



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**OSTEOGENEZİS IMPERFEKTALİ HASTALARDA
PLAZMA miRNA (miR26a, miR29a, miR133a)
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Latife ÖZ

Antalya, 2017



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**OSTEOGENEZİS IMPERFEKTALİ HASTALARDA
PLAZMA miRNA (miR26a, miR29a, miR133a)
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Latife ÖZ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Banu NUR

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2017

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından TTU-2016-1527 Proje No ile desteklenmiştir.**

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında uzmanlık eğitimime katkısı bulunan tüm hocalarıma, bu tezin oluşturulmasında beni başından sonuna kadar yönlendiren, her konuda yardım ve bilgilerini esirgmeden, bilimsel çalışmanın gereklerini öğreten değerli tez hocam Yrd. Doç. Dr. Banu NUR'a ve Doç. Dr. Aslı TOYLU'ya, laboratuvar aşamasındaki kıymetli katkı ve desteği için biyolog Melike OKUR'a, uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım ve zorlukları birlikte göğüslediğim başta eş kidemlilerim olmak üzere tüm asistan ve diğer mesai arkadaşlarıma, bugüne gelmemde büyük katkısı olan ve her zaman bana destek olan canım aileme, hayatım ve tıp eğitimim boyunca bana rehberlik eden manevi babam Prof. Dr. Tuncay ÖZGÜNEN'e

Teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iii
Şekiller Dizini	v
Tablolar Dizini	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik Yapısı	3
2.1.1. Osteoprogenitör hücreler	5
2.1.2. Osteosit	5
2.1.3. Osteoblast	6
2.1.4. Osteoklast	6
2.1.5. Kemik ekstrasellüler organik matriksi	7
2.1.5.1. Kollajen	7
2.1.5.2. Non-kollajen proteinler	8
2.1.6. Kemik turnover	8
2.1.7. Kemik mineralizasyonu	10
2.2. Osteogenezis İmperfekta	11
2.2.1. Epidemiyoloji	12
2.2.2. Klinik	12
2.2.3. Genetik patogenez	14
2.2.4. Tanı	18
2.2.5. Tedavi	19
2.3. Mikro RNA'lar	20
2.3.1. miRNA biyogenezi	21
2.3.2. miRNA işlevleri ve ilişkili hastalıklar	23
2.3.3. Antagomirler	24
2.3.4. Mir 26a	25
2.3.5. Mir 29a	27
2.3.6. Mir133a	29

3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Olguların Seçimi ve Örnek Eldesi	31
3.2. Plazma miRNA İzolasyonu	32
3.3. cDNA Hazırlanması	32
3.4. Preamplifikasyon	33
3.5. Kantitatif PCR	34
3.6. miRNA İfadesi Değerlerinin Analizi	35
3.7. İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
7. ÖZET	50
8. ABSTRACT	52
9. KAYNAKLAR	54
10. EKLER	71
Ek 1. Etik Kurul Onayı	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ALP	Alkalen Fosfataz
ANK	Ankilozis Protein
BMP	Bone Morfogenik Protein
BMU	Temel Çok Hücreli Birim
CaCl	Kalsiyum Klorür
CaCO₃	Kalsiyum Karbonat
CaF₄	Kalsiyum Florür
CaPO₄	Kalsiyum Fosfat
CRTAP	Kartilaj İlişkili Protein
DEXA	Dual Energy X-Ray Absorptiometry
DGCR8	Di-George Sendromu Kritik Bölge Geni-8
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
GER	Granüllü Endoplazmik Retikulum
IGF	Insuline Like Growth Faktör
IFN-α	Interferon Alfa
IFITM5	Interferin Induced Transmembran Protein 5
IL	Interlökin
M-CSF	Makrofaj Koloni Stimulan Faktör
MCL1	Miyeloid Lösemi Hücre Farklılaşma Proteini
MGP	Matrik Gla Protein
MgPO₄	Magnezyum Fosfat
mRNA	Haberci RNA
miRNA	MikroRNA
ncRNA	Protein Kodlamayan RNA

OASIS	Old Astrosit Specifically Induced Substance
OD	Otozomal Dominant
OI	Osteogenezis Imperfecta
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OR	Otozomal Resesif
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PEDF	Pigment Epitelyum Derived Factor
PG	Prostoglandin
RANKL	Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatör Ligand
RISC	Sessizleştirme Kompleksi
RNA	Ribo Nükleik Asit
TCL1A	T-Hücreli Lösemi / Lenfoma
TGF-β	Transforming Growth Faktör Beta
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TRIC-B	Trimeric Intraselüler Katyon Kanal Tip B
tRNA	Taşıyıcı RNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Uzun kemiğin anatomik ve histolojik bölümleri	4
2.2. Osteoprogenitör hücre	5
2.3. Kemik yeniden düzenlenme evreleri	9
2.4. COL1A1 ve COL1A2 mutasyonu, tip-1 kollajen üçlü heliks yapısı	17
2.5. Osteogenesis üzerinde etkili mikroRNA'lar	18
2.6. miRNA biogenezisi	22
2.7. miRNA'lar ve ilişkili biyolojik olaylar	23
4.1. Hasta ve kontrol grubu miR-133a düzeyleri	38
4.2. Hasta ve kontrol grubu miR-26a düzeyleri	39
4.3. Hasta ve kontrol grubu miR-29a düzeyleri	39
4.4. Hasta grubu miR-133a düzeyleri ile D vit. ve ALP düzeylerinin kıyaslanması	40
4.5. Hasta ve kontrol grubunda miR-26a düzeyi ile yaş arasındaki ilişki	41

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kemik dokunun non-kollajen proteinleri ve inorganik içeriği	4
2.2. Osteogenezis imperfecta tipleri, kalıtım şekli, fenotipleri ve ilişkili genler	16
4.1. Demografik ve klinik bulgular	37
4.2. Hasta ve kontrol grubu plazma miRNA düzey karşılaştırması	40
4.3. Hasta grubunda miRNA düzeyleri ve biyokimyasal belirteçlerin kıyaslanması	40
4.4. miRNA düzeyleri ve dentinogenesis imperfekta varlığı	42

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Osteogenezis İmperfekta (OI) uzun kemik deformiteleri ve kırıkları ile seyreden beraberinde mavi sklera, diş bozuklukları, işitme kaybı ve ligamentöz laksite görülebilen genetik bir bağ dokusu hastalığıdır. Sillence ve ark. tarafından klinik, kalıtım şekli ve radyolojik özelliklere göre OI klasik olarak dört sınıfa ayrılmaktadır. Yaklaşık 0,3-0,7/10.000 canlı doğumda bir görülmektedir. Günümüzde OI'nın OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) veri tabanında 17 farklı tipi bildirilmiştir. Kalıtım şekli tiplere göre farklılık göstermekle birlikte otozomal dominant (OD) ve otozomal resesif (OR) geçişi mevcuttur (1,2).

Yakın zamana kadar klasik bilgilerimiz santral dogma olarak tanımlanan DNA'da depolanmış materyalin haberci RNA'ya (mRNA) transkribe olması ve sonrasında da taşıyıcı RNA (tRNA) aracılığıyla ribozomlara taşınarak gerekli proteinlerin sentezlenmesi yönünde idi. Fakat yapılan genom ve işlevsel analiz çalışmaları protein kodlamayan RNA (non-coding RNA- ncRNA) moleküllerinin de olduğunu göstermiştir (3). Bu ncRNA'lar da kendi içinde mikroRNA (miRNA), small interfering RNA (siRNA), interacting RNA'lar (piRNA) ve long non-coding RNA (lncRNA) gibi sınıflara ayrılmıştır. Yapılan çalışmalar genom üzerinde protein kodlamayan, transkripsiyonu kontrol eden (promoter) ve arttırıcı (enhancer) bölgeler ile gen ekspresyonunu düzenlemekle görevli ncRNA'ların hastalıklar ile ilişkili olduğunu ve genetik farklılıkları sağladığını göstermiştir (4,5). Tüm bu gelişmeler mikroRNA'ların bu süreçlerdeki rolünü ve vücut sıvılarından izole edilebilen bu nükleoproteinlerin biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağı sorusunu akla getirmiştir.

Küçük kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olan mikroRNA (miRNA)'lar gelişim, homeostaz, bağışıklık ve ossifikasyon gibi süreçlerde önemli rol oynamaktadırlar. miRNA'ların inflamasyondan kansere kadar çoğu hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. mRNA yıkılması veya translasyon baskılanması ile gen ekspresyonunu düzenleyen miRNA'ların, çeşitli hastalıklardaki rollerinin öğrenilmesi onların biyobelirteç olarak değerlendirilmesine yol açmıştır (6). Varolan kanıtlar, ossifikasyon sürecinde miRNA'ların hedef mRNA'ların ekspresyonunu bağlama ve bastırma ile etkilediğini dolayısıyla osteoblastik

proliferasyon, farklılaşma ve osteoklastik aktivitede etkili translasyon ürünlerini de etkilediğini göstermiştir.

Yapılan araştırmaların çoğunda doğrudan kemik hastalıklarıyla ilişkili miRNA'lar tanımlanmamıştır ancak miR-26a, miR-29a, miR-133a kemik ile ilişkili eksprese olduğu düşünülen miRNA'lardandır. miR-133a, Runx2'yi ve Smad5 yolaklarını baskılayarak osteoprogenitör hücre farklılaşmasını fonksiyonel olarak inhibe eder ve sinerjik olarak kemik oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (7). miR-29a ise osteoblast farklılaşmasını uyaran Wnt sinyalizasyonunun negatif düzenleyicileri olan DKK1, Kremen 2, ve SFRP2 ekspresyonunu baskılayarak etki etmektedir (8). miR-26a'nın kemik doku üzerindeki etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı olmakla birlikte osteoporotik farelerden üretilen mezenkimal kök hücrelerin üzerinde invitro koşullarda kemik rejenerasyonunu hızlandırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (9).

Bu bağlantıları destekleyen deneysel kanıtlar kısıtlı olduğundan ossifikasyon sürecince rol aldığı düşünülen miRNA'larla ilişkinin anlaşılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu biyobelirteçlerin belirlenmesi, hastalığın erken dönemde saptanması, hastalığın seyrinin ve yeni bir terapötik hedef olasılığı olan miRNA'lardan yola çıkarak tedaviye cevabın izlenmesi açısından önemli olabilmektedir. Osteogenezis İmperfekta yaygın osteoporoz, tekrarlayan kemik kırıkları ve bunun sonucunda oluşan deformiteler ile karakterize kesin tedavisi olmayan genetik bir hastalıktır. Bu nedenle çalışmamızda, Oİ'da mikroRNA'ların klinik heterojenitedeki rolünü saptamak, biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin anlaşılmasına katkı sağlamak ve yeni bir terapötik hedef olasılığı amacıyla kemik ilişkili miRNA'lardan miR-26a, miR-29a, miR-133a'nın hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

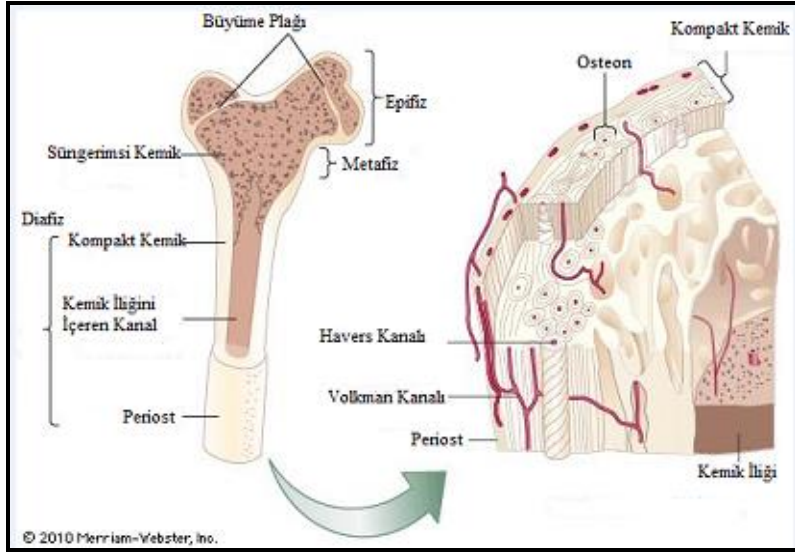
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Yapısı

Kemikler, kaslar ve diğer bağ dokusu elemanları ile birlikte hayati organların korunması, postürün sağlanması, büyüme ve gelişmenin yanı sıra kanın şekilli elemanlarının üretimi gibi sistemik görevler de üstlenmiş vücudun en sert dokusudur. Erişkin bir insan vücudunda ortalama 206 kemik bulunur. Bu sayı çocuklarda henüz bazı kemik bölümlerinin kaynaşmamış olması nedeniyle doğumda 270, 14 yaşında 254'tür (10).

Kemik dokusu embriyolojik dönemde mezodermden gelişen yapılardan biridir ve bağ dokusunun iki farklı mekanizma ile kemikleşmesinden oluşur. Mezenkimal dokuda membranöz bir kılıf içinde başlayan sürece intramembranöz kemikleşme denir. Kafatası, klavikula gibi yassı kemikler bu şekilde oluşur. Mezodermden kıkırdak dokusu oluşumunu takiben kıkırdak dokunun mineralizasyonuna da intrakartilaginöz kemikleşme denir. Uzun ve kısa tübüler kemikler bu şekilde oluşur (11,12).

Kemiğin eklem ile büyüme plağı arasında kalan bölgesi metafiz, büyüme plağı ile uzun kemiklerin uçları arasında bulunan hyalin kıkırdak ile kaplı bölgesi epifiz, uzun kemiklerde iki metafiz arasında kalan bölgesi ise diafiz (kemik shaftı) olarak isimlendirilir (12,13). Tüm kemiklerin çevresi periost isimli özelleşmiş bağ dokusundan oluşan bir zar ile çevrilidir. Periost tendon ve diğer bağ dokusu elemanlarının kemiğe tutunmasını sağlar. Sinir uçları yönünden zengindir ve kemiğin sinirsel iletiminden sorumludur. Kan damarlarından zengin olması nedeni ile kemiğin beslenmesi ve lüzum halinde onarılmasında da rol oynar (10,12,13).



Şekil 2.1. Uzun kemiğin anatomik ve histolojik bölümleri (13).

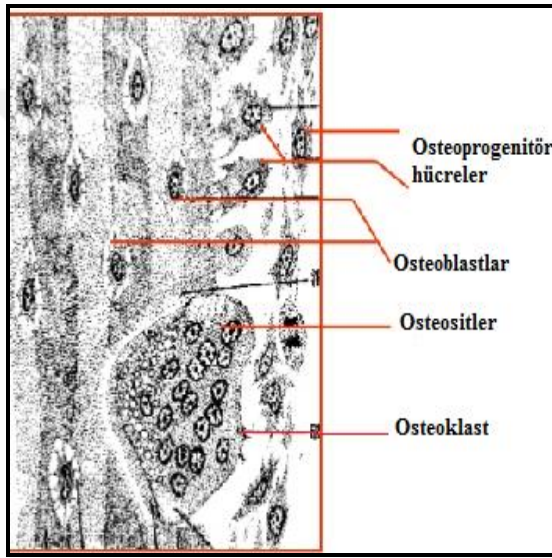
Kemik, yapısına esneklik kazandıran organik maddeler (%30-40) ve yapısına sertlik kazandıran inorganik tuzlar (%60-70) olmak üzere iki ana maddeden yapılmıştır. Organik matriks %90'ı kollajen %10'u non kollajen olan proteinlerden (heparan sülfat, dermatan sülfat gibi proteoglikanlar ve osteopontin, trombosponin, alkalin fosfat, glikoproteinler gibi özelleşmiş proteinler) oluşur. Kemiğin inorganik bölümünü kalsiyum fosfat (CaPO_4) (%85), kalsiyum karbonat (CaCO_3) (%10), magnezyum fosfat (MgPO_4) (%1,5), kalsiyum florür (CaF_4), kalsiyum klorür (CaCl) ve alkali tuzları meydana getirir. Kemik dokuda osteoprogenitör, osteoblast, osteosit ve osteoklast isimli özelleşmiş hücreler de vardır (11,12,13).

Tablo 2.1. Kemik dokunun non-kollajen proteinleri ve inorganik içeriği.

Kemik Doku Non-Kollajen Proteinler	Kemik Doku İnorganik Kısım
1. Proteoglikanlar - Dermatan sülfat - Heparan sülfat 2. Glikoproteinler - Osteopontin - Trombosponin - Alkalin fosfat - Osteonektin 3. Kemik Siyalo Protein - Matriks Gla Protein (MGP) - Osteokalsin	1. Kalsiyum fosfat (CaPO_4) 2. Kalsiyum karbonat (CaCO_3) 3. Magnezyum fosfat (MgPO_4) 4. Kalsiyum florür (CaF_4) 5. Kalsiyum klorür (CaCl)

2.1.1. Osteoprogenitör hücreler

Mezenkim kökenli, bağ dokusu hücrelerinden farklılaşarak mitotik aktivite gösteren, bölünme sonrası bir kısmı osteoprogenitör hücre olarak kalır iken bir kısmı da hormonal ve epigenetik etkenler ile kondroblast ya da osteoblastlara farklılaşan hücrelerdir (12). İşlev olarak fibroblastlara benzerler. Kemik matriksinin salgılanmasında işlev görürler. Periostun iç katmanında, kemik iliği boşluğunu döşeyen kemik içi zarının (endosteum) yapısında, havers ve volkman kanallarından geçen damarların bağ dokusu içinde bulunurlar (12,14).



Şekil 2.2. Osteoprogenitör hücre (12).

2.1.2. Osteosit

Kemik dokunun en uzun ömürlü ve en çok sayıda bulunan asıl hücresidir. Osteoblastların farklılaşması sonucu oluşurlar (15). Mineralize matriks içerisindeki lakünlerde yassı oval şekilli ve oldukça uzun dentritik uzantıları olan hücrelerdir (10). Bu dentritik uzantıları ile başta osteoblastlar, osteoklastlar, diğer osteositler ve kan damarları olmak üzere kemik yapıları ile besin maddeleri, hormonlar, sinyal molekülleri ve düzenleyici sitokinlerin alışverişini sağlarlar (14). Bu yol ile osteoblast ve osteoklastları etkileyerek kemik yeniden yapılandırılması ve mineralizasyonunda merkezi role sahiptir. Paratiroid hormonun direkt etkinlik gösterdiği hücrelerden biridir (16,17,18).

Osteosit apoptozu kemik yeniden yapılandırılması ve tamirinde tetikleyici rol oynar. Glukokortikoidler Wnt/beta-Katenin yolağı üzerinden osteosit ölümünü indüklerken; östrojen, bifosfonatlar, kalsitonin vb. gibi maddeler osteosit apoptozunu inhibe ederler (16,17).

Osteositler *PHEX*, *MEPE*, *DMP-1* gibi moleküller ile fosfat metabolizması ve kemik mineralizasyonunun da düzenlenmesinde rol alırlar. *DMP-1* ve *PHEX* mutasyonu FGF-23'ü inhibe ederek OR hipofosfatemik ricketse neden olurlar (18).

2.1.3. Osteoblast

Aktivitelerine göre prizmatik, yassı veya kübik görünümlü olabilen granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve golgi aparatından zengin hücrelerdir. Kemik trabekülleri ve kemik lamellerinin gelişimi sırasında bu yapıların yüzeyine tek sıra dizilim gösterip kemik yapı ve yeniden yapılandırılmasında dinamik rol oynarlar. Temel görevleri kemik yapısında bulunan makromolekülleri ve tip-1 kollajeni sentezlemektir (12,13).

Endokrin, parakrin ve otokrin yollar ile sitokinler, hormonlar, transkripsiyon ve büyüme faktörleri osteoblastların inhibisyonu, aktivasyonu ve farklılaşmasında rol oynarlar. Ayrıca osteoblastların farklılaşmasında rol oynayan tanımlanmış genler de vardır. Transforming growth faktör beta (TGF- β), insuline like growth faktör (IGF), leptin, vitamin D, bone morfogolik proteinler (BMPs) vb gibi biomoleküller; *WNT*, *NOTCH*, *RUNX*, *OSTERIX* vb gibi genler bunlara örnektir (19,20).

2.1.4. Osteoklast

Monositlerin bir araya gelerek farklılaşması ile oluşan, lizozom ve golgi aparatından zengin, multinükleer dev hücrelerdir. Asit fosfataz, kollagenaz, proteaz vb gibi özelleşmiş enzimleri mevcuttur ve egzozitoz ile hücre dışında da yıkım yapabilen kemik yıkımından sorumlu hücrelerdir (12,13). Nükleer faktör kapp B reseptör aktivatör ligand (*RANKL*) ve makrofaj koloni stimulan faktör (M-CSF) bu hücrelerin işlev ve özelleşmesinde etkilidir (21,22).

Çok sayıda sitokin ile etkileşerek ve kendisi de sitokin salgılayarak retiküloendotelial sistem hücresi gibi davranır. Osteoklastları stimüle eden

biyomoleküller; İnterlökin (IL) 1, IL 6, IL 11, IL17, prostoglandin (PG) E2, PTH, Kalsitriol, Tümör Nekrozis Faktör (TNF) alfa iken; IL-4, 12, 13, 18 ve İnterferon (IFN) gama inhibe eder (19).

2.1.5. Kemik ekstraselluler organik matriksi

2.1.5.1. Kollajen

Kollajen; kıkırdak, tendon, kemik organik matriksi ve göz korneasının en önemli elemanı olan basit fibriler bir skleroproteindir. Kollajenin aminoasit dizisi tekrarlayan tripeptitlerden oluşur. Glisin-X-Prolin ya da Glisin-X-Hidroksiprolin şeklinde gösterilebilir. Burada X herhangi bir aminoasiti temsil eder. Bu yapı taşları ile oluşan polipeptit zincirlerinden üçü bir araya gelip bükülünerek üçlü sarmal yapıyı oluşturur. Bu üçlü sarmal yapının stabilitesinde prolin ve hidroksiprolinin rotasyonu sınırlaması; lizin ve hidroksilizin kalıntıları arasında oluşan çapraz bağlar önemli rol oynar (23). Kollajen bir ekstrasellüler matriks proteindir ve kemik dokuda da ekstrasellüler matriksin inorganik bileşenleri arasında gömülüdür. Fakat sentezi fibroblastlarda hücre içerisinde başlar, hücre içi ve hücre dışı birçok enzimin dahil olduğu metabolik aşamalardan geçerek son halini alır (23,24).

28 farklı tip kollajen tanımlanmıştır. Vücudumuzda en çok bulunan ve kemik yapı ekstrasellüler organik matriksinin de %90'ını oluşturan tip I kollajendir. Farklı kromozomlarda bulunan ve ismi *COL* ile başlayan kollajen sentezi ile ilişkilendirilmiş 34 farklı gen tanımlanmıştır (21). Kollajen metabolizması ile ilgili hastalıklara Oİ, Ehler-Danlos sendromu, skorbüt, Menkes hastalığı, kutis laksa örnek verilebilir. Bu hastalıkların genetik altyapısı ile ilgili veriler mevcuttur fakat halen araştırmalar devam etmektedir (24,25).

Isı şok proteinleri kollajen sentezinde önemli bir role sahiptir. Hsp-47 en önemlilerinden biridir. *SERPINH1* (Hsp47'yi kodlayan gen) genindeki mutasyon sonucu OR tip Oİ bildirilmiştir. Yine aynı genin serpin ailesi üyesi olan serin proteaz sentezinden sorumlu bölgesindeki mutasyon tip VI Oİ ile ilişkilendirilmiştir (26,27).

Üçlü sarmal yapı oluşumunda önemli bir şaperon rolü oynayan *FKBP65*'i kodlayan gendeki bir mutasyon sonucu bildirilmiş OR tip Oİ vakaları mevcuttur

(26,28). Prolil 3 hidroksilaz enzim kompleksinin bir komponenti olan kartilaj ilişkili proteini (CRTAP) kodlayan *LEPRE1* genindeki mutasyon sonucu tanımlanmış OR tip Oİ olguları vardır (26,29).

2.1.5.2. Non-kollajen proteinler

Kemik organik matriksinin %10'unu non-kollajen proteinler (glikoproteinler, hyaluronik asit, proteoglikanlar, osteopontin, trombospondin) oluşturur. Kemiğin esnekliği, kollajen yapısının desteklenmesi ve mineralizasyonda rol alırlar (10,11).

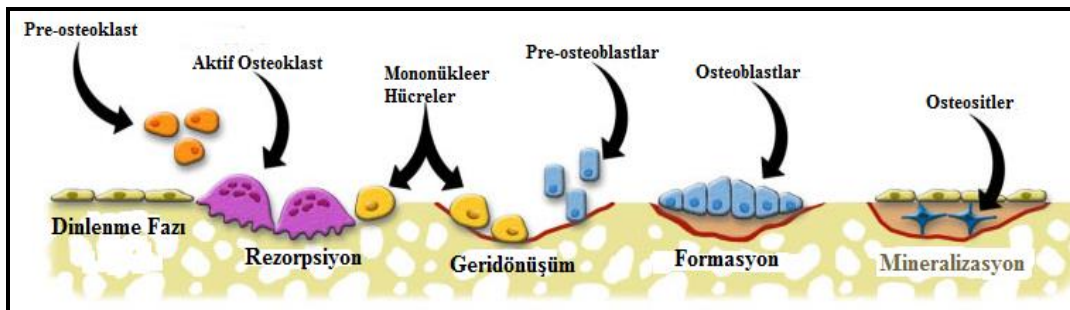
2.1.6. Kemik turnover

Sağlıklı bir insanda kemik dokunun oluşması ve varlığını sürdürmesi ile ilişkilidir; modelling (düzenlenme) ve remodelling (yeniden düzenlenme). Büyüme ve gelişme sürecinde iskelet yapının normal yapı ve fonksiyonlarına ulaşabilmesi için bir yandan kemik yapımı olur iken, diğer yandan yıkımı gerçekleşir buna 'modelling' denir. Remodelling ise olgun kemik dokusunda yaşlanan hücrelerin yerini genç hücrelerin alması sürecine verilen isimdir. Kemik hastalıklarının büyük bir yüzdesi bu süreçteki hassas dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar (30). Klinik pratikte en sık karşılaşılan remodelling kusuru osteoporozdur. 2010 yılında ABD'de yapılan bir çalışmada 50 yaşın üzerinde osteoporoz veya düşük kemik kütlesi bulunan 99 milyondan fazla yetişkin olduğu tespit edilmiştir. Remodelling kusurları çocukluk döneminde ise karşımıza kemik metabolizması hastalıkları olarak çıkmaktadır (31).

Son yıllarda yapılan epigenetik çalışmalar kemik remodellingi üzerinde DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu kadar mikroRNA'ların da etkin olduğunu göstermiştir (32). 2011 yılında Zhang ve ark. tarafından osteoblast farklılaşmasında ve osteogenezin düzenlenmesinde ciddi rol oynayan RUNX2'in transkripsiyonunda aktivatör ve inhibitör rol oynayan 11 farklı miRNA keşfedilmiştir. Bunlar miR-23a, miR-30c, miR-34c, miR-133a, miR-135a, miR-137, miR-204, miR-205, miR-217, miR-218 ve miR-338. miR-218 dışındaki diğer miRNA'ların in vitro hücre kültürlerinde aşırı ekspresyonlarının RUNX2 transkripsiyonunu downregüle ettiği gösterilmiştir (33). Farklı bir

çalışmada miRNA düzenleyici çerçevesinin çıkarılması durumunda osteoprogenitör hücrelerin Dicer geninin COL1a-Cre sistemi vasıtası ile koşullu olarak silindiği bunun da fetal iskeletin gelişmemesi ve ölüm ile sonuçlandığı gösterilmiş. İlginç bir şekilde olgun osteoblastlarda Osteokalsin-Cre sistemi aracılığıyla Dicer geninin in vivo olarak çıkarılması sonucu canlı doğumlar olduğu, fakat kemik mineralizasyonunun geriden geldiği gösterilmiştir (34).

İlk 1990 yılında Frost ve ark. tarafından tanımlanan remodelling sürecinde osteoklastlar ve osteoblastlar işbirliği içerisinde çalışırlar. Bir araya gelerek oluşturdukları birime temel çok hücreli birim (BMU) ismi verilir. Remodelling dört evreden oluşur bunlar; aktivasyon, rezorpsiyon, geri dönüşüm, formasyondur (35). Remodeling olacak kemik alanına osteoklastların çağırılması ve osteoklastların bu bölgeye migrasyonu aktivasyon fazıdır (36). Rezorpsiyon fazında temel çok hücreli birim (BMU) tarafından kemik yüzeyinde oyuklar oluşturulur. Ardından osteoklastlar tarafından bu alan osteoblastlar için uygun olacak şekilde düzeltilir. Son olarak osteoblastlar bu bölgeye göç eder ve non-kollajen proteinleri (glukozaminoglikanlar ve proteoglikanlar) sentezler. Oluşturulan bu geçici matriks kollajenden fakirdir (36). Bir sonraki aşamada rezorbe edilen alanın yüzeyi osteoblastlar tarafından sentezlenen glikoproteinler ile kaplanır. Rezorpsiyon alanının sınırları salgılanan bu non-kollajen protein ile işaretlenir. Bu evreye geri dönüşüm evresi denir. Osteopontin bu evrede anahtar rol oynayan bir proteindir (37). Son aşama olan formasyon fazının ana hücreleri osteoblastlardır. Osteoblastlar kemik matriksi sentezlerler ve ardından osteositlere dönüşürler (38).



Şekil 2.3. Kemik yeniden düzenlenme evreleri (*The Orthopaedic Knowledge Network*)

2.1.7. Kemik mineralizasyonu

Biyolojide, mineralizasyon, inorganik maddelerin organik bir matrikse çökmesi anlamına gelir. Mineralizasyonun lokalizasyonu, miktarı, kompozisyonu ve morfolojisi organizmanın özelleşmiş hücreleri tarafından kontrol altında tutulur (39). İnsan vücudunda kemik mineralizasyonu osteoblastlar tarafından tetiklenir ve kontrol edilir. Kondrosit matriksinde bulunan ekstrasellüler yerleşimli veziküller de bu süreçte önemli bir rol oynar. Bu veziküller alkali fosfataz (ALP), kalsiyum ve inorganik fosfattan zengindir (40).

ALP enzimi en iyi alkali pH'da işlev görür. Temel fonksiyonu nükleotidler, proteinler ve alkaloidler olmak üzere çeşitli biomoleküllerden fosfat grubunun koparılması ve inorganik pirofosfatın inorganik fosfata dönüştürülmesidir (41). Bu enzimin fonksiyon kaybı ya da düşüklüğünde çeşitli kemik hastalıkları görülür. Düşük ALP seviyesi ile karakterize hipofosfatazya bu hastalıklardan biridir. Hastalığın temel fizyopatolojisinde ALP sentezi ile ilişkili *TNSAPL* gen mutasyonu sorumludur. Basit mineralizasyon defektinden fatal seyre kadar geniş bir klinik spektrumu olan hastalık kemik, iskelet kası, böbrek, akciğer, gastrointestinal sistem ve sinir sistemi dahil olmak üzere birçok sistemi etkileyebilir (42).

Mineralizasyonda bir diğer önemli faktör de ekstrasellüler sıvıdaki inorganik fosfat ve pirofosfat seviyeleridir. Bu seviye enzim işlevine sahip dört membran proteini tarafından kontrol edilmektedir. Bunlar ANK (ankilozis protein) taşıyıcıları (pirofosfatı hüce dışına taşır), P1T-1 (inorganik fosfatı hücelere aktarır), PC-1 (Nükleotidlerden fosfat kopararak pirofosfat üretir) ve dokuya özgül olmayan ALP'dır (43). Clement ve ark. yaptıkları bir çalışmada miR-9'un aşırı ekspresyonunun PC-1, Pit-1 ve TNAP'ın post transkripsiyonel negatif regülasyonuna neden olduğunu göstermiştir. miR-9'un inorganik fosfat ve pirofosfat dengesini bozarak kusurlu kondrosit oluşumuna neden olduğu bunun da osteoartrit gibi bazı hastalıkların etiyolojisinde rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir (43).

2.2. Osteogenezis İmperfekta

Osteogenezis İmperfekta uzun kemik deformiteleri ve kırıkları ile seyreden beraberinde mavi sklera, diş bozuklukları, işitme kaybı, ligamentöz laksite görülebilen genetik bir bağ dokusu hastalığıdır. İntrauterin dönemde bulgu veren ve fatal seyreden, basit bir travma sonrası bazen travma olmadan da uzun kemik ve vertebra kompresyon kırıkları görülebilen, yaşam kalitesi düşüklüğüne sebep olabilen formları olmasının yanında sadece erişkin dönemde generalize osteopeni ile fark edilip geç tanı alan formları da vardır.

İlk tipik Oİ olgusu 1849 yılında Vrolik'in gelişme geriliği ve çoklu kırık ile doğan bir bebeği tanımlaması ile ortaya çıkmışsa da, ilk tarihsel olgu antik Mısır'a kadar dayandırılır (44,45). Geniş klinik yelpazesi nedeni ile hastalığın tanımlanması kadar genetik kalıtım şekli de uzunca bir süre araştırılmaktadır. Dominant tek bir genin mutasyon, penetrans ve ekspresyonundaki farklılık sonucu ortaya çıktığı (Caniggia ve ark.1958; Smars 1961) ya da yakın bağlantılı dominant gen kompleksindeki mutasyonun neden olduğu (Seedorf, 1949) yönünde hipotezler öne sürülse de, hastaların detaylı aile öyküleri alındığında pedigrilerinden OR bir kalıtım formunun da olduğu Kaplan ve Baldino (1953), Rohwedder (1953), Goldfarb ve Ford (1954), Adaita (1957), Awwaad ve Reda (1960), Chawla (1964), Maloney (1969), Remigio ve Grinvalsky (1970), McKusick (1972), Wilson (1974), Horan ve Beighton (1975), Tsuruta ve Sugiura (1977) tarafından bildirilmiştir (39). Bu çalışmalar sonucunda Oİ teriminin tek bir klinik yansıma ya da genetik mutasyonu değil içerisinde farklı varyasyonları barındıran geniş bir tanım olduğu sonucuna varılmaktadır (Cocchi, 1964; Ibsen, 1967; Francis ve ark., 1975; McKusick, 1975). Oİ'nın ilk klinik sınıflaması Sillence ve ark. tarafından yapılmış ve klasik dört tipi tanımlanmıştır (1).

Günümüzde OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) veri tabanında 17 farklı Oİ olgusu bildirilmiştir ve çoğunluğu OR tipleridir (2).

2.2.1. Epidemiyoloji

Osteogenezis İmperfekta prevalansı 0,3-0,7/10.000 canlı doğum, olarak bilinse de ağır vakaların prenatal tanı alarak terminasyonu ya da spontan abortus ile sonuçlanması; bazı hafif klinik seyirli tiplerinin ise geç tanı almasından dolayı insidansın sanıldığından daha yüksek olduğu düşünülmektedir (46,47).

2.2.2. Klinik

Osteogenezis İmperfekta'nın geniş bir klinik yelpazesi vardır. Tip 1 kollajen kemik, tendon, deri, sklera ve dentin dokularda bulunduğu için sadece iskelet anomalileri değil diş problemleri, işitme kusurları ve kardiyovasküler problemlerle de hastalar karşımıza çıkabilir. Hastalığın ciddiyet derecesi de bir o kadar değişkendir. Sadece progresif osteopeni ile kırık olmadan seyreden hafif formları, ciddi yaşam kalitesi düşüklüğüne sebep olacak düzeyde boy kısalığı, tekrarlayan kırık, kemik deformitesine sebep olan formları olduğu gibi intrauterin tanı alan ve fatal seyreden çok daha ağır tipleri de vardır (47,48,49).

Osteogenezis İmperfekta Tip I

Kemik kırıklarının normal başlangıç yaşı çocuğun yürümeye başladığı döneme denk gelmektedir. Nadiren intrauterin ya da perinatal dönemde kırık oluşmaktadır. Ergenlik dönemine kadar ortalama 50 kırık oluştuğunu bildiren yayınlar mevcuttur. Kırıklar özellikle kol ve bacaklar gibi uzun kemiklerde gözlenir fakat kaburgalar, el ve ayak küçük kemiklerinde de olabilmektedir. Genellikle iyi kallus oluşumu ve deformite olmadan iyileşme gözlenebilmektedir (50).

Kafatası bulguları yumuşak ve ince kalvarium, geniş fontanel, wormian kemikleri, frontal ve temporal belirginlik, oksipital düzleşmedir (51). Mavi sklera gözlenir. Bu olgular yetişkinlik döneminde yavaş yavaş mavi-gri skleraya dönebilir. Diğer göz bulgular periferik korneada opasite, keratokonus veya megalokorneadır. Bu tipin diş bulguları enamel hipoplazisi, sarı veya gri dişler, diş çürükleri, düzensiz yerleşim ve geç dökülmedir. Dentinogenezis imperfekta nadir görülür (52,53).

Otoskleroza sekonder 4. ve 5. dekadlarda işitme kaybı gözlenir. Erken evrede orta kulak kemiklerinin kırılıp yeniden kaynaşması sürecinde iletim tipi

işitme kaybı görülebilir. Tipik olarak yüksek frekanslı tipte işitme kaybı, timpanometri ile karakteristik iki yönlü uyum eğrisine neden olur. Ergenlik dönemi sonrasında işitme kaybı miks tipe dönebilir ve cerrahi müdahale bu vakalarda zorlaşır (54).

Mitral kapak prolapsusu, aort kapak yetmezliği ve disseksiyona neden olmayan aort kök çapında artış bu tipe eşlik eden kardiyovasküler problemlerdir. Eklemlerde hipermobilitate, trombosit fonksiyon kaybına bağlı kanamaya eğilim, kılcal damar kırılганlığında artış, umbilikal ve inguinal herni eşlik edebilecek diğer klinik bulgulardır.

Genellikle normal boyludurlar, ancak omurga tutulumu olan olgularda biraz yükseklik kaybı olabilir (55).

Osteogenesis İmperfekta Tip II

Perinatal lethal form olarak da bilinen bu formda ölümlerin en sık sebebi akciğer yetmezliği, konjestif kalp yetmezliği ve enfeksiyonlardır. İntrauterin büyüme geriliği, prematürite ve non-immun hidropsun önemli nedenlerinden biridir (56).

Kısa boy, kraniofasiyal deformiteler, son derece yumuşak kalvarium, koyu mavi sklera mikrognați, kalça eklemi tutulumuna bağlı kurbağa pozisyonu, kısa ve deforme eklemler tipik özellikleridir (57).

Toraks boşluğunun normalden daha dar ya da asimetrik gelişimine bağlı akciğer hipoplazileri, kosta kırıklarına ikincil gelişen pnömotoraks ve kanamalar, kifoskolyoz, vertebra basısı, pektus karinatum.. vb gibi iskelet deformitelerine ikincil gelişen fonksiyonel kapasitede azalma önde gelen mortalite nedenlerindendir (58). Prognozu kötüdür. Bir yıldan uzun yaşayan olgu sayısı çok nadirdir.

Osteogenesis İmperfekta Tip III

Bu tipin özelliği deformitelerin progresif seyretmesidir. Makrosefali, tipik üçgen yüz görünümü, kardiyopulmoner yetmezliğe neden olabilecek düzeyde kifoskolyoz, progresif seyirli eklem deformiteleri fenotipik özellikleridir. İntrauterin kırıklar ile de karşımıza çıkabilir (59).

Doğumda normal renkte skleraları olabileceği gibi, açık mavi sklera ile doğup yaşamın ilerleyen dönemlerinde beyaza dönebilir. İşitme kaybı ve dentinogenesis imperfekta da bu alt tipin klinik bulguları arasındadır (59).

Tip II'ye göre daha iyi fakat tip I'e göre kötü prognozu vardır. Çoklu kırık ve deformiteler ile hayatta kalım mümkündür. İnaktivite kaynaklı eklem kontraktürleri, kas güçsüzlüğü ve progresif kifoskolyoza bağlı boy kısalığı izlemde karşılaşılan diğer problemlerdir. Kardiyak dekompanasyon, pulmoner yetmezlik ve beyin sapı basısına neden olan baziller arter anevrizması en sık ölüm nedenlerindendir (60,61).

Osteogenesis Imperfekta Tip IV

İntrafamilyal ve interfamilyal fenotipik varyasyon olarak da değerlendirilir. Hafif-orta dereceli kemik deformitelerinden yenidoğan döneminde ortaya çıkan kırıklara kadar değişken bir kliniği olabilir. Skleraları beyazdır fakat gri skleralı olgular da bildirilmiştir. Olguların çoğunda dentinogenesis imperfecta vardır. Olguların bazılarında işitme kaybı da gözlenebilir (57).

Kardiyopulmoner komplikasyona neden olabilecek düzeyde kifoskolyozu olmayan olgularda beklenen yaşam ömrü normale yakındır. Uygun tedavi ve komplikasyonları önlemek adına alınan önlemler ile yaşam kalitesi yükseltilip normal bir ömür sürebilirler (62,63).

2.2.3. Genetik patogenezi

Kollajen sentezi ve kemik metabolizması çok basamaklıdır. Birçok biyomolekül ve genetik etken tarafından kontrol edilir. Bu nedenle farklı basamaklardaki aksaklıklar ya da mutasyonlar farklı klinik yansımalar ile kendini gösterir. Tip 1 kollajeni kodlayan genlerde 250'ye yakın mutasyon gösterilmiştir (64). Otozomal dominant kalıtım gösteren *COL1* geni bunlardan biridir ve klasik tip Oİ hastalarının %90'ında bu mutasyon vardır. *COL1A1* (17q21) geni prokollajen alfa 1 zincirini *COL1A2* (7q22) geni ise prokollajen alfa 2 zincirini kodlar (65). Klasik dört tip bu genler ve mutasyonları ile ilişkilendirilir. Fakat son yıllarda Oİ'nin sadece dominant değil resesif geçişli tiplerine ait çok sayıda gen tanımlanmıştır; *BMP1*, *CREB3L1*, *CRTAP*, *FKBP10*, *IFITM5*, *P3H1*, *P4HB*,

PLOD2, PLS3, PPIB, SEC24D, SERPINF1, SERPINH1, SP7, SPARC, TMEM38B ve *WNT1* bunlardan bazılarıdır (66,67).

Bu genler kemik mineralizasyonu, kollajen sentez ve konfigürasyonu, osteoblastların işlev ve diferansiyasyonunda görev alırlar (49).

Tip 1 kollajenin şekillenmesi ile ilişkili genler; *CRTAP, PPIB, TMTM38B, LEPRE1, P4HB*

Tip1 kollajenin sentez ve işlenmesi ile ilişkili genler; *COL1A1, COL1A2, BMP1*

Tip 1 kollajenin katlanması ve çapraz bağlarını etkileyen genler; *PLOD2, SERPINH1, FKBP10*

Mineralizasyon bozukluğuna neden olanlar; *SERPINF1, IFITM5*

Osteoblast gelişiminde defekte neden olanlar; *Osterix (SP7), WNT, CREB3L* (68,69,70).

Bu bilgiler ışığında sınıflamaya yeni eklenen Oİ tipleri;

Tip 5 Oİ; *IFITM5* (interferin induced transmembran protein 5) (11p15) genindeki OD mutasyon sonucu oluşur. Bu gen aynı isimli bir protein (IFITM5)'i kodlar, mutasyonunda kemik formasyon ve mineralizasyonunda bozukluklar ortaya çıkar (71).

Tip 6 Oİ; *SERPINF1* geni glikoprotein yapısındaki pigment epitelyum derived factor (PEDF) proteinini kodlar. Görevi anjiogenezin inhibisyonu olan bu proteinin eksikliğinde osteoid miktarında artma, lameller dezoryantasyon, mineralizasyon kusurları ve osteoblast fonksiyonlarında azalma gözlenir (72).

Tip 7, 8, 9 Oİ; *CRTAP* geni *Crtap* proteinini, *LEPRE1* geni prolil 3 hidroksilazı ve *PPIB* geni peptidil priliz izomerazı kodlar. Bu üç protein yapının oluşturduğu 3-prolil hidroksilaz kompleksi prolin rezidülerini hidroksilleyerek üçlü sarmal yapının kararlılığını sağlar. *CRTAP* mutasyonunda tip 7, *LEPRE1* mutasyonunda tip 8 ve *PPIB* mutasyonunda tip 9 Oİ olur. Üç tipinde kliniği ağır seyreder (73,74,75).

Tip 10 Oİ; Kollajen şaperon like protein (CBP2) ve HSP47'yi kodlayan *SERPINH1* (11q13) geni mutasyonunda kollajenin katlanmasında kusur olur (76).

Tip 11 Oİ; *FKBP10* geni kollajenin katlanmasında şaperon rolü üstlenen aynı isimli proteini kodlar, mutasyonunda telopeptide hidroksilizin çapraz bağında kusur oluşur. Bu gen Bruck sendromu ile de ilişkilendirilmiştir (77).

Tip12 Oİ; *SP7/OSX (12q13)* geni osteoblast ve osteosit maturasyonunda rol oynayan çinko parmak yapıdaki spesifik protein 7/osterix isimli transkripsiyon faktörünü kodlar. Mutasyonunda osteoblast diferansiasyonunda ve kemik organizasyonunda defektler olur (78).

Tip13 Oİ; *BMP1 (8p21)* geni C-propeptidi prokollajenden ayırmakla görevli proteolitik aktiviteye sahip gen ile aynı isimi taşıyan proteini kodlar. TGF-beta süper ailesinin üyesi olan bu enzim mutasyonunda ciddi iskelet anomalileri oluşur (79).

Tablo 2.2. Osteogenezis imperfekta tipleri, kalıtım şekli, fenotipleri ve ilişkili genler (47).

Osteogenezis İmpfekta Tipi	Kalıtım Şekli	Fenotip	Gen Defekti
Klasik Sillence Sınıflaması			
Tip I	OD	Hafif	<i>COL1A1</i> allel sessiz mutasyonu
Tip II	OD	Lethal	<i>COL1A1</i> ve <i>COL1A2</i>
Tip III	OD	Progresif Deformite	<i>COL1A1</i> ve <i>COL1A2</i>
Tip IV	OD	İlımlı	<i>COL1A1</i> ve <i>COL1A2</i>
Etiyolojisi bilinmeyen			
Tip V	OD	Histolojik bulgular	<i>IFITM5</i>
Mineralizasyon defekti			
Tip VI	OR	Mineralizasyon defekti	<i>SERPINF1</i>
3-hidroksilasyon defektleri			
Tip VII	OR	Şiddetli / lethal	<i>CRTAP</i>
Tip VIII	OR	Şiddetli / lethal	<i>LEPRE1</i>
Tip IX	OR	İlımlı / lethal	<i>PPIB</i>
Şaperon defekti			
Tip X	OR	Şiddetli / lethal	<i>SERPINH1</i>
Tip XI	OR	Progresif Deformite	<i>FKBP10</i>

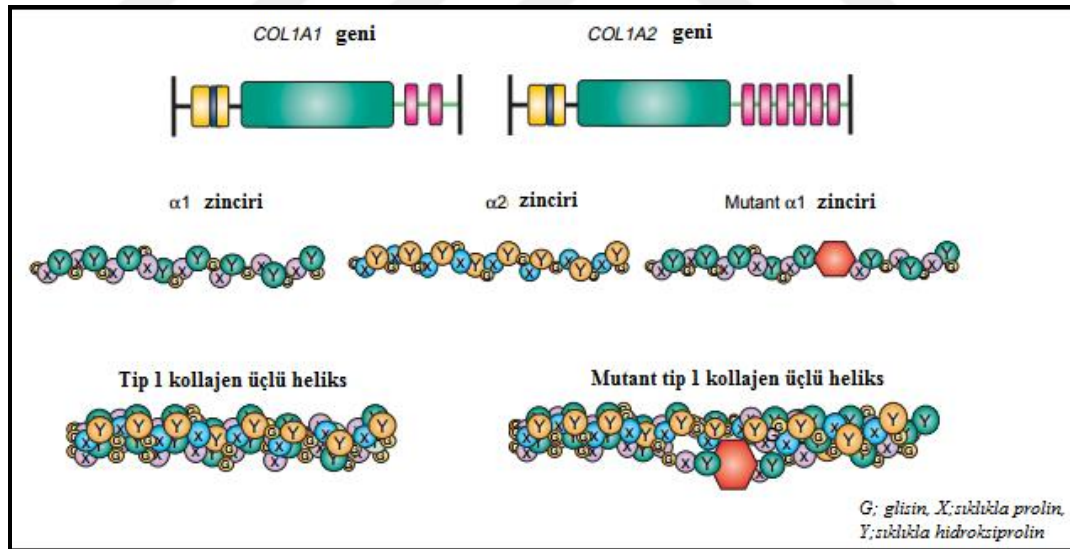
Tip 14 Oİ; *TMEM38B (9q31)* geni trimeric intrasellüler katyon kanal tip B (TRIC-B) proteinini kodlar. Bu protein monovalan katyon spesifik kanal özelliği taşır ve intrasellüler depolardan kalsiyum akışını sağlar. Mutasyonunda

kalsiyumun kofaktör olarak işlev gördüğü yolaklarda aksama olarak kemik metabolizması patolojileri oluşur (80).

Tip 15 Oİ; *WNT1(12q13)* geni yedi kangallı transmembran reseptör ailesindendir ve beta katenin yolağı ile ilişki halindedir. Osteoblast fonksiyonunda etkilidir ve mutasyonunda zeka geriliğinin de eşlik ettiği Oİ kliniği görülür (81).

Tip 16 Oİ; *CREB3L1 (11p11)* geni kemik matriks sentezi ve formasyonunda etkili OASIS (Old astrosit specifically induced substance) proteinini kodlar. Bu protein sıçanlarda tip 1 prokollajenin ifade edilmesini regüle eden endoplazmic reticulum-stress transducerı olarak görev yapar. Henüz yeterli sayıda veri yoksa da mutasyonunda osteopeni ve spontan fraktürlerin gözlenmesi nedeniyle Oİ ile ilişkilendirilmektedir (82).

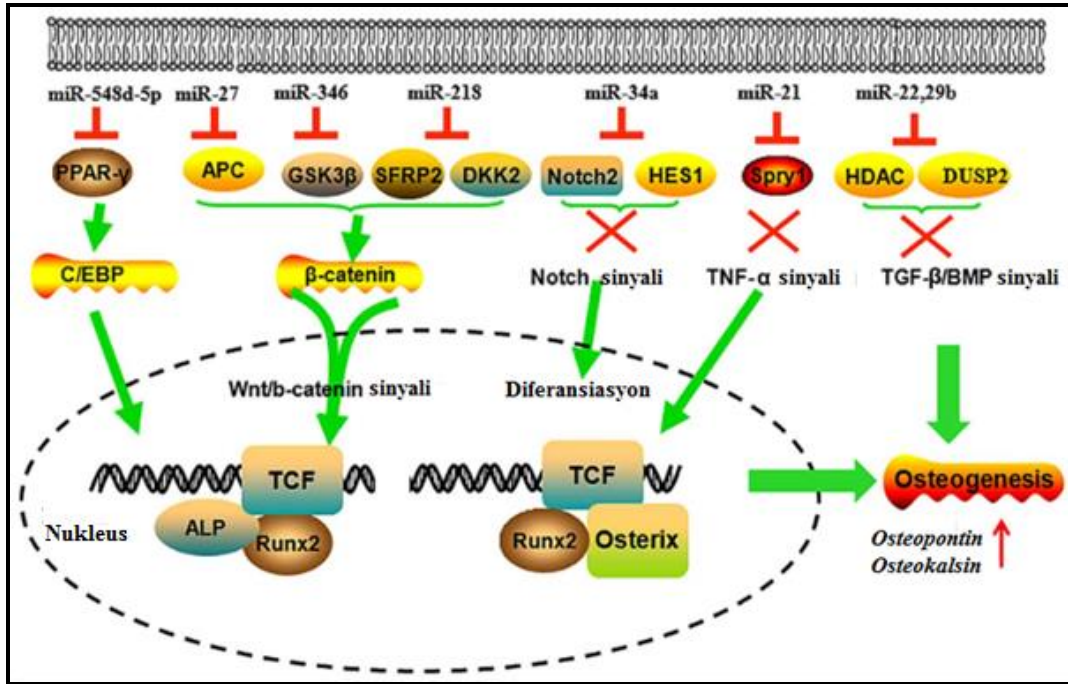
Tip 17 Oİ; *SPARC (5q33)* geni sisteinden zengin, asidik, glikoprotein yapılu bir proteinin sentezinden sorumludur. Tip 1 kollajen ve diğer ekstrasellüler proteinleri bağlar. Mutasyonunda kollajen üçlü helikal yapısını kazanamaz, progresif osteoporoz ve kemik şekil değişiklikleri olur (83).



Şekil 2.4. *COL1A1* ve *COL1A2* mutasyonu, tip-1 kollajen üçlü heliks yapısı (84).

Genetik alanındaki heyecan verici gelişmeler ve Oİ'nın bilindik kalıtımından farklı yeni alt tiplerinin keşfi etiopatogeneizde mikroRNA'lar ile de ilişkilerinin olup olmadığı sorusunu akla getirmiştir. Kaneto ve ark. Oİ hastalarındaki kemik iliği stromal hücrelerinin osteoblast farklılaşması sırasında

COL1A1 ekspresyonunun ve miR-29b seviyelerinin düşük olduğunu göstermiştir. Çalışmanın esas amacı *COL1A1* ve miR-29b arasındaki ilişkiyi incelemek olmasa da, bulgular mineralizasyon sırasında kollajen proteini birikimini düzenleyen miR-29b'nin *COL1A1*'den transkripte olan mRNA miktarına bağlı olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır (85). Bir başka çalışmada miR-133'ün kemik oluşumu için gerekli olan erken bir BMP (bone morfogenic protein) yanıt geni olan Runx2'yi doğrudan hedeflediği ve miR-135'in ise Smad5'i hedeflediği gösterilmiştir. Her iki miRNA da, Runx2 ve Smad5 yollarını zayıflatarak osteoprogenitörlerin farklılaşmasını fonksiyonel olarak inhibe eder. MiR-133'ün MEF-2'ye bağımlı myogenezi desteklediği bilinmesine rağmen, Runx2 aracılı osteogenezi inhibe etmek için ikinci bir tamamlayıcı fonksiyonu olduğu tespit edilmiştir (86).



Şekil 2.5. Osteogenesis üzerinde etkili mikroRNA'lar (87).

2.2.4. Tanı

Öykü (travma olmadan gelişen tekrarlayan kırık, çoklu kırık) ve fizik muayeneye (gelişme geriliği, iskelet deformitesi) ek olarak bazı laboratuvar ve radyolojik görüntüleme yöntemlerinden de yararlanılır. Bunlar direkt grafi, ultrasonografi, DEXA ve mutasyon analizidir.

Direkt grafi bulguları; şiddetli osteoporoz, özellikle uzun kemiklerde kortikal incelme ve eğrilik (bowing), hiperplastik kallus, patlamış mısır kalsifikasyonu (metafizler ve epifizlerde çok sayıda taraklı sklerotik kenar boşlukları olan radyolusent alanlar), zebra şerit işareti (sıklık bifosfonat tedavisi alanlarda, iyileşen kırık bölgelerinde psödoartroza bağlı sklerotik büyüme kurtarma çizgileri) gözlenir. Vertebralarda kompresyon kırıkları, kifoskolyoz, codfish (morina balığı) görünümü, platyspondili gözlenebilir. Pektus ekskavatum veya karinatum en sık eşlik eden göğüs kafesi deformitesidir. Pelviste asetabulum protruzyonu ve coxa vara saptanabilir (88).

Prenatal sonografik özellikle tip II (perinatal lethal form) ve tip III'de yararlı olabilir. Kalvaryum ossifikasyonunda azalma, kırıklar ve kemik deformitelerine ait bulgular saptanabilir. Bazı olgulara polihidramnion da eşlik eder (89).

Dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) de mineral dansitesindeki azalma önemli bir bulgudur. DEXA, tanı kadar tedaviye yanıt ve takip için de önemli bir tetkiktir.

Biyopsi materyalinin patolojik incelemesinde ince korteksler, azalan trabeküler kemik hacmi, daha küçük apatit kristaller, kusurlu mikrovasküler düzenlenme ve hatalı sentezlenmiş kollajen fibriller tanı için önemlidir.

Deri fibroblast kültürü ya da kandan mutasyon analizi kesin tanı koydurucudur.

Ayırıcı tanıda benzer klinik bulguları ile hipofosfatazya, rikets, juvenil osteoporoz, osteomalazi, Cole-Carpenter sendromu ve tekrarlayan kırıklar, radyografide eski kırık bulguları ile çocuk istismarından ayırt edilmesi bir diğer önemli noktadır (90,91,92).

2.2.5. Tedavi

Medikal tedavi, ortopedik cerrahi yaklaşımlar ve fizyoterapi temel tedavi alt başlıklarıdır. Hastalığın tam bir kürü olmamasına karşın uygun tedaviler ile yaşam kalitesi yükseltilerek, yıllık kırık sayıları ciddi oranda düşürülebilir. Medikal tedavide ilk akla gelen ve en etkin kabul edilen, temel mekanizması osteoklast aktivitesini azaltmak olan, IV pamidronat (bifosfonat) tedavisidir (93). Ortopedik yaklaşımlardan en sık kullanılanı intramedüller çivilerdir. Uzun kemik

merkezlerindeki kemik iliği kanallarına yerleştirilen bu aparatlar ile kırık sayısında ve deformitede azalma amaçlanır (94). Fizik tedavide ise öncelikli hedef immobilizasyona bağlı kas atrofisinin önüne geçerek kemik ve eklem dokusunu kaslar ile desteklemektir.

2.3. Mikro RNA'lar

Son yirmi yıla kadar klasik bilgilerimiz santral dogma olarak tanımlanan DNA'da depolanmış materyalin haberci RNA'ya (mRNA) transkribe olması ve sonrasında da taşıyıcı RNA (tRNA) vasıtasıyla ribozomlara taşınarak gerekli proteinlerin sentezlenmesi yönünde idi. Fakat yapılan genom ve işlevsel analiz çalışmaları hücrede var olan fakat protein kodlamayan RNA (non-coding RNA-ncRNA) moleküllerinin de olduğunu göstermiştir (3). ncRNA'lar da kendi içinde mikroRNA (miRNA), small interfering RNA (siRNA), interacting RNA'lar (piRNA) ve long non-coding RNA (lncRNA) gibi sınıflara ayrılır. Yapılan çalışmalar genom üzerinde protein kodlamayan, transkripsiyonu kontrol eden (promoter) ve arttırıcı (enhancer) bölgeler ile gen ekspresyonunu düzenlemekle görevli ncRNA'ların hastalıklar ile ilişkili olduğu ve genetik farklılıkları sağladığını göstermiştir (4,5).

miRNA terimi ilk defa 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından *Caenorhabditis elegans*'ta lineage-deficient-4 (lin-4) ve lethal-7 (lrt-7) isimli miRNA'ların tespit edilmesi ile gündeme gelmiştir (95). miRNA'lar transkripsiyon ve post transkripsiyon seviyesinde negatif gen düzenleyici olarak görev yapan; hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, metabolizma, homeostaz.. vb gibi birçok fizyolojik olayda etkin oldukları bilindiği gibi, birçok hastalığın fizyopatolojisinde de rolleri olan mikromoleküllerdir (6). miRNA'ların memeli mRNA'larının %50'si üzerinde etkin olduğu saptanmıştır. İnsan genomunun %3'ünü oluşturan miRNA'lar protein kodlayan genlerin %30'unun düzenlenmesinde rol oynar. Tek bir mRNA birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilirken tek bir miRNA da yüzlerce mRNA'yı hedefleyebilir (96,97). miRNA'lar kendilerin kodlayan gen lokusundaki bir mutasyon sonucu görevli oldukları protein sentez yolağını etkiledikleri için çeşitli hastalıkların ortaya

çıkmasına neden olabilirler. Bu nedenle günümüzde bazı hastalıkların erken tanısında miRNA biyobelirteçleri tanı amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (98).

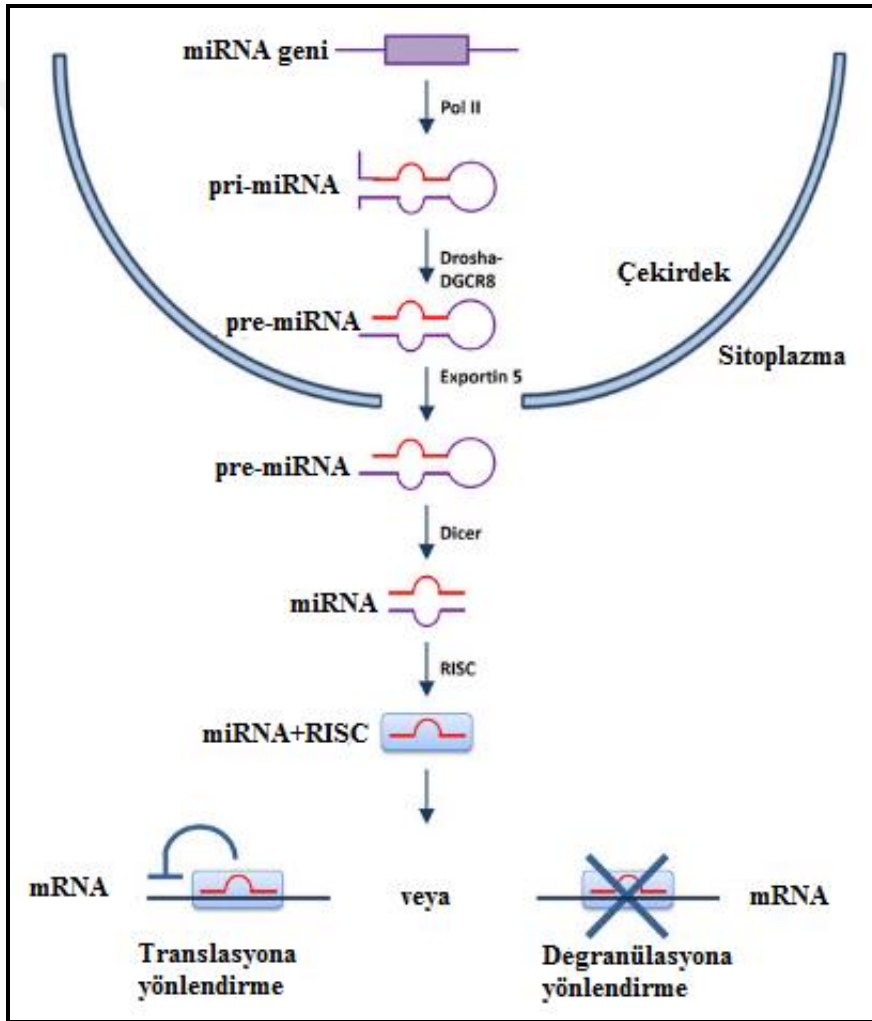
2.3.1. miRNA biyogenezi

miRNA biyosentezi birbirini izleyen 3 basamakta gerçekleşir. miRNA'lar, DNA'dan transkribe edilen ama proteine translasyonu yapılmayan RNA genleri tarafından kodlanır. Çoğu miRNA genleri intergenik bölgelerde, %40 intronlarda, nadiren ekzonlarda yer alır. Hücre çekirdeğinde RNA Polimeraz 2 (Pol II) enzimi aracılığı ile binlerce baz uzunluğunda primer miRNA (pri-miRNA) sentezlenir. İkinci aşamada nükleus içinde pri miRNA'lar yaklaşık 70 nükleotidlik prekürsör miRNA'ya (pre-miRNA) dönüştürülür. Üçüncü aşamada ise sitoplazma içinde pre-miRNA'lar 21-25 nükleotidlik matür miRNA'ya çevrilir (97,98). Pri-miRNA'lar, RNA polimeraz II enzimi tarafından DNA'dan sentezlenir ve yaklaşık 700 nükleotid uzunluğundadır. Çift zincirli pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü DGCR8 (Di-George sendromu kritik bölge geni-8) tarafından saç tokasına benzeyen pre-miRNA'ya dönüştürülür. Drosha ve kofaktörü DGCR8'in oluşturduğu komplekse mikro işlemci kompleks ismi verilmiştir (97,98,99). pri-miRNA, nükleus içinde RNAaz-III endonükleaz kompleksi (Drosha ve kofaktör Pasha) ile kuyruk parçaları atılarak hairpin şekilli yaklaşık 70 nükleotidlik pre miRNA'ya dönüşürler.

Transaktif edici cevabı oluşturan RNA bağlanan protein (TRBP), argonaute ve Dicer proteinleri bir araya gelerek trimerik bir ribonükleoprotein kompleksi olan RISC (RNA tarafından uyarılmış susturma kompleksi)'ni oluşturur. Dicer tarafından pre miRNA'nın ilgili kısımları kesildikten sonra RISC kompleksine oluşan miRNA-miRNA dupleksinden sadece biri katılır. Katılacak olan miRNA ipliği kılavuz iplik olarak isimlendirilir ve RISC ile hedef mRNA'nın susturulması amacı ile etkileşime girer. miRNA aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra Argonaute proteini yardımı ile hedef mRNA'nın yıkımı ya da susturulmasını sağlar (100).

miRNA'lar hedef mRNA'ya seed adı verilen 6-8 nükleotidden oluşan bir bölgeye bağlanarak etkileşir. Hedef mRNA ve miRNA'nın seed dizisi 5' ucunda yer alana 2. - 8. nükleotidleri arasında eşleşme olması hedefin belirlenmesi

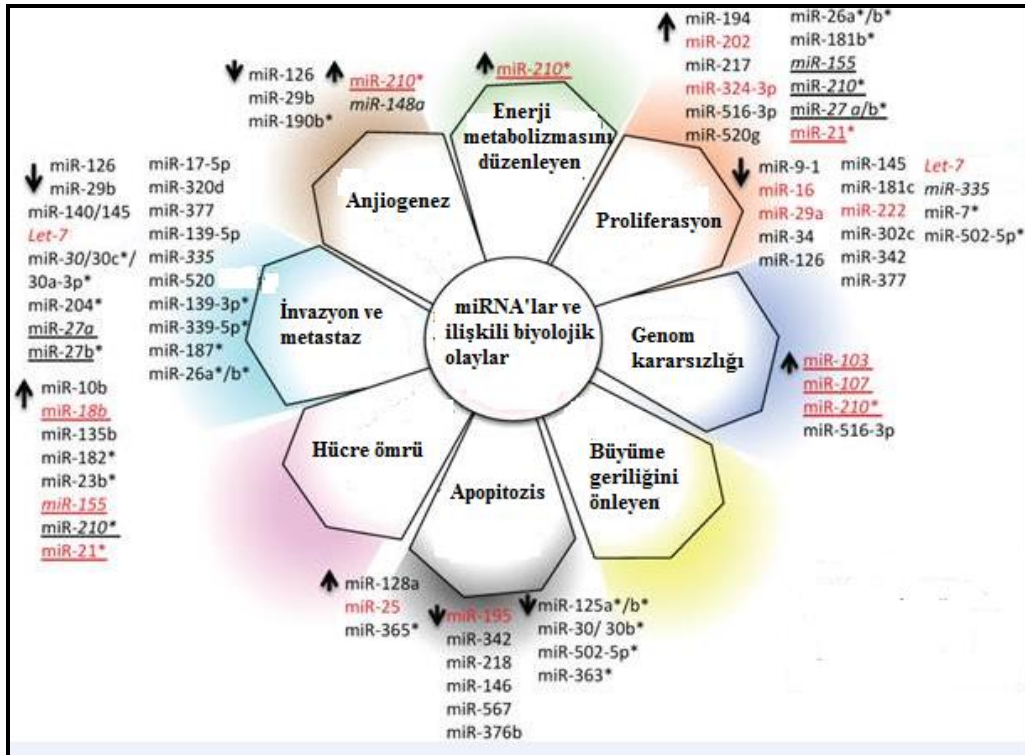
açısından önemlidir. miRNA'lar hedef mRNA'ya kısmi ya da tam eşleşerek bağlanırlar. Bu eşleşmenin düzeyi hedefin ne kadar ve nasıl baskılanacağını belirler (101). miRNA'lar post transkripsiyonel düzenlemeyi genellikle translasyonu baskılayarak veya mRNA'nın yıkımını sağlayarak gerçekleştirir. Eşleşmenin seviyesi yüksek ise RISC hedef mRNA'yı yıkar. RISC içindeki kılavuz iplikle mRNA'nın poliA ve 5'cap kısımlarını kopararak kararlılığını azaltır ve hücrede bulunan enzimler tarafından parçalanmasını sağlar. Eşleşmenin az olduğu durumlarda ise yıkım olmaz translasyon azalır (102,103).



Şekil 2.6. miRNA biogenezi (104).

2.3.2. miRNA işlevleri ve ilişkili hastalıklar

miRNA'ların aynı yolağı birden fazla noktada etkileyerek kontrol etme kabiliyetleri hematopoetik sistem üzerindeki etkilerinde net bir şekilde gözlemlenebilir. Bu kabiliyetleri nedeni ile ekspresyonlarındaki küçük değişikliklerin büyük biyolojik sonuçlar doğurabileceği tahmin edilebilir bir sonuçtur. Hematopoetik sistem üzerine direkt etkili olabildikleri gibi transkripsiyon faktörleri üzerinden de etki edebilirler (105). Eritropoez ve granülopoez üzerinde etkili olan NFI-A geni miR-223 tarafından modüle edilir. miR-223 tarafından baskılanan NFI-A eritropoetik transkripsiyonel programları engellerken granülopoezi harekete geçirir (106,107). NFI-A genini etkileyen bir diğer miRNA da miR-424'dür. miR-424'ün aşırı ekspresyonu NFI-A genini downregüle ederek monositik farklılaşmayı teşvik eder (107). Bunun yanı sıra monositik farklılaşma *RUNX1* i ve miR-17-92 ile de ilgilidir. Bu yolaktaki bir aksama maligniteler ile sonuçlanmaktadır (108). Jia ve ark.'nın fare modeli üzerinde yaptıkları bir çalışmada miR-17-92 ekspresyonunun baskılanmasının, kronik miyeloid lösem gibi *BCR-ABL* geni ile ilişkilendirilen lösemik hücrelerin oluşumunu engellediği gösterilmiş (109).



Şekil 2.7. miRNA'lar ve ilişkili biyolojik olaylar (110).

miRNA'ların bir diğer fonksiyonları ise hücre proliferasyonu, differansiasyonu ve apoptozisi düzenlemektir. Yong Li ve ark. yaptıkları bir çalışmada farklı kanserler ile sıkça ismi anılan ve temel fonksiyonu hücre proliferasyonunu inhibe etmek ve apoptozisi teşvik etmek olan miR-195 ile özefagus kanseri arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. mTOR / p70s6k sinyal yolu üzerinden kanser hücrelerinin hayatta kalması ve çoğalmasını sağlayan *HMGA2* geninin miR-195 seviyesini belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir (111).

Organogenezis, mikroRNA'ların etkilediği bir diğer biyolojik süreçtir. Organogenezis epitelyal ve mezenkimal kök hücrelerin etkileşimi temeline dayanır. Büyüme faktörleri ve ekstrasellüler matriks elemanları tarafından düzenlenir. Hayashi ve ark. fetal fare submandibular tükürük bezi dokusunda mezenkimal hücreler ile epitelyal hücreler arasında mezenkime spesifik olgun mikroRNA yüklü eksozomların mobil genetik sinyaller verdiğini tespit etmişlerdir. Bu sinyal yolu ile miR-133b yüklü veziküllerin iki doku arasında organizasyonu sağladığı ileri sürülmüştür (112).

miRNA'ların nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve metabolik hastalıklar gibi pek çok sistemik hastalıkta da rol aldığını gösteren yayınlar mevcuttur (110).

miRNA ve hastalıklarla ilişkileri ile ilgili çalışmalarda en geniş yeri ise kanser araştırmaları almaktadır. Meme kanseri (miR-216a-9-330), lenfoma (miR-30a-182), endometrium kanseri (miR-145), akciğer kanseri (let7), kolorektal karsinom (miR-139-5p), prostat kanseri (miR-17-19, let7) etiyopatogenezi miRNA'lar ile ilişkilendirilen kanserlerden bazılarıdır. Günümüzde olası gen terapileri üzerinde çalışılmaktadır (113).

2.3.3. Antagomirler

Oligonükleotid sınıfından biyomoleküller olan antagomirler anti-mir'ler veya blokmirler olarak da adlandırılmaktadır. Moleküllerin mRNA üzerinde istenen bölgeye bağlanmasını önleyen sentetik olarak geliştirilmiş moleküllerdir (114). Antagomirin miRNA'yi inhibe ettiği sürece antagomirizasyon denir. Mekanizması henüz aydınlatılamamış olsa da miRNA'lara irreversible bağlanarak inhibe ettiği düşünülür. Blockmirler, mikroRNA'ların bağlanma yeri

olan mRNA dizisini tamamlayan bir diziye sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Bağlandıktan sonra, antagomirler mikro RNA'nın aynı bölgeye bağlanmasını bloke ederek, sessizleştirme kompleksi (RISC) yoluyla hedef mRNA'nın bozulmasını önler. Antagomirler, mikroRNA temelli gen regülasyonunun modülasyonunu mükemmel özgünlükle sağlar. Tipik olarak hedef mRNA'sının agonistidir, yani hedef mRNA tarafından kodlanan proteinin sentezini arttırırlar (115).

Young ve ark. fare modeli üzerinde yaptıkları çalışmalarında blokmiR CD5-2'nin miR-27 ve kadherin arasındaki etkileşimi inhibe ederek iskemik hasardan sonra iyileşme sağladığını göstermişlerdir (116). Aynı blokmiRin pankreas kanserinin fare modellerinde immunoterapi ile kombine kullanıldığında T hücre infiltrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (117).

Farelerde mikroRNA-103/107 inhibisyonunun, artan insülin duyarlılığına yol açtığını gösteren çalışmalar vardır (116,118). Caveolin-1 eksik farelerde ise mikroRNA-103/107 inhibisyonunun insülin duyarlılığı ve sinyal vermede herhangi bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Bu da mikro103/107'nin Caveolin-1'i hedefleyerek insülin duyarlılığını etkilediğini göstermektedir (119).

2.3.4. Mir-26a

MiR-26 ailesi miR-26a-1, miR-26a-2 ve miR-26b'den oluşur ve sırasıyla 3., 12. ve 2. kromozomlardan kodlanırlar. Pre-miR-26 intranükleer ve intrastoplazmik bir dizi işleminden sonra matür miR-26'ya dönüşür. Sonrasında kodlandıkları gen bölgesine göre miR-26a-1, miR-26a-2 ve miR-26b'ye dönüşürler. miR-26a-1, miR-26a-2 ile 2 nükleotid istisna olmak üzere aynı diziye sahiptir (120).

miR-26a inhibisyonu düz kas hücrelerinin farklılaşmasını hızlandırıp, çoğalmasını inhibe ederken aynı zamanda, apoptosisi teşvik eder. miR-26a'nın inhibisyonu, *SMAD-1* ve *SMAD-4*'ün gen ekspresyonunu arttırırken, aşırı ekspresyonu halinde *SMAD-1*'i inhibe eder (121).

miR-26a aynı zamanda akciğer kanserinin moleküler mekanizmasında anti-onkojen olarak önemli rol oynamaktadır. miR-26a ifadesi normal dokulara kıyasla akciğer kanseri dokularında azdır. Akciğer kanseri hücre dizisindeki miR-26a'nın

aşırı ekspresyonunun, hücre proliferasyonunu dramatik olarak inhibe ettiği, G1 / S faz geçişini engellediği, apoptozu indükleyerek ve hücre metastazını inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (122).

miR-26a replasmanı, metastatik melanom için potansiyel bir tedavi stratejisi olarak önerilir. miR-26a, melanom hücrelerinde birincil melanositlere kıyasla azalmıştır. miR-26a'nın melanom hücre serileri üzerinde apoptotik etkisinin olduğu bu etkisini de *BAG4/ SODD* (Silencer of Death Domains Protein) üzerinden yaptığı düşünülmektedir (123).

miR-26a'nın kemik doku üzerindeki etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı olmakla birlikte osteoporotik farelerden üretilen mezenkimal kök hücrelerin üzerinde invitro koşullarda kemik rejenerasyonunu hızlandırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (9).

miR-26a'nın mezenkimal kök hücrelerin osteogenik farklılaşmasında düzenleyici rolü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur: Osteogenik farklılaşmanın birincil düzenleyici transkripsiyon faktörleri *RUNX2* ve *OSX* proteinleridir ve bu proteinlerin *TGFbeta/BMP* ve *WNT* sinyal yollarıyla uyarılması osteoblastik farklılaşmayı başlatmaktadır. *TGFbeta/BMP* sinyal yolağının aktive ettiği *SMAD1* transkripsiyon faktörünün miR-26a tarafından baskılandığı ancak miR-26a'nın osteogenik farklılaşmayı inhibe eden çeşitli proteinlerin ifadesini de azalttığı bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda ise, adipoz doku veya kemik iliği gibi, farklı kaynaklardan elde edilmiş mezenkimal kök hücrelerde, miR-26a'nın osteogenik farklılaşmayı baskılayabileceği veya uyarılabileceği öne sürülmüştür (124,125) Bunlara ek olarak, *WNT* sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olan *GSK3beta* enziminin miR-26a'nın hedefi olduğu; miR-26a uyarımı ile *WNT*-betaCatenin aracılı osteogenik aktivitenin desteklendiği bildirilmiştir (126,127). Bu verilere dayanarak, miR-26a/polimer bileşiklerinin kullanıldığı bir in vivo çalışmada farelerde osteoblastik aktivitenin uyarıldığı gösterilmiştir.

Osteoblastik uyarım yanında miR-26'nın osteoklastik aktivite üzerinde de düzenleyici rolü olduğu bildirilmektedir. Olgun osteoklastların farklılaşması sürecinde hücre-hücre füzyonunda rol alan *CTGF*'nin miR-26a tarafından baskılandığı ve böylece *RANKL*-aracılı osteoklastogenezin engellendiği gösterilmiştir. Ancak *RANKL*-aracılı osteoklast farklılaşmasının geç dönemlerinde, miR-26a ekspresyonunun arttığı da gözlenmiştir. Dolayısıyla *RANKL* ve miR-26a arasında bir negatif feed-back etkileşim olduğu düşünülmektedir (128).

Osteosarkoma patogeneğinde de miR-26a'nın düzenleyici role sahip olduğu gözlenmiştir. Osteosarkoma hücrelerinin çoğalma ve metastaz süreçlerinde miR-26a'nın baskılandığı, çeşitli miRNA ve lnc-RNA moleküllerinin de yer aldığı karmaşık bir etkileşimin söz konusu olduğu belirlenmiştir. Kanser patogeneğindeki rolü açısından incelendiğinde, miR-26a bazı kanserlerde tümör baskılayıcı olarak gözlenirken diğer kanserlerde onkogen olarak saptanabilmektedir (129,130).

Literatürdeki veriler göstermektedir ki miR-26a transkriptinin etkileri hücre tipine, gelişme basamağına ve zamana bağlı olarak değişmektedir. Kemik gelişiminde ve yapısının düzenlenmesinde miR-26a'nın düzenleyici rolü bilinmektedir ancak etki mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamamıştır.

2.3.5. miR- 29a

Memelilerde iki transkripsiyonel üniteye transkribe edilen dört miR-29 prekürsörü kodlanmıştır. miR-29a ve miR-29b-1, kromozom 7'den kodlanmamış bir kopyanın intronundan transkribe edilir. miR-29b-2 ve miR-29c kromozom 1'den birlikte transkribe edilir. Bu öncüllerden işlenen üç ana olgun miRNA, miR-29a, miR-29b ve miR-29c olarak bilinir (131).

İnsanlarda miR-29 ailesinde miR-29a, miR-29b ve miR-29c olarak üç olgun miRNA bulunmaktadır. miR-29a / miR-29b-1 genleri 7 no'lu kromozomda yer alırken miR-29b-2 / miR-29c genleri 1 no'lu kromozomda yer almaktadır (131). miR-29a geni transkripsiyonunda *MYC*, *NFkB*, *CEBP* ve *TCF/LEF* gibi transkripsiyon faktörü proteinlerin yer aldığı ayrıca *Wnt* sinyal yolağının da rolü olduğu bildirilmiştir.

Miyeloid lösemi hücre farklılaşma proteini (MCL1), birçok T hücreli lösemide bozukluğu tespit edilen TCL1A (T-hücreli lösemi / lenfoma) onkogeni, akciğer kanserinde sıklıkla yüksek bulunan DNA metil transferazları DNMT3A ve DNMT3B ile ilişkisi tespit edilmiş ise de tam olarak mekanizması aydınlatılamamıştır (132,133,134).

miR-29a'nın Runx2 asetilasyonu yoluyla glukokortikoid kullanımı ile tetiklenen kemik kaybı ve kemik iliği yağlanmasını hafiflettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (135).

miR-29 ailesinin hücresel etkileri arasında başlıca ekstrasellüler matriks düzenlenmesi, hücre çoğalması ve apoptozis yer almaktadır. Ekstrasellüler matriks yapısında bulunan çok sayıda proteinin ekspresyonu miR-29 ailesi tarafından düzenlenmektedir. Özellikle kollajen proteini alt tiplerinin ekspresyonu üzerinde, var olan kollajen genlerinin yarıdan fazlasında, bu ailenin düzenleyici rolü bulunmaktadır. Çeşitli dokularda gözlenebilen fibrozis süreçlerinde miR-29 ailesinin belirgin etkileri olduğu ve özellikle profibrotik TGFbeta sinyallerinin miR-29'ları baskılayarak fibrozisi düzenlediği öne sürülmüştür (136).

miR-29 tarafından miktarı düzenlenen matriks proteinlerinden birisi de osteonektindir. Kollajenden sonra kemik yapısında en yüksek oranda bulunan matriks proteini olan osteonektin, miR-29a ve miR-29c tarafından post-transkripsiyonel olarak baskılanmaktadır. Osteoblast farklılaşmasının erken dönemlerinde osteonektin ekspresyonunun yüksek olduğu, ancak farklılaşmanın ilerleyen dönemlerinde osteonektin ekspresyonunun azaldığı ve bu aşamada miR-29a ve -29c ekspresyonunun artış gösterdiği saptanmıştır (137).

Osteoblastik gelişimi inceleyen çalışmalarda WNT sinyallerinin osteoblastlardaki miR-29a ve miR-29c ifadesini artırdığı gözlenmiştir. Primer osteoblastlarda ve mezenkimal kök hücrelerde, miR-29a'nın WNT yolağı inhibitörü olan çeşitli proteinleri baskıladığı ve böylece WNT sinyallerini artırdığı belirlenmiştir. Sonuç olarak miR-29 ve WNT arasındaki karşılıklı etkileşimin pozitif feedback özellikte olduğu anlaşılmıştır (138).

Literatürdeki veriler miR-29'un osteoblastik farklılaşmayı direkt WNT yolağı üzerindeki etkileri yanında HDAC4'ü baskılayarak da etkileyebildiğini ortaya koymaktadır. HDAC4 ile ilişkili epigenetik değişikliklerin, miR-29a

etkisiyle azaltılması sonucunda, *RUNX2* ve osteocalcin gibi osteoblast farklılaşmasını sürdüren genlerin ifadesinin arttığı belirlenmiştir (139).

2.3.6. miR-133a

İnsan genomunda bilinen üç tane miR-133 geni vardır. miR-133a-1, miR-133a-2 ve miR-133b sırasıyla 18, 20 ve 6 kromozomlarından transkribe edilir (140).

Olgun miR-133a ve miR-133b transkriptleri başlıca kas dokularında eksprese edilmektedir. miR-133a mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması sürecinde miyoblast serisi yönünde farklılaşmayı uyarırken; osteoblast-kondroblast serisine yönelik farklılaşmayı baskılayıcı role sahiptir. Miyoblast farklılaşmasını düzenleyen *SRF* ve *MEF2* transkripsiyon faktörleri, yapısal miyosit proteinlerinin ekspresyonlarını artırır ve aynı zamanda negatif geri-besleme mekanizmasını uyarmak için miR-133a transkripsiyonunu da uyarırlar, çünkü *SRF* transkripti, miR-133a'nın hedefi olan transkriptler arasında yer almaktadır (7).

Mezenkimal kök hücrelerden osteoblast farklılaşması sürecinde ise miR-133a'nın baskılanması gereklidir ki bu baskılanmada çeşitli osteogenik transkripsiyon faktörlerinin karmaşık etkileşimi söz konusudur. *RUNX2* transkripsiyon faktör proteini, osteoblastlarda farklılaşmayı düzenleyici önemli proteinlerden birisi olarak, miR-133a'nın hedefidir ancak aynı zamanda *RUNX2* tarafından ekspresyonu uyarılan *OSX* proteini miR-133a'nın ekspresyonunu baskılayıcı fonksiyona sahiptir. Dolayısıyla osteogenik farklılaşmanın devam edebilmesi için *RUNX2-OSX-miR-133a* arasında sürekli bir etkileşim gerçekleşmektedir (8).

miR-133a bronş duvarı düz kas hücrelerinde RhoA ekspresyonunu negatif olarak regüle eder, miR-133a düzeylerinde azalma RhoA'nın overekspresyonuna, bu da bronş duvarında kasılma ve aşırı duyarlılığa neden olur (141).

Tam olarak mekanizması aydınlatılamamış olsa da, diyabetik kardiyomiyopatisi olan hastaların serum miR-133a düzeyleri düşük tespit edilmiştir (142).

Castario ve ark.'nın fare modeli üzerinde yaptıkları bir çalışmada miR-133a lokal inhibisyonu ile kök hücrelerin osteogenik potansiyelinin arttırılabileceği hipotezini öne sürmüşlerdir. miR-133a spesifik antagomir ile inhibe edildiğinde temel etki mekanizması olan *RUNX1* ekspresyonu üzerindeki negatif düzenleyici etkinin ortadan kalktığı ve bunun kök hücrelerin osteogenik potansiyellerini arttırdığı gösterilmiştir. Çalışmada bunun umut vaad eden bir terapötik yol olabileceği ileri sürülmüştür (143).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olguların Seçimi ve Örnek Eldesi

Hasta grubumuz Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Endokrinoloji ve Çocuk Genetik Polikliniğinde muayene edilen ve Oİ tanısı ile takip edilen 0-18 yaş grubu hastalar, kontrol grubumuz ise Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlam ve Genel Çocuk Polikliniğine başvuran hiçbir hastalığı olmayan 0-18 yaş arası sağlıklı çocuklardan oluşturuldu.

Sağlıklı çocuklardan oluşturulan gruptaki her olgu poliklinik hekimi tarafından muayene edilerek çalışmaya uygunluğu teyid edildi. Sağlıklı çocuklardan plazma örneği rutin kontrol için kan örneği alınması gereken zamanda alınarak ayrıldı. Her iki gruptaki olguların ebeveynleri çalışma içeriği konusunda bilgilendirildi ve yazılı onam alındı. Bu çalışma için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Onayı alındı (Karar tarih ve sayısı; 26/02/2016 -70904504 / 126) (Ek 1).

Çalışmaya Alınma Kriterleri

- Tanı almış Oİ hastası olması
- Ek bir hastalığının olmaması
- Düzenli ilaç kullanım öyküsünün olmaması (Oİ tedavisi dışında)
- Çalışmaya katılmayı kabul etmesi

Çalışmadan Dışlanma Kriterleri

- Çalışmaya alınma kriterlerine uymaması
- Çalışmaya katılmayı kabul etmemesi
- Referans miRNA seviyesinin ölçülemeyecek seviyede düşük olması

Hastaların dosyaları retrospektif taranarak ve yeni tanı alanların prospektif değerlendirmeleri yapılarak klinik ve laboratuvar bulguları, olgular ve/veya aileleri ile görüşülerek demografik verileri kaydedildi. Olgular ve/veya ailelerinin onayı ile EDTA'lı tüpe 5 cc periferik venöz kan örneği alındı. Kan örneklerinden en geç 2 saat içinde santrifügasyon ile plazma elde edildi. Plazma örnekleri QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) ile karıştırılıp -20°C'de miRNA izolasyonu basamağına kadar saklandı.

3.2. Plazma miRNA İzolasyonu

Olgulara ait plazma örneklerinden miRNA izolasyonu için miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, 217184) kullanıldı ve çalışma basamakları önerildiği şekilde uygulandı:

- 1- 200 µl plazma örneği üzerine 1 ml QIAzol Lysis Reagent eklendi, karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika homojenize olması için inkübe edildi. Karışım miRNA izolasyonunun yapılacağı güne kadar -20°C’de saklandı ve izolasyon öncesi oda sıcaklığında bekletilerek çözüldü.
- 2- Örnekler üzerine 200 µl kloroform eklendi, hızla karıştırıldı ve soğutmalı santrifüjde 10 dk 13.000 g’de santrifüj edilerek RNA fazı elde edildi.
- 3- RNA fazı yeni bir tüpe alınıp üzerine eşit hacimde isopropanol eklendi, karıştırıldı ve RNA izolasyon kolonuna yüklenip 13.000 g’de 30 sn santrifüj edildi.
- 4- Wash Buffer I ve II ile iki defa kolon yıkaması yapıldı ve son olarak kolondaki etanolün uzaklaştırılması için 13.000 g 1 dk santrifüj edildi.
- 5- Kolonlardan 50 µl Elution Buffer ile RNA elüsyonu yapıldı ve elde edilen RNA -80°C’de saklandı.

3.3. cDNA Hazırlanması

Plazma miRNA örneklerinden cDNA sentezi için miScript II Kit (Qiagen, 218161) kullanıldı.

Reaksiyon karışımı kit manuelinde belirtildiği üzere aşağıdaki gibi hazırlandı;

5x HiSpect Reaction Buffer	4 µl
10x Nucleic Mix	2 µl
Reverse Transcriptase	2 µl
RNA	7 µl
DW	5 µl
Toplam	20 µl

cDNA sentezi için aşağıdaki sıcaklık programı kullanıldı;

37°C 60 dk

95°C 5 dk

4°C ∞

Hazırlanan cDNA örnekleri -20°C’de saklandı.

3.4. Preamplifikasyon

Plazma miRNA örneklerinden hazırlanan cDNA kalıbı miScript PreAmp PCR Kit (Qiagen, 331452) kullanılarak hedef miRNA molekülleri açısından zenginleştirildi. Reaksiyon karışımı kit manuelinde belirtildiği üzere aşağıdaki gibi hazırlandı;

5x PreAmp Buffer	5 µl
Taq Polimeraz	2 µl
PreAmp Primer Mix	5 µl
Universal Primer	1 µl
cDNA (1/5dil)	5 µl
DW	7 µl
Toplam	25 µl

Preamplifikasyon PCR için aşağıdaki sıcaklık programı kullanıldı;

95°C 15 dk

12 döngü;

94°C 30 sn

60°C 3 dk

Hazırlanan preamplifikasyon örnekleri -20°C’de saklandı.

3.5. Kantitatif PCR

Plazma miRNA örneklerinden hazırlanan cDNA kalıbının zenginleştirilmesi sonrasında hedef miRNA moleküllerinin kantitasyonu için gerçek zamanlı kantitatif PCR çalışması yapıldı. Hedef miRNA moleküllerine özgü primer ve probler için miScript Primer Assay (Qiagen) kullanıldı.

miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, 218075) kullanılarak her bir hedef miRNA molekülü için ayrı PCR karışımı kullanıldı. Reaksiyon karışımı kit manuelinde belirtildiği üzere aşağıdaki gibi hazırlandı;

2x SYBR Green Taq Polimeraz mix	10 µl
Hedef miRNA Primer Mix	2 µl
Universal Primer	2 µl
preAMP kalıp (1/20 dil)	2 µl
DW	4 µl
Toplam	20 µl

Hazırlanan PCR karışımı aşağıdaki sıcaklık profili kullanmak üzere kantitatif gerçek zamanlı PCR cihazına (Light Cycler 480, Roche) yüklendi.

95°C	15 dk
45 döngü;	
94°C	15 sn
55°C	30 sn
70°C	30 sn + floresans ölçüm
Erime Eğrisi;	
95°C	10 sn
50°C	30 sn
50°C - 94°C	arası sürekli floresans ölçüm

PCR işlemi sonrası örneklerle ait döngü eşik değerlerinin (Cycle Threshold, CT) analizi için Light Cycler 480 programında Second Derivative Maximum metodu kullanıldı.

3.6. miRNA İfadesi Değerlerinin Analizi

miRNA ifadesi analizinde referans miRNA olarak miR-16-5p kullanıldı. Hedef miR-16-5p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-133a-3p moleküllerinin kantitatif PCR ile belirlenen CT değerleri REST[®] (Pfaffl MW ve ark. Nuc Acid Res, 2002; 30(9): E36) programı kullanılarak normalize edildi ve her bir miRNA'nın ifade değeri hesaplandı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistikler frekans, yüzde, ortalama, standart sapma, medyan, minimum, maksimum değerleri ile sunulmuştur. Normallik varsayımı Shapiro Wilk Testi ile kontrol edilmiştir. İki grubun sayısal verileri arasındaki farkın analizinde veriler normal dağılıma uyduğu durumda Independent Samples t test (Bağımsız İki Örneklem t Testi), uymadığı durumda Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. Sayısal veriler arasındaki ilişkiler non-parametrik Spearman Korelasyon Testi, parametrik Pearson Korelasyon Testi ile değerlendirilmiştir. Analizler SPSS 23.0 programı ile yapılmıştır. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda Oİ tanılı hasta grubu (n=26) ile sağlıklı çocuklardan oluşan kontrol grubu (n=16) arasında istatistiksel olarak anlamlı yaş farkı bulunmadı. Hasta grubun yaş ortalaması $8,3 \pm 1,1$ iken, kontrol grubunun yaş ortalaması $6,5 \pm 1,3$ olarak bulundu. Hastaların demografik ve klinik bulguları Tablo 4.1’de özetlenmiştir.

Hasta grubumuzu oluşturan 26 olgunun %26,9’u (n=7) kız, %73,1’i (n=19) erkek idi. Hastaların %50’sinin anne ve babasında akrabalık öyküsü var iken, %45,5’inde ailede en az bir kişide Oİ öyküsü olduğu saptandı (Tablo 4.1).

Olguların %34,6’sı (n=9) prenatal, %23’ü (n=6) 1 yaş altında, %30,7’si (n=8) 2-5 yaş arasında ve %11,5’i (n=3) 6 yaş ve sonrasında tanı aldı. Tanı koyulan hastaların %88,5’inin ilk başvuru şikayeti kırık iken, %11,5’i kırıksız başvurmuş ve diğer (kemik deformitesi, gelişme geriliği) klinik bulguları ile tanı almıştır.

Tedavi başlanan hastaların %7,6’sında izlemde kırık gözlenmez iken, %92,4’ünde sıklığı azalmak ile birlikte kırık oluşmaya devam etmiştir. Tüm hastaların kırık lokalizasyonu sınıflandırıldığında %65,3’ünde (n=17) ekstremitte kırığı, %11,5’inde (n=3) ekstremitte-kosta, %3,8’inde (n=1) ekstremitte-skapula kırığı, %7,2’sinde ekstremitte-skapula-kosta kırığı, %3,8’inde (n=1) parmaklarda kırık gözlendi.

Hastalarımızın %30,7’sinde (n=8) bağımsız hareket yetisi var iken, %69,3’ü (n=18) yürümek için desteğe ihtiyaç duyuyor ya da yürüyemiyor, %7,6’sında inguinal herni, %7,6’sında umbilikal herni mevcuttu. %80,8’inde (n=21) ekstremitte eğriliği saptanırken, %7,6’sının entelektüel düzeyinde gerilik olduğu tespit edildi.

Hastalar sklera renklerine göre gruplandırıldığında %54’ünde (n=14) mavi, %30,7’sinde (n=8) gri, %15,3’ünde (n=4) beyaz sklera olduğu saptandı.

Olguların %7,6’sında işitme kaybı, %65,4’ünde dentinogenesis imperfecta, %86,4’ünde boy kısalığı ve %36,4’ünde fontanelin yaşa göre geniş olup, eşlik eden kalvaryal kemik deformitesi olduğu saptandı.

Tablo 4.1. Demografik ve klinik bulgular.

		n	%
Cinsiyet	Erkek	19	73,1
	Kız	7	26,9
Yaş	10 yaş altı	19	73
	10 – 20 yaş	7	27
Başlangıç Yaşı	Prenatal	9	34,6
	0 - 1 yaş	5	19,2
	2- 5 yaş	9	34,6
	6 yaş ve üstü	3	11,5
Akrabalık Öyküsü	Yok	12	46,1
	1. Derece	9	34,6
	2. Derece	2	7,6
	Aynı köy	3	11,5
Aile Öyküsü	Yok	12	38,7
	Var	14	61,3
Başvuru Kırık Sayısı	1 Kırık	7	26,9
	2 Kırık	2	7,6
	3 Kırık	2	7,6
	4 Kırık	1	3,8
	5 Kırık	4	15,2
	Çoklu Kırık	7	26,9
	Kırık Yok	3	11,5
Tedavi Sonrası Yıllık Kırık Sayısı	1 Kırık	4	15,3
	2 Kırık	5	19,2
	3 Kırık	4	15,3
	4 Kırık	3	11,5
	5 Kırık	1	3,8
	Çoklu Kırık	7	26,9
	Kırık Yok	2	7,6
Kırık Yeri	Ekstremit	17	65,3
	Ekstremit, Kosta	3	11,5
	Ekstremit, Skapula	1	3,8
	Ekstremit, Kosta, Skapula	2	7,2
	Parmaklar	1	3,8
	Yok	2	7,2

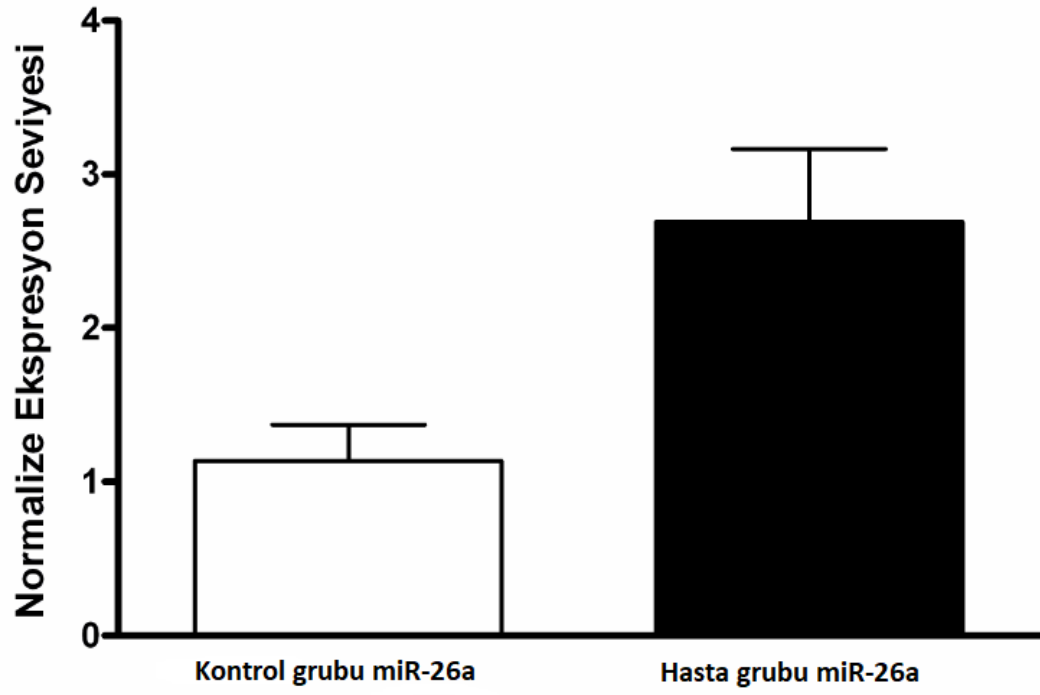
Tablo 4.1 (Devam). Demografik ve klinik bulgular.

		%
Ekstremitte Eğriliği	Var	80,8
	Yok	19,2
Bağımsız Hareket Yetisi	Var	53,8
	Yok	46,2
Sklera Rengi	Mavi	54
	Gri	30,7
	Beyaz	15,3
İşitme Kaybı	Var	7,6
	Yok	92,4
Dentinogenezis Imperfecta	Var	61,5
	Yok	38,5
Entelektüel Yeterlilik	Var	7,6
	Yok	92,4
Fıtık	Yok	84,8
	İnguinal Herni	7,6
	Umbilikal Herni	7,6

Hasta ve kontrol gruplarının miRNA düzeyleri arasında dikkat çekici düzeyde fark olduğu ve hasta grubunun miRNA düzeylerinin daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Tablo 4.2).



Şekil 4.1. Hasta ve kontrol grubu miR-133a düzeyleri.



Şekil 4.2. Hasta ve kontrol grubu miR-26a düzeyleri.



Şekil 4.3. Hasta ve kontrol grubu miR-29a düzeyleri.

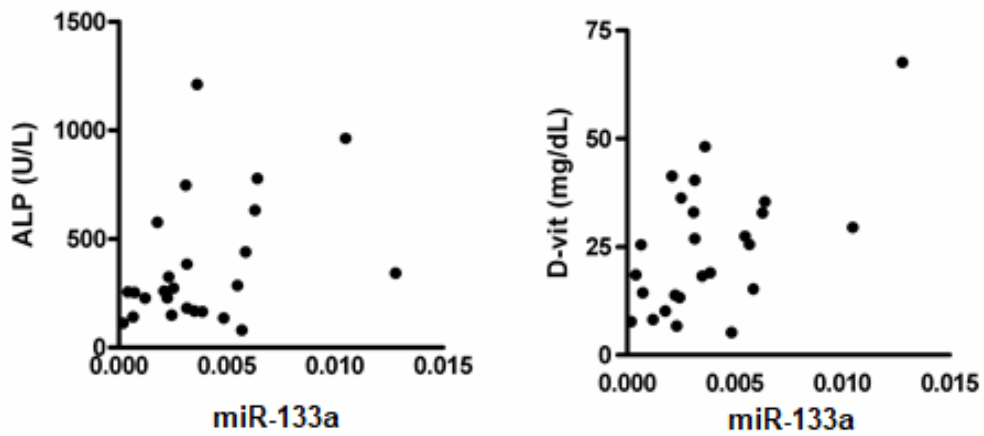
Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubu plazma miRNA düzey karşılaştırması.

miRNA	Grup	n	Ortalama±SD	Ortanca (max-min)	p
miR-26a	Kontrol	15	1,08±0,94	0,99 (0,14-3,64)	0,011
	Hasta	26	2,69±2,41	1,72 (0,26-9,66)	
miR-29a	Kontrol	15	0,04±0,02	0,03 (0,01-0,07)	<0,001
	Hasta	26	0,08±0,04	0,08 (0,01-0,19)	
miR-133a	Kontrol	15	0,0012 ± 0,01	0,0019 (0,0002-0,0037)	0,001
	Hasta	26	0,01±0,03	0 (0 – 0,15)	

mir133a düzeyi yüksek olan hastaların serum kalsiyum ve D vitamini düzeyleri diğer gruplara göre daha düşük bulundu (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Hasta grubunda miRNA düzeyleri ve biyokimyasal belirteçlerin kıyaslanması.

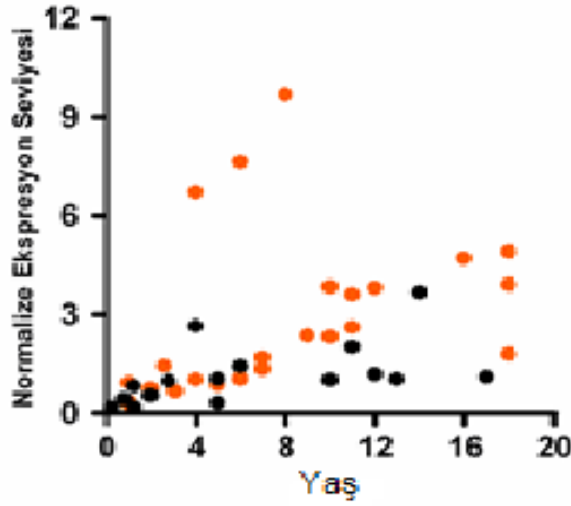
miRNA	n=26	Kalsiyum (mg/dl)	Fosfor (mg/dl)	D-vit (mg/dl)	ALP (U/lt)
miR-29a	p	0,656	0,204	0,734	0,901
miR-133a	p	0,02	0,939	0,018	0,123
miR-26a	p	0,166	0,579	0,564	0,774



Şekil 4.4. Hasta grubu miR-133a düzeyleri ile D vit. ve ALP düzeylerinin kıyaslanması.

miRNA düzeyleri ve ALP, fosfor, PTH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Hasta ve kontrol grubu miR-26a düzeyleri ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Hasta ve kontrol grubunda miR-26a düzeyi ile yaş arasındaki ilişki (kırmızı: hasta grubu, siyah: kontrol grubu).

miRNA düzeyleri ve cinsiyet farklılığı, akrabalık öyküsü ve aile bireylerinde hastalık öyküsü varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Hastaların başvuruındaki kırık sayıları, yıllık ortalama kırık sayıları, klavikula ve skapula kırığı görülme sıklığı ile miRNA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Dentinogenesis imperfecta görülme sıklığı ile miRNA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak miR-26a ekspresyonunun dentinogenesis imperfektalı hastalarda önemli düzeyde arttığı ($p=0,09$) gözlemlendi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. miRNA düzeyleri ve dentinogenesis imperfekta varlığı.

miRNA	Dentinogenesis İmpperfekta	n	Ortalama±SD	Ortanca (max-min)	p
miR-26a	Var	16	3,2±2,7	2,05 (0,72-9,66)	0,09
	Yok	10	1,45±1,3	1,01 (0,25-3,7)	
miR-29a	Var	16	0,08±0,04	0,07 (0,01-0,19)	0,37
	Yok	10	0,05±0,04	0,05 (0,01-0,1)	
miR-133a	Var	16	0,013±0,03	0,003 (0,007-0,14)	0,21
	Yok	10	0,0027±0,002	0,002 (0,002-0,005)	

Mental retardasyon, sklera rengi, fıtık görülme sıklığı, hipermobilité, fontanel genişliği, kalvaryal deformiteler ve işitme kaybı görülmesi ile miRNA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

5. TARTIŞMA

MikroRNA terimi 1990'lı yıllarda gündeme gelmiş olup tıp literatürüne 2000'li yılların başında girmiş ve bu tarihten sonra birçok canlı organizmada olduğu gibi insanlarda da bulunduğu keşfedilerek işlev tanımları yapılmaya başlanmıştır (144). Tıp dünyasında heyecan uyandıran bu gelişme beraberinde birçok çalışmayı doğurmuş ve insan genomundaki genlerin miRNA'lar tarafından da düzenlendiği saptanmıştır (145). Düzenleyici rol oynayan bu küçük nükleoproteinlerin fonksiyon kaybı ya da mutasyonlarında hastalıklara da sebep olabileceği fikri bunun yanı sıra vücut sıvılarından da izole edilebilirliği nedeni ile hastalıklara neden oluyor iseler biomarker olarak kullanılabilirliği soruları gündeme gelmiştir (146,147).

Günümüzde özellikle kanser fizyopatolojisi olmak üzere otoimmün hastalıklardan kas-iskelet sistemi hastalıklarına kadar birçok alanda keşfedilen mikroRNA'lar hastalıkların karanlık kalan noktalarına ışık tutarak erken tanı ve olası tedaviler ile gündeme gelmektedir (148,149,150). Kemik metabolizması ve hastalıkları da bu alanlardan biri olarak gözükmektedir.

Kemik metabolizması, osteoblastların anabolik aktiviteleri ve osteoklastların katabolik aktiviteleri arasındaki hassas denge ile sürdürülür. miRNA'lar, olgunlaşmaları için gerekli olan bir enzim olan Dicer'in fonksiyon kaybı analizleri ile kanıtlandığı üzere, her iki hücre tipinin olgunlaşması ve fonksiyonunda rol oynar. Dicer'in genel bir null mutasyonu, embriyonik fatal seyredebilir ve özellikle gastrulasyonda normal bir omurgalı vücut planının oluşumunu engeller (151). Gaur ve ark. olgun farelerle yaptığı çalışmasında osteoblastlarda olgun miRNA ekspresyonu için önemli olan koşullu Dicer allelinin ablasyonu ile *BGLAP/OC* (insan kemik gama-karboksi glutamik asidi içeren protein / osteokalsin) promoteri ve ya *COL1A1* (kolajen tipi 1 sentezinden sorumlu alan) geninden Cre (cyclization recombinase) ekspresyonu azalması olduğunu tespit etmiş, sonuç olarak fetal sağ kalımı ve kemik oluşumunu tehlikeye atan bir dizi metabolik aksama olduğunu göstermiştir (152). Noda ve ark. yaptıkları bir çalışmada osteoklast farklılaşmasına aracılık eden NFkappaB ligandı (RANKL) ve makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) için reseptörün dicer silinmesi ile

sayıca azaldığını tespit etmiştir. Sonuç olarak osteoklasta özgü Dicer gen eksikliğinin osteoklastik kemik resorpsiyonunu baskıladığını göstermiştir (153). Buna benzer birçok çalışma göstermiştir ki kemik metabolizması ve ilişkili hastalıklarda mikroRNA'lar etkin rol oynamaktadır. Osteogenesis Imperfecta gibi henüz tam olarak aydınlatılamamış birçok kemik hastalığının bu bakış açısı ile yeniden değerlendirilmesi bize yeni ufuklar açabilecektir.

miR-29 ailesinin hücre dışı matriks ile ilgili en az 16 geni hedeflediği gösterilmiştir. Bu genler, ekstraselüler matriksin fizyolojik veya patolojik formasyonunda yer alan anahtar proteinlerin birkaçını kodlarlar. Kollajen ve izoformları olan laminin, fibrilin, elastin, matriks metalloproteinaz ve integrin bunlardan bazılarıdır (154,155). miR-29'lar ile hücre dışı matriks genlerini kodlayan mRNA'lar arasındaki etkileşim, çoğu vakada, 3' UTR (translate edilmemiş bölgede) seed bölgesine bağlanması yoluyla olur. Başka hiçbir miRNA'nın, 20 kollajen geninin 11'inden fazlasını hedef aldığı öngörülmemiştir (156). miR-29'lar tarafından hedeflenen hücre dışı matris genlerinin transkripte ettiği mRNA miktarının azaldığı ve ya mRNA stabilitesini kısmen azalttığı varsayılmaktadır (157). Ekstraselüler matriksin miR-29'lar tarafından düzenlenmesi, kalp (158), böbrek (159), akciğer (160) ve karaciğer (161) gibi birçok organın fibrozisinin yanı sıra sistemik skleroz gelişiminde de rol oynar (162). Birçok hücre dışı matriks geninin önemli bir transkripsiyonel uyarıcısı olan transforme edici büyüme faktörü renal epitel hücreleri, insan fetal akciğer fibroblastları ve göz trabeküler ağ hücreleri de dahil olmak üzere fibrotik koşullarda miR-29'ları downregüle eden önemli bir faktör olabilir (163,164). miR-29 ailesinin downregulasyonu fibrozis ve hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (161). Bir başka çalışmada miR-29a ve Wnt sinyalizasyonunun osteoblast farklılaşmasını modüle edebilen düzenleyici bir devrede pozitif feed back etkileşimi ile yer aldığı gösterilmişti. İnsan mezenşimal kök hücrelerinin osteoblastlara diferansiyasyonu ekstraselüler matriks elemanları tarafından kontrol edilir. Wnt sinyali, insanlardaki kemik kütlesinin korunması için özellikle önemlidir. Mikro RNA'ların aracılık ettiği transkripsiyon sonrası gen ekspresyonu da osteoblast farklılaşmasının kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada da osteoblast farklılaşması sırasında miR-29a'nın arttığı, insan

osteoblastlarındaki Wnt sinyalizasyonunu olumlu bir geri besleme döngüsüyle modüle ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, Wnt sinyalizasyonunda Dkkp-1 (Dkk1), Kremen2 ve sFRP2 (salınmış frizzled ilgili protein 2) negatif regülatörlerinin, miR-29a'nın direkt hedefleri olduğu bulunmuştur. Wnt antagonistlerinin, sentetik miR-29a inhibitörü ile transfekte edilen hücrelerde arttığı, buna karşılık miR-29a mimikleri ile yapılan transfeksiyonun bu antagonistlerin ekspresyonunu azaltarak Wnt sinyalizasyonunu güçlendirdiği gösterilmiştir (165).

Sisteinden zengin, asidik bir non-kollajen protein olan osteonektin, kemik ekstrasellüler matriksinde bol miktarda bulunur ve kemik remodellinginin regülatörü olarak önemli rol oynar. İskelette, osteonektin, kemik kütlesi bakımında ve paratiroid hormonuna (PTH) yanıt olarak kemik oluşumunu ve emilimini dengelemek için şarttır. Fare osteonektin 3' UTR proksimal bölgesinin miRNA'lar (miR-29a ve miR-29c) ile etkileşime giren iyi korunmuş baskın bir düzenleyici motif içerdiğini gösteren bir çalışmada, osteoblastik hücrelerin miR-29a inhibitörleri ile transfekte edilmesinin osteonektin protein seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir. Bu miRNA'ların up-regülasyonu, matriks maturasyonu sırasında ve geç diferansiyasyonun mineralizasyon fazlarında azalmış osteonektin proteini ile korelasyon göstermiştir (166).

Çalışmamızda OI hastaların plazma miR-29a düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Literatürde bildirildiği üzere miR-29a'nın kemik dokusunda osteoblastik aktivite ile ilişkisi bulunmaktadır. Bizim verilerimizde de benzer şekilde hasta grubunda miR-29a düzeyinin yüksekliği OI'da devam eden osteoblastik aktiviteyle uyumlu görülmektedir. Ancak miR-29a düzeyi ile hastaların demografik ve klinik bulguları arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik veya kondrojenik farklılaşmasında önemli rolü olan RUNX2'in miRNA'lar ile etkileşimini araştıran bir çalışmada RUNX2'i hedefleyen yedi farklı miRNA'nın (miR-23a, miR-30c, miR-34c, miR-133a, miR-135a, miR-205 ve miR-217) varlığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda incelediğimiz miR-133a da bunlardan biridir. RUNX2'i hedefleyen her bir miRNA'nın etkinliği, osteoblastlar ve kondrositler arasında farklılık gösterse de, önceden etkinleşmiş osteoblastlar ve kondrositlerin olgunlaşmasını etkili bir

şekilde bloke ettikleri gösterilmiştir. Dahası, bu miRNA'ların, mezenkimal kök hücreleri adipogenik hücre kaderine yönlendirebildiği gösterilmiştir (167).

miRNA'lar Runx2'nin osteojenik aktivitesini kontrol edip etmediğini ve osteoblast olgunlaşmasını etkileyip etkilemediğini ele alan bir başka çalışmada da Runx2 hedefleyen miRNA miR-23a, miR-30c, miR-34c, miR-133a, miR-135a, miR-137, miR-204, miR-205, miR-217, miR-218 ve miR-338 olarak belirlenmiştir. Aralarında miR-133a'nın da bulunduğu bu miRNA'ların farklı yollar kullanarak da olsa aynı sonuca ulaştıkları, osteoblastlar ve kondrositlerdeki Runx2 protein ekspresyonunu inhibe ettikleri gösterilmiştir. Tüm Runx2'i hedefleyen miRNA'ların (miR-218 hariç) önemli ölçüde osteoblast farklılaşmasını engelledikleri gösterilmiş ve etkileri anti-miRNA'lar tarafından tersine çevrilerek teyid edilmiştir (168).

Çalışmamızda incelediğimiz OI hastalarında plazma miR-133a düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Literatürde miR-133a osteoblastik aktivite ile ters ilişkili olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur. Ancak bizim verilerimizde farklı olarak hasta grubunda miR-133a düzeyinin yüksekliği, hastalardaki olgun osteositlerin daha düşük seviyede olmasıyla ilişkili olabilir. Osteogenesis imperfekta hastalarında Runx2 protein ekspresyonunun daha düşük olduğu bilinmektedir. Buna bağlı olarak, OI hastalarında Runx2 ve OSX aracılı negatif feed back mekanizmanın yetersiz kalması miR-133a yüksekliği ile ilişkili olabileceği öngörülebilir.

miR-133a düzeyi ile hastalarımızın demografik ve klinik bulguları arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, miR-133a düzeyi ile D vitamini düzeyi arasında pozitif korelasyon varlığı saptanmıştır. Panizo ve ark.'nın D vitamini reseptör aktivatörleri (VDRA) ile kardiyak fibrozisin hafifletilmesine katkıda bulunduğu dair yaptıkları çalışmada D vitamini ile miRNA (miR-29b, miR-133b, miR-30c) düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulmuştur. Bu miRNA'ların promotörlerinde D vitamini yanıt elemanlarının var olduğu ve vitamin D'nin miRNA ekspresyonunda etkin bir role sahip olduğu öne sürülmektedir (169). Çalışmamızda miR-133a düzeyi yüksek olan hastaların serum vitamin D düzeylerinin de yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak literatürde miR-133a ve Vitamin D ilişkisini direkt olarak inceleyen bir yayına rastlanmamıştır.

Osteogenesis imperfekta hastalarında miR-133a ve Vitamin D arasındaki ilişkinin ayrıntılı olarak incelendiği çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Somatik kök hücreler (USSC), insan kordon kanındaki nadir bir popülasyon olup, üç germ tabakasını temsil eden hücrelere indüklenebilir. miRNA'ların USSC'deki osteojenik farklılaşma üzerindeki işlevsel etkisinin analiz edildiği bir çalışmada miR-26a / b ve miR-29b'nin upregüle oldukları ve osteojenik farklılaşmayı hızlandırdıkları gösterilmiştir (170).

Yapılan farklı bir çalışmada gözenekli bir hidroksiapatit iskele ile birleştirilen modifiye adipoz kaynaklı kök hücreler (ASC)'in miR-26a transfeksiyonu sonrası osteojenik tarafa kaydığı gözlenmiştir. Osteojenik genlerin belirgin bir biçimde upregüle olduğu ve ALP üretimi, kollojen sekresyonu ve ekstrasellüler matriks mineralizasyonunun arttığı gözlenmiştir. Histolojik değerlendirme, modifiye hücrelerin gözenekli bir hidroksiapatit iskele eşliğinde yeni kemik oluşumunu teşvik ettiğini göstermiştir. Sonuç olarak, miR-26a transfeksiyonu, ASC'lerin osteojenik potansini önemli ölçüde geliştirmiştir (171).

Çalışmamızda OI hastalarında miR-29a ve miR-133a'ya benzer şekilde, plazma miR-26a düzeyi de kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Bildirildiği üzere miR-26a'nın osteoblastik aktivite ile ilişkisi bulunmaktadır. Bizim verilerimizde de benzer şekilde hasta grubunda miR-26a düzeyinin yüksekliği OI'da devam eden osteoblastik aktiviteyle uyumlu görülmektedir. miR-26a düzeyi ile hastaların demografik ve klinik bulguları arasında ilişki değerlendirildiğinde hasta grubunda miR-26a düzeyi ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı. Ancak literatürde miR-26a ile yaş ilişkisini direkt olarak inceleyen bir yayına rastlanmamıştır.

Literatürde OI hastalarında miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılabilirliği sorusuna yanıt arayan sınırlı sayıda çalışma olmak ile birlikte, Wang ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada 22 OI tanılı hasta (yaş ortalaması $9,54 \pm 3,6$) ve 10 sağlıklı bireyden (yaş ortalaması $8,2 \pm 0,4$) alınan plazma örneklerinde karşılaştırılmıştır. Hastalarda miR-133a ve miR-29a'nın sağlıklı gruba göre daha düşük, miR-26a'nın ise yüksek olduğu belirlenmiştir (172). miR-26a ekspresyonu açısından verilerimiz benzerlik göstermekle birlikte, miR-29a ve

miR-133a ekspresyonlarında farklılık saptanmıştır. Çalışmamızda alınan örneklem sayıları (hasta grup $n=26$; sağlıklı grup $n=16$), yaş ortalaması (hasta grup $8,3\pm1,1$; kontrol grubu $6,5\pm1,3$), mikroRNA'ların plazmadan elde edilmiş olması açısından çalışmalar arasında farklılıklar bulunmaktadır. Ancak tanımlanan değişkenlerin, miR-29a ve miR-133a ekspresyonundaki farklılık açısından kesin olarak nasıl bir etkiye sahip oldukları henüz bilinmemektedir. Gerek sağlıklı gerekse Oİ olgularında yapılacak daha geniş hasta sayısı içeren çalışmalarda bakılacak miRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları olarak nadir bir hastalık grubunu inceleyen ve tek merkezli yapılmış çalışmada hasta sayısının görece az olması, Oİ ve miRNA arasındaki ilişkiyi daha net değerlendirilebilmek açısından Oİ hastalarımızda moleküler analizlerinin olmamasıdır. Literatürdeki az sayıdaki benzer yayınla kıyaslandığında çalışmamızın güçlü yanı ise hastaların demografik ve klinik özelliklerinin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi ve bunların miRNA ekspresyonları ile ilişkilerinin de karşılaştırılmasıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Osteogenezis İmperfekta uzun kemik deformiteleri ve kırıkları ile seyreden nadir genetik bir bağ dokusu hastalığıdır. İntrauterin dönemden itibaren bulgu verebilen, lethal olabilen, basit bir travma ile veya travma olmadan da uzun kemik ve vertebra kompresyon kırıkları görülebilen, yaşam kalitesi düşüklüğüne sebep olabilen, morbiditesi ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır. Osteogenezis İmperfekta yaygın osteoporoz, tekrarlayan kemik kırıkları ve bunun sonucunda oluşan deformiteler ile karakterizedir ve kesin tedavisi yoktur. Osteogenezis İmperfekta tanısı ve takibi için kullanılabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi, hastalığın erken dönemde saptanması, hastalığın seyrinin ve yeni bir terapötik hedef olasılığı olan miRNA'lerden yola çıkarak tedaviye cevabın izlenmesi açısından önemli olabilmektedir. Osteogenezis İmperfekta'da mikroRNA'ların klinik heterojenitedeki rolünü saptamak, biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin anlaşılmasına katkı sağlamak ve yeni bir terapötik hedef olasılığı amacıyla kemik ilişkili miRNA'larda deneysel kanıtlar kısıtlı olduğundan, ossifikasyon sürecince rol aldığı düşünülen miRNA'ların incelendiği daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

7. ÖZET

Osteogenezis Imperfektalı Hastalarda Plazma miRNA (miR-26a, miR-29a, miR-133a) Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Giriş-Amaç: Osteogenezis İmperfekta (OI) uzun kemik deformiteleri ve kırıkları ile seyreden beraberinde mavi sklera, diş bozuklukları, işitme kaybı ve ligamentöz laksite görülebilen genetik bir bağ dokusu hastalığıdır. Sillence ve ark. tarafından klinik, kalıtım şekli ve radyolojik özelliklere göre OI klasik olarak dört sınıfa ayrılmaktadır. Günümüzde OI'nın OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) veri tabanında 17 farklı tipi bildirilmiştir. Kalıtım şekli tiplere göre farklılık göstermekle birlikte otozomal dominant (OD) ve otozomal resesif (OR) geçişlidir.

Yakın zamana kadar klasik bilgilerimiz santral dogma olarak tanımlanan DNA'da depolanmış materyalin haberci RNA'ya (mRNA) transkribe olması ve sonrasında da taşıyıcı RNA (tRNA) aracılığıyla ribozomlara taşınarak gerekli proteinlerin sentezlenmesi yönünde idi. Fakat yapılan genom ve işlevsel analiz çalışmaları protein kodlamayan RNA (non-coding RNA- ncRNA) moleküllerinin de olduğunu göstermiştir. Küçük kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olan mikroRNA'lar (miRNA) gelişim, homeostaz, bağışıklık ve ossifikasyon gibi süreçlerde önemli rol oynamaktadırlar. miRNA'ların inflamasyondan kansere kadar çoğu hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Varolan kanıtlar, ossifikasyon sürecinde miRNA'ların hedef mRNA'ların ekspresyonunu bağlama ve bastırma ile etkilediğini dolayısıyla osteoblastik proliferasyon, farklılaşma ve osteoklastik aktivitede etkili transkripsiyon ürünlerini de etkilediğini göstermiştir. Yapılan araştırmaların çoğunda doğrudan kemik hastalıklarıyla ilişkili miRNA'lar tanımlanmamıştır ancak miR-26a, miR-29a, miR-133a kemik ile ilişkili eksprese olduğu düşünülen miRNA'lardandır.

Çalışmamızda, OI'da mikroRNA'ların klinik heterojenitedeki rolünü saptamak, biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin anlaşılmasına katkı sağlamak ve yeni bir terapötik hedef olasılığı amacıyla kemik ilişkili miRNA'lardan miR-26a, miR29a, miR-133a'nın hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Endokrinoloji ve Çocuk Genetik Polikliniğinde değerlendirilen ve Oİ tanısı ile takip edilen 0-18 yaş grubu 26 hasta, kontrol grubu olarak Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlam ve Genel Çocuk Polikliniğine başvuran hastalığı olmayan 0-18 yaş arası 16 sağlıklı çocuk alındı. Olgulara ait plazma örneklerinden miRNA (miR-26a, miR-29a, miR-133a) izolasyonu için miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, 217184) kullanıldı. Kantitatif PCR ile belirlenen değerler REST© (Pfaffl MW ve ark. Nuc Acid Res, 2002; 30(9): E36) programı kullanılarak normalize edildi.

Bulgular: Hasta ve kontrol gruplarının miRNA düzeyleri arasında dikkat çekici düzeyde fark olduğu ve hasta grubunun miRNA düzeylerinin daha yüksek olduğu saptandı. miR-133a düzeyi yüksek olan hastaların serum kalsiyum ve D vitamini düzeyleri diğer gruplara göre daha düşük bulundu. Dentinogenesis imperfecta görülme sıklığı ile miRNA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak miR-26a ekspresyonunun dentinogenesis imperfecta hastalarda arttığı ($p=0,09$) gözlemlendi.

Sonuç: Osteogenesis İmperfekta yaygın osteoporoz, tekrarlayan kemik kırıkları ve bunun sonucunda oluşan deformiteler ile karakterize ve kesin tedavisi olmayan nedir bir hastalıktır. Osteogenesis İmperfekta'da mikroRNA'ların klinik heterojenitedeki rolünü saptamak, biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin anlaşılmasına katkı sağlamak ve yeni bir terapötik hedef olasılığı amacıyla kemik ilişkili miRNA'larda deneysel kanıtlar kısıtlı olduğundan, ossifikasyon sürecince rol aldığı düşünülen miRNA'ların incelendiği daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Osteogenesis İmperfekta, mikroRNA, miR-26a, miR-29a, miR-133a

8. ABSTRACT

Evaluation of Serum miRNA (mir-26a, mir-29a, mir-133a) Expression Levels in Patients with Osteogenesis Imperfecta

Objective: Osteogenesis Imperfecta (OI) is associated with long bone deformities and fractures, accompanied by a genetic connective tissue disorder with visible blue sclera, tooth disturbances, hearing loss and ligamentous laceration. According to their clinical, inherited, and radiological characteristics, OI is classically divided into four classes by Silience et al. So far 17 different types of OI has been reported in OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) database. There are autosomal dominant (OD) and autosomal recessive (OR) transitions, although inheritance patterns differ according to types.

Until recently, our classical knowledge has been described as central dogma, in which DNA stored in genetic material is transcribed into messenger RNA (mRNA) and then carried by transporter RNA (tRNA) to move to ribosomes to synthesize the necessary proteins. However, genome and functional analysis studies have shown the presence of non-coding RNA (ncRNA) molecules. MicroRNAs (miRNAs), a class of small non-coding RNAs, play important roles in processes such as development, homeostasis, immune system and ossification. miRNAs have been shown to be associated with a variety of diseases from inflammation to cancer. Existing evidence suggests that miRNAs affect the expression of target mRNAs by binding and suppression in the process of ossification which in turn influence the osteoblastic proliferation, differentiation and osteoclastic activating translational products. miR-26a, miR-29a, miR-133a are believed to be associated with bone tissue.

In this study we aimed to identify the role of microRNAs in the clinical heterogeneity of OI, contribute to the understanding of their utility as biomarker, and also to determine the expression differences of bone-associated miRNAs (miR-26a, miR29a, miR-133a) between the patients and healthy controls in order to search for their possible use as a new therapeutic target.

Method: Control group was made up of healthy children between the ages of 0 and 18 who applied to the General Child Policlinic of Akdeniz University Medical School. Patient group was 0-18 age children, followed by OI diagnosis in Akdeniz University Medical School, Endocrinology and Child Genetics Departments. MiRNeasy Serum / Plasma Kit (Qiagen, 217184) was used for the isolation of miRNA (mir-26a, mir-29a, mir-133a) from the plasma samples of the participants. The values determined by quantitative PCR were normalized using the REST programme (Pfaffl MW et al., Nuc Acid Res, 2002; 30 (9): E36).

Results: There was a noticeable difference between the miRNA levels of the patient and control groups and the miRNA levels of the patient group were higher. Serum calcium and vitamin D levels of patients with higher mir133a levels were lower than those of the other groups. There was no statistically significant difference between the incidence of dentinogenesis imperfecta and miRNA levels. However, expression of miR26a was significantly increased in dentinogenesis imperfectant patients ($p = 0.09$).

Conclusion: OI is characterized by diffuse osteoporosis, recurrent bone fractures and resulting deformities, and there is no definitive treatment. Identification of biomarkers may be important in the diagnosis and follow-up of OI, detection of the disease at an early stage, monitoring the response to treatment, and determining miRNAs that are likely to be a new therapeutic targets. microRNAs are shedding light on early detection and possible treatments by shedding light on the dark areas of some diseases. Osteogenesis Imperfecta is also one of these diseases. Although there is need for more sufficient and extensive clinical trials currently microRNAs can be used as biomarkers

Key Words: Osteogenesis Imperfecta, microRNA, miR-26a, miR-29a, miR-133a

9. KAYNAKLAR

1. Sillence DO, Senn A, Danks DM. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 1979; 16: 101–16.
2. Online Mendelian Inheritance in Man An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders Updated 30 June, 2017 Access 03.07. 2017
3. Szymański M, Barciszewska MZ, Zywicki M, Barciszewski J. Noncoding RNA transcripts. *J Appl Genet* 2003; 44(1): 1-19.
4. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350-5.
5. Ambros V. The evolution of our thinking about microRNAs. *Nat Med* 2008; 14(10): 1036-40.
6. Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* 2006; 108(12): 3646–53.
7. QiuJuna W, Yingb L, Yuanxia Z, Lana M, Lina L, Jia M, Lihonga J, et al. LncRNA MEG3 inhibited osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from postmenopausal osteoporosis by targeting miR-133a-3p. *Biomedicine&Pharmacotherapy* 2017; 89: 1178–86.
8. Jee M, An H, Ohn JH, Song JA, Yang JY, Park H, Choi HJ, et al. Changes of MicroRNA Profile and MicroRNAmRNA Regulatory Network in Bones of Ovariectomized. *J Bone and Mineral Research* 2014; 29(3): 644–56.
9. Yan Li, Longkun Fan, Jiang Hu, Leilei Zhang. MiR-26a Rescues Bone Regeneration Deficiency of Mesenchymal Stem Cells Derived From Osteoporotic Mice *Molecular Therapy* 2015; 23(8): 1349–57.
10. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3(3): 131-9. DOI:10.2215/CJN.04151206
11. Rosen HN. Bone physiology and biochemical markers of bone turnover. UpToDate. Accessed 20.08.2017
12. Junqueira LC, Mescher AL. Basic Histology. 13th ed. Mc Graw-Hill Med Pub 2013; 138-58.
13. Adler CP. Normal anatomy and histology of bones and bone tissue. In *Bone Diseases* Edited By Adler CP. New York, NY: Sprinter-Verlag 2000; 1-30.

14. Gunawardene P, Al Saedi A, Singh L, Bermeo S, Vogrin S, Phu S, et al. Age, gender, and percentage of circulating osteoprogenitor (COP) cells: The COP Study. *Exp Gerontol* 2017; 96: 68-72. doi: 10.1016/j.exger.2017.06.004
15. Dallas SL, Bonewald LF. Dynamics of the Transition from Osteoblast to Osteocyte. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1192: 437–43. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05246.x
16. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The Osteocyte: An Endocrine Cell and More. *Endocr Rev* 2013; 34(5): 658–90. doi: 10.1210/er.2012-1026
17. Nakashima T. Frontiers in Live Bone Imaging Researches. Amazing function of osteocyte. *Clin Calcium* 2015; 25(6): 899-905. doi: CliCa1506899905
18. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1116: 281-90. DOI: 10.1196/annals.1402.018
19. Boyce BF, Zuscik MJ, Xing L. *Biology of Bone and Cartilage. Genetics Of Bone Biology And Skeletal Disease*, Academic Press 2011; 7-8.
20. Feng X, McDonald JM. Disorders of Bone Remodeling *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 121–45. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130203
21. Abdelmagid SM, Sondag GR, Moussa FM, Belcher JY, Yu B, Stinnett H, et al. Mutation in Osteoactivin Promotes Receptor Activator of NFκB Ligand (RANKL)-mediated Osteoclast Differentiation and Survival but Inhibits Osteoclast Function. *J Biol Chem* 2015; 290(33): 20128–46. doi: 10.1074/jbc.M114.624270
22. Tsubaki M, Komai M, Itoh T, Imano M, Sakamoto K, Shimaoka H, et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit RANKL- and M-CSF-induced osteoclast formation through the inhibition of ERK1/2 and Akt activation. *J Biomed Sci* 2014; 21(1): 10. doi: 10.1186/1423-0127-21-10
23. Diegelmann RF. *Collagen Metabolism* Virginia Commonwealth University Medscape Accessed 20.08.2017
24. Oliveira SM, Ringshia RA, LeGeros RZ, Clark E, Yost MJ, Terracio L, et al. An improved collagen scaffold for skeletal regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2010; 94(2): 371–9. doi: 10.1002/jbm.a.32694

25. Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, Ala-Kokko L, San Antonio JD. Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen. *J Biol Chem* 2002; 277(6): 4223–31.
26. Osteogenesis imperfecta & Ehlers-Danlos syndrome variant databases. Access date 02/07/2017
27. Koide T, Nishikawa Y, Asada S, Yamazaki CM, Takahara Y, Homma DL, et al. Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47- binding structural motif in collagens and related proteins. *J Biol Chem* 2006; 281(16): 11177–85. DOI:10.1074/jbc.M601369200
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): 31584–90. DOI: 10.1074/jbc.M802535200
29. Willaert A, Malfait F, Symoens S, Gevaert K, Kayserili H, Megarbane A, et al. Recessive osteogenesis imperfecta caused by LEPRE1 mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3- hydroxylation. *J Med Genet* 2009; 46: 233–41. doi: 10.1136/jmg.2008.062729
30. Frost HM. Bone remodeling and its relationship to metabolic bone diseases, Thomas, Springfield, Ill. 1973.
31. Wright NC, Looker AC, Saag KG, Curtis JR, Delzell ES, Randhall S, et al. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. *J Bone Miner Res* 2014; 29(11): 2520–6. doi: 10.1002/jbmr.2269
32. Husain A, Jeffries MA. Epigenetics and Bone Remodeling. *Curr Osteoporos Rep* 2017 Aug 14. DOI: 10.1007/s11914-017-0391-y
33. Zhang Y, Xie RL, Croce CM, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein GS. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(24): 9863–8. doi: 10.1073/pnas.1018493108

34. Gaur T, Hussain S, Mudhasani R, Parulkar I, Colby JL, Frederick D, et al. Dicer inactivation in osteoprogenitor cells compromises fetal survival and bone formation, while excision in differentiated osteoblasts increases bone mass in the adult mouse. *Dev Biol* 2010; 340(1): 10–21. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.01.008
35. Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat Rec* 1990; 226: 414–22.
36. Petrtyl M, Hert J, Fiala P. Spatial organization of the haversian bone in man. *J Biomech* 1996; 29: 161–9. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9290\(94\)00035-2](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9290(94)00035-2)
37. Mirzaali MJ, Schwiedrzik JJ, Thaiwichai S, et al. Mechanical properties of cortical bone and their relationships with age, gender, composition and microindentation properties in the elderly. *Bone* 2015; 87:159-60.
38. Marotti G, Cane V, Palazzini S, et al. Structure-function relationships in the osteocyte. *Ital J Min Electro Metab* 1990; 4: 93-97.
39. Sherman VR, Yang W, Meyers MA. The materials science of collagen. *J Mech Behav Biomed Mater* 2015; 52: 22–50.
40. Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol* 1969; 41: 59–72.
41. Ninfa, Ballou, Benore. *Biochemistry and Biotechnology*. John Wiley & Sons, INC; 229–230.
42. Mentrup B, Girschick H, Jakob F, Hofmann C. A homozygous intronic branch-point deletion in the ALPL gene causes infantile hypophosphatasia. *Bone* 2017; 94: 75-83.
43. Clement T, Salone V, Charpentier B, et al. Identification of new microRNAs targeting genes regulating the Pi/PPi balance in chondrocytes. *Biomed Mater Eng.* 2014; 24(1 Suppl): 3-16.
44. Baljet B. Aspects of the history of osteogenesis imperfecta (Vrolik's syndrome). *Ann Anat* 2002; 184: 1-7.
45. Lowenstein EJ. Osteogenesis imperfecta in a 3,000-year-old mummy. *Childs Nerv Syst* 2009; 25(5): 515-6.

46. Orioli IM, Castilla EE, Barbosa N. The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. *J Med Genet* 1986; 23: 328–32.
47. Forlino A, Marini JC. Osteogenesis imperfecta. *Lancet* 2016; 387: 1657–71.
48. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum Mutat* 1997; 9: 300–15.
49. Van Dijk FS, Cobben JM, Kariminejad A, et al. Osteogenesis imperfecta: A review with clinical examples. *Mol Syndromol* 2011; 2: 1–20.
50. Willing MC, Deschenes SP, Scott DA, et al. Osteogenesis imperfecta type I: molecular heterogeneity for COL1A1 null alleles of type I collagen. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 638–47.
51. Byers PH. Osteogenesis imperfecta: an update. *Growth Genet Horm* 1988; 4: 1–5.
52. Chan CC, Green WR, de la Cruz ZC, Hillis A. Ocular findings in osteogenesis imperfecta congenita. *Arch Ophthalmol* 1982; 100(9): 1458–63.
53. Malmgren B, Andersson K, Lindahl K, Kindmark A, et al. Tooth agenesis in osteogenesis imperfecta related to mutations in the collagen type I genes. *Oral Dis* 2017; 23(1): 42–9.
54. Kuurila K, Grénman R, Johansson R, Kaitila I. Hearing loss in children with osteogenesis imperfecta. *Eur J Pediatr* 2000; 159(7): 515–9.
55. Binder HB, Conway A, Hason S, et al. Comprehensive rehabilitation of the child with osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet* 1993; 45: 265–9.
56. Sillence DO, Barlow KK, Garber AP, et al. Osteogenesis imperfecta type II: Delineation of the phenotype with reference to genetic heterogeneity. *Am J Med Genet* 1984; 17: 407–23.
57. Steiner RD, Adsit J, Basel D. COL1A1/2-Related Osteogenesis Imperfecta. Synonyms: Brittle Bone Disease, OI. Includes: Classic Non-Deforming OI with Blue Sclerae, Perinatally Lethal OI, Progressively Deforming OI,

Common Variable OI with Normal Sclerae. Genereview:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1295>

58. Wekre LL, Kjensli A, Aasand K, et al. Spinal deformities and lung function in adults with osteogenesis imperfecta. *Clin Respir J* 2014; 8(4): 437-43.
59. Sillence DO, Barlow KK, Cole WG, Dietrich S. Osteogenesis imperfecta type III. Delineation of the phenotype with reference to genetic heterogeneity. *Am J Med Genet* 1986; 23(3): 821-32.
60. Khandanpour N, Connolly DJ, Raghavan A, et al. Craniospinal abnormalities and neurologic complications of osteogenesis imperfecta: imaging overview. *Radiographics* 2012; 32(7): 2101-12.
61. Vuorimies I, Mäyränpää MK, Valta H, Kröger H. Bisphosphonate Treatment and the Characteristics of Femoral Fractures in Children with Osteogenesis Imperfecta. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102(4): 1333-9.
62. Binder HB, Conway A, Hason S, et al. Comprehensive rehabilitation of the child with osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet* 1993; 45: 265–9.
63. Veilleux LN, Darsaklis VB, Montpetit K, Glorieux FH, et al. Muscle Function in Osteogenesis Imperfecta Type IV. *Calcif Tissue Int* 2017 May 4.
64. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum Mutat* 1997; 9: 300–15.
65. Van Dijk FS, Sillence DO. Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *Am J Med Genet A* 2013; 164A: 1470–81.
66. Valadares ER, Carneiro TB, Santos PM, et al. What is new in genetics and osteogenesis imperfecta classification? *J Pediatr (Rio J)* 2014; 90(6): 536-41.

67. Osteogenesis Imperfecta & Ehlers-Danlos Syndrome variant databases www.le.ac.uk/ge/collagen/ Access date 03.07.2017
68. Yazan H. Osteogenezis imperfekta tanılı hastaların klinik tiplendirilmesi ve pamidronat tedavisine yanıtın irdelenmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi (YÖK Tez No: 455149), İstanbul Ü Cerrahpaşa Tıp F 2016; 11-12. Danışman: Prof. Dr. Beyhan Tüysüz.
69. Marini JC, Blissett AR. New genes in bone development: what's new in osteogenesis imperfecta. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(8): 3095-103.
70. Antonella Forlino, Wayne A. Cabral, Aileen M. Barnes et al. New Perspectives on Osteogenesis Imperfecta *Nat Rev Endocrinol.* 2011; 7(9): 540-57.
71. Rauch F, Moffatt P, Cheung M, Roughley P, et al. 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): 21-4.
72. Wang JY, Liu Y, Song LJ, Lv F. Novel Mutations in SERPINF1 Result in Rare Osteogenesis Imperfecta Type VI. *Calcif Tissue Int* 2017; 100(1): 55-66.
73. Barbirato C, Trancozo M, Almeida MG, et al. Mutational characterization of the P3H1/CRTAP/CypB complex in recessive osteogenesis imperfecta. *Genet Mol Res* 2015; 14(4): 15848-58.
74. Jiang Y, Pan J, Guo D. Two novel mutations in the PPIB gene cause a rare pedigree of osteogenesis imperfecta type IX. *Clin Chim Acta* 2017; 469: 111-8.
75. Marini JC, Cabral WA, Barnes AM. Null mutations in LEPRE1 and CRTAP cause severe recessive osteogenesis imperfecta. *Cell Tissue Res* 2010; 339(1): 59-70.
76. Marshall C, Lopez J, Crookes L, Pollitt RC. A novel homozygous variant in SERPINH1 associated with a severe, lethal presentation of osteogenesis imperfecta with hydranencephaly. *Gene* 2016; 595(1): 49-52.

77. Lietman CD, Lim J, Grafe I, Chen Y, Ding H, Bi X, Ambrose CG. Fkbp10 Deletion in Osteoblasts Leads to Qualitative Defects in Bone. *J Bone Miner Res* 2017; 32(6): 1354-1367. doi: 10.1002/jbmr.3108. Epub 2017 Mar 20.
78. Lapunzina P, Aglan M, Temtamy S, Caparrós-Martín JA. Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2010; 87(1): 110-4.
79. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of Cell Science* 2005; 118: 1341-53.
80. Shaheen R, Alazami AM, Alshammari MJ, Faqeih E, Alhashmi N, Mousa N. Study of autosomal recessive osteogenesis imperfecta in Arabia reveals a novel locus defined by TMEM38B mutation <http://jmg.bmj.com/> on July 4, 2017 - Published by group.bmj.com
81. Fahiminiya S, Majewski J. Mutations in WNT1 are a cause of osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 2013; 50: 345-8.
82. Symoens S, Malfait F, D'hondt S, et al. Deficiency for the ER-stress transducer OASIS causes severe recessive osteogenesis imperfecta in humans. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 154.
83. Mendoza-Londono R, Fahiminiya S, Majewski J et al. Recessive osteogenesis imperfecta caused by missense mutations in SPARC. *Am J Hum Genet* 2015; 96: 979-85.
84. Millington-Ward S, McMahon HP, et al. Farra Emerging therapeutic approaches for osteogenesis imperfecta. *TRENDS in Molecular Medicine* 2005; 11: 6.
85. Kaneto CM, Lima PSP, Zanette DL. COL1A1 and miR-29b show lower expression levels during osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells from Osteogenesis Imperfecta patients. *BMC Med Genet* 2014; 15: 45.
86. Li Z, Hassan MQ, Volinia S, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program *Cell Biology Proc Natl Acad Sci* 2008; 105(37): 13906–11.

87. Peng S, Gao D, Gao C, et al. MicroRNAs regulate signaling pathways in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (Review) *Mol Med Rep* 2016; 14(1): 623-9.
88. Anticevic D, Zergollern L, Jankovi S, et al. Osteogenesis Imperfecta: A current overview of musculoskeletal radiology and new genetic concepts. *Acta Clin Croat* 2002; 41 (Suppl): 101-11.
89. Berge LN, Marton V, Tranebjaerg L, et al. Prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995; 74(4): 321-3.
90. Millán JL, Michael P. Whyte Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int* 2016; 98: 398–416.
91. Garcia IJ, Chiodo V, Ma Y, Boskey AL. Evidence of Altered Matrix Composition in Iliac Crest Biopsies from Patients with Idiopathic Juvenile Osteoporosis. *Connect Tissue Res* 2016; 57(1): 28–37.
92. Rauch F, Fahiminiya S, Majewski J, et al. Cole-Carpenter Syndrome Is Caused by a Heterozygous Missense Mutation in P4HB. *Am J Hum Genet* 2015; 96(3): 425–31.
93. Salehpour S, Tavakkoli S. Cyclic pamidronate therapy in children with osteogenesis imperfecta. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2010; 23(1-2): 73-80.
94. Franzone JM, Bober MB, Rogers KJ, et al. Re-alignment and intramedullary rodding of the humerus and forearm in children with osteogenesis imperfecta: revision rate and effect on fracture rate. *J Child Orthop* 2017; 11(3): 185-90.
95. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843-54.
96. Olena AF, Patton JG. Genomic Organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 2010; 222(3): 540–5. doi: 10.1002/jcp.21993
97. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116 (2): 281-97. PMID: 14744438
98. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(5): 376-85. DOI: 10.1038/nrm1644

99. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Lee J, Provost P, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425(6956): 415-9. DOI: 10.1038/nature01957
100. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005 Nov 18; 123(4): 631-40. Epub 2005 Nov 3.
101. Karginov FV, Conaco C, Xuan Z, Schmidt BH, Parker JS, Mandel G, et al. A biochemical approach to identifying microRNA targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(49): 19291-6. Epub 2007 Nov 27. DOI: 10.1073/pnas.0709971104
102. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CP. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115(7): 787-98. PMID: 14697198
103. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(11):4034-9. Epub 2006 Feb 22.
104. Goretti E, Wagner DR, Devaux Y. Regulation of endothelial progenitor cell function by microRNAs. *Minerva Cardioangiol* 2013; 61: 591–604.
105. Shalgi R, Brosh R, Oren M, et al. Coupling transcriptional and post-transcriptional mirna regulation in the control of cell fate. *Aging* 2009; 1: 762–70.
106. Starnes LM, Sorrentino A, Ferracin M, et al. A transcriptome-wide approach reveals the key contribution of nfi-a in promoting erythroid differentiation of human cd34(+) progenitors and cml cells. *Leukemia* 2010; 24: 1220–3.
107. Starnes LM, Sorrentino A, Pelosi E, et al. Nfi-a directs the fate of hematopoietic progenitors to the erythroid or granulocytic lineage and controls beta-globin and g-csf receptor expression. *Blood* 2009; 114: 1753–63.
108. Chen J, Odenike O, Rowley JD. Leukaemogenesis: More than mutant genes. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 23–36.

109. Jia Q, Sun H, Xiao F, Sai Y, Li Q. miR-17-92 promotes leukemogenesis in chronic myeloid leukemia via targeting A20 and activation of NF- κ B signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 487(4): 868-74.
110. Srinivasan S, Selvan ST, Archunan G, et al Parasuraman Padmanabhan MicroRNAs -the Next Generation Therapeutic Targets in Human Diseases Review *Theranostics* 2013; 3(12): 930-42.
111. Li Y, Wu D, Wang P, Li X, Shi G. miR-195 Regulates Proliferation and Apoptosis through Inhibiting the mTOR/p70s6k Signaling Pathway by Targeting HMGA2 in Esophageal Carcinoma Cells *Dis Markers* 2017; 2017: 8317913. <https://doi.org/10.1155/2017/8317913>
112. Hayashi T, Hoffman MP. Exosomal microRNA communication between tissues during organogenesis. *RNA Biol* 2017 Aug 17
113. Sanchez A, Mejias A, Tay Y. Competing Endogenous RNA Networks: Tying the Essential Knots for Cancer Biology and Therapeutics *J Hematol Oncol*, Mar 2015
114. Yue J. miRNA and vascular cell movement. *Adv. Drug Deliv* 2011; 63(8): 616–22.
115. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschli T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs. *Nature* 2005; 438(7068): 685–9. DOI: 10.1038/nature04303
116. Young JA, Ting KK, Li J, Moller T, Dunn L, Lu Y, et al. Regulation of vascular leak and recovery from ischemic injury by general and VE-cadherin-restricted miRNA antagonists of miR-27". *Blood* 2013; 122(16): 2911–9. doi: 10.1182/blood-2012-12-473017
117. Zhao Y, Ting KK, Li J, Cogger VC, Chen J, Jhonsson-Pervical A, et al. Targeting vascular endothelial-cadherin in tumor-associated blood vessels promotes T cell-mediated immunotherapy. *Cancer Research* 2017; 77(16): 4434-47. doi: 10.1158/0008-5472
118. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, et al. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 2011; 474(7353): 649–53. doi: 10.1038/nature10112

119. Kahn CR. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metab Clin Exp* 1978; 27(12 Suppl 2): 1893–902. PMID:723640
120. Gao J, Liu QG. The role of miR-26 in tumors and normal tissues (Review). *Oncol Lett* 2011; 2(6): 1019–23. DOI: 10.3892/ol.2011.413
121. Leeper NJ, Raiesdana A, Kojima Y, Chun HJ, Azuma J, et al. MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function. *J Cell Physiol* 2011; 226(4): 1035–43. doi: 10.1002/jcp.22422
122. Dang X, Ma A, Yang L, Hu H, Zhu B, Shang D, et al. MicroRNA-26a regulates tumorigenic properties of EZH2 in human lung carcinoma cells. *Cancer Genet* 2012; 205(3): 113–23. doi: 10.1016/j.cancergen.2012.01.002
123. Reuland SN, Smith SM, Bemis LT, Goldstein NB, Almeida A, Partyka KA, et al. MicroRNA-26a is Strongly Downregulated in Melanoma and Induces Cell Death through Repression of Silencer of Death Domains (SODD). *Journal of Investigative Dermatology* 2013; 133(5): 1286–93. doi: 10.1038/jid.2012.400
124. Ek4- Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death and Differentiation* 2016; 23: 1128–39. doi: 10.1038/cdd.2015.168; published online 12 February 2016
125. Ek6- Li S, Hu C, Li J, Liu L, Jing W, Tang W, et al. Effect of miR-26a-5p on the Wnt/Ca²⁺ Pathway and Osteogenic Differentiation of Mouse Adipose-Derived Mesenchymal. *Stem Cells Calcif Tissue Int* 2016; 99: 174–86. DOI 10.1007/s00223-016-0137-3
126. Ek5- Zhang X, Li Y, Chen YE, Chen J, Ma PX. Cell-free 3D scaffold with two-stage delivery of miRNA-26a to regenerate critical-sized bone defects. *Nature Communications* 2016; 7: 10376. DOI: 10.1038/ncomms10376
127. Ek7- Paquet J, Moya A, Bensidhoum M, Petite H. Engineered cell free scaffold with two-stage delivery of miRNA26a for bone repair. *Ann Transl Med* 2016; 4(10): 204. doi: 10.21037/atm.2016.05.28

128. Ek3- Kim K, Kim JH, Kim I, Lee J, Seong S, Park YW, Kim N. MicroRNA-26a Regulates RANKL-Induced Osteoclast Formation. *Mol Cells* 2015; 38(1): 75-80. <http://dx.doi.org/10.14348/molcells.2015.2241>
129. Ek1- Tan X, Fan S, Wu W, Zhang Y. MicroRNA-26a inhibits osteosarcoma cell proliferation by targeting IGF-1. *Bone Research* 2015; 3, 15033. doi:10.1038/boneres2015.33
130. Ek2- Wang J, Sun G. FOXO1-MALAT1-miR-26a-5p Feedback Loop Mediates Proliferation and Migration in Osteosarcoma Cells. *ORM-A-1154* provisionally accepted 2/1/2017 for publication in *Oncology Research* DOI: 10.3727/096504017X14859934460780
131. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 2001; 107(7): 823–6. PMID:11779458
132. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. Mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 2007; 26(42): 6133–40. DOI: 10.1038/sj.onc.1210436
133. Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, et al. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Research* 2006; 66 (24): 11590–3.
134. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104 (40): 15805–10. DOI:10.1073/pnas.0707628104
135. Ko JY, Chuang PC, Ke HJ, Chen YS, Sun YC, Wang FS. MicroRNA-29a mitigates glucocorticoid induction of bone loss and fatty marrow by rescuing Runx2 acetylation *Bone* 2015; 81: 80-8.
136. Ek8. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics* 2012; 44: 237–44.

137. Ek9. Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: Regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009; 108(1): 216–24.
138. Ek10. Kapinas K, Kessler C, Ricks T, Gronowicz G, Delany AM. miR-29 modulates wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 33: 25221–31.
139. Ek11. Ko JY, Chuang PC, Chen MW, Ke HC, Wu SL, Chang YH, Chen YS, Wang FS. MicroRNA-29a ameliorates glucocorticoid-induced suppression of osteoblast differentiation by regulating β -catenin acetylation. *Bone* 2013; 57(2): 468-75. doi: 10.1016/j.bone.2013.09.019.
140. Ivey KN, Muth A, Arnold J, King FW, Yeh RF, Fish JE, et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2(3): 219–29. doi: 10.1016/j.stem.2008.01.016
141. Chiba Y, Misawa M. MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: MiR-133a and bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in asthma. *J Pharmacol Sci* 2010; 114(3): 264–8.
142. Chavali V, Tyagi SC, Mishra PK. Differential expression of dicer, miRNAs, and inflammatory markers in diabetic Ins2^{+/-} Akita hearts. *Cell Biochem. Biophys* 2014; 68(1): 25–35. DOI: 10.1007/s12013-013-9679-4
143. Castaño IM, Curtin CM, Duffy GP, O'Brien FJ. Next generation bone tissue engineering: non-viral miR-133a inhibition using collagen-nanohydroxyapatite scaffolds rapidly enhances osteogenesis. *Sci Rep* 2016; 6: 27941. doi: 10.1038/srep27941
144. Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 2001; 294(5543): 797–9. DOI:10.1126/science.1066315
145. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev* 2011; 91: 827-87.
146. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE* 2008; 3: e3148

147. Steer CJ, Subramanian S. Circulating MicroRNAs as Biomarkers: A New Frontier in Diagnostics. *Liver Transpl*. 2012; 18: 265-9.
148. Sonkoly E, Pivarcsi A. Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. *J Cell Mol Med* 2009; 13(1): 24-38.
149. Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res* 2010; 70(18): 7027-30.
150. Henry JC, Azevedo-Pouly AC, Schmittgen TD. MicroRNA replacement therapy for cancer. *Pharm Res* 2011; 28(12): 3030-42.
151. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003; 35(3): 215–7. Epub 2003 Oct 5. Erratum in: *Nat Genet* 2003; 35(3): 287.
152. Gaur T, Hussain S, Mudhasani R, Parulkar I, Colby JL, Frederick D. Dicer inactivation in osteoprogenitor cells compromises fetal survival and bone formation, while excision in differentiated osteoblasts increases bone mass in the adult mouse. *Dev Biol* 2010; 340(1): 10–21.
153. Mizoguchi F, Izu Y, Hayata T, Hemmi H, Nakashima K, Nakamura T, et al. Osteoclast-specific Dicer gene deficiency suppresses osteoclastic bone resorption. *J Cell Biochem* 2010; 109(5): 866–75.
154. Alison J. Kriegel, Yong Liu, Yi Fang, Xiaoqiang Ding and Mingyu Liang The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury *Physiol. Genomics* 2011; 44: 237-44. First published 3 January 2012; doi: 10.1152/physiolgenomics.00141.2011
155. Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, Aqeilan RI, Garzon R, Croce CM, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2009; 284: 15676–84.
156. Liu Y, Taylor NE, Lu L, Usa K, Cowley AW Jr, Ferreri NR, Yeo NC, Liang M. Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes. *Hypertension* 2010; 55: 974–82.

157. Tian Z, Greene AS, Pietrusz JL, Matus IR, Liang M. MicroRNA target pairs in the rat kidney identified by microRNA microarray, proteomic, and bioinformatic analysis. *Genome Res* 2008; 18: 404–11.
158. Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 13027–32.
159. Qin W, Chung AC, Huang XR, Meng XM, Hui DS, Yu CM, Sung JJ, Lan HY. TGF- β /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1462–74.
160. Pandit KV, Milosevic J, Kaminski N. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res* 2011; 157: 191–9.
161. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, Luedde T. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* 2011; 53: 209–18.
162. Maurer B, Stanczyk J, Jungel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, Kowal-Bielecka O, Gay RE, Michel BA, Distler JH, Gay S, Distler O. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 1733–43.
163. Du B, Ma LM, Huang MB, Zhou H, Huang HL, Shao P, Chen YQ, Qu LH. High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells. *FEBS Lett* 2010; 584: 811–6.
164. Luna C, Li G, Qiu J, Epstein DL, Gonzalez P. Cross-talk between miR-29 and transforming growth factor- β s in trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2011; 52: 3567–72.
165. Kapinas K, Kessler C, Ricks T, Gronowicz G, Delany AM. miR-29 Modulates Wnt Signaling in Human Osteoblasts through a Positive Feedback Loop Received for publication, February 19, 2010, and in revised form, May 25, 2010 Published, JBC Papers in Press, June 15, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.116137

166. Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *J Cell Biochem* 2009; 108(1): 216-24. doi: 10.1002/jcb.22243.
167. Zhang Y, Xie RL, Gordon J, LeBlanc K, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein GS. Control of Mesenchymal Lineage Progression by MicroRNAs Targeting Skeletal Gene Regulators Trps1 and Runx2. *J Biological Chemistry* 2012; 287(26): 21926–35.
168. Zhang Y, Xie RL, Croce CM, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein GS. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(24): 9863-8. doi: 10.1073/pnas.1018493108. Epub 2011 May 31.
169. Panizo S, Carrillo-Lopez N, Naves-Diaz M, Solache-Berrocal G, Martinez-Arias L. Regulation of miR-29b and miR-30c by vitamin D receptor activators contributes to attenuate uraemia-induced cardiac fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2017; 1–10.
170. Trompeter HI, Dreesen J, Hermann E, Iwaniuk KM, Hafner M, Renwick N, Tuschl T, Wernet P. MicroRNAs miR-26a, miR-26b, and miR-29b accelerate osteogenic differentiation of unrestricted somatic stem cells from human cord blood. *BMC Genomics*. 2013; 14: 111. doi: 10.1186/1471-2164-14-111.
171. Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(37): 13906-11.
172. Wang Z, Lu Y, Zhang X, Ren X, Wang Y. Intractable. Serum microRNA is a promising biomarker for osteogenesis imperfecta & Rare Diseases Research 2012; 1(2): 81-5.

10. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı.

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

2016

KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA
	TELEFON	0 (242) 249 69 54
	FAKS	0 (242) 249 69 03
	E-POSTA	etik@akdeniz.edu.tr
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Doç.Dr.Banu NUR
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Osteogenesis İmperfektalı Hastalarda Serum miRNA (miR-26a, miR-29a, miR-133a) Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 137	Tarih: 24.02.2016
	Yukarıda bilgileri verilen çalışmanın bütçesinin Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açısından sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.	
	Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr. Arda TAŞATARGİL
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr. Arda TAŞATARGİL
Başkan

Öğr.Gör.Dr.M. Levent ÖZGÖNÜL
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Can ÇEVİKOL
Üye

Prof.Dr.Murat CANPOLAT
Üye

Prof.Dr.Dilara İNAN
Üye (İzinli)

Prof.Dr.Necmiye HADİMOĞLU
Üye (İzinli)

Prof.Dr.Gülşay ÖZBİLİM
Üye (İzinli)

Doç.Dr.Gülşüm Özge BAYSAL
Üye

Doç.Dr.Mehtap TÜRKAY
Üye

Doç.Dr.Doga TÜRKAKHRAMAN
Üye

Doç.Dr.Ali Bekir AYER
Üye

Doç.Dr.Dijle KİPMEN KORGUN
Üye

Av.Mustafa AÇIKEL

Turgut ALTUN