



Kısa Boyluluğu Etkileyen Genetik Faktörlerin İncelenmesi*

Ebru ETEM
Semra KALKAN
Hüseyin YÜCE

Fırat Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

Kısa boy, genetik ve çevre faktörlerinin kontrolü altında olup genel popülasyonun % 2-3'ünü etkilemektedir. Short Stature Homeobox Gene (SHOX), X ve Y kromozomlarının kısa kollarının psödootozomal bölgelerinde yer almakta ve X inaktivasyonuna maruz kalmamaktadır. Gendeki delesyonlar veya mutasyonların, insanlarda görülen Turner Sendromu (TS), İdiopatik Boy Kısaldığı (İKB) ve Leri-Weill Diskondrosteozu (LWD)'na neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmada İKB'li bireylerde, SHOX geninin tam delesyonlarının FISH yöntemi ve ekzon 2'de yer alan LWD hastalarında tespit edilmiş Y35X ve İKB'de tespit edilmiş A-337G mutasyonlarının ise moleküler genetik yöntemle taranması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, İdiopatik Kısa Boy (İKB)'a sahip olduğu belirlenen 61 birey incelendi. Standart sitogenetik tekniklerle vakaların normal karyotipe sahip oldukları gösterildi. Vaka grubundan en kısa boya sahip olan 8 birey seçilerek FISH tekniği ile SHOX genleri kontrol edildi. Vakaların tümü için ekzon 2, PCR metoduyla çoğaltıldı ve Y35X ile A-337G mutasyonlarını tespit etmek için Rsa I ve Alu I enzimleri kullanıldı. İdiopatik kısa boylu 61 bireyde, konvansiyonel sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik incelemeler sonucunda herhangi bir anormalliğe rastlanmadı.

İdiopatik kısa boylu bireylerde, konvansiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik tekniklerin yanı sıra moleküler genetik tekniklerin de kapsamlı bir biçimde çalışılması oldukça önemlidir. Çalışma, SHOX geninde yapılacak mutasyon taramalarında özellikle SSCP veya DNA dizileme gibi gendeki tüm mutasyonları ortaya koyacak yöntemlerin kullanılmasının daha uygun olacağını göstermektedir. Kısa boy ile birliktelik gösteren veya birliktelik gösterdiği düşünülen hastalıklara karşı alınacak tedbirlerde ve kısa boylu bireylerin yaşam kalitesinin artırılmasında, SHOX geni ve büyüme ile ilgili diğer genlerin araştırılmasının yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: İdiopatik kısa boy, SHOX, interfaz-FISH, Y35X, A-337G.

Investigation of Genetic Factors the Effects in Short Stature

Short stature is under genetic and environmental factors and affects 2-3 % of general population. SHOX gene is localised in the pseudoautosomal regions of the short arms of X and Y chromosomes and escapes X inactivation. It has shown that the deletions or mutations of the gene causes Turner Syndrome (TS), Idiopathic Short Stature (ISS) and Leri-Weill Dyschondrosteosis (LWD) seen in human. In this study, it is aimed to scan the complete deletions of SHOX gene in individuals with ISS by FISH method, Y35X mutations detected in LWD patients localised in exon 2 and A-337G mutations detected in ISS patients with molecular methods.

In this study, 61 individuals with ISS were detected. It has shown with standard cytogenetics techniques that cases have normal karyotypes. 8 individuals with the shortest stature were chosen from case group and their SHOX genes were controlled by FISH technique. For all cases, exon 2 was amplified by PCR and to determine Y35X and A-337G mutations, Rsa I and Alu I enzymes were used. In 61 individuals with ISS, conventional cytogenetics, molecular cytogenetics and molecular genetics studies didn't show any abnormalities.

It is important to study molecular genetics techniques with conventional cytogenetics and molecular cytogenetics techniques in individuals with ISS in an extensive way. This study shows that to scan the mutations within the SHOX gene, it is more appropriate to use the techniques especially like SSCP or DNA sequencing which determine all mutations in this gene. We consider that for taking preventive measures against diseases associated with or think to be associated with short stature and increasing the quality of life of the individuals with short stature, to research SHOX gene and other genes related to growth will be guide.

Key Words: Idiopathic short stature, SHOX, interphase-FISH, Y35X, A-337G.

Giriş

İnsan boyu, hem genetik hem de çevre faktörlerinin kontrolü altındaki kompleks bir özelliktir (1). Bugüne dek yapılan pek çok çalışma boyun, kardiyovasküler hastalıklar, inme ve kanserle ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (2-16). Kısa boy, genel popülasyondaki bireylerin % 2-3'ünü etkilemekte olup sosyal ve tıbbi öneme sahiptir (17, 18).

Geliş Tarihi : 03.10.2007
Kabul Tarihi : 03.07.2008

Yazışma Adresi Correspondence

Ebru ETEM
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı,
23119
Elazığ, TÜRKİYE

ebruetem@gmail.com

*IX. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi. Anemon Otel. 24-27 Kasım 2005, Manisa.

Genel olarak boyun kalıtlılabirliği % 50'nin üstündedir ve çalışılmış kompleks insan özellikleri arasında kalıtlılabirlik oranı en yüksek olanıdır (1).

İnsan X kromozomu ve Y kromozomlarının kısa kolunun küçük delesyonlarının sürekli olarak kısa boy ile birliktelik gösterdiği gözlemine dayalı olarak, büyümeyi olumlu yönde etkileyen bir genin, cinsiyet kromozomlarının psödootozomal 1 bölgesinde (PAR1) yer aldığı ileri sürülmüştür (19). Ogata ve Matsuto adlı araştırmacılar, bu genin PAR1'in 700 kb'lık distalinde lokalize bir homeobox gen olduğunu tanımlamışlardır. Bu gen Rao ve arkadaşlarıncı SHOX, Ellison ve arkadaşlarıncı ise PHOG (Pseudoautosomal Homeoboxcontaining Osteogenic Gene) olarak adlandırılmıştır (20). 1997'de, SHOX geni, psödootozomal bölgelerden klonlanmış ve büyümenin düzenlenmesinde aday bir gen olduğu ileri sürülmüştür (18). SHOX geninin X inaktivasyonundan kurtulduğu ve her iki allelin de aktif ve inaktif X kromozomu ile Y kromozomundan eksprese olduğu gösterilmiştir (21). SHOX yaklaşık 40 kb'lık genomik bir bölge kaplamaktadır. 7 ekzondan ibarettir ve 3 ekzonu alternatif splicing ile oluşturulan iki transkript kodlamaktadır. SHOXa ve SHOXb olarak adlandırılan bu transkriptler sırasıyla 292 ve 225 amino asitten oluşan proteinleri kodlamaktadırlar (19). SHOX geni ekstremite ve faringeal arkus olmak üzere iki büyük bölgede eksprese olmaktadır. Bu her iki alandaki anormal gelişim, Turner Sendromu'nun iskelet özelliklerinin temelini oluşturmaktadır (22).

SHOX'un tek doz yetersizliği, insanlarda görülen Turner Sendromu (TS), İdiopatik Kısa Boy (İKB) ve Leri-Weill Diskondrosteozu (LWD) olmak üzere üç farklı büyüme hastalığına katkıda bulunmaktadır (23). SHOX delesyonuna sahip bireyler hafif, zorlukla ortaya konabilen iskelet malformasyonlarından, bu hastaların yaşamlarını olumsuz yönde etkileyen ciddi displazilere kadar değişen hatırı sayılır bir fenotipik heterojenite göstermektedirler (24). Bununla beraber, SHOX'taki aynı mutasyonun ya LWD sendromu veya İKB fenotipine yol açtığı gözlenmiştir. (21, 25). Y35X mutasyonu bilateral Madelung deformitesine sahip LWD'li bireylerde daha önce yapılan çalışmalarda tanımlanmıştır (26). Ancak literatürde bu mutasyon İKB'li bireylerde tespit edilememiştir. A-337G mutasyonu İKB'li bireylerde tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, boyu Elazığ boy ortalamasının altında kalan İKB'li bireylerde, SHOX genindeki ekzon 2'de daha önce tanımlanmış olan Y35X ve A-337G mutasyonlarının taranması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma için kullanılan kontrol ve vakalar ELAZIĞ ilinde yaşayan bireylerden seçildi. Bu çalışmada olgu grubu olarak 69 birey ve kontrol grubu olarak 31 birey olmak üzere toplam 100 birey çalışmaya alındı. Bu 100 bireyden 12'si monozigotik, 6'sı dizigotik kardeşler ve 44'ü kardeş çiftiydi. Geriye kalan 38 birey, aynı cinsiyette kardeşleri olmadığından, çalışmaya tek başlarına alındı. Çalışmaya alınan bireylerden yaşı en küçük olanı 20 ve

en büyük olanı 50 olmak üzere yaş ortalamaları 28.8 (standart sapma 11.33) idi. Çalışmaya katılan bireylerin 48'i erkek ve 52'si bayan bireylerden oluşmaktaydı. Olgular çalışmaya alınırken aşağıdaki kriterler göz önünde bulunduruldu:

1. Monozigot kardeşler için; aralarında en az 5 cm boy farkı bulunan ve kısa boya sahip olan kardeşin bölge boy ortalamasının altında kalması.

2. Dizigot kardeşler ve kardeş çiftleri için; cinsiyetlerinin aynı olması, aralarında en az 5 cm boy farkı bulunması ve kısa boya sahip olan kardeşin bölge boy ortalamasının altında kalması.

3. Çalışmaya tek başına alınan bireyler için; aynı cinsiyette kardeşleri olmaması, boylarının aile ortalamaları ve bölge ortalamasının altında kalması.

Sitogenetik çalışma: Her bir olgu için bunların periferik kanlarından elde edilen en az 16 metafaz standart sitogenetik tekniklerle incelendi.

İnterfaz-FISH çalışması: Biotinle işaretli SHOX bölgesini de içine alan Xp22'deki bölgeye spesifik bir prob kullanıldı (Cytocell, Banbury Business Park Addenbury, United Kingdom). Preparasyon işlemleri prob protokolüne uygun olarak yapıldı ve floresan mikroskopla incelendi.

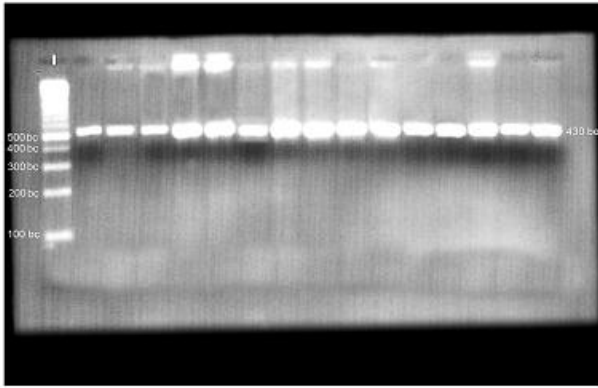
Moleküler çalışma: Çalışma için gerekli olan olgu DNA'ları standart tekniklerle elde edildi ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. DNA'ların çoğaltılmasında Ekzon 2 için forward: 5'-CGAGGTCGCCGCGTATAAATA-3' ve revers: 5'-AGACGGGAGCTGCAAATGTG-3' primerleri kullanıldı. PZR cihazında çift sarmal DNA moleküllerini denatüre etmek için yalnızca bir döngü olmak üzere 96°C'de 3 dakika, denatürasyon (melting) için 96°C'de 30 saniye, yapışma (annealing) için 60°C'de 1 dakika, uzama (extension) için 72°C'de 1 dakika olmak üzere toplam 35 döngü gerçekleştirildi. En son döngüdeki uzatma periyodu 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi ve örnekler 4°C'ye kadar hızla soğutuldu. Elde edilen PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde koşutuldu.

Bulgular

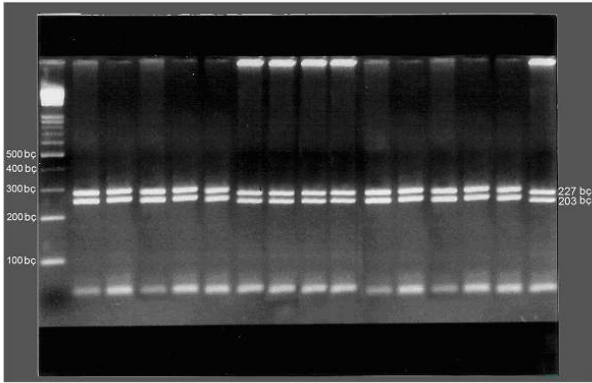
Çalışmaya alınan erkek ve bayan vakaların hepsi konvensiyonel sitogenetik yöntemle incelendi. Yapılan sitogenetik inceleme sonucunda tüm vakaların karyotipi normal olarak değerlendirildi. İnterfaz-FISH çalışmasında kullanılan DXYS129 probunun telomerden uzaklığı 160 kb olup SHOX bölgesini de içine alan Xp22 ve Yp11 bölgelerine spesifiktir. Prob, dioxigeninle işaretli olup normal vakalarda 2 yeşil sinyal vermektedir. Çalışılan 8 vakanın interfaz-FISH analizi sonucunda incelenen hücrelerden 2 yeşil sinyal alınmasıyla tüm 8 olgu normal olarak değerlendirildi. Moleküler çalışmada kullanılan Alu enzimi mutasyonlu diziyi ve Rsa I enzimi ise wild type diziyi spesifik olarak kesmektedir. Vaka ve kontrolleri içeren toplam 100 bireyde, çalışılan mutasyonlardan herhangi biri tespit edilemedi ve bireyler SHOX genindeki bu iki mutasyon açısından normal olarak değerlendirildi.



Şekil 1. SHOX genine spesifik olan DXYS129 probe kullanılarak yapılan FISH çalışması sonucunda elde edilen 2 yeşil sinyale sahip bir interfaz hücresi.



Şekil 2. A-337G mutasyonu için Alu I restriksiyon enzim kesim sonrası agaroz jele yüklenen ürünlerin görüntüsü.



Şekil 3. Y35X mutasyonu için Rsa I restriksiyon enzim kesim sonrası agaroz jele yüklenen ürünlerin görüntüsü.

Tartışma

1997'de, SHOX geni, X ve Y kromozomlarının kısa kol bölgelerinin psödotozomal bölgelerinden klonlanmış ve büyümenin düzenlenmesinde aday bir gen olduğu ileri sürülmüştür. SHOX geninin büyümenin düzenlenmesinde rol oynadığının anlaşılmasından sonra LWD'li ve Xp veya Yp delesyonlu hastalarda yapılan pek çok çalışma büyümenin kontrolünde bu genin görev aldığını doğrulamıştır (18, 21, 24, 27). Çalışmamızda

konvensiyonel sitogenetik yöntemle değerlendirilen tüm olguların karyotipleri normal olarak değerlendirilmiştir ve bu bulgu idiyopatik kısa boylu hastalarda yapılan diğer çalışmalarla uygunluk göstermektedir. Çalışma grubumuz içerisinde normal karyotipe sahip İKB'li hastalardan boyları ortalamanın altında kalan ve en kısa boya sahip olduğu belirlenen 8 bireye uyguladığımız interfaz FISH çalışması sonucunda, 8 bireyden de 2 yeşil sinyal alındı ve bu bireyler normal olarak değerlendirildi. İKB'li hastalarda yapılan diğer çalışmalarda, FISH yöntemi için SHOX genine özgü ve Xp22.3 ile Yp11.3'te lokalize olan LLNOYCO3'M'34F5 kozmid probe kullanılmıştır (18, 21, 27). Çalışmayı yaptığımız sırada bu probe ticari olarak elde edilebilir olmadığından, SHOX bölgesini de içine alan Xp22 ve Yp11'deki bölgeye spesifik farklı bir probe kullanıldı. Interfaz FISH metodu uygulanarak elde edilen sonuç, Müsebeck ve arkadaşlarının 35 İKB'li probantta yaptıkları çalışmanın sonucuyla uyumludur (27). Buna karşın, Morizio ve arkadaşlarının 33 dişi ve 23 erkek olmak üzere toplam 56 İKB'li hastada FISH metodu ile yaptıkları araştırma sonucu 4 hastada (%7.1) tek bir SHOX geni kopyasının varlığını tespit etmişlerdir. Bu 4 hastada da SHOX'un bir kopyasının delesyonunun de novo olduğu ve X kromozomunda meydana geldiği ortaya konmuştur (18). Benzer şekilde Binder ve arkadaşları 68 İKB'li hasta çalışmışlar ve yalnızca 1'inde SHOX delesyonu bulmuşlardır (28). Rao ve arkadaşları da İKB'li 91 hastada yaptıkları inceleme sonucu sadece 1 hastada, SHOX geninde bir nokta mutasyon tespit etmişlerdir (24). Diğer bir çalışmada Rappold ve arkadaşları 150 İKB'li hastayı FISH ile incelemişler ve 3'ünde SHOX delesyonuna rastlamışlardır (21). A337G ve Y35X mutasyonlarının hasta grubumuzda var olup olmadığı, hastaların PCR ürünlerinin Alu I ve Rsa I restriksiyon enzim kesimiyle araştırıldı. Alu I enzimiyle kontrol edilen hastalar ve kontroller A337G mutasyonu açısından negatif olarak değerlendirildi. Aynı şekilde Y35X mutasyonu Rsa I enzimi ile araştırıldı ve hasta ile kontrollerin tümü bu mutasyon açısından da negatif bulundu.

Rappold ve arkadaşları 2002 yılında 900 İKB'li hastada yaptıkları çalışmada hastaların %2.4'ünde SHOX mutasyonlarını tespit etmişlerdir. Çalışmada A337G mutasyonunu 2 (%0.22) hastada tespit etmişlerdir (21). Hasta seçim kriterlerinin farklı olduğu göz önünde bulundurulursa bu mutasyona çalışma grubunda rastlanmaması mümkündür. Daha önce Flanagan ve arkadaşlarının LWD'li hastalarda yapmış oldukları çalışmada tespit ettikleri Y35X mutasyonuna İKB'li 69 bireyde rastlanmamıştır. Bu mutasyon, muhtemelen LWD spesifik olup İKB'ye neden olmamaktadır. Daha önce İKB'li bireylerde yapılan SHOX geni mutasyon tarama çalışmalarında bu mutasyonun İKB'ye neden olduğuna dair bir bulguya rastlanmamıştır. Ancak çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Gendeki aynı mutasyonların İKB veya LWD'ye neden olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur. Örneğin R195X mutasyonuna hem LWD'li hem de İKB'li bireylerde rastlanmıştır (21). SHOX geninde belirlenen mutasyonların restriksiyon fragment uzunluk polimorfizimi yöntemi ile hem İKB hem de LWD hastalarında taranması

her iki hastalığa neden olabilen ortak nokta mutasyonlarının belirlenmesi açısından önemlidir.

Sonuç olarak sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler incelemelerimiz sonucunda, İKB'li 69 proband ve 31 kontrol bireyinde herhangi bir anormalliğe rastlanmadı. Çalışmada, SHOX geninin 2. ekzonuna spesifik primerler kullanıldığından sadece bu ekzondaki A-337G ve Y35X olmak üzere iki mutasyonun varlığı araştırılmıştır. (20). Oysa SHOX genindeki mutasyonlar

tüm gen boyunca dağılım göstermektedir (25). Dolayısıyla İKB'li hastaları SHOX gen mutasyonları açısından değerlendirirken, bu gene ait tüm ekzonların incelenmesinin daha doğru sonuçlar vereceği kanaatindeyiz. Bununla beraber İKB'li hastalarda, SHOX'ta görülen mutasyonların prevalansının % 1 olduğu dikkate alındığında (24), İKB'li hastalardaki SHOX mutasyonu araştırması için daha fazla sayıda hasta incelemenin daha bilgi verici olacağını düşünmekteyiz.

Kaynaklar

- Deng H, Xu F, Liu Y, et al. A whole-genome linkage scan suggests several genomic regions potentially containing QTLs underlying the variation of stature. *Am J Med Genet* 2002;113: 29-39.
- Andersson SO, Wolk A, Bergstrom R, et al. Body size and prostate cancer: A 20-year follow-up study among 135006 Swedish construction workers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(5): 385-389.
- Albanes D, Jones DY, Schatzkin A, Micozzi MS, Taylor PR. Adult stature and risk of cancer. *Cancer Res* 1988; 48(6): 1658-1662.
- Goldbourt U, Tanne D. Body height is associated with decreased long term stroke but not coronary heart disease mortality? *Stroke* 2002; 33: 743-748.
- Gunnell D, Okasha M, Smith GD, Oliver SE, Sandhu J, Holly JM. Height, leg length, and cancer risk: a systematic review. *Epidemiol Rev* 2001; 23(2): 313-342.
- Hebert PR, Ajani U, Cook NR, Lee IM, Chan KS, Hennekens CE. Adult height and incidence of cancer in male physicians (United States). *Cancer Causes Control* 1997; 8(4): 591-597.
- Eaten SB, Konner M, Shostak M. Stone agers in the fast lane: chronic degenerative diseases in evolutionary perspective. *Am J Med* 1988; 84(4):739-749.
- McCarron P, Okasha M, McEwen J, Smith GD. *Am J Epidemiol* 2002; 155(8): 688-689.
- Okasha M, Gunnell D, Holly J, Smith GD. Childhood growth and adult cancer. *Best pract res clin endocrinol metab* 2002; 16 (2): 225-241.
- Parker DR, Lapane KL, Lasater TM, Carleton RA. Short stature and cardiovascular disease among men and women from two southeastern New England communities. *Int J Epidemiol* 1998; 27: 970-975.
- Petrelli JM, Calle EE, Rodriguez C, Thun MJ. Body mass index, height, and postmenopausal breast cancer mortality in a prospective cohort of US women. *Cancer Causes Control* 2002; 13(4): 325-332.
- Samaras TT, Elrick H, Storms LH. Is height related to longevity? *Life Sci* 2003; 72: 1781-1802.
- Samaras TT, Elrick H, Storms LH. Is short height really a risk factor for coronary heart disease and stroke mortality? A review. *Med Sci Monit* 2004; 10(4): 63-76.
- Shors AR, Solomon C, McTiernan A, White E. Melanoma risk in relation to height, weight, and exercise (United States). *Cancer Causes Control* 2001; 12(7): 599-606.
- Smith GD, Shipley M, Leon DA. Height and mortality from cancer among men: prospective observational study. *BMJ* 1998; 317:1351-1352.
- Wannamethee SG, Shaper AG, Winchup PH, Walker M. Adult height, stroke, and coronary heart disease. *Am J Epidemiol* 1998; 148(11): 1069-1076.
- Willet WC. Nutritional epidemiology issues in chronic disease at the turn of the century. *Epidemiol Rev* 2000; 22(1):82-86.
- Morizio E, Stuppia L, Gatta V, et al. Deletion of the SHOX gene in patients with short stature of unknown cause. *Am J Med Genet* 2003; 119A: 293-296.
- Blaschke RJ, Rappold GA. SHOX: Growth, Leri-Weill and Turner syndromes. *TEM* 2000; 11 (6): 227-230.
- Grigelioniene G, Eklöf O, Ivarsson SA, Westphal O, Neumeyer L, Kedra D, Dumanski J, Hagenas L. Mutations in short stature homeobox containing gene (SHOX) in dyschondrosteosis but not in hypochondroplasia. *Hum Genet* 2000; 107: 145-149.
- Rappold GA, Fukami M, Niesler B, et al. Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(3): 1402-1406.
- Jones MC, Schiller S, Rao E, et al. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 2000; 9(5): 695-702.
- Zinn AR, Wei F, Zhang L, et al. Complete SHOX deficiency causes langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet* 2002; 110: 158-163.
- Rao E, Weiss B, Fukami M, et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 1997; 16: 54-63.
- Niesler B, Fischer C, Rappold GA. The human SHOX mutation database. *Hum Mutat* 2002; 20: 338-341.
- Flanagan SF, Munns CFJ, Hayes M, et al. Prevalence of mutations in the short stature homeobox containing gene (SHOX) in Madelung deformity of childhood. *J Med Genet* 2002; 39:758-763.
- Müsebeck J, Mohnike K, Beye P, et al. Short stature homeobox-containing gene deletion screening by fluorescence in situ hybridisation in patients with short stature. *Eur J Pediatr* 2001; 160: 561-565.
- Binder G, Schwarze CP, Ranke MB. Identification of short stature caused by SHOX defects and therapeutic effect of recombinant human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85 (1): 245-249.