

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

FACİOSCAPULOHUMERAL MUSKÜLER
DİSTROFİ'DE DUX4/ β -KATENİN/ PAX3-7 PROTEİN
DÜZEYLERİNDEKİ FARKLILIKLARIN VE
BİRBİRLERİYLE ETKİLEŞİMLERİNE ÖSTROJENİN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ceren HANGÜL

DOKTORA TEZİ

2019-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

FACİOSCAPULOHUMERAL MUSKÜLER
DİSTROFİ'DE DUX4/ β -KATENİN/ PAX3-7 PROTEİN
DÜZEYLERİNDEKİ FARKLILIKLARIN VE
BİRBİRLERİYLE ETKİLEŞİMLERİNE ÖSTROJENİN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ceren HANGÜL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2016-1460 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 01/02/2019

İmza

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. İbrahim KESER
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Hilmi UYSAL
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Filiz KOÇ
Çukurova Üniversitesi

Üye : Dr.Öğr.Üye. Onur EROĞLU
Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Dr. Ceren HANGÜL

İmza



Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

İmza



TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecimde, tüm bilgi ve deneyimi ile, en zor koşullarda dahi, her zaman yanımda olan, sevgi ve desteğini esirgmeden paylaştan kıymetli danışman hocam Prof.Dr.Sibel BERKER KARAÜZÜM ve onun akademisyen olmasını hep desteklemiş olan değerli babası İrfan BERKER'e,

Tüm süreçlerdeki karşılıksız paylaşımları ve bitmeyen bilim aşkları ile hep örnek aldığım Prof.Dr.Nidai ÖZEŞ, Prof.Dr.Hilmi UYSAL, Prof.Dr. İbrahim KESER ve Prof.Dr.Filiz KOÇ'a,

Tez sürecinde deneylerin her aşamasındaki katkı ve emeklerinin varlığı için, değerli Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi ekibi; saygıdeğer hocam Öğr. Üye. Dr. Onur EROĞLU, Esin GÜVENİR ÇELİK, Hacer KAYA, Elif KORKUT, Merve BAŞOL, Kübra ERDOĞAN, Büşra SEVİM, Gamze USAÇ'a,

Hücre hatlarımı hiçbir karşılık beklemeden sadece bilimsel araştırmaya destek amacıyla göndermeleri nedeniyle Rochester Üniversitesinden Professor Rabi Tawil ve Don Henderson'a; bu duruma vesile olan Leiden Üniversitesinden Silvere van der Maarel ve Judith'e,

Her başımız sıkıştığında başlarımızı ağrıttığımız, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanları Turhan TAT, Burhan ÇAKMAZ , Cihan POLAT'a sevgi ve sabırla verdikleri destekleri için,

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana yol gösteren arkadaşlarım Dileyra ADIGÜZEL ve Elanur YILMAZ'a,

Doktora sürecinde her bunaldığım anda destekleri ile baştan başlayabilmemi sağlayan insanlar, değerli dostlarım, Betül YILMAZ, Faik ŞAVKLI, Dr.Güneş AYTAÇ ve Nüzhet YENİLMEZ'e,

Ve tabi ki, sadece tez çalışmam süresince değil, hayatımın her gününde her döneminde anlayış, sevgi ve destekleri için annem Şengül SÜSLÜ ve babam Hamza HANGÜL ile birlikte kocaman güzel ailemin tüm fertlerine teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Fasioskapulohumeral Distrofi(FSHD)'de bulguların erkeklerde kadınlara göre erken yaşta başlayarak hızlı ilerlemesi, kadınlarda menapoz sonrası hastalığın ağırlaşması dikkati çekmiş; bu gözlemlerden yola çıkılarak östrojenin kilit rol oynayabileceği düşünülmüş, FSHD patofizyolojisinde östrojenin rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: 63 ve 71 yaşında iki erkek(63yE/71yE); 47 ve 58 yaşında iki kadın(47yK/58yK) olmak üzere FSHD tanılı dört bireye ait primer miyoblast hücre hatlarında, i)östradiol uygulanmayan kontrol grubu , ii)10nM 30-dakika ve iii)10nM 4-saat östradiol muamelesi olmak üzere üç farklı gruba ait FSHD miyoblastlarından elde edilen hücre lizatlarında; DUX4, PAX3/7 ve β -katenin transkripsiyon faktörlerinin varlığı-miktarları western blot yöntemiyle incelenmiştir.

Bulgular: DUX4 proteini östradiol muamelesi ile 71yE azalarak sıfırlanmış; 63yE ve 47yK tespit edilememiştir. 58yK tutunma-çoğalma gerçekleşmediği için sonuç elde edilememiştir. β -katenin proteininin, 71yE, 63yE ve 47yK örneklerinde östradiolle düzeyi artmıştır. PAX3/7 proteinlerine ait 80 kDa, 56 kDa ve 45 kDa ağırlığında üç farklı protein bandı tespit edilmiştir. Bunlardan 80 kDa ve 56 kDa'luk form sadece 71yE örneğinde gözlenmiş ve 80 kDa formu östradiol ile azalarak sıfırlanmış; 56 kDa formu östradiol sonrası 4. saatte eksprese olmuştur. 45 kDa formu üç örnekte de tespit edilmiş; 71yE ve 47yK örneğinde östradiolle azalırken; 63yE örneğinde artmıştır.

Sonuç: Östradiol muamelesi ile DUX4'ün azalması, β -kateninin artması, PAX3/7 protein ailesinden 56 kDa formunun 4. saatte ekspresyonunun uyarılması, östrojenin FSHD patofizyolojisindeki koruyucu rolünü destekler niteliktedir. Östradiolün etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi ve tedaviye yönelik alternatiflerin geliştirilebilmesi için her bir transkripsiyon faktörü ve ilgili hedef genlerinin; mRNA-protein düzeylerini içeren kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: östradiol, DUX4, β -katenin, PAX3/7, FSHD (fasioskapulohumeral musküler distrofi)

ABSTRACT

Objective: In Facioscapulohumeral Dystrophy(FSHD) it is noteworthy that the findings progressed at an earlier age in men, and the disease worsens in postmenopausal women. Depending on these observations; the role of estrogen was investigated in the pathophysiology of FSHD.

Method: Primary FSHD myoblast cell lines prepared from biopsies of four individuals(63 and 71 years old(63yE/71yE) two males; 47 and 58 years old(47yK/58yK) two females) were used. Three different groups i) estradiol untreated control group, ii) 10nM 30-minutes and iii) 10nM 4-hours estradiol treatment were generated. Cell lysates from FSHD myoblasts in these groups were examined by western blot for the presence-amount of DUX4, PAX3/7 and β -catenin transcription factors.

Results: After estradiol treatment DUX4 protein level reduced to zero in 71yE, it wasn't detected in 63yE and 47yK. Because of ineffective attachment in 58yK, proteins weren't obtained. The level of β -catenin protein increased with estradiol in 71yE, 63yE and 47yK samples. Three different protein bands of 80 kDa, 56 kDa and 45 kDa were determined for PAX3/7 proteins. Of these, 80 kDa and 56 kDa forms were observed only in 71yE; after estradiol 80-kDa PAX3/7 form reduced; 56-kDa PAX3/7 form was expressed at the 4th hour. The 45 kDa form was determined in all samples; with estradiol treatment this form decreased in 71yE-47yK and increased in 63yE.

Conclusion: The decrease in DUX4, the increase in β -catenin, stimulation in the expression of 56 kDa form of PAX3/7 protein family after 4 hours of estradiol treatment support the protective role of estrogen in FSHD pathophysiology. To understand the effect of estradiol on pathophysiology better and to develop treatment alternatives; extensive studies are needed with each transcription factor and related target genes; both at mRNA-protein levels.

Key words: estradiol, DUX4, β -catenin, PAX3/7, FSHD (facioscapulohumeral muscular dystrophy)

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. FSHD'nin Tarihçesi	2
2.2. FSHD İnsidansı ve Prevelansı	3
2.3. Klinik Özellikler	3
2.3.1. Genel Klinik Bulgular	3
2.3.2. Tedavi Seçenekleri	4
2.3.3. MRI ve EMG Bulguları	6
2.4. FSHD Patogenezi	6
2.4.1. FSHD'nin Moleküler ve Genetik Özellikleri	6
2.4.2. FSHD ve İskelet Kası Gelişimi	25
2.5. Çalışmanın Amacı	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Miyoblast (FSHD) Hücre Soyları	29
3.2. Miyoblast Hücre Kültürü	30
3.2.1. Hücre Kültürü Basamakları	30
3.2.2. Gerekli Solüsyonlar	33
3.2.3. İşlemler	34
3.3. Protein İzolasyonu	35
3.3.1. Gerekli Solüsyonlar	35
3.3.2. İşlemler	35

3.4. Protein Miktar Tayini	36
3.5. Western Blot Yöntemi	36
3.5.1. İşlemler	36
3.5.2. Proteinlerin Hazırlanması ve Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	36
3.5.3. Proteinlerin Nitröselülöz Membrana Transferi	38
3.5.4. Bloklama	38
3.5.5. Primer ve Sekonder Antikor Muamelesi	39
3.6. Görüntüleme	40
3.7. Bantların Kantitatif Olarak Hesaplanması ve Grafik Çizimi	41
3.8. Deneylerde Kullanılan Makina-Techizatlar	41
4. BULGULAR	42
4.1. Hücre Kültürü Bulguları	43
4.2. 58 Yaşında Kadın Hastaya ait Hücre Hattı Bulguları	43
4.3. 71 Yaşında Erkek Hastaya ait Hücre Hattı Bulguları	44
4.3.1. GAPDH Proteinine ait Bulgular	44
4.3.2. DUX4 Proteinine ait Bulgular	47
4.3.3. β -katenin Proteinine ait Bulgular	49
4.3.4. PAX3 ve PAX7 Proteinlerine ait Bulgular	52
4.4. 63 Yaşında Erkek Hastaya ait Hücre Hattı Bulguları	55
4.4.1. DUX4 Proteinine ait Bulgular	55
4.4.2. β -katenin Proteinine ait Bulgular	55
4.4.3. PAX3/7 Proteinine ait Bulgular	56
4.5. 47 Yaşında Kadın Hastaya ait Hücre Hattı Bulguları	56
4.5.1. DUX4 Proteinine ait Bulgular	56
4.5.2. β -katenin Proteinine ait Bulgular	57
4.5.3. PAX3/7 Proteinine ait Bulgular	57
5. TARTIŞMA	59
5.1. 58 Yaşındaki Kadın Hasta Örneğine ait Sonuçların Değerlendirilmesi	63
5.2. 71 Yaşındaki Erkek Hasta Örneğine ait Sonuçların Değerlendirilmesi	63
5.2.1. GAPDH Bulgularının Tartışılması	63

5.2.2. DUX4 Bulgularının Tartışılması	65
5.2.3. β - katenin Bulgularının Tartışılması	68
5.2.4. PAX3/7 Bulgularının Tartışılması	69
5.2.5. DUX4, β -katenin, PAX3/7 Bulgularının Birbirlerine göre Durumlarının Tartışılması	70
5.3. 63 Yaşındaki Erkek Hasta Örneğine ait Sonuçların Değerlendirilmesi	71
5.3.1. DUX4 Bulgularının Tartışılması	71
5.3.2. β -katenin Bulgularının Tartışılması	71
5.3.3. PAX3/7 Bulgularının Tartışılması	72
5.3.4. β -katenin, PAX3/7 Sonuçlarının Birbirlerine göre Durumlarının Tartışılması	72
5.4. 47 Yaşındaki Kadın Hasta Örneğine ait Sonuçların Değerlendirilmesi	72
5.4.1. DUX4 Bulgularının Tartışılması	72
5.4.2. β -katenin Bulgularının Tartışılması	73
5.4.3. PAX3/7 Bulgularının Tartışılması	73
5.4.4. β -katenin, PAX3/7 Sonuçlarının Birbirlerine göre Durumlarının Tartışılması	73
5.5. 71yE, 63yE, 47yK Örneklerinden Elde Edilen Bulguların Karşılaştırılması	73
5.5.1. DUX4 Bulgularının Karşılaştırılarak Tartışılması	73
5.5.2. β -katenin Bulgularının Karşılaştırılarak Tartışılması	74
5.5.3. PAX3/7 Bulgularının Karşılaştırılarak Tartışılması	75
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	88

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. FSHD hastalığının klinik şiddeti (clinical severity score-CSS) skorlaması	5
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan FSHD hücre hatlarına ait klinik ve moleküler veriler	30
Tablo 3.2. RIPA solüsyonu içeriği	35
Tablo 3.3. Poliakrilamid jel bileşenleri %4 Yükleme Jelinin içeriği	37
Tablo 3.4. Poliakrilamid jel bileşenleri % 12 Ayırma Jelinin içeriği	37
Tablo 4.1. DUX4, β -katenin, PAX3/7, GAPDH, β -aktin proteinlerinin molekül ağırlıkları ve çalışma sonucunda elde edilen yaklaşık bant büyüklükleri	42
Tablo 5.1. PAX3 protein varyantları	69
Tablo 5.2. PAX7 protein varyantları	69
Tablo 5.3. 71 yaşındaki erkek hasta örneğinde elde edilen DUX4, β -katenin, PAX3/7, GAPDH sonuçlarında görülen düzey değişikliklerini özetleyen tablo	70
Tablo 5.4. 63 yaşındaki erkek hasta örneğinde elde edilen DUX4, β -katenin, PAX3/7, GAPDH sonuçlarında görülen düzey değişiklikleri özetleyen tablo	72
Tablo 5.5. 47 yaşındaki kadın hasta örneğinde elde edilen β -katenin, PAX3/7 sonuçlarında görülen düzey değişiklikleri özetleyen tablo	73
Tablo 6.1. 71, 63, 47 yaşındaki hasta örneklerinde elde edilen DUX4, β -katenin, PAX3/7, GAPDH'e ait tüm sonuçlarda görülen düzey değişikliklerinin birleştirildiği tablo	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Landouzy-Dejerine'in 1885'de tanımladığı FSHD aile pedigrisi	3
Şekil 2.2. FSHD'de kas tutulumunun şematizasyonu	4
Şekil 2.3. İnsan genomundaki tekrar dizilerinin sınıflandırılması	7
Şekil 2.4. Antisipasyon; tekrar sayısı artışı ve hastalığın şiddetinin nesilden nesile artışı (antisipasyon) gösteren şekil	8
Şekil 2.5. (A)İleri ve (B)geri olarak adlandırılan iki farklı slipaj mekanizması	9
Şekil 2.6. FSHD'den sorumlu tutulan 4q35'te yer alan D4Z4 dizinin yerleşimi	9
Şekil 2.7. D4Z4 bölgesindeki tekrar sayısının (a)sağlıklı ve (b)FSHD1 bireylerindeki yapısı	10
Şekil 2.8. FSHD tanısında kullanılan Southern Blot yöntemi sonucunda elde edilen PFGE görüntüsü	11
Şekil 2.9. FSHD tanısında kullanılan moleküler kombine yöntemi	12
Şekil 2.10. DUX4 proteinin yapısı ve bağlandığı DNA dizilimi	13
Şekil 2.11. Kanonikal Wnt yolağının; Wnt varlığı ve yokluğu durumundaki işleyişin şematizasyonu	17
Şekil 2.12. β -katenin proteininin miyoblast, miyotüp ve miyofiber oluşmasında etki ettiği noktalar	18
Şekil 2.13. D4Z4 dizisinin FSHD'deki tekrar sayısı ve metilasyon durumu	20
Şekil 2.14. LncRNA'lar ve Polikomb-Trithorax Protein aile üyelerinin FSHD'deki gen regülasyonu üzerindeki etkisinin temsili şekli	22
Şekil 2.15. PAX3/7 proteinin yapısının şematizasyonu	25
Şekil 2.16. Çalışmanın Hipotezi	28
Şekil 3.1. Kullanılan belirteç (protein büyüklük belirteci) görseli	38
Şekil 4.1. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait hücrelerin E2 uygulaması ile morfolojik görüntüleri	43
Şekil 4.2. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 maruziyeti ile zamana bağlı GAPDH ekspresyonunun western blot yöntemiyle gösterilmesi	44

Şekil 4.3. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 maruziyeti ile zamana bağlı β -aktin ekspresyonunun western blot yöntemiyle gösterilmesi	45
Şekil 4.4. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 maruziyeti ile zamana bağlı GAPDH ekspresyonunun western blot yöntemiyle β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi	46
Şekil 4.5. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı DUX4 ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi	47
Şekil 4.6. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı DUX4 ekspresyonunun western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi	48
Şekil 4.7. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı β -katenin ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi	49
Şekil 4.8. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı β -katenin ekspresyonunun western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi	50
Şekil 4.9. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı β -katenin ekspresyonunun western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi	51
Şekil 4.10A. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı 80 kDa PAX3/7 ekspresyonunun western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi	52
Şekil 4.10B. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı 56 kDa PAX3/7 ekspresyonunun western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi	53
Şekil 4.10C. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı 45 kDa PAX3/7 ekspresyonlarının western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi	54

Şekil 4.11. 63 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı β -katenin ekspresyonunun western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi	55
Şekil 4.12. 63 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı 45 kDa PAX3/7 ekspresyonunun western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi	56
Şekil 4.13. 47 yaşındaki kadın FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı β -katenin ekspresyonunun western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi	57
Şekil 4.14. 47 yaşındaki kadın FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı 45 kDa PAX3/7 ekspresyonunun western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi	58
Şekil 5.1. Çalışma tasarımının görseli: FSHD hücre kültüründe östradiol muamelesinin DUX4, β -katenin, PAX3/7 düzeylerine etkisinin araştırılması	61
Şekil 5.2. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait hücrelerin östradiol uygulaması yapılan ve yapılmayan gruplardaki hücrelerin morfolojik görüntüleri	62
Şekil 5.3. Kalp kası, iskelet kası ve düz kas dokularındaki GAPDH genine ait mRNA ve protein ekspresyonunun düzeyi	64
Şekil 5.4. Kalp kası, iskelet kası ve düz kas dokularındaki DUX4 genine ait mRNA ve protein ekspresyonunun düzeyi	65
Şekil 5.5. Satellit hücresinden miyoblast-miyosit-miyofiber yapısı oluşum sürecinde eksprese olan genlerin şeması	66
Şekil 5.6. Kullanılan DUX4 “E5-5” antikorunun özellikleri	67
Şekil 5.7. Kalp kası, iskelet kası ve düz kas dokularındaki β -katenin genine ait mRNA ve protein ekspresyonunun düzeyi	68
Şekil 5.8. Kalp kası, iskelet kası ve düz kas dokularındaki PAX3 ve PAX7 genlerine ait mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri	76

SİMGELER ve KISALTMALAR

AGO	: Agonuate
bFGF	: temel Fibroblast Büyüme Faktörü
Ccna2	: Siklin A2
Cdc25c	: Hücre Bölünme Siklus 25
CTNNB1	: Katenin-beta-1
CSS	: Klinik Şiddet Skoru
DNMT3B	: DNA Metiltransferaz 3 Beta
DUX4c	: DUX4 kısa form
DUX4-fl	: DUX4 uzun form
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FZD-LRP5	: Frizzled Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör İlişkili Protein
ERE	: Östrojen Yanıt Elementi
ER-α	: Östrojen Reseptörü α
ER-β	: Östrojen Reseptörü β
FBS	: Fötal Dana Serum
FSHD	: Fasioskapulohumeral Musküler Distrofi
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GSK3β	: Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta
LEF/TCF	: Lenfoid Enhancer Faktör/T-cell Faktör
lncRNA	: uzun kodlamayan RNA
miRNA	: mikro RNA
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
PCR	: Polimerase Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	: Revers Transkriptaz-Polimerase Zincir Reaksiyonu
SMCHD1	: Esnek menteşe içerem kromozom yapı elemanı
SNP	: Tek Nükleotit Polimorfizmi
μl	: mikrolitre
μm	: mikrometre
nM	: nanomol

1. GİRİŞ

Fasioscapulohumeral Musküler Distrofi (FSHD), otozomal dominant olarak kalıtılan genetik bir hastalıktır ve kas distrofilerinin arasında üçüncü sırada yer alır.

FSHD'nin kliniği yüz, omuz-scapular kaslar ve bazen de peroneal kaslarda asimetrik ilerleyici güç kaybı ile kendini gösterir. Hastalık genel olarak ikinci ve üçüncü dekatta ortaya çıkar; ancak hastalığın ortaya çıkışı ve ilerleyişi heterojendir.

Klinik olarak kadın ve erkek FSHD hastalarında muayene bulguları anlamlı bir farklılık gösterir ve kadın hastalarda genellikle menapoza kadar hafif, menapoz sonrası şiddetlenerek artan bir seyir gözlenir. Klinik olarak görülen bu gözlem östrojeni hastalığın şiddetini etkileyen bir faktör olarak öne çıkarmaktadır.

FSHD'nin moleküler patogenezi ile ilgili birçok araştırma yapılmış olsa da patogenez hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Buna karşın bugün için bilenen kilit protein bir transkripsiyon faktörü olan DUX4 proteindir. DUX4 ile yarışmalı olarak etki gösteren benzer yapıdaki transkripsiyon faktörleri PAX3-PAX7 ile ve bir network çalışmasında FSHD'deki merkezi rolü gösterilen β -katenin proteini öne çıkan diğer kilit proteinler arasındadır.

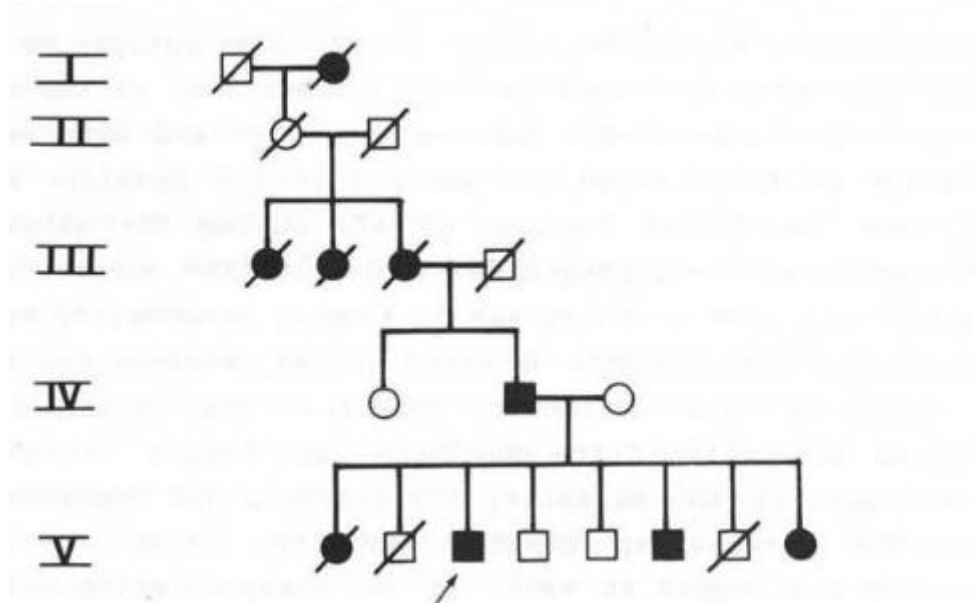
Çalışmamızda klinik olarak hastalığın seyrini etkilediği düşünülen östrojenin etkisini moleküler düzeyde ortaya koymak amacıyla; DUX4, β -katenin ve PAX3-7 düzeylerine östrojenin etkisinin olup olmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla; FSHD hücre hatlarında östrojen muamelesi öncesinde ve sonrasındaki örneklerden western blot yöntemiyle DUX4, β -katenin ve PAX3-7'nin proteinlerinin varlığı ve düzeylerindeki değişikliklerin ölçülerek, östrojenin bu proteinlerin düzeyinde anlamlı bir fark oluşturup oluşturmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fasioskapulohumeral musküler distrofi (FSHD)'nin Tarihçesi

Nöromusküler hastalık kavramı oldukça geniş hastalık grubunu kapsayan bir tanımlamadır. Bu tanıma dahil olan hastalıklarda sinir ve/veya kas komponentlerini kapsayan hasarlar söz konusudur. Bu hasar sinir hücresinin gövdesinde, aksonunda, schwann hücrelerinde olabildiği gibi; nöromusküler kavşak ya da kas yapısının kendisinde olabilmekte ya da daha kompleks olarak tüm bu yapıların kombinasyonları şeklinde de ortaya çıkabilmektedir (Morrison, 2016).

FSHD ise sadece kas yapısının tutulduğu nöromusküler bir hastalıktır. Sadece kas yapısını tutan bu hastalığı tarihi süreçte diğer nöromusküler hastalık ve distrofilerden ayırt edip tanımlamak kolay olmamıştır (Padberg, 1982). Duchenne çalışmalarının bir bölümünde FSHD' nin bugünkü tanımına neredeyse tamamen uyan vakalar tanımlamış olmasına rağmen; 19.yy ortalarında kronik musküler atrofiler, ön boynuz hastalıkları olarak kabul edilmekteydi. Duchenne 1868 yılında kas yapısındaki değişikliklere dikkat çeken makalesinde; Eulenburg ve Cohnheim'ın beyin ve spinal kordun etkilenmediğini gösterdikleri otopsi raporunu referans olarak göstermiş, 1852-1853 yıllarında çiçekten kaybedilen facial tutulumlu ilerleyici kas hastalığı olan başka bir vakada ise spinal kord ve periferik sinirlerin hiç etkilenmediğini belirten gözleme atıf yapmamıştır. Bu ikinci vaka muhtemelen tarihteki ilk tanımlanamamış FSHD otopsi vakası gibi görünmektedir. Primer kas hastalığı kavramının tanımlanabilmesi ise birkaç yılı daha almıştır. 1885 yılında Landouzy ve Dejerine "La myopathie atrophique progressive; myopathie sans neuropathie debutant d'ordinaire dans l'enfance, par la face " adlı yayınlarında Duchenne'in bu tanıma uyan vakaları ile kendi vakalarının aynı olduğunu varsayarak ilk kez FSHD hastalığının bulgularını bir ailede (Şekil 2.1) tanımlamışlardır. Bu tanımlama ile primer kas hastalığı kavramı literatürde yerini almıştır.



Şekil 2.1. Landouzy-Dejerine'in 1885'de tanımladığı FSHD aile pedigrisi. (<https://openaccess.leidenuniv.nl/bitstream/handle/1887/25818/01.pdf?sequence=13> adresinden alınmıştır. Erişim Tarihi: 15 Aralık 2015)

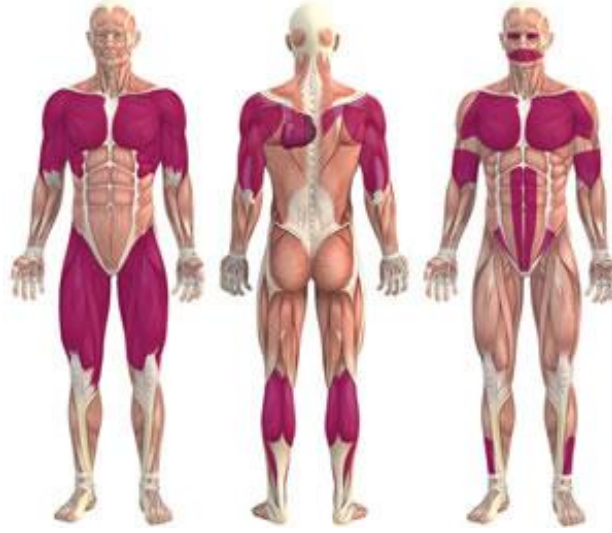
2.2. FSHD İnsidansı ve Prevelansı

Fasioskapulohumeral Musküler Distrofi (FSHD) (OMIM#158900), bugün için dünya üzerinde en sık görülen üçüncü kas distrofisi olup görülme sıklığı 1:15,000-1:20,000'dir (Statland ve Tawil, 2014). Hollanda'da yapılan bir çalışmaya göre ise prevelansın yaklaşık iki kat daha fazla 12:100.000, insidansın ise 0.3:100.000 olduğu bildirilmiştir (Deenen ve ark., 2014).

2.3. Klinik Özellikler

2.3.1. Genel Klinik Bulgular

FSHD'nin kliniği, adından da anlaşılacağı gibi yüz, omuz-scapular kaslar ve bazen de peroneal kaslarda (Şekil 2.2) asimetrik ilerleyici güç kaybı ile kendini gösterir (Tawil, 2008; Fitzsimons, 2011).



Şekil 2.2. FSHD’de kas tutulumunun şematizasyonu. Koyu olarak işaretlenmiş olan bölgeler FSHD’nin tutulum yaptığı kas gruplarını simgelemektedir. (<https://mobilitymgmt.com/articles/2016/10/01/limb-girdle-emery-dreifuss-fshd-md.aspx>, Erişim tarihi: 20 Kasım 2018)

Hastalığın ortaya çıkış zamanı genel olarak ikinci ve üçüncü dekad (Tawil, 2008) olarak tanımlansa da hastalığın ortaya çıkış yaşı ve klinik şiddeti bireyler arasında farklılık gösterir. Hastaların bir kısmında prognoz, 20’li yaşlarda hastalık tablosunun başlaması ve ilerleyen yaşlarda tekerlekli sandalyeye mahkum bırakacak kadar şiddetli seyrederken, diğer hastalarda daha geç başlayan ve sadece bazı kas tutulumlarıyla sınırlı olarak hafif şiddette bir klinik seyir gözlenebilmektedir. Avrupa ve Amerika’da yaygın olarak kullanılan; klinik şiddetin bir sınıflaması olan klinik şiddet skor (clinic severity score-CSS) sistemi; hastalığın ilerleyişini on ana parçaya bölerek incelemektedir (Ricci ve ark., 1999; van Overveld ve ark., 2005) (Tablo 2.1).

2.3.2. Tedavi Seçenekleri

FSHD, üçüncü en sık görülen kas distrofisi olarak azımsanamayacak sayıda hasta profiline sahiptir ve bugün için hala bir tedavisi bulunmamaktadır. Yapılan ilaç denemelerinden biri DUX4 proteinini hedefleyen küçük RNA parçaları olmuştur (Vanderplanck ve ark., 2018) ancak pozitif bir sonuç elde edilememiştir. Bir diğer çalışmada histidil-tRNA sentetaza çok yakın özellikte bir protein kullanılmış, 3 aylık tedavi ile erken başlangıçlı vakalarda fayda görüldüğü öne sürülmüştür (Walker ve ark., 2017) ancak henüz klinik kullanıma geçilmemiştir.

Tablo 2.1. FSHD hastalığının klinik şiddeti (clinical severity score-CSS) skorlaması

KLİNİK ŞİDDET SKORU(CLINICAL SEVERITY SCORE-CSS)

0,5	Yüz kaslarında güçsüzlük
1	Kol abdüksiyonunda kısıtlama olmaksızın hafif şiddette skapular tutulum; hastalığa ait bulgular fark edilemez düzeyde
1,5	Kol kasları ve/veya skapular kasların orta şiddette (kol abdüksiyonu $>60^\circ$ ve kol kuvveti >3) tutulumu var, pelvik kaslar ile bacak kasların tutulumu yok
2	Ciddi şiddette skapular tutulum (kol abdüksiyonu en az bir taraflı olarak $<60^\circ$), kolun en az bir bölgesinde tutulum var, pelvik kaslar ile bacak kasların tutulumu yok
2,5	Tibioperoneal zayıflık; pelvik kaslar ile bacak kaslarında güçsüzlük yok
3	Pelvik kaslar ve/veya bacak kaslarında hafif şiddette güçsüzlük (tüm bu kaslardaki kuvvet >4); sandalyeden desteksiz kalkabilme
3,5	Pelvik kaslar ve/veya bacak kaslarında orta şiddette güçsüzlük (tüm bu kaslardaki kuvvet >3); sandalyeden tek taraflı(monolateral) destek ile kalkabilme
4	Pelvik kaslar ve/veya bacak kaslarında ciddi şiddette güçsüzlük (tüm bu kaslardaki kuvvet <3); sandalyeden çift taraflı(bilateral) destek ile kalkabilme; yardımsız yürüyebilme
4,5	Sandalyeden kalkma mümkün değil; desteksiz çoklu adım atabilme sınırlı; aktivitelerin çoğunda tekerlekli sandalye kullanır
5	Tekerlekli sandalyeye bağımlı

Kadın ve erkek hastalar arasında belirgin klinik farklılıklar birçok çalışmada tanımlanmış olup, FSHD tanısı olan erkek hastalarda klinik bulgular daha erken yaşta ortaya çıkmakta ve daha şiddetli seyretmektedir (Lin ve ark., 2015). Kadın ve erkek arasındaki bu farklılık infantil vakalarda gözlenmez (L. Klinge ve ark., 2006). FSHD her ne kadar kas hastalığı olarak bilinse de göz, kulak, kemik ve diş anomalileri de hastalığa eşlik edebilmekte ve bu durum hastalığın şiddeti ile ilişkilendirilmektedir (T. Matsuzaka ve ark., 1986; Balatsouras ve ark., 2007; Fitzsimons, 2011). FSHD’de gözlenebilen diğer klinik bulgular; retinal vaskülopati, sensörinöral tipte işitme kaybı, restriktif akciğer hastalığı, kalpte sağ dal bloğudur (Tawil ve ark., 2015). Ayrıca FSHD’nin şiddetli seyrettiği çocuk vakalarda epilepsi ve mental retardasyon gibi santral sinir sistemi tutulumları da görülebilmektedir (Saito ve ark., 2007).

2.3.2. MRI (Magnetic Resonance Görüntüleme) ve EMG(Elektromiyografi)

Bulguları

Manyetik rezonans görüntüleme çalışmaları FSHD'deki fiziksel değişimleri ortaya koymaktadır. Buna göre en çok rastlanılan bulgu atrofi ve yağ infiltrasyonudur (Iosa ve ark., 2007) . Bugüne kadar diğer musküler distrofilerden ayırt edilmesini sağlayabilecek FSHD'ye spesifik bir değişim bulunamamış olsa da; güncel bir çalışmada Multivoxel Proton Manyetik Rezonans Spektroskopi yöntemi ile kas gruplarında metabolit olarak incelenen trimetilamin/kreatin oranında kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunmuştur (Leung ve ark., 2018).

EMG bulguları FSHD'de miyopatik bulgularla uyumlu tespit edilmekte ancak elektrofizyolojik bulgular ve klinik özellikler arasında bir korelasyon bulunmamaktadır (Dorobek ve ark., 2013).

2.4. FSHD Patogenezi

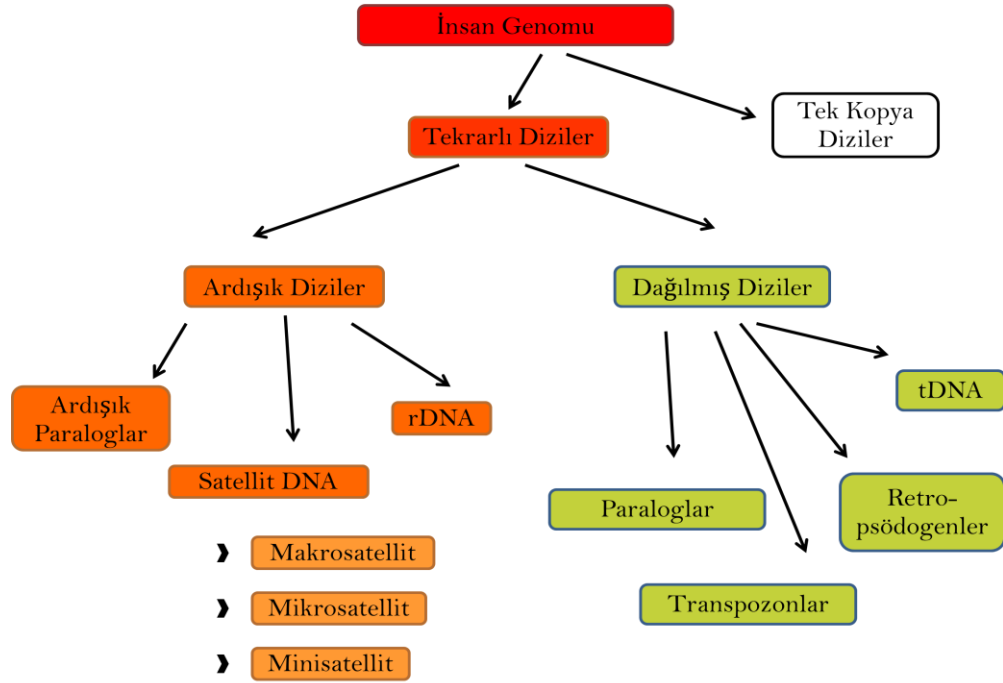
2.4.1. FSHD'nin Moleküler ve Genetik Özellikleri

Otozomal dominant kalıtım modeli ile ortaya çıkan FSHD hastalığının moleküler genetik altyapısı *a) genetik, b) epigenetik, c) multifaktöriyel* etkiler sınıflaması ile üç ana başlık altında incelenebilir.

A. FSHD'nin Genetik Altyapısı

D4Z4 Tekrar Dizileri

İnsan genomu yaklaşık 3 milyar bazdan (3,200,000,000 baz= 3200 megabaz) meydana gelmektedir. Bu büyük genomun, beklenenin aksine, küçük bir bölümü protein kodlamaktadır. Kodlayan bölgeler, gen ve gen ilişkili bölgelerdir. Tek kopya(unique) olarak sınıflandırılan bu diziler; kodlayan bölgeler, promotör bölgeleri, enhancer bölgeleri gibi alanları içermektedirler. Protein kodlamayan bölgeler ise intergenik bölgeler olarak adlandırılmaktadır. İntergenik DNA'nın büyük bir kısmı "repetitive DNA" adı verilen tekrarlı dizilerden oluşmaktadır. Tekrar dizileri tekrar ünitesinin büyüklüğü ve evrimsel kökenine bağlı olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.3). Örneğin satellit diziler olarak adlandırılan tekrar dizileri içerdikleri nükleotit miktarına göre *mikrosatellit* (her bir tekrar 1 ile 10 baz çifti), *minisatellit* (her bir tekrar 10 ile birkaç yüz baz çifti) ve *makrosatellit* (kilobaz) olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 2.3. İnsan genomundaki tekrar dizilerinin sınıflandırılması (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2593564/figure/f1/> adresindeki şekil temel alınarak hazırlanmıştır. Erişim tarihi: 13 Aralık 2013)

Tüm dünyada yaşayan insanların %99 oranında DNA dizi benzerliği mevcuttur. Geriye kalan %1’lik kısım bireyler arası farklılıkları oluşturmakta ve genetik varyasyon (polimorfizm) olarak adlandırılmaktadır. Belirli hastalıklara eğilimi arttırma ya da koruyucu olma özellikleri taşıyıcılar da; polimorfizmler mutasyondan farklı olarak hastalık oluşturma potansiyeline sahip değildir. İnsan genomundaki polimorfizmler; tek bir nükleotit düzeyinde (SNP; Single Nükleotit Polimorfizmi) ya da daha büyük alanları içerecek şekilde olabilmektedir. Genomda yer alan tekrar dizilerinin büyük bir bölümü de polimorfik özellik taşımakta; bireyler arasında farklılık göstermektedir. Bu tekrar dizilerinin her birinin normal kabul edilen bir aralığı bulunmaktadır. Tekrar sayılarının dinamik mutasyonlarla ortaya çıkan, normal aralık dışında artış ya da azalış göstermesi tekrar dizi hastalıkları adı verilen bir grup hastalığı oluşturmaktadır.

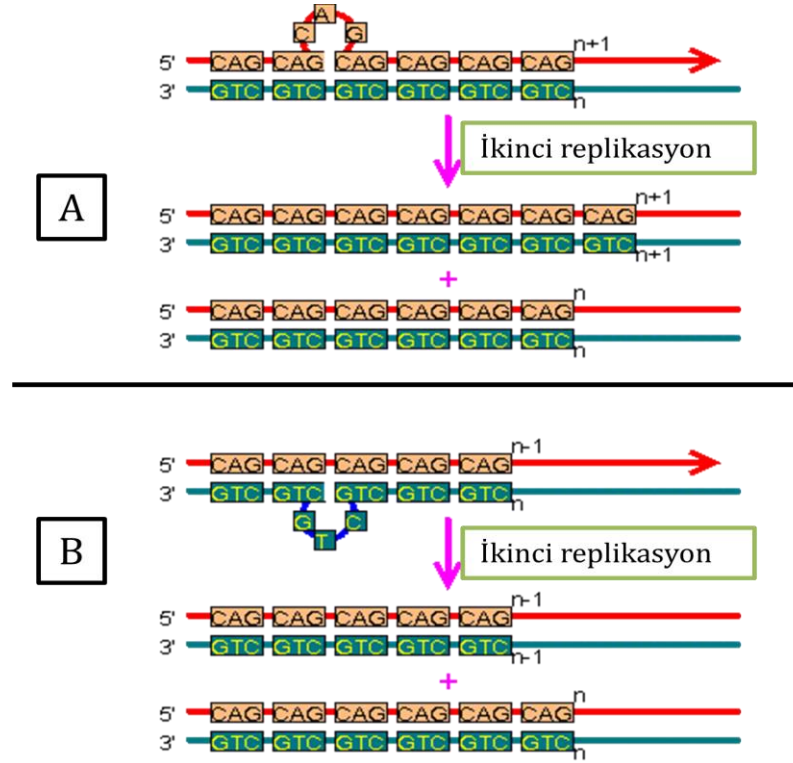
Tekrar dizi artış hastalıklarında 1-6 nükleotidlik mikrosatellit dizilerinde artış gözlenebilmektedir. İlginç olan, tüm bu hastalıkların “nöromusküler ve nörodejeneratif hastalıklar” altında toplanmasıdır (Frajil X, Spinocerebellar Ataksi, Huntington Hastalığı, Myotonik Distrofi gibi). Değişimin genomun neresinde yer aldığı önem

taşımaktadır (Budworth ve McMurray, 2013). Tekrar dizi artışı kodlayan bölgede ise bozuk protein oluşumuna ve birikimine sebep olurken, kodlamayan bölgede kırılmada veya gen ekspresyonunun kontrolünde bozulma gibi etkiler oluşturabilmektedir. İlgili genin fonksiyon kaybı ya da protein birikmesi nöronlarda fonksiyon bozukluğu ile hastalık ortaya çıkmaktadır. Ailesel görülen olgularda her nesilde tekrar sayısı daha da artarak; hastalığın şiddetinin de artmasına ve hastalığın görülme yaşının her nesilde daha erken yaşlara çekilmesine sebep olmaktadır. Bu fenomen genetikte antispasyon olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.4).

<u>Hastalık Başlangıç Yaşı</u>	<u>Tekrar Dizi Sayısı</u>	<u>Hastalığın Klinik Şiddeti</u>
Daha geç başlangıçlı	1. Kuşak CAGCAG	Az şiddetli
Geç başlangıçlı	2. Kuşak CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG	Şiddetli
Erken başlangıçlı	3. Kuşak CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG	Çok şiddetli

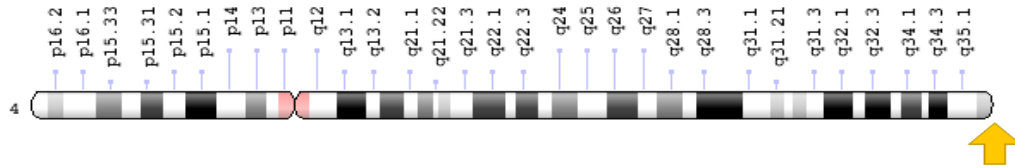
Şekil 2.4. Antispasyon; Tekrar *sayısı artışı* ve *hastalığın şiddetinin* nesilden nesile artışı (antispasyon) gösteren şekil (<http://www.sunnyprom.com/sca3/genetics.html>'den esinlenerek çizilmiştir. Erişim Tarihi: 12 Aralık 2018)

Antispasyonun oluşmasına yol açan tekrar sayı değişikliğine birçok genetik mekanizma neden olabilmektedir. “DNA slippage” olarak adlandırılan mekanizmada DNA replikasyonu sırasında iki farklı durum oluşabilir. Birinci durumda sentezlenen DNA zinciri kendi üstüne katlantı yaparak insersiyona (tekrar artışına) sebep olmaktadır (Şekil 2.5.A). Bu mekanizma Frajil X, Huntington Hastalığı gibi tekrar artışı ile seyreden hastalıklarda önem taşımaktadır. İkinci durumda ise kalıp DNA zinciri kendi üstüne katlantı yaparak sanki kopyalanmamış gibi delesyona (tekrar azalmasına) sebep olmaktadır (Şekil 2.5.B) ki FSHD için bu mekanizma söz konusu olabilir. Çünkü FSHD; çok bilinen bu *mikrosatellit* tekrar dizi *artış* hastalıklarından farklı olarak; bir *makrosatellit* tekrar dizi *kısalması* hastalığı olarak karşımıza çıkan bir nöromusküler hastalıktır.



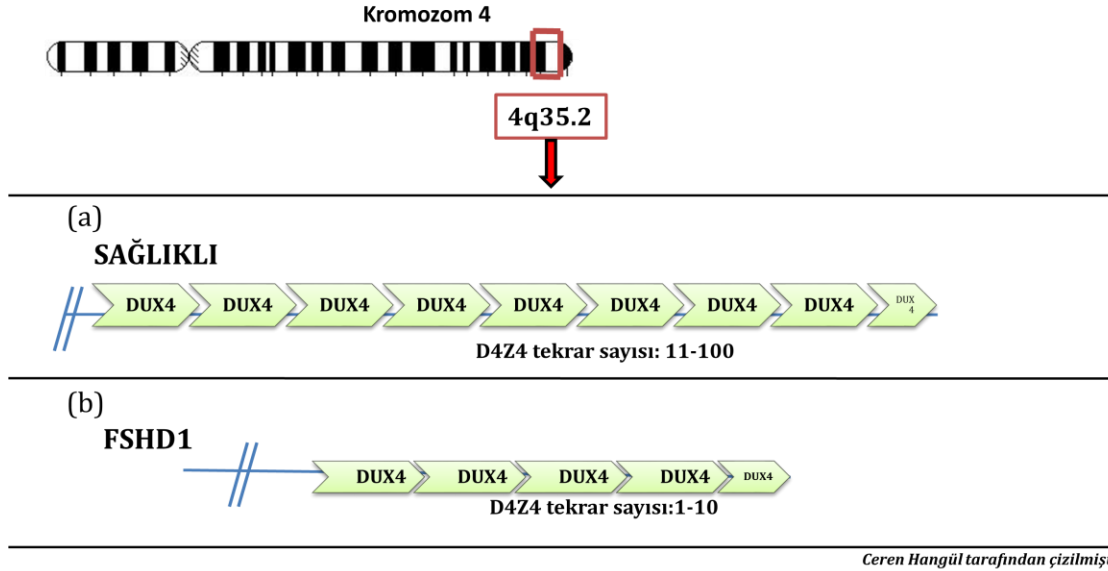
Şekil 2.5. (A)İleri ve (B)geri olarak adlandırılan iki farklı slipaj mekanizması. (<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7F3.htm> sitesinden alınarak türkçeleştirilmiştir. Erişim Tarihi 16 Aralık 2018)

Yapılan linkaj çalışmaları sonucunda FSHD vakalarının %95'inin 4 numaralı kromozomun uzun kolunda (4q35.2 bölgesinde) yer alan D4Z4 tekrar dizisi ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wijmenga ve ark., 1990; Wijmenga, Hewitt ve ark., 1992; Wijmenga, Sandkuijl ve ark., 1992) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. FSHD'den sorumlu tutulan 4q35'te yer alan D4Z4 dizinin yerleşimi (<https://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/4#idiogram> adresinden alınmıştır. Erişim tarihi 14 Aralık 2018)

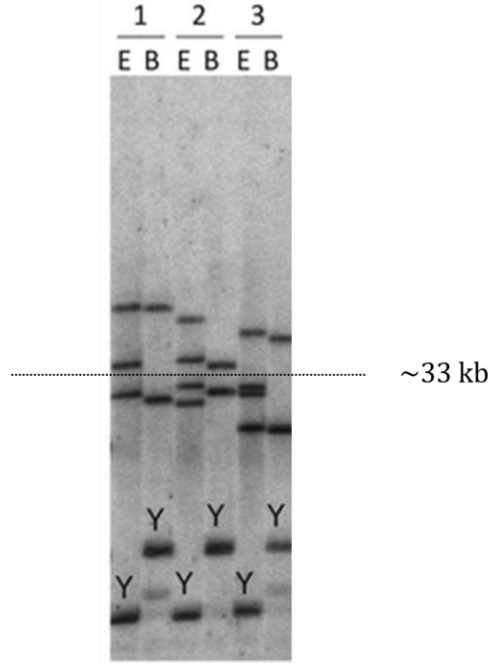
Bu bölge normal popülasyonda her biri 3.3kb (3300 baz)'den oluşan 11 ile 100 arasında değişen tekrar dizilerinden meydana gelmektedir. Ancak FSHD tanısı almış bireylerin azalmış (1-10 arasında) tekrar dizisi içerdiği gösterilmiştir (Hewitt ve ark., 1994) ve bu grup hastalar FSHD1 olarak adlandırılmaktadırlar (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. D4Z4 bölgesindeki tekrar sayısının (a)sağlıklı ve (b)FSHD1 bireylerindeki yapısı

FSHD tanısında; çok uzun bir tekrar dizisi olması nedeniyle (her bir tekrar 3300 baz), D4Z4 tekrar dizilerindeki kısalmanın gösterilmesinde southern blot ya da moleküler kombine yöntemleri kullanılmaktadır (Lemmers ve ark., 2007; Nguyen ve ark., 2011). FSHD’de ayırt edilebilir bir takım semptomlar olsa da kesin tanı konulmasını sağlayabilecek bir biyomarker mevcut değildir. Kreatin kinaz gibi kas destrüksiyonunu gösteren laboratuvar değerleri FSHD’yi diğer distrofilardan ayırt etmeye yeterli olmamaktadır. D4Z4 tekrar dizilerindeki kısalmayı gösteren en eski ve en geçerli metod southern blot yöntemidir. Bu yöntem hastadan alınan örneğin yüksek yoğunluklu DNA eldesinden sonra; DNA’nın 4q35 bölgesinde yer alan D4Z4 dizisine seçicilik gösteren EcoRI ve BlnI enzimleri tarafından kesilmesi ve pulse-field jel elektroforezi ile kesilen DNA boyutlarının incelenmesi temeline dayanmaktadır. Fakat bu yöntemin bir dezavantajı D4Z4 dizilerinin insan genomunda birçok paraloğunun bulunmasıdır (Clapp ve ark., 2007). Bunların hiçbiri FSHD ile ilişkilendirilmemişken (Ehrlich ve ark., 2007; Klooster ve ark., 2009) 10 numaralı kromozomun telomerik bölgesinde yer alan 10q26’da lokalize D4Z4 tekrar dizisi; 4q35’de bulunan D4Z4 dizisiyle % 97 homoloji göstermektedir. 10 numaralı kromozomdaki bu yüksek homoloji southern blot yönteminde EcoRI enzim kesimi ile 4 numaralı kromozoma iki fragman elde edilmesi gerekirken; 10 numaralı kromozoma ait diğer iki allelin de duruma dahil olarak dört fragman görülmesine sebep olmaktadır. D4Z4 dizisinde hastalığa sebep olan tekrar

kısalmasının 4 numaralı kromozoma ait olduğunun gösterilmesi gerektiğinden; %97'lik homolojiden geriye kalan %3'lük farklılıktan yararlanılarak, 10q26'da lokalize D4Z4 dizisini çok küçük parçalar halinde kesen fakat 4q35'de lokalize D4Z4 dizisini kesmeyen BlnI enzimi kullanılmaktadır. BlnI enzim muamelesi ile 10 numaralı kromozoma ait fragman ekarte edilmiştir. Aynı kişiye ait iki farklı örnek; (i)EcoRI ile kesilmiş hasta DNA'sı, (ii) EcoRI ve BlnI ile kesilmiş hasta DNA'sı yanyana yüklenerek; 4 ve 10 numaralı kromozoma ait alleller ayırt edilmekte (Şekil 2.8) ve kısa allelin 4 numaralı kromozoma ait olduğunun gösterilmesiyle genetik tanı konabilmektedir.

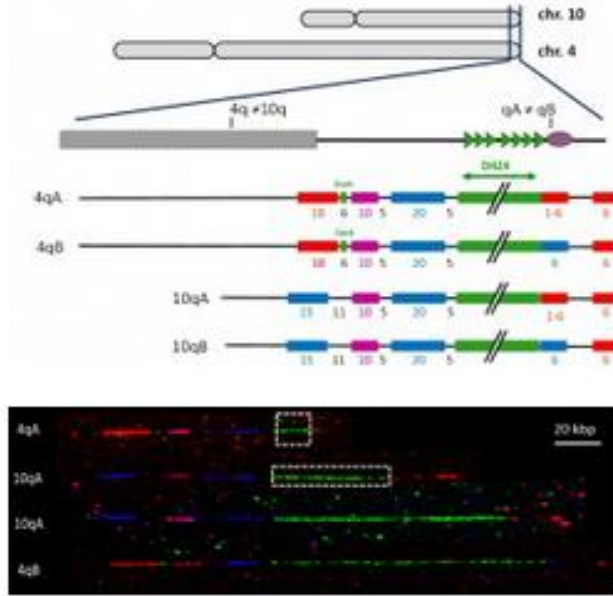


Şekil 2.8. FSHD tanısında kullanılan Southern Blot yöntemi sonucunda elde edilen PFGE(Pulse Field Gel Electrophoresis) görüntüsü. Farklı vakalar 1,2,3 rakamlarıyla belirtilmiş; Y-kromozomu ; Y olarak işaretlenmiştir. Resmin sağında yer alan rakamlar fragmanın kilobaz(kb) düzeyinde büyüklüğünü yansıtmaktadır. EcoRI enzimi “E” harfi ile , BlnI ise “B” harfi ile temsil edilmektedir. (https://www.google.com/search?q=southern+FSHD&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjLsZKCxKLFhAhWD_CoKHZQSD3UQ_AUIDigB&biw=1366&bih=664#imgrc=pLmoKApjDgoJ-M: adresinden alınmıştır. Erişim Tarihi: 15 Aralık 2018)

Southern blot yöntemindeki 4 numaralı kromozoma ait fragmanlar dizinin çok uzun olması nedeniyle jelde yürümekte ve bazen sadece üç fragman tespit edilebilmekte bir fragman görüntülenememektedir. Ayrıca 4 ve 10 numaralı kromozomlar arasındaki yüksek homoloji, bu iki kromozom arasında gen konversiyonlarına sebep olmaktadır

(Lemmers ve ark., 2004). Gen konversiyonunun 4 ve 10 numaralı kromozomlarda hangi alanı içerdiğine bağlı olarak jelde çok farklı fragman kombinasyonları oluşabilmektedir. Dizinin uzun oluşu ve gen konversiyonları tanıda büyük zorluklar yaratmaktadır.

Tanıdaki bu zorlukları aşabilmek amacı ile Nyugen ve arkadaşları, FSHD tanısı için moleküler kombine adı verilen yeni bir tanı metodu geliştirmiştir(Nguyen ve ark., 2011). Bu metod floresan in situ hibridizasyon temelli bir yöntem olup çoklu probler kullanarak bölgenin işaretlenmesine dayanmaktadır (Şekil 2.9). Daha güvenilir sonuçlar veren ve özel cihaz gerektiren bu yöntem henüz sadece Fransa'da uygulanmakta olup diğer laboratuvarlar bu metodu oturtmaya çalışmaktadır.

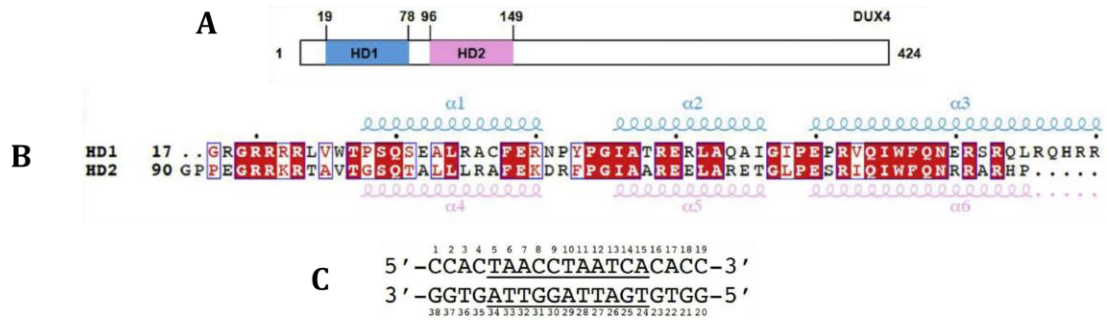


Şekil 2.9. FSHD tanısında kullanılan moleküler kombine yöntemi. (<http://www.genomicvision.com/products/genetic-tests/fshd/> adresinden alınmıştır. Erişim tarihi: 15 Aralık 2018)

Hem southern blot hem moleküler kombine'de FSHD'nin moleküler tanısını koyabilmek için kısalmış 4q35-D4Z4 dizisine ek olarak gösterilmesi gereken bir genetik değişim daha mevcuttur. Bu değişim normal populasyonda 4q35'te %50 oranında (Lemmers ve ark., 2007; Spurlock ve ark., 2010) bulunan; D4Z4 tekrarına yakın bir tek nükleotidlik polimorfizmin (SNP) varlığıdır. qA aleli olarak adlandırılan bu SNP; 4q35'de bulunan D4Z4 tekrar dizisinin içinde yerleşik DUX4 mRNA'sı için poliadenilasyon sinyali yaratarak DUX4 mRNA'sının stabilize olmasını sağlamaktadır

ve 10q26'da neredeyse hiç görülmemektedir (Kowaljaw ve ark., 2007; Lemmers ve ark., 2010).

4q35'te yer alan D4Z4 tekrar dizilerinin içinde tespit edilmiş tek gen DUX4 retrogenidir. Retrogen kavramı RNA'nın revers transkriptaz enzimi ile DNA'ya çevrilerek insan genomuna sonradan girmiş olan genleri kapsamaktadır. DUX4 retrojeni, 4q35'te yer alan D4Z4 bölgesindeki her bir tekrar ünitesinin sonunda yer almaktadır ve sadece en sondaki D4Z4 tekrar ünitesinin sonunda yer alan DUX4 geni hastalıkla ilişkilendirilmektedir (Kowaljaw ve ark., 2007; Snider ve ark., 2010). DUX4 geni; iki homeodomain içeren (Lyle ve ark., 1995; Winokur ve ark., 1996) (Şekil 2.10), nükleusta lokalize bir transkripsiyon faktörünü kodlamakta (Dixit ve ark., 2007) ve sağlıklı erişkin bireylerde sadece testis dokusunda (Snider ve ark., 2010) transkribe edilirken, diğer doku ve organlarda ekspresyonu gözlenmemektedir.



Şekil 2.10. A. DUX4 proteininin yapısı; homeodomain (HD1/HD2) bölgeleri. B. Homeodomain bölgelerinin aminoasit dizilimi. C. DUX4 proteininin bağlandığı DNA dizilimi. (Li ve ark., 2018)

DUX4 geninin evrimsel olarak korunmuş olması (Leidenroth ve Hewitt, 2010), promotörü olmasına rağmen kendine ait bir poliadenilasyon sinyalinin olmaması (Gabriels ve ark., 1999) ve hiçbir FSHD hastasında D4Z4 dizisinin tamamen silindiğinin görülmemesi (Tupler ve ark., 1996) hastalığa sebep olan temel olayın susturulması gereken bir genin fonksiyon kazanımı olduğuna işaret etmektedir. Yaklaşık her 1000 adet FSHD miyoblastının ya da nükleusunun bir tanesi DUX4 mRNA'sının tamamı (full length) (fl-mRNA) veya proteini için pozitif bulunmakta iken, kontrol grubu kültürleri DUX4 için negatif bulunmuştur (Snider ve ark., 2010). Ekspresyonu bozulmuş DUX4'ün bir transkripsiyon faktörü olması (Dixit ve ark., 2007), faktörün kendisinden ziyade ekspresyonunu değiştirdiği genler ile etkisini gösterdiğini düşündürmektedir. Bu

düşünce ile yapılmış olan çalışmalar sonucunda, DUX4-fl' nin ekspresyonunun indüklenmesi kas atrofisi ile ilgili genlerin ekspresyonunun yükselmesine, anormal görünümlü miyotüplerin oluşmasına ve bazı hücrelerin ölümüne sebep olmuştur (Bosnakovski, Xu ve ark., 2008; Vanderplanck ve ark., 2011). DUX4-fl bu etkisini DNA'ya bağlanarak oluşturur ki DNA' ya bağlanan bölgelerinin mutantları oluşturulduğunda bu etki gözlenmemektedir (Mitsuhashi ve ark., 2013).

Son yapılan çalışmalarda, DUX4 transkriptlerinin varyantlarının olduğu ortaya konmuştur. Hastalıkla ilişkilendirilen DUX4-fl pA formunun karboksil terminalindeki farklılıktan kaynaklanan farklı bir splice formu (Dixit ve ark., 2007; Snider ve ark., 2010), DUX4c (olarak adlandırılmış); diğer bir kaynakta ise DUX4s olarak adlandırılmıştır (Snider ve ark., 2010). Bu kısa formun kodlandığı bölge uzun formu olarak bilinen DUX4-fl'in (ya da diğer adıyla DUX4) kodlandığı bölgeden farklılık göstermektedir. 4q35 bölgesindeki D4Z4 tekrar dizinden 42 kb uzaklıkta yer alan; ters yerleşimli ve daha kısa bir D4Z4 tekrarı daha mevcuttur (T. J. Wright ve ark., 1993). Bu tekrar dizisi açık okuma dizisi (open reading frame-ORF) içermektedir ve DUX4'e çok benzer olup karboksi terminalinde son 82 amino asidi yerine farklı 32 aminoasit dizilimi içeren 47 kDa ağırlığındaki kısa form olan DUX4c proteinini kodlamaktadır. DUX4c'nin FSHD hücrelerinde ekspresyonu üzerine yapılan bir çalışmada; DUX4c'nin her bir kas nükleusunda bulunduğu gösterilmiştir (Vanderplanck ve ark., 2018). Bu bilgi DUX4'ün FSHD kas hücre biyopsilerinde her 1000 hücreden sadece birinde mevcut olduğu bilgisinden (Snider ve ark., 2010) farklılık göstermektedir. Yine DUX4-fl'nin aksine; DUX4c'nin kas hücreleri üzerinde direk toksik bir etkisinin olmadığı, bu hücrelerin morfolojilerinin normal olduğu, ancak etkisini miyojenik regülatörlerin ekspresyonunu azaltıp farklılaşmayı bloke ederek oluşturduğu gözlenmiştir (Bosnakovski, Lamb ve ark., 2008). Aynı çalışmada, çok düşük düzeylerde dahi eksprese edilen DUX4c'nin miyotüp formasyonunu önleyerek kas homeostazı ve yenilenmesine engel olduğu da tespit edilmiştir (Bosnakovski, Lamb ve ark., 2008; Anseau ve ark., 2009). DUX4c'nin patojenik olduğuna işaret eden benzer bir çalışmada DUX4c'nin hücre hatlarında overekspresyonu sağlanmış; geniş çekirdek kümeleri ile beraber troponin T dağılım bozukluğuna bağlı, farklılaşma özelliği gösterememiş disorganize bir fenotip ortaya çıktığı gözlenmiştir (Vanderplanck ve ark., 2018).

DUX4c'nin bu etkisi miyojenik faktörlerden MyoD ve Myf5' in overekspresyonu ile düzeltilebilmektedir (Bosnakovski, Lamb ve ark., 2008). FSHD fenotipinin DUX4c baskılanması yapıldığında da düzelebildiği gözlenmiş, bu bilgiye dayanarak DUX4c hedefli FSHD tedavisinin gündeme gelebileceği öne sürülmüştür (Vanderplanck ve ark., 2018).

Zebrafish yumurtalarında yapılan bir çalışmada; tüm bu sonuçlar ile çelişir şekilde, DUX4s enjeksiyonu ile DUX4-fl sonucunda oluşması beklenen anomalilerin önlendiği gözlenmiştir (Mitsuhashi ve ark., 2013). Bu çelişen veri çalışmanın farklı bir türde yapılmış olmasıyla açıklanabilirse de bir yandan DUX4 proteininin işlevselliği ile ilgili bilginin hala eksik olduğuna ve FSHD'deki yerini netleştirebilmek için DUX4 ve DUX4c ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiğine işaret etmektedir.

Gen Ekspresyon Çalışmaları

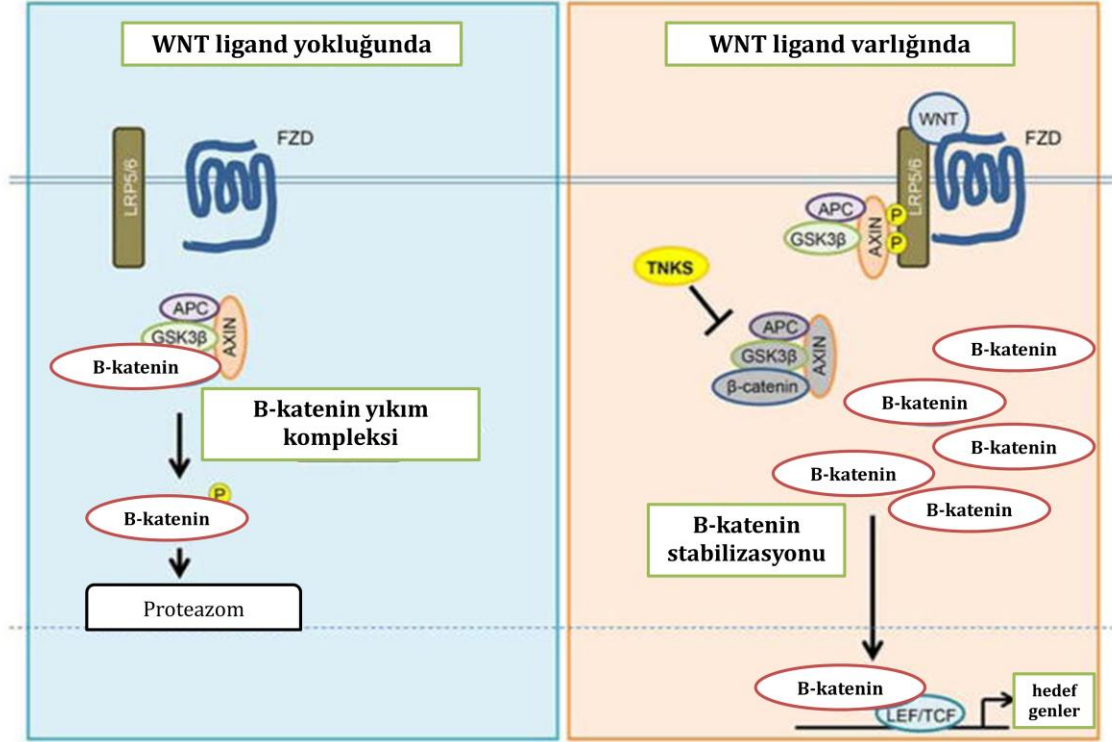
FSHD miyoblast hücre hatları ve hasta biopsilerinde gen ekspresyon düzeyleri ile ilgili birçok çalışma mevcuttur (Osborne ve ark., 2007; Cheli ve ark., 2011; Tsumagari ve ark., 2011). Her ne kadar sonuçlarda birçok farklılık olsa da (ki bu çalışma koşulları, örnek heterojenitesi gibi birçok faktörden kaynaklanabilir) bu çalışmalar FSHD'de birçok genin ekspresyonunda oluşan değişikliği göstermektedir (Tupler ve ark., 1999; Winokur ve ark., 2003; Celegato ve ark., 2006; Osborne ve ark., 2007; Arashiro ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda apoptoz, embriyolojik farklılaşma evreleri gibi farklı fonksiyonlarda görevleri olan birçok gende sağlıklı kişilere kıyasla oluşan ekspresyon farkları ortaya konmuştur. Farklı çalışmalarda kesişim gösteren genler olmakla birlikte, FSHD hastalığında sorumlu net bir gen yakın zamana kadar tanımlanmamış; 2015 yılında yayınlanan bir ekspresyon analizi çalışması ile TGF- β (transforming growth factor beta), HIF1- α (hypoxia inducible factor alfa) gibi birkaç proteinde oluşan ekspresyon değişiklikleri bir network analizi ile incelendiğinde β -kateninin merkezde rol alan kilit protein olduğu ortaya konmuştur (C. R. Banerji ve ark., 2015).

Wnt Yolağı ve β -katenin

Fare deneylerinde yapılan çalışmalarda, Wnt/ β -katenin sinyal yokluğunun letal olduğu bilinmektedir (Haegel ve ark., 1995). Wnt/ β -katenin sinyali, miyogenez s¼recinde dermatom ve miyotom oluşumu için elzemdir. Ancak miyoblast gelişimi için bu sinyalin ne az ne de fazla olmaması gerekir; ¼nk¼ sinyal azlığının, PAX7 eksprese eden önc¼l kas h¼crelerinde miyofiber oluşumunu yavaşlattığı gösterilmiştir (Hutcheson ve ark., 2009) β -kateninin sinyal fazlalığı ise kas fiberlerinin boyutunda azalma ve beraberinde nöronal faktörlerin de etkilenmesi ile letaliteye sebep olmaktadır (Liu ve ark., 2012). Bu sonuçlar Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun belirli bir düzeyde tutulmasının kas hücre gelişiminin doğru sonuçlanması açısından ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

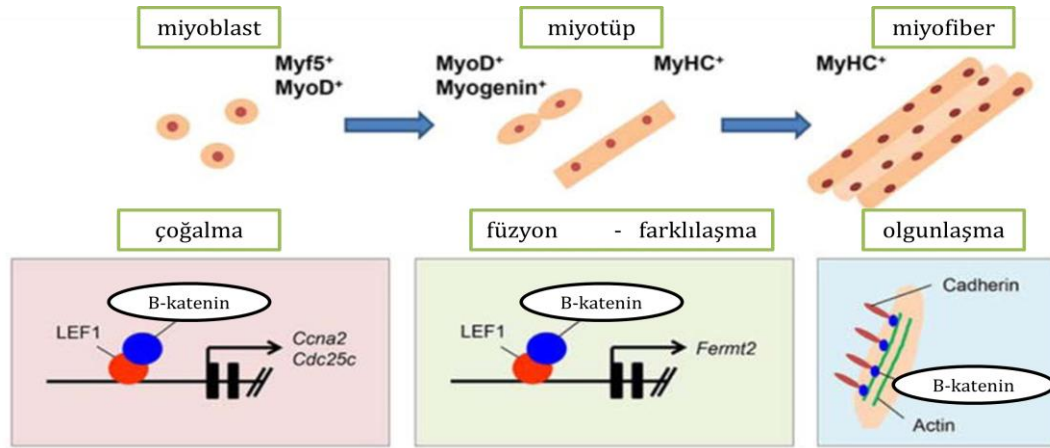
Wnt ailesi 21 adet ligandan meydana gelir ve kanonikal (β -katenin ilişkili) ya da kanonikal olmayan (β -katenin ilişkisiz) olarak birçok fizyolojik veya patolojik yolda etkin rol oynamaktadır.

Wnt ligandı olmadığında β -katenin; aktin/GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta) ve APC (Adenomatous Polyposis Coli)'den oluşan bir kompleks ile tutularak proteazom aracılığıyla yıkılmaktadır (MacDonald ve ark., 2009). Wnt ligandı varlığında ise; Wnt FZD-LRP5 (Frizzled Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5) kompleksine bağlanarak sinyal uyarımını başlattığında LRP5 kompleksi fosforillenmekte; daha sonra aktin/GSK3B ve APC kompleksi bu fosforile olan LRP5 reseptörüne çekilerek, β -katenin serbest kalmaktadır. Serbest kalan β -katenin çekirdeğe göç ederek oradaki LEF/TCF (lymphoid enhancer factor/T cell factor) transkripsiyon faktörleri ile beraber hedef genler üzerindeki etkisini göstermektedir (şekil 2.11) (MacDonald ve ark., 2009).



Şekil 2.11. Kanonik Wnt yolağının; WNT varlığında ve yokluğundaki işleyişinin şematize edilmiş görseli (Suzuki, Scruggs ve ark., 2015)

β -katenin proteini; 3'üncü kromozomun kısa kolunun p22.1 bölgesinde yer alan CTNNB1(katenin-beta-1) geni tarafından kodlanan 92 kDa ağırlığında bir proteindir. Bu proteinin iki temel fonksiyonu bulunmaktadır. Birincisi, kaderin proteinleri ile birlikte hücre iskeletinin önemli bir parçası olan hücre adezyon kompleksinde yer almasıdır. β -kateninin kaderinlerle olan bu ilişkisi miyojenik farklılaşma ve miyotüp oluşmasında rol oynamaktadır (Kuch ve ark., 1997; Goichberg ve ark., 2001) . İkinci fonksiyonu ise; β -katenin aynı zamanda Wnt yolağında transkripsiyonel ko-aktivatör olarak; LEF/TCF transkripsiyon faktörleri aracılığıyla da miyojenik hattın farklılaşmasında (Munsterberg ve ark., 1995; Tajbakhsh ve ark., 1998; Parker ve ark., 2003) kritik görev üstlenmesidir. Miyoblastların çoğalmasında β -katenin, Ccna2(cyclin A2) ve Cdc25c (cell division cycle 25) genlerinin ekspresyonunu sağlayarak; füzyon ve miyotüp farklılaşmasında ise Fermt2 geninin ekspresyonunu sağlayarak bu görevi üstlenmektedir (Suzuki, Pelikan ve ark., 2015) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. β -katenin proteininin miyoblast, miyotüp ve miyofiber oluşumunda etkilediği noktalar (Suzuki, Scruggs ve ark., 2015).

Sonuç olarak, Wnt- β -katenin yolu kas gelişimi üzerinde önemli etkilere sahiptir (Cisternas ve ark., 2014). Moleküler mekanizmaların tamamı bugün hala tam olarak aydınlatılamamış olsa da bu yolakta oluşabilecek sinyal değişikliklerinin kas hastalığı oluşumunda etkili olabileceği bilinmektedir. Farklı kas distrofilerde yapılan çalışmalarla β -katenin ile ilgili değişikliklerin kas hastalıklarında nasıl rol oynayabileceği gösterilmiştir. Bir örnek olarak, okülofarengeal kas distrofide yapılan bir çalışmada, GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 Beta) inhibitörü olan lityum klorid kullanılarak β -katenin düzeyinin artması sağlanmış; hücre ölümünün azaldığı gözlenmiştir (Abu-Baker ve ark., 2013). Yine Duchenne Kas Distrofide yapılan bir çalışmada ise özellikle Wnt3a üzerinden oluşan β -katenin uyarımının; kollajen sentezini artırarak kas hücrelerinde yaşlılık ve miyopati değişikliklerinin arttığı gösterilmiştir (Trensz ve ark., 2010).

FSHD'de ise; klinik olarak rastlanan ektramusküler bulgulardan retinal vasküler hastalık ve sensörinöral sağırılık mekanizmalarında β -kateninin rol aldığı bilinmesi FSHD araştırmalarında β -katenine yönelmesine sebep olmuştur (Gurwin ve ark., 1985; Fitzsimons ve ark., 1987; Brouwer ve ark., 1991). Özellikle erken başlangıçlı FSHD vakalarında Coats Sendromu olarak bilinen retinal vaskülopati de distrofiye eşlik edebilmektedir (Small, 1968; Taylor ve ark., 1982; Wulff ve ark., 1982; Gurwin ve ark., 1985; Pauleikhoff ve ark., 1992). Yine bu vakalarda distrofi ile birlikte sensörinöral işitme kaybı da gözlenebilmektedir (Voit ve ark., 1986). Bu ektramusküler bulguların

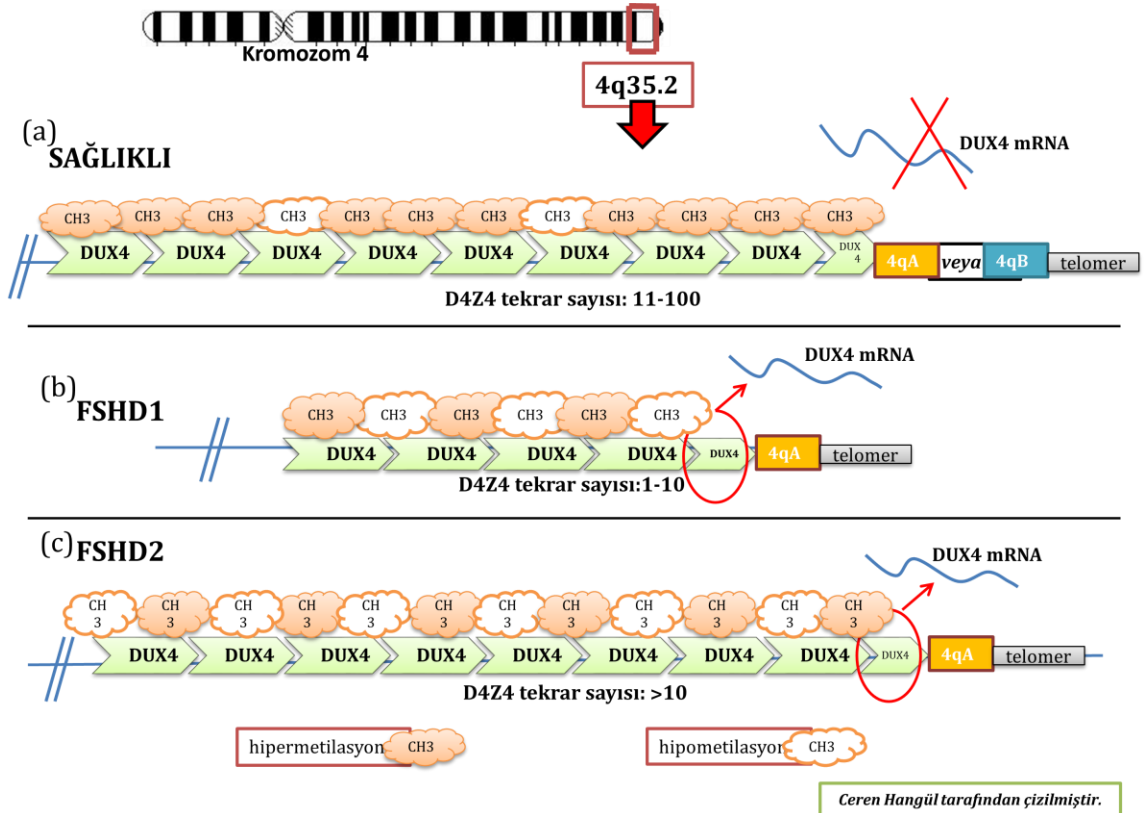
bazı vakalarda FSHD' ye eşlik edişii son dönemde β -katenin üzerine yapılan çalışmaların sayısını arttırmıştır. GJ Block ve arkadaşları tarafından Wnt/ β -katenin yolağının DUX4 düzeyini etkilediğinin ortaya konduğu ilk moleküler ilişkilendirmeden (Block ve ark., 2013) sonra bir network çalışması olan ve DUX4 düzey değişikliği sonucunda miyoblast hücrelerinin tüm transkripsiyonel profilini inceleyen bir çalışmada β -kateninin, tüm proteinler arasında FSHD networkünün merkez proteini olduğu ortaya konmuştur (C. R. Banerji ve ark., 2015).

B. FSHD'nin Epigenetik Altyapısı

Geleneksel genetik tanımı, taşıdığımız DNA dizilimini ifade eder. Epigenetik kavramı ise latince epi (üstü,dışı,etrafi) anlamına gelen kavramdan türemiştir ve DNA dizisi dışında var olan genetik özellikleri/değişiklikleri tanımlamak için kullanılmaktadır. DNA dizisi değişmeden meydana gelen bu değişiklikler (modifikasyonlar) daha ziyade genlerin ekspresyon seviyelerinde değişiklik oluşturarak etkilerini göstermektedir. Son birkaç dekada üzerinde çok geniş çalışmaların yapıldığı epigenetik değişimler; çevre, beslenme gibi kavramların genetik üzerindeki etkisinin nasıl oluştuğuna ve aynı DNA diziliminde bile ortaya çıkan kişiler arası farklılıkların nasıl görülebildiğine ışık tutmaktadır. Epigenetik değişiklikler başlığı altında yer alan konular; (1) DNA üzerindeki metilasyon/hidroksimetilasyon; histonlar üzerindeki asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinilasyon, sumolasyon, ribozilasyon ve sitrulinasyon gibi kovalent modifikasyonlar ile (2) uzamsal kalıtım ile nükleozom pozisyonlama; (3) miRNA (mikroRNA), lncRNA (long-noncodingRNA) gibi kodlamayan RNA aile üyeleri post-transkripsiyonel modifikasyonlar olarak özetlenebilir.

Bugüne kadar yapılmış tüm bu çalışmalar ile gelinen son noktada FSHD vakalarının %95'inin (FSHD1) D4Z4 tekrar dizisindeki kısalma ve bu tekrar dizisi içinde yer alan DUX4'ün patofizyolojiye katkısının yüksek olduğu birçok çalışma ile ortaya konmuş olsa da tekrar dizilerindeki bu kısalma tek başına patofizyolojiyi açıklamada yeterli olamamıştır. 4q35'deki D4Z4 alanında 5 tekrar dizisi taşıyan asemptomatik vakaların olması ya da tam tersine interzone denilen 11-12 tekrar sayısı olan bireylerde FSHD semptomlarının ortaya çıkışı ileri çalışmaları gerektirmiş; bu farklılıkların D4Z4 dizisindeki metilasyon düzeyi ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır.

DNA metilasyonunda rol oynadığı bilinen SMCHD1 (structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1) ve DNMT3B (DNA Methyltransferase 3 Beta) genlerindeki mutasyonlar D4Z4 dizisinde delesyon olmayan %5'lik dilimdeki vakalarının bir kısmında tanımlanmış, FSHD'de epigenetik etkinin varlığını göstermiştir. SMCHD1 geni; 18 numaralı kromozomun p11.32 bölgesinden kodlanmakta, dimer olarak fonksiyon görerek genomik DNA metilasyonunu sağlamaktadır (Yamanaka, Goto et al. 2004, de Greef, Lemmers et al. 2009). DNMT3B; 20 numaralı kromozomda q11.21 bölgesinde yer almakta ve bu genin ürünü protein de genomik DNA'da metilasyona neden olmaktadır. Bu iki genden herhangi biri mutasyon taşıdığında DNA düzeyinde genel bir hipometilasyon oluşmaktadır. Eğer bir birey bu hipometilasyona ek olarak 4q35 bölgesinde qA aleli ile beraber aynı kromozom üzerinde kısalmış bir D4Z4 dizisi taşıyorsa FSHD ortaya çıkmaktadır (Lemmers, Tawil et al. 2012)(van den Boogaard ve ark., 2016) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. FSHD'de gösterilmiş D4Z4 dizisinin tekrar sayısı ve metilasyon durumu . (a) sağlıklı birey, (b) FSHD1, (c) FSHD2

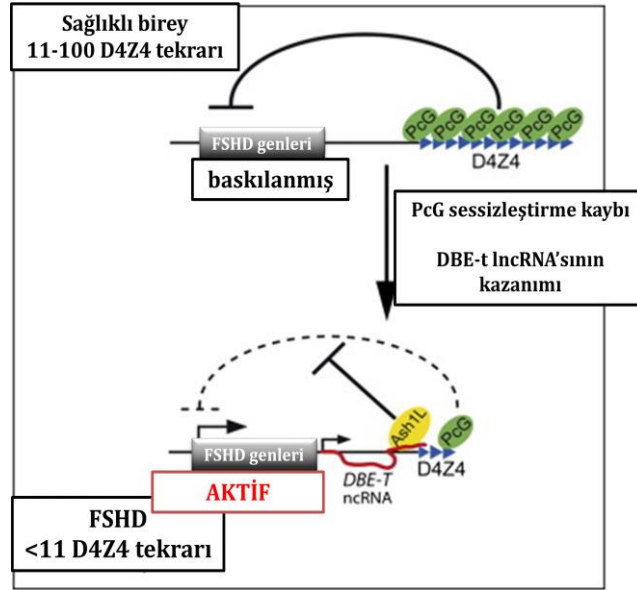
FSHD patofizyolojisinde rol oynadığı bilinen D4Z4 metilasyon profil değişimini tespit ederek sonuca gitmeye çalışılan epigenetik tanı metodları geliştirilmeye çalışılmış; FSHD1, FSHD2 ve sağlıklı popülasyonu genetik olarak birbirinden ayırt edebilmek için bisülfid dizileme adı verilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı bir metod geliştirilmiştir. Bu metod kapsamında; D4Z4 bölgesinin metilasyon düzeyi gösterilerek hastalığın tanısına gidilebileceği öne sürülmüştür (Gaillard ve ark., 2014; Jones ve ark., 2014). Daha kolay uygulanabilir ve daha ucuz olan bu yöntemin rutine oturabilmesi için biraz daha zaman gerekmektedir.

LncRNA'lar ve Polikomb-Trithorax Protein Ailesinin FSHD'deki Rolü

Polikomb ve Trithorax protein grubunun üyeleri; evrimsel olarak oldukça korunmuş yapıya sahip olan, embriyonik-gelişimsel süreçte hücrelerin hangi hücre tipine özelleşeceğini yani hücre kaderini, epigenetik düzlemde önemli genlerin ekspresyon düzeyini regüle ederek kontrol eden proteinler olarak bilinmektedirler (Schuettengruber ve ark., 2017).

LncRNA'lar proteine kodlanmayan, 200 bazdan daha uzun RNA molekülleridir. Epigenetik etkinin var olduğu bilinen FSHD araştırmalarında Polikomb ve Trithorax proteinleri lncRNA'lar ile beraber yerini almıştır. Gabellini ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı bir çalışmada, FSHD'de tekrar dizisinin yakınında yer alan genlerin overeksprese olduğunu ve bunun yüksek olasılıkla D4Z4 dizisi içinde DNA Binding Element (DBE) adını verdikleri 27 baz çiftini içeren diziye bağlanan represör multiprotein kompleks ile gerçekleştiğini göstermiştir (Gabellini ve ark., 2002). Kromatin ilişkili bir lncRNA olan *DBE-T*(D4Z4 binding element transcript)'nin bir Trithorax group proteini olan Ash1L(Ash1 Like Histone Lysine Methyltransferase)'i 4q35 bölgesine çekerek histon 3 lizin 36 dimetilasyonu ile gen transkripsiyonunu sağladığı gösterilmiştir (Cabianca ve ark., 2012) (Şekil 2.14).

Bu veriler; genetik olarak tekrar dizilerinde oluşan kısalma ile epigenetik parametrelerin karşılıklı etkileşim içinde FSHD patofizyolojisine katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 2.14. LncRNA'lar ve Polikomb-Trithorax Protein aile üyelerinin FSHD'deki gen regülasyonu üzerindeki etkisinin temsili şekli (Cabianca ve ark., 2012)

MiRNA'ların FSHD'deki Rolü

MiRNA'lar small-RNA adı verilen RNA ailesinin bir üyesi olup, 19-25 nükleotit uzunluğunda tek zincirli RNA molekülleridir ve genomun en az %1'ini oluşturmaktadırlar; bugün için tanımlanmış 2000'den fazla miRNA bulunmaktadır (Bartel, 2004). RNA polimeraz II enzimi aracılığıyla sentezlenmektedirler ve insan genomundaki genlerin en az 1/3'ünün miRNA'larla etkileşiminin olduğu bilinmektedir (Lewis ve ark., 2005). MiRNA'lar epigenetik etkilerini posttranskripsiyonel olarak meydana getirmektedirler. Sentezlenen miRNA; üzerinde taşıdığı dizinin eşleniği olan hedef mRNA'ların 3' ucuna bağlanarak AGO (Argonaute) proteinlerini ortama çekmektedir; AGO proteinleri ise sonuç olarak (i) ilgili mRNA'nın yıkımı, (ii) translasyonel kompleksin ilgili mRNA üzerindeki ilerleyişini durdurarak protein sentezini (translasyon) baskılama, (iii) ilgili mRNA'da deadenilasyon oluşturma aracılığıyla üç farklı alternatif yolla bu mRNA'dan protein sentezini önlemektedir (Huntzinger ve Izaurralde, 2011).

RT-PCR yöntemi ile yapılan bir çalışmada normal ve FSHD kas hücrelerinde; 4q D4Z4 ünitesinden kaynaklanan birçok sense ve antisense transkript tanımlanmıştır (Snider ve ark., 2009). Bu çalışmanın sonuçlarına göre; 5' UTR - gövde - 3' UTR olarak üç parça olarak incelenen DUX4 transkript ürününün gövde bölümü ve 3' UTR'den de miRNA

ebatlı fragmanlar oluşmaktadır. DUX4 'ün transkripsiyonel başlangıç bölgesini hedef alan siRNA ile DUX4 düzeyinin düştüğü; miRNA işlenmesinde rol alan DICER (ribonükelaz III) ve AGO'nun susturulması sonucunda ise DUX4 miktarının arttığı gösterilerek DUX4 düzeyinin kontrolünde miRNA'ların rol oynadığı net olarak ortaya konmuştur (Lim ve ark., 2015).

FSHD'de miRNA profilinin çıkarılmasını amaçlayan bir çalışmada hem primer hem de immortalize miyoblast hücrelerinde miR-411 'in ekspresyon düzeyinde anlamlı farklılık tespit edilmiştir (Harafuji ve ark., 2013). FSHD ve kontrol grubu primer miyoblastları üzerinde yapılan bir diğer miRNome/transkriptom çalışmasında; FSHD grubunda 21 tanesi up-regüle, 8 tanesi down-regüle olmak üzere farklı düzeyde eksprese olan 29 adet miRNA tespit edilmiştir. Ektopik olarak DUX4 overekspresyonu yapılan hücrelerde 21'i upregüle olan miRNA'ların 12 tanesinde örtüşme olmuştur (Dmitriev ve ark., 2013). Benzer bir başka çalışmada ise; FSHD1 hastalarından alınan biyopsiler kontrol grubu ile kıyaslandığında 8 miRNA (miR-330, miR-331-5p, miR-34a, miR-380-3p, miR-516b, miR-582-5p, miR-517* and miR-625) 'nın ekspresyon farklılığı gösterdiği ortaya konmuştur (Portilho ve ark., 2015).

Miyogenezde çoğalma ve farklılaşma süreçlerindeki miRNA ekspresyon farklılıklarını incelemek amacıyla NGS(next generation sequencing) ve q-PCR(quantitative polimerase chain reaction) yöntemleri kullanılarak yapılan bir çalışmada kontrol grubunda 34'ü upregüle olmak üzere 38 adet miRNA'nın modüle olduğu ortaya konmuştur. FSHD hücrelerinde ise bu sayı 38'den daha az olmakla beraber kontrol grubunda tespit edilemeyen, FSHD'ye spesifik 6 farklı miRNA'nın (miR-1268, -1268b, -1908, 4258, -4508- and -4516) düzeyinin değiştiği tespit edilmiştir (Colangelo ve ark., 2014). FSHD1 ve FSHD2'de farklı miRNA'ların değiştiği gösterilmiştir (Lim ve ark., 2018) basit gibi görünen bu veri klinik olarak aynı olan FSHD1 ve FSHD2 'nin moleküler mekanizmalarının farklı olduğuna işaret etmektedir.

Tanı testlerine alternatif olarak kullanılabilmesi amacıyla Duchenne Musküler Distrofi (DMD)'de alternatif serum biyomarkerları olarak tespit edilen üç adet (miR-1, miR-133a, and miR-206) miRNA; 4'ü kadın 4'ü erkek olmak üzere toplam 8 FSHD

hastasının serumunda incelenmiş anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Y. Matsuzaka ve ark., 2014).

RNA interference mekanizmaları (hedef alınan protein mRNA'sının inhibisyonu) ile tedavi bulabilme amaçlı patofizyoloji çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Farelerde, DUX4'ün miRNA/antisenseRNA ile sessizleştirilmesi kas hücrelerindeki atrofiyi önlemektedir (Wallace ve ark., 2012).

MiRNA'lar ile yapılan bu çalışmalar şu an için kesişim göstermese ve ortak bir gene işaret etmese de; miRNA'lar FSHD'de epigenetik mekanizmalardaki değişimi destekleyen bir diğer nokta olarak literatürde yerini almaktadır.

C. FSHD'de Multifaktöriyel Altyapı

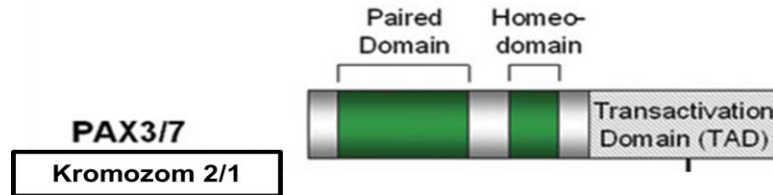
FSHD'ye ait yapılmış literatür çalışmaları dikkate alındığında patofizyolojisinde hem genetik hem epigenetik faktörlerin iç içe geçerek rol oynadığı tartışmasız olarak kabul edilebilmektedir. Bu durum "FSHD birden fazla genin etkileşmesi ve çevresel faktörlerin etkisinin kesiştiği multifaktöriyel/kompleks bir hastalık olarak kabul edilebilir mi?" sorusunu gündeme getirmiştir. Birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen bu soruya hala net bir cevap verilememesinin sebebi, hastalığı oluşturan patofizyolojinin tam olarak ortaya konamamış olmasıdır.

FSHD'ye ait moleküler ve klinik bazı özellikler göz önüne alındığında FSHD'nin bir kompleks hastalık olduğu hipotezi daha ağır basmaktadır. Bu özellikler; (i) farklı genetik altyapı içeren FSHD1 ve FSHD2'nin klinik olarak hiçbir farkının olmaması, (ii) hastalıktan sorumlu tutulan DUX4'ün her bireyde farklı profilde izleniyor olması, (iii) yapılan gen ekspresyon çalışmalarında bireyler arası farklılık ve tek bir aday gen belirlenemiyor olması, (iv) klinikte vakaların hiçbirinde; aynı aile üyelerinde dahi, hastalığın kas tutulum seçiciliği, hastalığın başlangıç yaşı-seyri-şiddetinin aynı olmaması olarak özetlenebilir. İşte tüm bu noktalar FSHD araştırmalarının bir ileri noktaya taşınmasına sebep olmuştur: FSHD'ye sahip bireylerdeki farklılıklar yapılan metilasyon çalışmaları ile bir oranda ilişkilendirilebilmişse de (Gaillard ve ark., 2014); değişik metilasyon düzeylerini belirleyen faktörler bilinmemektedir.

2.4.2. FSHD ve İskelet Kası Gelişimi

Vücudumuzdaki tüm iskelet kası hücreleri mezodermal progenitor hücrelerin gelişiminden oluşmaktadır. Büyük bir kısmı hala tam olarak aydınlatılmamış, oldukça karmaşık ve kompleks basamaklar içermekle beraber; iskelet kası hücrelerinin oluşumu, temelde kas regülatör faktörler (muscle regulatory factors-MRFs) adı verilen bir grup transkripsiyon faktörünün ekspresyonuna bağlıdır. MRFler; MYOD, Myf5, MYOG, Myf6 olmak üzere dört üyeden oluşmaktadır (Braun ve ark., 1989; Edmondson ve Olson, 1989; W. E. Wright ve ark., 1989; Miner ve Wold, 1990). Bu faktörler omurgasız canlılardaki atasal genlerin duplikasyonu ile oluşmuş olup memeliler arasında yüksek oranda korunmuşluk içermektedir. (Michelson ve ark., 1990). Bu dört transkripsiyon faktörü iskelet kasına spesifik genlerin promotörlerine bağlanarak bu genlerin transkripsiyonlarını regüle etmekte ve hücre kaderini iskelet kası yönünde belirlemektedir (Berkes ve Tapscott, 2005). PAX3 ve PAX7 olarak bilinen iki transkripsiyon faktörü, MRFler gibi iskelet kası gelişiminde önemli yer taşımaktadır. İskelet kas öncülleri ve satellit hücreler bu iki faktörün transkripsiyonu ile karakterizedir (Buckingham ve Relaix, 2015).

PAX genleri embriyonel gelişimde kilit rol almaktadır. PAX3 proteinini kodlayan gen 2 numaralı kromozomun q36.1 bölgesinde; PAX7 proteinini kodlayan gen ise 1 numaralı kromozomun p36.13 bölgesinde yer almaktadır. Paired box adı verilen yüksek oranda korunmuş diziler içermektedirler ve ekspresyonları yer ve zaman olarak gelişimsel dönem ile sınırlı olup doku ve organların morfogenezinde rol oynayan transkripsiyon faktörleridirler (Tremblay ve Gruss, 1994). İçerdikleri transaktivasyon bölgesi ile DNA'ya bağlanmaktadır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. PAX3/7 proteininin yapısının şematizasyonu. Her iki protein de orta kısmında bir homeodomain ve bu homeodomainin yanında paired domain ile transaktivasyon domaini içermektedir. (<https://www.pnas.org/content/suppl/2006/08/16/0605926103.DC1> adresinden alınmıştır. Erişim tarihi: 19 Aralık 2018)

Embriyonik miyogenez aşamasının ilk başlarında PAX3 ve PAX7 yokluğunda öncül kas hücreleri miyogenez girememektedir (Relaix ve ark., 2005). PAX3^{+/7+} hücreler aynı zamanda postnatal dönemde oluşacak olan kas hücrelerinin de öncülleridir (Relaix ve ark., 2005). PAX3 ve PAX7 proteinleri yapısal ve fonksiyonel olarak incelendiğinde benzerlik göstermekteyse de tam olarak aynı işleve sahip değildir. Farede PAX7 proteini PAX3 ile değiştirildiği zaman; PAX3 nöral yapılarda fonksiyonu karşılayabilmekte iken, kas oluşumu ve özellikle uzuv oluşumunda yetersiz kalmaktadır (Relaix ve ark., 2004). Ayrıca PAX7, PAX3'den farklı olarak satellit hücrelerde de eksprese olmaktadır (Seale ve ark., 2000) ve kas kök hücrelerinin sağ kalımı ve yenilenmesi için gerekmektedir (Oustanina ve ark., 2004). Satellit hücrelerinin hepsinde PAX7 ekspresyonu gözlenmemektedir. Sadece bir bölümünde PAX7 pozitif bulunmuştur. Bu PAX7(+) grubun satellit hücre havuzunu sağladığı düşünülmektedir (Olguin ve Olwin, 2004; Zammit ve ark., 2004). PAX7'nin satellit hücrelerinde kritik antiapoptotik etkisi bulunmaktadır ve PAX3 ile yer değiştirildiğinde antiapoptotik etkinin PAX3 tarafından kompanse edilememesi de bu iki protein arasındaki başka bir farklılığı ortaya koymaktadır (Relaix ve ark., 2006). PAX3, PAX7'den farklı olarak miyogenez aşamasındaki proliferasyondan sorumlu tutulmaktadır (Conboy ve Rando, 2002). Sonuç olarak PAX3 ve PAX7 embriyogenezden itibaren iskelet kası oluşumu, yenilenmesi gibi tüm gelişim aşamalarında role sahiptir ve büyük orandaki yapısal fonksiyonel benzerliklerine rağmen birbirlerinin yokluğunu tam olarak kompanse edemedikleri için her ikisinin de varlığı sağlıklı iskelet kası oluşumu ve yenilenmesi için elzemdir.

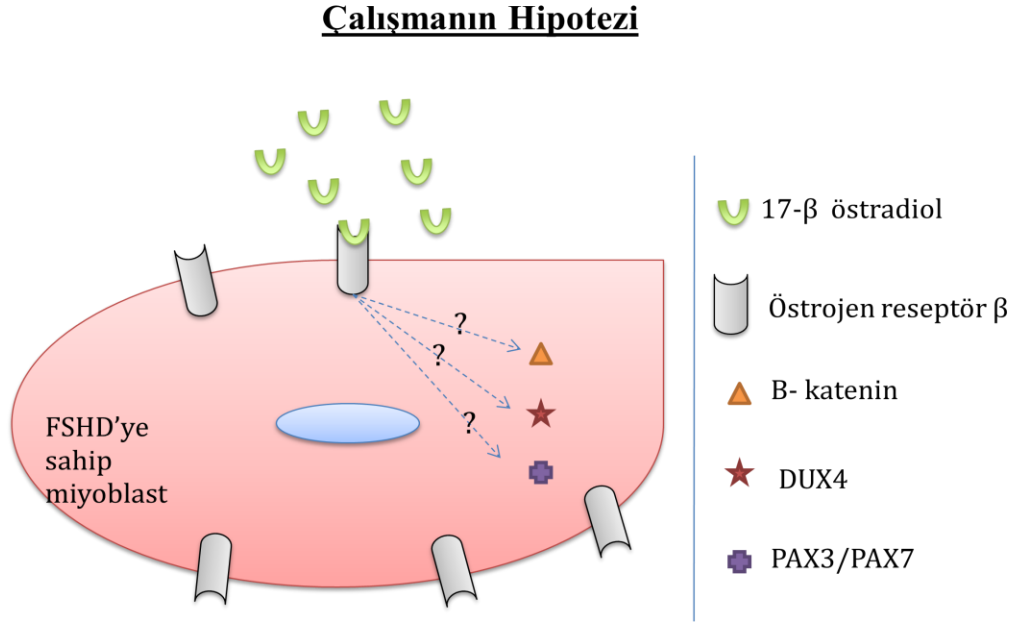
Bu iki transkripsiyon faktörünün FSHD'de araştırma konuları arasında yer almasının altında birçok sebep yer almaktadır. Bunlardan ilki şüphesiz FSHD'nin bir kas hastalığı olması ve bu faktörlerin kas ve satellit hücre gelişimindeki önemli proteinlerden olmasıdır. Ek olarak, PAX3 ve PAX7, DUX4 gibi homeobox ailesi üyesidir. DUX4'ün gen aktivasyonu oluşturabilmesi için C-terminali gerektirmediği; homeodomain bölgesinin farklılaşmayı uyarabilmek için yeterli olduğu gösterilmiştir (Bosnakovski ve ark., 2017). Yine aynı çalışmada, homeodomain proteinlerinin DUX4 ile DNA bölgelerine bağlanırken birbiriyle yarışıp yarışmadığı incelenmiş; DUX4 homeodomaini PAX3 ve PAX7 ile fenotipik yarışma göstermiş, ancak diğer homeodomain aile üyeleri

olan PAX6, Pitx2c, OTX1, Rax, Hesx1, MIXL1, Tbx1 ile fenotipik yarışma göstermemiştir. İzleyen deneylerde PAX3 ve PAX7 ile detaylı çalışmalar yapıldığında, PAX7 homeodomaininin DUX4 homeodomaini ile yer değiştirildiğinde aynı işlevi görebildiği; aynı DUX4 proteininde olduğu gibi PAX7'nin de C-terminali olmasa da bağlandıktan sonra gen aktivasyonu yapabildiği ortaya konmuştur. Bu değişimi PAX3 ile gerçekleştirdiklerinde, PAX3 'de var olan homeodomainin yarışma için gerekli olduğu ancak gen aktivasyonu için PAX3'e ait diğer domainlerin de gerektiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar daha ağırlıklı olarak PAX7 olmak üzere; PAX3 ve PAX7 transkripsiyon faktörlerinin DUX4 ile yapı benzerliği gösterdiğini ve aynı hücrede aynı anda var olduklarında DNA bölgelerine yarışmalı olarak bağlanacaklarını ortaya koymaktadır. Bunu destekler şekilde, FSHD hastalarının biyopsilerinde yapılmış olan bir transkriptom çalışmasında DUX4 ve PAX7'nin hedef genlerine bağlanırken birbirlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. PAX7 baskılanması ile elde ettikleri gen ekspresyon değişimleri, DUX4'a ait hedef genlerin ekspresyonu üzerinde de aynı etkiyi göstermiştir. PAX7'nin arttırıldığında ise DUX4 aktivasyonu ile gerçekleşen apoptozisin önlendiği gösterilmiştir (C. R. S. Banerji ve ark., 2017). Bu çalışmalardan DUX4 ve PAX7'nin birbirinin zıttı fonksiyona sahip olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.

PAX3 ve PAX7 'nin FSHD araştırmalarında ve çalışmamızda yer almasının nedenleri arasında klinik nedenler de mevcuttur. PAX3 gen mutasyonlarının Waardenburg sendromuna sebep olması (Chen ve ark., 2018) ve ilginç bir şekilde bu vakalarda FSHD'de de rastlanabilen sağırlığın görülmesi FSHD patofizyolojisinde PAX3'ün rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Yine sağlıklı erişkin bireylerde testosteron ilişkili genleri belirlemek için yapılan bir çalışmada DUX4 gibi PAX7'nin de hedef genler arasında olduğunun belirtilmesi (Gegenschatz-Schmid ve ark., 2017); sadece testiste eksprese olan DUX4 için ilginç bir kesişim oluşturmaktadır. Bu veriler; DUX4'ün, PAX3 ve PAX7 ile klinik düzlemde de kesiştiğinin bir kanıtı olmuştur.

2.5. Çalışmanın Amacı

Keşif kapısını aralamış olan iki klinik bilgi; (i) kadın erkek hastalar arasındaki hastalık şiddet farkı ve (ii) menapozdan sonra kadın hastalarda hastalığın şiddetlenmesi gözlemlerinden yola çıkılarak östrojenin FSHD patogenezinde önemli rol oynayabileceği hipotezi oluşturulmuştur. Bu çalışmada; FSHD’de östrojenin bir etkisinin olup olmasının (i) FSHD’nin vazgeçilmez proteini olan her bir D4Z4 tekrar ünitesinin içinde yer alarak birçok çalışma ile patofizyolojideki etkisi gösterilmiş DUX4/ (ii) gen ekspresyon çalışmalarında kilit protein olduğu gösterilmiş β -katenin/ (iii) iskelet kası gelişiminde aktif rol alan, aynı zamanda DUX4’ün zıt yönünde fonksiyon gösteren PAX3/7 kilit proteinleri üzerinden ortaya konulması amaçlanmıştır (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Çalışmanın Hipotezi : FSHD miyoblastlarının 17-beta östradiol muamelesinin B-katenin, DUX4, PAX3/PAX7 protein düzeylerini etkileyip etkilemediğinin gösterilmesi

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, FSHD miyoblast hücre hatlarında östrojenin; FSHD hastalığının patofizyolojisinde rol aldığı gösterilmiş olan DUX4 kilit proteini, gen ekspresyon çalışmalarında kesişim noktasında olduğu tespit edilen β -katenin proteini, iskelet kas gelişiminde merkez protein olma özelliği ile beraber DUX4 ile ters yönlü etki oluşturduğu gösterilmiş PAX3 ve PAX7 proteinlerinin ekspresyonu üzerinde etki oluşturup oluşturmadığı western blot yöntemi ile incelenmiştir. Bu etkinin varlığının test edilebilmesi için (i) östrojen muamelesi yokluğunda (kontrol), (ii) östrojen muamelesi sonrasındaki 30.dakikada, (iii) östrojen muamelesi sonrasındaki 4.saatte olacak şekilde üç ana grup üzerinde deneyler gerçekleştirilmiştir.

İnsandan elde edilmiş hücre hatları üzerinde bu çalışmayı yapabilmek için Akdeniz Üniversitesi Etik Kurulundan onay alınmıştır.

3.1. Miyoblast (FSHD) hücre soyları

Çalışmada kullanılan insan FSHD miyoblast hücre hatları; klinik olarak FSHD bulgularına sahip olan, moleküler olarak 4q35'te yer alan D4Z4 tekrar dizi kısılmasının gösterilmesi ile FSHD1 tanısı doğrulanmış gönüllü vericilerin etkilenmiş iskelet kaslarından biyopsi alınması ve bu biyopsilerdeki kas hücrelerinin miyoblast hücre hattı haline getirilmesi ile oluşturulmuştur. Gönüllülerden biyopsi alımı ve hücre hattı eldesi Amerika Birleşik Devleti'nde yer alan Massachusetts Üniversitesi tarafından gerçekleştirilmiş olup hücre hatları, aynı üniversitede görev yapan Prof.Dr.Rabi Tawil tarafından doktora tez araştırması amacıyla tarafımıza sağlanmıştır. Deneylerde 71 yaşında ve 63 yaşında olmak üzere iki FSHD'li erkek; 47 ve 58 yaşında olmak üzere iki kadın FSHD'li hastaya ait olmak üzere dört farklı hücre hattı kullanılmıştır. Bu dört hücre hattının oluşturulabilmesi için olgulardan alınan biyopsinin hangi kas grubuna ait olduğu, FSHD biyopsi anındaki olguların yaşı, cinsiyeti, hastalığın başlangıç yaşı, klinik şiddet skoru ve her olguya ait D4Z4 tekrar dizisi uzunluğu (kb) tablo 3.1 'de verilmektedir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan FSHD hücre hatlarına ait klinik ve moleküler veriler

Bx* anındaki yaş	Cinsiyet	Hastalığın Başlangıç Yaşı	CSS**	4q35 D4Z4 tekrar DNA uzunluğu	Bx alınan kas grubu
71	E	40	8	31 kb A	Deltoid
63	E	15	6	23 kb A	Vastus Lateralis
47	K	47	0-1	19 kb A	Vastus Lateralis
58	K	15	6	28 kb A	Vastus Lateralis

* Bx: Biyopsi

**CSS (Clinic Severity Score): Hastalığın klinik şiddeti ile ilgili bir skorlamadır. CSS formu anlaşılabilirliğinin sağlanabilmesi için orijinal ingilizce formundan türkçeye çevrilerek Tablo 2.1' de paylaşılmıştır.

3.2. Miyoblast hücre kültürü

3.2.1. Hücre Kültürü Basamakları

Hücre kültürünün sürdürülmesindeki basamakları içeren protokol; FSHD miyoblast hücrelerinin temin edildiği Massachusetts Üniversitesine ait protokoldür. Tamamı Türkçeye çevrilmiştir.

(JES 4/14 Rochester Üniversitesi, Nöroloji Departmanı janet_sowden@urmc.rochester.edu) (Bu protokol; Prof.Dr.Rabi Tawil tarafından doktora çalışmamızda kullanılmak üzere, hücre hatları ile beraber paylaşılmıştır; https://genome.ucsc.edu/ENCODE/protocols/cell/human/HSMM_HSMMtube_Crawford_protocol.pdf adresinde ingilizce metni mevcuttur.)

Aşağıda basamakları açıklanmış olan protokol, kullandığımız miyoblast hücre hatlarının FSHD hastalarından alınan kas biyopsisi aşamasından itibaren izlenmesi gerekli olan tüm aşamaları içermektedir. Miyoblast hücre hatları, FSHD hastalarına ait çalışmamızda kullanılmak üzere bize gönderildiğinde halihazırda 19. basamağa kadar getirilmiş olup tez süresince uygulanan aşamalar 19. maddeden itibaren gerçekleştirilmiştir.

Kas Biyopsi Örneğinden Primer Kültür Protokolü

1. Transport amaçlı olan besi ortamı uzaklaştırılır ve 10 ml PBS (Phosphate-buffered saline) ile biyopsi örneği yıkanır.
2. PBS uzaklaştırılır ve yeni 5 ml PBS ilave edilir.

3. Biyopsi materyali steril petri kabına konulur ve iki steril bıçak kullanarak küçük parçalara kesilir.
4. Çok küçük parçalara ayrılan örneğin tamamı pipetle alınarak 15 ml'lik steril tüpe aktarıldıktan sonra üzerine 5 ml PBS ilave edilerek yıkanır.
5. Doku parçacıklarının kendiliğinden sedimentasyonu sağlanır ve üzerindeki PBS aspire edilerek uzaklaştırılır.
6. Doku parçacıklarının üzerine 10 ml PBS eklenir. Tüp kapatılır ve iyice çalkalanır. Tekrar örneğin tüpün dibine çökmesi beklenilir ve üzerinde kalan PBS aspire uzaklaştırılır.
7. Bir önceki basamak iki kez tekrarlanır.
8. PBS uzaklaştırılarak 1.6 ml Dispase II çözeltisi, 2ml kollajenaz IV ve 50 µl 0.2M CaCl₂ eklenir.
9. 37°C temiz su banyosunda 15 dakika inkübe edilir.
10. Pipetle yukarı ve aşağıya doğru 10 kere karıştırılarak homojenize edilir (bu sırada köpük oluşturmaktan kaçınılmalıdır) ardından 15 dakika daha su banyosunda bırakılır.
11. Karıştırma işlemi tekrarlanır.
12. Doku parçacıkları gözle bakıldığında birbirinden ayrılmamış görünüyorsa; inkübasyon ve karıştırma işlemi tekrarlanır.
13. 50 ml'lik tüpün üzerine önceden PBS ile ıslatılmış olan 100 µm naylon hücre filtresi yerleştirilir.
14. Doku parçaları filtreden geçirilir ve 5 ml PBS ile yıkanır.
15. Çökeltideki hücreler kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırılır ve 10 ml besiyeri eklenir.
16. Hücreler T75 flasklarda 90 dakika bekletilir. Bu süre kontamine olmuş örnekteki fibroblastların tutunmasına olanak tanır; ancak miyoblastlar tutunmaz.
17. Suspensiyon yeni bir T75 flaska aktarılır.
18. Kültür başlatıldıktan sonra 3. veya 4. günde besiyerine 1 ml F10 mediumda çözülmüş 4 µl bFGF ilave edilir, bu aşamada miyoblastlar yapışmamış olabileceğinden normal görünümde olmayabilirler.

19. İlk günler hücreler yuvarlak görünümde ve hepsi yapışmamış olabilir. Hücrelerin yapışması ve düz bir şekil alması bir haftaya kadar sürebilir. Alınmış olan biyopsi örneği küçükse, birkaç gün boyunca herhangi bir hücre görünemeyebilir.
20. 3-4 günde bir taze bFGF ilave edilir. İlk besiyeri değişimi eğer küçük hücre odakları meydana gelir ise bir hafta sonra gerçekleştirilir. Eğer hücre odakları oluşmamışsa besiyerine 3-4 günde bir 4 µl bFGF takviyesi yapılarak hücreler aynı besiyerinde 10 gün süre ile tutulur. İlk besiyerini değişikliğinin 1 haftadan daha önce yapılması gerekirse yapışmayan hücreleri kaybetmeden bu değişim yapılmalıdır.
21. Daha sonra, büyüme odaklarını görecekt aşamaya gelene kadar yaklaşık olarak haftada 2 kez besiyeri değiştirilir. Büyüme odaklarının fazla büyümesine müsaade edilmez (Çünkü fazla büyüyen odak miyosit farklılaşmasına neden olabilir).
22. Odaklar geliştikçe yeniden dağıtılır. Besiyeri uzaklaştırılarak 10 ml PBS ile yıkanır, kapak hafifçe örtülerek PBS uzaklaştırılır. 1 ml % 0.1 tripsin ilave edilerek tüm yüzeye yayılması sağlandıktan sonra flaska vurularak ya da flaskın inkübatörde bırakılması ile hücrelerin birkaç dakika içinde yüzeyden kalkması sağlanır. Yavaşça flaskın bir yanına vurularak mikroskop altında hücrelerin ayrılıp ayrılmadığı kontrol edilir. Hücreler ayrılmışsa aynı flaska 10 ml besiyeri eklenerek inkübatörde bekletilir.
23. Kültür ortamındaki hücreler % 60-80 yoğunluğa ulaşana kadar büyümesine izin verilir. Bu yoğunluğa ulaştığında, bir önceki basamakta anlatıldığı gibi tripsinize edilerek 3-4 flaska dağıtılır (her bir flaska 10ml besiyeri eklenir). Bu nokta 1 numaralı pasaj sayısına denk gelir.
24. Pasajlanan hücreler % 60-80 yoğunluğa ulaşana kadar kültür büyütülür. İstenilen yoğunluk elde edildiğinde her bir flask için 1 ml % 0.1 tripsin ile hücreler kaldırılır. Hücreler kalktıktan sonra tripsinin aktivitesi 10 ml F10 besiyeri ile durdurulur. Hücreler toplanarak yavaş devirde 5 dakika santrifüj edilir.
25. Süpernatant uzaklaştırılır ve hücre peleti dikkatli bir şekilde saklama besiyerine aktarılır. Bu aşamada; hücre yoğunluğuna bağlı olarak, her hücre hattı için 8-10 adet vial oluşturacak şekilde, 2-3 ml saklama(freezing) besiyeri eklenir. Bu noktadaki pasaj; 2 numaralı pasajdır. Her bir hücre hattı 1'er ml olacak şekilde cyrotüplere aktarılır ve en azından bir gece veya birkaç gün sürecek şekilde yavaşça soğutulur. Uzun dönem saklanması gerekli ise hücreler -196 °C'de sıvı azot tankında tutulmalıdır.

3.2.2. Gerekli Solüsyonlar

Hücre kültüründe kullanılan F10 (koruma mediumu) aşağıda listelenen beş bileşenden meydana gelmektedir.

- F10 Nutrient Media (Gibco)

Fenol Red ve L-glutamin ile beraber birçok esansiyel aminoasit, vitamin, mineral gibi bileşeni içeren temel besiyeridir. Protein ya da büyüme hormonu içermediğinden fetal dana serumu(Fetal Bovine Serum-FBS) gibi ilaveler gerektirmektedir.

- %20 Fetal Bovine Serum (Gibco)

Fötal dana serumunu temel protein olarak dana serum antijeni (bovine serum antigen-BSA) ve diğer birçok proteini içeren, kültür ortamındaki hücrelerin yaşamasını, büyümesini ve bölünmesini sağlayan kültür bileşeni olarak bilinmektedir.

Fetal Bovine Serum 37 °C 'de erimesi sağlandıktan sonra; 56 C°'de ısı ile inaktivasyonu takiben 0.22 µM por çapına sahip hücre kültürü uyumlu filtrelerden geçirilerek filtrelendir. Karışımdaki son hacmi %20 oranında olacak şekilde F10 besiyeri ortamına ilave edilir.

- 10 ng/ml bFGF (Promega)

İnsan rekombinant bFGF (basic-Fibroblast Growth Factor) aynı zamanda FGF-2 olarak da bilinmektedir. Hücre kültüründe miyoblast hücrelerinin çoğalmasını sağlamaktadır. 25 µg bFGF içeren flakonun üzerine 1 ml PBS eklenerek süspanse edilir. Homojenizasyon sağlandıktan sonra 50 ml'lik stoklar hazırlanarak -20 °C'de saklanır. Kültür için gerekli olduğunda stok eritilerek her 10 ml besiyeri için 4 µl olacak ölçüde besiyerine ilave edilir.

- %1 Penisilin/Streptomisin (Gibco)

Penisilin/Streptomisin antibiyotik karışımı hücre kültürünün kontaminasyonunu önlemek amacıyla kullanılmaktadır. 5000 ünite/mL penisilin ve 5000 µg/mL streptomisin içeren karışımdaki son hacmi %1 olacak şekilde besi ortamına ilave edilir.

- 1 μ M Dexamethazone

Dexamethazone hücre kültüründeki spontan apoptozisi önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Stok miktarı 1 μ M olan dexamethazone; her 10 ml besiyeri için 10 μ l olacak ölçüde besi ortamına eklenir.

Besi ortamı kültür işlemine başlamadan önce her seferinde taze olarak hazırlanır. Bu hazırlık aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir:

%20 ısı ile inaktive olmuş FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren F-10 besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 0.22 μ M por çapına sahip hücre kültürü uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilmiş ve 50 ml'lik steril disposable santrifüj tüplerine bölünerek +4C°'de saklanmıştır. 10 ng/ml bFGF (Promega) ve 1 μ M dexamethazone deneyler gerçekleştirilmeden hemen önce taze olarak besiyerine eklenmiştir.

3.2.3. İşlemler

FSHD miyoblast hücreleri 10 ml F-10 besiyeri kullanılarak 75 cm²'lik flaslara ekilmiştir. %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatörde (Newbrunswick-Galaxy 170R) hücrelerin gece boyunca flaslara yapışmaları sağlandıktan sonra hücreler çoğalmaları için bekletilmiştir. Hücrelerin ilk açıldığı aşamadan itibaren 2-3 gün süre aralıkları ile besiyerleri yenilenerek çoğalmaları ve tutunmaları 7-10 gün süre ile desteklenmiştir. Petri kabındaki hücre yoğunluğunun %60-%80 değerlerine ulaşması sonucunda; hücre pasajlanması işlemi için ortamdan besiyeri uzaklaştırılmış hücreler 75 cm²'lik flaslarda 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanıp 3 ml tripsin-EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit) (%0,1) ile %5 oranında CO₂ içeren etüvde(Life Technologies) 3 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda hücrelerin zarar görmesini engellemek için petri kabına 3 ml F10 besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş ve hücreler santrifüj tüpüne alınmıştır. 1800 rpm' de 7 dakika santrifüj gerçekleştirildikten sonra süpernatant atılmış, hücre pelletinin üzerine 1 ml taze besiyeri eklenmiştir. Pipetaj yapılarak homojen hale getirilen hücre süspansiyonu, hücre sayımına hazırlanmıştır. Hücre süspansiyonundan 10 μ l alınarak hemositometre kanalına aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılarak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hemositometrede 25 kare için sayılan hücre sayısı, 1 ml' deki hücre sayısının bulunabilmesi amacı ile 10⁴ ile çarpılmıştır.

Pasajlama sonrasında her bir 75 cm²'lik flaska 1,5x10⁶ hücre ekimi gerçekleştirilmiş ve 10 ml besiyeri eklenerek tutunma ve çoğalma işlemleri tekrarlanmıştır.

3.3. Protein İzolasyonu

3.3.1. Gerekli Solüsyonlar

Tablo 3.2. RIPA solüsyonu içeriği

Malzeme Adı	Miktarı/Molaritesi/Yüzdesi
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
NaCl	150 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
EGTA(etilenglikolbis(β-aminoetileter))	1mM
NP-40 (nonilfenoksipolietoksietanol)	% 1
Sodyum Deoksikolat	% 1
Sodyum Pirofosfat	2,5mM
β-gliserofosfat	1 mM
Na ₂ VO ₄	1 mM
Leupeptin	1µg/ml

3.3.2. İşlemler

Her hücre hattından 75 cm²'lik flaslara; 1,5x10⁶ miktarında 3 farklı hücre ekimi yapılmıştır. Hücreler yüzeye tutunabilmeleri için %5 CO₂'lik ortamda 37°C'de inkübe edilmiştir. Yapışan hücelere 30 dakika ve 4 saat olmak üzere 10 nM östradiol (E2) uygulaması yapılarak 37°C' de %5 CO₂ içeren etüvde bekletilmiştir. Kontrol grubuna ise hiçbir muamele yapılmamıştır. Hücreler PBS ile yüzeyden kaldırılarak 2 dakika 13200 rpm'de çöktürülmüştür. Bu işlem flastaki bütün hücreler toplanana kadar tekrar edilmiştir. Santrifüjle çöktürülen hücrelerin üzerindeki süpernatant atılıp hücrelerin üzerine lizis tamponu olarak RIPA solüsyonu eklenmiştir. RIPA solüsyon içeriği tablo 3.2'de belirtilmiştir. (RIPA solüsyonuna; örneğin üzerine eklenmeden hemen önce proteaz aktivitesi ile proteinlerin parçalanmasını önlemek amacıyla PMSF

(phenylmethylsulfonyl fluoride) eklenmiştir.) Örnekler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 20 dakika 13200 rpm'de +4°C' de santrifüj yapılmıştır. Üst faz yeni ependorf tüpüne alınarak protein miktar tayini gerçekleştirilmiştir ve örnekler -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.4. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini için Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford, 1976). Öncelikle BSA (sığır serum albümini) kullanılarak standart eğri çizilmiştir. Standart eğri; 1 µg/µl, 2 µg/µl, 3 µg/µl, 4 µg/µl, 5µg/µl BSA örneklerinin üzerine 200 µl Bradford çözeltisi (coomassie blue, etil alkol, fosforik asit) eklenerek 595 nm dalga boyunda absorbans ölçülmesi ile çizilmiştir. Daha sonra miyoblast hücrelerinden elde edilen protein lizatlarından 1'er µl alınıp üzerlerine 200 µl Bradford çözeltisi eklenerek 595 nm dalga boyunda absorbansları belirlenmiştir. Standart olarak kabul edilen absorbans/konsantrasyon eğrisinin eğim eşitliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen miyoblast örneklerinin içerdiği protein konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu aşamanın ardından protein konsantrasyonu belirlenen örnekler için; eşit konsantrasyonda örnek yüklemesini sağlayacak yükleme hacimleri belirlenmiştir.

3.5. Western Blot Yöntemi

3.5.1. İşlemler

FSHD miyoblast hücrelerine yapılmış olan farklı sürelerdeki östrojen muamelesinin östrojen uygulanmayan hücrelere kıyasla etkisini gözlemleyebilmek için protein örneklerinde DUX4/ β-katenin /PAX3-PAX7 hedef proteinlerin ifadesinin belirlenmesi amacıyla western blot yöntemi uygulanmıştır. Western blot basamakları aşağıda verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.5.2. Proteinlerin Hazırlanması ve Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

Jel elektroforezi için, yükleme (%4) ve ayırma (%12) olarak iki farklı jel hazırlanmıştır. (Kullanılan jel içeriği tablo 3.3 ve 3.4' de verilmiştir.)

Tablo 3.3. Poliakrilamid jel bileşenleri %4 Yükleme Jeli (Stacking jel)'inin içeriği

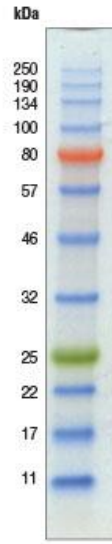
Yükleme Jelinde Kullanılan Kimyasallar	Miktarı(2 jel için)
ddH ₂ O	3075 µl
0,5M Tris (pH=6,8)	1250 µl
%30 akrilamid	670 µl
%10 SDS (sodyum dodesil sülfat)	50 µl
%10 APS (amonyum per sülfat)	40 µl
TEMED	5 µl

Tablo 3.4. Poliakrilamid jel bileşenleri %12 Ayırma Jeli (Seperating jel)'inin içeriği

Ayırma Jelinde Kullanılan Kimyasallar	Miktarı(2 jel için)
ddH ₂ O	3400 µl
1,5M Tris (pH=6,8)	2500 µl
%30 akrilamid	4 ml
%10 SDS (sodyum dodesil sülfat)	100 µl
%10 APS (amonyum per sülfat)	100 µl
TEMED	10 µl

Her bir miyoblast hücre hattı (kontrol, 30 dakika, 4 saat) için yükleme miktarına eşit hacimde olacak şekilde 2xLaemli (Sigma Aldrich-Merck) ile karıştırılmıştır. 2x Laemli solüsyonu hazır olarak temin edilmiştir. Bu solüsyonun içerisinde disülfid bağlarının yıkımını sağlayan 2-merkaptoetanol, protein denatürasyonu ve negatif yük kazandırılmasını sağlayan SDS (sodyum dodesil sülfat), yüklerken ve yürürken görülebilmeyi sağlayan bromfenol mavisi, yüklerken örneğin kuyucuğa çökmesini sağlayan gliserol yer almaktadır. Elde edilen lizat yükleme öncesi 95 °C'de 5 dakika süre ile denatüre edilmiştir.

FSHD miyoblast hücrelerinden kontrol, 30 dakika ve 4 saat olmak üzere üç farklı örnek olarak elde edilen protein lizatları poliakrilamid jele 11-250 kDa aralığındaki marker ile birlikte yüklenmiştir (Şekil 3.6). Marker küçükten büyüğe; 11, 17, 22, 25, 32, 46, 57, 80, 100, 134, 190, 250 kDa olmak üzere on iki bant içermektedir. Tris-Gly-SDS-1X yürütme tamponu (Hazır olarak alınan 10X Tris-Glisin-Sodyum dodesil sülfat solüsyonununun 10 kat sulandırılması ile hazırlanmıştır) kullanılarak 80 Volt'da yükleme jelini geçene kadar (yaklaşık 1 saat süreyle), sonrasında ise yaklaşık 100 Volt 'da 4 saat süreyle olmak üzere yürütülmüştür.



Şekil 3.1. Kullanılan belirteç (protein büyüklük belirtecinin görseli. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26616> sitesinden alınmıştır. Erişim Tarihi: 13 Aralık 2018)

3.5.3. Proteinlerin Nitroselülöz Membrana Transferi

Poliakrilamid jelde yürütülen protein örnekleri iBlot2 (Life Technologies) cihazında nitroselülöz membrana yarı kuru (semi-dry) metod ile 20 Volt'da 7 dakika süreyle transfer edilmiştir.

3.5.4. Bloklama

Transfer işlemi tamamlandıktan sonra protein içeren nitroselülöz membran %5'lik yağsız süt tozu (% 0,1 Tween 20 içeren 1x TBS) solüsyonunda 1 saat süre ile bloke edilmiştir. Solüsyonların içerikleri tablo 3.5'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. TBS (Tris buffered saline) ve TBS-T (tris buffered saline-tween 20) solüsyonu içerikleri

TBS 10x	Miktarı
NaCl	88,6 gr
Tris Base	12,11 gr
pH:8 'e ayarlanarak , dH ₂ O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.	

TBS 1x	Miktarı
TBS	100 ml
dH ₂ O	900 ml

TBS-T 1x	Miktarı
TBS-Tween	100 ml
dH ₂ O	900 ml

3.5.5. Primer ve Sekonder Antikor Muamelesi

Bloklama işlemi tamamlandıktan sonra membran, primer antikorlar; β -katenin rabbit monoklonal antikor (6B3) (Cell Signaling 9582S), DUX4 rabbit monoklonal antikor (ABCAM E5-5) ve PAX 3/7 mouse monoklonal antikor (Santa Cruz) ile 1:1000 dilüsyonda +4°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. (Primer antikorlar %5'lik yağsız süt tozu içinde hazırlanmıştır.) Primer antikor ile işaretleme işleminden sonra membran 1xTBS-T ile 5 dakika olmak üzere üç kere yıkanmıştır. Membran primer antikorun rabbit ya da mouse oluşuna göre 1:5000 dilüsyonda HRP (horse radish peroxidase) bağlı anti-rabbit veya anti-mouse sekonder antikorları ile +4°C'de 60 dakika süreyle inkübe edilmiştir. (Sekonder antikorlar %5'lik yağsız süt tozu içinde hazırlanmıştır.)

Housekeeping gen ürünü protein olarak seçilmiş olan GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (Cell Signaling) ve β -aktin (Cell Signaling) için mouse primer antikor ile 1:1000 dilüsyonda; HRP (horseradish peroxidase) birleştirilmiş anti-mouse sekonder antikor ile (Cell Signaling) 1:5000 dilüsyonda çalışılmıştır.

Sekonder antikor ile işaretleme işleminden sonra membran 1xTBS-T ile 5 dakika olmak üzere yıkanmış ve bu işlem üç kere tekrar edilmiştir. Sonrasında 1xTBS (içeriği tablo 3.5’de verilmiştir.) ile yıkanarak görüntüleme işlemine hazırlanmıştır.

Strip off; housekeeping proteinler ile yakın kDa ağırlığındaki hedef proteinler aynı anda incelenememiştir. Bu nedenle önce ilgili protein şartlanmış sonra strip off yapılmıştır. Strip off solüsyonu; 67,5 ml bidistile suya 20 ml SDS %10, 12,5 ml Tris HCl (pH 6,8 0,5M), 0,8 ml β -merkaptoetanol eklenerek hazırlanmıştır. İşlem öncesi solüsyon 50°C’ye ısıtılmıştır. Membran, üzeri solüsyon ile örtülecek şekilde 50°C’de 45 dakika muamele edilmiş; solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra, membran 1-2 saat süresince akan musluk altında yıkanmıştır. Son olarak 5 dakika TBS-T’de yıkandıktan sonra housekeeping β -aktinin primer ve sekonder antikorları ile muamele edilmiştir.

3.6. Görüntüleme

Bu çalışmada HRP içerikli western blot yöntemi uygulanmıştır. Işımayı elde edebilmek için ECL (ThermoFisher Scientific) kimyasalı kullanılmıştır. ECL; A (luminol) ve B (peroksit solüsyonu) olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. 3 ml A bileşeni ve 3 ml B bileşeni olacak şekilde 1:1 oranda karıştırılarak, bu karışım membranın üstüne yayılmış; sonrasında enzimatik aktivitenin gerçekleşeceği sıcaklığa ulaşabilmek amacıyla membran alüminyum folyoya sarılarak oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu esnada ECL solüsyonunun etkinliğini kaybetmemesi için ortamın karanlık olmasına dikkat edilmiştir. ECL ile 1-2 dk muamele sonrasında membran görüntüleme cihazına alınmış sonuçlar kaydedilmiştir.

3.7. Bantların Kantitatif Olarak Hesaplanması ve Grafik Çizimi

Elde edilen western blot bantlarının ölçümü için; “ImageJ” programı kullanılmıştır. Bu programda beyaz görüntü üzerine siyah olan bantların siyah üzerine beyaz olacak şekilde kontrastı tersine çevrilmiştir. Daha sonra program yardımıyla görüntünün alanı çizilerek, bu alan içindeki protein miktarına karşılık gelen piksel yoğunlukları ölçülmüştür. Bias oluşmaması için her bir bant 3 kere ölçülerek ortalaması alınmıştır. β -katenin, DUX4, PAX3/7, GAPDH ve β -aktine ait ölçülen bu sayısal değerler excel dosyasına aktarılmıştır. β -katenin, DUX4, PAX3/7 ve GAPDH’den elde edilen değerler housekeeping gen olarak kullanılmış β -aktin ile oranlanarak standardize edilmiş; yükleme ve diğer kullanıcı hatalarından kaynaklanabilecek olan biaslar bu şekilde ekarte edilmiştir.

3.8. Deneylerde Kullanılan Makina-Techizatlar

- √ Hassas terazi (Pioneer,Ohaus),
- √ Mikrosantrifüj(Thermoscientific, MikroCL21R),
- √ Vorteks (JEIO TECH, Lab Companion),
- √ İnkübatör (Memmert),
- √ Steril Kabin (Sconlaf Mars SafetyClasse 2),
- √ Etüv(JEIO TECH, Lab, Companion),
- √ Santrifüj (Nüve, NF800),
- √ pH metre(Inolab pH7110),
- √ Su banyosu (Lab Companion, JEIO TECH,Bs11),
- √ İverted ışık mikroskobu(nikon eclipse TS100),
- √ Laminer flow (scanlaf-mars safety classe 2),
- √ Otoklav (nüve steamart- OT 90L),
- √ Dikey elektroforez sistemi (clever omnipage cvs10),
- √ Membran görüntüleme cihazı (Syngene).

4. BULGULAR

Bu çalışmada, FSHD'nin klinik olarak erkeklerde daha erken başlangıçlı oluşu, daha ağır seyredişi ve kadınlarda menapozdan sonra hastalığın belirgin olarak şiddetlenmesi nedeniyle; FSHD'nin patofizyolojisinde östrojenin koruyucu bir rol oynayabileceği hipotezi oluşturulmuştur. Literatürde FSHD patofizyolojisindeki rolü birçok çalışmayla ortaya konmuş olan DUX4 ve β -katenin proteinleri ve DUX4 ile antagonist çalıştığı bilinen; miyoblast gelişim ve proliferasyonunda rol alan PAX3 ve PAX7 transkripsiyon faktörleri hedef proteinler olarak belirlenmiştir. Östrojenin FSHD patofizyolojisinde etken olup olmadığı ve bu proteinlerin seviyelerini etkileyip etkilemediğinin gösterilmesinin amaçlandığı bu çalışmada; 2 dişi ve 2 erkek; 4 farklı FSHD hastasından alınan biyopsilerden elde edilmiş primer miyoblast hücre kültürlerinde 30 dakika ve 4 saat olmak üzere 10nM östradiol (E2)'e maruziyet sonrası ve östradiol yokluğu durumlarında protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen örneklerde western blot yöntemi aracılığıyla DUX4, β -katenin ve PAX3/PAX7 proteinlerinin düzeyleri belirlenmiştir.

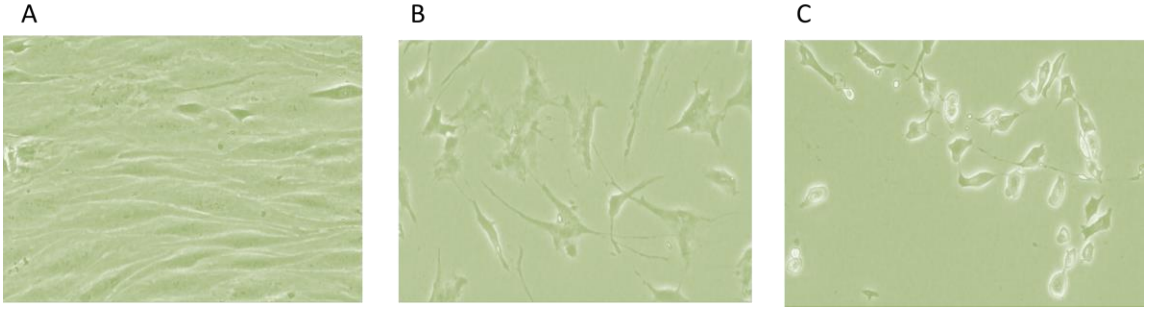
İncelenen herbir proteinin moleküler ağırlığı ve bu çalışmada elde edilen sonuçlarda spesifik antikor kullanılarak elde edilen bant yerleşimleri aşağıda belirtildiği şekildedir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. DUX4, β -katenin, PAX3/7, GAPDH, β -aktin proteinlerinin molekül ağırlıkları ve çalışma sonucunda elde edilen yaklaşık bant büyüklükleri

	Moleküler Ağırlık	Gözlenen (<i>yaklaşık</i>) Protein Yerleşimi
DUX4	45 kDa	32-46 kDa
β -katenin	92 kDa	80-100 kDa
PAX3/7		80 kDa
PAX3/7	56 kDa	46-57 kDa
PAX3/7		32-46 kDa
GAPDH	37 kDa	≤ 32 kDa
β -aktin	45 kDa	32-46 kDa

4.1. Hücre Kültürü Bulguları

Östradiol muamelesinden sonra kültür ortamındaki miyoblast hücreleri fibroblastik görünen uzantılarını kaybederek, yuvarlak görümlü bir morfoloji kazanmıştır. 30 dakika ve 4 saat E2 muamelesi, hücre yoğunluğunda azalma ile seyretmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 71 yaşındaki FSHD hastasına ait hücrelerin E2 uygulaması ile morfolojik görüntüleri. A: Kontrol grubu, B: 30 dakika 10 nM E2 uygulaması, C: 4 saat 10 nM E2 uygulaması.

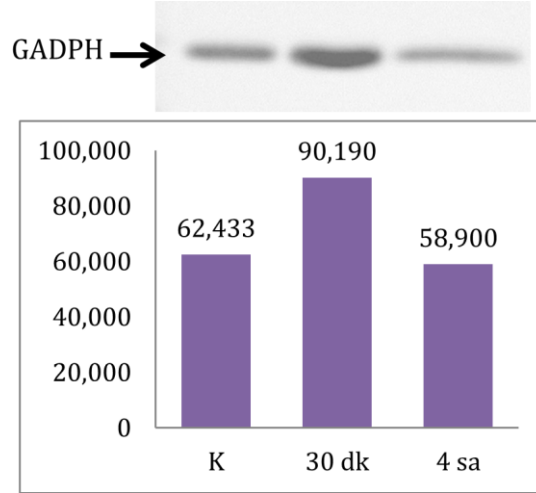
4.2. 58 Yaşında Kadın Hastaya ait Hücre Hattı Bulguları

Bu hücre hattında tutunma çok düşük düzeyde gerçekleşmiştir. Tutunan hücrelerde çoğalma gözlenememiş bu nedenle ilerleyen deney aşamaları gerçekleştirilememiştir.

4.3. 71 Yaşında Erkek Hastaya ait Hücre Hattı Bulguları

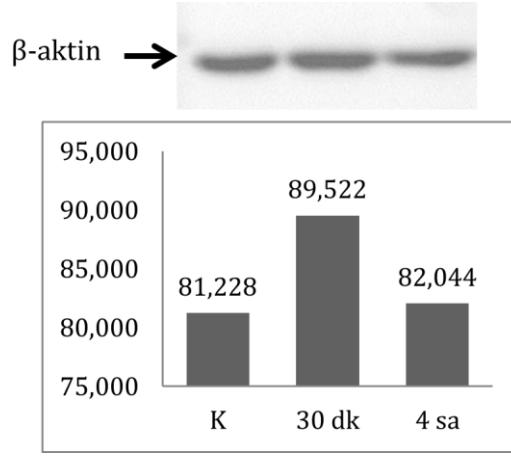
4.3.1. GAPDH Proteinine ait Bulgular

71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait FSHD miyoblast hücrelerinde housekeeping gen (her hücrede bazal düzeyde protein sentezleyen gen) ürünü ve aynı zamanda yükleme kontrolü olarak seçilen GAPDH'in protein bandı; belirteçte yer alan 32 kDa bandının alt hizasında yaklaşık 31,5 kDa ağırlığında izlenmiştir. GAPDH antikoru ile kontrol, 30. dakika, ve 4. saatte elde edilen sayısal bant değerlerinin birbirine yakın değerler olmadığı tespit edilmiştir. GAPDH bant yoğunluğu olarak östradiol muamelesinin 30. dakikasında 60 binlik bir değerden 90 binlik bir değere artış göstererek 4. saatinde kontrol örneğinde 58 binlik bir düzeye inmiştir (Şekil 4.2). İlk deneyde elde edilen bu sonuç; FSHD miyoblastlarında GAPDH gen ürünü proteininin ekspresyonunun östrojenden etkilendiğini düşündürmüştür. Bu nedenle diğer hücre hatlarında housekeeping proteini olarak GAPDH çalışılmamış; ilerleyen süreçte β -aktin ile deneylere devam edilmiştir.



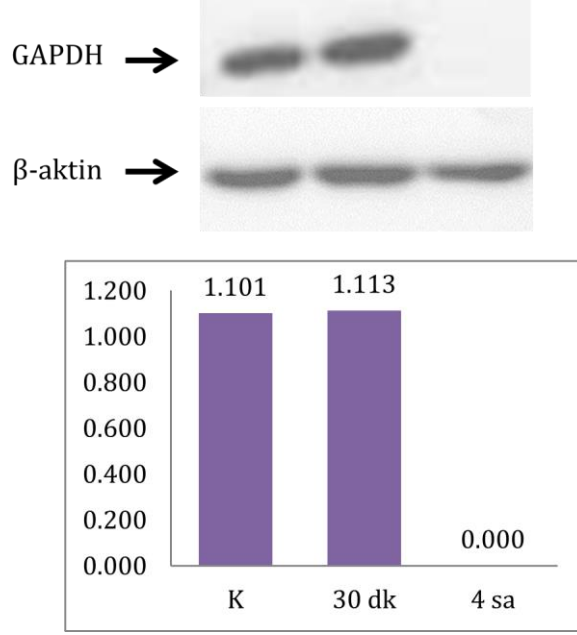
Şekil 4.2. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 maruziyeti ile zamana bağlı GAPDH ekspresyonunun western blot yöntemiyle gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda), ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar. Hücre grupları RIPA lizis tamponunda homojenize edilmiş, 50 μ g hücre lizatı %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüş, nitroselülöz membran GAPDH antikoru ile işaretlenmiştir. Western blot sonucunda GAPDH protein bandı ImageJ programında piksel olarak ölçülmüş ve sayısal bir değere çevrilmiştir.

71 yaşındaki erkek hasta örneğinde bir sonraki deneyde β -aktin proteininin housekeeping gen ürünü olarak kullanılıp kullanılmayacağını gösterebilmek amacıyla β -aktin ile beraber tekrar GAPDH proteini çalışılmıştır. Hücrelere i) Kontrol grubu E2 yokluğunda, ii) 30 dakika 10 nM E2 maruziyeti ve iii) 4 saat 10 nM E2 maruziyeti yapılmıştır. β -aktin proteinine ait kontrol, 30 dakika ve 4. saatteki sayısal değerler incelendiğinde her biri yaklaşık 80-90 bin aralığında değerler içerecek şekilde birbirine yakın sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 maruziyeti ile zamana bağlı β -aktin ekspresyonunun western blot yöntemiyle gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar. Hücre grupları RIPA lizis tamponunda homojenize edilmiş, 50 μ g hücre lizatı %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüş ve nitroselülöz membrana aktarılmıştır. Membran β -aktin ve GAPDH antikorları ile işaretlenmiştir. Elde edilen western blot bantlarının piksel yoğunlukları ImageJ programı yardımıyla ölçülerek sayısal değerlere çevrilmiştir.

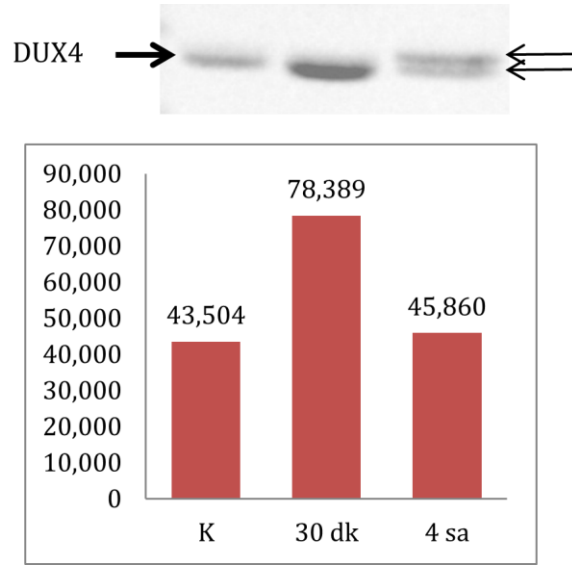
GAPDH proteininin E2'den etkilendiğini ortaya koyabilmek amacıyla; GAPDH'in elde edilen kontrol, 30. dakika, 4. saatteki GAPDH sayısal değerleri; β -aktinin kontrol, 30. dakika, 4. saat sayısal değerlerine oranlanmıştır. Sonuç olarak; GAPDH proteininin östradiol maruziyetinin 30. dakikasında hafif bir artış gösterdiği; 4.saatte ise azalarak sıfırlandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 maruziyeti ile zamana bağlı GAPDH ekspresyonunun western blot yöntemiyle β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar. GAPDH antikoruna ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saat sayısal değerleri; β -aktin antikoruna ile elde edilen kontrol, 30.dakika, 4.saat sayısal değerlerine oranlanmıştır.

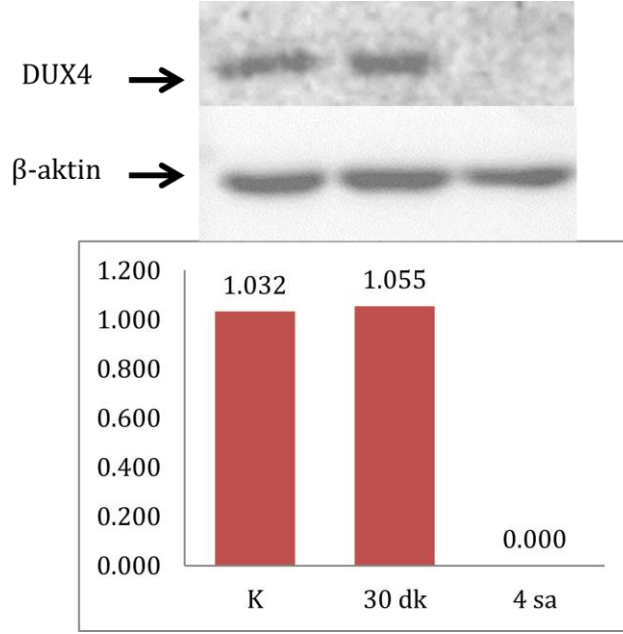
4.3.2. DUX4 Proteinine ait Bulgular

71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde DUX4 protein düzeyleri E2 muamelesi sonrası 30. dakikada artış göstermiş; 4. saatte başlangıç düzeyine yakın bir değere ulaşmıştır. Ancak standardizasyon yapılmadığı için bu sonuç güvenilir kabul edilmemiştir. DUX4'ün bu sonucunun paylaşılmasına sebep olan nokta; 30. dakikada gözlenen bandın daha küçük kDa düzeyinde yer alması; 4. saatte ise hem kontrol örneğinde gözlenen hem de 30. dakika örneğinde gözlenen bant hizasında olmak üzere çift bant görüntüsünün varlığıdır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı DUX4 ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar. Hücre grupları RIPA lizis tamponunda homojenize edilmiş, 50 µg hücre lizati %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüştür. Nitroselülöz membrana transfer işleminden sonra membran; belirteçte yer alan 57 kDa hizasından kesilerek üst kısım DUX4 antikoruna ve alt kısım GAPDH antikoruna ile işaretlenmiştir. Elde edilen western blot bantlarının piksel yoğunlukları ImageJ programı yardımıyla ölçülerek sayısal değerlere çevrilmiştir. DUX4'ün ilk deneyde elde edilen sayısal değerleri; aynı deneyde housekeeping olarak kullanılan GAPDH E2'den etkilendiği için standardizasyon yapılmadan paylaşmıştır.

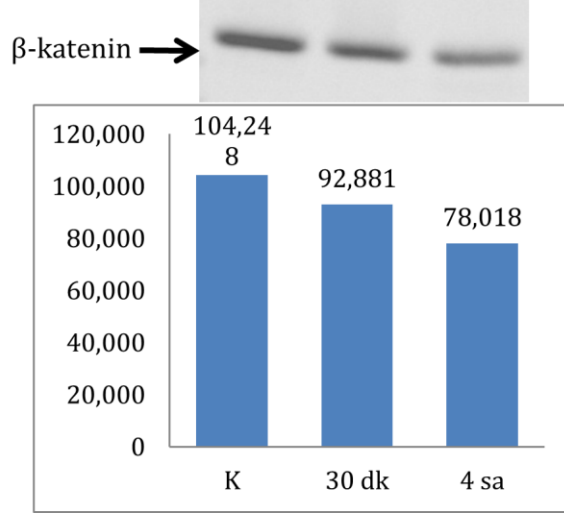
İkinci DUX4 sonucu olarak 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde; DUX4 proteininin E2 maruziyetinin 30.dakikasında çok hafif derecede bir artışla neredeyse aynı kaldığı; 4.saatte ise azalarak sıfırlandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı DUX4 ekspresyonunun western blot yöntemi ile β-aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar. Hücre grupları RIPA lizis tamponunda homojenize edilmiş, 50 µg hücre lizatı %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüştür nitroselülöz membrana aktarılmıştır. Membran önce DUX4 antikoruna ile işaretlenmiştir. DUX4 ve β-aktin yakın kDa ağırlığına sahip olduklarından ötürü strip off işlemi gerçekleştirilmiştir; daha sonra β-aktin antikoruna ile işaretlenmiştir. Elde edilen western blot bantlarının piksel yoğunlukları ImageJ programı yardımıyla ölçülerek sayısal değerlere çevrilmiştir. DUX4 antikoruna ile elde edilen kontrol, 30.dakika.ve 4.saate sayısal değerleri; β-aktin antikoruna ile elde edilen kontrol, 30.dakika, 4.saate sayısal değerlerine oranlanmıştır.

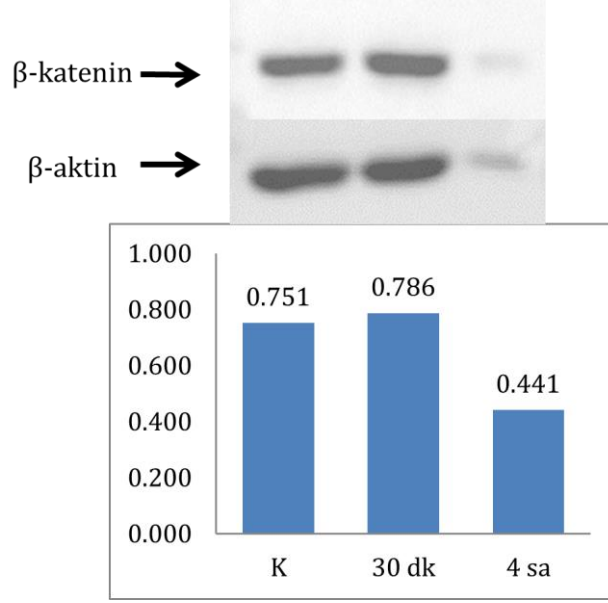
4.3.3. β -katenin Proteinine ait Bulgular

71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde östradiol muamelesi sonrası 30. dakikada ve 4. saatte β -katenin protein yoğunluğunda azalma izlenmiştir. Ancak housekeeping protein ile standardizasyon yapılmadığı için bu sonuç azalma olarak kabul edilmemiştir (Şekil 4.7).



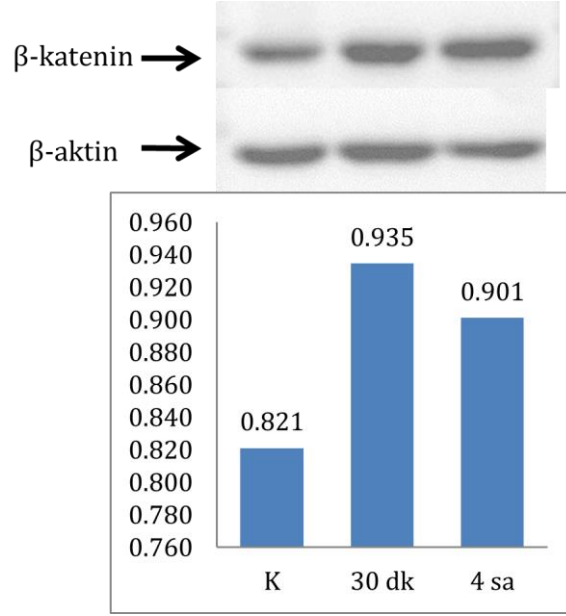
Şekil 4.7. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı β -katenin ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar. Hücre grupları RIPA lizis tamponunda homojenize edilmiş, 50 μ g hücre lizati %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüştür. Nitroselülöz membrana transfer işleminden sonra membran; belirteçte yer alan 57 kDa hizasından kesilerek üst kısım β -katenin antikoru ve alt kısım GAPDH antikoru ile işaretlenmiştir. Elde edilen western blot bantlarının piksel yoğunlukları ImageJ programı yardımıyla ölçülerek sayısal değerlere çevrilmiştir. β -kateninin ilk deneyde elde edilen bu sayısal değerleri, aynı deneyde housekeeping olarak çalışılan GAPDH östradiolden etkilendiği için standardizasyon yapılmadan paylaşılmıştır.

Bu deney düzeneğinde doğru housekeeping protein olan β -aktin ile tekrar gerçekleştirilen deneyde; 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde β -katenin 30.dakikada büyük bir değişiklik teşkil etmeyecek şekilde hafif bir artış sergilemiştir. Hem β -aktin, hem β -kateninde 4. saat örneğinde gözlenen yükleme hatası nedeniyle 4. saat sonucu incelemeye dahil edilmemiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı β -katenin ekspresyonunun western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar. Hücre grupları RIPA lizis tamponunda homojenize edilmiş, 50 μ g hücre lizatı %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüştür. Nitroselülöz membrana transfer işleminden sonra membran; belirteçte yer alan 57 kDa hizasından kesilerek üst kısım β -katenin antikoruna ve alt kısım β -aktin antikoruna ile işaretlenmiştir. Elde edilen western blot bantlarının piksel yoğunlukları ImageJ programı yardımıyla ölçülerek sayısal değerlere çevrilmiştir. β -katenin antikoruna ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saat sayısal değerleri; β -aktin antikoruna ile elde edilen kontrol, 30.dakika, 4.saat sayısal değerlerine oranlanmıştır.

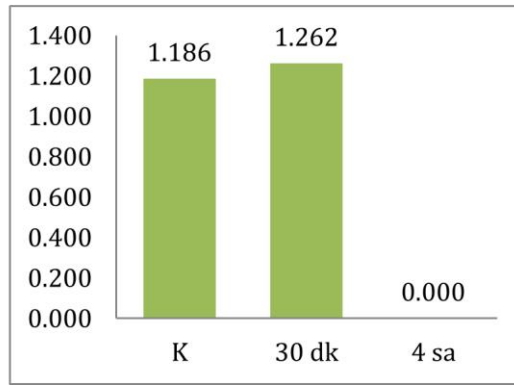
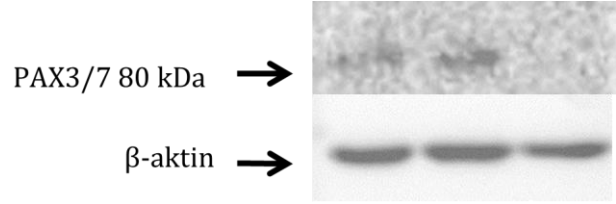
4. saatte sonuç elde edilemediğinden β -katenin proteini tekrar çalışılmıştır. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde β -katenin 30.dakikada hafif bir artış sergilemiş; 4.saatte kontrol örneğinin altına düşmeyecek düzeyde hafif bir azalma izlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı β -katenin ekspresyonunun western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar. Hücre grupları RIPA lizis tamponunda homojenize edilmiş, 50 μ g hücre lizati %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüştür. Nitroselülöz membrana transfer işleminden sonra membran; belirteçte yer alan 57 kDa hizasından kesilerek üst kısım β -katenin antikoruna ve alt kısım β -aktin antikoruna ile işaretlenmiştir. Elde edilen western blot bantlarının piksel yoğunlukları ImageJ programı yardımıyla ölçülerek sayısal değerlere çevrilmiştir. β -katenin antikoruna ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saat sayısal değerleri; β -aktin antikoruna ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saat sayısal değerlerine oranlanmıştır.

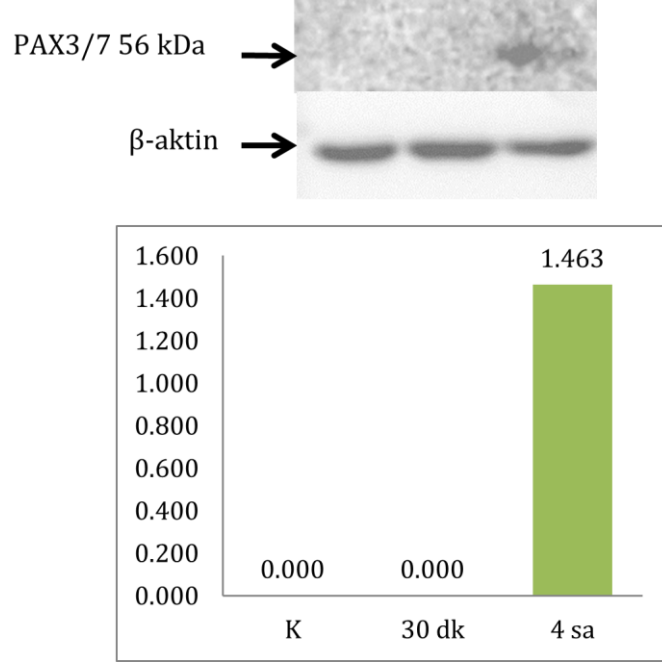
4.3.4. PAX3 ve PAX7 Proteinlerine ait Bulgular

71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde 80 kDa PAX3/7 proteininin östradiol maruziyetinin 30. dakikasında çok hafif derecede bir artışla neredeyse aynı kaldığı; 4.saatte ise azalarak sıfırlandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.10A).



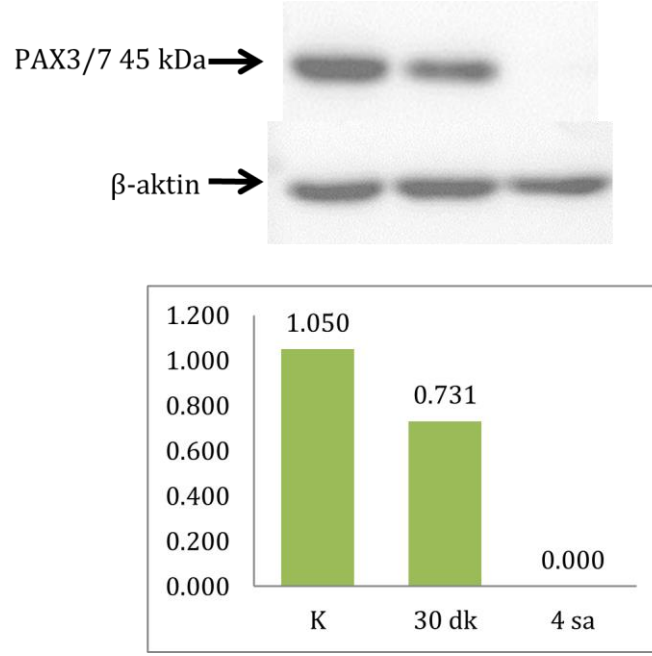
Şekil 4.10A. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı 80 kDa PAX3/7 ekspresyonunun western blot yöntemi ile β-aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar. Hücre grupları RIPA lizis tamponunda homojenize edilmiş, 50 µg hücre lizatı %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüştür nitroselülöz membrana aktarılmıştır. Membran önce PAX3/7 antikoruna ile işaretlenmiştir. PAX3/7 ve β-aktin yakın kDa ağırlığına sahip olduklarından ötürü strip off işlemi gerçekleştirilerek β-aktin antikoruna ile işaretlenmiştir. Elde edilen western blot bantlarının piksel yoğunlukları ImageJ programı yardımıyla ölçülerek sayısal değerlere çevrilmiştir. PAX3/7 antikoruna ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saate sayısal değerleri; β-aktin antikoruna ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saate sayısal değerlerine oranlanmıştır.

56 kDa PAX3/7 proteininde kontrol örneği ve E2 maruziyetinin 30. dakikasında ekspresyon gözlenmezken; 4.saatte ise 56 kDa PAX3/7 ekspresyonu belirlenmiştir (Şekil 4.10B).



Şekil 4.10B. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı 56 kDa PAX3/7 ekspresyonunun western blot yöntemi ile β-aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar.

45 kDa PAX3/7 proteini, östrojen maruziyetinin 30. dakikasından başlayarak azalma göstermiş; 4.saatte ise sıfırlandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.10C).



Şekil 4.10C. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı 45 kDa PAX3/7 ekspresyonlarının western blot yöntemi ile β-aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar.

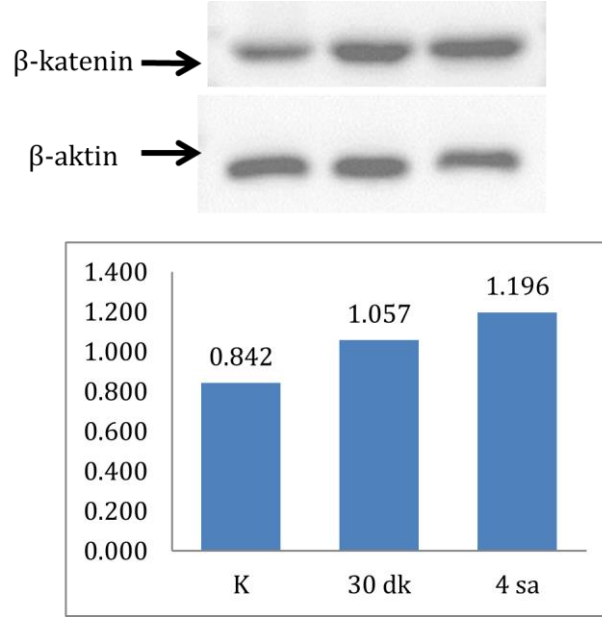
4.4. 63 Yaşında Erkek Hastaya ait Hücre Hattı Bulguları

4.4.1. DUX4 Proteinine ait Bulgular

Bu hücre hattında; β -aktin ekspresyonu mevcut olduğu durumda DUX4 bant görüntüsü tespit edilememiştir. DUX4 ve β -aktinin moleküler ağırlıkları yakın olduğu için; β -aktin strip off sonrası çalışılmıştır. Bant bulunmayan boş DUX4 membran görseli, marker-DUX4 ve β -aktin proteinlerinin aynı membran üzerinde gösterilmesi mümkün olamayağı için paylaşılmamıştır.

4.4.2. β -katenin Proteinine ait Bulgular

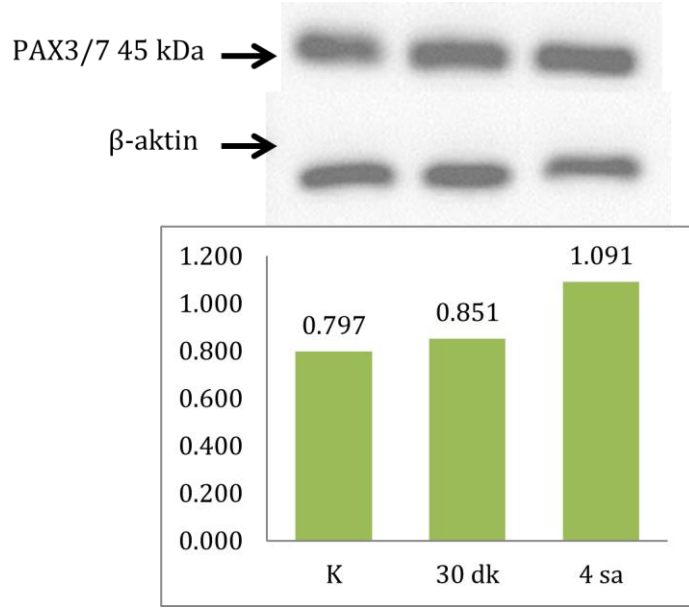
63 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde β -katenin proteininde 30.dakika ve 4.saate giden süreçte belirgin artış gözlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. 63 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı β -katenin ekspresyonunun western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar. Hücre grupları RIPA lizis tamponunda homojenize edilmiş, 50 μ g hücre lizati %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüştür. Nitroselülöz membrana transfer işleminden sonra membran; belirteçte yer alan 57 kDa hizasından kesilerek üst kısım β -katenin antikoruna ve alt kısım β -aktin antikoruna ile işaretlenmiştir. Elde edilen western blot bantlarının piksel yoğunlukları ImageJ programı yardımıyla ölçülerek sayısal değerlere çevrilmiştir. β -katenin antikoruna ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saat sayısal değerleri; β -aktin antikoruna ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saat sayısal değerlerine oranlanmıştır.

4.4.3. PAX3/7 Proteinine ait Bulgular

63 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde yalnızca 45 kDa PAX3/7 proteini tespit edilmiş; 45 kDa'luk formun E2 maruziyetinin 30. dakikasında çok hafif derecede bir artışla neredeyse aynı kaldığı; 4.saatte artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. 63 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı 45 kDa PAX3/7 ekspresyonunun western blot yöntemi ile β-aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar. Hücre grupları RIPA lizis tamponunda homojenize edilmiş, 50 µg hücre lizati %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüş ve nitroselülöz membrana aktarılmıştır. Membran önce PAX3/7 antikoru ile işaretlenmiştir. PAX3/7 ve β-aktin yakın kDa ağırlığına sahip olduklarından ötürü strip off işlemi gerçekleştirilmiştir; daha sonra β-aktin antikoru ile işaretlenmiştir. Elde edilen western blot bantlarının piksel yoğunlukları ImageJ programı yardımıyla ölçülerek sayısal değerlere çevrilmiştir. PAX3/7 antikoru ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saat sayısal değerleri; β-aktin PAX3/7 antikoru ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saat sayısal değerlerine oranlanmıştır.

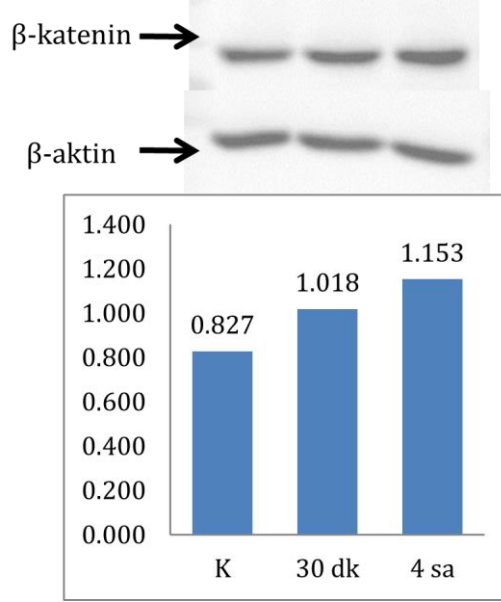
4.5. 47 Yaşında Kadın Hastaya ait Hücre Hattı Bulguları

4.5.1. DUX4 Proteinine ait Bulgular

Bu hücre hattında DUX4 ekspresyonu izlenmemiştir; β-aktin ekspresyonu mevcut olduğu durumda DUX4 bant görüntüsü tespit edilememiştir. Bant bulunmayan boş DUX4 membran görseli, marker-DUX4 ve β-aktin proteinlerinin aynı membran üzerinde gösterilmesi mümkün olamayağı için paylaşılmamıştır.

4.5.2. β -katenin Proteinine ait Bulgular

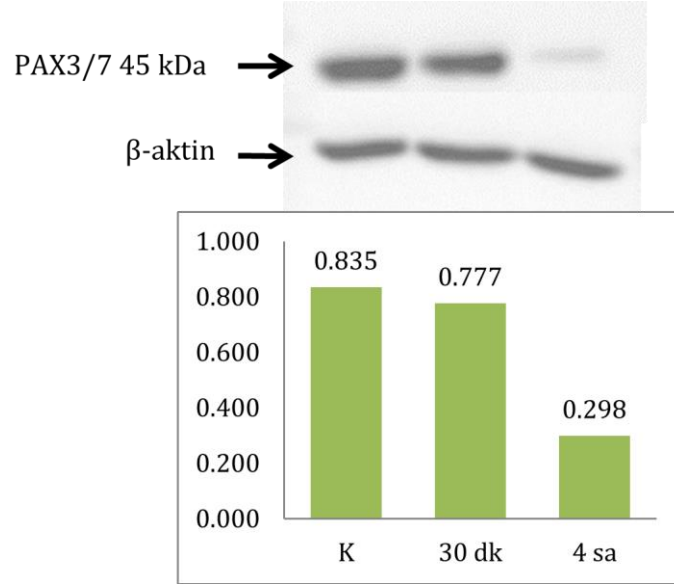
47 yaşındaki kadın FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde 30. dakikadan başlayarak β -katenin belirgin bir artış ile seyretmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. 47 yaşındaki kadın FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı β -katenin ekspresyonunun western blot yöntemi ile β -aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar. Hücre grupları RIPA lizis tamponunda homojenize edilmiş, 50 μ g hücre lizati %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüştür. Nitroselülöz membrana transfer işleminden sonra membran; belirteçte yer alan 57 kDa hizasından kesilerek üst kısım β -katenin antikoru ve alt kısım β -aktin antikoru ile işaretlenmiştir. Elde edilen western blot bantlarının piksel yoğunlukları ImageJ programı yardımıyla ölçülerek sayısal değerlere çevrilmiştir. β -katenin antikoru ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saat sayısal değerleri; β -aktin antikoru ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saat sayısal değerlerine oranlanmıştır.

4.5.3. PAX3/7 Proteinine ait Bulgular

47 yaşındaki kadın FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde yalnızca 45 kDa PAX3/7 proteini tespit edilmiş; 45 kDa'luk formun östrojen maruziyetinin 30. dakikasından itibaren 4.saate kadar giderek azaldığı izlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. 47 yaşındaki kadın FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde E2 varlığında zamana bağlı 45 kDa PAX3/7 ekspresyonunun western blot yöntemi ile β-aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi. i) K (kontrol-E2 yokluğunda) , ii) 30 dk (30 dakika 10 nM E2 maruziyeti) ve iii) 4 sa (4 saat 10 nM E2 maruziyeti) sonrasında elde edilen sonuçlar. Hücre grupları RIPA lizis tamponunda homojenize edilmiş, 50 µg hücre lizatı %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüş ve nitroselülöz membrana aktarılmıştır. Membran önce PAX3/7 antikoru ile işaretlenmiştir. PAX3/7 ve β-aktin yakın kDa ağırlığına sahip olduklarından ötürü strip off işlemi gerçekleştirilmiştir; daha sonra β-aktin antikoru ile işaretlenmiştir. Elde edilen western blot bantlarının piksel yoğunlukları ImageJ programı yardımıyla ölçülerek sayısal değerlere çevrilmiştir. PAX3/7 antikoru ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saat sayısal değerleri; β-aktin antikoru ile elde edilen kontrol, 30.dakika ve 4.saat sayısal değerlerine oranlanmıştır.

5. TARTIŞMA

FSHD; yüz, skapula, kol, bacak kaslarının asimetrik ve ilerleyici tutulumuyla seyreden (Tawil, 2008), mortaliteye sebep olmayan ancak morbiditeyi ciddi ölçüde etkileyen, geniş bir yelpazede farklı klinik bulgularla gözlenebilen, otozomal dominant kalıtım gösteren bir distrofi olarak karşımıza çıkmaktadır. Kas hastalıkları arasında yaklaşık 1:7500 sıklıkla, en sık görülen üçüncü distrofi olarak yerini almaktadır (Denny ve Heather, 2017).

Genetik ve epigenetik birçok çalışma göz önüne alındığında FSHD'nin klinik özellikleri ve ilişkili moleküler alt yapısı hala tam olarak aydınlatılamamıştır. 4q35 bölgesinde yer alan D4Z4 tekrar dizilerinin azalması ya da bu bölgedeki mevcut metilasyon azalmasının hastalığın şiddetini arttırdığı bilinse de (Gaillard ve ark., 2014; Jones ve ark., 2014); kliniğin oldukça farklı yelpazede seyrettiği görülmektedir; i) klinik bulguların ortaya çıktığı yaş, ii) ilk bulgu veren kas grubu (yüz, scapula, biceps, triceps, tibialis anterior kaslarından herhangi biri olabilir), iii) hastalığın şiddeti ve iv) hastalığın seyri her bir vakada kendine özgü bir örüntüde ortaya çıkmaktadır. Aynı tekrar sayısına sahip aile bireylerinde dahi hastalığın farklı bir örüntü sergilediği gözlenmektedir. Özellikle kadın ile erkek FSHD vakaları arasında belirgin farklılıklar dikkat çekmektedir. Erkek FSHD vakalarında hastalığın daha erken yaşta ortaya çıkıp daha hızlı progresyon göstermesi (Lin ve ark., 2015) FSHD'de hormonların etkili olabileceğini düşündürmüştür. Kadınlarda menapozun bir dönüm noktası yaratarak; menapoz ile beraber hastalığın şiddetlenerek ilerlemesi ise etkili olabileceği düşünülen hormonlar arasında özellikle östrojeni akla getirmiş ve patofizyolojik süreçte önemli bir rolü olabileceğine işaret etmiştir.

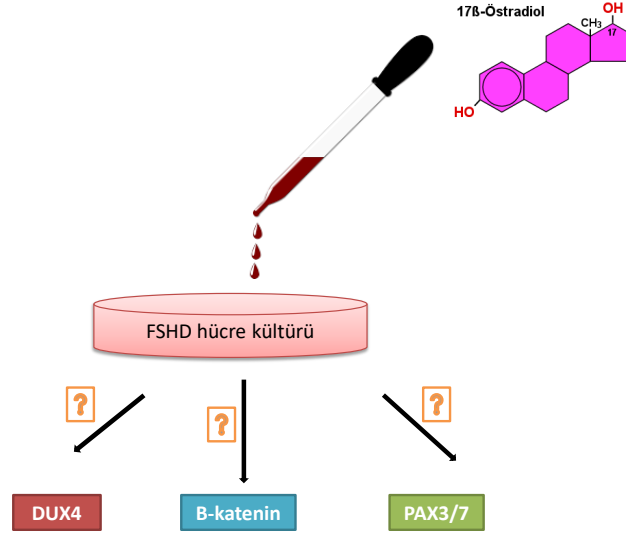
Bu tez projesi, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2016-1460 proje numarası ile desteklenmiş; 2016 yılında kabul edilmiş olup ilgili tarihte orjinal bir hipotez olarak sunulmuştur. Ancak deneyler tamamlanıp tez yazım aşamasına gelinme sürecine kadar konu ile ilgili yayımlanan çalışmalar olmuştur. Bu çalışmalardan ilkinde meme kanserine yakalanmış ve anti-östrojenik tedavi alan FSHD vakalarında, FSHD'nin şiddetlenerek ilerlediği gösterilmiştir, bu şiddetlenme

anti-östrojenik tedavi almayan diğer vakalarda gözlenmemiştir (Teveroni ve ark., 2017). Östrojenin etkisini moleküler olarak test etmeyi amaçlayan aynı çalışmada FSHD hücreleri farklılaşma aşamasında östradiole maruz bırakılmış ve oluşan değişiklikler incelenmiştir. DUX4 düzeyinin östradiol muamelesi ile değişmediği ancak DUX4 hedef genlerinin ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Östrojen bu etkisini, DUX4'ün hedef genleri üzerinde transkripsiyonel aktivasyonun bir göstergesi olan histon 3'ün 4.'cü lizinindeki trimetilasyonu (H3[Lys4]) azaltarak gerçekleştirmiştir (Teveroni ve ark., 2017). Bu çalışma bir ölçüde bilinen östrojen ve metilasyon ilişkisinin FSHD hücrelerindeki 4q35 D4Z4 bölgesi için de geçerli olduğunu ortaya koymuştur.

Klinik bir çalışmada ise ömür boyu östrojen maruziyeti ile FSHD şiddeti direkt olarak ilişkilendirilememiş (Mul ve ark., 2018); fakat diğer hormonlarla kompleks etkileşiminin etkisinin dışlanamayacağı belirtilmiştir. T47D meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan moleküler çalışmada DUX4, progesteron reseptörünün, ligand ile uyarılan transkripsiyonel aktivasyonunu inhibe etmiş; tam tersi şekilde progesteron, testesteron ya da östrojen ile muamele edilen hücreler ise DUX4 toksisitesinden korunmuştur(https://www.fshsociety.org/assets/pdf/FSHSociety_FSHD_IRC_2122October2013FullProgramAbstracts_Proof.pdf). Bu çalışmanın bulguları; FSHD hücre hatlarına östrojen muamelesi yapılarak östrojenin koruyucu olduğu ortaya konmuş olan diğer çalışmayı (Teveroni ve ark., 2017) destekler niteliktedir.

Çalışmamızda, literatür bilgileri ışığında ve FSHD hastalarında gözlemlenen kadın-erkek arasındaki klinik farklılıktan yola çıkarak; östrojenin FSHD patofizyolojisinde etkisi olup olmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, literatürde FSHD patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiş kilit proteinler olan dört farklı transkripsiyon faktörü belirlenmiştir. Bu kilit transkripsiyon faktörleri; (i) tekrar dizi kısalmasının gerçekleştiği bölgede yer alan ve FSHD'deki patolojik etkinliği birçok çalışmada gösterilmiş olan *DUX4* proteini; (ii) FSHD hücrelerinin protein etkileşim ağının merkezinde yerleşim gösterdiği ortaya konmuş olan *β-katenin*, (iii) *DUX4* proteini ile yarışmalı olarak bağlandığı ve embriyonik dönemde miyoblast/miyosit gelişiminde önemli rol oynadığı bilinen *PAX3* ve *PAX7* olarak seçilmiştir. Oluşturduğumuz hipotez kapsamında, östrojenin FSHD ile olası etkileşimini test edebilecek en yakın deney

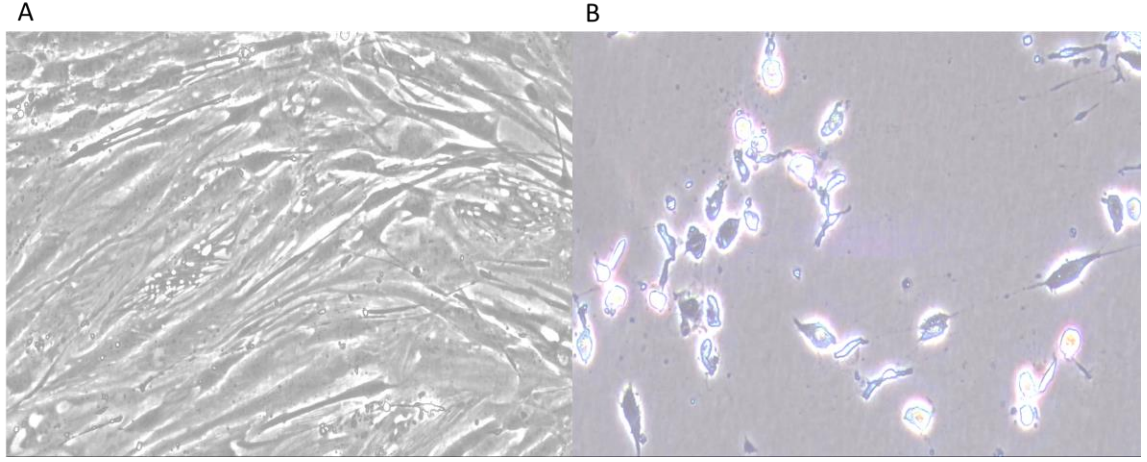
tasarımı FSHD hastalarının kas örnekleri üzerinde gerçekleştirilecek bir deney düzeneği olacağından ötürü FSHD hastalarından alınan biyopsi örneklerinden elde edilmiş olan primer miyoblast hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücre dizilerini içeren kültür ortamında FSHD-östrojen etkileşiminin var olup olmadığı hipotezi belirlemiş olduğumuz dört protein üzerinden test edilmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Çalışma tasarımının görseli. FSHD hücre kültüründe östradiol muamelesinin DUX4, β -katenin, PAX3/7 düzeylerine etkisinin araştırılması.

Miyoblast gibi ileri derecede farklılaşmış primer hücre kültürlerinde tutunma ve çoğalma kanser hücre kültürlerine kıyasla daha uzun sürede gerçekleşmektedir. Primer miyoblast hücre kültüründeki bir diğer önemli nokta büyüme odaklarında hücre birikimi veya uzun pasaj sayısı sonrasında miyosite farklılaşabilmeleridir. Bu nedenle miyoblast hücre kültürlerinin tutunmasından sonra her gün takibi gerçekleştirilerek yeterli süre sonrasında pasajlanmış ve deneyler hücreler farklılaşma sürecine ilerlemeden mevcut ilk pasajlarda gerçekleştirilmiştir.

Hücre hattı çalışmalarında östradiolün genel olarak 1nM, 10nM, 100nM olmak üzere artan dozları kullanılmaktadır. Östradiol muamelesi için gerekli *doz ve süre*; FSHD’de östrojen ile yapılmış tek çalışmada uygulanmış olan *doz ve süre* olarak literatürde yer alan (Teveroni ve ark., 2017) çalışmadan *10nM östradiol ve 72 saat* olarak belirlenmiş; yeterli yoğunluğa en erken ulaşılan 71yE hücre hattında bu doz ve süre uygulanmıştır.



Şekil 5.2. 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait hücrelerin östradiol uygulaması yapılan ve yapılmayan gruplardaki hücrelerin morfolojik görüntüleri . A: Kontrol grubu, B: 10 nM östradiol uygulaması (72 saat)

71 yaşındaki erkek FSHD hücre hatları, 10 nM E2 ile 72 saat muamele edildiğinde, tekrarlayan tüm deneylerde hücrelerin 4 saatten sonra morfolojilerinin bozulduğu, parlaklıklarını kaybederek renklerinin soluklaştığı ve canlılık oranının büyük ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Daha önce yapılmış östrojen-FSHD çalışması ile uyuşmayan bu hücre ölümünün, Teveroni ve arkadaşlarının miyoblast hücre hatları üzerinde değil; miyosite farklılaşma aşamasında östrojen uygulanmasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Karşılaşılan hücre kaybı nedeniyle östradiol uygulama süresinde değişikliğe gidilmiştir. Fare menşeyli iskelet kası kullanılarak yapılan bir östradiol çalışmasındaki (Berio ve ark., 2017) sürelerden yola çıkılarak hücrelerin canlılığını koruyabilmesi doğrultusunda a. kontrol grubu (östradiol yokluğunda), b. 10 nM östradiol ile 30 dakika muamele, c. 10 nM östradiol ile 4 saat muamele olmak üzere üç temel grup oluşturularak deneyler tekrar planlanmıştır.

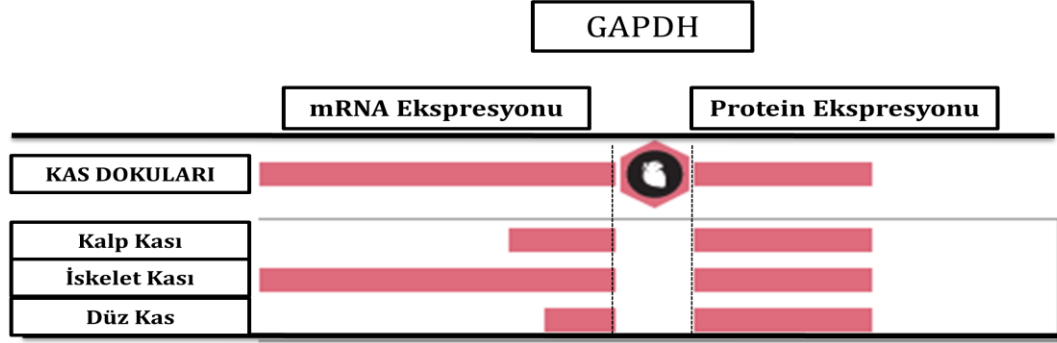
5.1. 58 Yaşındaki Kadın Hasta Örneğine ait Sonuçların Değerlendirilmesi

Erkek FSHD hastalarına ait miyoblastlarda; 71 ve 63 yaşındaki iki hücre hattında tutunma ve çoğalma başarı ile gerçekleştirilmiştir. Dişi FSHD hastalarına ait miyoblastlarda; 47 yaşındaki dişi FSHD hastasına ait hücrelerde tutunma ve çoğalma gerçekleşirken, 58 yaşındaki dişi FSHD hastasına ait hücrelerde tutunma düşük düzeyde gerçekleşmiş; ancak çoğalma gözlenmemiş ve hücre sayısı yeterli yoğunluğa ulaşmamıştır. Hücre kültürlerinde erkek FSHD hastalarında tutunma ve çoğalma süreleri yaklaşık 7-10 gün arasında gerçekleşmiş; bu sürenin 10-15 gün ile dişi hücre hattında daha uzun olduğu dikkati çekmiştir. Erkek hastalara ait hücre hatlarında tutunma ve çoğalma sürelerinin daha kısa sürmesi; erkek bireylerdeki yüksek testosteron düzeyi-testosteronun kas hücreleri üzerindeki hipertrofik etkisi sonucunda kas yoğunluğu ve proliferasyonunun dişi bireylerle kıyaslandığında daha fazla görülmesi şeklinde açıklanabilir (Herbst ve Bhasin, 2004). 17β -östradiolün ise miyoblast gelişimini arttırıcı bir özelliği yoktur (Kahlert ve ark., 1997). Bu bilgiler FSHD'nin kas tutulumuyla seyreden ve zamanla kas dokusunda kayıp ve atrofiye neden olan bir nöromusküler hastalık olması ve hasar sonrası kas rejenerasyonunun sağlıklı miyositlere kıyasla azalıyor olması bilgisi ile birleştiğinde; klinik şiddeti daha yüksek olan 58 yaşındaki kadın hastaya ait hücre kültüründeki tutunma ve proliferasyon azlığının nedeni açıklanabilmektedir.

5.2. 71 Yaşındaki Erkek Hasta Örneğine ait Sonuçların Değerlendirilmesi

5.2.1. GAPDH Bulgularının Tartışılması

GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) enzimi en sık kullanılan housekeeping gen ürünlerinden biri olarak bilinmektedir. Bir çalışmada kullanılacak housekeeping proteinin taşınması gereken temel özellikler (i) çalışılan hücre/doku grubunda ekspresyonunun olması (Şekil 5.3) ve (ii) ekspresyonunun dış faktörlerden etkilenmiyor olması olarak özetlenebilir. En sık kullanılan house keeping genler; hücre iskelet elemanları olan aktin ve tubulinler ile metabolik yolda glikolizde görev alan GAPDH genleridir.




Şekil 5.3. Kalp kası, iskelet kası ve düz kas dokularındaki GAPDH genine ait mRNA ve protein ekspresyonunun düzeyi (<https://www.proteinatlas.org/> sitesinden uyarlanmıştır. Erişim tarihi 13 Aralık 2018)

45 kDa ağırlığında olan DUX4 proteininin bu ağırlığa yakın olan housekeeping gen ürünlerinden β -aktin (~45 kDa) ile α -tubulin (~50 kDa) proteinleri ile çalışıldığında strip gerektirecek olması ancak 37 kDa ağırlığında olan GAPDH ile stripe gerek duyulmadan deneylerin gerçekleştirilebileceği bilgisinden yola çıkılmış, östradiol uygulanan fare C2C12 hücrelerinde yapılan bir çalışmada; GAPDH proteininin housekeeping gen ürünü olarak kullanılmış olması ve östradiol muamelesi sonucu herhangi bir düzey değişikliği sergilememiş (Ogawa ve ark., 2011) olması bilgisi ile desteklenerek ilk aşamada GAPDH proteini housekeeping protein olarak seçilmiştir. Yapılan ilk deneyde GAPDH proteininin miyoblast hücrelerinde eksprese olduğu gözlenmiş ancak östrojen muamelesi sonrası GAPDH'ın protein düzeyinde değişiklik oluşması ile tekrar literatür taramasına yönelilmiştir. İnsan miyoblast hücreleri üzerinde yapılmış hem östradiol hem de GAPDH'i içeren bir yayına erişilememiş; ancak meme kanseri hücre hattında (MCF7) östradiol muamelesi dozuna bağlı olarak GAPDH ekspresyonunun arttığı (Revillion ve ark., 2000), endometriumda östradiol muamelesi ile östrojen reseptörü ve GAPDH mRNA konsantrasyonlarının yükseldiği; karaciğerde ise düştüğü (Zou ve Ing, 1998) ve GAPDH'in 17- β östradiolün hedef bölgesi olduğu (Joe ve Ramirez, 2001) bilgilerini ortaya koyan çalışmalara erişilmiştir. Tüm bu çalışmalar ve çalışmamızda gözlenen östradiol ile GAPDH düzey değişikliği östrojenin GAPDH proteininin seviyelerini etkileyebileceğini ve farklı dokularda farklı sonuçlar oluşabileceğini göstererek çalışmamıza β -aktin housekeeping protein ile devam edilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur.

5.2.2. DUX4 Bulgularının Tartışılması

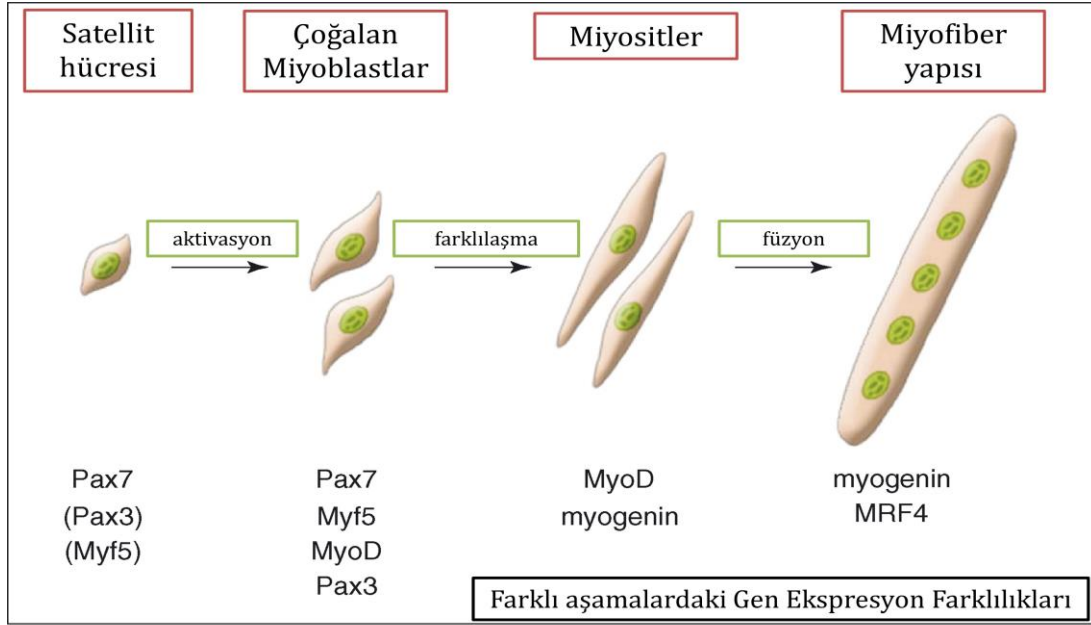
DUX4 transkripsiyon faktörü, embriyonik dönemde aktiftir ve erişkin dokularında sadece testiste ekspresyonu mevcuttur (Snider ve ark., 2010). Sağlıklı bireylerde iskelet kasında eksprese edilmemektedir (Şekil 5.4). FSHD’de ise erişkin bireyde iskelet kasında ekspresyonunun patolojik bir şekilde devam ettiği gösterilmiştir.

		DUX4	
		mRNA Ekspresyonu	Protein Ekspresyonu
KAS DOKULARI			N/A
Kalp Kası			N/A
İskelet Kası			N/A
Düz Kas			N/A

Şekil 5.4. Kalp kası, iskelet kası ve düz kas dokularındaki DUX4 genine ait mRNA ve protein ekspresyonunun düzeyi (<https://www.proteinatlas.org/> sitesinden uyarlanmıştır. Erişim tarihi 13 Aralık 2018)

Daha önce FSHD hücre hattında miyosite farklılaşma sürecinde östrojenle yapılmış olan çalışma ile DUX4 mRNA seviyesinin miyoblastta arttığı; östrojen maruziyeti sonrasında DUX4 mRNA düzeyinde bir değişiklik oluşmadığı ancak DUX4 transkripsiyon faktörünün hedef proteinlerinin (TRIM43 ve ZSCAN4 gibi) düzeylerinde azalma saptanmıştır (Teveroni ve ark., 2017). Çalışmamızda ise DUX4 seviyesinin östrojenden etkilendiği tespit edilmiş; 71 yaşındaki erkek FSHD hastasına ait miyoblast hücrelerinde DUX4 proteininin 30. dakikadaki hafif artış sonrasında 4. saatte sıfırlanacak düzeye indiği belirlenerek östrojen maruziyetinden etkilendiği gözlenmiştir. İki çalışma bulguları arasındaki çelişki; i) *miyoblast ve miyosit olarak farklı hücre tipi ve farklı besiyeri ögeleri kullanımı* (çalışmamızda miyoblastlar üzerinde deneyler gerçekleştirilirken diğer çalışmada miyoblasttan miyosite farklılaşma sürecinde deneyler gerçekleştirilmiştir), ii) *farklı östradiol maruziyet süreleri* (çalışmamızda hücre kaybı nedeniyle östradiol maruziyeti en çok 4 saat ile sınırlandırılmış diğer çalışmada ise 72 saat östradiol maruziyeti uygulanmıştır), iii) *bir çalışmada mRNA diğer çalışmada protein bakılması* farklılıkları ile açıklanabilir. Miyoblast ve miyosit hücrelerindeki

mevcut protein ekspresyon paternleri ve miyoblasttan miyosite farklılaşma sürecindeki ekspresyon paternleri birbirinden farklılık göstermektedir (Le Grand ve Rudnicki, 2007) (Şekil 5.5). Bu iki hücre epigenetik düzeyde farklı özelliklere sahip olduğundan, bu farklılık; DUX4 düzeyinde östradiole yanıt değişkenliğini bir ölçüde açıklayabilmektedir.

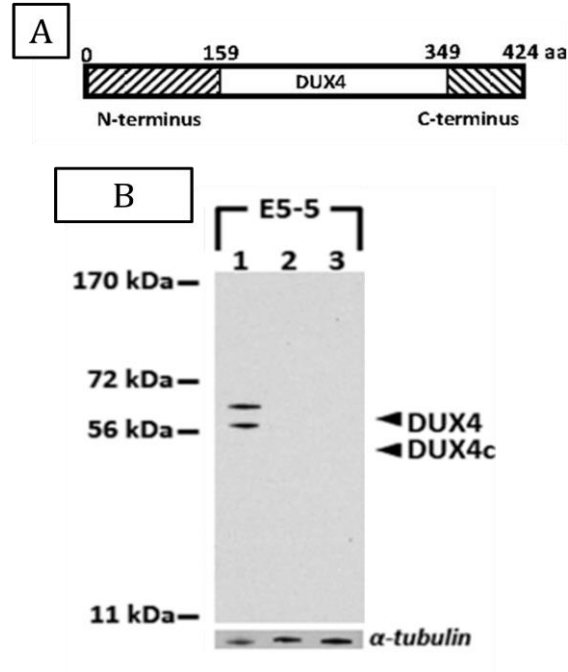


Şekil 5.5. Satellit hücresinden miyoblast-miyosit-miyofiber yapısı oluşum sürecinde eksprese olan genlerin şeması (Le Grand ve Rudnicki, 2007).

İki çalışma arasındaki bir diğer farklılık olan DUX4 düzeylerinin mRNA ve protein olarak incelendiği bilgisi; FSHD patofizyolojisinde bilinen miRNA ekspresyon profili değişimleri (Snider ve ark., 2009; Colangelo ve ark., 2014; Portilho ve ark., 2015) ile birlikte değerlendirildiğinde östrojenin bu miRNA'ların sentez veya aktivitesini etkileyerek; DUX4 mRNA'sından protein sentezini DUX4 mRNA düzeyini değiştirmeden DUX4 protein düzeyinin azalmasını sağlıyabileceğini akla getirmiştir.

Elde edilen sonuçlar içinde bir diğer ilginç nokta; 71 yaşındaki FSHD bireyine ait elde edilmiş olan bulgulardan birinde 30. dakikada elde edilen DUX4 bandının daha aşağıda yer alması ve 4. saatte belirgin şekilde ortaya çıkan *çift bant* görüntüsü olmuştur. Bu görüntü daha kısa olabilecek bir splice formu akla getirmiştir. DUX4'ün bugüne kadar tanımlanmış iki temel protein formu mevcuttur; DUX4-full length(fl) olarak tanımlanan

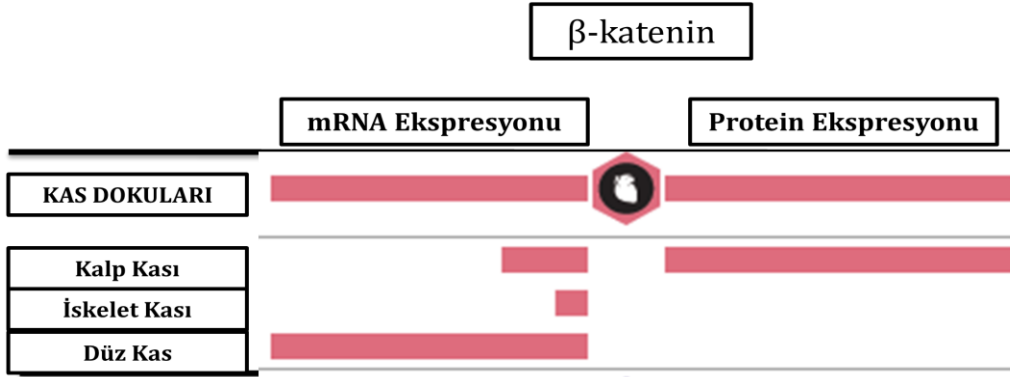
uzun formu 52 kDa ağırlığında, D4Z4 dizisine 42 kilobaz uzaklıkta olan DUX4c veya DUX4s olarak tanımlanan kısa formu ise 47 kDa ağırlığındadır (Ansseau ve ark., 2009). DUX4c; DUX4'ün C-terminalinde yer alan son 82 aminoasitin yerine farklı bir 32 aminoasit dizisi içermektedir. İkinci bant daha kısa form olan DUX4c'ye ait olabileceği olasılığını akla getirir de; bu çalışmada kullanılan antikor DUX4'ün uzun formuna spesifiktir ve DUX4c'yi tanımamaktadır. Bu spesifik DUX4 antikorunu üretilirken; DUX4c ile farklılık gösteren DUX4'ün C-terminalindeki 349.-424. aminoasitler arasındaki 76 aminoasitlik bölgeye göre dizayn edilmiştir (Şekil 5.6A). Daha sonra DUX4 ve DUX4c vektörü ile transfekte edilen fare hücrelerinde bu antikor denenmiş ve sadece DUX4'e bağlandığı; DUX4c'ye bağlanmadığı gösterilmiştir (Şekil 5.6B). Bu nedenle; görülen ikinci bant için DUX4c'den bahsedilemez. Görülen bant çifleşmesinin zamansal olarak kısa bir kesit anında degradasyon sebebiyle oluşabileceği düşünülebilir.



Şekil 5.6. Kullanılan DUX4 “E5-5” antikorunun özellikleri **A)** “E5-5” antikorunun dizayn etmek için kullanılan antijen 349-424 numaralı aminoasit dizilimini kapsayan 76 aminoasitlik bölge kullanılarak elde edilmiştir. Bu antikor DUX4c formunu tanımamaktadır (Geng ve ark., 2011). **B)** DUX4 “E5-5” antikorunun western blot üzerinde test edilmesi ile ilgili sonuç resmi. 1 numaralı kuyucukta DUX4 vektörü ile transfekte edilmiş C2C12 fare hücreleri, 2 numaralı kuyucukta transfeksiyon yapılmayan C2C12 fare hücreleri, 3 numaralı kuyucukta DUX4c vektörü ile transfekte edilmiş C2C12 fare hücreleri yer almaktadır. (Geng ve ark., 2011).

5.2.3. β - katenin Bulgularının Tartışılması

Hem DUX4 hem de β -katenin embriyolojik dönemde aktif olduğu bilinen transkripsiyon faktörleridir. Sağlıklı erişkin bireylerin iskelet kasında DUX4'ün *mRNA*'sı ve *proteini* eksprese edilmemekte, FSHD iskelet kası hücrelerinde ise hem *mRNA*'sı hem de *proteini* eksprese edilmektedir. Bu bakış açısıyla incelendiğinde sağlıklı bir erişkinde β -kateninin *mRNA*'sı ise en yüksek oranda düz kasta olmak üzere; kalp kası ve iskelet kasını içeren tüm kas dokularında mevcutken; β -katenin *proteini* sağlıklı iskelet kasında ekspresyon göstermez (Şekil 5.7).



Şekil 5.7. Kalp kası, iskelet kası ve düz kas dokularındaki β -katenin genine ait mRNA ve protein ekspresyonunun düzeyi (<https://www.proteinatlas.org/> sitesinden uyarlanmıştır. Erişim tarihi 13 Aralık 2018)

DUX4'ün hem mRNA hem de proteininin sağlıklı iskelet kasında yokluğu; β -kateninin ise mRNA'sı mevcutken proteininin yokluğu noktasında DUX4 ve β -katenin birbirinden ayrılmakta bu veri β -katenin mRNA'sının DUX4'ten farklı olarak sağlıklı erişkin bireylerde kas sisteminde fonksiyonel olduğuna işaret etmektedir.

71yE'e ait örnekte östradiol muamelesi ile, β -katenin düzeyinde sonuç olarak artış belirlenmiş olsa da ilk sonuçta gözlenen β -katenin düzeyi azalışı soru işareti uyandırmıştır. Ancak azalışa ait sonuç housekeeping proteini içermediğinden anlamlı kabul edilmemiştir. Sonuç olarak, bu örneğe ait hücre hattında östradiol muamelesi β -kateninin artışına sebep olmuştur.

5.2.4. PAX3/7 Bulgularının Tartışılması

71yE örneğinde 80 kDa, 56 kDa ve 45 kDa olmak üzere belirlenen üç farklı bant büyüklüğü bu hücre hattında farklı PAX3 ve PAX7 splice formlarının eksprese olabileceğini düşündürmüştür.

PAX3 proteinini kodlayan gen 10 exondan meydana gelmektedir. PAX3 mRNA'sının kırılması (splicing) işlemi sonucunda farklı uzunluk ve kDa ağırlıklarında varyant formları oluşmaktadır. Bilinen varyant sayısı bugün için sekiz tanedir (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. PAX3 protein varyantları (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000135903-PAX3/cell> adresinden alınmıştır. Erişim Tarihi: 13 Aralık 2018)

PAX3 varyantları	PAX3-001	PAX3-002	PAX3-003	PAX3-004	PAX3-005	PAX3-006	PAX3-008	PAX3-009
uzunluk (aminoasit sayısı)	403	407	206	484	215	479	505	483
ağırlık (kDa)	44,8	45,2	22,7	53,5	24,1	53	56	53,3

PAX7 proteinini kodlayan gen ise; 9 exondan meydana gelmektedir. PAX7 proteinin PAX3'e kıyasla daha az varyantı mevcuttur; birbirine yakın boyutlarda üç adet varyant içermektedir (Tablo 5.2).

Tablo 5.2. PAX7 protein varyantları (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000009709-PAX7/cell> adresinden alınmıştır. Erişim Tarihi: 13 Aralık 2018)

PAX7 varyantları	PAX7-001	PAX7-002	PAX7-003
uzunluk (aminoasit sayısı)	520	505	518
ağırlık (kDa)	56,9	55,1	56,7

Her bir varyant için ayrı bir antikor kullanımı mümkün olmadığından; tüm PAX3 ve PAX7 proteinlerine bağlanabilen ortak antikor kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir (Tablo 5.1 ve Tablo 5.2).

71yE örneğinde, 56 kDa olan formun östradiol muamelesi sonrası 4.saatte ekspresyonu gözlenebilmiştir. Bu bulgu PAX3/7'nin DUX4 ile yarışmalı olarak fonksiyon gördüğü bilgisi (Bosnakovski ve ark., 2017) ile uyumlu olan formun 56 kDa'luk form olabileceğini düşündürmüştür, çünkü 56 kDa'luk form, elde edilen DUX4 sonucuyla birebir zıt bir görüntü sergilemiştir. Hem PAX3 hem de PAX7'nin 56 kDa splice formları bulunduğu için; 56 kDa bandının PAX3 ve PAX7'den hangisine ait olduğu belirlenememiştir; bu ayırım sadece PAX3 ve PAX7'nin ayrı antikorlarla çalışılması sonucunda elde edilebilecektir.

80 kDa form ve 45 kDa form ise; DUX4'e benzer seyir göstererek östradiol etkisi ile azalarak sıfırlanmıştır. 45 kDa'luk bir PAX7 formu bulunmadığından, bu formun PAX3'e ait olduğu düşünülmüştür. Bilinen 80 kDa'luk bir PAX formu ise bulunmamaktadır. Bu nedenle bu form için PAX3 veya PAX7'ye atıf yapılamamıştır. Elde edilen bu bandın non-spesifik bir bant olabileceği düşünülmele beraber bu sonuç 71yE hücre hattında eksprese olan patolojik bir varyant olasılığını akla getirmiştir. Bu bandın 80 kDa'luk bir PAX formu olduğunun söylenebilmesi için mRNA düzeyinde varlığının gösterilmesi gerekmektedir.

5.2.5. DUX4, β -katenin, PAX3/7 Bulgularının Birbirlerine göre Durumlarının Tartışılması

İncelenen farklı proteinlerin östradiole verdikleri yanıtlar birbiriyle karşılaştırıldığında; DUX4, PAX3/7 80 kDa ve 45 kDa, GAPDH ekspresyonlarının aynı şekilde azalma profili gösterdiği; PAX3/7'nin 56 kDa formunun ve 4 saatin sonundaki β -katenin yanıtının bu proteinlere tam zıt şekilde artış gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 5.3).

Tablo 5.3. 71 yaşındaki erkek hasta örneğinde elde edilen DUX4, β -katenin, PAX3/7, GAPDH sonuçlarında görülen düzey değişikliklerini özetleyen tablo. "K-30 dk"; kontrol ile 30 dakika arasındaki değişim yönünü, "30 dk-4 sa"; 30 dakika ile 4 saat arasındaki değişim yönünü, "K- 4 saat"; kontrol ile 4 saat arasındaki değişim yönünü göstermektedir. (0,1'in altındaki değişimler "0" olarak, hiçbir değişiklik olmamış ise "0" olarak belirtilmiştir.)

	DUX4	β -katenin	PAX3/7			GAPDH
			80kDa	56 kDa	45 kDa	
K-30 dk	▲/0	▲	▲/0	0	▼	▲/0
30 dk-4 sa	▼	▼/0	▼	▲	▼	▼
K-4 sa	▼	▲	▼	▲	▼	▼

Bu tablo 71yE örneğinde; östradiol muamelesi ile baskılanarak etkinliği azalan DUX4, 80 kDa ve 45 kDa PAX3/7 formları ile GAPDH'in patolojik etkileri olabileceğine işaret etmekte; östradiol muamelesi ile miktarı artarak tam zıt yönde yanıt veren 56 kDa PAX3/7 formu ve β -kateninin ise koruyucu etkilerinin söz konusu olabileceğine işaret etmektedir.

Elde edilen tüm bu sonuçlar; DUX4; β -katenin ve PAX3/7 transkripsiyon faktörlerinin aynı hücrede eksprese olduğu anlamına gelmemektedir. FSHD hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada DUX4; PAX3 ve PAX7'nin farklılaşan miyoblast hücrelerinde uzamsal olarak farklı ekspresyon paternlerinin olduğu; çok nadiren aynı hücrede birlikte eksprese oldukları ortaya konulmuştur (Haynes ve ark., 2017). Bu bilgi FSHD üzerinde yapılan hücre kültürü çalışmalarında, hücre düzeyinde genetik bir heterojenite varlığına işaret etmektedir. İskelet kası gelişiminde innervasyon ve çevre dokulardan gelen sinyaller önem taşımaktadır (Demestre ve ark., 2015). Pluripotent kök hücrelerden elde edilen iskelet kası hücreleri ile yapılmış bir çalışmada hem distrofik hem de distrofik olmayan farelere kök hücrelerin aktarımı yapıldığında, eksprese edilen miyozin formları değişim göstererek erişkin dönem miyozin formlarına dönüşmüştür. Bu bilgilere göre kas hücrelerinin dinamik bir süreç içerisinde, farklı kesit anlarında, farklı epigenetik regülasyonların etkisi altında oldukları söylenebilir.

5.3. 63 Yaşındaki Erkek Hasta Örneğine ait Sonuçların Değerlendirilmesi

5.3.1. DUX4 Bulgularının Tartışılması

DUX4; FSHD miyoblast çekirdeklerinin tümünde eksprese olmamakta her 1000 çekirdekten 1 tanesinde eksprese olmaktadır (Snider ve ark., 2010; Tassin ve ark., 2013) ve çok düşük ekspresyon düzeyi nedeniyle her FSHD hasta örneğinde tespit edilememektedir (Bosnakovski ve ark., 2017). Bu çalışmada da 63yE örneğinde housekeeping protein varlığında DUX4 proteininin tespit edilememesi literatür bilgisi ile birlikte değerlendirildiğinde bu vaka örneğinde DUX4 ekspresyonunun olmadığı veya çok düşük düzeyde olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

5.3.2. β -katenin Bulgularının Tartışılması

63yE örneğinde östradiol maruziyeti ile artan β -katenin düzeyleri; bu protein ekspresyonunun östradiol ile aktive olduğuna işaret etmektedir.

5.3.3. PAX3/7 Bulgularının Tartışılması

63yE örneğinde elde edilen tek bant; 45 kDa'luk PAX3/7 bandı olmuştur. PAX3'nin mevcut 3 izoformu da ~56 kDa ağırlığındadır Bu nedenle 45 kDa'luk form PAX3'e ait görünmektedir. PAX3'ün ~45 kDa ağırlığında olan iki izoformu mevcut olduğu için (Tablo 5.1), bu iki formdan herhangi biri ya da her ikisi bu bant görünümünden sorumlu olabilir.

İlginç olarak, 63yE olan bu örnekte; 71yE ve 47yK örneklerinde östradiol muamelesi ile tespit edilenin azalmanın aksine 45 kDa'luk formunda artma gözlenmiştir. ~45 kDa ağırlığında olan iki farklı PAX3 varyant formunun varlığı; farklı bireylerde farklı ekspresyon ve östradiol yanıtılığının oluşabileceğini akla getirmiştir.

5.3.4. β -katenin, PAX3/7 Sonuçlarının Birbirlerine göre Durumlarının Tartışılması

63yE örneğinde, β -katenin ve PAX3/7 östradiol muamelesine artarak yanıt vermiştir (Tablo 5.4). Östrojen varlığında β -katenin ve PAX3/7 ekspresyonunun artışı, östrojenin kas hücreleri üzerinde koruyucu olabileceği hipotezimizi desteklemektedir.

Tablo 5.4. 63 yaşındaki erkek hasta örneğinde elde edilen β -katenin, PAX3/7 sonuçlarında görülen düzey değişiklikleri özetleyen tablo. "K-30 dk"; kontrol ile 30 dakika arasındaki değişim yönünü, "30 dk-4 sa"; 30 dakika ile 4 saat arasındaki değişim yönünü, "K- 4 saat"; kontrol ile 4 saat arasındaki değişim yönünü göstermektedir. (0,1'in altındaki değişimler "/0" olarak belirtilmiştir.)

	β -katenin	PAX3/7 45 kDa
K-30 dk	▲	▲/0
30 dk-4 sa	▲	▲
K-4 sa	▲	▲

5.4. 47 Yaşındaki Kadın Hasta Örneğine ait Sonuçların Değerlendirilmesi

5.4.1. DUX4 Bulgularının Tartışılması

63yE vaka örneğinde olduğu gibi; 47yK örneğinde de housekeeping gen ürünü β -aktin proteini varlığında DUX4 tespit edilememiş; aynı şekilde bu vaka örneğinde DUX4 ekspresyonunun olmadığı veya çok düşük düzeyde olduğu düşünülmüştür.

Bu hastanın, klinik şiddetinin çok düşük (CSS skoru=1) olması ve bazal östrojen düzeyinin erkeklere kıyasla yüksek olması; DUX4 ekspresyonunun baskılanmasını açıklayabilir.

5.4.2. β -katenin Bulgularının Tartışılması

47yK örneğinde östradiol maruziyeti ile artan β -katenin düzeyleri; bu protein ekspresyonunun östradiol ile aktive olduğuna işaret etmektedir. Bu bulgu, diğer hücre hatlarında elde edilen β -katenin bulguları ile uyumlu niteliktedir.

5.4.3. PAX3/7 Bulgularının Tartışılması

47yK örneğinde elde edilen tek bant; 45 kDa'luk PAX3/7 bandı olmuştur. 47yK örneklerinde östradiol muamelesi ile 45 kDa'luk PAX3/7 formunun azaldığı gözlenmiştir. Bu varyantta görülen azalma; 80 kDa varyantında olduğu gibi patolojik bir varyantı akla getirmiştir ancak aynı azalmanın 45 kDa'luk PAX3/7 formunun mRNA düzeyine bakılarak elde edilmesi gerekmektedir.

5.4.4. β -katenin, PAX3/7 Sonuçlarının Birbirlerine göre Durumlarının Tartışılması

47yK örneğinde, β -katenin östradiol muamelesine artarak ve PAX3/7 ise azalarak yanıt vermiştir (Tablo 5.5). Bu vakada β -katenin ve PAX3/7'nin ters yönlerde olan yanıtı; bu iki transkripsiyon faktörünün tam ters etki oluşturduğunu düşündürmüştür.

Tablo 5.5. 47 yaşındaki kadın hasta örneğinde elde edilen β -katenin, PAX3/7 sonuçlarında görülen düzey değişiklikleri özetleyen tablo. "K-30 dk"; kontrol ile 30 dakika arasındaki değişim yönünü, "30 dk-4 sa"; 30 dakika ile 4 saat arasındaki değişim yönünü, "K- 4 saat"; kontrol ile 4 saat arasındaki değişim yönünü göstermektedir. (0,1'in altındaki değişimler "/0" olarak belirtilmiştir.)

	β -katenin	PAX3/7 45 kDa
K-30 dk	▲	▼/0
30 dk-4 sa	▲	▼
K-4 sa	▲	▼

5.5. 71yE, 63yE, 47yK Örneklerinden Elde Edilen Bulguların Karşılaştırılması

5.5.1. DUX4 Bulgularının Karşılaştırılarak Tartışılması

Tek faktör olmasa da DUX4 ekspresyonu, FSHD hastalığının klinik şiddeti ile ilişkili faktörlerden birisidir. Protein izolasyonunu başarıyla gerçekleştirebildiğimiz 3 hücre hattından; klinik şiddet skoru 8 olan 71 yaşındaki erkek hasta örneğinde DUX4 ekspresyonu belirlenmiş; ancak klinik şiddet skoru 6 olan 63 yaşındaki diğer erkek bireyde ve klinik şiddet skoru 1 olan dişi bireyde DUX4 ekspresyonu belirlenememiştir.

Bu bulgu; DUX4'ün düzeyinin klinik şiddetle ilişkili olabileceği bilgisini destekler nitelikte bir bulgudur.

Östrojen düzeyi; menapoz öncesi kadınlarda; menapoz sonrası kadınlara ve erkeklere göre daha yüksek seyretmekte ve yaş ile azalmaktadır. 47yK ve daha genç 63yE(71yE örneğine göre) örneğinde, bu yaş ve cinsiyet faktörleri nedeniyle, DUX4 ekspresyonu yokluğu; östrojen etkisiyle DUX4 miktarının baskılanmış olabileceği gerekçesi ile açıklanabilir. Ancak, böyle bir ilişkiden söz edebilmek için; hücre hattı alınan bireylerin biyopsi anındaki serum östrojen düzeylerinin de bilinmesi gerekmektedir.

Yüz ve vücut kaslarının oluşumu ve gelişimi aşamasında farklılıklar mevcuttur (Wigmore ve Evans, 2002) bu nedenle farklı kas grupları farklı gen ekspresyon paternleri gösterebilmektedir. Sıçanlarla yapılan bir çalışmada ekstensor digitorum longus ve soleus kaslarının PAX3 ve PAX7 düzeyleri incelenmiş; bu iki farklı kas grubunda birbirine yakın PAX3 mRNA düzeyleri tespit edilirken, birbirinden farklı PAX7 mRNA düzeyleri tespit edilmiştir (Brzoska ve ark., 2009). Klinik olarak FSHD'de tutulum genelde yüz ve üst ekstremitelerden başlamakta; daha sonra alt ekstremitelere ilerlemektedir. Yani bir FSHD hastasında belirli bir zaman dilimi kesitinde farklı kas gruplarında hastalığın şiddeti farklı seyretmektedir. 71 yaşındaki erkek örneğinde deltoid kasından biyopsi alınmış olması, diğer bireylerde ise örnekleme vastus lateralisten yapılmış olması ile bu literatür bilgileri birleştirildiğinde; DUX4 ekspresyonunun sadece 71 yaşındaki erkek örneğinde gösterilmesinin bir diğer açıklaması olarak göze çarpmaktadır.

5.5.2. β -katenin Bulgularının Karşılaştırılarak Tartışılması

FSHD hastalarında görülen patolojik DUX4 ekspresyonuna benzer şekilde, patolojik β -katenin ekspresyonunun olabileceği ön hipotezi ile yapılan çalışmamızda; östrojen verilmeyen kontrol hücreleri dahil 71yE, 63yE ve 47yK 'a ait tüm kontrol örneklerinde β -katenin proteini tespit edilmiş ve hipotezle uyumlu olarak distrofik FSHD hücrelerinde DUX4 proteini gibi β -katenin protein pozitifliği olduğu ortaya konmuştur.

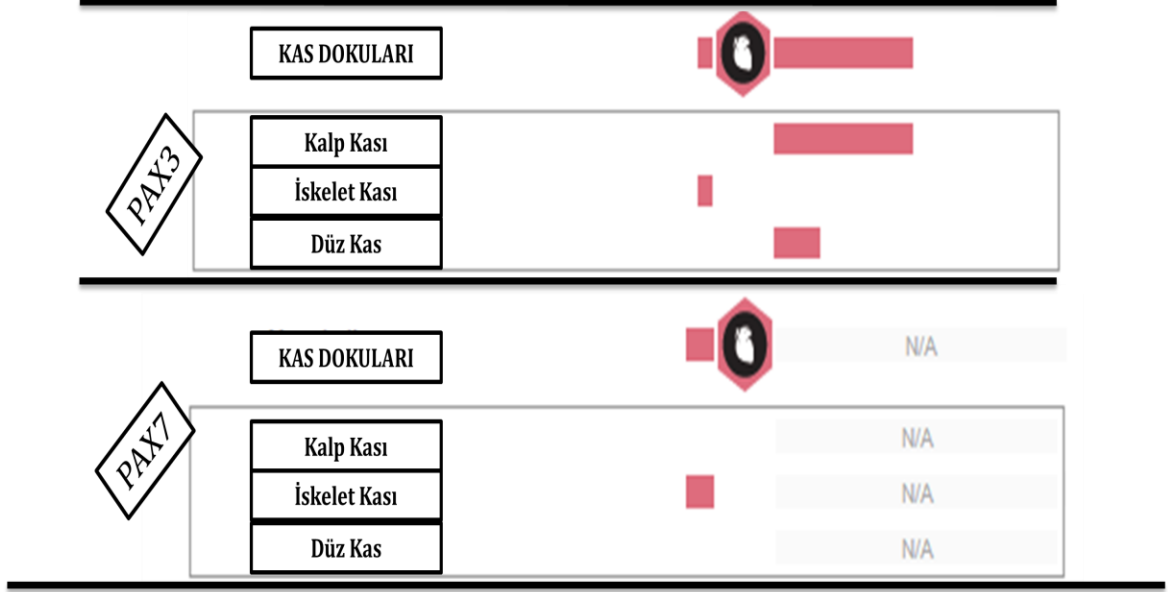
Wnt ligandı veya Wnt reseptörlerinde oluşan mutasyonların; FSHD'de de rastlanabilen periferik vasküler retinopatiye sebep olması (Fitzsimons, 2011) FSHD'de Wnt/ β -katenin

sinyalizasyonunu öne çıkarmıştır. FSHD’de β -katenin üzerine yapılmış dört ana çalışma mevcuttur. İlk çalışma 2013 yılında primer insan miyoblastlarında gerçekleştirilmiş, Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu aktive edildiğinde hem FSHD1 hem FSHD2 örneklerinde DUX4 transkripsiyonunun baskılandığı, β -katenin/Wnt3a/Wnt9b’den herhangi birinin mRNA’sı baskılandığında ise DUX4 aktivasyonu ile buna bağlı apoptozisin arttığı sonucu elde edilmiştir (Block ve ark., 2013). Bu çalışma FSHD’de DUX4 ve β -kateninin ters yönlü fonksiyon gördüğünü ortaya koymaktadır. Hemen ardından 2014 yılında C2C12 farede miyoblastlarında yapılan çalışmada DUX4’ün Wnt/ β -katenin sinyal yolak işleyişini bozduğu gösterilmiştir (C. R. Banerji ve ark., 2015). 2016’da insan periferel kanındaki mononükleer hücrelerde yapılan bir başka çalışmada ise kontrol grubuna göre β -kateninin hem sitozolik hem nükleer fraksiyonunda anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (Giacoppo ve ark., 2016). Bu azalmanın Wnt1 aracılı olmadığı gösterilmiştir. 2018’de insan primer miyoblastlarında yapılan dördüncü çalışmada ise; DUX4- β -katenin ilişkisi üzerine bir veri sunulmamış; DUX4c’nin β -katenin protein miktarını arttırdığı ve β -kateninin nükleer bölgede birikimine sebep olduğu ortaya konmuştur (Vanderplanck ve ark., 2018).

β -katenin ile yapılan bu dört çalışma ile, FSHD’de β -kateninin düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada östrojen muamelesinin tüm örneklerde β -katenin düzeyini zamanla arttırdığının gösterilmesi, östrojenin FSHD’de koruyucu olduğu hipotezini desteklemektedir.

5.5.3. PAX3/7 Bulgularının Karşılaştırılarak Tartışılması

PAX3 ve PAX7 ekspresyonu farklılaşmamış kas hücreleri ile sınırlıdır ve farklılaşmanın ileri aşamalarından itibaren hem PAX3 hem PAX7 ekspresyonu olmamaktadır (Brzoska ve ark., 2009) (Şekil 5.7).



Şekil 5.8. Kalp kası, iskelet kası ve düz kas dokularındaki PAX3 ve PAX7 genlerine ait mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri (<https://www.proteinatlas.org/> sitesine girilerek elde edilen görüntülerin birleştirilmesi ile çizilmiştir. Erişim tarihi 13 Aralık 2018)

İlginç olarak 80 ve 56 kDa'luk PAX3/7 formları sadece 71yE örneğinde gözlenmiş; yine sadece 71yE örneğinde gözlenmiş olan DUX4 proteini ile muhtemel bir etkileşimi akla getirmiştir.

45 kDa'luk PAX3/7 formu ise 71yE ve 47yK örneğinde azalırken; ilginç bir şekilde 63yE örneğinde artışla seyretmiştir. Bu noktada östrojenin 63yE örneğinde farklı bir etki oluşturduğu akla gelmiştir. Östrojen etkisini, ER- α ve ER- β olarak adlandırılan iki farklı östrojen reseptörü ile gerçekleştirmektedir. Ortamda 17 β -östradiol veya diğer östrojen ligandları var ise; bu reseptörlerle bağlanarak çekirdeğe göç etmekte, DNA üzerinde ERE(estrogen response element) adı verilen belirli DNA dizilerine bağlanarak gen ekspresyonunu sağlamaktadır (C. M. Klinge, 2000). Daha önce yapılan bir çalışmada FSHD miyoblast hücrelerinde eksprese olan östrojen reseptörünün ER- β olduğu, ER- α 'nın eksprese edilmediği gösterilmiştir (Teveroni ve ark., 2017). ER- β ve ERE etkileşimi her hücre için farklılık göstermektedir. Çünkü ERE dizisinde yer alan varyasyonlar ER- β 'nin bağlanmasını ve oluşturduğu transkripsiyonel aktivasyonu etkilemektedir (C. M. Klinge, 2001). 63yE örneğinde ERE dizisinde yer alabilecek muhtemel bir farklılık; bu örnekteki artan 45 kDa'luk PAX3/7 bulgusunu açıklayabilir.

Kök hücreler üzerine yapılan bir çalışmada DNA metilasyonunun tüm genom profili çalışılmış; her bir hücrede DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve gen ekspresyonu profillerinin farklı olduğu ortaya konmuştur (Lister ve ark., 2011). Bu bilgi göz önüne alındığında; farklı bireylere ait hücre hatlarının kullanılması ve farklı pasajlama sürelerinde deneylerin yapılmış olması dahi hücreler üzerindeki epigenetik imzanın farklı olmasına sebep olabilecek ve 45 kDa PAX3/7 bulgusundaki gibi farklı gen ekspresyonları ile sonuçlanabilecektir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada kadın ve erkek FSHD hastaları arasındaki klinik farklılık gözleminden yola çıkılarak östrojenin koruyucu rolü araştırılmış; gelecek nesiller için FSHD tedavisine katkıda bulunabilmek amaçlanmıştır.

Çalışmadaki FSHD örneklerinden elde edilen bulgular bir araya getirildiğinde; cinsiyete göre östradiole verilen protein yanıtlarının yönü açısından farklılık gözlenmemiştir. Östradiol muamelesi ile proteinlerin gösterdikleri değişimler incelendiğinde; DUX4 proteini, GAPDH proteini ve 80 ve 45 kDa'luk PAX3/7 proteinlerinin düzeylerinde azalma, β -katenin, 56 ve 45 kDa 'luk PAX3/7 proteinlerinin düzeylerinde ise artış gözlenmiştir. DUX4 proteini, 80 ve 56 kDa 'luk PAX3/7 proteinleri sadece klinik şiddeti en yüksek olan 71yE örneğinde tespit edilmiş; östradiol ile düzeyleri azalarak sıfırlanmıştır (Tablo 6.1).

Tablo 6.1. 71, 63, 47 yaşındaki hasta örneklerinde elde edilen DUX4, β -katenin, PAX3/7, GAPDH'e ait tüm sonuçlarda görülen düzey değişikliklerinin birleştirildiği tablo. (0,1'in altındaki değişimler "/0" olarak, hiçbir değişiklik olmamış ise "0" olarak belirtilmiştir.)

	DUX4	β -katenin			PAX3/7			GAPDH		
	(45 kDa)	(92 kDa)			(80 kDa)	(56 kDa)	(45 kDa)	(45 kDa)	(45 kDa)	31,5 (kDa)
	71yE	71yE	63yE	47yK	71yE	71yE	71yE	63yE	47yK	71yE
K-30 dk	▲/0	▲	▲	▲	▲	0	▼	▲	▼	▲/0
30 dk-4 sa	▼	▼	▲	▲	▼	▲	▼	▲	▼	▼
K-4 sa	▼	▲	▲	▲	▼	▲	▼	▲	▼	▼

Literatürde ilk defa tespit edilmiş olan veriler olarak; i) patolojik kabul edilen DUX4 düzeyini azaltması ve buna tam zıt yönde seyreden ii) β -katenin ve PAX3/7(56 kDa) transkripsiyon faktörlerini arttırması, östradiolün FSHD üzerindeki koruyucu bir etkisi olduğu hipotezini desteklemektedir. Östrojenin FSHD üzerindeki etkisini gösterebilmek amacıyla gerçekleştirdiğimiz bir önceki klinik çalışmamızda, kandaki hormon değerlerinin (özellikle östrojenin) klinik şiddet ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Hangul, Ozsoy ve ark., 2017). Yaptığımız bu çalışmalar ile beraber östrojenin FSHD'de koruyucu olduğunu ortaya koyan literatürdeki klinik ve moleküler çalışmalar;

patofizyolojisi tamamen aydınlatılmayan ve bu nedenle uygulanabilir bir tedavi geliştirilemeyen FSHD'de östrojen tedavisine yönlendirilmesine sebep olmuştur. Ancak yaptığımız klinik çalışmamızda (Hangul, Ozsoy ve ark., 2017; Hangul, Uysal ve ark., 2017), birkaç FSHD vakasında yüksek fibrinojen düzeyi tespit edilmiştir. Bu fibrinojen yüksekliği östrojen tedavisinin halihazırda var olan tromboemboli yan etki riskinin FSHD hastalarında daha yüksek olabileceğine işaret etmiştir. Bu nedenle FSHD hastalarında östrojen tedavisine dikkatle yaklaşılmalıdır. Tromboemboli ve diğer östrojen tedavi risklerini azaltmak amacıyla fito-östrojenler tedavide denenebilir. Nitekim çok yakın bir zamanda fito-östrojen olan genistein, daidzein, biochanin A gibi ER- α agonistleri ile yapılan in vitro bir çalışmada; bu ajanların hipotrofik FSHD fenotipini düzelttiği gösterilmiştir (Christopher RS Banerji ve ark., 2018). Fakat bu güne kadar yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalar, östradiolün FSHD patofizyolojisi üzerindeki moleküler ve klinik etkisini tam olarak gösterebilmek için yeterli olmayıp ilave olarak;

- Kişiler arası varyasyonları da göz önüne aldığımızda; östrojenin farklı reseptörlerinin
- Östron ve fito-östrojenler gibi östrojenin farklı metabolik etki yaratan formlarının
- β -katenin ile birlikte her bir Wnt yolağının
- PAX3/7 varyanlarının FSHD'deki rolünün
- mRNA ve protein düzeyleri ile beraber, mRNA ve protein bağlantısının sağlanabilmesi için östradiol maruziyeti ile değişen miRNA profillerinin incelenmesi ile konunun daha iyi aydınlatılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Abu-Baker, A., Laganieri, J., Gaudet, R., Rochefort, D., Brais, B., Neri, C. Lithium chloride attenuates cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy by perturbing wnt/beta-catenin pathway. *Cell Death Dis.* 2013; 4: e821.

Anseau, E., Laoudj-Chenivesse, D., Marcowycz, A., Tassin, A., Vanderplanck, C., Sauvage, S. Dux4c is up-regulated in fshd. It induces the myf5 protein and human myoblast proliferation. *PLoS One.* 2009; 4 (10): e7482.

Arashiro, P., Eisenberg, I., Kho, A. T., Cerqueira, A. M., Canovas, M., Silva, H. C. Transcriptional regulation differs in affected facioscapulohumeral muscular dystrophy patients compared to asymptomatic related carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106 (15): 6220-6225.

Balatsouras, D. G., Korres, S., Manta, P., Panousopoulou, A., & Vassilopoulos, D. Cochlear function in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Otol Neurotol.* 2007; 28 (1): 7-10.

Banerji, C. R., Knopp, P., Moyle, L. A., Severini, S., Orrell, R. W., Teschendorff, A. E. Beta-catenin is central to dux4-driven network rewiring in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J R Soc Interface.* 2015; 12 (102): 20140797.

Banerji, C. R., Panamarova, M., Pruller, J., Figeac, N., Hebaishi, H., Fidanis, E. Dynamic transcriptomic analysis reveals suppression of *pgc1 α /err α* drives perturbed myogenesis in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2018.

Banerji, C. R. S., Panamarova, M., Hebaishi, H., White, R. B., Relaix, F., Severini, S. Pax7 target genes are globally repressed in facioscapulohumeral muscular dystrophy skeletal muscle. *Nat Commun.* 2017; 8 (1): 2152.

Bartel, D. P. Micrnas: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116 (2): 281-297.

Berio, E., Divari, S., Starvaggi Cucuzza, L., Biolatti, B., & Cannizzo, F. T. 17beta-estradiol upregulates oxytocin and the oxytocin receptor in c2c12 myotubes. *PeerJ*. 2017; 5: e3124.

Berkes, C. A., & Tapscott, S. J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2005; 16 (4-5): 585-595.

Block, G. J., Narayanan, D., Amell, A. M., Petek, L. M., Davidson, K. C., Bird, T. D. Wnt/beta-catenin signaling suppresses dux4 expression and prevents apoptosis of fshd muscle cells. *Hum Mol Genet*. 2013; 22 (23): 4661-4672.

Bosnakovski, D., Lamb, S., Simsek, T., Xu, Z., Belayew, A., Perlingeiro, R. Dux4c, an fshd candidate gene, interferes with myogenic regulators and abolishes myoblast differentiation. *Exp Neurol*. 2008; 214 (1): 87-96.

Bosnakovski, D., Toso, E. A., Hartweck, L. M., Magli, A., Lee, H. A., Thompson, E. R. The dux4 homeodomains mediate inhibition of myogenesis and are functionally exchangeable with the pax7 homeodomain. *J Cell Sci*. 2017; 130 (21): 3685-3697.

Bosnakovski, D., Xu, Z., Gang, E. J., Galindo, C. L., Liu, M., Simsek, T. An isogenetic myoblast expression screen identifies dux4-mediated fshd-associated molecular pathologies. *EMBO J*. 2008; 27 (20): 2766-2779.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.

Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E., & Arnold, H. H. A novel human muscle factor related to but distinct from myoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J*. 1989; 8 (3): 701-709.

Brouwer, O. F., Padberg, G. W., Ruys, C. J., Brand, R., de Laat, J. A., & Grote, J. J. Hearing loss in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*. 1991; 41 (12): 1878-1881.

Brzoska, E., Przewozniak, M., Grabowska, I., Janczyk-Ilach, K., & Moraczewski, J. Pax3 and pax7 expression during myoblast differentiation in vitro and fast and slow muscle regeneration in vivo. *Cell Biol Int.* 2009; 33 (4): 483-492.

Buckingham, M., & Relaix, F. Pax3 and pax7 as upstream regulators of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 44: 115-125.

Budworth, H., & McMurray, C. T. A brief history of triplet repeat diseases. *Methods Mol Biol.* 2013; 1010: 3-17.

Cabianca, D. S., Casa, V., Bodega, B., Xynos, A., Ginelli, E., Tanaka, Y. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in fshd muscular dystrophy. *Cell.* 2012; 149 (4): 819-831.

Celegato, B., Capitanio, D., Pescatori, M., Romualdi, C., Pacchioni, B., Cagnin, S. Parallel protein and transcript profiles of fshd patient muscles correlate to the d4z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of myod-dependent genes. *Proteomics.* 2006; 6 (19): 5303-5321.

Cheli, S., Francois, S., Bodega, B., Ferrari, F., Tenedini, E., Roncaglia, E. Expression profiling of fshd-1 and fshd-2 cells during myogenic differentiation evidences common and distinctive gene dysregulation patterns. *PLoS One.* 2011; 6 (6): e20966.

Chen, K. T., Zhan, Y., Wu, X., Zong, L., & Jiang, H. Y. Germinal mosaicism of pax3 mutation caused waardenburg syndrome type i. *Int J Pediatr Otorhi.* 2018; 104: 200-204.

Cisternas, P., Henriquez, J. P., Brandan, E., & Inestrosa, N. C. Wnt signaling in skeletal muscle dynamics: Myogenesis, neuromuscular synapse and fibrosis. *Mol Neurobiol.* 2014; 49 (1): 574-589.

Clapp, J., Mitchell, L. M., Bolland, D. J., Fantes, J., Corcoran, A. E., Scotting, P. J. Evolutionary conservation of a coding function for d4z4, the tandem DNA repeat mutated in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2007; 81 (2): 264-279.

Colangelo, V., Francois, S., Solda, G., Picco, R., Roma, F., Ginelli, E. Next-generation sequencing analysis of mirna expression in control and fshd myogenesis. *PLoS One*. 2014; 9 (10).

Conboy, I. M., & Rando, T. A. The regulation of notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell*. 2002; 3 (3): 397-409.

Deenen, J. C., Arnts, H., van der Maarel, S. M., Padberg, G. W., Verschuuren, J. J., Bakker, E. Population-based incidence and prevalence of facioscapulohumeral dystrophy. *Neurology*. 2014; 83 (12): 1056-1059.

Demestre, M., Orth, M., Fohr, K. J., Achberger, K., Ludolph, A. C., Liebau, S. Formation and characterisation of neuromuscular junctions between hipsc derived motoneurons and myotubes. *Stem Cell Res*. 2015; 15 (2): 328-336.

Denny, A. P., & Heather, A. K. Are antioxidants a potential therapy for fshd? A review of the literature. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 7020295.

Dixit, M., Anseau, E., Tassin, A., Winokur, S., Shi, R., Qian, H. Dux4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of pitx1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104 (46): 18157-18162.

Dmitriev, P., Stankevics, L., Anseau, E., Petrov, A., Barat, A., Dessen, P. Defective regulation of microrna target genes in myoblasts from facioscapulohumeral dystrophy patients. *J Biol Chem*. 2013; 288 (49): 34989-35002.

Dorobek, M., Szmidt-Salkowska, E., Rowinska-Marcinska, K., Gawel, M., & Hausmanowa-Petrusewicz, I. Relationships between clinical data and quantitative emg findings in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurol Neurochir Pol*. 2013; 47 (1): 8-17.

Edmondson, D. G., & Olson, E. N. A gene with homology to the myc similarity region of myod1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev*. 1989; 3 (5): 628-640.

Ehrlich, M., Jackson, K., Tsumagari, K., Camano, P., & Lemmers, R. J. Hybridization analysis of d4z4 repeat arrays linked to fshd. *Chromosoma*. 2007; 116 (2): 107-116.

Fitzsimons, R. B. Retinal vascular disease and the pathogenesis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. A signalling message from wnt? *Neuromuscul Disord*. 2011; 21 (4): 263-271.

Fitzsimons, R. B., Gurwin, E. B., & Bird, A. C. Retinal vascular abnormalities in facioscapulohumeral muscular dystrophy. A general association with genetic and therapeutic implications. *Brain*. 1987; 110 (Pt 3): 631-648.

Gabellini, D., Green, M. R., & Tupler, R. Inappropriate gene activation in fshd: A repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell*. 2002; 110 (3): 339-348.

Gabriels, J., Beckers, M. C., Ding, H., De Vriese, A., Plaisance, S., van der Maarel, S. M. Nucleotide sequence of the partially deleted d4z4 locus in a patient with fshd identifies a putative gene within each 3.3 kb element. *Gene*. 1999; 236 (1): 25-32.

Gaillard, M. C., Roche, S., Dion, C., Tasmadjian, A., Bouget, G., Salort-Campana, E. Differential DNA methylation of the d4z4 repeat in patients with fshd and asymptomatic carriers. *Neurology*. 2014; 83 (8): 733-742.

Gegenschatz-Schmid, K., Verkauskas, G., Demougin, P., Bilius, V., Dasevicius, D., Stadler, M. B. *Dmrtc2*, *pax7*, *brachyury/t* and *tert* are implicated in male germ cell development following curative hormone treatment for cryptorchidism-induced infertility. *Genes-Basel*. 2017; 8 (10).

Geng, L. N., Tyler, A. E., & Tapscott, S. J. Immunodetection of human double homeobox 4. *Hybridoma (Larchmt)*. 2011; 30 (2): 125-130.

Giacoppo, S., Rajan, T., Calabrò, R., Bramanti, P., & Mazzon, E. Role of wnt/ β -catenin signaling in regulating the balance between oxidative stress and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells from patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J Mol Genet Med*. 2016; 10 (213): 1747-0862.1000213.

Goichberg, P., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A., & Geiger, B. Recruitment of beta-catenin to cadherin-mediated intercellular adhesions is involved in myogenic induction. *J Cell Sci.* 2001; 114 (Pt 7): 1309-1319.

Gurwin, E. B., Fitzsimons, R. B., Sehmi, K. S., & Bird, A. C. Retinal telangiectasis in facioscapulohumeral muscular dystrophy with deafness. *Arch Ophthalmol.* 1985; 103 (11): 1695-1700.

Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., & Kemler, R. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development.* 1995; 121 (11): 3529-3537.

Hangul, C., Ozsoy, U., Hizay, A., Bozkurt, S., Bilge, U., Özdem, S. Fasioskapulohumeral musküler distrofide yüz morfolojisi ve klinik şiddetin hormonlarla ilişkisi. 53. Ulusal Nöroloji Kongresi. 2017.

Hangul, C., Uysal, H., Yucel, O., Toyflu, A., & Karauzum, S. Fasioskapulohumeral musküler distrofi ve trombositoz birlikteliği. 53. Ulusal Nöroloji Kongresi. 2017.

Harafuji, N., Schneiderat, P., Walter, M. C., & Chen, Y. W. Mir-411 is up-regulated in fshd myoblasts and suppresses myogenic factors. *Orphanet J Rare Dis.* 2013; 8.

Haynes, P., Kernan, K., Zhou, S. L., & Miller, D. G. Expression patterns of fshd-causing *dux4* and myogenic transcription factors *pax3* and *pax7* are spatially distinct in differentiating human stem cell cultures. *Skelet Muscle.* 2017; 7 (1): 13.

Herbst, K. L., & Bhasin, S. Testosterone action on skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004; 7 (3): 271-277.

Hewitt, J. E., Lyle, R., Clark, L. N., Valleley, E. M., Wright, T. J., Wijmenga, C. Analysis of the tandem repeat locus *d4z4* associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1994; 3 (8): 1287-1295.

Huntzinger, E., & Izaurralde, E. Gene silencing by micrnas: Contributions of translational repression and mrna decay. *Nat Rev Genet.* 2011; 12 (2): 99-110.

Hutcheson, D. A., Zhao, J., Merrell, A., Haldar, M., & Kardon, G. Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for beta-catenin. *Genes Dev.* 2009; 23 (8): 997-1013.

Iosa, M., Mazza, C., Frusciante, R., Zok, M., Aprile, I., Ricci, E. Mobility assessment of patients with facioscapulohumeral dystrophy. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2007; 22 (10): 1074-1082.

Joe, I., & Ramirez, V. D. Binding of estrogen and progesterone-bsa conjugates to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh) and the effects of the free steroids on gapdh enzyme activity: Physiological implications. *Steroids*. 2001; 66 (6): 529-538.

Jones, T. I., Yan, C., Sapp, P. C., McKenna-Yasek, D., Kang, P. B., Quinn, C. Identifying diagnostic DNA methylation profiles for facioscapulohumeral muscular dystrophy in blood and saliva using bisulfite sequencing. *Clin Epigenetics*. 2014; 6 (1): 23.

Kahlert, S., Grohe, C., Karas, R. H., Lobbert, K., Neyses, L., & Vetter, H. Effects of estrogen on skeletal myoblast growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 232 (2): 373-378.

Klinge, C. M. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*. 2000; 65 (5): 227-251.

Klinge, C. M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29 (14): 2905-2919.

Klinge, L., Eagle, M., Haggerty, I. D., Roberts, C. E., Straub, V., & Bushby, K. M. Severe phenotype in infantile facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2006; 16 (9-10): 553-558.

Klooster, R., Straasheijm, K., Shah, B., Sowden, J., Frants, R., Thornton, C. Comprehensive expression analysis of fshd candidate genes at the mrna and protein level. *Eur J Hum Genet*. 2009; 17 (12): 1615-1624.

Kowaljow, V., Marcowycz, A., Anseau, E., Conde, C. B., Sauvage, S., Matteotti, C. The *dux4* gene at the *fshd1a* locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord.* 2007; 17 (8): 611-623.

Kuch, C., Winnekendonk, D., Butz, S., Unvericht, U., Kemler, R., & Starzinski-Powitz, A. M-cadherin-mediated cell adhesion and complex formation with the catenins in myogenic mouse cells. *Exp Cell Res.* 1997; 232 (2): 331-338.

Le Grand, F., & Rudnicki, M. A. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2007; 19 (6): 628-633.

Leidenroth, A., & Hewitt, J. E. A family history of *dux4*: Phylogenetic analysis of *dux*a, b, c and *duxbl* reveals the ancestral *dux* gene. *BMC Evol Biol.* 2010; 10: 364.

Lemmers, R. J., van der Vliet, P. J., Klooster, R., Sacconi, S., Camano, P., Dauwerse, J. G. A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Science.* 2010; 329 (5999): 1650-1653.

Lemmers, R. J., Van Overveld, P. G., Sandkuijl, L. A., Vrieling, H., Padberg, G. W., Frants, R. R. Mechanism and timing of mitotic rearrangements in the subtelomeric *d4z4* repeat involved in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2004; 75 (1): 44-53.

Lemmers, R. J., Wohlgemuth, M., van der Gaag, K. J., van der Vliet, P. J., van Teijlingen, C. M., de Knijff, P. Specific sequence variations within the 4q35 region are associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2007; 81 (5): 884-894.

Leung, D. G., Wang, X., Barker, P. B., Carrino, J. A., & Wagner, K. R. Multivoxel proton magnetic resonance spectroscopy in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 2018; 57 (6): 958-963.

Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005; 120 (1): 15-20.

Li, Y., Wu, B., Liu, H., Gao, Y., Yang, C., Chen, X. Structural basis for multiple gene regulation by human dux4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 505 (4): 1161-1167.

Lim, J. W., Snider, L., Yao, Z. Z., Tawil, R., Van Der Maarel, S. M., Rigo, F. Dicer/ago-dependent epigenetic silencing of d4z4 repeats enhanced by exogenous sirna suggests mechanisms and therapies for fshd. *Hum Mol Genet.* 2015; 24 (17): 4817-4828.

Lim, J. W., Wong, C. J., Yao, Z., Tawil, R., van der Maarel, S. M., Miller, D. G. Small noncoding rnas in fshd2 muscle cells reveal both dux4- and smchd1-specific signatures. *Hum Mol Genet.* 2018.

Lin, F., Wang, Z. Q., Lin, M. T., Murong, S. X., & Wang, N. New insights into genotype-phenotype correlations in chinese facioscapulohumeral muscular dystrophy: A retrospective analysis of 178 patients. *Chin Med J (Engl).* 2015; 128 (13): 1707-1713.

Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y. S., Hawkins, R. D., Nery, J. R., Hon, G. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011; 471 (7336): 68-73.

Liu, Y., Sugiura, Y., Wu, F., Mi, W., Taketo, M. M., Cannon, S. Beta-catenin stabilization in skeletal muscles, but not in motor neurons, leads to aberrant motor innervation of the muscle during neuromuscular development in mice. *Dev Biol.* 2012; 366 (2): 255-267.

Lyle, R., Wright, T. J., Clark, L. N., & Hewitt, J. E. The fshd-associated repeat, d4z4, is a member of a dispersed family of homeobox-containing repeats, subsets of which are clustered on the short arms of the acrocentric chromosomes. *Genomics.* 1995; 28 (3): 389-397.

MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. Wnt/beta-catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009; 17 (1): 9-26.

Matsuzaka, T., Sakuragawa, N., Terasawa, K., & Kuwabara, H. Facioscapulohumeral dystrophy associated with mental retardation, hearing loss, and tortuosity of retinal arterioles. *J Child Neurol.* 1986; 1 (3): 218-223.

Matsuzaka, Y., Kishi, S., Aoki, Y., Komaki, H., Oya, Y., Takeda, S. Three novel serum biomarkers, mir-1, mir-133a, and mir-206 for limb-girdle muscular dystrophy, facioscapulohumeral muscular dystrophy, and becker muscular dystrophy. *Environ Health Prev Med.* 2014; 19 (6): 452-458.

Michelson, A. M., Abmayr, S. M., Bate, M., Arias, A. M., & Maniatis, T. Expression of a myod family member prefigures muscle pattern in drosophila embryos. *Genes Dev.* 1990; 4 (12A): 2086-2097.

Miner, J. H., & Wold, B. Herculin, a fourth member of the myod family of myogenic regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87 (3): 1089-1093.

Mitsubishi, H., Mitsubashi, S., Lynn-Jones, T., Kawahara, G., & Kunkel, L. M. Expression of dux4 in zebrafish development recapitulates facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2013; 22 (3): 568-577.

Morrison, B. M. Neuromuscular diseases. *Semin Neurol.* 2016; 36 (5): 409-418.

Mul, K., Horlings, C. G. C., Voermans, N. C., Schreuder, T. H. A., & van Engelen, B. G. M. Lifetime endogenous estrogen exposure and disease severity in female patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2018; 28 (6): 508-511.

Munsterberg, A. E., Kitajewski, J., Bumcrot, D. A., McMahon, A. P., & Lassar, A. B. Combinatorial signaling by sonic hedgehog and wnt family members induces myogenic bhlh gene expression in the somite. *Genes Dev.* 1995; 9 (23): 2911-2922.

Nguyen, K., Walrafen, P., Bernard, R., Attarian, S., Chaix, C., Vovan, C. Molecular combing reveals allelic combinations in facioscapulohumeral dystrophy. *Ann Neurol.* 2011; 70 (4): 627-633.

Ogawa, M., Yamaji, R., Higashimura, Y., Harada, N., Ashida, H., Nakano, Y. 17beta-estradiol represses myogenic differentiation by increasing ubiquitin-specific peptidase 19 through estrogen receptor alpha. *J Biol Chem.* 2011; 286 (48): 41455-41465.

Olguin, H. C., & Olwin, B. B. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: A potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol.* 2004; 275 (2): 375-388.

Osborne, R. J., Welle, S., Venance, S. L., Thornton, C. A., & Tawil, R. Expression profile of fshd supports a link between retinal vasculopathy and muscular dystrophy. *Neurology.* 2007; 68 (8): 569-577.

Oustanina, S., Hause, G., & Braun, T. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J.* 2004; 23 (16): 3430-3439.

Padberg, G. W. A. M. Facioscapulohumeral disease: Faculty of Medicine, Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden University; 1982, p:

Parker, M. H., Seale, P., & Rudnicki, M. A. Looking back to the embryo: Defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet.* 2003; 4 (7): 497-507.

Pauleikhoff, D., Bornfeld, N., Bird, A. C., & Wessing, A. Severe visual loss associated with retinal telangiectasis and facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1992; 230 (4): 362-365.

Portilho, D. M., Alves, M. R., Kratassiouk, G., Roche, S., Magdinier, F., de Santana, E. C. Mirna expression in control and fshd fetal human muscle biopsies. *PLoS One.* 2015; 10 (2).

Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S. Pax3 and pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol.* 2006; 172 (1): 91-102.

Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., & Buckingham, M. Divergent functions of murine pax3 and pax7 in limb muscle development. *Genes Dev.* 2004; 18 (9): 1088-1105.

Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., & Buckingham, M. A pax3/pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature.* 2005; 435 (7044): 948-953.

Revillion, F., Pawlowski, V., Hornez, L., & Peyrat, J. P. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer*. 2000; 36 (8): 1038-1042.

Ricci, E., Galluzzi, G., Deidda, G., Cacurri, S., Colantoni, L., Merico, B. Progress in the molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy and correlation between the number of kpni repeats at the 4q35 locus and clinical phenotype. *Ann Neurol*. 1999; 45 (6): 751-757.

Saito, Y., Miyashita, S., Yokoyama, A., Komaki, H., Seki, A., Maegaki, Y. Facioscapulohumeral muscular dystrophy with severe mental retardation and epilepsy. *Brain Dev*. 2007; 29 (4): 231-233.

Schuettengruber, B., Bourbon, H. M., Di Croce, L., & Cavalli, G. Genome regulation by polycomb and trithorax: 70 years and counting. *Cell*. 2017; 171 (1): 34-57.

Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., & Rudnicki, M. A. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 2000; 102 (6): 777-786.

Small, R. G. Coats' disease and muscular dystrophy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1968; 72 (2): 225-231.

Snider, L., Asawachaicharn, A., Tyler, A. E., Geng, L. N., Petek, L. M., Maves, L. Rna transcripts, mirna-sized fragments and proteins produced from d4z4 units: New candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2009; 18 (13): 2414-2430.

Snider, L., Geng, L. N., Lemmers, R. J., Kyba, M., Ware, C. B., Nelson, A. M. Facioscapulohumeral dystrophy: Incomplete suppression of a retrotransposed gene. *PLoS Genet*. 2010; 6 (10): e1001181.

Spurlock, G., Jim, H. P., & Upadhyaya, M. Confirmation that the specific sslp microsatellite allele 4qa161 segregates with facioscapulohumeral muscular dystrophy

(fshd) in a cohort of multiplex and simplex fshd families. *Muscle Nerve*. 2010; 42 (5): 820-821.

Statland, J., & Tawil, R. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurol Clin*. 2014; 32 (3): 721-728, ix.

Suzuki, A., Pelikan, R. C., & Iwata, J. Wnt/beta-catenin signaling regulates multiple steps of myogenesis by regulating step-specific targets. *Mol Cell Biol*. 2015; 35 (10): 1763-1776.

Suzuki, A., Scruggs, A., & Iwata, J. The temporal specific role of wnt/beta-catenin signaling during myogenesis. *J Nat Sci*. 2015; 1 (8): e143.

Tajbakhsh, S., Borello, U., Vivarelli, E., Kelly, R., Papkoff, J., Duprez, D. Differential activation of myf5 and myod by different wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of myf5. *Development*. 1998; 125 (21): 4155-4162.

Tassin, A., Laoudj-Chenivesse, D., Vanderplanck, C., Barro, M., Charron, S., Anseau, E. Dux4 expression in fshd muscle cells: How could such a rare protein cause a myopathy? *J Cell Mol Med*. 2013; 17 (1): 76-89.

Tawil, R. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurotherapeutics*. 2008; 5 (4): 601-606.

Tawil, R., Kissel, J. T., Heatwole, C., Pandya, S., Gronseth, G., & Benatar, M. Evidence-based guideline summary: Evaluation, diagnosis, and management of facioscapulohumeral muscular dystrophy: Report of the guideline development, dissemination, and implementation subcommittee of the american academy of neurology and the practice issues review panel of the american association of neuromuscular & electrodiagnostic medicine. *Neurology*. 2015; 85 (4): 357-364.

Taylor, D. A., Carroll, J. E., Smith, M. E., Johnson, M. O., Johnston, G. P., & Brooke, M. H. Facioscapulohumeral dystrophy associated with hearing loss and coats syndrome. *Ann Neurol*. 1982; 12 (4): 395-398.

- Teveroni, E., Pellegrino, M., Sacconi, S., Calandra, P., Cascino, I., Farioli-Vecchioli, S. Estrogens enhance myoblast differentiation in facioscapulohumeral muscular dystrophy by antagonizing dux4 activity. *J Clin Invest.* 2017; 127 (4): 1531-1545.
- Tremblay, P., & Gruss, P. Pax: Genes for mice and men. *Pharmacol Ther.* 1994; 61 (1-2): 205-226.
- Trensz, F., Haroun, S., Cloutier, A., Richter, M. V., & Grenier, G. A muscle resident cell population promotes fibrosis in hindlimb skeletal muscles of mdx mice through the wnt canonical pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010; 299 (5): C939-947.
- Tsumagari, K., Chang, S. C., Lacey, M., Baribault, C., Chittur, S. V., Sowden, J. Gene expression during normal and fshd myogenesis. *Bmc Med Genomics.* 2011; 4.
- Tupler, R., Berardinelli, A., Barbierato, L., Frants, R., Hewitt, J. E., Lanzi, G. Monosomy of distal 4q does not cause facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J Med Genet.* 1996; 33 (5): 366-370.
- Tupler, R., Perini, G., Pellegrino, M. A., & Green, M. R. Profound misregulation of muscle-specific gene expression in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96 (22): 12650-12654.
- van den Boogaard, M. L., Lemmers, R., Balog, J., Wohlgemuth, M., Auranen, M., Mitsuhashi, S. Mutations in dnmt3b modify epigenetic repression of the d4z4 repeat and the penetrance of facioscapulohumeral dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2016; 98 (5): 1020-1029.
- van Overveld, P. G., Enthoven, L., Ricci, E., Rossi, M., Felicetti, L., Jeanpierre, M. Variable hypomethylation of d4z4 in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2005; 58 (4): 569-576.
- Vanderplanck, C., Anseau, E., Charron, S., Stricwant, N., Tassin, A., Laoudj-Chenivesse, D. The fshd atrophic myotube phenotype is caused by dux4 expression. *PLoS One.* 2011; 6 (10): e26820.

Vanderplanck, C., Tassin, A., Anseau, E., Charron, S., Wauters, A., Lancelot, C. Overexpression of the double homeodomain protein *dux4c* interferes with myofibrillogenesis and induces clustering of myonuclei. *Skelet Muscle*. 2018; 8 (1): 2.

Voit, T., Lamprecht, A., Lenard, H. G., & Goebel, H. H. Hearing loss in facioscapulohumeral dystrophy. *Eur J Pediatr*. 1986; 145 (4): 280-285.

Walker, G., Butterfield, R., Mathews, K., Servais, L., Day, J., Gidaro, T. Results of a phase 1b/2 study of atyr1940 in adolescents and young adults with early onset facioscapulohumeral muscular dystrophy (fshd)(atyr1940-c-003). *Neuromuscular Disorders*. 2017; 27: S199.

Wallace, L. M., Liu, J., Domire, J. S., Garwick-Coppens, S. E., Guckes, S. M., Mendell, J. R. Rna interference inhibits *dux4*-induced muscle toxicity in vivo: Implications for a targeted fshd therapy. *Mol Ther*. 2012; 20 (7): 1417-1423.

Wigmore, P. M., & Evans, D. J. Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis. *Int Rev Cytol*. 2002; 216: 175-232.

Wijmenga, C., Frants, R. R., Brouwer, O. F., Moerer, P., Weber, J. L., & Padberg, G. W. Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4. *Lancet*. 1990; 336 (8716): 651-653.

Wijmenga, C., Hewitt, J. E., Sandkuijl, L. A., Clark, L. N., Wright, T. J., Dauwerse, H. G. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1992; 2 (1): 26-30.

Wijmenga, C., Sandkuijl, L. A., Moerer, P., van der Boorn, N., Bodrug, S. E., Ray, P. N. Genetic linkage map of facioscapulohumeral muscular dystrophy and five polymorphic loci on chromosome 4q35-qter. *Am J Hum Genet*. 1992; 51 (2): 411-415.

Winokur, S. T., Bengtsson, U., Vargas, J. C., Wasmuth, J. J., Altherr, M. R., Weiffenbach, B. The evolutionary distribution and structural organization of the homeobox-containing repeat *d4z4* indicates a functional role for the ancestral copy in the fshd region. *Hum Mol Genet*. 1996; 5 (10): 1567-1575.

Winokur, S. T., Chen, Y. W., Masny, P. S., Martin, J. H., Ehmsen, J. T., Tapscott, S. J. Expression profiling of fshd muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Hum Mol Genet.* 2003; 12 (22): 2895-2907.

Wright, T. J., Wijmenga, C., Clark, L. N., Frants, R. R., Williamson, R., & Hewitt, J. E. Fine mapping of the fshd gene region orientates the rearranged fragment detected by the probe p13e-11. *Hum Mol Genet.* 1993; 2 (10): 1673-1678.

Wright, W. E., Sassoon, D. A., & Lin, V. K. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to myod. *Cell.* 1989; 56 (4): 607-617.

Wulff, J. D., Lin, J. T., & Kepes, J. J. Inflammatory facioscapulohumeral muscular dystrophy and coats syndrome. *Ann Neurol.* 1982; 12 (4): 398-401.

Zammit, P. S., Golding, J. P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T. A., & Beauchamp, J. R. Muscle satellite cells adopt divergent fates: A mechanism for self-renewal? *J Cell Biol.* 2004; 166 (3): 347-357.

Zou, K., & Ing, N. H. Oestradiol up-regulates oestrogen receptor, cyclophilin, and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase mrna concentrations in endometrium, but down-regulates them in liver. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998; 64 (5-6): 231-237.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ceren	Uyruğu	TC
Soyadı	HANGÜL	Tel no	0535 323 40 15
Doğum tarihi	28.10.1987	e-posta	cerenhangul@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Sokullu Mehmet Paşa Lisesi	2005
Önlisans	Anadolu Üniversitesi, Adalet	Devam ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi	2012
Lisans (2)	Anadolu Üniversitesi, Kamu Yönetimi	2011
Doktora	Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi Genetik Programı	Devam ediyor

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Ar.Gör.Dr.	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2013-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL(2018-Sonbahar)	97,5
İngilizce	Kamu Personeli Dil Sınavı (KPDS-2012)	90
İtalyanca	İtalyan Kültür Derneği Dil Sınavı	B2 düzeyi

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
SMCHD1'de yer alan hasta mutasyonlarının protein fonksiyonuna etkisi	Hollanda Leiden Üniversitesi FSHD araştırma merkezi	Altı (6) ay
Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy (FSHD) has a talk with endocrinologic parameters: Estradiol, Progesterone and Testosterone	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi-Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi	İki (2) yıl

Burslar-Ödüller:

Erasmus Doktora Staj eğitimi bursu iki (2) ay (Hollanda)

EMBO (European Molecular Biology Organisation) miRNA kursu katılım bursu (yol giderleri)

Yayınlar:

“Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy (FSHD) has a talk with endocrinologic parameters: Estradiol, Progesterone and Testosterone” (revizyon aşamasında)

“The Coexistence of Chronic Lymphocytic Leukemia and Multiple Myeloma” Turk J Haematol. 2018 Jun 20. doi: 10.4274/tjh.2018.0096

Sözlü Sunumlar:

54. Ulusal Nöroloji Kongresi (30 Kasım - 6 Aralık 2018) Antalya-TÜRKİYE
Sözlü Sunum “Facioscapulohumeral Kas Distrofisinde (FSHD) östrojenin B-katenin, DUX4 ve PAX3/7 düzeylerine etkisi”

13.Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi (7-11 Kasım 2018) Antalya - TÜRKİYE
Sözlü Sunum “Facioscapulohumeral Kas Distrofisinde (FSHD) östrojenin B-katenin, DUX4 ve PAX3/7 düzeylerine etkisi”

Bildiriler:

53. Ulusal Nöroloji Kongresi (24-30 Kasım 2017) Antalya-TÜRKİYE
“Facioskapulohumeral musküler distrofi ve trombositoz birlikteliği”

53. Ulusal Nöroloji Kongresi (24-30 Kasım 2017) Antalya-TÜRKİYE
“Facioskapulohumeral musküler distrofide yüz morfolojisi ve klinik şiddetin hormonlarla ilişkisi”

ASHG (American Society of Human Genetics) San Diego, CA “A Rare Transformation Case Report: From Chronic Lymphocytic Leukemia to Multiple Myeloma”

Mesleki Deneyim:

Araştırmacı, Universiteit Leiden Tıp Fakóltesi, Tıbbi Genetik, 17.01.2017 - 12.04.2017

Araştırmacı, Universiteit Leiden Tıp Fakóltesi, Tıbbi Genetik, 01.03.2016 - 12.05.2016

Gözlemci Araştırmacı, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ Tıp Fakóltesi, Tıbbi Biyoloji, 01.07.2015 - 08.07.2015

Araştırmacı, Universite Aix-Marseille Tıp Fakóltesi, Tıbbi Genetik, 01.02.2015-28.02.2015

Araştırmacı, Università Degli Studi di Modena, Doęa Bilimleri, Genetik, 04.06.2014-27.08.2014

Mesleki Deneyim (Kurslar):

54. Ulusal Nöroloji Kongresi: Nöronutrition atölyesi (2018)

Bağırsak ve Fizyoloji Sendromu (GAPS) sertifikası (1-4 Aralık 2018) Antalya-Türkiye

53. Ulusal Nöroloji Kongresi: Nöromüsküler hastalıklar atölyesi, Hareket bozuklukları atölyesi, Evrimsel tıp atölyesi (2017)

Yoga 1. Kademe Yardımcı Antrenörlük Kursu

Tübitak Projesi Eğitim Programı (2237) (Kasım-2016) Antalya-TÜRKİYE

MGC Sağlık ve Hastalıkta Epigenetik Düzenleme (2 - 3 Mayıs 2016) Leiden-HOLLANDA

EMBO Uygulamalı Kursu: kodlamayan RNA'larının analizi: peraspera ad astra, CEITEC Kampüsü, Brno, Çek Cumhuriyeti (25 - 31 Temmuz 2015)

EndnoteX3 Dersi Akdeniz Üniversitesi- ANTALYA- TÜRKİYE (1 gün)(2015)

Bilimsel Araştırmaların Temel Öğeleri, Makale Hazırlama ve Sunum Eğitimi Kursu, Akdeniz-ANTALYA- TÜRKİYE (20-22 Kasım 2014)

Mikroarray Kursu Adrasan-ANTALYA-TÜRKİYE (18-21 Mayıs 2014)

İstanbul-TÜRKİYE Gelecek Nesil Dizileme, İstanbul Üniversitesi 3. Kurs (7 Mayıs 2014 - 10 Mayıs 2014)

Tıbbi Biyoloji Eğitim Kursu, Hacettepe Üniversitesi - Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü-ANKARA-TÜRKİYE (Temmuz 2013; 1 ay)

Deneyel Hayvan Kullanımı Sertifika Kursu-Akdeniz Üniversitesi-TÜRKİYE (80 saat)(2013)

Genom Dizisinden Gen Fonksiyon Kursuna - Kuşadası-TÜRKİYE (1 gün)(2013)

Sağlık Hukuku Sertifikasyonu- Dokuz Eylül Üniversitesi-İZMİR - TÜRKİYE (5 gün)(2013)

Erasmus University (İtalya) 'da Bologna Üniversitesinde Staj (Kardiyoloji, Hematoloji ve Genel Cerrahi) (3 ay)(2011)

Bell Scholl Cambridge / İngiltere'de 2010 İngilizce Dil Kursu (1 ay)(2010)

Mesleki Deneyim (Kongreler):

7. GAPS Bilgi Paylaşım Toplantısı (3 Şubat 2019) Konak Otel - İstanbul - TÜRKİYE

54. Ulusal Nöroloji Kongresi (30 Kasım - 6 Aralık 2018) Antalya-TÜRKİYE

13.Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi (7-11 Kasım 2018) Antalya - TÜRKİYE

1. Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Kongresi (19 – Nisan 2018) İstanbul-TÜRKİYE

53. Ulusal Nöroloji Kongresi (24-30 Kasım 2017) Belek- Antalya-TÜRKİYE

VI. Uluslararası Moleküler Tıp Kongresi (22-25 Mayıs 2017) İstanbul-TÜRKİYE

FSH Derneği Uluslararası Araştırma Konsorsiyumu Çalıştayı, Westin Boston Waterfront Oteli Marina Balo Salonu, Boston, MA-ABD (5-6 Ekim 2015)

İkinci Akdeniz Hematolojisi Sempozyumu “Multipl Miyelom”, Titanic Beach Oteli-Lara-Antalya / TÜRKİYE (3-5 Nisan, 2015)

ESHG (Avrupa İnsan Genetik Kongresi Derneği) Milano / İTALYA (30/05/2014 - 03/06/2014)

13. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (27/10/2013 - 30/10/2013)

Diğer:

Microsoft Office, SPSS, EndnoteX3

Almanca ve Flemenkçe (A1-A2 düzeyi)