



Konya İli ve Çevresinde Granüler Kornea Distrofisi Tip 1 Saptanan Ailelerde TGFB1 (Transforme edici büyüme faktörü beta tarafından indüklenen) Gen Mutasyonlarının Araştırılması

Investigation of TGFB1 (Transforming growth factor beta-induced) Gene Mutations in Families with Granular Corneal Dystrophy Type 1 in the Konya Region

© Fatma Malkondu*, © Hilal Arıkoğlu*, © Dudu Erkoç Kaya*, © Banu Bozkurt**, © Fehmi Özkan***

*Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

**Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

***Konya Numune Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği, Konya, Türkiye

Öz

Amaç: Granüler kornea distrofisinin (GKD) karakteristik özellikleri kornea stromasında yerleşim gösteren küçük, ayrık, keskin kenarlı, grimsi beyaz opasitelerdir. GKD'nin gelişiminden sorumlu tutulan genler içinde en kuvvetli ilişkilendirilen gen transforme edici büyüme faktörü beta tarafından indüklenen (*TGFB1*) genidir. Yapılan çalışmalar kromozom 5q31.1 lokusunda yer alan *TGFB1* geninin ekzon 4 ve ekzon 12 bölgelerinde sırasıyla R124H ve R555W değişimlerinin GKD gelişimine yol açan sıcak nokta mutasyonları olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada GKD Tip 1 Türk ailelerde *TGFB1* geninde ekzon 4 ve 12 bölgelerinde yer alan iki sıcak nokta mutasyonunun ve varsa proteinde önemli işlevsel bölgeleri kodlayan bu ekzon bölgelerindeki başka mutasyonların araştırılması ve belirlenen mutasyonların hastalıkla ve ilgili fenotiplerle ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntem:** Çalışmamıza GKD tip 1 (GKD1), tanısı alan 16 hasta ile bu bireylerin aile ağaçlarından belirlenen 11 sağlıklı birey ve bu ailelerle akraba olmayan 28 sağlıklı birey dahil edildi. Her bir bireyden alınan periferik kan örneklerinden DNA elde edildi ve polimeraz zincir yöntemi tekniği ile hedef gen bölgeleri çoğaltıldı. Genotipleme çalışmaları Dizi Analizi yöntemiyle gerçekleştirildi. **Bulgular:** Hasta ve sağlıklı bireylerin *TGFB1* geninin ekzon 4 bölgesinde R124S mutasyonu belirlenmedi. Ancak GKD1 tanısı alan tüm bireylerde *TGFB1* geninin ekzon 12 bölgesinde R555W mutasyonu heterozigot olarak tespit edildi. Ailelerin sağlıklı bireyleri ve bu ailelerle akraba olmayan kontrol bireylerinde ise bu mutasyon gözlenmedi. Ayrıca çalışmamızda bazı hasta ve sağlıklı bireylerde sessiz bir mutasyon olan F540F değişimi ile intronik bölgede yer alan c.32924G>A değişimi tespit edildi. **Sonuç:** Bulgularımız, *TGFB1* geninin ekzon 12 bölgesinde yer alan bir sıcak nokta mutasyonu olan R555W mutasyonunun GKD1 ile literatürde rapor edilen ilişkisini kuvvetli şekilde desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Granüler kornea distrofisi Tip 1, *TGFB1* geni, R555W mutasyonu

Abstract

Objectives: Granular corneal dystrophies (GCD) are characterized by small, discrete, sharp-edged, grayish-white opacities in the corneal stroma. Among the genes responsible for the development of GCD, the most strongly related gene is transforming growth factor beta-induced (*TGFB1*), located in the 5q31.1 locus. Studies show that R124H in exon 4 and R555W in exon 12 are hot-spot mutations in the *TGFB1* gene that lead to GCD development. In this study, we aimed to investigate these two hot-

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Hilal Arıkoğlu, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

Tel.: +90 532 706 07 14 E-posta: berkutug200@hotmail.com **ORCID-ID:** orcid.org/0000-0002-6600-6603

Geliş Tarihi/Received: 07.06.2019 **Kabul Tarihi/Accepted:** 25.12.2019

Cite this article as: Malkondu F, Arıkoğlu H, Erkoç Kaya D, Bozkurt B, Özkan F. Investigation of TGFB1 (Transforming growth factor beta-induced) Gene Mutations in Families with Granular Corneal Dystrophy Type 1 in the Konya Region. Turk J Ophthalmol. 2020;50:64-70

©Telif Hakkı 2020 Türk Oftalmoloji Derneği
Türk Oftalmoloji Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından basılmıştır.

spot mutations in exons 4 and 12 of the *TGFBI* gene and other possible mutations in the same regions, which code important functional regions of the protein, in Turkish families with GCD1 and to determine the relationship between the mutations and disease and related phenotypes. **Materials and Methods:** The study included, 16 individuals diagnosed with GCD type 1 (GCD1), 11 of these patients' healthy relatives, and 28 unrelated healthy individuals. DNA was obtained from peripheral blood samples taken from each individual and polymerase chain reaction was used to amplify target gene regions. Genotyping studies were done by sequence analysis. **Results:** The R124S mutation in exon 4 of *TGFBI* was not detected in the patients or healthy individuals in our study. However, all individuals diagnosed as having GCD1 were found to be heterozygous carriers of the R555W mutation in exon 12 of *TGFBI*. This mutation was not detected in healthy family members or control individuals unrelated to these families. In addition, we detected the silent mutation F540F in exon 12 and c.32924 G>A substitution in an intronic region of the gene in a few patients and healthy individuals. **Conclusion:** Our study strongly supports the association of GCD1 with R555W mutation in exon 12 region of the *TGFBI* gene, as reported in the literature.

Keywords: Granular corneal dystrophy type 1, *TGFBI* gene, R555W mutation

Giriş

Kornea distrofisi, non-enflamatuvar opaklaşma ile seyreden, ilerleyici, sıklıkla bilateral, genellikle genetik geçişli, bir grup hastalıktır.¹ Kornea distrofilerin tanı ve sınıflandırılması biyomikroskopik muayenede saptanan kornea bulgularına dayanmaktadır. Kornea distrofileri klinik, patolojik ve genetik özelliklere göre sınıflandırılmaktadır [kornea distrofi sınıflandırması (IC3D)] (Tablo 1).² Bu sınıflandırmaya göre 5q31-bağlı kornea distrofilerine sıklıkla transforme edici büyüme faktörü beta tarafından indüklenen gende [transforming growth factor beta-induced; (*TGFBI*)] meydana gelen mutasyonlar neden olmaktadır.¹ 5q31 gen lokusunda lokalize *TGFBI* genindeki farklı mutasyonlar, granüler kornea distrofisi tip 1 ve 2 (GKD1 ve 2), Reis-Bückler kornea distrofisi, lattis kornea distrofisi (LKD) ve Thiel-Behnke kornea distrofisine yol açmaktadır.³ Korneal stromal distrofi grubunda yer alan GKD1, genellikle çocukluk çağında başlayan, otozomal dominant kalıtım gösteren, çoğunlukla asemptomatik olan, yavaş seyirli bir distrofidir. Korneal opasiteler gri-beyaz renkte, küçük, keskin kenarlı, birbirinden ayrı olup merkezi stromada bulunurlar. Periferik kornea saydamdır. Başlangıç evresinde görme bozukluğu olmamasına rağmen hastalık ilerledikçe stroma tabakası üzerindeki birikintiler birleşerek görmeyi azaltırlar.⁴

TGFBI geninin kodladığı *TGFBI* proteini korneanın başlıca epitel tabakasından ve kısmen de keratosit adı verilen stromal fibroblastlar tarafından üretilerek stromaya taşınır.^{5,6} Korneanın yaklaşık %90'ını oluşturan stroma, zengin bir matrikse sahiptir ve yapısal ve işlevsel olarak özel önemi mevcuttur. Stroma matriksinde tip I ve tip V heterotrimerik kollajen fibrillerin hegzagonal örüntüsüyle düzenlenen lamel yapısı özellikle korneanın şeffaf kalabilmesi için son derece önemlidir.⁷ Kollajen tip VI, XII ve XIV ile birlikte dekorin, lumikan, keratikan, mimekan, biglikan ve fibromodulin proteoglikanları kollajen fibrillerin birleşmesine ve pozisyon almasına yapısal destek sağlar.⁸ Matriksellüler bir protein olan *TGFBI* proteini, matriks elemanlarının integrine bağlanma bölgeleri olan Arjinin-Glisin-Aspartik asit (RGD) dizisi içeren FAS1 bölgeleri ile integrine bağlanarak matriks organizasyonunun sağlanması ve sürdürülmesinde iş görür. *TGFBI* proteini, sinyal peptid dizisi (Met1-Ala23), sistein açısından zengin EMI alanı (Gly45-Ala99), her biri 140 aminoasit ihtiva eden dört FAS1 alanı (Ala100-Pro635) ve C-terminalinde RGD motifi içerir.^{9,10}

Bugüne kadar *TGFBI* geninde tanımlanan 50'den fazla mutasyon kornea distrofileri ile ilişkilendirilmiş ve çoğunlukla ilk FAS1 domaininde Arg124 kodonunda veya dördüncü FAS1 domaininde Arg555 kodonunda mutasyon tanımlanmıştır.¹¹ GKD1'de, *TGFBI* geninde 555. kodonda CG dinükleotidinde meydana gelen ve arjininin (Arg/R) triptofana (Trp/W) değişimine yol açan yanlış anlamlı (missense) mutasyon çoğunlukla ilişkili gösterilmiştir.¹² Çalışmamızda GKD1 tanısı almış bireyler

Tablo 1. Kornea distrofilerinin sınıflandırılması²

1. Epitelyal ve subepitelyal distrofiler

- a. Epitelyal bazal membran distrofisi (EBMD) C1
- b. Epitelyal tekrarlayan erozyon distrofisi (ERED) C4
- c. Subepitelyal müsinoz korneal distrofi (SMCD) C4
- d. Keratin genlerinde mutasyon C1
- e. Lisch epitelyal kornea distrofisi (LECD) C2
- f. Jelatinimsi damla benzeri kornea distrofisi (GDLD) C1

2. Bowman tabakası distrofiler

- a. Reis-Bückler kornea distrofisi (RBCD)
- b. Thiel-Behnke kornea distrofisi (TBCD) C1
- c. Grayson-Wilbrandt kornea distrofisi (GWCD) C4

3. Stromal distrofiler

- a. *TGFBI* Kornea distrofileri
 - * Lattice kornea distrofisi, Granuler kornea distrofisi
- b. Maküler korneal distrofi (MCD) C1
- c. Schnyder kornea distrofisi (SCD) C1
- d. Konjenital stromal korneal distrofi (CSCD) C1
- e. Fleck kornea distrofisi (FCD) C1
- f. Posterior amorf korneal distrofi (PACD) C3
- g. François C4'ün merkezi bulutlu distrofisi (CCDF)
- h. Ön-descemet kornea distrofisi (PDCD) C4

4. Descemet membran ve endotelial distrofiler

- a. Fuchs endotelial korneal distrofi (FECD) C1, C2 veya C3
- b. Posterior polimorf korneal distrofi (PPCD) C1 veya C2
- c. Konjenital kalıtsal endotelial distrofi 1 (CHED1) C2
- d. Konjenital kalıtsal endotelial distrofi 2 (CHED2) C1
- e. X'e bağlı endotel kornea distrofisi (XECD) C2

TGFBI: Transforme edici büyüme faktörü beta tarafından indüklenen

ve aileleri, TGFBI proteininin işlevi için önemli olan birinci ve dördüncü FAS1 bölgelerini kodlayan, sırasıyla ekzon 4 ve ekzon 12 gen bölgelerinde literatürde belirtilen iki sıcak nokta mutasyonu ve farklı bir mutasyonun varlığı bakımından her iki ekzonun tamamı DNA dizi analizi yöntemiyle değerlendirildi.

Gereç ve Yöntem

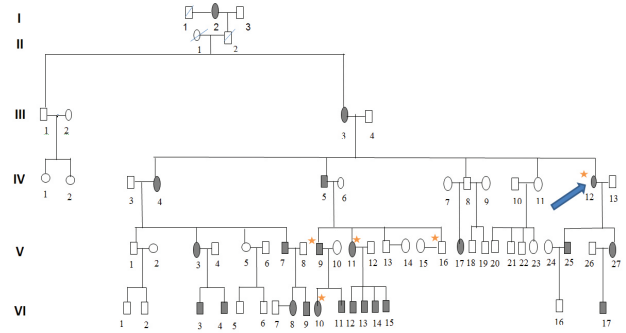
Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Çalışma için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onay alındı (2017/193). Çalışmaya katılmadan önce bireyler bilgilendirildi ve onamları alındı. Çalışmaya Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran ve GKD1 tanısı alan 3 birey ve aileleri dahil edildi. Üç bireyin dört jenerasyonluk aile ağaçları çizildi (Şekil 1, 2, 3). Çalışmaya alınan her bir bireyin yaş, belirti, semptom, hastalığının ilerlemesi, genetik hastalığı ve kullandığı ilaçlar ile ilgili öyküleri kaydedildi. Aile bireylerinin tam oftalmolojik muayenede hastaların düzeltilmemiş ve düzeltilmiş görme keskinliği belirlendi. Biyomikroskopik muayenede kornea birikintilerinin yoğunluğu ve yerleşim yeri incelenerek ön segment fotoğrafları alındı (Şekil 4). Ön segment optik koherens tomografide birikintilerin özellikleri ve derinlikleri değerlendirilip konfokal mikroskopi ile *in vivo* olarak kornea hücresel düzeyde ayrıntılı olarak incelendi. Aile bireylerinden 16 bireye GKD1 tanısı konulurken, 11 bireyde hastalık saptanmadı. Çalışmaya aile bireyleri dışında, bu ailelerle ve birbirleriyle akraba olmayan göz muayenesinde sağlıklı olduğu tespit edilen 28 birey kontrol

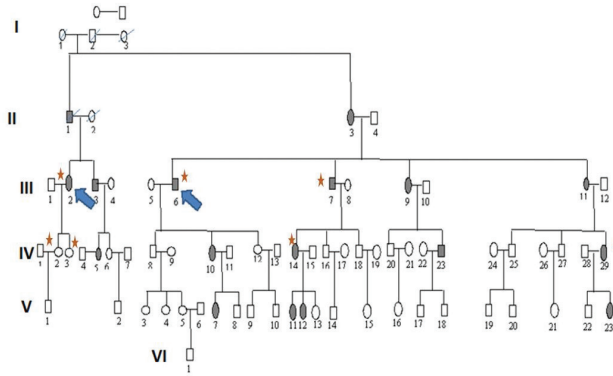
grubu olarak alındı. DNA eldesi için her bireyden EDTA'lı tüplere 6 cc periferik kan alındı.

Hedef Gen Bölgelerinin Belirlenmesi ve Primer Tasarımı

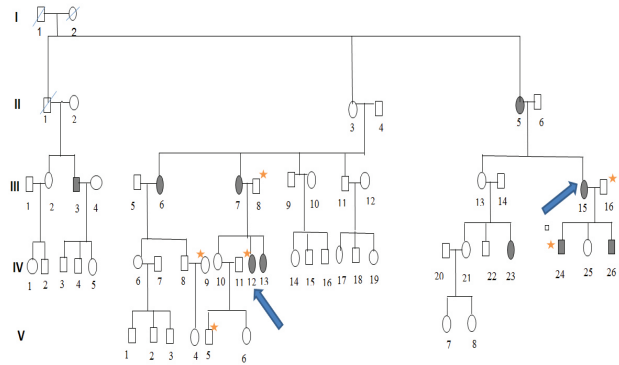
TGFBI geninin nükleotid dizileri Gen Bankasından National Center for Biotechnology Information (NCBI) aracılığı ile NM_000358 erişim numarasından temin edildi. Primerlerin *TGFBI* geninin literatürde özellikle hastalıkla ilişkili olduğu tespit edilen ekzon 4 ve ekzon 12 kodlanan bölgelerinin tamamını tarayacak şekilde tasarlanmış olması planlandı ve buna uygun olarak literatürde rapor edilen primerler kullanıldı (Tablo 2).



Şekil 2. İki nolu aileye ait aile ağacı. Koyu semboller GKD1 tanısı alan bireyleri, ok işareti probandı, yıldız işareti ise çalışmaya dahil edilen bireyleri göstermektedir



Şekil 1. Bir nolu aileye ait aile ağacı. Koyu semboller GKD1 tanısı alan bireyleri, ok işareti probandı, yıldız işareti ise çalışmaya dahil edilen bireyleri göstermektedir



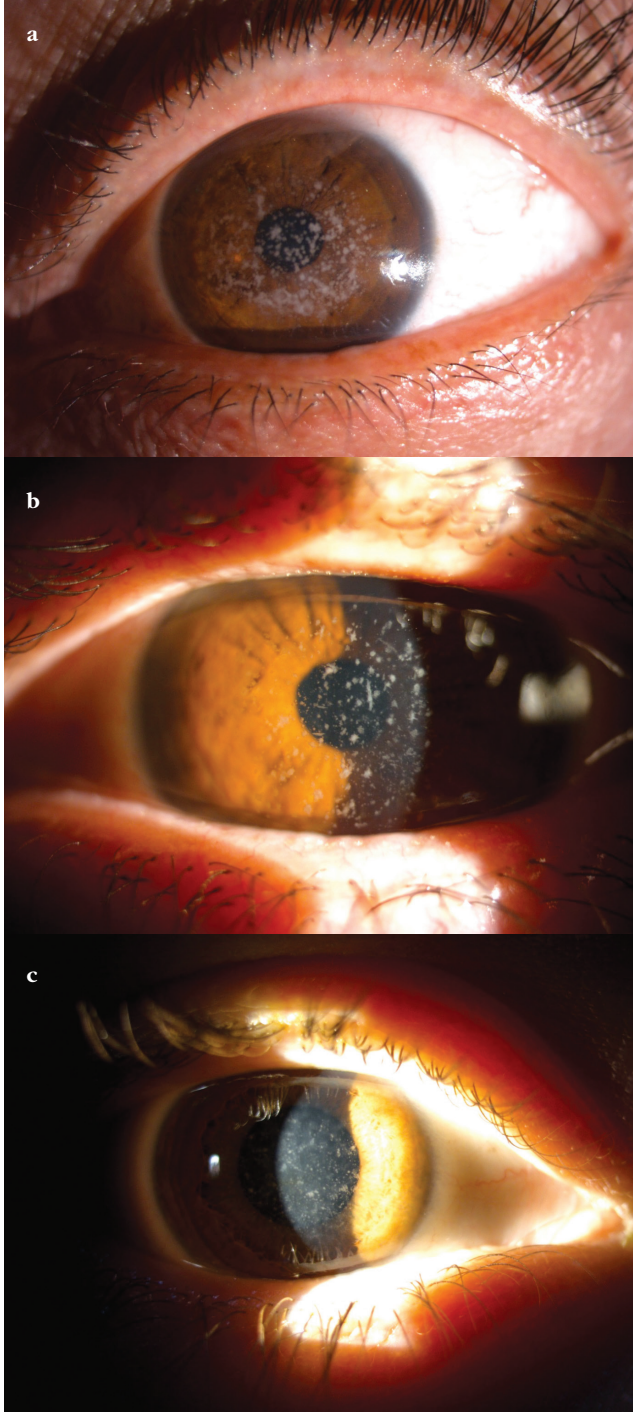
Şekil 3. Üç nolu aileye ait aile ağacı. Koyu semboller GKD1 tanısı alan bireyleri, ok işareti probandı, yıldız işareti ise çalışmaya dahil edilen bireyleri göstermektedir

Tablo 2. *TGFBI* geninin Ekzon 4 ve Ekzon 12 bölgelerinde yer alan hot spot mutasyonlar ve bu bölgeleri çoğaltmak üzere kullanılan primer dizileri

Hedef gen bölgesi	Hedef mutasyon	RS No	Primer dizisi (5'→3') (İ: İleri/G: Geri)	Ürün büyüklüğü (Baz çifti)	Erişim sıcaklığı (°C)	Kaynak
Ekzon 4	Arg124Ser	rs121909210	İ: CCCAGAGGCCATCCCTCCT G: AACATGTTCTCAGCCCTCGT	481	58.8	Yaylacioğlu Tuncay ve ark 2016 ¹³
Ekzon 12	Arg555Trp	rs121909208	İ: CATTCCAGTGGCCTGGACTCTACTATC G: CCCTGGTTGGCCTCATCCTT	431	62.8	Li ve ark., 2012 ¹⁴

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması

Çalışmada kullanılacak 2 çift primer için uygun erime sıcaklığının tespit edilebilmesi amacıyla gradiyent polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulandı. Her primer çifti için



Şekil 4. a) 1 nolu ailesinden III-6 numaralı 72 yaşında fotofobi ve görme kaybı olan erkek hastanın, b) 2 nolu ailesinden IV-12 numaralı 73 yaşında kadın hastanın, c) 3 nolu ailesinden IV-12 numaralı 20 yaşında kadın hastanın ön segment fotoğraf cihazı görüntüleri. Küçük, ayırık, keskin kenarlı, ekmek kırıntısı şeklinde grimsi beyaz opasitelerin görünümü

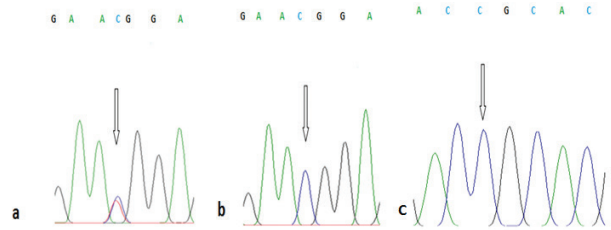
gradiyent PZR'de belirlenen sıcaklıklar dikkate alınarak örnekler çoğaltıldı. PZR, 1XPZR tamponu, 0,4 mM primer, 0,6 mM deoksiribonukleotid trifosfat, 0,1 ünite Taq polimeraz ve 100 ng DNA içerecek şekilde 30 µL'lik hacimlerde çalışıldı. PZR şartları 94 °C'de 5 dk ilk denatürasyon ve sonraki adımlarda 94 °C'de 30 sn denatürasyon, her bir primer için gradient PZR ile belirlenen sıcaklıkta 45 sn primer bağlanma ve 72 °C'de 45 sn uzama basamaklarını içeren 35 döngü ve 72 °C'de 2 dk son uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. PZR sonuçları %1'lik agaroz jel elektroforezde değerlendirilerek fotoğraflandı.

DNA Dizi Analizi

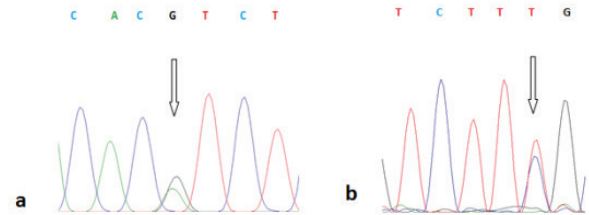
PZR ile çoğaltılan hedef DNA bölgelerinin dizi analizi yapıldı. Finch TV programı ile diziler pik şeklinde görüntülendi ve NCBI BLAST programları ile gen bankasındaki dizilerle eşleştirildi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). BLAST sonuçları ve pik görüntüleri dikkatli bir biçimde karşılaştırılarak değişiklikler değerlendirildi. DNA dizi analizinde oluşabilecek olası hatalı sonuçları önlemek için çift yönlü dizi analizi yapıldı. Böylece mutasyonlar her iki yönde de belirlenerek yüksek güvenilirlikte değerlendirildi.

Bulgular

TGFBI geninin ekzon 12 bölgesi dizi analiz sonuçlarına göre GKD1 tanısı almış tüm hasta bireylerin sıcak nokta mutasyonu olan Arg555Trp (c.1663C>T) değişimini heterozigot olarak taşıdığı tespit edildi (Şekil 5a). Sağlıklı aile bireyleri ve kontrol bireylerinde bu mutasyon belirlenmedi (Şekil 5b). Ayrıca, 4



Şekil 5. a) Ekzon 12 bölgesinde 1663C→T (Arg555Trp) değişimine ait dizi analizi sonuçları. C/T heterozigot genotipinin elektroferogram görüntüsü, b) C/C homozigot genotipinin, elektroferogram görüntüsü. Çalışmada T/T homozigot genotipe sahip birey tespit edilmedi. c) Ekzon 4 bölgesinde 370C→T (Arg124Ser) bölgesine ait dizi analiz sonuçları. Çalışmaya alınan tüm bireyler C/C homozigot genotipe sahiptir



Şekil 6. a) İntron 12 bölgesinde belirlenen c.32924G→A (rs2072239) heterozigot genotipinin, elektroferogram görüntüsü, b) Ekzon 12 bölgesinde (Phe540Phe) 1620T→C heterozigot genotipinin elektroferogram görüntüsü

hasta ve 1 sağlıklı bireyde (1 nolu aileden IV-14 ve IV-12, 2 nolu aileden V-12 ve V-16, aileler ile akraba olmayan 1 kontrol bireyde) dizi analizlerinde ekzon 12 bölgesinde bir sessiz mutasyon olan ve gen bankasında daha önce rapor edilmiş Phe540Phe tek nükleotid değişimi (single nucleotide polymorphism; SNP) tespit edildi (Şekil 6a ve b). Üç hasta (1 nolu aileden IV-14, 2 nolu aileden V-12 ve VI-12) ve hastalık tespit edilmeyen iki sağlıklı bireyde (2 nolu aileden V-11, 3 nolu aileden IV-25) hedef gen bölgesinin intronik bölgesinde yer alan bir SNP (rs2072239) saptandı.

Hastaların ve sağlıklı bireylerin hiçbirinde *TGFBI* geninin ekzon 4 bölgesinde Arg124Ser mutasyonu saptanmadı. Ekzon 4 bölgesinde farklı bir mutasyon veya polimorfizm tespit edilmedi (Şekil 5c).

Tartışma

GKD1'in genetik temelinde kritik role sahip olan *TGFBI* geni korneada başlıca epitel hücrelerinde ve kısmen keratositlerde sentezlenen ve stroma matrisine salgılanan TGFBI proteinini kodlar. Matris organizasyonunun sağlanması ve sürdürülmesinde önemli bir role sahip olan bu proteini kodlayan *TGFBI* genindeki heterojenite, farklı klinik tablolara yol açmaktadır. Özellikle proteinin birinci ve dördüncü FAS1 bölgelerini kodlayan ekzon 4 ve ekzon 12 bölgelerinde yer alan sırasıyla R124 ve R555 noktalarında meydana gelen mutasyonların farklı tip distrofilere neden olduğu gösterilmiştir. Ekzon 4'de 124. pozisyonda meydana gelen mutasyonlardan R124H mutasyonu GKD2 (granüler-latis, Avellino)'ye, R124C değişimi latis kornea distrofisi tip 1'e, R124L mutasyonu ise Reis-Bückler kornea distrofisine yol açarken, ekzon 12'nin 555. pozisyonundaki mutasyonlardan R555W değişimi GKD1'e, R555Q mutasyonu ise Thiel-Behnke kornea distrofisine neden olmaktadır.^{3,11} *TGFBI* genindeki farklı mutasyonların, aynı pozisyonda dahi olsa, proteinin katlanması, proteolizisini, birikimini ve yarı ömrünü değiştirerek farklı kornea distrofilerine yol açtığı gösterilmiştir.^{15,16,17,18}

TGFBI ve *Drosophila* fascilin I, birbirine yüksek homoloji gösteren FAS1 domaini içeren bir süper ailenin üyeleridir.¹⁶ Homoloji model kullanarak yapılan bir çalışmada kodon Arg124 ve Arg555'deki mutasyonların protein-protein etkileşimlerini etkileyerek stabilizeyi değiştirebileceği rapor edilmiştir. Arg124 rezidüsünün, ilk FAS1 domainin $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ heliksin arasında lokalize, Arg555 rezidüsünün ise dördüncü FAS1 domainin $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ helikslerin bağlayıcı kısmında lokalize olduğu ve her iki bölgenin de proteolitik yıkımı için tahmini bölgeler olduğu ifade edilmiştir.¹⁰ Likid-durum nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ile normal TGFBI proteininin Arg557 ve 558. rezidüleri arasında proteolizin gerçekleştiği ancak Arg555Trp mutasyonunda bu domainin proteolize direnç oluşturduğu gösterilmiştir.¹⁹

TGFBI geninin farklı noktalarında meydana gelen mutasyonlar sonucu TGFBI proteinini, çeşitli formlarda çözünmeyen tortular olarak korneanın farklı tabakalarında birikmekte ve klinik değişkenliklere neden olmaktadır. *TGFBI*

geninde saptanan 50'den fazla mutasyon korneada çözünmeyen mutant proteinin hücre dışı birikimi (amiloid, hiyalin) ile karakterize çeşitli kornea distrofileriyle (granüler, latis, Avellino, Bowman tabaka tip 1 ve 2 ve bazal membran kornea distrofisi) ilişkili bulunmuştur.¹² FAS1 domaini α -sarmal ve β -tabaka içeren kompakt globüler yapıya sahip bölgelerdir.²⁰ Birinci FAS1 bölgesinde yer alan R124 ve dördüncü FAS1 alanında yer alan R555 pozisyonlarında meydana gelen iki sıcak nokta mutasyonu farklı etnik topluluklarda en sık rastlanan mutasyonlardır.²¹ GKD1 ile en çok ilişkilendirilen dördüncü FAS1 alanında meydana gelen Arg555Trp mutasyonudur. IC3D sınıflandırmasına göre bu değişimin GKD1 ile ilişkili değişim olduğu kabul edilmiştir. Nadir de olsa birinci FAS1 alanında meydana gelen Arg124Ser mutasyonunun da GKD1 ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.²²

Türkiye'den yapılan 2 çalışmada Kıratlı ve ark.²³, ekzon 4 ve 12 bölgelerini SSCP yöntemi ile tarayarak, 26'sı GKD1'li olan 52 üyeli geniş bir Türk ailesinde, Arg555Trp mutasyonunu belirlemişlerdir. Yaylacioglu Tuncay ve ark.¹³ her iki sıcak nokta mutasyonunu araştırdıkları 12 GKD1'li hastada aynı sonuca ulaşmışlardır. Kornea distrofilerinin Türkiye'deki prevalansı tam olarak bilinmemekle birlikte özellikle İç Anadolu Bölge'sinde çok sayıda etkilenen aile bulunmaktadır.

Çalışmamızda Konya ili ve çevresinde yerleşimli 3 geniş ailenin GKD1 tespit edilen 16 bireyinde Arg555Trp mutasyonu tespit edildi. Normal bir TGFBI proteininde Arg555 rezidüsü ortada, kesime açık olarak bulunurken, Trp555 mutant rezidünün proteinin dördüncü FAS1 bölgesinin hidrofobik kavitesinde gömülü olduğu gösterilmiştir.¹⁹ Moleküler dinamikler simülasyonunda da bu mutasyonun kesim bölgesinin $\alpha 3$ heliksin C-ucunun daha az fleksibl olmasına yol açtığı ve böylece proteolitik dirence neden olduğu gösterilmiştir.¹⁹ Bu bulgular GKD1 patogeneğinde matrisde görülen ve TGFBI olduğu gösterilmiş olan depositlerin birikimini açıklamaktadır. Hücre dışı matris proteinlerinin yapımı olduğu kadar yıkımı da, doku gelişimi, remodelling ve tamir gibi hücresel süreçler için esansiyeldir ve bu dengenin bozulması kornea distrofilerinde olduğu gibi birçok hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır.

Çalışma bulgularımız, literatürde GKD1'in genetik zemininde *TGFBI* genindeki R555W mutasyonunun yer aldığı görüşünü desteklemektedir. Proteinin işlevi için önemli olan FAS1 domainlerini kodlayan ekzon 4 ve ekzon 12 bölgelerinin tamamını dizi analizi ile değerlendirdiğimiz çalışmamızda ekzon 12 bölgesinde R555. pozisyonundaki sıcak nokta mutasyonu dışında iki varyasyon tespit edildi. Bunlardan biri 540. pozisyonda bir varyasyon olup aminoasit değişikliğine yol açmayan sessiz bir değişimdi. Üç hasta ve iki sağlıklı bireyde belirlediğimiz Phe540Phe değişimi ile GKD1 arasında bir ilişki belirlenmedi. Literatürde aynı pozisyonundaki yanlış anlamlı mutasyon (Phe540Ser) ve delesyonun (Phe540del) ise LCD1/3A ile ilişkili olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır.^{24,25} Sıcak nokta olabileceği düşünülen bu pozisyonda tespit ettiğimiz değişikliğin protein yapısında değişikliğe yol açmaması ve sağlıklı bireylerde de belirlenmesi hastalıkla ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Çalışmamızda üç hasta ve iki sağlıklı bireyde

belirlediğimiz intronik bir SNP olan rs2072239 değişiminin de GKD1 fenotipiyle herhangi bir ilişkisi belirlenmedi.

Etkilenen bireylerin ailelerinde yapılacak genetik analizler erken dönemde ya da henüz klinik belirtiler başlamadan önce tanı konması ile klinik takip ve tedavinin planlaması bakımından önemlidir. Klinik olarak benzerlik gösteren farklı kornea stromal distrofilerinin ayırt edilmesinde de genetik analizler kullanılmaktadır. Klinik olarak GKD1 ile en çok karışan, R124H mutasyonunun yol açtığı, GKD2'de granüler depozit sayısı daha azdır ve latis benzeri çizgisel ve yıldız biçiminde depozitler daha geç safhada görülmektedir.^{2,26} Histopatolojik yapılarının değerlendirildiği ışık mikroskobu çalışmalarında GKD1'de Masson trikrom pozitif birikintiler gözlenirken, GKD2'de bazal epitelden derin stromaya kadar yerleşim gösteren ve Masson trikrom ve Kongo kırmızısı ile boyanan hiyalin ve amiloid birikintiler izlenmektedir.^{2,26} Diğer taraftan klinik ve histopatolojik özelliklere bakılarak tanı konması güç olan Reis-Bückler ve Thiel-Behnke kornea distrofilerinde etkilenen bireylerde kesin tanı için genetik analizler önem taşımaktadır.

Dikkate alınması gereken bir başka nokta da, *TGFBI* ilişkili distrofilerde aynı ailenin bireylerinin içinde dahi klinik farklılıkların gözlenebilmesidir. Bu durum korneal depositlerin oluşumunda *TGFBI* proteininin etkisine diğer matriks elemanlarının da katkısının olabileceği düşüncesini desteklemektedir. Farklı faktörler *TGFBI*'dan bağımsız olabildiği gibi *TGFBI*'yı regüle eden faktörler ya da epigenetik faktörler de olabilir. *TGFBI* geninin promotor bölgesinde Sp1 ve Sp3 bağlanma bölgelerinin *TGFBI* ifadesinin olduğu hücrelerde bu faktörler tarafında işgal edildiği *in vitro* ve *in vivo* olarak da gösterilmiştir. Epigenetik çalışmalarda, normal kornea fibroblastları ile GKD2 türevi kornea fibroblastları karşılaştırıldığında, *TGFBI* ve matriks ilişkili genlerin promotorlarında gen aktive edici H3K4Me1,3 ve gen baskılayıcı H3K27Me3 modellerinin farklı oluştuğu ve dolayısıyla bu genlerin ifadelerinin değiştiği gösterilmiştir.²⁷ Ancak daha fazla epigenetik çalışmalara ihtiyaç vardır.

GKD1'in otozomal dominant geçişli olması nedeniyle nispeten diğer kornea distrofilerden daha sık görülmesi, yaşla beraber birikintilerin artmasıyla görmede azalmaya neden olması ve kornea nakli tedavisi gerektirmesi, hatta kornea nakli sonrasında konulan greftte de birikintilerin tekrarlaması ve güncel tedavi yaklaşımlarının kalıcı iyileşme sağlayamıyor olması gibi nedenlerden dolayı genetik bozukluğu düzenleyici gen tedavi çalışmalarına ihtiyaç vardır. *TGFBI* gen ve proteininin yapısı, işlevi ve düzenlenme süreçlerinin ortaya açık bir şekilde konması farklı kornea distrofilerinin genetik mimarisinin ve buna bağlı olarak moleküler mekanizmaların hangi aşamalarında bozulduğunun anlaşılması geliştirilebilecek tedavi stratejileri için belirleyici olacaktır.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u tarafından onay alındı (2017/193).

Hasta Onayı: Çalışmaya katılmadan önce bireyler bilgilendirildi ve onamları alındı.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: B.B., Konsept: H.A., B.B., Dizayn: H.A., D.E.K., B.B., Veri Toplama veya İşleme: B.B., F.Ö., Analiz veya Yorumlama: F.M., H.A., D.E.K., Literatür Arama: F.M., H.A., D.E.K., Yazan: F.M., H.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nce desteklenerek gerçekleştirilmiştir (Proje Numarası: 17202039).

Teşekkür

Hasta bireylerin çalışmaya alınması sürecindeki yardımlarından dolayı Akşehir Devlet Hastanesi Göz Hastalıkları Uzmanı Operatör Dr. İsmail Doğru'ya teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Kanski JJ, Bowling B. Kornea. In: Ken N, Andrew P, eds. Klinik Oftalmoloji Sistematik Yaklaşım (9. basım). Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri; 2013: 212-224.
2. Weiss JS, Moller HU, Aldave AJ, Seitz B, Bredrup C, Kivela T, Munier FL, Rapuano CJ, Nischal KK, Kim EK, Sutphin J, Busin M, Labbe A, Kenyon KR, Kinoshita S, Lisch W. IC3D classification of corneal dystrophies--edition 2. Cornea. 2015; 34, 2: 117-159.
3. Evans CJ, Davidson AE, Carnt N, Rojas Lopez KE, Veli N, Thauang CM, Tuft SJ, Hardcastle AJ. Genotype-phenotype correlation for *TGFBI* corneal dystrophies identifies p.(G623D) as a novel cause of epithelial basement membrane dystrophy. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2016; 13: 5407-5414.
4. Aydın P, Akova YA. Anatomi. In: Pınar A, Yonca A.A eds. Temel Göz Hastalıkları (1. basım). Ankara, Güneş Kitabevi; 2001:160-166.
5. Escibano J, Hernando N, Ghosh S, Crabb J, Coca-Prados M. cDNA from human ocular ciliary epithelium homologous to beta ig-h3 is preferentially expressed as an extracellular protein in the corneal epithelium. Journal of Cellular Physiology. 1994; 3: 511-521.
6. Korvatska E, Henry H, Mashima Y, Yamada M, Bachmann C, Munier FL, Schorderet DE. Amyloid and non-amyloid forms of 5q31-linked corneal dystrophy resulting from kerato-epithelin mutations at Arg-124 are associated with abnormal turnover of the protein. The Journal of Biological chemistry. 2000; 15:11465-11469.
7. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. Progress in Retinal and Eye Research. 2015; 49: 1-16.
8. Poulsen ET, Runager K, Nielsen NS, Lukassen MV, Thomsen K, Snider P, Simmons O, Vorum H, Conway SJ, Enghild JJ. Proteomic profiling of *TGFBI*-null mouse corneas reveals only minor changes in matrix composition supportive of *TGFBI* knockdown as therapy against *TGFBI*-linked corneal dystrophies. The FEBS Journal. 2018; 285: 101-114.
9. Gu Z, Zhao P, He G, Wan C, Ma G, Yu L, Zhang J, Feng G, He L, Gao L. An Arg124His mutation in *TGFBI* associated to Avellino corneal dystrophy in a Chinese pedigree. Molecular vision. 2011; 17: 3200-3207.
10. Han KE, Choi SI, Kim TI, Maeng YS, Stulting RD, Ji YW, Kim EK. Pathogenesis and treatments of *TGFBI* corneal dystrophies. Progress in Retinal and Eye Research. 2016; 50: 67-88.
11. Kim BY, Olzmann JA, Choi SI, Ahn SY, Kim TI, Cho HS, Suh H, Kim EK. Corneal dystrophy-associated R124H mutation disrupts *TGFBI* interaction with Periostin and causes mislocalization to the lysosome. The Journal of Biological Chemistry. 2009; 284: 19580-19591.

12. Munier FL, Korvatska E, Djemai A, Le Paslier D, Zografos L, Pescia G, Schorderet DE. Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nature Genetics*. 1997;15: 247-251.
13. Yaylacioglu Tuncay F, Kayman Kurekci G, Guntekin Ergun S, Pasaoglu OT, Akata RF, Dincer PR. Genetic analysis of CHST6 and TGFBI in Turkish patients with corneal dystrophies: Five novel variations in CHST6. *Molecular Vision*. 2016; 22: 1267-1279.
14. Li Y, Li T, Song XS, Li JZ, Wu QS, Li HY. TGFBI and CHST6 gene analysis in Chinese stromal corneal dystrophies. *International Journal of Ophthalmology*. 2012; 5(3): 301-6.
15. Fandrich M, Fletcher MA, Dobson CM. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature*. 2001; 410:165-166.
16. Clout NJ, Hohenester E. A model of FAS1 domain 4 of the corneal protein beta(ig)-h3 gives a clearer view on corneal dystrophies. *Molecular Vision*. 2003; 9: 440-448.
17. Munishkina LA, Fink AL, Uversky VN. Conformational prerequisites for formation of amyloid fibrils from histones. *Journal of Molecular Biology*. 2004; 342: 1305-1324.
18. Runager K, Basaiawmoit RV, Deva T, Andreasen M, Valnickova Z, Sorensen CS, Karring H, Thogersen IB, Christiansen G, Underhaug J, Kristensen T, Nielsen NC, Klintworth GK, Otzen DE, Enghild JJ. Human phenotypically distinct TGFBI corneal dystrophies are linked to the stability of the fourth FAS1 domain of TGFBIp. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(7): 4951-4958.
19. Underhaug J, Koldso H, Runager K, Nielsen JT, Sorensen CS, Kristensen T, Otzen DE, Karring H, Malmendal A, Schiott B, Enghild JJ, Nielsen NC. Mutation in transforming growth factor beta induced protein associated with granular corneal dystrophy type 1 reduces the proteolytic susceptibility through local structural stabilization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1834: 2812-2822.
20. Clout NJ, Tisi D, Hohenester E. Novel fold revealed by the structure of a FAS1 domain pair from the insect cell adhesion molecule fasciclin I. *Structure* (London, England:1993). 2003; 11: 197-203.
21. Yang J, Han X, Huang D, Yu L, Zhu Y, Tong Y, Zhu B, Li C, Weng M, Ma X. Analysis of TGFBI gene mutations in Chinese patients with corneal dystrophies and review of the literature. *Molecular Vision*. 2010; 16:1186-1193.
22. Lakshminarayanan R, Chaurasia SS, Anandalakshmi V, Chai SM, Murugan E, Vithana EN, Beuerman RW, Mehta JS. Clinical and genetic aspects of the TGFBI-associated corneal dystrophies. *The Ocular Surface*. 2014; 12: 234-251.
23. Kiratli H, Irkeç K, Ozgüç K, Oğuş A. The phenotype of arg555trp mutation in a large Turkish family with corneal granular dystrophy. *European Journal of Ophthalmology*. 2001; 11: 333-337.
24. Stix B, Leber M, Bingemer P, Gross C, Ruschhoff J, Fandrich M, Schorderet DE, Vorwerk CK, Zacharias M, Roessner A, Rocken C. Hereditary lattice corneal dystrophy is associated with corneal amyloid deposits enclosing C-terminal fragments of keratoepithelin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005; 46: 1133-1139.
25. Munier FL, Frueh BE, Othenin-Girard P, Uffer S, Cousin P, Wang MX, Heon E, Black GC, Blasi MA, Balestrazzi E, Lorenz B, Escoto R, Barraquer R, Hoeltzenbein M, Gloor B, Fossarello M, Singh AD, Arsenijevic Y, Zografos L, Schorderet DE. BIGH3 mutation spectrum in corneal dystrophies. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2002; 43: 949-954.
26. Kennedy SM, McNamara M, Hillery M, Hurley C, Collum LM, Giles S. Combined granular lattice dystrophy (Avellino corneal dystrophy) *Br J Ophthalmol*. 1996; 80: 489-490.
27. Maeng YS, Lee GH, Choi SI, Kim KS, Kim EK. Histone methylation levels correlate with TGFBIp and extracellular matrix gene expression in normal and granular corneal dystrophy type 2 corneal fibroblasts. *BMC Medical Genomics*. 2015; 8: 74.