

# Osteoartrit Tanısı Konmuş Hasta Bireylerde *Smad3* Gen Mutasyonlarının Analizi

## The Analysis of *Smad3* Gene Mutations in Patients with Osteoarthritis

Mustafa SOYÖZ,<sup>a</sup>  
Nurten ÖZÇELİK,<sup>a</sup>  
Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU,<sup>a</sup>  
Dr. Selami AKKUŞ,<sup>b</sup>  
Dr. Erdem İLGÜN<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Tıbbi Biyoloji AD,  
<sup>b</sup>Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon AD,  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Tıp Fakültesi, Isparta  
<sup>c</sup>Fizik Tedavi Bölümü,  
Siloipi Devlet Hastanesi, Sinop

Geliş Tarihi/Received: 04.11.2009  
Kabul Tarihi/Accepted: 22.02.2010

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Mustafa SOYÖZ  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyoloji AD, Isparta,  
TÜRKİYE/TURKEY  
e-mail: mssoyoz@yahoo.com

**ÖZET Amaç:** Eklem kırırdağının harabiyeti ile karakterize bir hastalık olan osteoartrit (OA), insanları etkileyen eklem hastalıklarından en yaygın olanıdır. Transforming growth faktör-beta (TGF- $\beta$ ) sinyal yolunun aracı molekülü olan *Smad3*, kondrositlerin olgunlaşma sürecinde inhibitör etkiler oluşturur. Çalışmamızda, primer diz osteoartriti ve *Smad3* genindeki nükleotid değişimleri arasındaki ilişki araştırıldı. **Gereç ve Yöntemler:** Primer diz OA'lı olgu (n=92) ve kontrol bireylerde (n=87) *Smad3* geni, polimeraz zincir reaksiyonu-tek zincir konformasyon polimorfizim (PCR-SSCP) analiziyle mutasyonlar açısından tarandı. SSCP'de farklı bant paterni gözlenen bireylere DNA dizi analizi yapıldı. İntron 2'nin 59. pozisyonunda G→C transversiyonu PCR/RFLP yöntemi ile tarandı. **Bulgular:** İntron 2'nin 59. pozisyonunda G→C transversiyonu, 103. kodonda sessiz A→G transisyonu ve 170. kodonun ikinci pozisyonunda A→G transisyonu olmak üzere üç farklı tek nükleotid polimorfizimi (SNP) tespit edildi. İntron 2'nin 59. pozisyonundaki G/C allel frekansları değerlendirildiğinde OA hastaları ve kontrol grubu (P= 0,030) ile şiddetli OA hastaları ve kontrol grubu (P= 0,037) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunurken, genotip frekansları açısından farklılık tespit edilmedi. C allel frekansının radyografik olarak şiddetli OA hastalarında farklı olması, C allelinin hastalığın şiddeti ile ilişkili olabileceğini gösterdi. **Sonuç:** *Smad3* geninde ilk defa OA ile ilişkilendirilen bir bölgeyi tespit ettiğimiz ve bu bölgenin frekanslarının hızlı bir şekilde çalışılması için Bme1390I enzim kesim metodu geliştirdiğimiz çalışmamızın, osteoartrit ile ilgili çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Mutasyon; osteoartrit; çok biçimlilik, tek nükleotid; dönüştürücü büyüme faktörü beta; *Smad3* proteini

**ABSTRACT Objective:** Osteoarthritis (OA) which is a disease characterized by the destruction of joint cartilage is one of the most common joint diseases that affect human beings. *Smad3* is the mediator molecule of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) signal pathway and it generates inhibitory effects in the maturation process of chondrocytes. In our study, the relationship between primary knee osteoarthritis and nucleotide changes in *Smad3* gene was investigated. **Material and Methods:** *Smad3* gene was scanned in the patients with primary knee osteoarthritis (n=92) and in controls (n=87) with single strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction (PCR-SSCP) in terms of mutations. DNA sequence analysis was performed for the patients with distinct band pattern in SSCP. G→C transversion in the 59<sup>th</sup> position of intron 2 was scanned with PCR/RFLP method. **Results:** Three distinct single nucleotide polymorphisms (SNP) were detected including G→C transversion in the 59<sup>th</sup> position of intron 2, silent A→G transition on the codon 103 and A→G transition on the second position of codon 170. While statistically significant differences were found between OA patients and control group (P= 0,030) and severe OA patients and control group (P= 0,037) when the G/C allele frequencies in the 59<sup>th</sup> position of intron 2 were evaluated, no difference was found in terms of genotype frequencies. The difference of C allele frequency in radiologically severe OA patients suggested that C allele could be related to the severity of the disease. **Conclusion:** We detected a region on *Smad3* gene associated with OA for the first time in our study and developed Bme 1390I enzyme cut method for a rapid investigation of the frequencies of this region; we believe that our study will enlighten the studies about osteoarthritis.

**Key Words:** Mutation; osteoarthritis; polymorphism, single nucleotide; transforming growth factor beta; *Smad3* protein

doi:10.5336/medsci.2009-16002

Copyright © 2011 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31(1):22-9

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

Transforming growth faktör  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ailesi gelişimi çok yönlü kontrol eden ekstraselüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubunu oluşturur. Hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahip TGF- $\beta$  ailesi, çok sayıda yapısal olarak benzer polipeptid büyüme faktörleri içerir. TGF- $\beta$  ailesi, organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostasisinde ve onarımında çok önemli rol oynar. Bu faktörlerin tümü, hücre içi sinyallerin düzenlenmesinde büyük yer tutar.<sup>3</sup> TGF- $\beta$  ailesi üyeleri, transmembran proteinlerden olan serin/treonin kinaz aktivitesine sahip TGF- $\beta$  reseptör ailesine sinyal iletirler. TGF- $\beta$  reseptörleri, yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre tip I ve tip II olmak üzere ikiye ayrılır. Tip II reseptörün aracılık yaparak tip I reseptörü aktive etmesi TGF- $\beta$  sinyallerinin başlamasına neden olur. Aktive olan tip I reseptör, hücre çekirdeğine sinyal taşıyan SMAD proteinlerini fosforlar ve aktive eder. SMAD ailesine ait proteinler, tip I reseptör kinazların tanımlanmış ilk substratlarıdır ve reseptör sinyallerinin hücre çekirdeği içindeki hedef genlere iletiminde merkezi bir rol oynarlar.<sup>4-6</sup>

Yapısal ve fonksiyonel etkenler göz önünde tutulduğunda, SMAD'lar üç ayrı alt gruba ayrılırlar: (a) Reseptör ile regüle edilen SMAD'lar (R-Smad'lar); TGF- $\beta$  ailesi reseptör kinazlarının direkt substratlarıdır. (b) Common-partner SMAD'lar (Co-Smad'lar); R-Smad'larla birleşerek sinyal iletimine katılan SMAD'lar ve (c) İnhibitör SMAD'lar (I-Smad'lar); diğer iki grubun sinyal fonksiyonunu inhibe eden antagonist SMAD'lardır.<sup>6,7</sup>

SMAD'lar serbest halde homo-oligomerler olarak bulunurlar. Reseptör kompleks ligandın bağlanmasıyla aktive olduktan sonra, tip I reseptör kinazlar spesifik SMAD'ları fosforile eder, fosforile olan SMAD'lar *Smad4* ile birleşerek hücre çekirdeğine taşınırlar. Bu kompleksler çekirdek içinde yalnız veya DNA-bağlanma altbirimi ile birleşik halde bulunabilir ve spesifik promotör elemanlarına bağlanarak hedef genleri aktive ederler.<sup>3,6,7</sup>

TGF- $\beta$  ailesinin, kondrosit büyüme ve farklılaşmasında anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir.<sup>8</sup> TGF- $\beta$ 'lar çok farklı hücre tiplerinde üretilmesine rağmen kemikteki konsantrasyonları diğer dokulardan 100 kat daha fazladır ve osteoblastlar yüksek konsantrasyonlarda TGF- $\beta$  reseptörleri içerirler.<sup>9</sup> TGF- $\beta$  ailesi, eklem kondrositlerinde proliferasyonu, hücre dışı matriksi ve/veya farklılaşmasını kontrol eder. Kıkırdakta proliferen olan kondrositlerde *Smad2*'nin ekspresyonu fazla olurken, *Smad3*'ün genelde olgunlaşan kondrositlerde eksprese olduğu görülmüştür. *Smad4* genel olarak epifiziyal plağın bütün bölgelerinde eksprese olur ve inhibitör Smad'lar 6 ve 7, olgun kondrositleri bulduran bütün kıkırdak bölgelerinde kuvvetli bir şekilde eksprese olur. Ayrıca TGF- $\beta$ /*Smad3* sinyalleri, kondrositlerin terminal hipertrofik farklılaşmasını inhibe eder ve eklem kıkırdağının bütünlüğünün korunması için gereklidir.<sup>10</sup> Osteoartritli hastalarla yapılan mutasyon çalışmasında bir hastada *Smad3* gen mutasyonu tespit edilmiş ve *Smad3* genindeki mutasyonun insanda OA'ye yakınlık oluşturabilecek olası bir faktör olabileceği bildirilmiştir.<sup>1</sup>

Bu çalışmanın temel amacı, *Smad3* genindeki nükleotid değişimlerinin OA patogenezi ile ilişkisini araştırmak ve bu değişimlerin Türk popülasyonundaki frekanslarını ortaya koymaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### ÇALIŞMA GRUBU

Çalışma grubu için, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Polikliniğine başvuran toplam 179 olgudan toplanan periferik kan örnekleri kullanıldı. Hasta ve kontrol olmak üzere

iki çalışma grubu oluşturuldu. (I) Kontrol Grubu; uluslararası osteoartrit kriterleri dışında kalan 87 gönüllü bireyden, (II) Hasta Grubu; uluslararası kriterlere göre primer diz osteoartriti tanısı konmuş 92 gönüllü hasta bireyden oluştu. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalında fizik muayene ile tanı konulan ve radyografi ile doğrulan primer osteoartrit vakaları çalışmaya dâhil edildi.

OA değerlendirmesinde, yaygın olarak kullanılan Kellgren skalası<sup>11</sup> kullanıldı ve 1, 2, 3, 4 olarak skorlandı. Buna göre 1 ve 2 orta şiddette, 3 ve 4 şiddetli olarak değerlendirildi. Ayrıca radyografide osteofit bakımından da değerlendirme yapılarak skorlandı (0-3). Hastaların tutulan eklem sayıları da değerlendirmeye alındı. Hasta grubuna dâhil edilen bireylerin, yaş, boy, kilo, ilk belirtilerin görüldüğü yaş gibi özellikleri de ayrıca sorgulandı. Kontrol bireyler belirlenirken, yaşlarının hasta grubunun yaş ortalamasına yakın olmasına özen gösterildi.

Çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındı. Ayrıca çalışmaya katılan her gönüllü için hasta onam formları dolduruldu.

## MOLEKÜLER ANALİZLER

DNA örnekleri, 9 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan periferik kandan tuzla çöktürme yöntemi ile izole edildi.<sup>12</sup> *Smad3* geninin kodlayan bölgelerini tarayabilmek için ilk olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile dokuz ekzonun amplifikasyonu yapıldı.

Dokuz ekzonun PCR şartları, Fukushima ve ark.<sup>13</sup> metodu modifiye edilerek optimize edildi. Tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP) analizi için %12.5'lük (29:1) poliakrilamid jel kullanıldı. Örnekler 1100 voltta yürütüldükten sonra jeller gümüş nitratla boyama yöntemi ile boyandı.

SSCP değerlendirmelerinde ekzon 2 ve ekzon 3'de farklı bant paterni tespit edildi. Numunelerin DNA dizi analizi işlemleri REFGEN firması tarafından sağlanan ABI 3100 DNA Analizörü kullanılarak yapıldı.

Dizi analizinde yüksek oranda değişim görülen bölgenin intron 2'nin 59. nükleotidi olduğu tespit edildi. İtron 2'nin 59. bazındaki varyantın belirlenmesi için bu bölgeye özgü Bme1390I restriksiyon enzimi kullanıldı. Bu enzimin bölgeye özgüllüğü [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) web sitesinden bulundu. 37 °C'de 16 saat süre ile enzim kesimi yapılan amplifikasyon ürünleri, %2.5'lük agaroz jelde görüntüldü. Bireylerin genotipi normal (GG) ise 187 ve 64 bp büyüklüğünde bantlar gözlenirken, 28, 19, 12 ve 11 bp. uzunluğundaki kesim ürünleri küçük boyutta olduğundan jelde ayırt edilemez. Homozigot varyantlar (CC) ise 187 ve 83 bp uzunluktaki bant paternlerini verir. Heterozigot bireylerde (GC) ise 187, 83 ve 64 bp uzunluğundaki bantları elde ederiz.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS 10.0 paket programı kullanıldı. İsimsel değişkenler yüzde frekans olarak, sayısal değişkenler "ortalama ± standart sapma" olarak verildi. Osteoartrit hastaları ve kontrol popülasyonunun genotip ve allel frekans karşılaştırmalarında standart "ki-kare" ve "Fisher Exact" testleri kullanıldı. P <0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

### KLİNİK BULGULAR

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

Kellgren Lawrence (K/L) skalası radyografi üzerinde hastalığın şiddetini göstermektedir. Buna göre hastalardan elde edilen radyografik bulgular orta şiddetli (K/L 1 veya 2) ve şiddetli (K/L 3 veya 4) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Osteofitlere göre yapılan sınıflandırmada ise; 0= osteofit yok, 1= çok küçük osteofit, 2= anlamlılığı kesin olan osteofit, orta büyüklükte, 3= büyük osteofit olarak nitelendirildi. Hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyet, yaş ve beden kitle indeksi (BKİ) bakımından farklılık olmadığı gözlemlendi. Çalışmaya katılan primer

**TABLO 1:** Primer diz osteoartritli hastaların klinik özellikleri.

Özellikler	Bulgular
Yaş (yıl)	62.1 ± 8.7
Erkek/Kadın (n)	19/73
İlk görülme yaşı (yıl)	55.0 ± 7.8
Vücut kütle indeksi (kg/m <sup>2</sup> )	29.5 ± 4.5
Kellgren Lawrence skalası (n): 2/3/4	28/49/10
Osteofit (n): 0/1/2/3	3/26/32/26

diz OA'li hastaların klinik özellikleri Tablo 1'de verildi.

### MOLEKÜLER BULGULAR

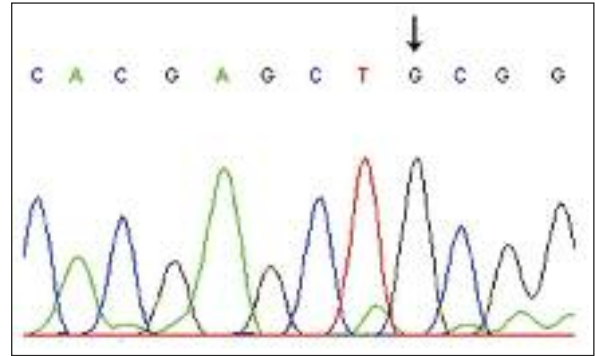
Primer diz osteoartriti tanısı konmuş 40 hasta ve 40 kontrol bireyin *Smad3* geninin dokuz ekzonu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile ön çalışma için çoğaltıldı ve PCR koşulları her ekzon için ayrı ayrı optimize edildi.

Tek nükleotid konformasyon polimorfizmi (SSCP) analizi sonucunda 1, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9. ekzonlar için farklı bir bant paterni gözlenmezken, ekzon 2 ve 3'de farklı bantlar tespit edildi.

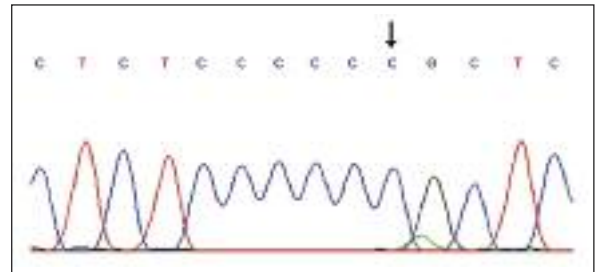
Ekzon 2'de gözlemlenen beş farklı bant paternine ait numunelerden örnekler seçilerek DNA dizi analizi yapıldı. Dizi analizi yapılan bireylerde iki ayrı bölgede baz değişimi gözlemlendi. Bunlardan birincisi ekzon 2'nin 103. kodonundaki sessiz A → G transisyonu olarak saptandı. Bu bölgede CTG ve

CTA/CTG genotipi belirlendi, fakat CTA genotipi gözlenmedi. İkinci baz değişimi ise intron 2'nin 59. pozisyonundaki G → C transisyonu olarak belirlendi (Şekil 1a, 1b).

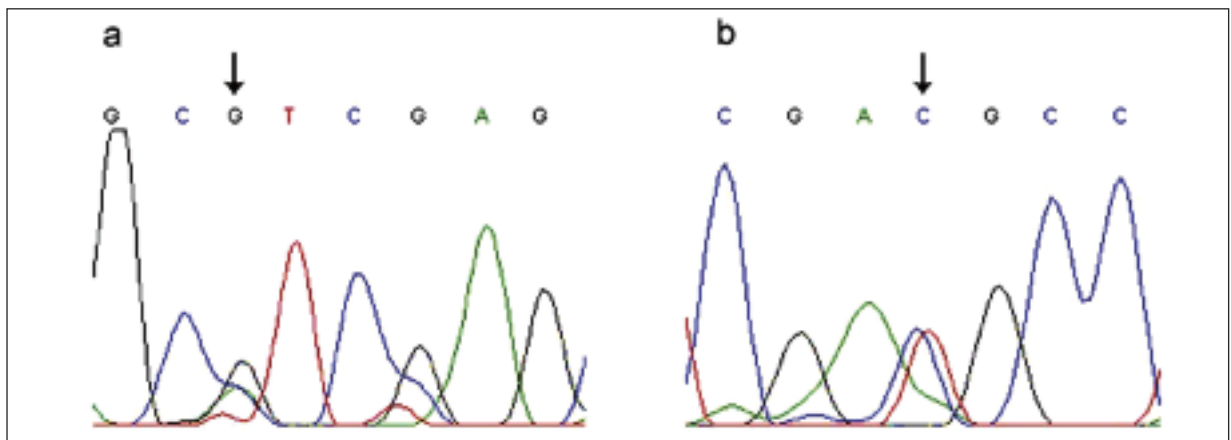
Ekzon 3'de normallerden farklı olarak dört bireyde aynı karakterde bant kaymaları tespit edildi. Ekzon 3'ün dizi analiz sonuçlarında *Smad3* geninin 170. kodonunun ikinci pozisyonunda A → G tran-



ŞEKİL 1a: Ekzon 2'nin 103. kodonundaki sessiz A→G transisyonu.



ŞEKİL 1b: İtron 2'nin 59. pozisyonundaki G→C transisyonu.



ŞEKİL 2: a. Ekzon 3'ün 170. kodonundaki A→G transisyonu. b. Ekzon 3'ün 170. kodonundaki A→G transisyonunu doğrulamak için ters dizi analizi.

**TABLO 2:** Bme1390I enzim kesimi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki allel frekansları.

Allel	Kontrol		OA		P	OO (%95 GA)	Toplam	
	Sayı	(%)	Sayı	%			Sayı	%
G	92	52.9	78	42.3	0.030	1.525 (1.005-2.314)	170	47.4
C	82	47.1	106	57.7			188	52.6

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

**TABLO 3:** Bme1390I enzim kesimi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip dağılımı.

Genotip	Kontrol		Hasta		Toplam	
	Birey Sayısı	Frekans (%)	Birey Sayısı	%	Birey Sayısı	%
GG	28	32.2	22	23.9	50	27.9
GC	36	41.4	34	37.0	70	39.1
CC	23	26.4	36	39.1	59	33
	87		92		179	
P= 0.173						

P: P değeri.

**TABLO 4:** Osteoartrit başlama yaşı ve Bme1390I polimorfizmi genotip ve allel frekansları.

Genotip	OA Başlama Yaşı (yıl)		Allel	OA Başlama Yaşı (yıl)	
	Erken	Geç		Erken	Geç
GG	6 (15.8)	13 (26.0)	G	29 (38.2)	42 (42.0)
GC	17 (44.7)	16 (32.0)	C	47 (61.8)	58 (58.0)
CC	15 (39.5)	21 (42.0)			
P <sup>a</sup> = 0.37			OO (%95 GA) 0.85 (0.46-1.57) P <sup>b</sup> = 0.36		

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

sisyonu olduğu tespit edildi. Bu transisyon sonucu izolösin (CAT) aminoasidinin yerine valin aminoasidinin (CGT) geçtiği belirlendi (Şekil 2).

DNA dizi analizi yapılmayan fakat aynı bant paternine sahip olan diğer bireylere ait DNA örneklerinde intron 2'nin 59. pozisyonundaki G → C transversiyonu, Bme1390I enzimi kullanılarak parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile tarandı. Ön çalışmada kullanılan hasta ve kontrol bireylerinin sayısı artırılarak enzim kesimi için 92 hasta ve 87 kontrol olmak üzere, toplam 179 bireyin DNA örnekleri kullanıldı.

İntron 2'nin Bme1390I polimorfizmi allel frekansı açısından değerlendirildiğinde, OA hastaları ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak an-

lamlı bir farklılık tespit edildi [Olasılıklar oranı (OO)= 1.525, %95; güven aralığı (GA)=1.005-2.314; p= 0.030) (Tablo 2). Buna rağmen genotip ayrımı göz önüne alındığında istatistiksel açıdan herhangi bir anlamlılık bulunamadı (Tablo 3).

İntron 2'nin Bme1390I polimorfizminin allel frekansı, hasta grubundaki kadın ve erkekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (OO= 2.21, %95; GA= 1.07-4.56; p= 0.02). Genotip frekansında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık bulunamadı. Ayrıca, erkekler ve kadınlar ayrı ayrı değerlendirmeye alındığında da farklılık görülmedi.

OA başlama yaşını değerlendirmek için, 55 yaş altı bireyler erken dönem, 55 yaş üstü ise geç dönem olarak belirlendi. Yapılan istatistiksel analizler

**TABLO 5:** Kellgren Lawrence skalası ve Bme1390I polimorfizmi genotip ve allel frekansları.

Genotip	K/L Skalası		Allel	K/L Skalası	
	Orta	Şiddetli		Orta	Şiddetli
GG	6 (21.4)	14 (23.7)	G	22 (39.3)	49 (41.5)
GC	10 (35.7)	21 (35.6)	C	34 (60.7)	69 (58.5)
CC	12 (42.9)	24 (40.7)			
	$P^a= 0.18$			OO (%95 GA)	
	$P^b= 0.24$			0.58 (0.31-1.07)	$P^c= 0.053$
				0.63 (0.40-1.02)	$P^d= 0.037$

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

sonucunda, başlama yaşı ve intron 2 Bme1390I polimorfizmi allel ve genotip frekansları arasında herhangi bir anlam bulunamadı (Tablo 4).

Orta şiddetli ve şiddetli OA hastalarının Bme1390I polimorfizmi genotip frekansı, kontrol bireyler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $P^a= 0.18$ ;  $P^b= 0.24$ ). Allel frekansları kontroller ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında ise şiddetli OA hastaları ile kontrol grubu Bme1390I polimorfizmi arasında anlamlı bir fark tespit edilirken ( $P^d= 0.037$ ), orta şiddetli OA hastaları ve kontroller arasında fark yoktu ( $P^c= 0.053$ ) (Tablo 5).

Bme1390I polimorfizmi, normal ve kilolu bireyler arasında karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ( $P= 0.31$ ). Aşırı kilolu (BKİ>30) bireyler normal bireylerle değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $P= 0.22$ ). Bunun yanında hasta ve kontrol grupları arasında da BKİ açısından bir ilişki gözlenmedi ( $P= 0.30$ ).

## TARTIŞMA

TGF- $\beta$ /*Smad3* sinyalleri, kondrositlerin terminal hipertrofik farklılaşmasını inhibe eder ve eklem kıkırdığının bütünlüğünün korunması için gereklidir. *Smad3*'ün ekzon8'i hasara uğratılan homozigot mutant bir farede insan OA'ne benzer dejeneratif eklem hastalığı geliştiği bildirilmektedir. *Smad* proteinlerinin kondrosit metabolizması üzerine TGF- $\beta$  etkilerinde aracı rolü oynadığı araştırılmış, *Smad2* ve *Smad3*'ün kondrosit olgunlaşmasında TGF- $\beta$ 1

sinyallerine inhibitör etkiler oluşturan önemli araçlar olarak rol aldıkları tespit edilmiştir.<sup>10</sup>

TGF- $\beta$ 'nın büyüme hormonu olması, araştırmacıları daha çok kanser çalışmaları üzerine yoğunlaştırmıştır, OA patogenezindeki rolü ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Osteoartrit çalışmalarında bazı genlerin OA ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Özellikle kıkırdak bileşenlerini oluşturan proteinleri kodlayan genler ilk etapta aday genler listesine alınmış ve bunlar üzerine çalışmalar yürütülmüştür. Kıkırdak bileşenlerini kodlayan genlerin yanında, bu genlerin aktivitesini kontrol edecek molekülleri kodlayan genlerin de osteoartritte önemli rolü olacağı düşünülerek, TGF- $\beta$  sinyal iletim yolundaki aracı molekül olan *Smad3* genindeki mutasyonların veya polimorfizimlerin hastalıkla ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Dizi analizi sonuçlarımıza göre, *Smad3* geninin 170. kodonunda izolösini kodlayan "CAT" kodonu, A  $\rightarrow$  G transisyonu sonucu valin aminoasidini kodlayan "CGT" tripletine dönüşmüştür. Yüz yetmişinci kodon *Smad3* geninin çok önemli fosforilasyon alanları içeren bağlantı bölgesinde yer alır. Çok sayıda serin ve treonin rezidüsü içeren bu bağlantı bölgesindeki farklılıklar, R-*Smad*'ların çok yönlü sinyal girişi ile düzenlenmesine olanak sağlamaktadır.<sup>14</sup>

Ekzon 3 üzerindeki varyantın tek nükleotid polimorfizim (SNP) veri bankasına "rs35874463" kodu ile kayıtlı olduğunu tespit ettik. Buradaki verilere göre, tamamı kadınlardan oluşan bir popülasyon taraması esnasında 32 birey değerlendirilmiş,

allel frekansları A: 0.938 ve G: 0.062 olarak belirlenmiş, genotip frekansları ise A/A: 0.875, A/G: 0.125 olarak verilmiştir. Çalışmamızda ise A/G genotipine sahip bireylerin üçü kadın, biri erkekti. Genotip ve allel frekanslarını hesap etmek için, SSCP yapılan hasta ve kontrol grupları birleştirilerek 80 birey değerlendirmeye alındı. Sonuçlarımıza göre, allel frekansı; A: 0.975, G: 0.025, genotip frekansı A/A: 0.95, A/G: 0.05 olarak bulundu. Türk popülasyonu için ilk defa verilen ekzon 3'deki tek nükleotid polimorfizm frekansının kullanılmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

Yaptığımız araştırmalarda, bulduğumuz SNP ile ilgili herhangi bir bağlantı çalışmasına rastlamadık. Bulgularımıza göre *Smad3* geni ekzon 3 bölgesindeki polimorfizmin, primer diz osteoartriti ile ilişkisi olabileceğini düşünüyoruz. *Smad3* geninin genomik yapısını ve kolon kanserinde gen üzerindeki farklılıkları yayınlayan Arai ve ark.<sup>15</sup> ile yine kolon kanserinde *Smad3* genini çalışan Fukushima ve ark.,<sup>13</sup> belirlediğimiz SNP ile ilgili bir bulguya rastlamamışlardır.

*Smad3* geni, Çin popülasyonunda 32 OA'li hasta ve 50 kontrol bireyde çalışılmış, bir hastada, ekzon 4'de 197. kodonda tek nükleotid mutasyonu bulunmuş ve mutasyon OA ile ilişkilendirilmiştir.<sup>1</sup> Bulgularımızda ekzon 4 bölgesinde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Bulgulardaki farklılıkların, mutasyonların ve SNP'lerin popülasyonlara göre çeşitlilik göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yüz üçüncü kodonda meydana gelen A → G transisyonu neticesinde bir sessiz mutasyon ortaya çıkmakta ve oluşan kodon yine lösin aminoasitini kodlamaktadır. Bu bölge, *Smad3* yapısal elemanlarından MH1 domaini içerisinde bulunur. MH1 domaini diziyeye özgül DNA bağlanma özelliği olan bölgedir ve *Smad3* proteinin fonksiyonunda önemli bir yere sahiptir.<sup>16</sup>

Yüz üçüncü kodondaki sessiz A→G transisyonu, SNP veritabanında "rs1065080" kodu ile tanımlanmaktadır. Elde ettiğimiz verilere paralel olarak değişik popülasyon frekanslarına ulaştık. Farklı popülasyonlarda da G/G genotipinin yaygın olarak bulunduğu tarafımızdan tespit edilmiştir.

*Smad3* geni üzerinde bulduğumuz diğer polimorfizm ise intron 2' nin 59. pozisyonunda G→C transversiyonudur. Bu polimorfizmi belirlemek için hızlı tarama yöntemi geliştirerek "CC / NGG" tanıma bölgesine sahip Bme1390I enzimi ile 59. pozisyonundaki G → C transversiyonu taraması yapılmıştır. İtron 2' nin 59. pozisyonundaki G → C transversiyonunu allel frekansı bakımından değerlendirdiğimizde, C allelinin OA'li hasta grubunda kontrol grubuna göre farklı olduğunu tespit ettik (p= 0.030). Bu çalışma, Isparta yöresinde primer diz osteoartriti ile *Smad3* geni Bme1390I polimorfizmi arasında bağlantı olduğunu ortaya koyan ilk çalışmadır.

Isparta ve yöresinde primer OA'li hasta grubunun C/C genotip frekansı (%39.1), Arai ve ark.<sup>15</sup> tarafından yapılan çalışmadaki Japon popülasyonunun C/C (%18) genotip frekansı ile karşılaştırıldığında, iki kat daha fazla fark olduğu gözlemlendi. Isparta ve yöresindeki çalışmamız için ortalama genotip frekansı ise G/G: %27.9 G/C:%39.1, CC: %33 olarak belirlendi.

Bme1390I polimorfizminin allel ve genotip frekansı cinsiyete göre değerlendirildiğinde, hasta grubundaki kadın ve erkekler arasında allel frekansı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p= 0.02). C alleli frekansı kadın hastalarda, erkeklere göre daha fazlaydı. Bulgularımız, cinsiyetin önemli bir risk faktörü olduğu primer OA'de, Bme1390I polimorfizmi ve cinsiyet arasındaki farklılıkları da ortaya koymuştur. Özellikle hasta ve kontrol kadın bireylerin C/C genotipi arasındaki farklılık dikkat çekicidir.

Şiddetli OA hastaları ve kontrol grubu ile Bme1390I polimorfizmi allel frekansı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın (p= 0.037) bulunması, C allelinin hastalığın şiddeti ile ilişkili olabileceğini düşündürdü. Biliyoruz ki, sadece bir faktör hastalığı ortaya çıkarmaya veya şiddetini belirlemeye yetmez. Çünkü osteoartrit multifaktöriyel bir hastalıktır ve çevre şartları da hastalığın oluşmasında ve ilerlemesinde önemli bir yer tutar. Örneğin, eğilme ve taşıma ile ilgili meslek grubu OA için risk altındadır ve genetik faktörlerin etkisi ile hastalığın şiddeti ortaya çıkabilir.

Ayrıca, normal ve kilolu bireyler arasında Bme1390I polimorfizmi değerlendirildiğinde, genotip ve allel frekansları bakımından anlamlı bir fark bulunamadı. Ayrıca hasta ve kontrol gruplarında, BKİ'nin OA ile ilişkisi değerlendirildiğinde farklılık olmadığı görüldü.

Birçok çalışmada TGF- $\beta$  sinyallerinin, eklem kıkırdığının normal yapısının korunmasında önemli bir role sahip olduğu bildirilmiş ve özellikle TGF- $\beta$ 1'in insan OA' i ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir.<sup>17</sup> Önceki çalışmalar, *Smad3* kaybını, immün yanıtın bozulması, azalan kemik yoğunluğu ve kolon kanseri ile ilişkilendirmiştir. *Smad3* ve OA ilişkisini ortaya koyan ilk çalışmada, bir hastanın dördüncü ekzonunda aminoasit değişimi ile sonuçlanan tek baz mutasyonu tespit edilmiş ve *Smad3* geni insan OA' i için muhtemel predispozan faktör olarak gösterilmiştir. *Smad3* gen mutasyonunun düşük frekansından dolayı, TGF- $\beta$ /*Smad3* sinyal iletiminin insan OA'den sorumlu majör yol olamayacağı da bildirilmiştir.<sup>1</sup>

Sonuç olarak, Isparta ve yöresinde yaygın olarak görülen osteoartrit *Smad3* genindeki nükleotid değişimleri ile bağlantısını araştırdığımız bu çalışmada, SSCP analizinde tanımladığımız farklı

bant paternlerinden yola çıkılarak, dizi analizi ile tek nükleotid polimorfizimleri tespit edilip OA ile ilişkisi incelendi. Tanımlanan tek nükleotid polimorfizimlerinden biri için hızlı tarama metodu geliştirilerek, allel frekansı açısından OA ile ilişkisi ortaya çıkarılmıştır. Türk popülasyonundaki bu polimorfizmin frekansını belirlemek için çalışmamızın bir ilk adım olabileceği kanaatindeyiz. Ayrıca, *Smad3* proteini fonksiyonunda önemli bir yer tutan, ekzon 3 tarafından kodlanan bağlantı bölgesinde tanımladığımız SNP'in osteoartrit ile ilişkili olabileceği ilk defa bu çalışma ile ortaya konmaktadır. Çalışmanın devamında bu bölge için hızlı tarama metodu geliştirilerek hastalıkla ilişkisini tespit etmek ve Türk popülasyonu frekansını belirlemek amaçlanmaktadır. Bunun yanı sıra, TGF- $\beta$  sinyal iletim yolundaki diğer aracı proteinleri kodlayan genleri de tarayarak osteoartrit hastaları için TGF- $\beta$  sinyal iletim yolu haplotipinin ortaya konması hedeflenmektedir.

### Teşekkür

*Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından 908-D-04 proje numarası ile desteklenmiştir. İstatistiksel analizlerde yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr Ersin Uskun'a (Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı AD) teşekkür ederiz.*

### KAYNAKLAR

1. Yao JY, Wang Y, An J, Mao CM, Hou N, Lv YX, et al. Mutation analysis of the Smad3 gene in human osteoarthritis. *Eur J Hum Genet* 2003;11(9):714-7.
2. Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12(Suppl A):S39-44.
3. Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-91.
4. Mathews LS, Vale WW. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 1991;65(6):973-82.
5. Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390(6659):465-71.
6. Soyöz M, Özçelik N. [TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) and signal transduction: medical education]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007;27(3):426-33.
7. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000;267(24):6954-67.
8. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998;(346):26-37.
9. Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, et al. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *J Cell Biol* 1987;105(1):457-63.
10. Ferguson CM, Schwarz EM, Reynolds PR, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. Smad2 and 3 mediate transforming growth factor-beta1-induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology* 2000;141(12):4728-35.
11. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 1957;16(4):494-502.
12. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.
13. Fukushima T, Mashiko M, Takita K, Otake T, Endo Y, Sekikawa K, et al. Mutational analysis of TGF-beta type II receptor, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6 and Smad7 genes in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2003;22(2):315-20.
14. Sapkota G, Knockaert M, Alarcón C, Montalvo E, Brivanlou AH, Massagué J. Dephosphorylation of the linker regions of Smad1 and Smad2/3 by small C-terminal domain phosphatases has distinct outcomes for bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 2006;281(52):40412-9.
15. Arai T, Akiyama Y, Okabe S, Ando M, Endo M, Yuasa Y. Genomic structure of the human Smad3 gene and its infrequent alterations in colorectal cancers. *Cancer Lett* 1998;122(1-2):157-63.
16. Chai J, Wu JW, Yan N, Massagué J, Pavletich NP, Shi Y. Features of a Smad3 MH1-DNA complex. Roles of water and zinc in DNA binding. *J Biol Chem* 2003;278(22):20327-31.
17. Yamada Y, Okuizumi H, Miyauchi A, Takagi Y, Ikeda K, Harada A. Association of transforming growth factor beta1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women. *Arthritis Rheum* 2000;43(2):452-60.