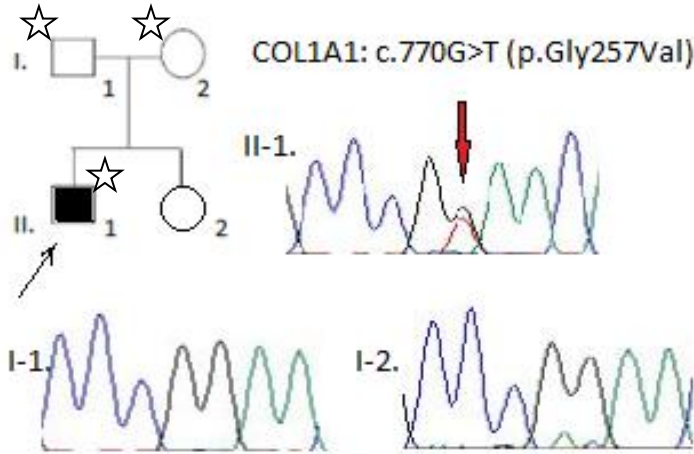
İndeks IV-1'de saptanan *COL1A1*: c.2854C>T (p.Gln952Ter) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba II-6'de ve anne II-11'de mutasyon saptanmadı. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-27. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

24. Olgu 28.

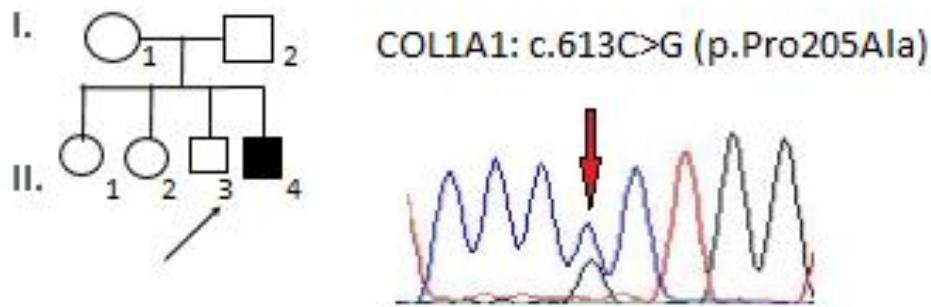
İndeks II-1’de saptanan *COL1A1*: c.770G>T (p.Gly257Val) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Baba I-1’de ve Anne I-2’de mutasyon saptanmadı. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-28. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

25. Olgu 29.

İndeks II-4’de saptanan *COL1A1*: c.613C>G (p.Pro205Ala) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması.

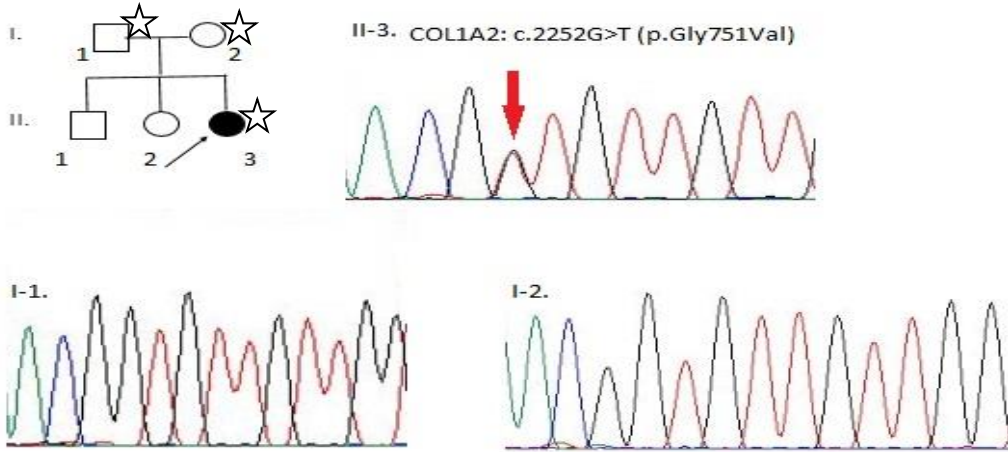


Şekil 4-29. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

4.1.1. COL1A2 GEN MUTASYONU OLAN HASTALAR

1. Olgu 37.

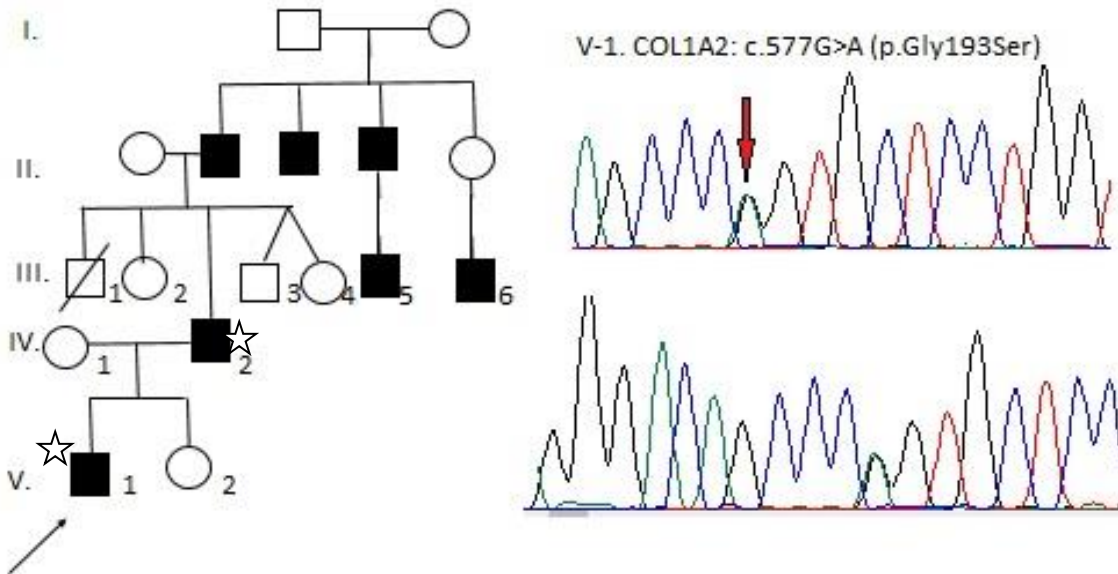
İndeks II-3'de saptanan COL1A2: c.2252G>T (p.Gly751Val) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba I-1'de ve anne I-2'de mutasyon saptanmadı. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-30. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

2. Olgu 38.

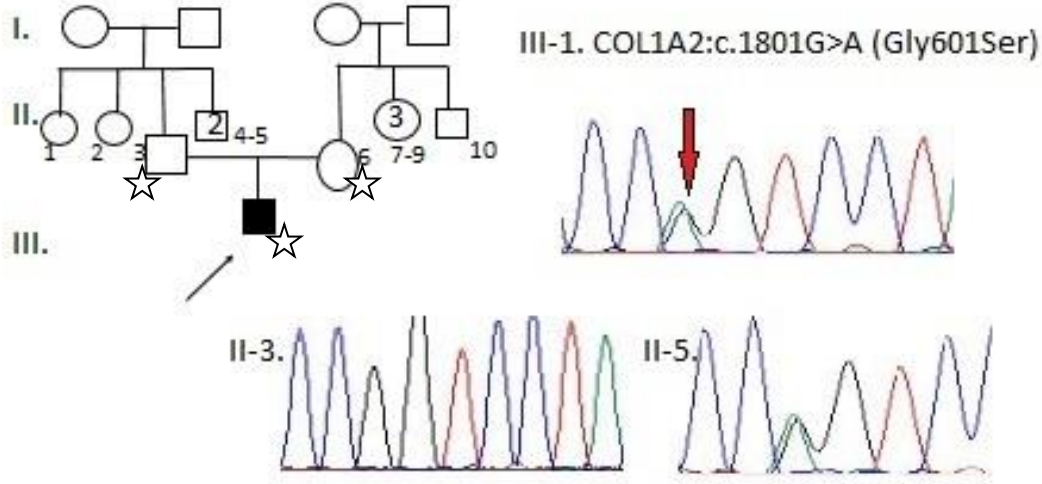
İndeks V-1'de saptanan COL1A2: c.577G>A (p.Gly193Ser) heterozigot mutasyon; Baba IV-2'de klinik ile uyumlu olarak taşıdığı gösterildi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-31. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

3. Olgu 40.

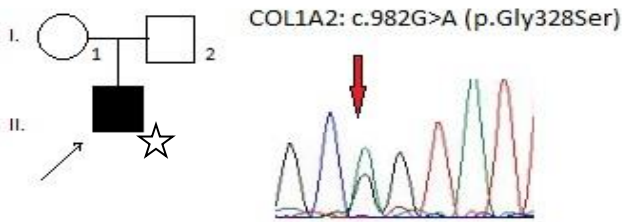
İndeks III-1'de saptanan COL1A2: c.1801G>A (p.Gly601Ser) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Anne II-6'de saptanan mutasyon, baba II-3'de gözlenmedi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-32. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

4. Olgu 42.

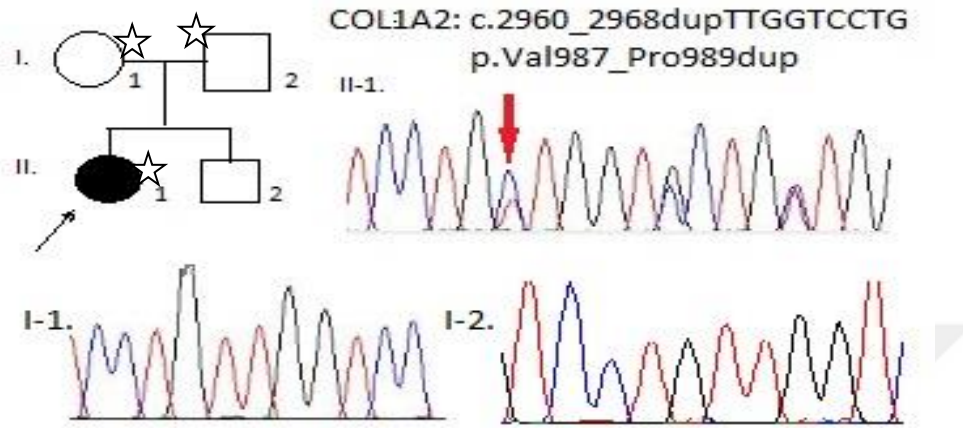
İndeks II-1'de saptanan COL1A2: c.982G>A (p.Gly328Ser) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-33. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

5. Olgu 45.

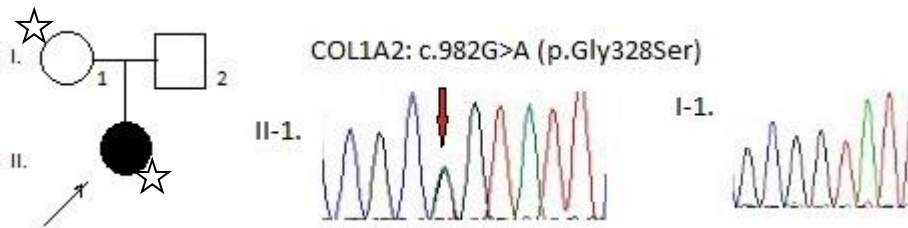
İndeks II-1'de saptanan COL1A2: c.2960_2968dupTTGGTCCTG p.Val987_Pro989dup heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Anne I-1'de ve baba I-2'de mutasyon gözlenmedi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-34. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

6. Olgu 41.

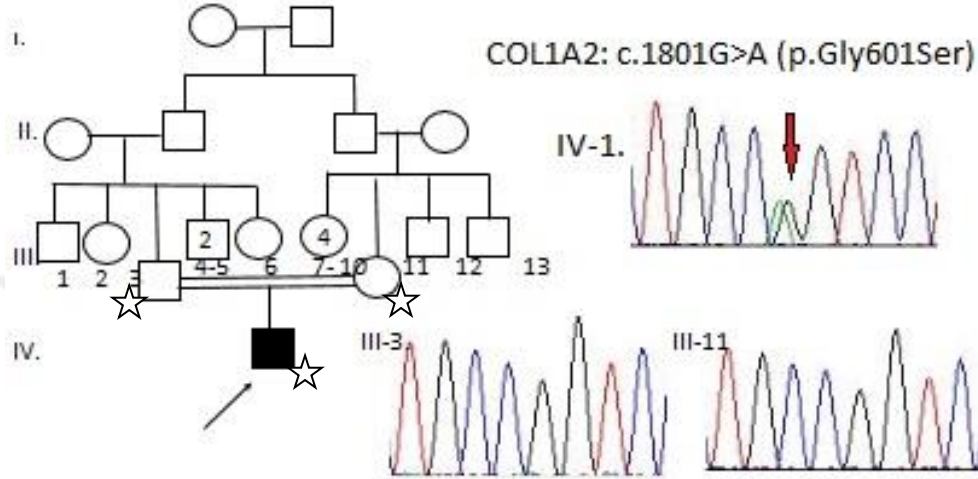
İndeks II-1'de saptanan COL1A2: c.982G>A (p.Gly328Ser) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Anne I-1'de mutasyon gözlenmedi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-35. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

7. Olgu 43.

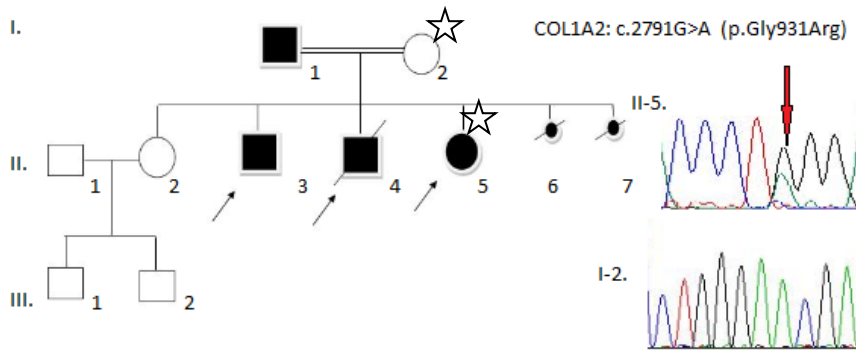
İndeks IV-1’de saptanan COL1A2: c.1801G>A (p.Gly601Ser) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması; Baba III-3’de ve anne III-11’de mutasyon saptanmadı. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-36. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

8. Olgu 39.

İndeks II-5’de saptanan COL1A2: c.2791G>A (p.Gly931Arg) heterozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Anne I-2’de mutasyon saptanmadı. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.

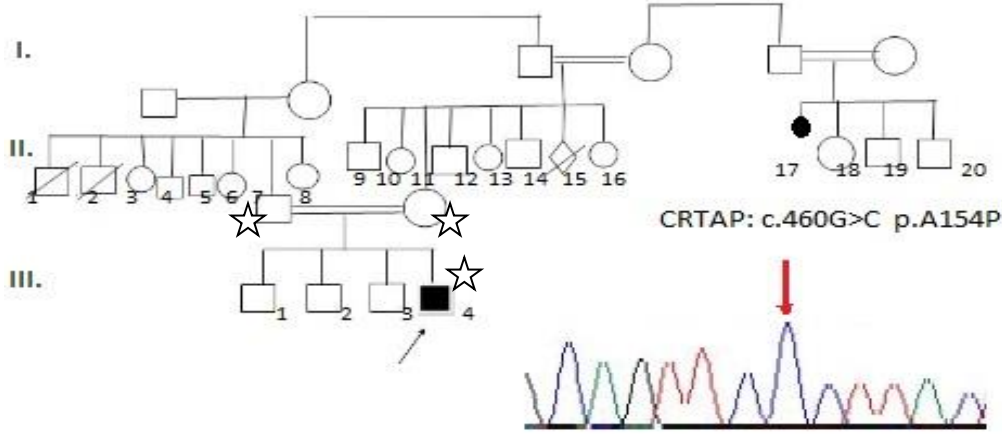


Şekil 4-37. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

4.1.2. OTOZOMAL RESESİF TIPLERDE AİLE AĞACI VE SANGER ANALİZİNE ÖRNEKLER

1. Olgu 61.

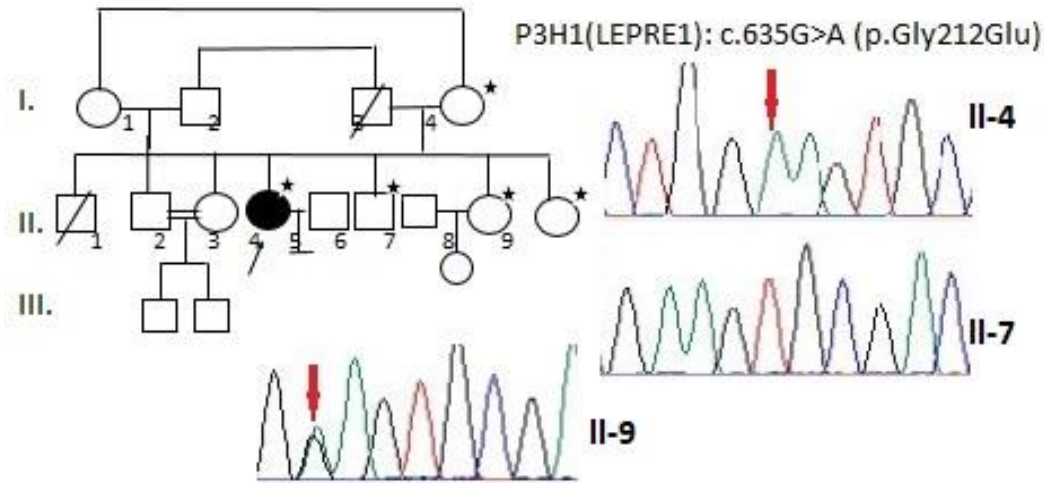
İndeks III-4’de saptanan CRTAP: c.460G>C (p.A154P) homozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-38. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

2. Olgu 47.

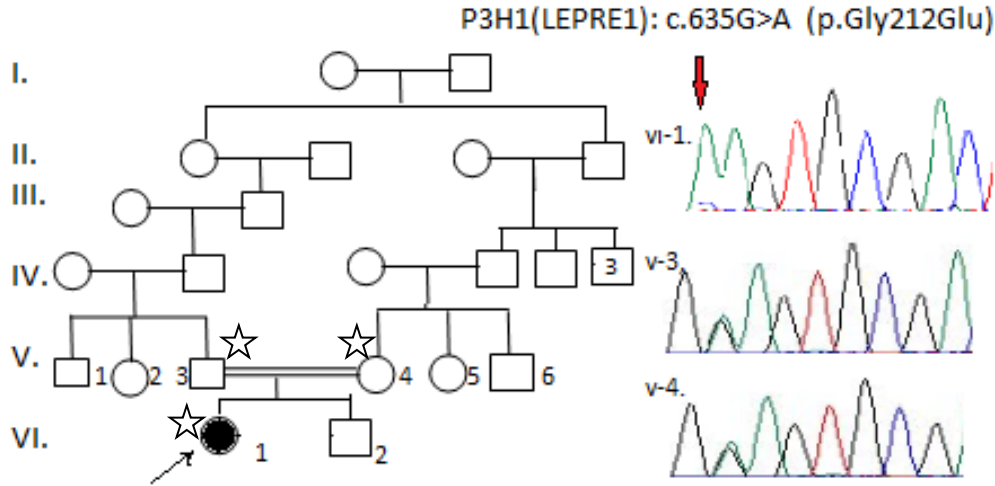
İndeks II-4’de saptanan P3H1(LEPRE1): c.635G>A (p.Gly212Glu) homozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Saptanan varyan açısından Kardeş II-7 homozigot, Kardeş II-8 heterozigot olarak saptandı. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-39. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

3. Olgu 46.

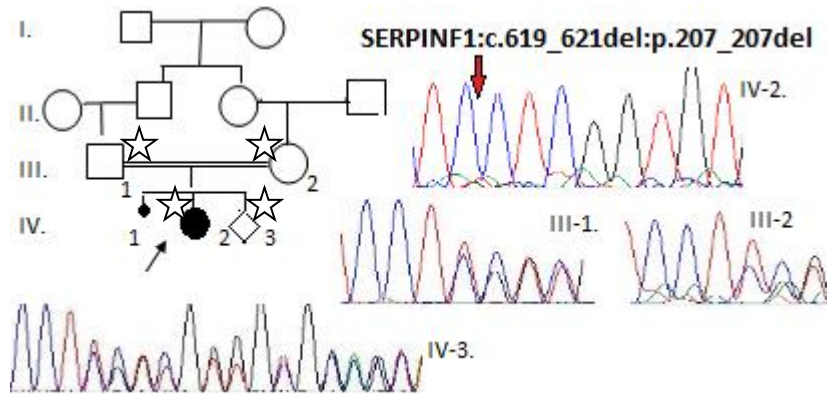
İndeks VI-1’de saptanan P3H1(LEPRE1): c.635G>A (p.Gly212Glu) homozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Saptanan varyan açısından Baba V-3’de ve anne V-4’de heterozigot taşıyıcılığı gösterildi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-40. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

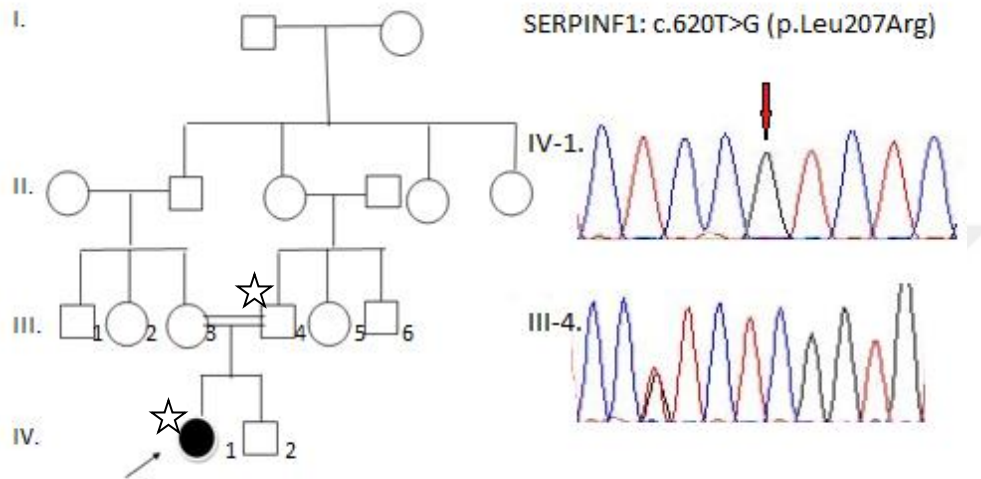
4. Olgu 52.

İndeks VI-2’de saptanan SERPINF1: c.619_621del p.207_207del homozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Saptanan varyan açısından Baba V-3’de ve anne V-4’de heterozigot taşıyıcılığı gösterildi. Fetus IV-3’de mutasyon heterozigot olarak saptandı. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-41. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

İndeks VI-1’de saptanan SERPINF1: c.620T>G (p.Leu207Arg) homozigot mutasyonun Sanger doğrulaması. Saptanan varyan açısından Baba V- heterozigot taşıyıcılığı gösterildi. Yıldız simgesi ile belirtilen olgular segregasyon analizine alındı.



Şekil 4-42. Aile ağacı ve Sanger görüntülemesi.

4.4. GENOTIP- FENOTIP İLİŞKİSİ

COL1A1A2 mutasyonu olan hastaların, mutasyonun tipi ve klinik tiple uyumu Tablo 3.2’de özetlenmiştir.

COL1A1/A2 mutasyonu olan olgularda mutasyon tipine göre klinik tipin ağırlığında farklılıklar vardı. Glisin serin değiştiği missense mutasyonlarda kliniğin ağır tipi olan tip 3 ve 4 fenotipi daha sıkı (Tablo-4.1 ve Tablo 4.4) Otozomal resesif kalıtım gösteren 18 hastanın dokuzu ağır tiplerden olan tip3 ve altısı tip 4 fenotipi gösterirken dört hastada hafif bulguları olan tip 1 fenotipi mevcuttu (Tablo 4.4).

COL1A1 gen mutasyonları toplam 34 olguda saptandı. 13 olguda glisini değiştiren nokta mutasyonu tespit edildi. Bu olguların altısı Oİ tip 1, yedisi tip 2-3 ile uyumlu idi. *COL1A2* gen mutasyonu 11 olguda saptandı. Bu olguların altısı Oİ tip 1, üç olgu Oİ tip 3 ve iki olgu Oİ tip 4 ile uyumlu bulundu. *COL1A1* ve *COL1A2* mutasyona sahip Oİ hastalarda glisini değiştiren varyant %46,6 olguda görüldü. Bunların %28,9 *COL1A1* geninde saptanan mutasyon iken, %17,7’i *COL1A2* geninde saptandı. *COL1A1* mutasyonlu olguların Oİ tip 1 ile uyumlu yedisinde stop varyant değişimi saptandı. *COL1A2* mutasyonlu olguların sadece bir olguda stop varyant olup Oİ tip 1 ile uyumlu idi. . *COL1A1* ve *COL1A2* mutasyona sahip Oİ hastalarda stop varyant %17,8 olguda saptandı. Bunların %15,6 *COL1A1* geninde saptanan mutasyon iken, %2,2’i *COL1A2* geninde saptandı. *COL1A1* geninde Splice varyantı sekiz olguda saptandı, bunların altı olgu Oİ tip 1, iki olgu Oİ tip 2-3 ile uyumlu bulundu. *COL1A2* geninde ise bir olgu Oİ tip 3 ile uyumlu idi. *COL1A1* ve *COL1A2* mutasyona sahip Oİ hastalarda splice varyant %19,9 olguda görüldü. Bunların %17,7 *COL1A1* geninde saptanan mutasyon iken, %2,2’i *COL1A2* geninde saptandı. *COL1A1* tüm gen delesyonu bir olguda tespit edildi, hastanın hafif klinik fenotipi Oİ tip 1 ile uyumlu idi. Geriye kalan patojenik varyantları *COL1A1* geninde %11,1 hastada saptandı, bunların dördü Oİ tip 1, bir olgu Oİ tip 4 ile uyumlu idi. *COL1A2* geninde %2,2’de (bir olgu) duplikasyon patojenik varyant saptandı, hastanın fenotipi Oİ tip 1 ile uyumlu idi.

Tablo 4-1. COL1A1 ve COL1A2 mutasyon tipi ile Oİ klinik tipin ilişkisi

Varyant tipi	Oİ tipi	COL1A1		COL1A2		Toplam	
		N	%	n	%	n	%
Gly'ni değiştiren variant	Tip 1	6	%13,3	4	%8,9	10	22,2
	Tip 2-3	7	%15,6	2	%4,4	9	20
	Tip4	-	-	2	%4,4	2	4,4
Toplam		13	%28,9	8	%17,7	21	46,6
Stop Varyant	Tip 1	7	%15,6	1	%2,2	8	17,8
	Tip 2-3	-	-	-	-	-	-
	Tip4	-	-	-	-	-	-
Toplam		7	%15,6	1	%2,2	8	17,8
Splice Varyant	Tip 1	6	%13,3	-	-	6	13,3
	Tip 2-3	2	%4,4	1	%2,2	3	6,6
	Tip4	-	-	-	-	-	-
Toplam		8	%17,7	1	%2,2	9	19,9
Tüm gen delesyonu	Tip 1	1	%2,2	-	-	1	2,2
	Tip 2-3	-	-	-	-	-	-
	Tip4	-	-	-	-	-	-
Toplam		1	%2,2	1	%2,2	2	4,4
Diğer varyantlar	Tip 1	4	%8,9	1	%2,2	5	11,1
	Tip 2-3	-	-	-	-	-	-
	Tip4	1	%2,2	-	-	1	2,2
Toplam		5	%11,1	1	%2,2	6	13,3

Tablo 4-2: Otozomal resesif genlerde mutasyon tipi ile Oİ klinik tipin ilişkisi

Oİ tipi	P3H1	SERPINF1	FKBP10	CRTAP	SPARK	Toplam (n)	%
Tip1	1	1	1	-	-	3	% 17
Tip 2-3	3	3	1	1	1	9	% 50
Tip 4	2	1	3	-	-	6	% 33
N	6	5	5	1	1	18	
%	%33	%28	%28	%5,5	%5,5		

4.3 TÜM EKZOM DİZİLEME

Tüm ekzom dizileme 10 indeks olguya yapılabildi. Bunların ikisinde panel gen çalışmasında bulunamayan homozigot *FKBP10* mutasyonu bulundu. Diğer olgularda ilişkili gen saptanmadı.

TARTIŞMA

OSTEOGENEZİS İMPERFEKTAYA NEDEN OLAN GENLERİN SIKLIĞININ İRDELENMESİ

Bu çalışmada 79 aileden 108 osteogenezis imperfekta tanıılı hasta incelenmiş olup 63 ailede hastalığa neden olan patojenik varyantlar tanımlanmıştır. Hastalarımızın 45'nde (%57) *COL1A1* ve *COL1A2* genlerindeki heterozigot mutasyon saptanmıştır. Otozomal resesif OI ile ilişkili genlerdeki homozigot mutasyonlar hastaların %23'ünde bulunmuştur. Panel gen çalışmaları ile bilinen bir gen mutasyonu olmayan 16 hastanın 10'nda yapılan TED analizinde 2 hastada otozomal resesif OI'ya neden olduğu bilinen gende mutasyon saptanmış, 8 hastada ise bilinen veya yeni bir gen bulunamamıştır.

Osteogenezis imperfektada hastalarının ~%85-90 ve %78'inde tip 1 kollajenin alfa zincirlerini kodlayan genlerdeki (*COL1A1* ve *COL1A2*) heterozigot mutasyonların tanımlanabileceğini gösterilmiştir (65,106,110). Lindahl 2015 (111) yılında yaptığı çalışmasında 164 aileden 223 OI hastasında *COL1A1/A2* gen analizi yapılmış; %87 hastada mutasyon bulunmuştur.

Bizim hasta grubumuzda *COL1A1/A2* gen mutasyon oranının daha az (%57) olmasının nedeni hasta grubumuzda akraba evliliği sıklığının (%40,5) yüksek olmasından dolayı otozomal resesif geçişli alt tiplerinin oranının (%23) fazla olması idi.

Otozomal dominant kalıtılan bu klasik tiplerden özellikle ağır seyirli olan tip-2, 3 ve orta seyirli 4 kliniği olan hastalarda anne/baba sağlıklı iken birden fazla kardeşle hastalığın gözlenmesi, bu hastalıkta aynı zamanda otozomal resesif (OR) kalıtımın olduğu düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Son 10 yılda moleküler genetik testlerdeki ilerlemeler sonucu özellikle tüm ekzom dizileme (TED) teknikleri ile OI ile ilişkili OR geçişli tipe yol açan yeni genler tanımlanmıştır (49,112). İskelet displazilerinin 2015 sınıflamasına göre 17 (113), güncel olarak OMIM'de kayıtlı 19 farklı OI tipi vardır (114).

2017 yılında Liu ve ark. (112) Çinli 101 aileden 108 hastada moleküler analiz yapılan çalışmasında, mutasyon dağılımını 101 ailede; *COL1A1/COL1A2* 66 hastada (%65.3), otozomal kalıtıma neden olan gen mutasyonları (*IFITM5* n=9, *SERPINF1* n=4, *WNT1* n=4, *FKBP10* n=3, *TMEM38B* n=3, *PLOD2* n=1) 24 hastada (%23.7) şeklinde bildirmiş, 11

ailede ise mutasyon bulunamamıştı. Bu makaledeki Oİ neden olan gerek otozomal dominant gerekse otozomal resesif geçişli gen mutasyonlarının oranları bizim çalışmamıza benzerdi.

Osteogenezis imperfektada moleküler etyolojiyi araştıran en geniş çaplı araştırma Bardai ve ark. tarafından 2016 yılında yapılmıştır (49). Bu çalışmaya göre; 598 Oİ klinik tanısı olan hastada TED ile dizileme yapılmış, hastaların %77'sinde *COL1A1/A2* genlerinde, %16,5'de ise otozomal resesif Oİ neden olan genlerde mutasyon saptanmıştır. Hastaların % 6.5'nde hastalığa neden olan mutasyon bulunamamıştır.

Çalışmamızda otozomal resesif geçişli Oİ neden olan gen mutasyonlarının sıklığı; 6 hastada *P3H1 (LEPRE1)*, 5 hastada *SERFIN1*, 5 hastada *FKBP10*, 1 hastada *CTRAP* ve 1 hastada *SPARC* genlerindeki biallelik mutasyon şeklinde idi. Son yıllarda yapılan benzer çalışmalara baktığımızda (49,112,115) bizim çalışmamızdaki gibi *SERPINF1* ve *FKBP10* mutasyonlarının daha sık olduğu görülmektedir. Ancak genlerin daha doğru sıklık oranlarının belirleyebilmek için bu konuda daha çok sayıda geniş populasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Caparros-Martin ve ark. tarafından 2016 yılında Avrupa- Güney Amerika kökenli Oİ hastalarında TED ile moleküler kökeni inceleyen bir çalışma yapılmıştı (115). Bu çalışmada anne babalar sağlıklı idi. Akraba evliliği olan 20 aile ve akraba evliliği olmayan 21 aile olmak üzere toplam 42 hastadan oluşan bu çalışmanın sonuçlarına göre; *COL1A1/A2* gen mutasyonu ebevenyleri arasında akrabalık olmayan ailelerden 12, olanlarda ise 2 olguda saptanmıştır. Otozomal resesif kalıtılan gen mutasyonları ise akraba evliliği olan ailelerde 17 hastada saptanırken, akraba olmayan ailelerden 9'nda bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda mutasyon saptanan 63 ailenin 19'nda akraba evliliği vardı, akraba evliliği oranı %43.8 idi. *COL1A1* veya *COL1A2* mutasyonları olan 45 hastanın 41'nde akraba evliliği yokken, otozomal resesif mutasyonlar olan 18 hastanın 15'nde akraba evliliği vardı. Literatürdeki bilgiler ile uyumlu olarak akraba evliliği olmayan sporadik hastaların genellikle de novo heterozigot *COL1A1* veya *COL1A2* mutasyonlarına sahip olduğunu göstermektedir (115). Hastalarımızda otozomal dominant kalıtım gösteren *COL1A1/A2* gen mutasyonu olan hastalarda akraba evliliği oranı % 8.8 iken'de, otozomal resesif fenotipe neden olan gen mutasyonu olan hastalarda ise akraba evliliği oranı %83.3 idi.

Aile öyküsünde bazı ailelerde otozomal dominant kalıtımı gösteren *COL1A1/A2* mutasyonu olan hastalarda dikey geçiş (dede/nine, anne/baba ve çocukta) hastalık

gözlenirken, homozigot mutasyonla ortaya çıkan diğer Oİ tiplerinde otozomal resesif geçişle uyumlu yatay dağılım (Anne baba normalken kardeşlerde hastalık olması) gözlemlendi.

Otozomal dominant geçiş gösteren *COL1A1/A2* varyantlarının 45 ailede 17'si ailevi formu, de novo – 19'unda ve belirlenmeyen 9' ailede bulunmaktadır.

De novo mutasyonları hem önemli bir genetik varyasyon kaynağı olarak hem de insanlarda sporadik hastalığın önde gelen bir nedeni olarak kabul edilmektedir. TED ile yapılan bir çalışmada, probanddaki “de novo” varyantların tüm genom dizi analizi ile ebeveynlerin birisinin kanında tespit edilmesi ile varyantın tanımlanmasına ve bu varyantların %4 parental mozaizmi kaynaklı olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak, *de novo* mutasyonlarının önemli bir kısmının, %6.5 çocukta post-zigotik meydana geldiğini veya ebeveynlerden birinde düşük seviyeli mozaizim nedeniyle kalıtsal olduğunu göstermektedir (116). Ayrıca Oİ'nin ağır tiplerin olduğu ailelerde tekrarlama riski germline mozaizme bağlı %10'dan daha az olduğu bilinmektedir (66). Bu bilgiler ışığında bizim hasta kohortumuzda *COL1A1* ve *COL1A2* gen mutasyonlarının %67'sinin (n=30) *de novo* mutasyonlardan oluşması nedeniyle anne ve baba taraması yapılmıştı.

GENOTİP FENOTİP İLİŞKİSİNİN TARTIŞILMASI

Osteogenezis imperfekta hastaları halen Sillence 1979'da yaptığı klinik sınıflamaya göre 4 ana grupta incelenmektedir. Klinik olarak 19 alt grup kapsamındaki tüm hastalar bu sınıflamaya göre dört farklı tip içinde gruplanmaktadır. Bizim çalışmamızda metod bölümünde anlatılan kriterlere göre yaptığımız sınıflamada *COL1A1/A2* mutasyonu olan 45 hastamızda 30 hafif fenotip (tip 1), 12 sinde ağır fenotip (Tip2 ve3), 3'nde ise orta fenotip (Tip 4) uygun klinik bulgular vardı (Tablo 4-1). Lindahl'in çalışmasında hastalar klinik olarak %67,7'si tip 1, %18,8 tip4, %13'ü ise tip 3 olarak gruplanmıştır. Osteogenezis imperfektada moleküler etyolojiyi araştıran en geniş çaplı araştırma Bardai ve ark. tarafından 2016 yılında çalışmada 598 Oİ klinik tanısı olan hastada TED ile dizileme yapılmış, klinik olarak hafif fenotipi olan hastaların hepsinde, orta- ciddi kliniği olanların %77'sinde *COL1A1/A2* genlerinde mutasyon bulunmuştur. Orta ve ciddi fenotipi olan hastaların %16,5'de ise otozomal resesif Oİ neden olan genlerde mutasyon saptanmıştır. Bu çalışmalarda orta-ciddi fenotipe otozomal resesif kalıtılan tiplere neden olan genlerin yanısıra *COL1A1/A2* genlerinde saptanan mutasyonlarında neden olabileceği gösterilmiştir.

Otozomal Dominant Genlerde (*Col1A1/A2*) Sık Görülen Mutasyon Tipleri Ve Genotip-Fenotip İlişkisinin İncelenmesi

Çalışmamızda *COL1A1/A2* genlerinde 45 hastada 41 farklı mutasyon bulundu, bunların %75.5'i *COL1A1*, %24.5 'i ise *COL1A2* geninde idi. Dört ailede benzer mutasyon vardı. HGMD kayıtlı 1005 adet *COL1A1*, 523 adet *COL1A2* mutasyonu vardır.

Bu mutasyonların fenotipin şiddetine etkisi; etkilenen alfa zincirine, mutasyonun tipine ve pozisyonuna, glisin yerine geçen amino aside veya bu üç değişkenin kombinasyonuna bağlıdır.

Çalışmamızda *COL1A1/A2* genlerinde 8 hastada stop kodon oluşturan nonsense veya çerçeve kayması tipi mutasyon, 9 hastada ise splice bölgesi mutasyon tespit edildi . Hastaların 28'nden 21'inde üçlü sarmal alandaki glisin kalıntısını değişmesine sebep olan missense mutasyon bulundu. Bir hastada *COL1A2* geninde küçük delesyon, diğer bir hastada ise MLPA yöntemi ile tüm *COL1A1* genin içeren delesyon tespit edildi.

COL1A1/A2 genlerinde mutasyonlar Tip-1 fenotipe yol açan 1.ci sınıf mutasyonlar ve tip 2-3 fenotipe yol açan 2. ci sınıf mutasyonlar olarak ikiye ayrılmaktadır.

1. Sınıf mutasyonlar: *COL1A1* bir allelinde erken stop kodon oluşturan nonsense veya frame shift mutasyon ve bazen splice-site ve C-propeptide mutasyonlardır.
2. Sınıf mutasyonlar ise Oİ'ye neden olan en sık mutasyon tipidir ve başka bir amino asidin glisin yerine geçmesidir.

Kollajenin Gly-X-Y dizisini bozan herhangi bir mutasyon bozulmuş kollajen fonksiyonuna neden olur; sarmal oluşumunu, stabilite bozulur, kollajen hücre dışı matris ile etkileşime girer. Glisin-serin süstitüsyonları, en sık görülen mutasyon türüdür.

Alfa 1 zincirindeki serin süstitüsyonları, alfa 2 zincirinden daha şiddetli bir fenotipe yol açma eğilimindedir. Alfa 1'in karboksil ucuna yakın iki büyük ligand bağlayıcı bölgedeki süstitüsyonlar, ölümcül sonuçlara sahiptir.

Alfa 2 zincirindeki glisin substitüsyonları esas olarak öldürücü değildir; ancak, zincir boyunca kollajen fibrilleri üzerindeki proteoglikan bağlanma bölgelerindeki sekiz kümede yer alanlar ölümcüldür. Alfa 1'in ilk 200 amino asit boyunca olan arginin, aspartat, glutamat ve valinin substitüsyonları genellikle öldürücüdür, ancak alfa 2'de değişken sonuçlara sahiptir (117).

Bu çalışmada tanımlanan patojenik mutasyonların %46,6 glisin kalıntıları içeren, tip I kollajen üçlü sarmalının sıkı paketlenmesini bozan amino asit değişmesi idi. Bu, *COL1A1* genindeki 13 mutasyon ve *COL1A2* genindeki 8 mutasyon anlamına gelir; sırasıyla *COL1A1* ve *COL1A2* genlerindeki mutasyonların % 28,9 ve % 17,7'dir.

Marini ve ark. (18) tarafından büyük bir hasta kohortu üzerinde yapılan çalışmada kollajen tip 1 mutasyonları Gly'ni değiştiren nokta varyanlar ve splicing varyantlar olarak iki büyük gruba ayrılmıştı. Bu mutasyonların çoğu, OI tip II, III veya IV'e neden olup, bu çalışmada varyantların hayat ile bağdaşması (letalite) değerlendirilmişti. Kollajen tip I alfa 1 zincirindeki glisin değiştiren mutasyonları alfa 2 zincirindeki mutasyonlardan daha fazla saptanmış olup ölümcül bir sonuca sahip olma olasılığı daha yüksekti.

Bizim çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak Glisini değiştiren nokta mutasyonlar daha sık gözlendi (n=21), splice site değiştiren mutasyonlar (n=9), stop varyantlar (n=8), diğerleri (n=7).

Kollajen tip I alfa 1 zincirindeki Glisini değiştiren alfa 2 zincirindeki mutasyonlardan daha sıklıkla (% 28,9'ye karşı %17,7). Alfa 1 zincirinin ilk 200 kodonunda yer alan değişimlerin genellikle ölümcül olmadığı, fakat 691-823 ve 910-964 amino asit pozisyonlarında majör ligand bağlanma bölgeleri ile hizalanmakta olan, iki ölümcül bölge ile alfa 2 zincirinde sekiz ölümcül bölge (amino asit pozisyonlar arası 319-364, 451-505, 547-580, 622-706, 757-811, 859-907, 937-994) tanımlanmıştı. Alfa 1 zincirindeki glisin kalıntılarının, aspartat, glutamat veya arjinin gibi yüklü amino asitlere veya dallanmış valin amino aside değişmesi ve 200 pozisyonundaki C-terminalinde glisini amino asidi etkilenmesi letal sonucu olması daha yüksektir. Alfa 2 zinciri için böyle bir ilişki bulunamadı (19). Bununla birlikte, başka bir çalışmada ölümcül bölge mutasyonlara sahip olan postnatal letal olmayan istisna olarak yedi kişi tanımlanmıştı (118).

Bu gözlendiği sonuç özellikle prenatal döneminde genetik danışma için önem taşır. Bizim hastalardan toplam 5 kişide alfa 1 (n = 2: Olgu 28 ve Olgu 19) ve alfa 2 zincirde (n=3: Olgu 38, Olgu 41 ve Olgu 42) ölümcül bölgelerde mutasyon saptanmıştı.

Otozomal Resesif Genlerde Sık Görülen Genler Ve Genotip-Fenotip İlişkisinin İncelenmesi

LEPRE1 genindeki patojenik varyantlar, vakaların yaklaşık yarısında, görülen letal 'Batı Afrikalı' homozigot mutasyon ile ortaya çıkar, prenatal başlangıçlı ağır fenotip ile

ilişkilidir. Etkilenen bireylerin klinik bulguları, prenatal döneminde sıklıkla kollajen tip I mutasyonlardan kaynaklı ölümcül Oİ özelliklerini taklit eder. Ayırıcı tanıda, yuvarlak yüz, beyaz sklera, daha geniş toraks bulguları ve akra evliliği durumu yardımcı olan bir özelliktir. Bu hastalar için, ağır ve öldürücü bir fenotipten, daha tipe kadar bu gen ile ilgili geniş klinik spektrumu bildirilmiştir (42). Bizim hastalarda LEPRE1 geninde iki yeni homozigot mutasyon saptandı. Bunlardan dört ailede aynı mutasyon varken c.446T>G:p (p.Leu149Arg), diğer iki ailede ise c.635G>A (p.Gly212Glu) mutasyonu saptandı. Literatür ile uyumlu olarak bizim olgularımızda: geniş açık ön fontaneli, açık sütürler, beyaz sklera, wormian kemik, platispondili, kifoskolyoz, radyal, tibial ve femoral bowing, ince uzun kemikler, vertebralarda kompresyon kırığı, bulböz metafiz, uzun falank ile kısa metafizler vardı.

SERPINF1 gen mutasyonu ile oluşan orta-ağır tipte, etkilenen bireyler doğumda normal görünür ve 1 yaş civarında ilk kırığı ortaya çıkar. Daha sonra, giderek artan sayıda kırıklar, şiddetli eğrilme ve skolyoz ile deformiteler oluşur. Ligament gevşekliği, femoral bowing, modere-ciddi skolyozis, kemik biopsisinde lamellerin fish scale görünümü mevcuttur. Sklera, diş ve işitme normaldir. Etkilenen bireylerin bifosfonat tedavisine kötü yanıt verir. Prognoz orta derecededir. Çalışma grubumuzda beş hastada SERPINF1 geninde birbirinden farklı biallelik mutasyon saptandı. Hastalarımızın klinik özelliklerinde yer alan modere-ciddi skolyozis, beyaz sklera, normal diş, femoral bowing, bikonkav vertebra ve eklem laksitesi bulguları literatür ile uyumlu bulundu.

CTRAP iskelet tutulumu ve klinik bulgularına göre Oİ tip II ve III'e benzerdir. Ciddi boy kısalığı ile koksa vara, rüzmeli, beyaz sklera, yenidoğan döneminde geniş uzun kemiklerde kırıklar ile karakterizedir. Barnes ve ark tarafından yapılan çalışmada CRTAP mutasyonları, mutant mRNA transkriptlerinin hücre içi yıkımını tetikleyen, erken çevirinin sonlandırılmasına neden olmuştur. CRTAP defektlerinin ölümcül osteogenezis imperfekta vakalarının %2 ile 3'üne neden olduğu yönündedir. Resitif CRTAP mutasyon nedeniyle bebeklerde perinatal ölümcül Oİ tip 2'ye benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, göreceli olarak küçük baş çevresi, proptotik göz görünümü ile beyaz veya açık mavi sklera bulgular gibi ayırıcı özellikleri mevcuttur (78). Bizim olgumuzda daha önce bildirilmemiş nokta mutasyon saptandı. Literatür ile uyumlu olarak: doğumda normal boy uzunluğu, çoklu kırıklar vardı, yaş ilerledikçe boy kısalığı belirginleşmesi, geniş açık ön fontaneli, açık sütürler, yuvarlak yüz görünümü, uzun filtrum, proptozis, mavimsi sklera, dar toraks, pektus

ekskavatum, çoklu kosta kırığı, hidronefrozu, osteopeni, wormian kemikleri, orta-şiddetli derece kemik kırıkları vardı.

FKBP10 hafif tip. Eklem laksitesi ve skolyoz ile birlikte şiddetli deforme edici tipidir. Osteogenezis imperfekta ile epidermolizis büllozanın birlikte görüldüğü formudur. Eklem laksitesi, kifoskolyozis, koksa vara, grafilerde: bülboz metafiz, protüzyo asetabuli, bikonkav vertebra gözlenir. Bizim çalışma grubumuzda, beş hastada FKBP10 geninde 4 farklı biallelik mutasyon vardı, 2 ailede aynı mutasyon bulundu. Literatürle uyumlu olarak, kısa boy, brakisefali, üçgen yüz görünümü, orta ve ağır derecede kemik kırıkları, eklem laksitesi, bikonkav vertebra, bülboz metafiz bulguları saptandı.

SPARC1 ağır tiptir. Doğumda normal olan ve daha sonra vertebra kompresyonları, kas hipotonisitesi ve eklem hiper mobilitesi, ciddi kemik kırıkları ve kifoskolyoz geliştiğini bugüne kadar iki kişide bildirildi (104). Bu gende mutasyona sahip tek hastamız akraba evliliğinden doğmuş, prenatal takibinde şikayeti yoktu. Skleraları gri, uzun kemikler deforme, hiper mobil parmaklar, cilt laksitesi mevcut, dirsek ve dizlerde kontraktür mevcut, dört yaşında yürümesi henüz yoktu.

3.Çalışmamızda hasta grubunda yaklaşık % 20'sinde (n=16) hastalığa neden olan varyantlarını tespit edemedik. Bu insanların bazılarında Oİ panelimizde yer alan, ancak derin intron bölgeleri gibi dizilenmeyen bölgelere yerleştirilmiş genlerin varyantlarından kaynaklanması olabilir. Bununla birlikte, bu kişilerin en azından bazılarının henüz Oİ ile ilişkili olmayan genlerden kaynaklanmış olabilir. Her durumda, çalışmamız, henüz Oİ ile ilişkili bulunmayan bu genlerin, Oİ'li çok az sayıda insanda hastalığı açıkladığını ortaya koymaktadır. Tipik bir OI fenotipine sahip hemen hemen tüm insanlar, Oİ ile ilişkili bilinen genlerden birinde patojenik varyantlara sahiptir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

1- Osteogenezis İmperfektalı (OI) 79 hastanın dahil edildiği bu çalışmanın amacı bilinen genlerdeki mutasyonların taranması, bu yöntemlerle mutasyonların dışlandığı ailelerde tüm ekzom dizileme (TED) yöntemi ile yeni genlerin varlığının araştırılması idi. Çalışma kapsamına alınan hastaların %58,8'i erkek, %41,2'si kız dı. Anne/baba arasındaki akraba evliliği oranı %40,5 idi.

2- Genetik tanı için ilk aşamada *COL1A1* ve *COL1A2* genlerindeki olası nokta mutasyonlarının saptamak amacıyla önce bu genler dizilendi, sonra MLPA yöntemi ile küçük delesyon veya duplikasyonların varlığı araştırıldı. Mutasyon saptanmayan hastalarda tasarlanmış bir Panel-Gen'de, yeni nesil dizileme (YND) teknolojisi ile otozomal resesif tiplere neden olan bilinen genlerin incelendi. Hastaların 45'nde (%57) *COL1A1/A2* genlerinde heterozigot mutasyon, 18'nde (%22,8) otozomal resesif kalıtımla ilişkili genlerde (*P3H1*, *FKBP10*, *CRTAP*, *SPARC*, *SERPINF1*) homozigot mutasyon bulundu, 16'sında (%20,2) ise mutasyon bulunamadı. Mutasyon saptanmayan 10 hastada yapılan TED ile iki hastada bilinen genlerde mutasyon saptandı. Diğer hastalarda mutasyon saptanmadı.

3- *COL1A1/A2* genlerde mutasyon oranı literatüre göre düşüktü. Bunun nedeni akraba evliliği oranının hasta grubumuzda yüksek olması nedeniyle, otozomal resesif kalıtılan tiplerin daha fazla olmasıydı. Otozomal dominant kalıtım gösteren *COL1A1/A2* genlerinde heterozigot mutasyonu olan 45 aileden sadece 4 ailede akraba evliliği varken, otozomal resesif kalıtılan tiplerden 13 ailenin 10'da akraba evliliği vardı. *COL1A1/A2* mutasyonu olan hastalar %67 ailede ilk olgu idi, %33'de hastalık ebeveynden kalıtılmıştı. Bilinen mutasyon oranı % 71, yeni mutasyon oranı %29 idi.

4- *COL1A1/A2* genlerinde mutasyonların %75,5'i *COL1A1*, %24,5'i ise *COL1A2* geninde idi. *COL1A1/A2* gen mutasyonu saptanan 45 aileden 41'nde farklı mutasyon vardı. Sekiz hastada *COL1A1/A2* genlerinde stop kodon oluşturan nonsense veya çerçeve kayması tipinde mutasyon bulunurken, splice (kırılma) bölgesi mutasyonları 9 hastada mevcuttu. Hastaların 28'nde saptanan missense (yanlış anlamlı) mutasyonların 21'i üçlü sarmal alandaki glisin kalıntısını değişmesine sebep olan missense mutasyondur. Bir hastada *COL1A2* geninde küçük delesyon, diğer bir hastada ise MLPA yöntemi ile tüm *COL1A1* genin içeren heterozigot delesyon olarak belirlendi. *COL1A1/A2* genlerindeki protein

sentezini durduran mutasyonlar hafif fenotipe (tip 1) neden olurken, glisin serin dönüştüren missense mutasyonu ağır fenotip mevcuttu. Bu sonuçlar literatürle uyumlu idi.

5- Hasta grubumuzda en sık rastlanan resesif mutasyonlar sıra ile P3H1, SERPINF1, FKBP10, CRTAP, SPARC idi ve bu hastalarda ağır-orta fenotipi mevcuttu.

6- Bu çalışmada ülkemizde Oİ hastalarında en sık görülen genlerin ve mutasyonların sıklığı belirlenmesinin bu hastalık grubunda genetik tanı algoritmasının oluşturulmasında önemli katkıları olmuştur. Ayrıca gerek otozomal dominant kalıtım gösteren COL1A1/A2 genlerindeki mutasyon tipinin hastalığın prognozu ile ilişkisinin gösterilmesi, gerekse ülkemizde en sık görülen resesif tiplerin saptanması hastalara doğru genetik danışma verilmesinde yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Marini JC, Cabral WA. Osteogenesis Imperfecta. İçinde Thakker RV, Whyte MP, Eisman J ve Igarashi T, editor. *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease*. Elsevier; 2018. pp. 397-420.
2. van Dijk FS, Cobben JM, Kariminejad A, Maugeri A, Nikkels PG, van Rijn RR ve ark. Osteogenesis Imperfecta: A Review with Clinical Examples. *Mol Syndromol* 2011; 2(1), 1-20. doi:000332228
3. Sillence DO, Rimoin DL, Danks DM. Clinical variability in osteogenesis imperfecta-variable expressivity or genetic heterogeneity. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1979; 15(5b), 113-129.
4. Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, Marini JC. New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7(9), 540-557. doi:10.1038/nrendo.2011.81
5. Sam Stout CC. Bone Histology: An Anthropological Perspective. 2011, 1-6.
6. Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater* 2014; 28, 269-286.
7. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015; 2015, 421746. doi:10.1155/2015/421746
8. Shaker JL, Deftos L. Calcium and Phosphate Homeostasis. İçinde Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Perreault L, Purnell J, Rebar R, Singer F, Trencle DL, Vinik A ve Wilson DP, editor. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. pp.
9. Wein MN, Kronenberg HM. Regulation of Bone Remodeling by Parathyroid Hormone. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; 8(8). doi:10.1101/cshperspect.a031237
10. Eisman JA, Bouillon R. Vitamin D: direct effects of vitamin D metabolites on bone: lessons from genetically modified mice. *Bonekey Rep* 2014; 3, 499. doi:10.1038/bonekey.2013.233
11. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2017; 26(6). doi:10.1111/ecc.12740
12. Martin TJ. Reflecting on Some Discoveries of 40 Years and Their Outcomes. *J Bone Miner Res* 2017; 32(10), 1971-1976. doi:10.1002/jbmr.3282
13. Lee WC, Guntur AR, Long F, Rosen CJ. Energy Metabolism of the Osteoblast: Implications for Osteoporosis. *Endocr Rev* 2017; 38(3), 255-266. doi:10.1210/er.2017-00064
14. Conover CA. Insulin-like growth factor-binding proteins and bone metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294(1), E10-14. doi:10.1152/ajpendo.00648.2007
15. Wu M, Chen G, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 2016; 4, 16009. doi:10.1038/boneres.2016.9
16. Caplan AI, Correa D. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. *J Orthop Res* 2011; 29(12), 1795-1803. doi:10.1002/jor.21462
17. Su N, Jin M, Chen L. Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models. *Bone Res* 2014; 2, 14003. doi:10.1038/boneres.2014.3

18. Marini JC, Forlino A, Bachinger HP, Bishop NJ, Byers PH, Paepe A ve ark. Osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3, 17052. doi:10.1038/nrdp.2017.52
19. Marini JC, Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, San Antonio JD, Milgrom S ve ark. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat* 2007; 28(3), 209-221. doi:10.1002/humu.20429
20. Wu M. Biochemistry, Collagen Synthesis. 2019.
21. Khoshnoodi J, Cartiailler JP, Alvares K, Veis A, Hudson BG. Molecular recognition in the assembly of collagens: terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. *J Biol Chem* 2006; 281(50), 38117-38121. doi:10.1074/jbc.R600025200
22. Bourhis JM, Mariano N, Zhao Y, Harlos K, Exposito JY, Jones EY ve ark. Structural basis of fibrillar collagen trimerization and related genetic disorders. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19(10), 1031-1036. doi:10.1038/nsmb.2389
23. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 7), 1341-1353. doi:10.1242/jcs.01731
24. van der Slot AJ, Zuurmond AM, Bardoe AF, Wijmenga C, Pruijs HE, Sillence DO ve ark. Identification of PLOD2 as telopeptide lysyl hydroxylase, an important enzyme in fibrosis. *J Biol Chem* 2003; 278(42), 40967-40972. doi:10.1074/jbc.M307380200
25. Hyry M, Lantto J, Myllyharju J. Missense mutations that cause Bruck syndrome affect enzymatic activity, folding, and oligomerization of lysyl hydroxylase 2. *J Biol Chem* 2009; 284(45), 30917-30924. doi:10.1074/jbc.M109.021238
26. Ishikawa Y, Wirz J, Vranka JA, Nagata K, Bachinger HP. Biochemical characterization of the prolyl 3-hydroxylase 1.cartilage-associated protein.cyclophilin B complex. *J Biol Chem* 2009; 284(26), 17641-17647. doi:10.1074/jbc.M109.007070
27. Makareeva E, Aviles NA, Leikin S. Chaperoning osteogenesis: new protein-folding disease paradigms. *Trends Cell Biol* 2011; 21(3), 168-176. doi:10.1016/j.tcb.2010.11.007
28. Ishikawa Y, Vranka J, Wirz J, Nagata K, Bachinger HP. The rough endoplasmic reticulum-resident FK506-binding protein FKBP65 is a molecular chaperone that interacts with collagens. *J Biol Chem* 2008; 283(46), 31584-31590. doi:10.1074/jbc.M802535200
29. Schwarze U, Cundy T, Pyott SM, Christiansen HE, Hegde MR, Bank RA ve ark. Mutations in FKBP10, which result in Bruck syndrome and recessive forms of osteogenesis imperfecta, inhibit the hydroxylation of telopeptide lysines in bone collagen. *Hum Mol Genet* 2013; 22(1), 1-17. doi:10.1093/hmg/dd371
30. Hartigan N, Garrigue-Antar L, Kadler KE. Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1). Identification of the minimal domain structure for procollagen C-proteinase activity. *J Biol Chem* 2003; 278(20), 18045-18049. doi:10.1074/jbc.M211448200
31. Le Goff C, Somerville RP, Kesteloot F, Powell K, Birk DE, Colige AC ve ark. Regulation of procollagen amino-propeptide processing during mouse embryogenesis by specialization of homologous ADAMTS proteases: insights on collagen biosynthesis and dermatosparaxis. *Development* 2006; 133(8), 1587-1596. doi:10.1242/dev.02308
32. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 2013; 19(2), 179-192. doi:10.1038/nm.3074
33. Chen Q, Lee CE, Denard B, Ye J. Sustained induction of collagen synthesis by TGF-beta requires regulated intramembrane proteolysis of CREB3L1. *PLoS One* 2014; 9(10), e108528. doi:10.1371/journal.pone.0108528
34. Murakami T, Saito A, Hino S, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K ve ark. Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nat Cell Biol* 2009; 11(10), 1205-1211. doi:10.1038/ncb1963

35. Shaheen R, Alazami AM, Alshammari MJ, Faqeih E, Alhashmi N, Mousa N ve ark. Study of autosomal recessive osteogenesis imperfecta in Arabia reveals a novel locus defined by TMEM38B mutation. *J Med Genet* 2012; 49(10), 630-635. doi:10.1136/jmedgenet-2012-101142
36. Volodarsky M, Markus B, Cohen I, Staretz-Chacham O, Flusser H, Landau D ve ark. A deletion mutation in TMEM38B associated with autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 2013; 34(4), 582-586. doi:10.1002/humu.22274
37. Cabral WA, Ishikawa M, Garten M, Makareeva EN, Sargent BM, Weis M ve ark. Absence of the ER Cation Channel TMEM38B/TRIC-B Disrupts Intracellular Calcium Homeostasis and Dysregulates Collagen Synthesis in Recessive Osteogenesis Imperfecta. *PLoS Genet* 2016; 12(7), e1006156. doi:10.1371/journal.pgen.1006156
38. Becker J, Semler O, Gilissen C, Li Y, Bolz HJ, Giunta C ve ark. Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2011; 88(3), 362-371. doi:10.1016/j.ajhg.2011.01.015
39. Homan EP, Rauch F, Grafe I, Lietman C, Doll JA, Dawson B ve ark. Mutations in SERPINF1 cause osteogenesis imperfecta type VI. *J Bone Miner Res* 2011; 26(12), 2798-2803. doi:10.1002/jbmr.487
40. Farber CR, Reich A, Barnes AM, Becerra P, Rauch F, Cabral WA ve ark. A novel IFITM5 mutation in severe atypical osteogenesis imperfecta type VI impairs osteoblast production of pigment epithelium-derived factor. *J Bone Miner Res* 2014; 29(6), 1402-1411. doi:10.1002/jbmr.2173
41. Rauch F, Fahiminiya S, Majewski J, Carrot-Zhang J, Boudko S, Glorieux F ve ark. Cole-Carpenter syndrome is caused by a heterozygous missense mutation in P4HB. *Am J Hum Genet* 2015; 96(3), 425-431. doi:10.1016/j.ajhg.2014.12.027
42. Baldrige D, Schwarze U, Morello R, Lenington J, Bertin TK, Pace JM ve ark. CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 2008; 29(12), 1435-1442. doi:10.1002/humu.20799
43. Bodian DL, Chan TF, Poon A, Schwarze U, Yang K, Byers PH ve ark. Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype-phenotype relationships. *Hum Mol Genet* 2009; 18(3), 463-471. doi:10.1093/hmg/ddn374
44. Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagens at a glance. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 12), 1955-1958. doi:10.1242/jcs.03453
45. Van Dijk FS, Pals G, Van Rijn RR, Nikkels PG, Cobben JM. Classification of Osteogenesis Imperfecta revisited. *Eur J Med Genet* 2010; 53(1), 1-5. doi:10.1016/j.ejmg.2009.10.007
46. Bishop N. Bone Material Properties in Osteogenesis Imperfecta. *J Bone Miner Res* 2016; 31(4), 699-708. doi:10.1002/jbmr.2835
47. Schorderet DF, Gartler SM. Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(3), 957-961.
48. Shapiro JR, Lietman C, Grover M, Lu JT, Nagamani SC, Dawson BC ve ark. Phenotypic variability of osteogenesis imperfecta type V caused by an IFITM5 mutation. *J Bone Miner Res* 2013; 28(7), 1523-1530. doi:10.1002/jbmr.1891
49. Bardai G, Moffatt P, Glorieux FH, Rauch F. DNA sequence analysis in 598 individuals with a clinical diagnosis of osteogenesis imperfecta: diagnostic yield and mutation spectrum. *Osteoporos Int* 2016; 27(12), 3607-3613. doi:10.1007/s00198-016-3709-1
50. Willing MC, Deschenes SP, Slayton RL, Roberts EJ. Premature chain termination is a unifying mechanism for COL1A1 null alleles in osteogenesis imperfecta type I cell strains. *Am J Hum Genet* 1996; 59(4), 799-809.

51. van Dijk FS, Huizer M, Kariminejad A, Marcelis CL, Plomp AS, Terhal PA ve ark. Complete COL1A1 allele deletions in osteogenesis imperfecta. *Genet Med* 2010; 12(11), 736-741. doi:10.1097/GIM.0b013e3181f01617
52. Malfait F SS, Coucke P, Nunes L, De Almeida S, A. De Paepe Total absence of the $\alpha 2(I)$ chain of collagen type I causes a rare form of Ehlers-Danlos syndrome with hypermobility and propensity to cardiac valvular problems. *J Med Genet* 2006; (43(7):e36.).
53. Schwarze U, Hata R, McKusick VA, Shinkai H, Hoyme HE, Pyeritz RE ve ark. Rare autosomal recessive cardiac valvular form of Ehlers-Danlos syndrome results from mutations in the COL1A2 gene that activate the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Am J Hum Genet* 2004; 74(5), 917-930. doi:10.1086/420794
54. Byers PH, Starman BJ, Cohn DH, Horwitz AL. A novel mutation causes a perinatal lethal form of osteogenesis imperfecta. An insertion in one $\alpha 1(I)$ collagen allele (COL1A1). *J Biol Chem* 1988; 263(16), 7855-7861.
55. Bodian DL, Madhan B, Brodsky B, Klein TE. Predicting the clinical lethality of osteogenesis imperfecta from collagen glycine mutations. *Biochemistry* 2008; 47(19), 5424-5432. doi:10.1021/bi800026k
56. Pace JM, Atkinson M, Willing MC, Wallis G, Byers PH. Deletions and duplications of Gly-Xaa-Yaa triplet repeats in the triple helical domains of type I collagen chains disrupt helix formation and result in several types of osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 2001; 18(4), 319-326. doi:10.1002/humu.1193
57. Nuytinck L, Freund M, Lagae L, Pierard GE, Hermanns-Le T, De Paepe A. Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen. *Am J Hum Genet* 2000; 66(4), 1398-1402. doi:10.1086/302859
58. Cho TJ, Moon HJ, Cho DY, Park MS, Lee DY, Yoo WJ ve ark. The c.3040C > T mutation in COL1A1 is recurrent in Korean patients with infantile cortical hyperostosis (Caffey disease). *J Hum Genet* 2008; 53(10), 947-949. doi:10.1007/s10038-008-0328-5
59. Malfait F, Symoens S, De Backer J, Hermanns-Le T, Sakalihasan N, Lapiere CM ve ark. Three arginine to cysteine substitutions in the pro- $\alpha 1(I)$ -collagen chain cause Ehlers-Danlos syndrome with a propensity to arterial rupture in early adulthood. *Hum Mutat* 2007; 28(4), 387-395. doi:10.1002/humu.20455
60. Pace JM, Kuslich CD, Willing MC, Byers PH. Disruption of one intra-chain disulphide bond in the carboxyl-terminal propeptide of the pro $\alpha 1(I)$ chain of type I procollagen permits slow assembly and secretion of overmodified, but stable procollagen trimers and results in mild osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 2001; 38(7), 443-449.
61. Takagi M, Hori N, Chinen Y, Kurosawa K, Tanaka Y, Oku K ve ark. Heterozygous C-propeptide mutations in COL1A1: osteogenesis imperfecta type IIC and dense bone variant. *Am J Med Genet A* 2011; 155a(9), 2269-2273. doi:10.1002/ajmg.a.34152
62. Lindahl K, Barnes AM, Fratzl-Zelman N, Whyte MP, Hefferan TE, Makareeva E ve ark. COL1 C-propeptide cleavage site mutations cause high bone mass osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 2011; 32(6), 598-609. doi:10.1002/humu.21475
63. Pollitt R, McMahon R, Nunn J, Bamford R, Afifi A, Bishop N ve ark. Mutation analysis of COL1A1 and COL1A2 in patients diagnosed with osteogenesis imperfecta type I-IV. *Hum Mutat* 2006; 27(7), 716. doi:10.1002/humu.9430
64. Cabral WA, Makareeva E, Colige A, Letocha AD, Ty JM, Yeowell HN ve ark. Mutations near amino end of $\alpha 1(I)$ collagen cause combined osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos syndrome by interference with N-propeptide processing. *J Biol Chem* 2005; 280(19), 19259-19269. doi:10.1074/jbc.M414698200
65. Forlino A, Marini JC. Osteogenesis imperfecta. *Lancet* 2016; 387(10028), 1657-1671. doi:10.1016/s0140-6736(15)00728-x

66. Pepin M, Atkinson M, Starman BJ, Byers PH. Strategies and outcomes of prenatal diagnosis for osteogenesis imperfecta: a review of biochemical and molecular studies completed in 129 pregnancies. *Prenat Diagn* 1997; 17(6), 559-570.
67. Pyott SM, Pepin MG, Schwarze U, Yang K, Smith G, Byers PH. Recurrence of perinatal lethal osteogenesis imperfecta in sibships: parsing the risk between parental mosaicism for dominant mutations and autosomal recessive inheritance. *Genet Med* 2011; 13(2), 125-130. doi:10.1097/GIM.0b013e318202e0f6
68. Glorieux FH, Rauch F, Plotkin H, Ward L, Travers R, Roughley P ve ark. Type V osteogenesis imperfecta: a new form of brittle bone disease. *J Bone Miner Res* 2000; 15(9), 1650-1658. doi:10.1359/jbmr.2000.15.9.1650
69. Glorieux FH, Ward LM, Rauch F, Lalic L, Roughley PJ, Travers R. Osteogenesis imperfecta type VI: a form of brittle bone disease with a mineralization defect. *J Bone Miner Res* 2002; 17(1), 30-38. doi:10.1359/jbmr.2002.17.1.30
70. Ward LM, Rauch F, Travers R, Chabot G, Azouz EM, Lalic L ve ark. Osteogenesis imperfecta type VII: an autosomal recessive form of brittle bone disease. *Bone* 2002; 31(1), 12-18.
71. Lazarus S, McInerney-Leo AM, McKenzie FA, Baynam G, Broley S, Cavan BV ve ark. The IFITM5 mutation c.-14C > T results in an elongated transcript expressed in human bone; and causes varying phenotypic severity of osteogenesis imperfecta type V. *BMC Musculoskelet Disord* 2014; 15, 107. doi:10.1186/1471-2474-15-107
72. Cho TJ, Lee KE, Lee SK, Song SJ, Kim KJ, Jeon D ve ark. A single recurrent mutation in the 5'-UTR of IFITM5 causes osteogenesis imperfecta type V. *Am J Hum Genet* 2012; 91(2), 343-348. doi:10.1016/j.ajhg.2012.06.005
73. Semler O, Garbes L, Keupp K, Swan D, Zimmermann K, Becker J ve ark. A mutation in the 5'-UTR of IFITM5 creates an in-frame start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus. *Am J Hum Genet* 2012; 91(2), 349-357. doi:10.1016/j.ajhg.2012.06.011
74. Rauch F, Moffatt P, Cheung M, Roughley P, Lalic L, Lund AM ve ark. Osteogenesis imperfecta type V: marked phenotypic variability despite the presence of the IFITM5 c.-14C>T mutation in all patients. *J Med Genet* 2013; 50(1), 21-24. doi:10.1136/jmedgenet-2012-101307
75. Wang JY, Liu Y, Song LJ, Lv F, Xu XJ, San A ve ark. Novel Mutations in SERPINF1 Result in Rare Osteogenesis Imperfecta Type VI. *Calcif Tissue Int* 2017; 100(1), 55-66. doi:10.1007/s00223-016-0201-z
76. Morello R, Bertin TK, Chen Y, Hicks J, Tonachini L, Monticone M ve ark. CRTAP is required for prolyl 3- hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell* 2006; 127(2), 291-304. doi:10.1016/j.cell.2006.08.039
77. van Dijk FS, Nesbitt IM, Zwikstra EH, Nikkels PG, Piersma SR, Fratantoni SA ve ark. PPIB mutations cause severe osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2009; 85(4), 521-527. doi:10.1016/j.ajhg.2009.09.001
78. Barnes AM, Chang W, Morello R, Cabral WA, Weis M, Eyre DR ve ark. Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 2006; 355(26), 2757-2764. doi:10.1056/NEJMoa063804
79. Barnes AM, Carter EM, Cabral WA, Weis M, Chang W, Makareeva E ve ark. Lack of cyclophilin B in osteogenesis imperfecta with normal collagen folding. *N Engl J Med* 2010; 362(6), 521-528. doi:10.1056/NEJMoa0907705
80. Cabral WA, Chang W, Barnes AM, Weis M, Scott MA, Leikin S ve ark. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat Genet* 2007; 39(3), 359-365. doi:10.1038/ng1968

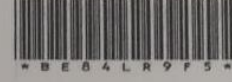
81. Cabral WA, Barnes AM, Adeyemo A, Cushing K, Chitayat D, Porter FD ve ark. A founder mutation in LEPRE1 carried by 1.5% of West Africans and 0.4% of African Americans causes lethal recessive osteogenesis imperfecta. *Genet Med* 2012; 14(5), 543-551. doi:10.1038/gim.2011.44
82. Alanay Y, Avaygan H, Camacho N, Utine GE, Boduroglu K, Aktas D ve ark. Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2010; 86(4), 551-559. doi:10.1016/j.ajhg.2010.02.022
83. Christiansen HE, Schwarze U, Pyott SM, AlSwaid A, Al Balwi M, Alrasheed S ve ark. Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2010; 86(3), 389-398. doi:10.1016/j.ajhg.2010.01.034
84. Drogemuller C, Becker D, Brunner A, Haase B, Kircher P, Seeliger F ve ark. A missense mutation in the SERPINH1 gene in Dachshunds with osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet* 2009; 5(7), e1000579. doi:10.1371/journal.pgen.1000579
85. Duran I, Nevarez L, Sarukhanov A, Wu S, Lee K, Krejci P ve ark. HSP47 and FKBP65 cooperate in the synthesis of type I procollagen. *Hum Mol Genet* 2015; 24(7), 1918-1928. doi:10.1093/hmg/ddu608
86. Marshall C, Lopez J, Crookes L, Pollitt RC, Balasubramanian M. A novel homozygous variant in SERPINH1 associated with a severe, lethal presentation of osteogenesis imperfecta with hydranencephaly. *Gene* 2016; 595(1), 49-52. doi:10.1016/j.gene.2016.09.035
87. Kelley BP, Malfait F, Bonafe L, Baldridge D, Homan E, Symoens S ve ark. Mutations in FKBP10 cause recessive osteogenesis imperfecta and Bruck syndrome. *J Bone Miner Res* 2011; 26(3), 666-672. doi:10.1002/jbmr.250
88. Shaheen R, Al-Owain M, Faeih E, Al-Hashmi N, Awaji A, Al-Zayed Z ve ark. Mutations in FKBP10 cause both Bruck syndrome and isolated osteogenesis imperfecta in humans. *Am J Med Genet A* 2011; 155a(6), 1448-1452. doi:10.1002/ajmg.a.34025
89. Barnes AM, Duncan G, Weis M, Paton W, Cabral WA, Mertz EL ve ark. Kuskokwim syndrome, a recessive congenital contracture disorder, extends the phenotype of FKBP10 mutations. *Hum Mutat* 2013; 34(9), 1279-1288. doi:10.1002/humu.22362
90. Lapunzina P, Aglan M, Temtamy S, Caparros-Martin JA, Valencia M, Leton R ve ark. Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2010; 87(1), 110-114. doi:10.1016/j.ajhg.2010.05.016
91. Fisaletti M, Biggin A, Bennetts B, Wong K, Briody J, Pacey V ve ark. Novel variant in Sp7/Osx associated with recessive osteogenesis imperfecta with bone fragility and hearing impairment. *Bone* 2018; 110, 66-75. doi:10.1016/j.bone.2018.01.031
92. Asharani PV, Keupp K, Semler O, Wang W, Li Y, Thiele H ve ark. Attenuated BMP1 function compromises osteogenesis, leading to bone fragility in humans and zebrafish. *Am J Hum Genet* 2012; 90(4), 661-674. doi:10.1016/j.ajhg.2012.02.026
93. Syx D, Guillemin B, Symoens S, Sousa AB, Medeira A, Whiteford M ve ark. Defective Proteolytic Processing of Fibrillar Procollagens and Prodecorin Due to Biallelic BMP1 Mutations Results in a Severe, Progressive Form of Osteogenesis Imperfecta. *J Bone Miner Res* 2015; 30(8), 1445-1456. doi:10.1002/jbmr.2473
94. Martinez-Glez V, Valencia M, Caparros-Martin JA, Aglan M, Temtamy S, Tenorio J ve ark. Identification of a mutation causing deficient BMP1/mTLD proteolytic activity in autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 2012; 33(2), 343-350. doi:10.1002/humu.21647

95. Fahiminiya S, Majewski J, Mort J, Moffatt P, Glorieux FH, Rauch F. Mutations in WNT1 are a cause of osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 2013; 50(5), 345-348. doi:10.1136/jmedgenet-2013-101567
96. Pyott SM, Tran TT, Leistriz DF, Pepin MG, Mendelsohn NJ, Temme RT ve ark. WNT1 mutations in families affected by moderately severe and progressive recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2013; 92(4), 590-597. doi:10.1016/j.ajhg.2013.02.009
97. Keupp K, Beleggia F, Kayserili H, Barnes AM, Steiner M, Semler O ve ark. Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. *Am J Hum Genet* 2013; 92(4), 565-574. doi:10.1016/j.ajhg.2013.02.010
98. Joeng KS, Lee YC, Lim J, Chen Y, Jiang MM, Munivez E ve ark. Osteocyte-specific WNT1 regulates osteoblast function during bone homeostasis. *J Clin Invest* 2017; 127(7), 2678-2688. doi:10.1172/jci92617
99. Laine CM, Joeng KS, Campeau PM, Kiviranta R, Tarkkonen K, Grover M ve ark. WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 2013; 368(19), 1809-1816. doi:10.1056/NEJMoa1215458
100. Palomo T, Al-Jallad H, Moffatt P, Glorieux FH, Lentle B, Roschger P ve ark. Skeletal characteristics associated with homozygous and heterozygous WNT1 mutations. *Bone* 2014; 67, 63-70. doi:10.1016/j.bone.2014.06.041
101. Symoens S, Malfait F, D'Hondt S, Callewaert B, Dheedene A, Steyaert W ve ark. Deficiency for the ER-stress transducer OASIS causes severe recessive osteogenesis imperfecta in humans. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8, 154. doi:10.1186/1750-1172-8-154
102. Keller RB, Tran TT, Pyott SM, Pepin MG, Savarirayan R, McGillivray G ve ark. Monoallelic and biallelic CREB3L1 variant causes mild and severe osteogenesis imperfecta, respectively. *Genet Med* 2018; 20(4), 411-419. doi:10.1038/gim.2017.115
103. Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; 105(7), 915-923. doi:10.1172/jci7039
104. Mendoza-Londono R, Fahiminiya S, Majewski J, Tetreault M, Nadaf J, Kannu P ve ark. Recessive osteogenesis imperfecta caused by missense mutations in SPARC. *Am J Hum Genet* 2015; 96(6), 979-985. doi:10.1016/j.ajhg.2015.04.021
105. Lindert U, Cabral WA, Ausavarat S, Tongkobpetch S, Ludin K, Barnes AM ve ark. MBTPS2 mutations cause defective regulated intramembrane proteolysis in X-linked osteogenesis imperfecta. *Nat Commun* 2016; 7, 11920. doi:10.1038/ncomms11920
106. Li L, Mao B, Li S, Xiao J, Wang H, Zhang J ve ark. Genotypic and phenotypic characterization of Chinese patients with osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 2019; 40(5), 588-600. doi:10.1002/humu.23718
107. Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, Nakaoka H, Inoue I. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet* 2012; 57(10), 621-632. doi:10.1038/jhg.2012.91
108. Belkadi A, Bolze A, Itan Y, Cobat A, Vincent QB, Antipenko A ve ark. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(17), 5473-5478. doi:10.1073/pnas.1418631112
109. Lynch M. Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(3), 961-968. doi:10.1073/pnas.0912629107
110. Tournis S, Dede AD. Osteogenesis imperfecta - A clinical update. *Metabolism* 2018; 80, 27-37. doi:10.1016/j.metabol.2017.06.001
111. Lindahl K, Astrom E, Rubin CJ, Grigelioniene G, Malmgren B, Ljunggren O ve ark. Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish

- population with osteogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet* 2015; 23(8), 1042-1050. doi:10.1038/ejhg.2015.81
112. Liu Y, Asan, Ma D, Lv F, Xu X, Wang J ve ark. Gene mutation spectrum and genotype-phenotype correlation in a cohort of Chinese osteogenesis imperfecta patients revealed by targeted next generation sequencing. *Osteoporos Int* 2017; 28(10), 2985-2995. doi:10.1007/s00198-017-4143-8
113. Bonafe L, Cormier-Daire V, Hall C, Lachman R, Mortier G, Mundlos S ve ark. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *Am J Med Genet A* 2015; 167a(12), 2869-2892. doi:10.1002/ajmg.a.37365
114. OMIM. <https://www.omim.org> 2019.
115. Caparros-Martin JA, Aglan MS, Temtamy S, Otaify GA, Valencia M, Nevado J ve ark. Molecular spectrum and differential diagnosis in patients referred with sporadic or autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Mol Genet Genomic Med* 2017; 5(1), 28-39. doi:10.1002/mgg3.257
116. Acuna-Hidalgo R, Bo T, Kwint MP, van de Vorst M, Pinelli M, Veltman JA ve ark. Post-zygotic Point Mutations Are an Underrecognized Source of De Novo Genomic Variation. *Am J Hum Genet* 2015; 97(1), 67-74. doi:10.1016/j.ajhg.2015.05.008
117. Ben Amor IM, Glorieux FH, Rauch F. Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant osteogenesis imperfecta. *J Osteoporos* 2011; 2011, 540178. doi:10.4061/2011/540178
118. Rauch F, Lalic L, Roughley P, Glorieux FH. Genotype-phenotype correlations in nonlethal osteogenesis imperfecta caused by mutations in the helical domain of collagen type I. *Eur J Hum Genet* 2010; 18(6), 642-647. doi:10.1038/ejhg.2009.242

ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 02/11/2016-395577



T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Prof.Dr.Beyhan Tüysüz'ün etik
kurul kararı A-35

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :18.10.2016 tarihli, 29430533-903.99-373699 sayılı yazı

Anabilim Dalınız öğretim üyesi Prof.Dr. Beyhan TÜYSÜZ'ün sorumluluğunda ve yürütücülüğünde Prof.Dr.Oya UYGUNER, Dr.Güven TOKSOY,PHD.Doktora Öğr.Leyla ELKANOVA, Doktora Öğr.Uzm.Dr.Dilek Uludağ AKKAYA ve MSC Biyolog Elif YILMAZ'ın yardımcılıklarında "Osteogenezis İmperfekta Hastalarında Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile İlişkili Genlerin Taranması ve Bilinmeyen Genlerin Araştırılması" başlıklı çalışması hakkında ilgi yazınız ve ekleri 01 Kasım 2016 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) ve TÜBİTAK desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Hüsnüye YÜKSEL
Bölüm Başkanı

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için:<http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE84LR9F5>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL

Tel : 0 (212) 414 30 00 21107- 21108 Fax : 0 (212) 632 00 33

e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağı : www.istanbul.edu.tr

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

OSTEOGENEZİS İMPERFEKTA HASTALARINDA YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN TARANMASI VE BİLİNMEYEN GENLERİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

% 7	% 1	% 1	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 5
2	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	% 1
3	acikerisim.bartın.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
4	Mona S. Aglan, Moushira E. Zaki, Laila Hosny, Rasha El-Houssini, Ghada Oteify, Samia A. Temtamy. "Anthropometric measurements in Egyptian patients with osteogenesis imperfecta", American Journal of Medical Genetics Part A, 2012 Yayın	<% 1
5	www.labome.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	tipedu.cumhuriyet.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Leyla	Soyadı	Elkanova
Doğ.Yeri	Rusya Federasyonu	Doğ.Tar.	16.03.1986
Email	leylaelkan@gmail.com	Uyruğu	Rusya

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü. A.S.Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik AD	2019
Uzmanlık	Rusya Tıp Bilimleri Akademisi Genetik Bilim Merkezi	2012
Lisans	Rusya Devlet Tıp Üniversitesi	2009
Lise	Cherkessk Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
.	Araştırma Görevlisi	Rusya Tıp Bilimleri Akademisi Tıbbi Genetik Bilim Merkezi	2009 - 2013
.	Uzman Hekim	Moskova Şehri Klinik Hastanesi, Kardiyoloji ve İç Hastalıkları Bölümü	2012 - 2013

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
Rusça	İyi	İyi	iyi		
İngilizce	İyi	Orta	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi