

Orijinal araştırma-Original research

Sistemik sklerozda COL1A1 ve COL1A2 gen polimorfizmlerinin incelenmesi

Investigation of COL1A1 and COL1A2 polymorphisms in systemic sclerosis

Ömer Ateş, Nilay Büdeyri, Benan Müsellim, Gül Öngen, Ayşegül Topal Sarıkaya

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (Yrd. Doç.Dr. Ö. Ateş), Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, TR-60100 Tokat, Biyomühendislik Anabilim Dalı (MSc N. Büdeyri) Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, TR-34722 İstanbul, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı (Doç.Dr. B. Müsellim, Prof.Dr. G. Öngen) İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, TR-34098 İstanbul, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (Prof.Dr. A. Topal Sarıkaya) İstanbul Üniversitesi, TR-34118 İstanbul

Özet

Amaç. Sistemik sklerozis (SSc) ile kollajen üretimi üzerine etkili olabileceği düşünülen COL1A1 ve COL1A2 gen polimorfizmleri arasındaki olası bağlantıyı araştırmaktır. **Yöntem.** 45 kadın SSc hasta grubunda ve 75 sağlıklı kadın kontrol grubunda COL1A1 ve COL1A2 gen polimorfizmleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve restriksiyon enzim analizi (REA) yöntemleri kullanılarak analiz edildi. **Bulgular** Sp1 ve PvuII genotip ve allel frekanslarının dağılımı hasta ve kontrol grubunda yaklaşık değerlerde bulundu ve bu polimorfizmlerle SSc arasında anlamlı bir bağlantı tespit edilemedi. **Sonuç.** Sistemik sklerozda kollajenin aşırı yapımı ve birikiminde COL1A1 geni Sp1 ve COL1A2 geni PvuII polimorfizmlerinin önemli rol oynamadığı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Sistemik skleroz, kollajen, polimorfizm

Abstract

Aim. Our aim was to investigate the association between Systemic sclerosis (SSc) and COL1A1 and COL1A2 gene polymorphisms which are thought to have a probable effect on the production of collagen. **Method.** We analysed COL1A1 and COL1A2 gene polymorphisms in 45 SSc women patients and 75 healthy women by using the Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Enzyme Analysis (REA). **Result.** It was found that the genotip and allel frequencies distribution of Sp1 and PvuII was approximately the same values in the control and patient group and also determined that there was no meaningful association between SSc and these polymorphisms. **Conclusion.** It was thought that Sp1 polymorphism of COL1A1 gene and PvuII polymorphism of COL1A2 gene did not play a significant role on the excessive synthesis and deposition of collagen in systemic sclerosis.

Key words: Systemic sclerosis, collagen, polymorphism

Geliş tarihi/Received: 4 Aralık 2009; **Kabul tarihi/Accepted:** 18 Şubat 2009

İletişim Adresi:

Dr. Ömer Ateş, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, TR-60100 Tokat. e-posta: omerates27@yahoo.com

Giriş

Otoimmün bir hastalık olan Sistemik Skleroz (SSc), fibrozis, inflamasyon ve vasküler değişiklikler ile seyreden kronik bir bağ dokusu hastalığıdır [1]. Hastalık, 30-50 yaş

aralığında yaygın olarak görülmesine rağmen çok nadiren de olsa bebeklik döneminde ya da 60 yaşından sonra da görülebilmektedir [2]. SSc'nin kadınlarda erkekle oranla 7 kat daha fazla görüldüğü bulunmuştur [1]. Etiyolojisi kesin olarak bilinmemekle beraber genetik, immunolojik ve çevresel faktörlerin etkili olabileceği düşünülmektedir [3]. Bu hastalığın karakteristik semptomları arasında kollajenin deride ve akciğer başta olmak üzere iç organlarda aşırı sentez edilmesi ve depolanması yer alır [3-4].

Kollajen, dokular arası alanı dolduran ekstraselüler matriksin (ECM) önemli bir bileşenidir. Günümüze kadar birçok kollajen tipi bulunmuştur. Tip I kollajen ECM'de en fazla bulunan kollajen tipidir [5]. İki $\alpha 1$ ve bir tane $\alpha 2$ zincirlerinden oluşan heterodimerik bir molekül olan kollajen, COL1A1 ve COL1A2 genleri tarafından şifrelenir [6]. COL1A1 geninin 1. intronunda bulunan Sp1 transkripsiyon bölgesi, kollajen transkripsiyonunun kontrolünde önemlidir. Bu bölgede bulunan tek nükleotid polimorfizmi (Sp1 polimorfizmi, 1546 G-T nükleotid değişimi) Sp1 transkripsiyon faktörünün bağlanma oranını değiştirerek COL1A1 proteininin yüksek miktarlarda üretilmesinden sorumlu tutulmaktadır. Fazla miktarda üretilen $\alpha 1$ kollajen zinciri de, $\alpha 2$ kollajen zinciri ile birlikte anormal homotrimer yapıda kollajen oluşumuna sebep olmaktadır [7-8]. COL1A2 zincirinde bulunan tek nükleotid polimorfizminin (PvuII polimorfizmi 392. kodonda A-C nükleotid değişimi) fonksiyonel etkisi tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, bu polimorfizmin aminoasit değişimine sebep olmadığı ancak aynı gen içinde veya komşu genler içerisinde başka mutasyonlarla bağlantı dengesizliği içinde bulunarak genin fonksiyonunu etkileyebileceği olası görülmektedir [9-10]. Yapılan çalışmalarda SSc hastalarında kollajen aşırı yapımı ve birikimi olduğu ortaya konulmuştur [11-12]. Bu çalışmada, SSc ile kollajen üretimi üzerine etkili olabileceği düşünülen COL1A1 ve COL1A2 gen polimorfizmleri arasındaki olası bağlantı araştırılmıştır.

Yöntem

1. SSc Hasta –Kontrol Grupları

Bu çalışmaya, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'nda akciğer tutulumlu sistemik skleroz tanısı alan, takip ve tedavileri sürdürülen ve daha önce yaptığımız SSc'deki polimorfizm çalışmalarında [13-15] da yer alan 45 kadın hasta (yaş ortalaması 57,1±13) ve aralarında akrabalık ilişkisi olmayan ve hastalık öyküsü bulunmayan 75 sağlıklı kadın birey (yaş ortalaması 59,2±18) katıldı. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi etik kurulu tarafından onaylanmış olup, her bir bireyden bu çalışma için bilgilendirilmiş onam formu alındı.

2. DNA İzolasyonu ve COL1A1, COL1A2 Gen Polimorfizmlerinin Analizi

Genomik DNA, standart yöntemlere göre donmuş EDTA'lı kandan izole edildi [16]. COL1A1 geninde Sp1 (Sp1, transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesindeki 1546 G -T nükleotid değişimi), COL1A2 geninde ise PvuII (392. kodonda A-C nükleotid değişimi) polimorfizmleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Restriksiyon Enzim Analizi (REA) yöntemleri kullanılarak analiz edildi. COL1A1 ve COL1A2 gen polimorfizmleri analizinde kullanılan primer dizileri Tablo 1'de verildi.

Tablo1. COL1A1 ve COL1A2 Gen polimorfizmlerinin analizinde kullanılan primer dizileri

| Primer | Primer Dizisi |
|---------------|---|
| Primer1 Sp1 | 5'-GTCCAGCCCTCATCTGGCC-3' (COL1A1 Geni) |
| Primer2 Sp1 | 5'-TAACTTCTGGACTATTTGCGGACTT-3' (COL1A1 Geni) |
| primer1 PvuII | 5'-GGGATATAAGGATACTAGAGG-3' (COL1A2 Geni) |
| primer2 PvuII | 5'-GAAATATCGGCCCGCTGGAA-3' (COL1A2 Geni) |

İlgili gen bölgelerini PCR yöntemi ile çoğaltmak için, hazırlanan reaksiyon karışımının

en son hacmi 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımına, 10 pmol her bir primer, 1,5 Unite (U) taq DNA polimeraz (Fermentas) 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1x PCR Buffer konuldu. PCR protokolü olarak 94°C'de 5 dk. denatürasyon aşamasının ardından 35 döngü 94°C'de 1dk. 60°C'de 1dk., 72°C'de 1dk. uygulaması tamamlandıktan sonra 72°C'de 5 dk. uzama aşaması gerçekleştirildi.

COL1A1 genine ait PCR ürünleri 37°C'de bir gece bekletilerek 3 U BalI restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesilen ürünler 0,5 µg/ml etidyum bromidli % 3 Nusieve GTG agaroz jelde elektroforez edildikten sonra UV ışık altında analiz edildi. S alleli (G nükleotidi) içeren PCR ürünleri BalI ile kesilmemekte olup 264 baz çiftlik (bç) tek bant, s alleli (T nükleotidi) içeren PCR ürünleri ise BalI enzimi ile kesime uğrayarak 246 ve 18 bç'lik bantlar şeklinde gözlemlendi.

COL1A2 genine ait PCR ürünleri ise, 37°C'de 4 saat bekletilerek 10 U PvuII restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesilen ürünler 0,5 µg/mL etidyum bromidli % 1.5 agaroz jelde elektroforez edildikten sonra UV ışık altında analiz edildi. P alleli (A nükleotidi) içeren PCR ürünleri PvuII ile kesilmemekte olup 771 bç'lik tek bant, p alleli (C nükleotidi) içeren PCR ürünleri ise PvuII enzimi ile kesime uğrayarak 541 ve 239 bç'lik bantlar şeklinde gözlemlendi.

3. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi, Epi Info Software 3.2.2 versiyonu (CDC, Atlanta, GA, USA) programı kullanılarak yapıldı. SSc hasta ve kontrol gruplarında COL1A1 ve COL1A2 gen polimorfizmlerinin dağılımı χ^2 veya Fisher kesin χ^2 testleri ile karşılaştırıldı. P değerinin $\leq 0,05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Genotip dağılımı ve Hardy-Weinberg denkliği Arlequin Software 2000 (University of Geneva, Switzerland) programı ile test edildi.

Bulgular

Hasta ve kontrol grubunda, COL1A1 geni Sp1 ve COL1A2 geni PvuII genotip ve allel dağılımları Tablo 2'de verildi. Hasta ve kontrol gruplarında PvuII genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı yaklaşık aynı değerlerde olup, SSc ile PvuII polimorfizmi arasında anlamlı bir bağlantı bulunamadı. S alleli sıklığı SSc grubunda kontrol grubuna oranla yüksek bulunmasına rağmen, Sp1 genotipleri ve allelleri ile SSc arasında anlamlı ilişki tespit edilemedi.

Tablo2. SSc ve kontrol gruplarında Col1a1 ve Col1a2 gen polimorfizmlerinin dağılımı

| COL1A1 ve COL1A2 polimorfizmleri | SSc grubu n=45 | Kontrol grubu n=75 | P |
|----------------------------------|----------------|--------------------|------|
| Sp1 | | | |
| S/S | 29 [%64.44] | 55 [%73.33] | 0.53 |
| S/s | 14 [%31.11] | 18 [%24.00] | |
| s/s | 2 [%4.44] | 2 [%2.67] | |
| Allel | | | |
| S | 72 [%80.00] | 128 [%85.33] | 0.18 |
| s | 18 [%20.00] | 22 [%14.67] | |
| PvuII | | | |
| P/P | 4 [%8.89] | 11 [%11.76] | 0.52 |
| P/p | 25 [%55.56] | 34 [%45.59] | |
| p/p | 16 [%35.56] | 30 [%42.65] | |
| Allel | | | |
| P | 33 [%36.67] | 56[%37.33] | 0.51 |
| p | 57 [%63.33] | 94[%62.67] | |

Tartışma

SSc etiyojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, genetik immunolojik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu multifaktöriyel bir hastalıktır. Hastalığın insidansı düşük olduğundan dolayı SSc’de yapılan aile çalışmaları sınırlı sayıda kalmaktadır. Bu nedenle, SSc genetiğini aydınlatmak için yapılan çalışmalar, aday genlerle hastalık arasında bağlantı kurmaya yönelik olarak gerçekleştirilmektedir [17].

SSc fibrozis, inflamasyon ve vasküler değişikliklerle seyreden bir hastalık olmasından dolayı, aday gen bağlantı çalışmalarında ECM protein genleri, sitokinler, büyüme faktörleri ve kemokin genleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bugüne kadar farklı serilerde yapılan çalışmalarda; fibroziste rol oynadığı düşünülen Fibrillin1 (FBN1), Fibronektin (FN1), Osteonektin (SPARC), Transforme Edici Büyüme Faktörü beta (TGF-beta), İnterlökin1 alfa (IL1-alfa), inflamasyonda rol aldığı düşünülen İnsan Lökosit Antijenleri (HLA), Sitotoksik T Lenfositleriyle İlişkili Protein 4 (CTLA4), Protein Tirozin Fosfotaz Tip22 (PTPN22), Tümör Nekroz Faktör (TNF), İnterlökin10 (IL10), IL13, vasküler değişimlerde etkili olabilecek Endoglin (CD105), Nitrik Oksit Sentaz (NOS), Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE), Endotelin (ET1), Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) genleri ile SSc arasında bağlantı olabileceği rapor edilmektedir [18]. Türk toplumunda yaptığımız çalışmalar, IL10 -1082G/A ve TNF-alfa -308G/A polimorfizmlerinin SSc’ye yakınlıkta rol oynadığını ortaya koymaktadır [14,15]. Bir diğer çalışmamız Metal İyon Taşıyıcı Protein Geni (SLC11A1-NRAMP1)’nin SSc’de aday bir gen olabileceğini göstermektedir [13].

Elde ettiğimiz veriler, sistemik sklerozda kollejenin aşırı yapımı ve birikiminde COL1A1 geni Sp1 ve COL1A2 geni PvuII polimorfizmlerinin etkili olmadığını düşündürmektedir. Günümüze kadar, bu gen polimorfizmleri ile SSc arasındaki bağlantı incelenmemiştir. Hata ve arkadaşlarının Japon toplumunda yaptığı çalışmada COL1A2 promotör bölgesindeki mikrosatellit polimorfizmi ile SSc arasında bağlantı olduğu rapor edilmektedir [19]. Pushpakom ve arkadaşlarının İngiltere’de yaptığı çalışmada, COL15 geninde bulunan 11 farklı polimorfizmle SSc arasında anlamlı bağlantı olmadığı bildirilmektedir [20].

SSc’nin görülme sıklığının düşük olması nedeniyle çalıştığımız hasta ve kontrol grubunu oluşturan birey sayısının az olması; gen polimorfizmlerinin farklı ırklar ve etnik gruplar arasında değişkenlik göstermesi nedenlerinden dolayı, elde ettiğimiz verilerin daha büyük çalışmalarla doğrulanmasına gereksinim bulunmaktadır.

Kaynaklar

1. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J.Rheumatol* 1988;15:202-5.
2. Chen K, See A, Shumack S. Epidemiology and Pathogenesis of Scleroderma. *Australas J Dermatol* 2003 ;44:1-7
3. Hinchcliff M, Varga J. Systemic sclerosis/scleroderma: a treatable multisystem disease. *Am Fam Physician* 2008;78:961-8.
4. Eckes B, Mauch C, Huppe G, Krieg T. Differential regulation of transcription and transcript stability of pro-alpha 1(I) collagen and fibronectin in activated fibroblasts derived from patients with systemic scleroderma. *Biochem J* 1996; 315: 549-554.
5. Ghosh AK. Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227: 301-14.
6. Trojanowska, M. Molecular aspects of scleroderma. *Front Biosci* 2002; 7: 608-18.
7. Mann V, Hobson EE, Li B, Stewart TL, Grant SFA, Robins SP, Aspden RM, Ralston SH (2001) A COL1A1Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest* 2001;107: 899-907
8. Deak SB, van der RM, Prockop DJ. Altered helical structure of a homotrimer of alpha

- 1(I) chains synthesized by fibroblasts from a variant of osteogenesis imperfecta. *Coll Relat Res* 1985; 5: 305-13.
9. Suuriniemi M, Mahonen A, Kovanen V, Alén M, Cheng S. Relation of PvuII site polymorphism in the COL1A2 gene to the risk of fractures in prepubertal Finnish girls. *Physiol Genomics* 2003; 14: 217-24.
 10. Ramirez F, Tanaka S, Bou-Gharios G. Transcriptional regulation of the human alpha2(I) collagen gene (COL1A2), an informative model system to study fibrotic diseases. *Matrix Biology* 2006; 25: 365-72.
 11. Liu T, Zhang J. Expression and distribution of type I, III and V collagens in skin lesions from patients with systemic sclerosis. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2008;39: 748-52.
 12. Liu T, Zhang J. Detection of V, III and I type collagens of dermal tissues in skin lesions of patients with systemic sclerosis and its implication. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2008; 28: 599-603.
 13. Ates O, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarıkaya A. NRAMP1 (SLC11A1): A Plausible Candidate Gene for Systemic Sclerosis (SSc) with Interstitial Lung Involvement. *J Clin Immunol* 2008; 28: 73-7.
 14. Ates O, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarıkaya A. Association between Interleukin 10 Gene (IL10) Polymorphisms and Systemic Sclerosis (SSc) with Interstitial Lung Involvement. *Rheumatol Int* 2008; 28: 1123-6.
 15. Ates O, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarıkaya A. Analyses of TNF polymorphisms in Turkish systemic sclerosis patients with interstitial lung involvement. *Biochem Genet* 2008; 46: 696-701.
 16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988 11; 16: 1215.
 17. Granel B, Bernard F, Chevillard C. Genetic susceptibility to systemic sclerosis. From clinical aspect to genetic factor analyses. *Eur J Intern Med* 2009 ; 20: 242-52.
 18. Allanore Y, Wipff J, Kahan A, Boileau C. Genetic basis for systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2007; 74: 577-83.
 19. Hata R, Akai J, Kimura A, Ishikawa O, Kuwana M, Shinkai H. Association of functional microsatellites in the human type I collagen alpha2 chain (COL1A2) gene with systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272: 36-40.
 20. Pushpakom SP, Herrick AL, Kumar S, Worthington J. Polymorphisms in COL15 gene are not associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2008; 35: 251-3.