

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE MÜSKÜLER DİSTROFİ
PROTEİNLERİNİN TANIMLANMASI**

EDA BECER

**DANIŞMAN
PROF. DR. NİHAN ERGİNEL-ÜNALTUNA**

GENETİK ANABİLİM DALI/GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

06 / 05 / 2008

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Genetik Programı
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı : Genetik Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Eda Becer
Tez Başlığı : Western blot yöntemi ile müsküler distrofi proteinlerinin tanımlanması
Sınav Yeri : Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Prof. Dr. Ahmet Sevim Büyükdevrim Kütüphanesi
Sınav Tarihi : 01 / 05 / 2008

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof. Dr. Nihan Erginel-Ünaltuna (Tez Danışmanı), İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı
- 2.Prof. Dr. Piraye Serdaroglu-Oflozer, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı
- 3.Prof. Dr. Beyhan Tüysüz, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
- 4.Prof. Dr. Adnan Yüksel, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
- 5.Doç. Dr. Kıvanç Çefle, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı

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 çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Eda Becer


(İmza)

İTHAF

Anneme ve babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve deneyler esnasında verdiği bilgiler, akademik kariyerimde bir adım olan yüksek lisans eğitimimin her aşamasında gösterdiği destek, açtığı kapılar ve inancı için, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nihan Erginel-Ünaltuna'ya

Tez çalışmamda kullandığım verilerin ve materyallerin temin edilmesi, en önemlisi verdiği bilgiler ve gösterdiği destek ile nöromüsküler bilim dalına ilgi duymamı, çalışma konumu benimsememi sağladığı için, Sayın Prof. Dr. Piraye Serdaroğlu-Ofłazer'e

Bu çalışmada verdikleri fikirler ve gösterdikleri destek için, dostlarım Dr. Serpil Eraslan ve Biyolog Burcu Akın'a

Çalışmada kullandığım materyallerin toplanmasındaki yardımları için, Biyolog Hatice Taşlı'ya

Gösterdikleri anlayış ve destek için tüm DETAE Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına

Her zaman yanımda olan aileme sabırları için,

“Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı” çerçevesinde tarafıma karşılıksız burs tahsis eden Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na

Teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T3/15122006

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Müsküler Distrofiler	4
2.2. Distrofinopatiler (Duchenne Ve Becker Müsküler Distrofisi).....	4
2.2.1. Duchenne Ve Becker Müsküler Distrofisinin Klinik Özellikleri	4
2.2.2. Distrofin Geni Ve Proteini.....	6
2.3. Kavşak Tipi Kas Distrofisi (“Limb-Girdle Müsküler Distrofi” (LGMD)).....	10
2.3.1. Sarkoglikanopatiler	10
2.3.1.1. α -Sarkoglikanopati (Limb-Girdle Müsküler Distrofi Tip 2D).....	10
2.3.1.2. β -Sarkoglikanopati (Limb-Girdle Müsküler Distrofi Tip 2E)	11
2.3.1.3. γ -Sarkoglikanopati (Limb-Girdle Müsküler Distrofi Tip 2C)	11
2.3.1.4. δ -Sarkoglikanopati (Limb-Girdle Müsküler Distrofi Tip 2F)	12
2.3.1.5. Sarkoglikan Proteinlerinin Moleküler Özellikleri.....	12
2.4. Miyoklonus Distoni Sendromu.....	17
2.5. Distrofin Glikoprotein Kompleksi.....	18
2.6. Limb-Girdle Müsküler Distrofi Tip 2B ve Miyoshi Miyopatisi	22
2.6.1. Limb-Girdle Müsküler Distrofi Tip 2B’nin ve Miyoshi Miyopatisi’nin Klinik Özellikleri.....	22
2.6.2. Disferlin Geninin Ve Proteininin Moleküler Özellikleri.....	23
2.6.3. Disferlin Proteininin Görevleri	25

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Gereçler.....	30
3.1.1. Hasta Ve Kontrol Grubu Seçimi.....	30
3.1.2. Kimyasallar.....	31
3.1.3. Western Blot İşleminde Kullanılan Materyaller.....	31
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	32
3.1.5. Kullanılan Tampon Ve Çözeltiler.....	32
3.1.5.1. Doku Homojenizasyonu İşleminde Kullanılan Çözeltiler.....	32
3.1.5.2. SDS-Poliakrilamid Jel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler.....	32
3.1.5.3. Western Blot İşleminde Kullanılan Çözeltiler.....	33
3.2. Yöntemler.....	35
3.2.1. Doku Homojenizasyonu	35
3.2.2. SDS-Poliakrilamid Jelin Hazırlanması	35
3.2.3. SDS-Poliakrilamid Jelin Yüklenmesi Ve Elektroforezi.....	36
3.2.4. SDS-Poliakrilamid Jelin Boyanması.....	36
3.2.5. SDS-Poliakrilamid Jel Üzerindeki Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması.....	38
3.2.6. Nitroselüloz Membran Üzerindeki Proteinlerin İmmünolojik Saptanması.....	38
4. BULGULAR.....	40
4.1. Kontrol Grubuna Ait Western Blot Sonuçları.....	42
4.2. Hasta Grubuna Ait Western Blot Sonuçları	42
5. TARTIŞMA	49
KAYNAKLAR	53
FORMLAR	62
Gönüllü Olur Formu	62
ETİK KURUL KARARI.....	66
ÖZGEÇMİŞ	67

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Müsküler distrofiler ve ilişkili oldukları genler (24).....	5
Tablo 3-1: SDS-poliakrilamid jelin içerdığı kimyasal maddeler ve jelin yoğunluğuna göre değişen madde miktarları.....	36
Tablo 3-2: Western blot işleminde kullanılan antikorların TBS çözeltisi içindeki sulandırma miktarları.....	39
Tablo 4-1: Kontrol grubunda yer alan hastaların klinik ve laboratuvar parametreleri....	41
Tablo 4-2: Hasta grubunda yer alan hastaların klinik ve laboratuvar parametreleri.....	41
Tablo 4-3: Kontrol grubuna ait Western blot, patolojik tanı ve immünohistokimyasal analiz sonuçları.....	47
Tablo 4-4: Hasta grubuna ait Western blot, patolojik tanı ve immünohistokimyasal analiz sonuçları.....	48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Distrofin geninin şematik çizimi.....	7
Şekil 2-2: Sarkoglikanopatilerin moleküler mekanizması.....	16
Şekil 2-3: Distrofin glikoprotein kompleksinin (DGC) şematik çizimi.	18
Şekil 2-4: Distrofin proteini eksikliği bulunan kas hücrelerinde kalsiyum homeostasisinin bozulmasına ve nekrozuna neden olan fizyopatolojik yol hipotezi	21
Şekil 2-5: Disferlin proteininin yapısı ve topolojisi.	24
Şekil 2-6: Disferlin proteini aracılığıyla yapılan membrane onarım modeli.	29
Şekil 3-1: Elektroforez işlemi sonrası boyanmış SDS-poliakrilamid jel görüntüsü.	37
Şekil 4-1: Western blot işlemi sonunda elde edilen distrofin proteininin rod bölgesine ait bant görüntüleri.	43
Şekil 4-2: Western blot işlemi sonunda α -sarkoglikan proteinine (50 kDa) ait bant görüntüleri.....	44
Şekil 4-3: Western blot işlemi sonunda disferlin proteinine (230 kDa) ait bant görüntüleri.....	44
Şekil 4-4: Western blot işlemi sonunda distrofin proteininin rod bölgesine ait bantların görüntüleri.....	46

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

DMD:	Duchenne müsküler distrofisi
BMD:	Becker müsküler distrofisi
LGMD:	Kavak tipi kas distrofisi (“Limb-Girdle müsküler distrofi”)
DGC:	Distrofin glikoprotein kompleksi (“Dystrophin glycoprotein complex”)
NOS:	Nitrik oksit sentaz
SGC:	Sarkoglikan protein kompleksi (“Sarcoglycan complex”)
ABD:	Aktin bağlayıcı blge (“Actin-binding domain”)
CH:	Kalponin homolog bölgesi (“Calponin-homology domain”)
MCMD:	Merozin eksikliğine bağlı konjenital müsküler distrofi
CMD:	Konjenital müsküler distrofi (“Congenital muscular dystrophy”)
CK:	Kreatin kinaz (“Creatine kinase”)
PPXY:	Prolin-Prolin-X-Trozin motifi
PIP2:	Fosfotidilinozitol 4,5-difosfat
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
TEMED:	Tetrametilediamin
CR:	Sisteinden zengin distrofin proteini bölgesi (“Cystein-rich domain”)
CT:	Distrofin proteininin C-terminal bölgesi (“C-terminal domain”)
EGF:	Epidermal büyüme faktörü (“Epidermal growth factor”)
CC:	Bobin yapısı (“Coiled-coil”)
β DG:	Beta distroglikan
α DG:	Alfa distroglikan
PBS:	Tuzlu fosfat tamponu (“Phosphate buffered saline”)
TBS:	Tris-tuz zeltisi (“Tris-buffered saline”)
TBST:	Tris-tuz-tween 20 zeltisi (“Tris-buffered saline Tween 20”)
α :	Alfa
β :	Beta
γ :	Gama
δ :	Delta
ϵ :	Epsilon
ζ :	Zeta

ÖZET

Becer E. Western Blot Yöntemi İle Müsküler Distrofi Proteinlerinin Tanımlanması . İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2008.

Müsküler distrofiler, ilerleyici kas güçsüzlüğü ve atrofi ile karakterize bir kalıtsal hastalık grubudur. Duchenne müsküler distrofisi (DMD), distrofin proteinin yokluğu ile karakterize, X kromozomuna bağlı resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır. Becker müsküler distrofisi, DMD'nin daha hafif seyreden formudur. Kavşak tipi kas distrofileri ("Limb-Girdle müsküler distrofi" (LGMD)), klinik fenotip olarak birbirlerine çok benzeyen otozomal kalıtsal hastalıklardan oluşan bir müsküler distrofi alt grubudur ve değişik proteinlerin eksikliği veya defekti nedeni ile oluşmaktadır. Örneğin LGMD2B ve Miyoshi miyopatisi, disferlin, LGMD2D ise alfa sarkoglikan proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu genetik olarak heterojen ancak fenotipik olarak benzer hastalıkların birbirlerinden ayırt edilebilmeleri için kullanılan yöntemlerden bir tanesi Western blot'tur. Western blot, proteinlerin ağırlığını ve miktarlarını belirlemede kullanılan önemli bir yöntemdir. Çalışma kapsamında Western blot yöntemi kullanılarak müsküler distrofilardan bazılarının ayırıcı tanımlarının yapılması amaçlanmıştır. Çalışmada alfa sarkoglikan antikor, disferlin antikor, distrofin proteininin C-terminal ve rod bölgelerinin antikorları kullanılmıştır. 15 müsküler distrofi ve 16 kontrol grubu hastasına ait kas dokusu Western blot yöntemiyle incelenmiştir. Kontrol grubunda yer alan hastaların patolojik bulgu ve Western blot işlemi sonuçları arasında farklılık saptanmamıştır. Müsküler distrofi hastalarının dördünde disferlin proteininin, birinde alfa sarkoglikan proteininin, üçünde ise distrofin proteinin eksikliği saptanmıştır. Hastalardan birinin distrofin proteininin rod bölgesine ait bantlarında farklılık gözlemlenmiştir. Beş hastada ise araştırılan proteinlerin hiçbirinde eksiklik saptanmamıştır. Bu çalışma, hastaların, klinik tanımlarının konulmasında ve hastalıklarına neden olan genetik bozuklukların belirlenmesinde çok önemli bir rol oynayacaktır.

Anahtar Kelimeler : Müsküler distrofi, Western blot, Duchenne müsküler distrofisi, Kavşak tipi kas distrofisi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T3/15122006

ABSTRACT

Becer E. Western Blotting For The Description Of Muscular Dystrophy Proteins. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Programme. Master Thesis. İstanbul. 2008.

Muscular dystrophies are group of inherited disorders characterized by progressive muscle wasting and weakness. Duchenne muscular dystrophy (DMD) is X-linked recessive disorder which is characterized by dystrophin protein deficiency. Becker muscular dystrophy is a milder form of the DMD. Limb-Girdle muscular dystrophies (LGMD) are autosomally inherited muscular dystrophy subgroup which have very similar phenotypes. LGMD2B and Miyoshi myopathy are autosomal recessively inherited diseases in which dysferlin protein deficiency or defect are responsible for both diseases. Alpha sarcoglycan gene mutations cause LGMD2D. The clinical phenotypes of muscular dystrophy types are very similar. For this reason, Western blotting is used to distinguish them. Western blotting is a crucial method to determine the weight and quantities of proteins. The aim of this study is to differentiate certain muscular dystrophies by using Western blotting. Anti-alpha sarcoglycan, anti-disferlin, anti-dystrophin protein C-terminal and anti-rod domain antibodies were used in this study. 15 muscular dystrophy and 16 control group patients were analysed. No differences were found between the results of immunocytochemistry and Western blotting process of control group patients. According to the results of Western blotting four patients had dysferlin, one of them had alpha sarcoglycan protein , three of them had dystrophin protein deficiency. In one patient, change in dystrophin rod domain band was observed. No protein deficiency was shown in five patients. This study has an impact in diagnosing and defining genetic causes of these disorders.

Key Words: Muscular dystrophy, Western blotting, Duchenne muscular dystrophy, Limb-Girdle muscular dystrophy

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. T3/15122006

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Müsküler distrofiler, iskelet kas dokusu tutuluşuna bağlı anormal kas güçsüzlüğü ve atrofisi ile karakterize bir grup kalıtsal kas hastalığıdır. Hastalığın başlangıcında sadece belli bir grup kasta güçsüzlük görülebilmektedir. Fakat hastalığın ilerleyen dönemlerinde diğer kas grupları da etkilenebilmektedir. Bu nedenle müsküler distrofi hastalık grubunda iskelet kas dokusu temelde etkilenen doku olsa da kalp kası, düz kas dokusu ve beyin de hastalığın tutulumunun görüldüğü dokulardır (1). Hastalığın etkilediği kas grubu, kalıtım şekli ve başlama yaşı müsküler distrofileri gruplamak için kullanılan kriterlerdir. Kalıtım şekline göre otozomal dominant, otozomal resesif ve X kromozomuna bağlı geçiş gösteren yaklaşık kırk beş müsküler distrofi çeşidi bulunmaktadır (2, 3).

Birçok müsküler distrofi tipinde hastaların klinik fenotipleri birbirine benzemektedir. Bu nedenle hastalıklar arasında ayırıcı tanı yapmak oldukça güçtür. Örneğin DMD’de kas güçsüzlüğü çok erken yaşta başlayabilmektedir. Bu nedenle hastalık, konjenital müsküler distrofi veya diğer resesif kalıtmı çocukluk çağı müsküler distrofileri ile karıştırılabilmektedir (4). Ayrıca kavşak tipi kas distrofileri de klinik fenotip olarak birbirine çok benzeyen otozomal kalıtmı müsküler distrofi alt grubudur. Bu grup içinde yer alan müsküler distrofilerin klinik özellikleri bakımından birbirinden ayırt edilmesi hemen hemen olanaksızdır (5). Bu nedenle hastalığa sebep olan protein değişikliğinin gösterilmesi ayırıcı tanı yapılabilmesi açısından çok önemlidir. Çalışma kapsamında Western blot yöntemi kullanılarak bazı müsküler distrofi grupları arasında ayırıcı tanı yapılması amaçlanmıştır.

Müsküler distrofi çeşitlerinden en sık görülenleri Duchenne ve Becker müsküler distrofisidir. Bunlar, X’e bağlı resesif kalıtım gösteren müsküler distrofi tipleridir. Bu hastalıkların oraya çıkma nedeni distrofin adı verilen 427 kDa’luk distrofin proteinini kodlayan gendeki mutasyonlardır (2). Bu mutasyonlar sonucu kas dokusunda hücre dışı matriks ve hücre iskeleti arasındaki bağlantıyı sağlayan distrofin proteininin hücre içindeki varlığı, fonksiyonel işlevliliği ve yapısı bozulmaktadır. Duchenne müsküler distrofisi hastalığı çocukluk çağında ortaya çıkmaktadır. Hastaların iskelet kas dokusunda distrofin proteini yoktur. Becker müsküler distrofisi, Duchenne müsküler

distrofisinin geç başlangıçlı ve daha hafif seyreden formudur. Becker müsküler distrofisi hastalarında düşük seviyede ve yapısı değişmiş distrofin proteini bulunur (4).

Kavşak tipi kas distrofileri (“Limb-Girdle müsküler distrofi” (LGMD)), otozomal dominant veya resesif geçişli, yüksek heterojenitesi bulunan bir müsküler distrofi alt grubudur. Bunlar kavşak-ekstremita tipi tutulumla seyretmektedir. Belirtileri çocukluk veya erişkin dönemde başlayan bu hastalık grubu içinde klinik olarak birbirleriyle benzer özellikler gösteren hastalıklar vardır. Limb-Girdle müsküler distrofilerin on sekiz çeşidi vardır. Bunların yedisi otozomal dominant, on biri ise otozomal resesif kalıtım göstermektedir (5).

Kavşak tipi kas distrofilerinden bir tanesi LGMD2B’dir. LGMD2B, Miyoshi miyopatisi ile klinik özellikler bakımından farklı fakat allelik otozomal resesif kalıtmı müsküler distrofi çeşitleridir. Her iki hastalık da disferlin proteininin yapısının ve hücre içindeki varlığının bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır. Limb-Girdle müsküler distrofi tip 2B, proksimal kaslarda tutulum gösteren bir hastalıktır. Miyoshi miyopatisi ise distal kasların etkilendiği bir müsküler distrofi tipidir (6).

Sarkoglikanopatiler, kavşak tipi kas distrofilerinin bir alt grubudur. α -, β -, γ - ve δ -sarkoglikan proteinlerindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan bir hastalık grubudur. Bu hastalıklar otozomal resesif kalıtım göstermektedir (7-11). LGMD2D, 50 kDa’lık α -sarkoglikan proteinini kodlayan gendeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan bir müsküler distrofi çeşididir (12). α -sarkoglikan proteini, kas hücresi membranında yer alan sarkoglikan protein kompleksinin bir elemanıdır. Bu proteindeki mutasyon sarkoglikan protein kompleksinin bozulmasına yol açmaktadır (13). LGMD2E, 43 kDa ağırlığındaki β -sarkoglikan proteinini kodlayan gendeki mutasyon sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. β -sarkoglikan proteinindeki bir bozukluk, α -, δ - ve γ -sarkoglikan proteinlerinin kas hücresi membranında eksikliğine yol açmaktadır (14). Limb-Girdle müsküler distrofi tip 2C (LGMD2C), 35 kDa ağırlığındaki γ -sarkoglikan proteinin kas hücresi membranında eksikliğiyle karakterize bir hastalıktır. Hastalığa yol açan çeşitli tipte γ -sarkoglikan protein mutasyonları tanımlanmıştır (10, 15). Sarkoglikanopati ailesinin diğer bir üyesi limb-girdle müsküler distrofi tip 2F’dir. 35 kDa ağırlığındaki δ -sarkoglikan proteinindeki mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır (11).

Western blot yöntemi, proteinlerin ağırlığını ve miktarlarını belirlemede kullanılan önemli bir yöntemdir (16). Western blot yönteminde proteinler moleküler

ağırlıklarına göre ayrıştırılır ve kimyasal metotlarla görüntülenir. Böylece proteinlerin yapısı ve miktarındaki bir farklılık bu yöntem kullanılarak ayırt edilebilmektedir. Bu yöntem özellikle müsküler distrofi proteinlerinin belirlenmesinde büyük bir öneme sahiptir. Çünkü müsküler distrofi çeşitlerinin birçoğu benzer klinik fenotipe sahiptir. Bu hastalıkların birbirinden ayırt edilebilmesi için Western blot işlemi kullanılmaktadır (17). Bu tez projesi kapsamında Western blot yöntemi kullanılarak müsküler distrofi proteinlerinin bazılarının ayırıcı tanılarının saptanması amaçlanmıştır. Ayrıca hastalığa neden olan işlevi bozuk olan proteinin kas dokusundaki miktarı ve boyutu belirlenecektir. Çalışmadan elde edilecek sonuçlar müsküler distrofi hastalarının tedavisi ve hekimin hastaya genetik danışma verme aşamalarında önemli bir rol oynayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Müsküler Distrofiler

Müsküler distrofiler, ilerleyici kas güçsüzlüğü ve kaybıyla karakterize geniş bir kalıtsal hastalık grubudur. Müsküler distrofilerde iskelet kas dokusu temelde etkilenen doku olsa da kalp kası, düz kas ve beyin dokusunda da yapısal ve fonksiyonel anormallikler saptanabilmektedir (18-20). Yaş, hastalığın ilerleme hızı, kalıtım şekli, etkilediği kas grubu, genetik sebep ve etkilendiği gen müsküler distrofileri sınıflamada kullanılmaktadır (1). Distrofin proteininin keşfedilmesinden sonra müsküler distrofilerle ilişkili çok sayıda gen tanımlanmıştır. Tanımlanan genler sayesinde de müsküler distrofiler genetik temellerine göre sınıflandırılabilmişlerdir (Tablo 2-1) (2, 3).

2.2. Distrofinopatiler (Duchenne Ve Becker Müsküler Distrofisi)

2.2.1. Duchenne Ve Becker Müsküler Distrofininin Klinik Özellikleri

Duchenne müsküler distrofisi (DMD), X kromozomuna bağlı resesif kalıtım gösteren, ilerleyici kas güçsüzlüğüyle karakterize bir hastalıktır ve 3.500 erkek doğumunda bir görülmektedir (2). Hastalığın daha hafif seyreden formu Becker müsküler distrofisidir. Becker müsküler distrofisi (BMD), Duchenne müsküler distrofisine göre daha geç yaşta başlangıç gösterir ve hastaların yaşam süresi daha uzundur. Her iki hastalık da distrofin genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonlar sonucunda distrofin geninin kodladığı 427 kDa'luk distrofin adı verilen hücre iskeleti proteininde yapısal ve fonksiyonel bozukluklar oluşmaktadır. DMD hastalarının büyük bir çoğunluğunda mutasyonlar nedeniyle distrofin proteini bulunmamaktadır. BMD hastalarında ise düşük seviyede ve boyutu küçülmüş distrofin proteini bulunmaktadır (4).

Distrofinopatiler, X kromozomuna bağlı resesif kalıtım gösterdiği için erkeklerde görülen bir hastalıktır. Kadınlar hastalığın taşıyıcısı olabilmektedir. Fakat nadir de olsa kadınlarda da kas zaafı görülebilmektedir. Bunun nedenlerinden bir tanesi mutasyonlu distrofin geni taşıyan kadının normal X kromozomunun inaktivasyonudur (21). Diğer bir neden ise mutasyonsuz distrofin geni taşıyan X kromozomunun otozomal bir kromozomla translokasyon yapmasıdır. Ayrıca tek X kromozomu taşıyan Turner sendromlu kadınlarda da Duchenne müsküler distrofisi hastalığı görülebilmektedir. (22, 23).

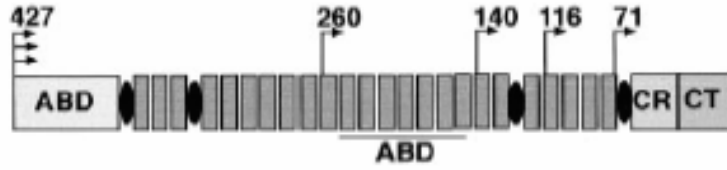
Tablo 2-1: Müsküler distrofiler ve ilişkili oldukları genler (24).

Hastalık adı	Kalıtım şekli	Gen bölgesi	Gen ürünü
X'e bağlı kalıtım gösteren müsküler distrofiler			
Duchenne /Becker müsküler distrofi	X'e bağlı resesif	Xp21	Distrofin
Emery-Dreifuss müsküler distrofi	X'e bağlı resesif	Xp28	Emerin
Limb-Girdle müsküler distrofiler			
LGMD1A	Otozomal dominant	5q31	Myotilin
LGMD 1B	Otozomal dominant	1q21	Lamin A/C
LGMD 1C	Otozomal dominant	3q25	Kaveolin-3
LGMD 1D	Otozomal dominant	6q23	Tanımlanmadı
LGMD 1E	Otozomal dominant	7q32	Tanımlanmadı
LGMD 1F	Otozomal dominant	5q31	Tanımlanmadı
LGMD 1G	Otozomal dominant	4q21	Tanımlanmadı
LGMD 2A	Otozomal resesif	15q15	Kalpain-3
LGMD 2B	Otozomal resesif	2p13	Disferlin
LGMD 2C	Otozomal resesif	13q12	γ -sarkoglikan
LGMD 2D	Otozomal resesif	17q12	α -sarkoglikan
LGMD 2E	Otozomal resesif	4q12	β -sarkoglikan
LGMD 2F	Otozomal resesif	5q23	δ -sarkoglikan
LGMD 2G	Otozomal resesif	17q11	Telethonin
LGMD 2H	Otozomal resesif	9q31	E3-ubiquitin
LGMD 2I	Otozomal resesif	19q13	Fukutin ile ilişkili protein
LGMD 2J	Otozomal resesif	2q31	Titin
LGMD 2K	Otozomal resesif	9q34	Protein-O-mannoil transferaz 1
Distal müsküler distrofiler			
Miyoshi miyopati	Otozomal resesif	2p13	Disferlin
Tibial müsküler distrofi	Otozomal dominant	2q31	Titin
Konjenital müsküler distrofiler			
Konjenital müsküler distrofi tip 1A	Otozomal resesif	6q22	Laminin $\alpha 2$
Konjenital müsküler distrofi tip 1B	Otozomal resesif	1q42	Tanımlanmadı
Konjenital müsküler distrofi tip 1C	Otozomal resesif	19q13	Fukutin ile ilişkili protein
Konjenital müsküler distrofi tip 1D	Otozomal resesif	22q12	LARGE
Fukuyama tipi konjenital müsküler distrofi	Otozomal resesif	9q31	Fukutin
Walker-Warburg Sendromu	Otozomal resesif	9q34	Protein-O-mannoil transferaz 1
Walker-Warburg Sendromu	Otozomal resesif	14q24	Protein-O-mannoil transferaz 2
Serebro-oküler-displazi	Otozomal resesif	1p32	Protein O-bağılı mannoz $\beta 1,2$ -asetil glikozamin transferaz (POMGnT1)
$\alpha 7$ integrin konjenital miyopati	Otozomal resesif	12q13	$\alpha 7$ integrin
Ullrich sendromu	Otozomal resesif	21q22	Kollajen VI $\alpha 1$
Ullrich sendromu	Otozomal resesif	21q22	Kollajen VI $\alpha 2$
Ullrich sendromu	Otozomal resesif	2q37	Kollajen VI $\alpha 3$
Rijit omurga konjenital müsküler distrofi	Otozomal resesif	1p35	Selenoprotein N 1
Diğer müsküler distrofi tipleri			
Emery-Dreifuss müsküler distrofi	Otozomal dominant	1q21	Lamin A/C
Bethlem miyopati	Otozomal dominant	21q22	Kollajen VI $\alpha 1$
Bethlem miyopati	Otozomal dominant	21q22	Kollajen VI $\alpha 2$
Bethlem miyopati	Otozomal dominant	2q37	Kollajen VI $\alpha 3$
Epidermolysis bullosa	Otozomal resesif	8q24	Plektin
Facioskapulohumeral müsküler distrofi	Otozomal dominant	4q35	Tanımlanmadı
Skapuloperoneal müsküler distrofi	Otozomal dominant	12q21	Tanımlanmadı
Okulofarinjial müsküler distrofi	Otozomal dominant	14q11	Poly-A-bağlayıcı protein 2
Miyotonik distrofi	Otozomal dominant	19q13	Miyotonin protein kinaz

DMD hastaları doğdukları zaman klinik özellikler bakımından sağlıklı bireylerdir (24). Fakat bu kişilerin serum kreatin fosfokinaz seviyeleri yüksektir. Hastalardaki ilk semptomlar 2 ile 5 yaş arası görülmektedir (25). Bu çocuklar, yürürken düşmektedirler, basamak çıkmakta zorluk çekmektedirler ve ördekvari yürüyüşleri vardır. Hastaların baldır kaslarında hipertrofi vardır. Proksimal kol ve bacak kaslarında ise güçsüzlük bulunmaktadır ve Gowers belirtisi göstermektedir. Bu belirtide çocuklar yerden kalkarken kendi vücutları üzerinde tırmanarak doğrulmaktadırlar (26). Alt ekstremitte kaslarındaki ve kalça kavşağındaki kaslardaki güçsüzlüğün artması nedeniyle DMD hastaları 12 yaş civarında tekerlekli sandalyeye bağlanmaktadır. Kollardaki refleksler hastalığın ilerleyen dönemlerinde kaybolmaktadır. Hastalarda devamlı oturmaktan dolayı kifoskolyoz ortaya çıkmaktadır. DMD hastalarının büyük bir çoğunluğu yirmili yaşların başlangıcında solunum sorunları nedeniyle kaybedilmektedir. Bazı hastaların ölümü kardiyak hastalıklar nedeniyle de olabilmektedir (2). BMD hastaları, DMD hastalarıyla aynı klinik semptomları paylaşır. Fakat semptomların ortaya çıkış yaşı daha ileridir ve hastalığın ilerleme hızı yavaştır. Hastaların serum kreatin kinaz (CK) seviyeleri yüksektir. BMD hastalarının bazıları uzun bir süre tekerlekli sandalyeye bağlanmadan yaşamaktadır (2). Duchenne müsküler distrofi hastalarının bir kısmında ılımlı mental gerilik bulunmaktadır. BMD hastalarında mental gerilik Duchenne müsküler distrofi hastaları kadar sık görülmemektedir (25).

2.2.2. Distrofin Geni Ve Proteini

Distrofin geni, X kromozomunun p21 bölgesinde yer almaktadır. Bu gen 2.5 Mb uzunluğundadır ve 79 eksonu vardır (27). Distrofin gen bölgesinden kodlanan 14 kb'lık mRNA, iskelet kasında ağırlıklı olmak üzere kalp kası ve beyinde sentezlenmektedir (28). Distrofin geni, iskelet kas dokusunda 427 kDa'luk distrofin proteinini kodlamaktadır. Distrofin proteini dört bölgeye ayrılmaktadır. Bunlar N-terminal aktin bağlayıcı bölge, rod bölgesi, sisteinden zengin bölge ve C-terminal bölgesidir (Şekil 2-1) (29).



Şekil 2-1: Distrofin geninin şematik çizimi.

Distrofin proteini farklı dokularda aktive olan promotor bölgelerine sahiptir. Farklı promotor bölgelerinin aktive olmasıyla kalp kası, iskelet kası ve beyinde 3 farklı 427 kDa büyüklüğünde distrofin adı verilen protein sentezlenmektedir. 427-kDa büyüklüğündeki distrofin proteini amino uç kısmında aktin bağlayıcı bölge (ABD) içermektedir. Distrofinin rod bölgesi, 24 tane spektrin benzeri tekrar ve dört tane esnek menteşe bölgelerinden oluşmaktadır. Ayrıca rod bölgesinde 11.-17. spektrinler arasında ikinci bir aktin bağlayıcı bölge (ABD) bulunmaktadır. Proteinin karboksi terminal bölgesinde distrofin glikoprotein kompleksinde yer alan proteinlerle etkileşen sisteinden zengin bölge (CR) ve C-terminal bölge (CT) vardır. Distrofinin 4 tane farklı promotordardan sentezlenen küçük formları amino terminal bölge içermemektedir. Dp260 çoğunluklar retinada, Dp140 ve Dp116 sinir sisteminde, Dp71 ise genel olarak tüm hücre çeşitlerinde sentezlenmektedir (30).

Distrofin proteininin F-aktinle bağlantı kuran N-terminal bölgesi, düz kas dokusunda bulunan kalponin proteininin aktin bağlayıcı bölgesiyle homoloji göstermektedir. Bu nedenle aktin bağlayan bu bölgeye kalponin homolog bölgesi ("calponin-homology domain" (CH)) adı verilmektedir. Aktinle bağlantı kuran utropin, spektrin, α -aktinin ve fibrin gibi proteinlerde de CH bölgeleri vardır (31). Distrofin proteininin N-terminal bölgesi, CH1 ve CH2 olmak üzere iki α -heliks yapıdan oluşan bölge içermektedir (32). N-terminal CH bölgelerinde üç tane aktin bağlayıcı bölge ("actin-binding domain" (ABD)) vardır. Bunlar ABD1, ABD2 ve ABD3'tür. ABD1 ve ABD3, CH1 ve CH2'nin heliks A yapısında yer alır. ABD2 ise CH1'in heliks E ve F yapılarında yer almaktadır (33).

Distrofin proteininin rod bölgesi, 24 tane spektrin benzeri tekrardan oluşmaktadır. Bu rod bölgesinde yer alan 11-17 spektrin benzeri tekrar bölgesi, aktin proteini ile amino terminal bölgeden bağımsız olarak bağlantı kurabilmektedir. Utropin proteininin distrofin proteiniyle homoloji gösteren rod bölgesinin ortasındaki 11-16 asidik spektrin benzeri tekrarlar aktin proteinine bağlanma özelliği göstermemektedir. Fakat utropin proteininin rod bölgesindeki ilk 10 spektrin benzeri tekrar, aktin proteinin utropin proteininin amino terminal bölgesine bağlanma kapasitesini ve ilgisini artırıcı etki göstermektedir. Distrofin proteininin rod bölgesiyle F-aktin proteininin bağ kurması elektrostatik etkileşime bağlıdır. Asidik özelliğe sahip aktin proteini, asidik özelliklere sahip distrofin proteininin rod bölgesiyle bağlantı kurabilmektedir (34).

Distrofin proteininin C-terminal bölgesi, WW, EF, sisteinden zengin ve COOH bölgelerinden oluşmaktadır (35). Rod bölgesinde bulunan yirmi dördüncü spektrin

benzeri tekrardan sonra protein içindeki dördüncü menteşe bölgesi adı verilen yapı gelmektedir. Bu yapı WW bölgesiyle birleşmektedir. WW bölgesi, birçok sinyal iletili ve düzenleyici molekülde yer alan bir bölgedir (36). Distrofin proteininde yer alan WW bölgesi, rod bölgesini sisteinden zengin ve COOH bölgesinden ayırmaktadır. WW bölgesi iki tane korunmuş triptofan ve β -tabakası yapısı içermektedir. Bu bölge, Prolin-Prolin-X-Tirozin (PPXY) motifine sahip moleküllerle bağlantı kurabilmektedir. Distrofin proteinin WW bölgesi, β -dystroglikan proteinin PPXY motifine sahip C-terminal bölgesindeki 15 amino asitlik prolinden zengin bölgesini tanıyarak bağlantı kurmaktadır (35). Distrofin proteinin WW bölgesinden sonra sisteinden zengin bölgesi gelmektedir. Sisteinden zengin bölgesinde WW bölgesine uzaklıklarına göre sırasıyla EF1, EF2 ve ZZ bölgeleri bulunmaktadır. EF1 ve EF2 bölgeleri, birçok kalsiyum bağlayıcı proteinin sahip olduğu heliks-ilmik-heliks motifi yapısını içermektedir. Fakat EF1 ve EF2 bölgeleri kalsiyum iyonu bağlamaz. EF1 ve EF2 bölgeleri, WW bölgesiyle birçok heliks yapısı aracılığıyla bağlantı kurmaktadır (36). EF2 bölgesinden sonra ZZ bölgesi adı verilen, yüksek miktarda sistein içeren ve çinko parmak motifi yapısına sahip bölge yer almaktadır (37). WW bölgesi ile EF1 ve ZZ bölgeleri de distrofin proteininin β -dystroglikan proteini ile bağlantı kurması için gereklidir. EF1 ve ZZ bölgeleri, WW bölgesinin β -dystroglikan proteini ile bağlantısını güçlendirici etkiye sahiptir. ZZ bölgesi ise EF1 bölgesi ile bağlantı kurar. ZZ bölgesinde meydana gelen G10227A yanlış anlamlı mutasyonu, C3340Y mutasyonlu distrofin proteini oluşumuna neden olmaktadır. Bu mutasyon distrofin proteinin β -dystroglikan proteinine bağlanmasını bozar ve DMD fenotipinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Distrofin proteini C-terminal bölgesinde rod bölgesine benzer olarak α -helikal bobin yapısı içermektedir. Bu bölgeye bobin yapısı (“coiled coil” (CC)) bölgesi adı verilmektedir. Distrofin proteini, sintrofin, distrobrevin proteinleriyle ve diğer ilişkili olduğu proteinlerle bu bölgeden bağlantı kurmaktadır. Distrofin proteinin içerdiği aktin bağlayıcı bölgesi, rod bölgesi, sisteinden zengin bölge ve C-terminal bölgesi otozomal homologu olan 395 kDa moleküler ağırlığındaki utrofin proteini ile benzerlik göstermektedir (38).

Utrofin, fetal dönemde kas dokusunda bulunan büyük bir hücre iskeleti elemanıdır. Fakat doğumdan sonra bu proteinin normal kas dokularında sentezlenmesi azalmaktadır. Utrofin proteini, normal yetişkin kas dokularında miyotendonlar ve nöromusküler birleşme bölgelerinde yer almaktadır. Utrofin, spektrin ailesi üyesi olan

proteinlerdendir. Bu aile üyesi olan proteinler aktin proteini bağlama bölgelerinde tek veya birden fazla kalponin homolojisi gösteren CH bölgeler içerir. Utropin proteininde yer alan CH bölgeleri distrofin proteinine göre farklı heliks yönlendirmesi içermektedir. Bu nedenle utropinin aktin proteiniyle distrofine göre farklı kuvvette ve yapıda bağlantı kurmaktadır (32). Utropin proteininin rod bölgesinde 22 spektrin benzeri tekrarlar vardır. Ayrıca bu tekrarların arasında dört tane menteşe gibi görev yapan bölgeler bulunmaktadır. Sisteinden zengin ve karboksi uç bölgeleri, utropin proteininin sarkolemmaya bağlanabilmesi açısından önem taşımaktadır. Utropin proteini, β -distroglukan proteinine distrofin proteininden daha az kuvvetle bağlanmaktadır. Bunun nedeninin utropin proteininin ZZ bölgesinin, distrofin proteininkinden farklı yapıya sahip olduğu düşünülmektedir (38). Utropin proteini, distrofin proteini ile yüksek miktarda homoloji göstermektedir. Bu nedenle Duchenne ve Becker müsküler distrofisinde, utropin proteininin terapötik ajan olarak kullanılmasını sağlamabilmek amacıyla yapılan çalışmalar vardır (34).

DMD ve BMD hastalarının yaklaşık olarak %65'inde distrofin geninde delesyon mutasyonu görülmektedir (39). DMD hastalarında delesyon mutasyonlarından dolayı distrofin geninin açık okuma çerçevesi bozulmaktadır. Bu nedenle fonksiyonel distrofin proteini sentezlenememektedir. BMD hastalarında ise mutasyon sonucunda distrofin geninin açık okuma çerçevesi korunmaktadır. Fakat fonksiyonları ve yapısı bozulmuş distrofin proteini üretilmektedir. DMD ve BMD hastalarının %5-10'unda kısmi gen duplikasyonu mutasyonu saptanmıştır. Çerçeve dışı duplikasyon mutasyonları DMD hastalarında, çerçeve içi mutasyonlar ise BMD hastalarında daha sık rastlanmaktadır. Tüm DMD ve BMD hastalarının 1/3'lük kısmında ise nokta mutasyonu görülmektedir (40).

İskelet kasının normal fonksiyonlarını yerine getirmesi ve canlılığını sürdürebilmesi için hücre içi kalsiyum iyon konsantrasyonunu sıkı bir kontrol altında tutması gerekmektedir. Kalsiyum iyon konsantrasyonu hücre içi sinyal iletimi sırasında iskelet kası sitoplazmasında artmaktadır. Fakat kasın normal dinlenme durumunda sitoplazmik kalsiyum iyon konsantrasyonu düşük seviyelerdedir. Membrandaki iyonik kanallar ve taşıyıcılar, hücresel kalsiyum düzenleyicileri, kalsiyum depolayıcı organeller, kalsiyum iyonunun hücre içinde normal fizyolojik sınırlar içinde kalmasını sağlamaktadır. Fakat kas lifinin zarar gördüğü bazı müsküler distrofi hastalıklarında

iskelet kasındaki hücre içi kalsiyum iyon konsantrasyonu artmaktadır. Yapılan araştırmalarda Duchenne müsküler distrofi hastalarının iskelet kası hücrelerinde kalsiyum iyon konsantrasyonun arttığı gösterilmiştir (41).

2.3. Kavşak Tipi Kas Distrofisi (“Limb-Girdle Müsküler Distrofi” (LGMD))

Kavşak tipi kas distrofileri (“Limb-Girdle müsküler distrofiler” (LGMD)), kalça ile omuz kavşak kaslarının güçsüzlüğü ve kaybıyla karakterize bir müsküler distrofik hastalık grubudur. Bu grup, çok sayıda farklı gende bulunan genetik mutasyona bağlı olarak geniş ve farklılıklar içeren klinik tablolara sahiptir. Kalıtım şekline göre iki grup limb-girdle müsküler distrofisi vardır. Bunlar otozomal dominant ve resesif geçişli limb-girdle müsküler distrofi çeşitleridir (5). Son on yıl içinde on sekiz tane LGMD geni haritalanmıştır. Bunların yedi tanesi otozomal dominant, on bir tanesi ise otozomal resesif kalıtmalıdır. Otozomal dominant limb-girdle müsküler distrofiler, otozomal resesif kalıtmalı olanlardan daha nadir görülmektedir (42).

Bu grup hastalıkların klinik ilerleyişi, oldukça fazla değişkenlik göstermesiyle karakterize edilmektedir. Ağır klinik tablo gösteren çeşitleri yaşamın ilk on yılı içinde başlar ve hızlı ilerleyiş göstermektedir. Hafif klinik tablo gösteren çeşitleri ise geç yaş başlangıcı ve yavaş ilerleme göstermektedir (43).

2.3.1. Sarkoglikanopatiler

Otozomal resesif limb-girdle müsküler distrofi alt grubu olarak yer alan sarkoglikanopatiler, δ -, γ -, β - ve α -sarkoglikan proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır (8-11). Bu hastalık grubunda omuz ve kalça kasları başlıca etkilenen kas grubudur. Hastaların serum kreatin kinaz seviyesi değişik derecelerde yüksektir (43).

2.3.1.1. α -Sarkoglikanopati (Limb-Girdle Müsküler Distrofi Tip 2D)

1992 yılında adhalin (α -sarkoglikan) adı verilen 50kDa’luk proteininin eksikliğinde ağır çocukluk çağı otozomal resesif müsküler distrofi hastalığının ortaya çıktığı bildirilmiştir (12). Bu ağır çocukluk çağı otozomal resesif müsküler distrofi hastalığının klinik patolojisi, Duchenne müsküler distrofisi hastalığına benzetilmiştir. Her iki müsküler distrofide de hastalar ağır kas hücresi nekrozuna bağlı olarak hayatlarını kaybetmektedir. 1994 yılında α -sarkoglikan geni kromozom 17q12-q21.33 bölgesinde haritalanmıştır ve klonlanmıştır. Ayrıca bu proteinin distrofin glikoprotein

kompleksinde yer alan sarkoglikan proteinlerinden oluşan kompleksin üyesi olduğu bulunmuştur (13).

Limb-Girdle müsküler distrofi tip 2D (LGMD2D) hastalığı değişik coğrafik bölgelerde görülebilmektedir (44). LGMD2D hastalığı, hafiften ağıra kadar çeşitli şiddetteki klinik tablolara sahiptir. Hastalığın klinik olarak ağırlığı, α -sarkoglikan genindeki mutasyon tipine bağlı olarak, oluşan protein miktarıyla ilişkilidir. Fakat aynı mutasyon çeşidini taşıyan ve farklı klinik tablo gösteren hastalar da vardır. LGMD2D hastalarında semptomlar beş yaş civarında kalça ve omuz kavşak kaslarındaki güçsüzlükle başlamaktadır. Distrofik değişimler, iskelet kas dokusunun immünohistokimyasal olarak incelemesiyle belirlenebilmektedir. Genç hastalarda serum kreatin kinaz seviyesinde belirgin bir artış vardır. Fakat yaş olarak daha büyük hastalarda serum kreatin kinaz seviyesinde daha ılımlı bir artış vardır (45). Hastalarda nadir de olsa kardiyolojik bozukluklar görülebilmektedir (46). LGMD2D’de α -sarkoglikan proteini eksikliğine bağlı olarak β - ve δ -sarkoglikan proteinlerinin kas hücresi membranında bulunmadığı gözlenmiştir. Fakat üç sarkoglikan proteini eksik olmasına rağmen γ -sarkoglikan proteini hücre membranındaki yerini korumaktadır (14).

2.3.1.2. β -Sarkoglikanopati (Limb-Girdle Müsküler Distrofi Tip 2E)

β -sarkoglikan genindeki mutasyonlar limb-girdle müsküler distrofi tip 2E (LGMD2E) hastalığına neden olmaktadır. Ağır veya hafif klinik fenotipe sahip LGMD2E hastaları vardır. β -sarkoglikan proteini sentezi ile klinik fenotip arasında zayıf bir ilişki bulunmuştur. Limb-Girdle müsküler distrofi tip 2E hastaları klinik tablo olarak α -sarkoglikanopatilere benzemektedir. Hastaların serum CK seviyesinde ılımlı yükselme görülmektedir (9). Bu hastalıkta kalça ve omuz kavşak kasları etkilenen kas grubudur. Hastalarda kardiyolojik ve solunum sistemi bozuklukları görülebilmektedir (46). LGMD2E’de kas hücresi membranlarında β -sarkoglikan proteininin yokluğuna bağlı olarak γ -, α - ve δ -sarkoglikan proteinlerinin de eksikliği saptanmaktadır (14).

2.3.1.3. γ -Sarkoglikanopati (Limb-Girdle Müsküler Distrofi Tip 2C)

Limb-Girdle müsküler distrofi tip 2C (LGMD2C), Kuzey Afrika’da yaygın olarak görülen bir hastalıktır (15). Önceleri bu hastalık ağır çocukluk çağı otozomal resesif müsküler distrofisi veya DMD benzeri müsküler distrofi olarak anılmıştır. Proksimal kaslardaki ilerleyici güçsüzlük ve erken çocukluk çağı başlangıcıyla karakterize bir hastalıktır (44). Kalça ve omuz kavşak kasları etkilenen kas grubudur

(46). LGMD2C hastalarından alınan iskelet kası biyopsilerinde DMD hastalarındakine benzer olarak kas liflerinde değişiklikler ve kas dokusunun yerini alan bağ dokusu ile yağ dokusu gözlemlenmektedir. Hastaların baldırlarında hipertrofi vardır ve serum CK seviyeleri yüksektir (44). LGMD2C hastalarının iskelet kası biyopsilerinin immünokimyasal yöntemle boyanması sonucunda γ -sarkoglikan proteininin kas dokusunda var olmadığı görülmüştür. Bu hastaların iskelet kası dokularında α - ve β -sarkoglikan proteinlerinin de azaldığı saptanmıştır.

γ -sarkoglikan genindeki tek bir mutasyon Kuzey Afrika'daki limb-girdle müsküler distrofi tip 2C hastalarının büyük bir kısmında hastalığın ortaya çıkma nedenidir. Bu mutasyon, $\Delta 521$ -T'dir. Belirlenen bu mutasyon γ -sarkoglikan genin açık okuma çerçevesinin değişmesine neden olmaktadır. Japon hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda, γ -sarkoglikan genindeki 73 bp'lik delesyon mutasyonunun LGMD2C hastalığına yol açtığı gözlenmiştir. Ayrıca yapılan araştırmalarda bir ailedeki γ -sarkoglikan genindeki aynı mutasyonların farklı hastalık fenotiplerine neden olabileceği saptanmıştır. Bu nedenle LGMD2C hastalarında görülen hafif ve ağır tipteki farklı klinik fenotipler, γ -sarkoglikan geninde belirlenen mutasyon dışında, çevresel faktörler veya farklı mutasyon odakların nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir (10).

2.3.1.4. δ -Sarkoglikanopati (Limb-Girdle Müsküler Distrofi Tip 2F)

Limb-Girdle müsküler distrofi tip 2F (LGMD2F), δ sarkoglikan genindeki mutasyon sonucu ortaya çıkan ve ağır DMD benzeri fenotipe sahip bir hastalıktır (11). Hastalık erken çocukluk çağında veya daha ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Hastalarda merdiven çıkmada, ayağa kalkmada, koşmada güçlük görülmektedir ve iskelet kaslarında güçsüzlük vardır. LGMD2F hastalarının serum kreatin kinaz seviyeleri yüksektir (47). Kalça ve omuz kavşak kasları başlıca etkilenen kas gruplarıdır. Hastalarda kardiyolojik sorunlar da ortaya çıkabilmektedir. (46).

2.3.1.5. Sarkoglikan Proteinlerinin Moleküler Özellikleri

Sarkoglikanlar, transmembran glikoproteinleridir. δ (delta)-, γ (gama)-, β (beta)-, α (alfa)-, ζ (zeta)- ve ϵ (epsilon)-sarkoglikan olmak üzere altı tane sarkoglikan proteini vardır. Bu proteinler tarafından oluşturulan sarkoglikan kompleksleri kas hücresi membranının yapısında yer almaktadır. Bu protein kompleksi, hücre membranının fizyolojik fonksiyonunu yerine getirmesi ve yapısal bütünlüğünü koruması için gerekmektedir (14).

α -sarkoglikan geni kromozom 17q21 bölgesinde yer almaktadır ve yaklaşık olarak 50kDa moleküler ağırlığa sahiptir. İnsan α -sarkoglikan cDNA'sı 1410 nükleotid ve sahip olduğu açık okuma dizisi ise 1161 nükleotid içermektedir (44). α -sarkoglikan ve homoloğu olan ε -sarkoglikan proteini sinyal iletim yollarıyla ilişkili olan kadherin benzeri bölge içermektedir. Bu bölgenin α - ve ε -sarkoglikan proteinlerinin diğer glikoproteinlerle bağlantı kurmasında yer aldığı düşünülmektedir (48).

α -sarkoglikan, diğer sarkoglikan proteinleri eksikliklerinde azalmış miktarda da olsa plazma membranında belirlenebilmektedir. Bunun nedeni α -sarkoglikan proteininin hücre içinde klatrin kaplı veziküller ve miyotübül sistemiyle ilişkili bir trafiğe sahip olmasıdır. Ayrıca mutasyona sahip α -sarkoglikan proteinlerinin plazma membranına taşınmadığı ve diğer sarkoglikan proteinleriyle bağlantı oluşturmadığı gösterilmiştir (13).

β -sarkoglikan geni kromozom 4q12 bölgesinde yer almaktadır ve yaklaşık olarak 43 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. β -sarkoglikan cDNA'sı, 1225 nükleotid ve sahip olduğu açık okuma dizisi 956 nükleotid içermektedir (44). β -sarkoglikan proteininin hücre dışı bölgesi 229 amino asit, hücre içi bölgesi 63 amino asit ve transmembran bölgesi 26 amino asit içermektedir. β -sarkoglikan proteini, hücre dışı bölgesinden β -distroglikan proteinine bağlanmaktadır (14).

γ -sarkoglikan geni kromozom 13q12 bölgesinde yer almaktadır. γ -sarkoglikan proteini yaklaşık olarak 35 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. γ -sarkoglikan cDNA'sının sahip olduğu açık okuma dizisi 873 nükleotid içermektedir (44). γ -sarkoglikan proteininin hücre dışı bölgesi 231 amino asit, hücre içi bölgesi 35 amino asit ve transmembran bölgesi 25 amino asit içermektedir. γ -sarkoglikanın dış karboksi terminal bölgesi hücre dışında yer alır ve çok sayıda korunmuş sistein bölgesi içermektedir (10). γ -sarkoglikan mRNA'sı iskelet kası ve kalp kasında yüksek miktarda sentezlenmektedir. Akciğer, deri ve omurilikte orta seviyede, beyin ve aorta da ise az miktarda γ -sarkoglikan mRNA'sı sentezlenmektedir (49).

Elektronik bilgi tabanlarında yapılan araştırmalarında γ -sarkoglikan proteininin amino asit dizisinin β -sarkoglikan proteini ile homoloji gösterdiği görülmüştür. γ - ve β -sarkoglikan proteinleri arasındaki homoloji, dış karboksi uç bölgelerindeki sistein içeren bölgede de göze çarpmaktadır. Sarkoglikan proteinlerinin sistein içeren bölgesi, epidermal büyüme faktörü ("epidermal growth factor" (EGF)) benzeri sistein tekrarları

içeren proteinlerle benzerlik göstermektedir. EGF benzeri sistein tekrarları içeren diğer proteinlerden farklı olarak, γ - ve β -sarkoglikan proteinleri hücre dışı bölgelerinde sadece tek bir sistein tekrar bölgesi içermektedir. γ -sarkoglikan proteininin sisteinden zengin bu hücre dışı bölgesi herhangi bir molekül ile ilişki kuran bir bölge olabileceği düşünülmektedir (10). Ayrıca bu proteinin çizgili kasın büyüme veya yapısını korumasıyla ilgili bir göreve sahip olabileceğini de işaret etmektedir. γ -sarkoglikan proteininin karboksi kısmında bozukluğa yol açan bir mutasyon, kas dokusunda β -, δ - ve α -sarkoglikan proteinlerinin miktarlarında azalmaya neden olmaktadır. Bu nedenle γ -sarkoglikan proteininin karboksi uç kısmı, sarkolemmada proteinin varlığını ve yapısını etkilediği gibi α - ve β -sarkoglikan proteinleriyle olan etkileşiminde de rol almaktadır (49).

δ -sarkoglikan geni kromozom 5q33 bölgesinde yer almaktadır. δ -sarkoglikan proteini yaklaşık olarak 35 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. δ -sarkoglikan cDNA'sı 870 nükleotid içermektedir.(44). δ -sarkoglikan proteininin hücre dışı bölgesi 231 amino asit, hücre içi bölgesi 34 amino asit ve transmembran bölgesi 25 amino asit içermektedir. δ -sarkoglikan asidik, γ -sarkoglikan ise bazik yapıya sahip bir protein olmasına rağmen amino asit dizileri arasında benzerlik vardır (11).

Sarkoglikan protein ailesinin beşinci üyesi ϵ -sarkoglikan proteindir. Yaklaşık olarak 48-50 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Epsilon sarkoglikan geni 12 ekson içermektedir. ϵ -sarkoglikan proteini, α -sarkoglikan proteini ile homoloji göstermektedir ve çeşitli dokularda sentezlenmektedir. ϵ -sarkoglikan, tek membran geçişli tip 1 transmembran proteindir. Proteinin hücre dışı bölümü N-bağlı glikozillenmiş bölgesinde beş tane sistein bölgesi içermektedir (50). Epsilon sarkoglikan proteini bir çok insan dokusunda sentezlenmektedir. Kas, akciğer, böbrek, dalak, testis ve beyin dokusu epsilon sarkoglikanın sentez edildiği dokulardır (51).

Son bulunan sarkoglikan protein ailesi üyesi ise ζ (zeta)-sarkoglikandır. Bu protein kromozom 8p22 yer alan gen bölgesinde kodlanmaktadır. ζ -sarkoglikan cDNA'sı 1.7 kb uzunluğundadır. Bu protein γ - ve δ -sarkoglikan proteinleriyle homoloji göstermektedir (14).

α -sarkoglikan proteini tip 1 transmembran proteindir. β -, γ - ve δ -sarkoglikan proteinleri ise tip 2 transmembran proteinleridir. α - ve γ -sarkoglikan proteinleri iskelet ve kalp kasında daha yoğun olarak sentezlenirken, β - ve δ -sarkoglikan proteinleri farklı

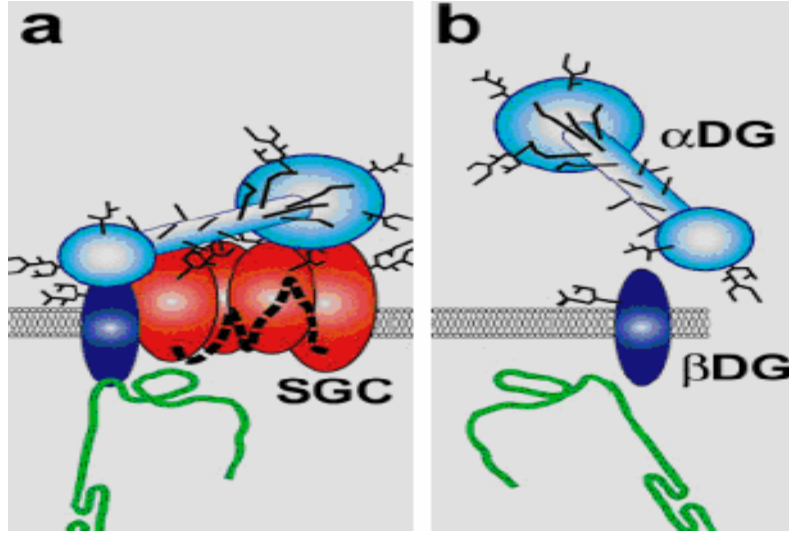
birçok dokuda sentezlenmektedir (10). Herhangi bir sarkoglikan proteininde olan bir mutasyon diğer üç sarkoglikan proteinin de sarkolemmada azalmasına veya eksilmesine neden olmaktadır. Çünkü sarkoglikan proteinlerinin herhangi birindeki bir bozukluk sarkoglikan kompleksinin oluşumunu engellemektedir (Şekil 2-2) (14).

Sarkoglikan proteinlerini kodlayan tüm genlerde çok sayıda farklı mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar, yanlış anlamlı mutasyon, kırpılma mutasyonu, anlamsız mutasyon, küçük ve geniş gen delesyonları mutasyonlarıdır (42). Genel olarak ağır hastalık fenotipi anlamsız veya çerçeve kayması mutasyonlarında görülmektedir. Hafif hastalık fenotipi ise yanlış anlamlı mutasyonlarda görülmektedir (47).

Sarkoglikan proteinlerinin hücre dışı bölgeleri β -tabaka ve çevirim yapılarından zengindir. Ayrıca bu bölgeler çok sayıda α -heliks yapısı ve glikozillenmiş bölgeler içermektedir. δ -, β - ve γ -sarkoglikan proteinleri hücre dışı C-terminal bölgesinde sistein bulunmaktadır. Fakat α -sarkoglikan proteinini hücre dışı transmembran bölgesine yakın kısmında sistein içermektedir. α -sarkoglikan proteininin C-terminal sonlanma bölümü hücre içinde yer almaktadır. Fakat γ -, β - ve δ -sarkoglikan proteinlerinin N-terminal sonlanma bölümü hücre içinde yer almaktadır. (44). Yapılan çalışmalarda sarkoglikan proteinlerinin hücre dışında kalan ve birbirinde farklı fonksiyona sahip bölgelerinin proteinaz K duyarlı bölgelerle bağlandığı gösterilmiştir. N-terminal yarım bölgeleri, sarkoglikan etkileşimleri için gerekmektedir. β -, δ - ve γ -sarkoglikan proteinlerinin C-terminal yarım bölgeleri, plazma membranı yerleşimi için gerekli olan sisteinden zengin motif ve daha önce tanımlanmamış korunmuş diziler içermektedir. Sisteinden zengin motif, molekül içi disülfid bağları içermektedir ve birçok reseptör kompleksinde yer alan laminin tipi epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri tekrarlar ailesine bağlanmaktadır. Yapılan çalışmaların sonucunda N- terminal ve C-terminal yarım bölgelerinin, sarkoglikan proteinleri arasındaki etkileşim ve bu proteinlerin plazma membranına yerleşimi için gerekli olduğu saptanmıştır (52).

Fonksiyonel analiz çalışmalarında sarkoglikan proteinlerinin C-terminalindeki sisteinden zengin motiflerinde ve korunmuş dizilerinde meydana gelen mutasyonların sarkoglikan proteinlerinin etkileşimini bozmadığını fakat hücre yüzeyine yerleşimlerini etkilediği gözlemlenmiştir (52). Yapılan çalışmalarda β -sarkoglikan proteininin N-bağlı glikozilasyonunun, δ -sarkoglikan proteinine bağlantı kurması ve hücre membranında sarkoglikan kompleksinin yerleşmesi açısından gerekli olduğu gösterilmiştir. β -

sarkoglikan proteininin glikozilasyonundaki bozukluk hücre içinde birikmesine neden olur ve diğer sarkoglikan proteinleriyle bağlantı kurması engellemektedir. Bu da β -sarkoglikan proteininin N-bağlı glikozilasyonundaki bozukluğun, diğer proteinlerle bağlantı kurmasını, hücre membranına yerleşimini ve taşınmasını etkilediğini işaret etmektedir (53).



Şekil 2-2: Sarkoglikanopatilerin moleküler mekanizması.

a) Normal sarkoglikan protein kompleksi yapısı ile distrofin proteininin C-terminal bölgesinin bağlantısı görülmektedir. (b) Sarkoglikan protein kompleksi olmadığı zaman distrofin proteininin bağlantısının bozulduğu görülmektedir. SGC: Sarkoglikan protein kompleksi, αDG: α-distroglikan proteini, βDG: β-distroglikan proteini (14).

Sarkoglikan, sarkospan ve distroglikan proteinleri transmembran protein ailesi üyesi oldukları için endoplazmik retikulumda sentezlenmektedir. Sarkoglikanlar sentezlendikten hemen sonra glikozillenmektedir. Distroglikan proteinleri ise endoplazmik retikulumdan hücre membranına golgi aygıtı ile taşınırken glikozillenmektedir. Sarkospan proteini ise glikozillenmemiş olarak hücre membranında görev almaktadır (14).

Sarkoglikan proteinlerinin birbirleriyle bağlantı kurması basamaklardan oluşan bir yol izlemektedir. β -sarkoglikan proteini, β -/ δ -sarkoglikan protein kompleksinin oluşumunda δ -sarkoglikan proteini ile etkileşime girerek bağlantı oluşturmaktadır. Bu β -/ δ -sarkoglikan kompleksi, sarkoglikan proteinlerinin bağlantı kurması ve membrana yerleşmesi işlemi için gerekmektedir. Bir sonraki aşamada γ -sarkoglikan proteini β -/ δ -

sarkoglikan kompleksi ile bağlantı kurmaktadır. En son olarak da α -sarkoglikan proteini bu komplekse eklenerek dörtlü sarkoglikan proteinlerinden oluşan kompleks meydana gelmektedir (52).

α -sarkoglikan proteini üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, bu proteinin γ -sarkoglikan proteini ile transmembran bölgesinden bağlantı kurduğu gösterilmiştir. Sarkoglikan proteinlerinde meydana gelen bir çok mutasyon bu bağlantı işlemlerinin bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir (53). Yapılan delesyon mutasyonu çalışmalarında sarkoglikan proteinlerinin sahip olduğu transmembran bölgesiyle bitişik olan N-terminal yarım bölgesinin proteinler arası etkileşim için önemli bir yere sahip olduğu saptanmıştır. β -sarkoglikan proteininin bu bölgesinde meydana gelen bir mutasyonun δ -sarkoglikan proteini ile bağlantı kurarak β -/ δ -sarkoglikan protein kompleksinin oluşumunu engelleyebileceği gösterilmiştir (52).

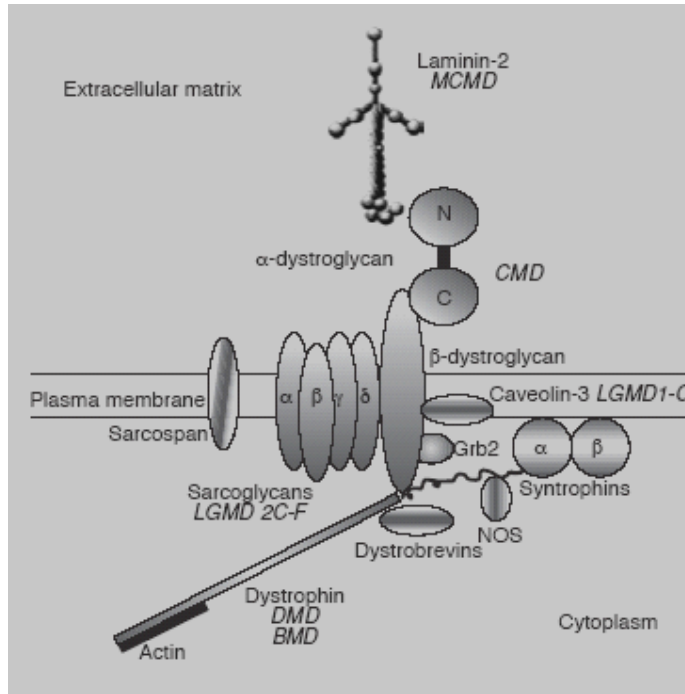
Araştırmacıların hipotezine göre iki çeşit sarkoglikan proteinlerinden oluşan ve kas dokusu membranında yer alan kompleks yapısı vardır. Bunlarda birincisi δ -, γ -, α - ve β -sarkoglikan proteinlerinden oluşan komplekstir. Bu kompleksin çizgili ve kalp kasında yer aldığı düşünülmektedir. İkinci kompleksin ise β -, δ -, ζ - ve ϵ -sarkoglikan proteinlerinden oluştuğu ve damar düz kasında yer aldığı düşünülmektedir (54).

2.4. Miyoklonus Distoni Sendromu

Miyoklonus distoni sendromu, kromozom 7q21'de yer alan, ϵ -sarkoglikan genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan otozomal dominant kalıtmımlı bir hareket bozukluğu hastalığıdır. 1999 yılında miyoklonus distoni sendromu geninin kromozom 7q21-q31 bölgesindeki 28 cM'lik bölgeyle bağlantılı olduğu bulunmuştur ve 2001 yılında ϵ -sarkoglikan geni olarak belirlenmiştir. ϵ -sarkoglikan, α -sarkoglikanla homoloji gösteren transmembran glikoproteinidir. ϵ -sarkoglikan genindeki anlamsız mutasyon, yanlış anlamlı mutasyon, kırılma bölgelerindeki mutasyonlar, delesyonlar mutasyonları ve insersiyonlar mutasyonları hastalığa yol açabilmektedir. Miyoklonus distoni sendromu, kollar ve aksial kaslardaki miyoklonik refleks ve distoni ile karakterize bir hastalıktır. Hastalık sıklıkla çocukluk ve erken ergenlik döneminde görülmektedir. Miyoklonus, alkole bağlı kısa süreli refleksler ile başlamaktadır. Distoni ise hastalığın daha ilerleyen dönemlerinde görülür ve miyoklonustan daha merkezi tutulum göstermektedir (55).

2.5. Distrofin Glikoprotein Kompleksi

Distrofin glikoprotein kompleksi (“Dystrophin glycoprotein complex” (DGC)), hücre iskeleti, hücre membranı ve hücre dışı matris arasında mekaniksel bir bağ oluşturmaktadır. Bu kompleks, sinyal iletimi ve mekaniksel sağlamlık sağlama görevlerine de sahiptir. Distrofin glikoprotein kompleksi, transmembran, sitoplazmik ve hücre dışı proteinlerden oluşmaktadır. Distrofin glikoprotein kompleksi, distrofin, sarkoglikan kompleksi, distroglikanlar, distrobrevin, sintrofinler, sarkospan, kaveolin-3 ve nitrik oksit sentaz (NOS) proteinlerinden oluşmaktadır (Şekil 2-3) (56). DGC, kalp ve iskelet kası hücreleri membranlarında farklı birleşim göstermektedir (30).



Şekil 2-3: Distrofin glikoprotein kompleksinin (DGC) şematik çizimi.

Distrofin glikoprotein kompleksi, periferik ve integral membran proteinlerinden oluşmaktadır. Bu proteinler hücre iskeleti elemanı olan F-aktin ve hücre dışı matris arasında bağlantı kurmaktadır. Distrofin, sintrofin ve distrobrevin DGC'nin hücre içindeki elemanlarıdır. β-, α-, γ- ve δ-sarkoglikan, α- ve β-distroglikan, sarkospan DGC'nin transmembran proteinlerini oluşturmaktadır. Bir çok müsküler distrofi tipi DGC'nin elemanı olan proteinlerdeki veya bunlarla ilişkili proteinlerdeki mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. DMD, distrofin proteininin eksikliği; BMD ise yapısı bozuk distrofinin sentezi nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Limb-Girdle müsküler distrofiler ise sarkoglikan veya kaveolin-3 proteinlerinin herhangi birindeki mutasyon sonucu oluşmaktadır. Laminin-2 eksikliği veya α-distroglikan proteinin glikoziltransferazlardaki bozukluk sonucu hipoglikozilasyonu konjenital müsküler distrofilere neden olmaktadır. DMD: Duchenne müsküler distrofi, BMD: Becker müsküler distrofi, NOS: Nitrik oksit sentaz, CMD: Konjenital müsküler distrofi, MCMD: Merozin eksikliğine bağlı konjenital müsküler distrofi, LGMD 2C-F: Limb-Girdle müsküler distrofi tip 2C-F, LGMD 1-C: Limb-Girdle müsküler distrofi tip 1C (56).

Distrofin proteininin içerdği C-terminal bölgeleri, sarkolemma ile hücre matriksi arasında köprü görevi görmektedir. Bu bölgeler aracılığıyla distrofin proteini membran glikoprotein kompleksinin elemanı olan hücre içi ve dışı membran proteinleriyle bağlantı kurmaktadır. Bu proteinler, α - ve β -distroglikan, sarkoglikan kompleksi (β -, α -, γ - ve δ -sarkoglikan) ve sarkospan proteinleridir. Distrofin proteininin C-terminal bölgesi, plazma membranındaki NOS, ErbB4 reseptör kinaz ve voltaj kapılı sodyum kanallarıyla ilişki kuran, distrobrevin ve sintrofin proteinleriyle de bağlantı kurmaktadır (4, 57).

Distrofin glikoprotein kompleksi, kas hücresi iskeleti ile hücre dışı matriks arasındaki bağlantıyı ve kas kasılması boyunca plazma membranındaki mekanik korumayı sağlamaktadır (58). Distrofin glikoprotein kompleksi'nin yapısal fonksiyonu yanında kalmodulin, NOS ve Grb2 gibi sinyal iletili moleküllerle bağlantı kurarak hücreler arası haberleşmede de yer aldığı düşünülmektedir (1).

Sarkoglikan kompleksi, α -, β -, γ - ve δ -sarkoglikan proteinlerinden oluşmaktadır. Bu kompleks sarkolemmada yer almaktadır. Bu proteinlerin herhangi birinin mutasyon sonucu eksikliğinin oluşması, diğer sarkoglikan kompleksi proteinlerinin de sarkolemmadaki miktarlarının azalmasına veya eksikliklerine yol açmaktadır (59). Özellikle δ - ve β -sarkoglikan proteinlerinin mutasyon sonucu sarkolemmada var olmaması tüm sarkoglikan protein kompleksinin eksikliğine neden olmaktadır (60, 61). Distrofin proteininin sentezi ve varlığı sarkoglikanopatilerde değişmemektedir. Fakat DMD hastalarında sarkoglikan proteinlerinin miktarı azalmakta ve sarkoglikan kompleksinin bütünlüğü bozulmaktadır (62). DMD'li hastalarda distrofin proteinindeki eksiklik genel olarak tüm distrofin glikoprotein kompleksi elemanlarının sarkolemmada yerleşiminin bozulmasına ve azalmasına neden olmaktadır (63).

Sarkospan proteini, tetraspin protein ailesi üyesidir ve hidrofobik özelliktedir. Plazma membranındaki varlığını koruyabilmesi için sarkospan, sarkoglikan protein kompleksine ihtiyaç duymaktadır. Sarkospan proteini bulunmayan fare kas dokularında distrofin glikoprotein kompleksi elemanı proteinlerinin varlığında ve yerleşiminde değişim olmadığı gözlemlenmiştir (64).

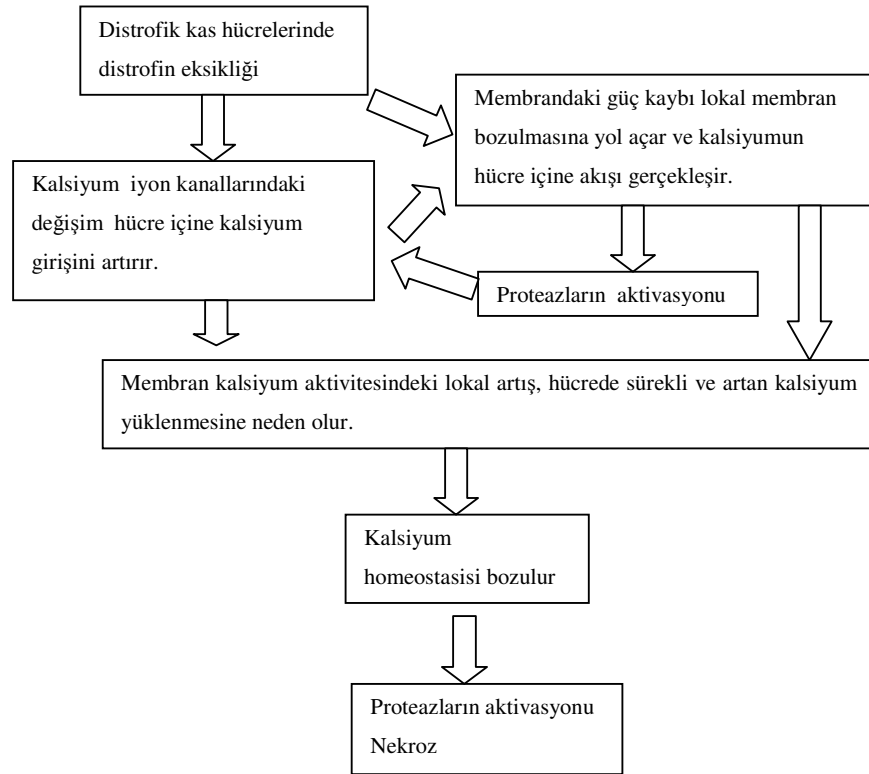
α - ve β -distroglikan proteinleri, hücre içi ve hücre dışı matriksle bağlantı kurulmasında yer alan önemli DGC elemanlarıdır (65). β -distroglikan proteini, distrofin proteininin karboksil terminal bölgesi ile bağlantı kurmaktadır. β -distroglikan,

sarkoglikan proteinleri, kaveolin-3, rapsin ve Grb2 ile de bağlantı kurmaktadır. Grb2, β -dystroglikan aracılı sinyal iletim yollarında yer almaktadır (66). β -dystroglikan, dystrofin proteininiyle bağlantı kurduğu bölgeden kaveolin-3 proteini ile de bağlantı kurmaktadır. β -dystroglikan proteini, amino terminal bölgesi aracılığıyla α -dystroglikan proteinine bağlanmaktadır. α -Dystroglikan proteini ise hücre dışı matriks elemanı olan laminin $\alpha 2$ ile bağlantı oluşturmaktadır (67). α -Dystroglikan proteini, agrin, perlecan ve biblikan ile de bağlantı kurmaktadır (65). Dystroglikan proteinleri, nöromusküler bağlantı bölgesinde nikotinik asetil kolin reseptörlerinin olgunlaşmasında ve yerleşimin sağlanmasında da görev almaktadır (68). DMD'li hastalarda α - ve β -dystroglikan proteinlerinin eksikliği görülmektedir. Limb-Girdle musküler distrofi ve konjenital musküler distrofili hastalarda ise α -dystroglikan proteininin ikincil eksikliği görülmektedir (69).

Sintrofin, 58 kDa ağırlığında bir proteindir ve dystrofin proteininin karboksi terminal bölgesine bağlanmaktadır (70). Sintrofin ayrıca nöral nitrik oksit sentaz (nNOS), fosfotidilinozitol 4,5-difosfat (PIP2), kalmodulin, ve Grb2 ile de bağlantı oluşturmaktadır (71). nNOS, vazokonstriksiyon durumunda sentezlenerek vazodilatasyon sağlamaktadır. Dystrofin eksikliği ve sarkoglikan eksikliğine bağlı limb-girdle musküler distrofilerde, nNOS plazma membranında bulunmamakta veya miktarı azalmaktadır. Bu nedenle hastalarda anormal kas kasılmaları sorunu ortaya çıkmaktadır (72). α -Distrobrevin, dystrofin proteininin sisteinden zengin ve karboksi terminal bölgeleriyle homoloji gösteren bir proteindir. Alternatif kırılma sonucu oluşan üç farklı α -distrobrevin izoformu iskelet kasındaki dystrofin glikoprotein kompleksinin elemanıdır. α -Distrobrevin, sahip olduğu CC bölgesi aracılığıyla dystrofin proteinine bağlanmaktadır. α -Distrobrevin, sintrofin proteini ile de bağlantı kurmaktadır. α -Distrobrevin'den yoksun farelerin kas dokularında yapılan çalışmalarda, dystrofin glikoprotein kompleksinin elemanları olan β -dystroglikan, α - ve β -sarkoglikan, dystrofin, sintrofin bulunmasına rağmen nNOS'un olmadığı görülmüştür. Bu nedenle α -distrobrevinin, nNOS ile bağlantı kuran ve sinyal iletimi için aracı bir protein olduğu düşünülmektedir (73).

Dystrofinle ilişkili proteinler hücre içi sinyal ileti yollarında da yer almaktadır. DMD hastalarında dystrofin eksikliğine bağlı olarak iskelet kası hücresinde bulunan bu proteinlerin miktarlarının ve birbirleriyle olan ilişkilerinin bozulduğu gösterilmiştir. Bu

nedenle kas hücresi içine giren ve çıkan iyon konsantrasyonu kontrol altında tutulamamaktadır. Ayrıca hücre içi kalsiyum miktarı artmaktadır. Hücre içine giren kalsiyum iyon konsantrasyonunun girişinin yükselmesi, kalsiyum duyarlı proteolitik ve fosfolitik aktivitelerini artırarak distrofik kas lifinin yıkımına yol açtığı DMD modeli olarak kullanılan farelerin kas hücrelerinde yapılan deneylerde gösterilmiştir (şekil 2-4) (41).



Şekil 2-4: Distrofin proteini eksikliği bulunan kas hücrelerinde kalsiyum homeostasisinin bozulmasına ve nekrozuna neden olan fizyopatolojik yol hipotezi .

Kaveolinler, sinyal iletiminde ve veziküler trafik olaylarında yer alan kaveolaların ana elemanıdır (74). Memeli kaveolin gen ailesi, kaveolin-1, kaveolin-2, kaveolin-3 olmak üzere üç proteinden oluşmaktadır. Kaveolin-1 ve kaveolin-2 birçok dokuda sentezlenmektedir. Kaveolin-3 proteini ise sadece çizgili kas dokusunda sentezlenmektedir. Kaveolin-3, sahip olduğu WW bölgesi aracılığıyla β -distroglikan proteinine bağlanmaktadır (75). Bu proteinin eksikliği veya yokluğu otozomal dominant

limb-girdle müsküler distrofi tip 1C'nin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Limb-Girdle müsküler distrofi tip 1C'de kaveolin-3'n yokluğu, α -dystroglikan proteininin kas lifi yüzeyinde ikincil eksikliğine neden olmaktadır. DMD hastalarında kaveolin-3 proteininin sentezi artmaktadır (74). Sonuç olarak distrofin glikoprotein kompleksinin elemanı olan proteinler birbirleriyle sıkı bir bağlantı içindedir. Bu kompleks içinde yer alan proteinlerin birinin yokluğu kompleksin bozulmasına yol açmaktadır. Bu nedenle de hücre içi iskelet ve hücre dışı matriks arasındaki mekaniksel sinyal iletim bağlantısı bozulmaktadır (30).

2.6. Limb-Girdle Müsküler Distrofi Tip 2B ve Miyoshi Miyopatisi

2.6.1. Limb-Girdle Müsküler Distrofi Tip 2B'nin ve Miyoshi Miyopatisi'nin Klinik zellikleri

Limb-Girdle müsküler distrofi tip 2B (LGMD2B) ve Miyoshi miyopatisi, klinik özellikleri bakımından farklı ancak allelik iki otozomal resesif kalıtmıllı kas hastalığıdır. Bunun nedeni hastalıkların başlangıç dönemlerinde farklı kas gruplarında güçsüzlük görülmesidir. LGMD2B, proksimal tipte müsküler distrofidir. LGMD2B hastalarının çocukluk dönemlerinde yavaş ilerleyen kas güçsüzlüğü ve kaybı vardır. Hastalık bulguları genel olarak erişkinlerde görülmektedir. Hastalarda distal bacağın n kasları ve distal kol kasları genellikle normaldir. LGMD2B'de daha çok ekstremite ve kavşak kasları etkilenmektedir. Hastaların serumlarında CK ve iskelet kasına özgü diğer enzimlerin seviyeleri yüksektir (6).

Miyoshi miyopatisi, alt ekstremite bölgelerini tutan distal bir müsküler distrofidir. Miyoshi miyopatisi, 1967 yılında ilk olarak Miyoshi tarafından tanımlanmıştır. Geç ocukluk veya erken yetişkin döneminde ortaya çıkan baldır kaslarının tutulumu ve serum CK seviyesindeki belirgin ykselmeyeyle karakterize bir hastalıktır. Hastalığın ilk semptomları ayak ucunda durma ve basamak çıkmadaki zorluktur. Miyoshi miyopatisi hastalarında yavaş ilerleyen kas güçsüzlüğü vardır. Bu hastalarda proksimal kas tutulumu hastalığın daha sonraki dönemlerinde meydana gelebilmektedir (76).

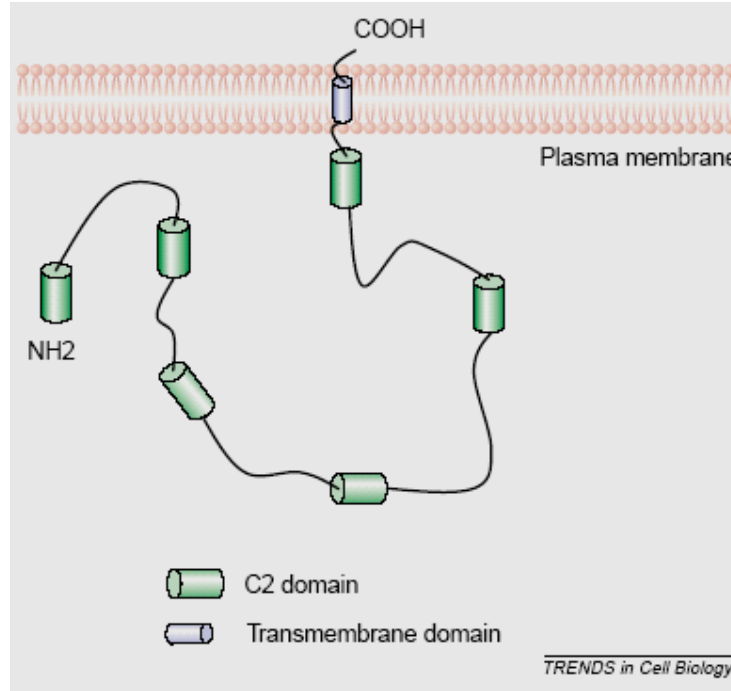
Disferlin geninde meydana gelen mutasyonlar LGMD2B ve Miyoshi miyopatisi hastalıklarının ortaya çıkma nedenidir. Hastalarda bu gendeki çeşitli mutasyonların disferlin proteininin kısmi veya tamamen kaybına yol açtığını gösterilmiştir. Fakat hastalığın klinik fenotipi ile gendeki mutasyonun yeri ve tipi arasında ilişki

kurulamamıştır. Bu nedenle LGMD2B ve Miyoshi miyopati arasında mutasyon analizine bağlı bir ayırım yapılamamaktadır. Ayrıca bir ailedeki aynı disferlin mutasyonu bir bireyde LGMD2B, diğer bireyde ise Miyoshi miyopatisi fenotipine neden olabilmektedir. Bu nedenle hastalardaki farklı klinik bulgulara ve çeşitliliğe yol açan başka genetik faktörlerin olduğu düşünülmektedir (77). Ayrıca LGMD2B ve Miyoshi miyopatisi olan hastaların iskelet kas dokularında kalpain-3 proteininin miktarının azaldığı yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (78)

2.6.2. Disferlin Geninin Ve Proteininin Moleküler Özellikleri

Disferlin geni insanda 2p13 kromozom bölgesinde bulunmaktadır. Bu gen 150 kb büyüklüğündedir ve 55 eksona sahiptir (79). Disferlin geni, iskelet kası, kalp kası, böbrek, plasenta, akciğer ve beyin dokularında sentezlenen 230 kDa ağırlığında protein kodlamaktadır. İskelet kasında yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda disferlin proteininin hücre membranında ve sitoplazmik veziküllerde yer aldığını gösterilmiştir. Disferlin proteininin embriyolarda ekstremitelerin bölgesel değişim göstermeye başladığı beşinci ve altıncı haftalarda ortaya çıktığı belirlenmiştir (80).

Disferlin, tip 2 transmembran proteindir. Disferlin proteinin C-terminal bölgesi membranda ve N-terminal bölgesi ise iskelet kas hücrelerine ait sitoplazmasında bulunmaktadır (Şekil 2-5). Disferlin proteini altı tane C2 bölgesi ve C-terminal bölgesinde tek bir transmembran bölge içermektedir (5). C2 bölgeleri, ilk olarak protein kinaz C’de ikinci sabit dizi olarak tanımlanmıştır. C2 bölgeleri, 120-140 amino asitlik bağımsızca katlanan protein bölgeleridir (81). Bunlar sinyal iletimi, vezikül trafiği ve membran birleşiminde yer alan bir çok proteinde yer almaktadır. Bu bölgelerin fosfolipitler ve proteinlerle ilişki kurdukları bilinmektedir (82). Disferlin proteinin sahip olduğu ilk C2 bölgesi kalsiyum iyonuna bağlı olaylarda fosfolipidlere bağlanmaktadır (83). C2 bölgelerinin hücre içinde iki değişik yolda yer aldığı düşünülmektedir. Bunlardan birincisi sinyal iletim yolunda yer alan ikincil iletiliç lipidlerin geliştirilmesidir. İkincisi yol ise membran birleşmesi ve trafiğidir (82).



Şekil 2-5: Disferlin proteininin yapısı ve topolojisi.

Disferlin proteini C-terminal transmembran bölgesiyle plazma membranına tutunmaktadır. Proteinin N-terminal bölümü sitoplazma içinde yer almaktadır (5).

Disferlinin proteininin yapısı sinaptotagmin proteinlerine benzemektedir. Vertebralılarda sinaptik vezikül birleşimi ve plazma membran onarımı gibi birçok görevde yer alan on üç tane farklı sinaptotagmin proteini vardır. Sinaptotagmin I ve II, sinaptik veziküllerin boşaltımı sırasında kalsiyum algılayıcıları olarak görev yapmaktadır (84). Kalsiyumun ortamdaki mikromolar konsantrasyonuna bağlı olarak protein kinaz C'nin C2 bölgesi membranın fosfadiğerin gibi negatif yüklü lipidlere bağlanmaktadır. Kalsiyum iyonları, C2 bölgesinin yüzeyinde bulunan eksi yüklü amino asitler ile eksi yüklü lipidlerin arasında köprü kurulmasında yer almaktadır. Sinaptotagmin proteinlerinin C2 bölgesi, sinaptik SNARE proteinlerinden sinaptobrevin, SNAP-25 ve sintaksin ile bağlantı kurmaktadır (85). Bu proteinler sinaptik vezikül birleşme mekanizmasının önemli elemanlarıdır. Bu proteinlerin sinaptotagminlerle bağlantı kurması, sinaptik veziküllerin boşaltım sırasında plazma membran ile bağlanması olayına aracılık etmektedir (5).

Disferlinin proteininin yapısı sinaptotagmin proteinlerine benzemektedir. Vertebralılarda sinaptik vezikül birleşimi ve plazma membran onarımı gibi birçok

görevde yer alan on üç tane farklı sinaptotagmin proteini vardır. Sinaptotagmin I ve II, sinaptik veziküllerin boşaltımı sırasında kalsiyum algılayıcıları olarak görev yapmaktadır (84). Kalsiyumun ortamdaki mikromolar konsantrasyonuna bağlı olarak protein kinaz C'nin C2 bölgesi membranın fosfadiplerin gibi negatif yüklü lipidlere bağlanmaktadır. Kalsiyum iyonları, C2 bölgesinin yüzeyinde bulunan eksi yüklü amino asitler ile eksi yüklü lipidlerin arasında köprü kurulmasına yer almaktadır. Sinaptotagmin proteinlerinin C2 bölgesi, sinaptik SNARE proteinlerinden sinaptobrevin, SNAP-25 ve sintaksin ile bağlantı kurmaktadır (85). Bu proteinler sinaptik vezikül birleşme mekanizmasının önemli elemanlarıdır. Bu proteinlerin sinaptotagminlerle bağlantı kurması, sinaptik veziküllerin boşaltım sırasında plazma membran ile bağlanması olayına aracılık etmektedir (5).

Sinaptotagmin VII eksikliği bulunan farelerde geniş fibrosis ile birlikte inflamasyon miyopatisi, yüksek serum kreatin fosfokinaz seviyesi ve ilerleyici kas güçsüzlüğü görülmesinden sonra sinaptotagmin VII aracılı lizosomal eksositoz olayının iskelet kasındaki plazma membran onarımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (85). Ancak sinaptotagmin VII ile disferlin proteinin iki farklı membran onarım mekanizmasında aynı rolü veya aynı membran onarım mekanizmasında farklı rolleri üstlendikleri konusuna açıklık getirilememiştir (86).

Disferlin proteinin ekspresyonuna farklı fare dokularında bakılmıştır (87). Tüm dokularda yapılan Western blot işleminde 230 kDa büyüklüğünde disferlin proteini belirlenmiştir. İskelet kası, kalp ve böbrek dokularında yüksek ışıma görülmüştür. Mide, akciğer, uterus, karaciğer ve dalak dokularında ise belirgin bir protein bandı görülmüştür. Beyincik, beyin sapı, omurilik ve siyatik sinir içeren sinir sistemi dokularında daha az belirgin bir disferlin proteini bandı belirlenmiştir. Ayrıca beyin sapı ve omurilik dokularında yaklaşık olarak 60 kDa , siyatik sinirde ise 40 kDa ek bir zayıf bant görülmüştür. Bu ek bantlar disferlin proteininin ek bir transkribinin olabileceğini işaret etmektedir (80).

2.6.3. Disferlin Proteininin Görevleri

Disferlin geninin *C.elegan*'nın fer-1 geni ile olan yapısal benzerliği, disferlin proteinin kas hücrelerindeki vezikül trafiği ve membran füzyonunda rol alabileceğini işaret etmektedir. Disferlin proteinin ilk C2 bölgesi kalsiyuma bağlı olarak fosfolidiplere bağlanmaktadır. Bu bölgedeki yanlış anlamlı mutasyon her iki LGMD2B

ve Miyoshi miyopati’de de tanımlanmıştır. İn vitro çalışmalarda ilginç olarak ilk C2 bölgesindeki mutasyonun artmış kalsiyum konsantrasyonunda disferlin proteininin fosfolipidlere bağlanmasını değiştirdiği gözlemlenmiştir (83). Bu çalışmalar disferlin proteininin C2 bölgesinin, membran fosfolipidlerine kalsiyum aracılı olarak bağlanılmasında önemli bir rolü üstlendiğini göstermektedir. Ayrıca disferlin proteininin iskelet kas hücrelerindeki vezikül trafiği ve membran füzyonunda rol oynadığını da desteklemektedir (5).

Disferlin, distrofin glikoprotein kompleksi için elzem bir protein değildir. Fakat disferlin proteinindeki bozukluk distrofin glikoprotein kompleksi ile ilişkili müsküler distrofilerde değişikliğe neden olmaktadır. Farklı çeşitteki değişik müsküler distrofilerde disferlin sentezi plazma membranında azalmakta ve sitoplazmik veziküller içinde ise artmaktadır (88). Bu müsküler distrofilerde disferlin proteinin yer değişimi nedeni tam olarak açık değildir. Fakat disferlin proteininin görevinin, yer değişimini etkilediği düşünülmektedir. Bu nedenle disferlinin doğrudan veya dolaylı yoldan distrofin glikoprotein kompleksi ile fonksiyonel ilişkisi içerisinde olduğu düşünülmektedir. Fakat disferlin protein eksikliği bulunan farelerde yapılan son çalışmalarda distrofin glikoprotein kompleksi proteinlerinin sentezinin normal, yapısının sağlam ve fonksiyonel oldukları gösterilmiştir. Bu nedenle disferlinden yoksun kas hücrelerinde sarkolemma daha sağlam ve kalıcıdır. Koşma gibi iskelet kaslarında stres yaratan fiziksel egzersizlerde yapısı bozuk sarkolemmaya sahip kas hücreleri yapısı normal içerikli olanlara göre daha dayanıksızdır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ayak değirmeninde yokuş aşağı doğru koşan sağlıklı farelerde meydana gelen hücre membranı zararının disferlin proteininden yoksun farelerde meydana gelen zarardan farklı olmadığı gösterilmiştir. Bu sonuç, disferlinden yoksun farelerin kas hücresi sarkolemmasının yapısal olarak sağlam olduğunu göstermektedir (89). Bu sonuç ayrıca disferlin eksikliği bulunan kasların yıkımında meydana gelen patolojik mekanizmanın, distrofin glikoprotein kompleksi bağlı müsküler distrofilerde oluşan mekanizmadan farklı olduğunu göstermektedir (5).

Plazma membranı, hücrenin yaşamı için önemli olan hücre içi ve hücre dışı matriks bölge arasındaki fiziksel bariyer görevine sahiptir. Plazma membranı tamiri, membran bozukluklarını düzeltmek için kullanılan temel bir hücresel mekanizmadır (90). Disferlin proteini eksikliği bulunan farelerde yapılan çalışmalarda kas

hücrelerindeki membran bozukluklarının onarılamadığını gösterilmiştir. Bu nedenle müsküler distrofilerdeki membran onarımın bozukluğu ve buna bağlı oluşan kas yıkılımının nedeninin disferlin proteininin eksikliğinin olduğunu düşünülmektedir. Disferlin mutasyonu taşıyan hastaların iskelet kas biyopsileri elektron mikroskobu altında incelendiği zaman bozuk plazma membranı, kalın bazal lamina ve bozuk membran altında toplanmış küçük veziküller gibi düzensizlikleri gözlemlenmiştir. Bozuk membranın altında vezikül toplanması gibi membran düzensizlikleri disferlin proteini eksikliği bulunan farelerin iskelet kaslarında da olduğu bildirilmiştir (89). Tüm bu bilgiler sonucunda disferlin eksikliğinde kas hücrelerinin membranlarında bozukluğun oluştuğuna ve bunun nedeninin de plazma membranının onarılamamasından dolayı olabileceğini düşünülmektedir (5). Disferlin proteininden yoksun kas hücrelerinin membran onarma kabiliyeti membran onarım assayı kullanılarak incelenmiştir. Araştırmacılar iskelet kası hücresindeki bozukluğun kalsiyum aracılı olarak etkili bir şekilde onarıldığını gözlemlenmiştir. Fakat aynı membran bozukluğunun disferlin proteini eksikliği bulunan kas hücrelerinde onarılamadığını gözlemlenmiştir (89).

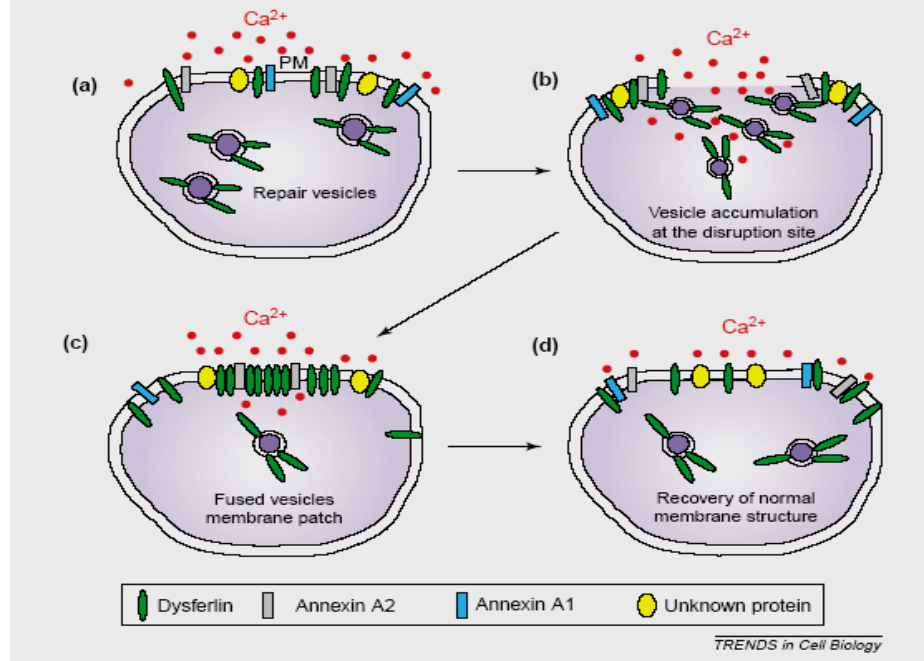
Membran onarım modeline göre hücre membranındaki bozukluk hücre dışındaki kalsiyumun kas lifinin içine doğru birikmesine ve zarar görmüş kısımda kısa süreli bir yüksek kalsiyum konsantrasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle disferlin proteini taşıyan veziküller hasar görmüş ve yüksek konsantrasyonda kalsiyum iyonun bulunduğu membran bölgesine doğru ilerlemektedir. Disferlin proteini plazma membranındaki onarım aşamasında hasarlı bölgedeki disferlin, anneksin ve diğer proteinlerle ilişki kurarak veziküllerin bu bölgeye füzyonunu sağladığı ve veziküllerin plazma membranına füzyonu ile hasarlı bölgenin membran yaması yapılarak kapatılabildiği düşünülmektedir (Şekil 2-6). Ayrıca bu mekanizmanın bozulmasından dolayı da disferlin proteininin eksikliğinin olduğu LGMD2B ve Miyoshi miyopatisi hastalarında membran hasarının kapatılamadığı ve yapısı bozulmuş kas lifinin devamlılığını sağlayamadığı düşünülmektedir (5).

Disferlin proteini, ortamda kalsiyum iyonu bulunan membran hasarlarında anneksin A1 ve A2 proteinleriyle bağlanmaktadır. Disferlin eksikliği bulunan iskelet kasında bu proteinlerin hasarlı bölgedeki dağılımı değişmektedir. Yapılan çalışmalarda anneksin A1 proteininin fonksiyonu bloke edici antikör kullanılarak yok edilmiştir.

Mutasyonlu anneksin A1 proteini kalsiyum iyonuna bağlanamamıştır ve hasarlı bölgede membran yenilenmesi yapılamamıştır. Bu da anneksin A1 proteinin membran onarımında rolü olduğunu göstermektedir (91).

Fareler üzerinde yapılan deneylerde disferlin proteinin kalpte yüksek miktarda sentezlendiği gösterilmiştir (80). Kalp kasının da iskelet kası gibi mekaniksel aktivitesi vardır. Bu nedenle iskelet kası hücrelerinde olduğu gibi membran hasarı meydana gelmektedir. Disferlin proteini kalp kasında da iskelet kasında olduğu gibi kalsiyum iyonuna bağlı membran onarım işlemine katıldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca disferlinden yoksun farelerde, disferline sahip olan farelere göre daha hızlı kardiyomiyopati geliştiği gözlenmiştir. Bu da disferlinden yoksun kalp kası hücrelerinde mekaniksel strese bağlı olarak oluşan membran hasarının düzeltilemediğinden dolayı kardiyomiyopatilerin oluşabileceğini göstermektedir (86).

Yapılan çalışmalarda disferlinopatik ve diğer müsküler distrofilere sahip olan hastalarda sağlıklı bireylere göre anneksin proteinlerinin sentezinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca anneksin proteinlerinin sentez seviyesiyle hastalığın klinik bozukluğu arasında ilişki gözlenmiştir. Bu da anneksin A1 ve A2 proteinlerinin seviyesi kasın histopatolojik değişiklikleriyle paralel gittiğini göstermektedir. Tüm bu bilgiler ışığında anneksin proteinlerinin de diğer proteinlerle birlikte kas hücresindeki hasarı onarmak için artış gösterdikleri düşünülebilmektedir. Bu bilgilere göre anneksin proteinlerinin seviyesindeki artış disferlinopatiler için belirgin bir işaret değildir. Fakat kas hastalıklarının oluşumunda meydana gelen bir ikincil olgu olarak tanımlanabilir (92). Yapılan immüno Floresan çalışmasında normal beyinin farklı kortikal yüzeylerindeki nöronlarda disferlin proteininin sentezlendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca disferlin proteininin amiloid β nöritik plaklarında bulunduğu ve nöritislerde toplandığı Alzheimer hastalığına sahip kişilerin beyinlerinde gözlenmiştir (93).



Şekil 2-6: Disferlin proteini aracılığıyla yapılan membrane onarım modeli.

(a) Normal kas lifinde disferlin plazma membranında ve sitoplazmik veziküllerde bulunmaktadır. (b,c) Membran yapısının bozulması kalsiyumun kas lifi içinde girmesine ve bu bölgede yüksek kalsiyum konsantrasyonunun oluşmasına neden olmaktadır. Disferlin taşıyan onarıcı veziküller ve diğer proteinler hasarlı bölgede toplanır. Veziküllerde taşınan disferlin proteini plazma membranındaki anneksin A2 ve diğer bilinmeyen proteinlerle etkileşime girerek hasarlı bölgeyle birleşir. (d) Onarıcı veziküllerin plazma membranıyla birleşmesiyle hasarlı bölge tamir edilir ve plazma membranı normal anatomik yapısını tekrar kazanır (5).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Hasta Ve Kontrol Grubu Seçimi

Çalışma, 2007 yılında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı'nda patolojik tanı amacıyla iskelet kası biyopsisi alınmış toplam otuz bir hastada gerçekleştirilmiştir. Çalışmada hastalara ait iskelet kas biyopsileri kullanılmıştır. Çalışma başlatılmadan önce İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurul'undan onay alınmıştır. Çalışmada kas dokusu örnekleri kullanılan tüm hastalara çalışmayı detayları ile anlatan bilgilendirilmiş gönüllü hasta onay formu imzalatılmıştır. Çalışmanın deneysel işlemleri İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

Proje kapsamında hastaların klinik ve patolojik tanı bilgileri kullanılarak iki hasta grubu oluşturulmuştur. Müsküler distrofi hasta grubu olarak, dokuzu erkek, altısı kadın olmak üzere toplam on beş hasta seçilmiştir. Hastaların yaşlarının ortalaması yirmidir. Hastaların tümü miyopati klinik tablosu ile başvuran kişilerdir ve serum kreatin kinaz seviyeleri 92 UI/l ile 39600 UI/l (normal<220 UI/l) arasında değişmektedir. Hastalardan biri tekerlekli sandalyeye bağlanmış durumdadır. Diğer hastaların biri kişi desteği ve on üçü ise destekli veya desteksiz bağımsız olarak yürüyebilmektedir. Hastalardan dördü distrofinopati, dördü disferlinopati, altısı kronik miyopati ve bir kişi ise hafif miyopati gösteren patolojik bulgulara sahiptir.

Kontrol hasta grubu olarak müsküler distrofi patolojik tanısı almamış on ikisi erkek, beşi ise kadın olmak üzere toplam on altı hasta seçilmiştir. Hastaların yaşlarının ortalaması otuz dördttür. Hastaların serum kreatin kinaz enzim seviyeleri 86 UI/l ile 2800 UI/l (normal<220 UI/l) arasında değişmektedir. Hastalar, mitokondriyal miyopati (1 kişi), metabolik miyopati (2 kişi), sentronükleer miyopati (1 kişi), vakuollü miyopati (3 kişi), denervasyon (4 kişi), miyofibriler miyopati (1 kişi) ve normal kas dokusu (4 kişi) patolojik tanısına sahiptir.

3.1.2. Kimyasallar

Akrilamid

Bisakrilamid

Amonyum persülfat

Sodyum dodesil sülfat (SDS)

Tris baz

Tetrametilendiamin (TEMED)

Tris-HCl

Üre

Gliserol

β -Merkaptoethanol

Glisin

Metanol

Etil alkol

Asetik asit

Coomasie parlak mavisi

Sodyum klorür (NaCl)

Tween 20

Diaminobenzidin

PBS (Tuzlu fosfat tamponu)

Hidrojen peroksit

Sodyum hidroksit (NaOH)

Bromfenol mavisi

Hidroklorik asit (HCl)

3.1.3. Western Blot İşleminde Kullanılan Materyallar

Moleküler ağırlık işaretleyici (Santa Cruz)

Distrofin proteini antikoru (Klon Dy4/6D3, Rod bölgesi) (Novocastra)

Distrofin proteini antikoru (Klon Dy8/6C5, C-uç bölgesi) (Novocastra)

Disferlin proteini antikoru (Klon Ham1/7B6) (Novocastra)

Alfa sarkoglikan antikoru (Novocastra)

İkincil antikor (Dako P260)

Nitroselüloz membran (Santa Cruz)

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Hassa terazi (Shimadzu)

Otomatik pipetler (Glison, Eppendorf)

Çeker ocak (Kermanlar)

Otoklav (Kermanlar)

Distile su cihazı (Milipore)

Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C, -20 °C, -80°C) (Arçelik ,Uğur)

Küçük poliakrilamid jel sistemi (BIO-RAD)

Güç kaynağı (BIO-RAD)

Soğutmalı santrifüj (Eppendorf)

Manyetik karıştırıcı (Kermanlar)

Ocak (Kermanlar)

Gradient mikser (Scie-Plas)

Yatay çalkalayıcı (Edmund Bühler)

3.1.5. Kullanılan Tampon Ve Çözeltiler

3.1.5.1. Doku Homojenizasyonu İşleminde Kullanılan Çözeltiler

Tris-HCl Çözeltisi (100 ml, 1,25M) (pH 6.4)

19,7 gr Tris-HCl, 90 ml distile su içinde çözündürüldü. Çözelti, sodyum hidroksit ve hidroklorik asitle pH 6.4'e ayarlandı ve distile su ile 100 ml tamamlanarak otoklavlandı. Çözelti oda ısısında muhafaza edildi.

Doku Homojenizasyon Çözeltisi (10 ml) (pH 6.8)

1 ml Tris-HCl çözeltisi, 2,4 gr üre, 0,4 gr sodyum dodesil sülfat, 1 ml gliserol, 1 ml β -merkaptotanol, 1 mg bromfenol mavisi karıştırılarak çözündürüldü. Çözelti, sodyum hidroksit ve hidroklorik asit kullanılarak pH 6.8'e ayarlandı. Daha sonra çözelti, distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak, +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.5.2. SDS-Poliakrilamid Jel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

Akrilamid/Bisakrilamid Stok Çözeltisi (100 ml, %30)

29 gr akrilamid ve 1 gr bisakrilamid distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü ve +4°C'de koyu renkli cam şişe içerisinde muhafaza edildi.

Amonyum Persülfat Stok Çözeltisi (100 ml, %10)

10 gr amonyum persülfat distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

Sodyum Dodesil Sülfat Stok Çözeltisi (100 ml, %10)

10 gr sodyum dodesil sülfat distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü ve 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi. Çözelti oda ısısında muhafaza edildi.

Tris Baz Stok Çözeltisi (100 ml, 1,5 M)

18,165 gr Tris baz distile su ile 90 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü. Çözelti, sodyum hidroksit ve hidroklorik asit kullanılarak pH 6.8'e ayarlandı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra çözelti otoklavlanarak oda ısısında muhafaza edildi.

3.1.5.3. Western Blot İşleminde Kullanılan Çözeltiler

Jel Elektroforez Tamponu (1000 ml)

14,4 gr glisin, 3 gr Tris baz ve 2 gr SDS distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü. Tampon +4°C'de muhafaza edildi.

Jelden Membrana Proteinleri Aktarım Tamponu (1000 ml)

6 gr Tris baz, 28,8gr glisin ve 200 ml metanol distile su ile 1000 ml 'ye tamamlanarak çözündürülmesi ile hazırlandı.

Jel Boyama Çözeltisi (100 ml)

25 ml etanol, 10 ml asetik asit ve 0,115gr Coomassie parlak mavisi distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti oda ısısında muhafaza edildi.

Jelden Boya Çıkartıcı Çözelti (100 ml)

10 ml etanol ve 10 ml asetik asit distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Her Western blot işleminde yeni çözelti hazırlandı.

TBS (Tris-tuz) Çözeltisi (500 ml)

0,7882 gr Tris-HCl ve 4,383 gr sodyum klorür distile su ile 400 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü. Çözelti, sodyum hidroksit ve hidroklorik asit kullanılarak pH 8'e ayarlandı ve distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

TBST (Tris-tuz-tween 20) Çözeltisi (300 ml)

TBST, 300 ml TBS çözeltisine 150 µl tween 20 eklenerek hazırlandı. Her Western blot işleminde yeni çözelti hazırlandı.

Kapatma Solüsyonu (50 ml)

2,5 gr yağsız süt tozu, 50 ml TBST çözeltisi içinde çözündürülmesi ile hazırlandı.

PBS (Fosfat-tuz tamponu)

1 PBS tableti 100 ml distile su içinde çözündürülerek hazırlandı.

Antikor Çözeltileri

Hazır liyofilize şekildeki antikorlar belirtilen miktarda steril distile su içinde çözündürüldü ve -20°C’de muhafaza edildi.

İmmünolojik Saptama İçin Kullanılan Çözelti

6 mg diaminobenzidin, sodyum hidroksit ve hidroklorik asit kullanılarak pH’sı 7.2’ye ayarlanmış olan 10 ml PBS içinde çözündürüldü. Daha sonra 10 µl %30’luk hidrojen peroksit eklenerek kullanıma hazır hale getirildi. Her Western blot işleminde yeni çözelti hazırlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Doku Homojenizasyonu

- 1- Hastalardan cerrahi operasyonla alınan ve derin dondurucuda -80°C 'de muhafaza edilen iskelet kas dokusu materyalleri hassas terazide tartıldı.
- 2- Daha sonra donmuş doku kuru buz üzerinde soğutulmuş havda ezildi.
- 3- Ezilen materyal üzerine 9,5 vol doku homojenizasyon çözeltisi eklenerek doku homojenatı hazırlandı.
- 4- Hazırlanan doku homojenatları mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve su içinde üç dakika kaynatıldı.
- 5- Kaynatma işleminden sonra tüpler buz içine konuldu.
- 6- $+4^{\circ}\text{C}$ 'de üç dakika 9500 rpm'de santrifüj edildi.
- 7- Santrifüj sonunda tüplerde iki faz oluştu. Bunlar üstte süpernatant , altta pellet kısmıdır.
- 8- Süpernatant kısmı dikkatlice yeni mikrosantrifüj tüplerine alındı.
- 9- Örnekler derin dondurucuda -20°C 'de saklandı.

3.2.2. SDS-Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

Çalışmada yüksek ve düşük moleküler ağırlıktaki proteinleri aynı jel üzerinde görüntülenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle hazırlanan SDS-poliakrilamid jel, 1mm kalınlığında %5'ten %15'e doğru artan bir yoğunluk gösteren gradient jeldir. Bu jeli hazırlayabilmek için küçük poliakrilamid jel sistemi ve gradient mikser adı verilen alet kullanıldı. İlk olarak jel dökmede kullanılan cam yüzeyler jel sistemindeki düzeneğine yerleştirildi. %5 ve %15 olmak üzere iki ayrı yoğunlukta 7 ml'lik SDS-poliakrilamid jel karışımı hazırlandı (Tablo 3-1). Gradient mikser adı verilen alet manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi ve her iki bölmesinde musluklar açıldı. Gradient mikserin iki bölmesine de manyetik karıştırıcı aparat konuldu. %5'lik SDS-poliakrilamid jel karışımı gradient mikserin hortumla dışa doğru akan bölmesine döküldü. %15'lik SDS-poliakrilamid jel karışımı ise muslukla %5'lik jel karışımının olduğu bölmeye açılan tüpe döküldü. Böylece %15'lik SDS-poliakrilamid jel karışımı yavaşça %5'lik SDS-poliakrilamid jel çözeltisine karıştırılarak hortumla küçük poliakrilamid jel sistemi düzeneğindeki iki cam yüzey arasına akıtıldı. Cam yüzeyler arası jel çözeltisiyle

doldurulduktan sonra 10 kuyucuk içeren tarak yerleştirildi. Jel oda ısısında 30 dakika donması için bekletildi. Western blot işlemi sırasında iki jele ihtiyaç olduğu için bu işlem her defasında iki kez yapıldı.

Tablo 3-1: SDS-poliakrilamid jelin içerdiği kimyasal maddeler ve jelin yoğunluğuna göre değişen madde miktarları.

Madde	%5'lik 7 ml SDS-poliakrilamid jel karışımındaki miktarı	%15'lik 7 ml SDS-poliakrilamid jel karışımındaki miktarı
%30 Akrilamid/bisakrilamid	3.5 ml	1.166 ml
%10 Amonyum persülfat	70 µl	70 µl
1,5 M Tris baz	1.75 ml	1.75 ml
%10 SDS	70 µl	70 µl
Distile su	1.609 ml	3.943 ml
Temed	1.4 µl	2.8 µl

3.2.3. SDS-Poliakrilamid Jelin Yüklenmesi Ve Elektroforezi

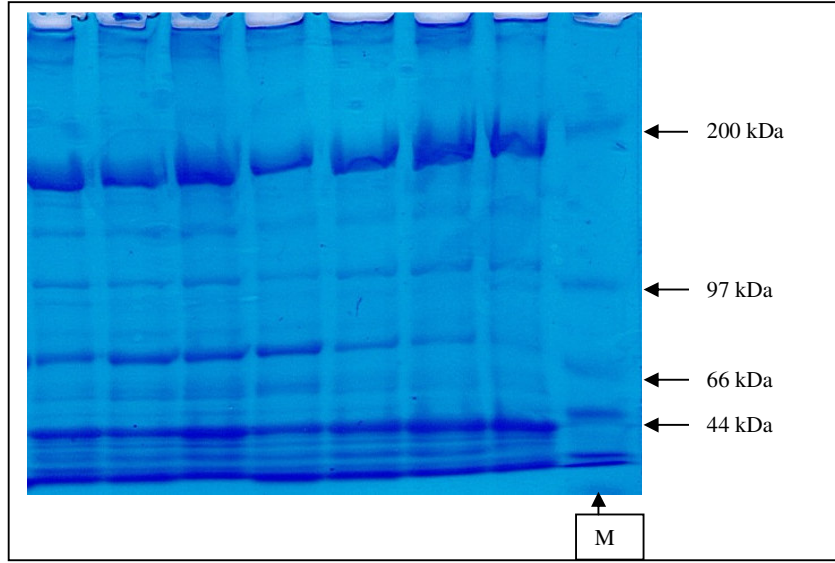
SDS-poliakrilamid jelin polimerizasyonu gerçekleştikten sonra arasında bulunduğu camlarla birlikte küçük poliakrilamid jel sistemine ait elektroforez tankına yerleştirildi. Tank elektroforez işleminde kullanılacak olan jel elektroforez tamponuyla dolduruldu. Taraklar hazırlanan iki jelden yavaşça çıkartıldı. Homojenizasyon işlemi sonunda -20°C'de saklanan örnekler derin dondurucudan çıkartılarak buz üzerine alındı. Her Western blot işleminde toplam iki jel kullanıldı. Bu jellerin her biri on tane kuyucuğa sahipti. Her iki jelin dokuz kuyucuğuna hastaların iskelet kas dokularına ait 10µl homojenizasyon örnekleri yüklendi. İki jele de aynı dokuz hastaya ait örnekler yüklendi. Son kuyucuğa ise 5µl moleküler ağırlık işaretleyici yüklendi. Örnekler yüklendikten sonra elektroforez sisteminin elektrotları yerleştirildi. Elektroforez işleminde örnekler 55 volt elektrik akımıyla 6 saat oda ısısında yürütüldü.

3.2.4. SDS-Poliakrilamid Jelin Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jellerden biri nitroselüloz membrana aktarma işleminde kullanıldı. Diğer ise protein bantlarının kontrol edilmesi amacıyla boyandı. Bu aşama Western blot işleminin sağlıklı ilerlemesi açısından önem taşımaktadır. Çünkü doku homojenizasyon işlemi sırasında iskelet kas dokusuna ait

proteinlerin yıkıma uğrama olasılığı vardır. Bu nedenle homojenizasyon işleminden sonra proteinlerin yıkıma uğrayıp uğramadıklarını kontrol edilmesi gerekmektedir.

SDS-poliakrilamid jel, boyanabilmesi için iki cam düzenek arasından çıkartılarak bir kaba konuldu. Üzerine jel boyama çözeltisi döküldü. Bir saat bu çözeltide bekletildi. Daha sonra boyama çözeltisinden arındırılarak üzerine jelden boya çıkartıcı çözelti döküldü. Jel bu çözelti içinde bir gece bekletildi. Bir gece sonunda jelde bulunan protein bantları görülür duruma geldi. Jel uzun süre saklanabilmesi amacıyla kurutulmadan iki şeffaf asetat kağıdı arasına alındı. Kullanılan jel %5'ten %15 yoğunluğa doğru artan gradient özellikte bir jeldi. Bu nedenle jelin en üst %5'lik bölgesinde yüksek moleküler ağırlıklı proteinler görüldü. Jelin alt %15'lik bölgesine doğru ise daha az moleküler ağırlığa sahip proteinler belirlendi. Sonuç olarak jelin üst kısmından alt kısmına doğru proteinler büyükten küçük moleküler ağırlığa doğru sırasıyla ayrılarak, görüntülendi (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Elektroforez işlemi sonrası boyanmış SDS-poliakrilamid jel görüntüsü.

M: Moleküler ağılık işaretleyici

3.2.5. SDS-Poliakrilamid Jel Üzerindeki Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması

Elektroforez işleminden sonra jeldeki proteinler membrana aktarıldı. Bu işlem sırasında küçük poliakrilamid jel sistemine ait membran-jel kaseti kullanıldı. Bu işlemde, jelden membrana proteinleri aktarım tamponu büyük bir kabın içine döküldü. Kasetin bir kapağı tamponun içinde diğer kapağı ise açık olarak yerleştirildi. Kasetin tampon içindeki kapağının üzerine küçük poliakrilamid jel sistemine ait sünger yerleştirildi. Süngerin boşluklarındaki hava tampona batırılarak çıkartıldı. Bu işlemden sonra süngerin üzerine tamponda ıslatılmış filtre kağıdı yerleştirildi. Filtre kağıdının üzerine ise elektroforez işlemi yapılmış jel yerleştirildi. Jelin üzerine metanolde 15 saniye, su içinde 2 dakika bekletilerek transfere hazır hale getirilmiş nitroselüloz membran yerleştirildi. Nitroselüloz membran yerleştirildikten sonra üzerine tamponda ıslatılmış, havası çıkartılmış filtre kağıdı ve sünger yerleştirildi. Bu işlemlerden sonra sünger, filtre kağıdı, jel ve nitroselüloz membran kasetin iki kapağı arasında sıkıştırıldı. Daha sonra kaset jelden membrana proteinleri aktarım tamponuyla dolu olan tanka yerleştirildi. Tankın kapağı artı yüklü elektrot nitroselüloz membran, negatif elektrot ise jelin olduğu tarafa gelecek şekilde kapatıldı. Jelden proteinlerin nitroselüloz membrana aktarım işlemi gece boyu soğuk ortamda 30 volt elektrik akımı gücüyle gerçekleştirildi.

Gece boyu elektrik akımı kullanılarak yapılan aktarım işleminden sonra kaset açılarak membran immünolojik saptama işlemine alındı. Jel ise jel boyama çözeltisi içerisinde bir saat bekletildi. Bu işlemden sonra jel boya çıkarma çözeltisi içine alındı ve beş saat bekletildi. Jel şeffaf asetat kağıtlarının arasına konularak jelden membrana proteinlerin aktarılıp aktarılmadığı incelendi.

3.2.6. Nitroselüloz Membran Üzerindeki Proteinlerin İmmünolojik Saptanması

Jel üzerindeki proteinler nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra proteinlerin immünolojik saptanması işlemi yapıldı. Bu işlemde Louise Anderson ve arkadaşlarının kullandığı yöntem uygulandı (17). İmmünolojik saptamada ilk olarak protein transferi sonrası nitroselüloz membran TBST ve yağsız süt tozu içeren kapatma solüsyonunda bir saat bekletildi. Bu bekletme işlemi yatay çalkalayıcı üzerinde yapıldı. Bu kapatma işleminin amacı protein bağlanmamış membran bölgelerinin süt tozuyla kapatılarak antikorların yanlış bağlanmasını önlemektir. Bu işlemden sonra membran TBS çözeltisinde yıkandı. Yıkama işleminden sonra membran bir saat TBS çözeltisiyle sulandırılmış birincil antikorla muamele edildi. Çalışmanın bu kısmında araştırılan

proteine özgü birincil antikor kullanıldı. Membran birincil antikorla bir saat muamele edildikten sonra TBST çözeltisiyle üç kez beşer dakika yıkandı. Yıkama işleminden sonra membran TBS çözeltisinde sulandırılmış ikincil antikor solüsyonunda bir saat bekletildi. Bekletme işlemi yatay çalkalayıcı üzerinde yapıldı. Bu aşamadan sonra membran üç kez beşer dakika TBST çözeltisiyle yıkandı. Daha sonra 6 mg diaminobenzidin PBS çözeltisi içinde çözündürüldü ve %30'luk 10 µl hidrojen peroksit eklendi. Karanlık ortam şartlarında hazırlanan bu solüsyon membranın üzerine döküldü. Üç dakika sonra hasta kas dokusunda varlığına bakılan protein eğer varsa membran üzerinde kahverengi bant şeklinde tespit edildi. Bu işlemlerden sonra membran kurutulduktan sonra şeffaf asetat kağıtları arasına konularak karanlık ortamda saklandı.

Kullanılan birincil antikorun çeşidine göre farklı sulandırma miktarı uygulandı. Fakat tüm Western blot işlemlerinde aynı ikincil antikor sulandırma miktarı kullanıldı. Çalışma sırasında kullanılan antikor sulandırma miktarları Louise Anderson ve arkadaşlarının daha önce uyguladıkları miktarlar baz alınarak ortam şartlarına göre değiştirildi ve en uygun miktar belirlendi (17). Kullanılan antikor çeşitleri ve sulandırma miktarları Tablo 3-2'de verilmiştir.

Tablo 3-2: Western blot işleminde kullanılan antikorların TBS çözeltisi içindeki sulandırma miktarları.

Antikor	Antikorların TBS Çözeltisi İçindeki Sulandırma Miktarları
Distrofin Antikoru (Rod bölgesi)	1/30
Distrofin Antikoru (C-terminal bölgesi)	1/20
Disferlin Antikoru	1/200
α -sarkoglikan Antikoru	1/30
İkincil Antikor	1/300

4. BULGULAR

Bu tez projesi kapsamında, Western blot yöntemi kullanılarak müsküler distrofi proteinlerinin saptanması amaçlanmıştır. Hasta materyali olarak iskelet kası biyopsisi kullanılmıştır. Toplam otuz bir kişiden oluşan hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Bu gruplar 2007 yılı içerisinde İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim dalında patolojik tanı amacıyla kas biyopsisi alınan hastalardan oluşmaktadır. Gruplarının oluşturulmasında hastaların klinik bilgileri ve iskelet kas dokularına ait patolojik tanı sonuçları kullanılmıştır. Hasta grubu, patolojik ve klinik olarak müsküler distrofi tanısına sahip hastalardan oluşturulmuştur. Kontrol grubu ise klinik ve patolojik tanı sonuçlarına göre müsküler distrofi hastalığına sahip olmayan hastalardan seçilmiştir.

Kontrol olarak kullanılan hasta grubu on biri erkek, beşi kadın olmak üzere toplam on altı hastadan oluşmaktadır. Hastaların yaşı on üç ile altmış iki yaş aralığındadır ve hastalıklarının başlama yaşı bir ile kırk bir yaş arasında değişmektedir. Hastaların serum kreatin kinaz seviyeleri 86 UI/l ile 2800 UI/l (normal<220 UI/l) arasındadır (Tablo 4-1). Hastalar, mitokondriyal miyopati (1 kişi), metabolik miyopati (2 kişi), sentronükleer miyopati (1 kişi), vakuollü miyopati (3 kişi), denervasyon (4 kişi), miyofibriler miyopati (1 kişi) ve normal kas dokusu (4 kişi) patolojik tanısına sahiptir.

Müsküler distrofi hastaları, dokuzu erkek, altısı kadın olmak üzere toplam on beş kişiden oluşmaktadır. Hasta yaşları dört ile elli beş yaş aralığında olup, hastalıklarının başlama yaşı ise bir ile otuz dört yaş arasında değişmektedir. Hastaların tümü miyopati klinik tablosu ile başvuran kişiler olup, serum kreatin kinaz seviyeleri 92 UI/l ile 39600 UI/l (normal<220 UI/l) arasındadır (Tablo 4-2). Hastalardan biri tekerlekli sandalyeye bağlanmış durumdadır. Diğer hastaların biri kişi desteği ve on üçü ise destekli veya desteksiz bağımsız olarak yürüyebilmektedir. Hastalardan dördü distrofinopati, dördü disferlinopati, altısı kronik miyopati ve bir kişi ise hafif miyopati gösteren patolojik bulgulara sahiptir.

Tablo 4-1: Kontrol grubunda yer alan hastaların klinik ve laboratuvar parametreleri

Hasta Numarası	Cinsiyet	Yaş	B. Yaşı	CK
1	Erkek	52		
2	Kadın	16	3	86 UI/l
3	Erkek	32	10	198 UI/l
4	Erkek	53	52	
5	Erkek	35	1	<220 UI/l
6	Erkek	46	36	121 UI/l
7	Erkek	46	0	550 UI/l
8	Erkek	41	40	1074 UI/l
9	Erkek	13	10	
10	Erkek	16	15	167 UI/l
11	Erkek	17	9	336 UI/l
12	Kadın	62	38	520 UI/l
13	Kadın	18	1	1200 UI/l
14	Erkek	46	41	2800 UI/l
15	Kadın	20	1	143 UI/l
16	Kadın	34	27	189 UI/l

B. Yaşı : Başlama yaşı, CK: Kreatin kinaz

Tablo 4-2: Hasta grubunda yer alan hastaların klinik ve laboratuvar parametreleri.

Hasta Numarası	Cinsiyet	Yaş	B. Yaşı	CK	PH/A	Yürüme
1	Erkek	11	9	3200 UI/l	PH(-)	+
2	Erkek	4	1	39600 UI/l	PH(+)	+
3	Kadın	10	6	7715 UI/l	A(+)	+
4	Erkek	10	2	6545 UI/l	A(+)	±
5	Kadın	24	16	6700 UI/l	PH(+)	+
6	Erkek	12	3	8976 UI/l	PH(+)	+
7	Kadın	23	16	822 UI/l	A(+)	+
8	Erkek	26	24	39000 UI/l	A(+)	+
9	Erkek	25	5	1377 UI/l	PH(+)/A(+)	+
10	Erkek	14	1	1972 UI/l	PH(-)/A(+)	+
11	Kadın	17	5			+
12	Erkek	55	8	228 UI/l	PH(+)/A(+)	-
13	Kadın	28	1	92 UI/l	A(+)	+
14	Kadın	14			PH(+)	
15	Erkek	39	33	18 800 UI/l	PH(+)	+

B. Yaşı : Başlama yaşı, PH : Pseudohipertrofi, A : Atrofi, CK: Kreatin kinaz, ± : Tek başına yürüyemiyor,

+ : Tek başına yürüyebiliyor

4.1. Kontrol Grubuna Ait Western Blot Sonuçları

Bu çalışma kapsamında Western blot işleminde α -sarkoglikan antikor, disferlin antikor, distrofin proteininin rod bölgesi ve C-terminal bölgesi antikorları olmak üzere dört farklı müsküler distrofi proteini bölgesine ait antikor kullanılmıştır. Western blot işleminde hastaların beşinde tüm antikorlar kullanılmıştır. Diğer hastaların işlemlerinde ise klinik ve patolojik bulgular dikkate alınarak eksik olma olasılığı en yüksek proteinlere ait antikorlar kullanılmıştır. Western blot işlemi sonucunda kontrol grubunda yer alan hastalarda araştırılan proteinlere ait bir defekt rastlanmamıştır. Elde edilen Western blot sonuçları ile patolojik tanı arasında farklılık gözlemlenmemiştir (Tablo 4-3).

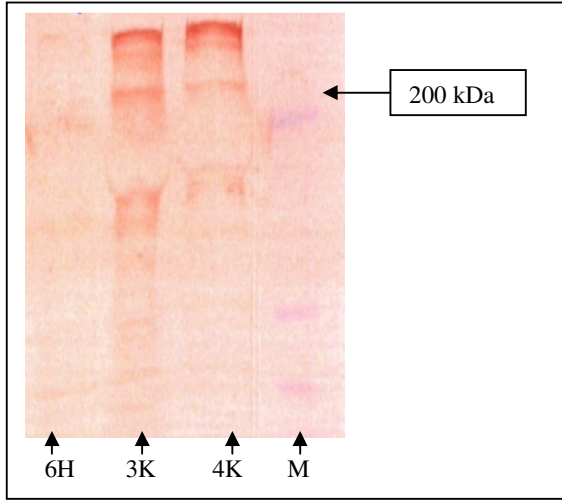
4.2. Hasta Grubuna Ait Western Blot Sonuçları

Proje kapsamında belirlenen hasta grubu on beş kişiden oluşmaktadır. Beş hastanın Western blot işlemlerinde α -sarkoglikan antikor, disferlin antikor, distrofin proteininin rod bölgesi ve C-terminal bölgesi antikorları kullanılmıştır. Diğer hastaların Western blot işlemlerinde ise klinik ve patolojik bulguları dikkate alınarak eksik olma olasılığı en yüksek olan proteinlere ait antikorlar kullanılmıştır (Tablo 4-4).

Bu grupta yer alan 1 numaralı hasta, on bir yaşındadır ve hastalığının başlama yaşı dokuzdur. Hasta, klinik olarak miyopatik özelliklere sahiptir ve serum kreatin kinaz değeri yüksektir. Hastanın kaslarında pseudohipertrofi veya atrofi bulunmamaktadır ve hasta yürüyebilmektedir. Hastaya ait kas dokusunun immünohistokimyasal olarak incelenmesi sonucunda da α -, β -, γ -sarkoglikan proteinlerinin, distrofin proteininin C-terminal, N-terminal ve rod bölgelerinin eksikliği saptanmamıştır. Western blot işlemi sonucunda hastanın kas dokusunda distrofin proteininin C-terminal ve rod bölgelerinin var olduğu, fakat disferlin proteininin var olmadığı saptanmıştır. Elde edilen Western blot sonuçları hastanın disferlinopatiye sahip olabileceğini göstermektedir.

2 numaralı hasta dört, 4 numaralı hasta on ve 6 numaralı hasta ise on iki yaşındadır. Hastalıklarının başlama yaşları sırasıyla bir, iki ve üç yaştır. Klinik ve patolojik bulguları bakımından hastaların distrofinopatisi olduğu düşünülmektedir. Hastaların serum keratin kinaz seviyeleri yüksektir. 2 ve 6 numaralı hastalar tek başlarına yürüyebilmektedir. Fakat 4 numaralı hasta tek başına yürüyememektedir. Üç hastanın da distrofin geninin moleküler genetik sonuçlara göre delesyon mutasyonu taşımadığı belirlenmiştir. 2, 4 ve 6 numaralı hastaların kas dokularının

immünohistokimyasal olarak incelenmesi sonucunda da distrofin proteininin N-terminal, C-terminal ve rod bölgelerinin eksikliği saptanmıştır. Yapılan Western blot işleminin sonuçlarında hastalarda α -sarkoglikan proteini eksikliği saptanmamıştır. Fakat hastaların üçünün de distrofin proteininin rod ve C-terminal bölgelerine sahip olmadığı saptanmıştır (Şekil 4-1). Üç hastanın da patolojik tanı sonuçları ve klinik bulguları ile Western blot sonuçları arasında farklılık bulunmamaktadır.

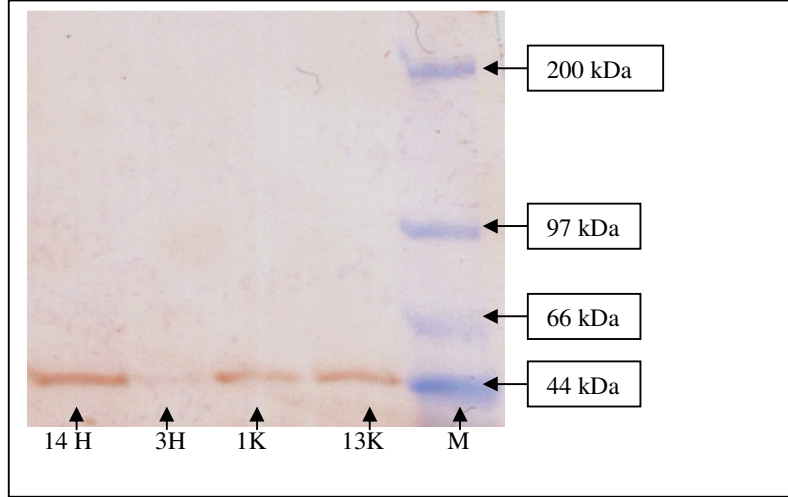


Şekil 4-1: Western blot işlemi sonunda elde edilen distrofin proteininin rod bölgesine ait bant görüntüleri.

Kontrol grubunda yer alan 3 ve 4 numaralı hastaların distrofin proteininin rod bölgesine ait bantlar gözlemlenmiştir. Fakat hasta grubunda yer alan 6 numaralı hastada bu bantlar gözlemlenememiştir. 6H, 6 numaralı hasta; 3K ve 4K, 3 ve 4 numaralı kontrol grubu hastaları; M, moleküler ağırlık işaretleyici.

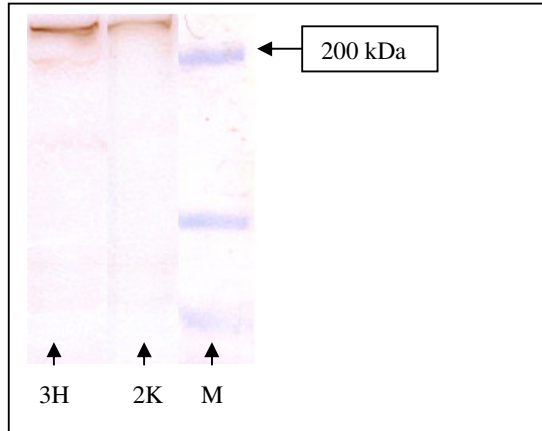
3 numaralı hasta, on yaşındadır ve hastalığının başlama yaşı altıdır. Hasta, klinik olarak belirgin kök zaafı bulgularına sahiptir ve serum kreatin kinaz seviyesi yüksektir. Hasta tek başına yürüyebilmektedir ve patolojik olarak disferlinopati tanısına sahiptir. 3 numaralı hastanın kas dokusunun immünohistokimyasal olarak incelenmesi sonucu merozin proteini, α -, γ -, β -sarkoglikan proteinleri, distrofin proteininin N-terminal, C-terminal ve rod bölgelerinin eksikliği gözlemlenmemiştir. Fakat kas dokusunda disferlin proteininin eksikliği saptanmıştır. Western blot işlemi sonucunda hastanın iskelet kası dokusunda disferlin proteininin varlığı, fakat α -sarkoglikan proteininin eksikliği saptanmıştır (Şekil 4-2) (Şekil 4-3). Western blot sonucu ile patolojik bulgu sonuçlarında farklılıklar saptanmıştır. Bu nedenle hastanın, farklı kas dokusu

proteinlerinin Western blot yöntemiyle araştırılması ve proteinlere ait genlerde olabilecek mutasyonların moleküler genetik yöntemlerle saptanması sonucunda klinik tanısı konulabilecektir.



Şekil 4-2: Western blot işlemi sonunda α -sarkoglikan proteinine (50 kDa) ait bant görüntüleri.

Kontrol grubunda yer alan 1 numaralı hastada, 13 numaralı hastada ve hasta grubunda yer alan 14 numaralı hastada α -sarkoglikan proteinine ait bant saptanmıştır. Fakat hasta grubunda yer alan 3 numaralı hastada α -sarkoglikan proteinine ait bant belirlenememiştir. 14H ve 3H, 14 ve 3 numaralı hastalar; 1K ve 13K, 1 ve 13 numaralı kontrol grubu hastaları; M, moleküler ağırlık işaretleyici.



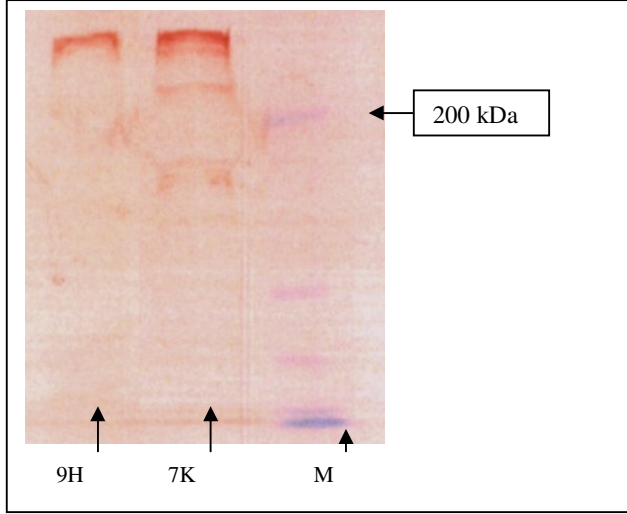
Şekil 4-3: Western blot işlemi sonunda disferlin proteinine (230 kDa) ait bant görüntüleri.

Kontrol grubunda yer alan 2 numaralı hastada ve hasta grubunda yer alan 3 numaralı hastada disferlin proteinine ait bant gözlemlenmiştir. 3H, 3 numaralı hasta; 2K, 2 numaralı kontrol grubu hastası; M, moleküler ağırlık işaretleyici.

5 numaralı hasta yirmi dört, 7 numaralı hasta yirmi üç ve 8 numaralı hasta ise yirmi altı yaşındadır. 8 numaralı hastanın hastalığının başlama yirmi dört yaş, 5 ve 7 numaralı hastaların ise on altı yaşıdır. Hastaların serum kreatin kinaz seviyeleri yüksektir. Klinik ve patolojik bulguları bakımından hastaların disferlinopati olduğu düşünülmektedir. Üç hasta da tek başına yürüyebilmektedirler. Hastaların kas dokularının immünohistokimyasal olarak incelenmesi sonucunda disferlin proteininin eksikliği gözlenmiştir. Western blot işlemi sonucunda da hastaların kas biyopsilerinde disferlin proteininin var olmadığı saptanmıştır. Western blot sonuçları ile hastaların klinik ve patolojik bulguları arasında farklılık saptanmamıştır.

9 numaralı hasta, yirmi beş yaşındadır ve hastalığının başlama yaşı beştir. Hastanın serum kreatin kinaz seviyesi yüksektir. Hasta yürüyebilmektedir ve patolojik olarak kronik miyopatik değişiklik tanısına sahiptir. Hastanın distrofin geninin moleküler genetik sonuçlara göre delesyon mutasyonu taşımadığı belirlenmiştir. 9 numaralı hastanın kas dokusunun immünohistokimyasal olarak incelenmesi sonucu α -, γ -, β -sarkoglikan proteinleri, distrofin proteininin N-terminal, C-terminal ve rod bölgelerinin eksikliği saptanmamıştır. Western blot işlemi sonucunda ise hastanın kas dokusunda disferlin proteininin, α -sarkoglikan proteininin, distrofin proteininin N-terminal ve rod bölgelerinin eksikliği saptanmamıştır (Şekil 4-4). Fakat hastanın distrofin proteinin rod bölgesine ait bandın metabolitler kısmının kontrol olarak kullanılan kas dokusunun distrofin protein bandından farklı olduğu gözlemlenmiştir. Hastanın distrofin proteininin rod bölgesindeki farklılığın moleküler genetik yöntemlerle araştırılması gerekmektedir.

13 numaralı hasta, yirmi sekiz yaşındadır ve hastalığının başlama yaşı birdir. Hasta hafif miyopatik bulgular patolojik tanısına sahiptir. Hastaya ait kas dokusunun immünohistokimyasal olarak incelenmesi sonucunda disferlin proteininin eksikliği saptanmamıştır. Western blot işlemi sonucunda da hastanın kas dokusunda disferlin proteininin varlığı gözlenmiştir. Hastanın patolojik tanı sonuçları ile Western blot sonuçları arasında farklılık gözlemlenmemiştir. 13 numaralı hastanın klinik tanısını konulabilmesi için farklı kas dokusu proteinlerinin Western blot ve moleküler genetik yöntemlerle araştırılması gerekmektedir.



Şekil 4-4: Western blot işlemi sonunda distrofin proteininin rod bölgesine ait bantların görüntüleri.

Kontrol grubunda yer alan 7 numaralı hastanın distrofin proteininin rod bölgesine ait bantlar gözlemlenmiştir. Fakat western blot işlemi sonunda hasta grubunda yer alan 9 numaralı hastanın distrofin proteininin rod bölgesine ait bantlarda farklılık saptanmıştır. 9H, 9 numaralı hasta; 7K, 7 numaralı kontrol grubu hastası; M, moleküler ağırlık işaretleyici.

10 numaralı hasta on dört, 11 numaralı hasta on yedi, 12 numaralı hasta elli beş ve 14 numaralı hasta ise on dört yaşındadır. Hastalar kronik miyopati patolojik bulgusuna sahiptir. 12 numaralı hastanın distrofin geninin moleküler genetik sonuçlara göre delesyon mutasyonu taşımadığı belirlenmiştir. Yapılan Western blot işleminin sonuçlarında 10 ve 12 numaralı hastaların disferlin, α -sarkoglikan, distrofin proteininin rod ve C-terminal bölgelerinin eksikliği saptanmamıştır. 11 numaralı hastanın Western blot işlemi sonucunda α -sarkoglikan proteininin eksikliği gözlemlenmemiştir. 14 numaralı hastanın Western blot işlemi sonucunda ise α -sarkoglikan proteininin ve disferlin proteininin eksikliği saptanmamıştır. Dört hastanın da patolojik tanı sonuçları ve klinik bulguları ile Western blot sonuçları arasında farklılık saptanmamıştır. Hastaların klinik tanıların konulabilmesi için farklı kas dokusu proteinlerinin Western blot ve moleküler genetik yöntemlerle araştırılması gerekmektedir.

Tablo 4-3: Kontrol grubuna ait Western blot, patolojik tanı ve immünohistokimyasal analiz sonuçları.

Hasta Numarası	Patolojik Tanı	İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçları	Western Blot Sonuçları
1	Mitokondrial miyopati	-	α -sarc (+), disferlin (+), DYS1 (+), DYS2 (+)
2	Denervasyon	Miyozin s ve f (+)	α -sarc (+), disferlin (+)
3	Normal	-	α -sarc (+), disferlin (+), DYS1(+), DYS2 (+)
4	Vakuollü miyopati	-	Disferlin (+), DYS1(+), DYS2 (+)
5	Kronik nörojenik tutulum bulguları gösteren kas dokusu	-	Disferlin (+), DYS1(+), DYS2 (+)
6	Vakuol ve mitokondriyal değişiklikler gösteren miyopati	-	α -sarc (+), disferlin (+), DYS1(+), DYS2 (+)
7	Normal	DYS1 (+), DYS2(+), DYS3 (+), DAG(+)	α -sarc (+), disferlin (+), DYS1(+), DYS2 (+)
8	Miyofibriller miyopati	Normal	Disferlin (+)
9	Normal	-	α -sarc (+), disferlin (+)
10	Denervasyon	-	α -sarc (+)
11	Normal	DYS1 (+), DYS2(+), DYS3 (+), DAG(+)	α -sarc (+), DYS1 (+) , DYS2 (+)
12	Miyofosforilaz eksikliği (Mc Ardle Hastalığı)	Kaveolin 3 (+), DAG(+)	α -sarc (+), disferlin (+)
13	Lipid depo hastalığı	-	α -sarc (+), disferlin (+), DYS1(+), DYS2 (+)
14	Denervasyon yanında belirgin reinnervasyon gösteren kas dokusu bulguları	-	Disferlin (+)
15	Miyotonik distrofi veya sentronükleer miyopati	-	α -sarc (+), disferlin (+)
16	Vakuollü miyopati	-	α -sarc (+)

(+) : Var, (-) : Yok, α -sarc: α -sarkoglikan proteini, DYS1: Distrofin proteininin rod bölgesi, DYS2: Distrofin proteininin C-terminal bölgesi, DYS3: Distrofin proteininin N-terminal bölgesi, DAG: α -, β - ve γ -sarkoglikan proteinleri

Tablo 4-4: Hasta grubuna ait Western blot, patolojik tanı ve immünohistokimyasal analiz sonuçları.

Hasta Numarası	Patolojik Tanı	İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçları	Western Blot Sonuçları
1	Kas distrofisi	DYS1 (+), DYS2(+), DYS3 (+), DAG (+)	Disferlin (-), DYS1 (+), DYS2 (+)
2	DMD	DYS1 (-), DYS2(-), DYS3 (-)	α -sarc (+), DYS1 (-), DYS2(-)
3	Disferlinopati	DYS1 (+), DYS2(+), DYS3 (+), DAG(+), merozin (+), disferlin (-)	α -sarc (-), disferlin (+)
4	DMD, Distrofinopati	DYS1 (-), DYS2(-), DYS3 (-)	α -sarc (+), DYS1 (-), DYS2 (-)
5	Disferlinopati	Disferlin (-)	Disferlin (-)
6	DMD tipi Distrofinopati	DYS1 (-), DYS2(-), DYS3 (-)	α -sarc (+), disferlin (+), DYS1(-), DYS2 (-)
7	İnflamatuvar kas hastalığı, Disferlinopati	Disferlin (-)	Disferlin (-)
8	Disferlinopati	Disferlin (-)	Disferlin (-)
9	Kronik miyopatik değişiklikler	DYS1 (+), DYS2(+), DYS3 (+), DAG(+)	α -sarc (+), disferlin (+), DYS1(+), DYS2 (+)
10	Kronik miyopati	DYS1 (+), DYS2(+), DYS3 (+), DAG (+), disferlin (+), kaveolin-3 (+)	α -sarc (+), disferlin (+), DYS1(+), DYS2 (+)
11	Kronik miyopati	DYS1 (+), DYS2(+), DYS3 (+), DAG (+)	α -sarc (+)
12	Kronik miyopati	DYS1 (+), DYS2(+), DYS3 (+), DAG (+)	α -sarc (+), disferlin (+), DYS1(+), DYS2 (+)
13	Hafif miyopatik bulgular	Disferlin (+)	Disferlin (+)
14	Kronik miyopati	DYS1 (+), DYS2(+), DYS3 (+), merozin (+), emerlin (+)	α -sarc (+), disferlin (+)
15	Kronik miyopati	DYS1 (+), DYS2(+), DYS3 (+), DAG (+), disferlin (+)	α -sarc (-), disferlin (+), DYS1 (-), DYS2 (-)

(+) : Var, (-) : Yok, α -sarc: α -sarkoglikan proteini, DYS1: Distrofin proteininin rod bölgesi, DYS2: Distrofin proteininin C-terminal bölgesi, DYS3: Distrofin proteininin N-terminal bölgesi, DAG: α -, β - ve γ -sarkoglikan proteinleri

5. TARTIŞMA

Müsküler distrofiler, kas hücrelerinin yapısal proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan kalıtsal bir hastalık grubudur. Bu genlerdeki mutasyonlar, hücre yapısının değişmesine neden olmaktadır. Müsküler distrofilerdeki genetik değişimlerin sonuçları, başta çizgili kas dokusu olmak üzere, kalp kası, beyin gibi çeşitli dokularda kendini gösterebilmektedir (1).

Kas distrofilerinin önemli bir bölümü öncelikli olarak kalça ve omuz kavşağında zaaf yapmaktadır ve “limb-girdle müsküler distrofi” (LGMD) olarak adlandırılmaktadır. “Limb-Girdle müsküler distrofiler” otozomal dominant veya otozomal resesif patern ile kalıtılmaktadır. İyi bilinen Duchenne ve Becker müsküler distrofileri ise X’e bağlı resesif kalıtım göstermektedir. Bugüne kadar otozomal geçişli LGMD’lerden dominant olanların on bir, resesif olanların ise yedi alt grubu tanımlanmıştır. Bu genotipik farklılığa rağmen hastalıkların birçoğunda fenotipik özellikler benzemektedir ve klinik planda ayırıcı tanıların yapılması çok zor, bazen olanaksızdır (17). Bu nedenle ayırıcı tanı DNA analizini gerektirmektedir. Ancak, bugün için bilinen çok sayıda genin mutasyon taramasının zahmetli ve pahalı olması nedeni ile kas dokusunda ilgili protein açısından immünohistokimyasal inceleme veya Western blot ile protein kalitesinin ortaya konması, var olan protein defektine yönelik genetik inceleme yapılarak tanının kesinleştirilmesi bu distrofilerde altın standart olmuştur.

X’e bağlı resesif geçişli hastalıklardan, distrofinopatilerden DMD, müsküler distrofi tipleri arasında en sık görülenidir. DMD, distrofin proteinin eksikliği sonucu ortaya çıkan, karakteristik kas tutulumu ve klinik fenotipi olan bir hastalıktır. DMD’de kas güçsüzlüğü çok erken yaşta görülebilmektedir. Bu nedenle klinik tanı konulurken konjenital müsküler distrofi veya diğer resesif kalıtsal çocukluk çağı müsküler distrofileri ile karıştırılabilmektedir. Fakat DMD, diğer hastalıklarla en az karışan kas distrofisidir, distrofin yokluğunun kas immünohistokimyası ile gösterilebilmesi çok daha kolaydır ve Western blot uygulamasına çok seyrek olarak ihtiyaç göstermektedir. Becker müsküler distrofisi (BMD) ise DMD’nin daha ılımlı klinik fenotipe sahip formudur. Fakat hastalığa ait klinik semptomların ve başlangıç yaşının heterojenite göstermesi diğer “limb-girdle müsküler distrofilerle” benzer klinik fenotipik özelliklere sahip olması hastalık tanısının konulmasında, BMD’nin diğer LGMD’den ayırt etmekte

zorluklara neden olmaktadır (17). Kas immünohistokimyasında kas membranındaki kesintili veya zayıf boyanma, iyi tanındığında, BMD tanısı koydurabilmektedir. Ancak, immünohistokimyasal olarak normal distrofin boyanması BMD'ye işaret edeceği gibi diğer LGMD'leri de ayırıcı tanı olasılıkları arasına yerleştirmektedir. Bu nedenle Western blot ile BMD tanısının konması veya BMD benzeri bir klinik fenotipin ayırıcı tanısının yapılması çok büyük önem taşımaktadır.

“Limb-Girdle müsküler distrofiler” (LGMD), klinik fenotip olarak birbirlerine çok bezeyen ve her iki cinste de görülebilen otozomal kalıtmı hastalıklardan oluşan bir müsküler distrofi alt grubudur. Bu nedenle bu grup içinde yer alan distrofilerin klinik özellikleri bakımından birbirinden ayırt edilmesi oldukça zordur (16). Ayrıca kas immünohistokimyası, hastalığa neden olan eksik protein dışında onun ilişkili olduğu proteinlerden bazılarında da azalma ortaya çıkmaktadır ve ayırıcı tanıyı olanaksızlaştırmaktadır. Bu nedenle Western blot, bu grup hastalıkların ayırıcı tanısında da çok önemli bir yer tutmaktadır.

Bu çalışmada, Western blot yöntemi kullanılarak müsküler distrofilerden bazılarının (distrofinopati, α -sarkoglikanopati, disferlinopati) ayırıcı tanılarının konulması amaçlanmıştır. Western blot, proteinlerin moleküler ağırlıklarını ve miktarlarını belirlemede kullanılan bir yöntemdir. Farklı bölge ve tiplerdeki genetik mutasyonlar sonucu ortaya çıkan müsküler distrofilerin bir çoğunun moleküler genetik yöntemlerle tanımlanması oldukça zordur. Bu nedenle Western blot, müsküler distrofi tiplerinin ayırıcı tanılarının konulmasında ve potansiyel olarak karıştırılabilecekleri diğer nöromüsküler hastalıklardan ayırt edilmelerinde kullanılabilecek en güvenli yöntemdir (17). Fakat bu yöntemin bazı dezavantajları ve zorlukları vardır. Bunlardan biri, işlem sırasında analiz edilen proteininin tipine göre ortam şartlarının değiştirilmesinin gerekli olmasıdır. Diğer dezavantajlar ise işlemin uzun sürmesi ve pahalı olmasıdır.

Çalışma kapsamında, Western blot yöntemi kullanılarak hastalara ait çizgili kas dokularında distrofin, α -sarkoglikan ve disferlin proteinleri analiz edilmiştir. Yöntemin laboratuvarımızda yeni çalışılıyor olması nedeni ile, çalışmanın bir kontrol grubunda da uygulanması amaçlanmıştır. Bu nedenle çalışmada hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Hasta grubu, patolojik ve klinik olarak müsküler distrofi tanısına sahip on beş kişiden oluşmaktadır. Kontrol grubu olarak ise müsküler distrofi

dışında farklı kas hastalığı patolojik tanısı bulunan on altı kişilik hasta grubu oluşturulmuştur. Kontrol grubuna ait Western blot analizi sonuçları ile hastaların patolojik bulgu sonuçları uyumlu bulunmuştur. Hastaların patolojik tanısından farklı bir protein analizi sonucu elde edilmemiştir.

Hasta grubunda yer alan üç hastada distrofin proteinin C-terminal ve rod bölgelerinin eksikliği gözlemlenmiştir. Bu hastaların patolojik tanıları da DMD tipi distrofinopatidir. Fakat üç hastanın da distrofin geninde moleküler olarak ekson delesyonu mutasyonu bulunmamıştır. Yirmi beş yaşında ve erkek bir hastanın ise Western blot işlemi sonucunda distrofin proteininin rod bölgesine ait bantlarda farklılık saptanmış ve hastada BMD olduğuna karar verilmiştir. Fakat bu hastada daha önce incelenmiş olan distrofin geninde moleküler olarak ekson delesyon mutasyonu saptanmamıştır. Bu nedenle hastanın distrofin geninde, bilinen sıcak bölgeler dışında bir gen mutasyonu olabileceği ve moleküler yöntemlerle bu mutasyonun belirlenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmada bir hastanın patolojik tanısı ile Western blot sonuçları arasında farklılık bulunmuştur. Hasta on yaşındadır ve hastalığının başlama yaşı altıdır. Hastanın patolojik tanısı disferlinopatidir. Western blot sonucunda ise hastada disferlin proteininin eksikliği saptanmamış, buna karşılık α -sarkoglikan proteininin eksikliği gözlemlenmiştir. Bu nedenle hastanın farklı kas dokusu proteinlerinin de araştırılmasının gerekli olduğu düşünülmüştür. Çünkü yapılan çalışmalarda kalpainopatisi ve sarkoglikanopatisi olan bazı hastalarda disferlin proteininin kısmi olarak azalmaya uğradığı gösterilmiştir (88). Ayrıca farklı bir kas dokusu proteinindeki bozukluk da α -sarkoglikan proteinini etkileyebilmektedir. Sarkoglikan kompleksinde yer alan herhangi bir proteindeki eksiklik tüm kompleksin bozulmasına neden olmakta, bu nedenle tüm sarkoglikan kompleksi proteinlerinin eksikliği görülmektedir (46). Distrofin glikoprotein kompleksinde yer alan bir proteinin eksikliği de diğer kompleks üyesi proteinlerin hücre içindeki veya sarkolemmadaki varlığını etkileyebilmektedir (4).

Hasta grubumuzdaki 4 hastada disferlin proteininin eksikliği gözlemlenmiştir. Bu hastaların ikisi erkek, ikisi ise kadındır. Erkek hastalardan birinin yaşı on birdir ve hastalığının başlama yaşı dokuzdur. Bu hastanın yaşı, disferlinopatiler için genel olarak literatürlerde verilen yaş grubuna ve bizim disferlinopati patolojik tanısı bulunan

hastalarımızın yaşlarına göre oldukça küçüktür. Yirmi ile otuz yaş aralığı, limb-girdle müsküler distrofi tip 2B ve Miyoshi miyopatisi için literatürlerde verilen klinik semptomların görülmeye başlandığı yaş grubudur (66). Yapılan başka bir çalışmada Seung-Hug Oh ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada dokuz yaşında limb-girdle müsküler distrofi tip 2B başlangıcı bulunan hastalarının bulunduğunu bildirmişlerdir (93). Bu da disferlin proteini bozukluğuna bağlı distrofilerin çocukluk çağında da ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Ayrıca kalpainopatisi ve sarkoglikanopatisi olan bazı hastalarda disferlin proteinin kısmi olarak azalmaya uğradığı gösterilmiştir (88). Hastanın patolojik bulgularında sarkoglikan proteinlerinin herhangi birinde eksiklik gözlemlenmemiştir. Bu nedenle hastanın klinik tanısı konulmadan önce özellikle kalpain-3 proteinin analiz edilmesi gerekmektedir.

Hasta grubunda yer alan beş kişide klinik ve patolojik bulguları dikkate alınarak Western blot yöntemiyle analiz edilen proteinlerinde eksiklik görülmemiştir. Bu nedenle hastaların klinik tanılarının konulabilmesi için farklı müsküler distrofi proteinlerinin ve gen mutasyonlarının araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar hastaların klinik tanılarının konulmasında, hangi genin incelenmesine yönelmek gerektiğine karar verilmesinde ve hastalığa neden olan genetik bozukluğun belirlenmesinde çok önemli bir rol oynayacaktır. Western blot, pahalı ve uzun süren bir yöntem olmakla birlikte müsküler distrofilerin ayırıcı tanılarında kullanılabilecek en güvenli yöntemdir. Bu nedenle çok sayıda müsküler distrofi tipini içeren bir Western blot tanı panelinin oluşturulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Cohn RD, Campell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2000;**23**:1456-1471.
2. Hoffman EP ve ark. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987;**51**:919-928.
3. Petrof BF ve ark. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1993;**90**:3710-3714.
4. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 2002;**82**:291-329.
5. Bansal D, Campbell K. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscle dystrophy. *Trends Cell Biol* 2004;**14**:206-213.
6. Argov Z, Sadeh M, Mazor K, Soffer D, Kahana E, Eisenberg I, Rosenbaum SM, Richard I, Beckmann J, Keers S, Bashir R, Bushby K, Rosemann H. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews. *Brain* 2000;**123**:1229-1237.
7. Duggan DJ, Hoffmann EP. Autosomal recessive muscular dystrophy and mutations of the sarcoglycan complex. *Neuromuscul Disord* 1996;**6**:475-82.
8. Lim LE, Duclos F, Allamand V ve ark. β -Sarcoglycan (43 DAG): characterization and involvement in a recessive form of limb-girdle muscular dystrophy linked to chromosome 4q12. *Nat Genet* 1995;**11**:257-65.
9. Bönnemann CG, Modi R, Noguchi S ve ark. β -sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet* 1995;**11**:266-73.
10. Jung D, Leturcq E, Sunada Y, Duclos F, Tome FM, Moomaw C, Merlini L, Azibi K, Chaouch M, Slaughter C, Fardeau M, Kaplan JC, Campbell KP. Absence of gamma-sarcoglycan (35 DAG) in autosomal recessive muscular dystrophy linked to chromosome 13q12. *FEBS Lett* 1996;**381**:15-20.
11. Kapoor S, Tatke M, Aggorwal S, Gupta A. Beta-sarcoglycanopathy. *Indian J Pediatr* 2005;**72**:71-74.

12. Sharma MC, Manan R, Singh NG, Gulati S, Karla V, Sarkar C. Sarcoglycanopathies: An enigmatic form of muscular dystrophy- A report of 7 cases. *Neurology India* 2004;**52**:446-449.
13. Draviam RA, Wang B, Shand SH, Watkins SC. α -Sarcoglycan is recycled from the plasma membrane in the absence of sarcoglycan complex assembly. *Traffic* 2006;**7**:793-810.
14. Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, Sasaoka T, Yoshida M. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve* 2005;**32**:563-576.
15. Ben Othmane K, Speer MC, Stauffer J ve ark. Evidence for linkage disequilibrium in chromosome 13-linked Duchenne muscular dystrophy (LGMD2C). *Am J Hum Genet* 1995;**57**:732-734.
16. Cooper ST, Lo HP, North KN. Single section Western blot. *Neurology* 2003;**61**:93-97.
17. Anderson LV, Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis for muscular dystrophy proteins. *Am J Pathol* 1999;**154**:1017-1022.
18. Coral-Vazquez R ve ark. Distruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* 1999;**98**:465-474.
19. Michele DE ve ark. Post-translational distruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 2002;**418**:417-422.
20. Esapa CT, Bentham GRB, Schröder JE, Stephan K, Blake DJ. The effects of post-translational processing on dystroglycan synthesis and trafficking. *FEBS Lett* 2003;**555**:209-216.
21. Richards CS, Watkins SC, Hoffman EP, Schneider NR, Milsark IW, Katz KS, Cook JD, Kunkel LM, Cortada JM. Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1990;**46**:672-681.
22. Quan F, Janas J, Fejel SET, Johnson DB, Wolford JK, Popovich BW. Uniparental disomy of the entire X chromosome in a female with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1997;**60**:160-165.

23. Jacobs PA, Hunt PA, Mayer M, Bart RD. Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosome translocation: Further evidence that the DMD locus is at Xp21. *Am J Hum Genet* 1981;**33**:513-518.
24. Kanagawa M, Toda T. The genetic and molecular basis of muscular dystrophy: roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *J Hum Genet* 2006;**51**:915-926.
25. Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet* 2002;**359**:687-95.
26. Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Diagn* 2005;**7**:317-326.
27. Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR. Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 1993;**16**:536-538.
28. Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U. A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J* 1990;**272**:557-560.
29. Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* 1990;**265**:4560-6.
30. Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signal strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 2004;**94**:1023-1031.
31. Stradal T, Kranewitter W, Winder SJ, Gimona M. CH domains revisited. *FEBS Lett* 1998;**431**:134-137.
32. Norwood FLM, Sutherland-Smith AJ, Keep NH, Kendrick-Jones J. The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Structure* 2000;**8**:481-491.
33. Hanein D et al, Matsudaira P. An atomic model of fimbrin binding to F-actin and its implications for filament crosslinking and regulation. *Nat Struct Biol* 1998;**5**:787-792.
34. Rybakova IN, Ervasti JM. Identification of spectrin-like repeats required for high affinity utrophin-actin interaction. *J Biol Chem* 2005;**280**:23018-23023.

35. Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS, Campbell KP. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on β -dystroglycan. *J Biol Chem* 1995;**270**:27305-27310.
36. Huang X, Poy F, Zhang R, Joachimiak A, Sudol M, Eck MJ. Structure of WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat Struct Biol* 2000;**7**:634-638.
37. Hnia K, Zouiten D, Cantel S, Chazalotte D, Hugon G, Fehrentz JA, Masmoudi A, Diment A, Bramham J, Mornet D, Winder SJ. ZZ domain of dystrophin and utrophin: topology and mapping of a β -dystroglycan interaction site. *Biochem J* 2007;**401**:667-677.
38. Ishikawa-Sakurai M, Yoshida M, Imamura M, Davies KE, Ozawa E. ZZ domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to β -dystroglycan. *Hum Mol Genet* 2004;**13**:693-702.
39. Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 1989;**45**:835-847.
40. Prior TW, Friedman KJ, Highsmith WE, Perry JrTR, Silverman LM. Molecular probe protocol for determining carrier status in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Clin Chem* 1990;**36**:441-445.
41. Constantin B, Sebille S, Cognard C. New insights in the regulation of calcium transfers by muscle dystrophin-based cytoskeleton: implications in DMD. *J Muscle Res Cell Motil* 2006;**27**:375-386.
42. Gouveia TLF, Paim JFO, Pavanello RC, Zatz M, Vainzof M. Sarcoglycanopathies: a multiplex molecular analysis for the most common mutations. *Diagn Mol Pathol* 2006;**15**:95-100.
43. Bushby KMD. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain* 1999;**122**:1403-1420.
44. Duggan DJ, Gorospe JR, Fanin M et al. Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *N Engl J Med* 1997;**336**:618-624.

45. Kawai H, Akaike M, Endo T, Adachi K, Inui T, Mitsui T, Kashiwagi S, Fujiwara T, Okuno S, Shin S, Miyoshi K, Campbell KP, Yamada H, Shimizu T, Matsumura K, Saito S. Adhalin gene mutations in patients with autosomal recessive childhood onset muscular dystrophy with adhalin deficiency. *J Clin Invest* 1995;**96**:1202-1207.
46. Guglieri M, Magri F, Comi GP. Molecular etiopathogenesis of limb girdle muscular and congenital muscular dystrophies: Boundaries and contiguities. *Clinica Chimica Acta* 2005;**361**:54-79.
47. Duggan DJ, Manchester D, Stears KP, Mathews DJ, Hart C, Hoffman EP. Mutations in the δ -sarcoglycan gene are a rare cause of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2). *Neurogenetics* 1997;**1**:49-58.
48. Dickens NJ, Beatson S, Ponting CP. Cadherin-like domains in alpha-dystroglycan, alpha/epsilon-sarcoglycan and yeast and bacterial proteins. *Curr Biol* 2002;**12**:197-199.
49. McNally EM, Duggan D, Gorospe JR, Bönnemann CG, Fanin M, Pegoraro E, Lidov HGW, Nogushi S, Ozawa E, Finkel RS, Cruse RP, Angelini C, Kunkel LM, Hoffman EP. Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of γ -sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1996;**5**:1841-1847.
50. Nishiyama A, Endo T, Takeda S, Imamura M. Identification and characterization of ϵ -sarcoglycans in the central nervous system. *Mol Brain Res* 2004;**125**:1-12.
51. McNally EM, Ly CT, Kunkel LM. Human epsilon-sarcoglycan is highly related to alpha-sarcoglycan (adhalin), limb girdle muscular dystrophy 2D gene. *FEBS Lett* 1998;**422**:27-32.
52. Chen J, Shi W, Zhang Y, Sokol R, Cai H, Lun M, Moore BF, Farber MJ, Stepanchick JS, Bönnemann CG, Chan YM. Identification of functional domains in sarcoglycans essential for their interaction and plasma membrane targeting. *Experimental Cell Research* 2006;**312**:1610-1625.
53. Shi W, Chen Z, Schottenfeld J, Stahl RC, Kunkel LM, Chan YM. Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on beta- and delta-sarcoglycan. *Muscle Nerve* 2004;**29**:409-419.

54. Wheeler MT, Zarnegar S, McNally EM. ζ -sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2002;**11**:2147-2154.
55. Esapa CT, Waite A, Locke M, Benson MA, Kraus M, McIlhinney J, Sillitoe RV, Beesley PW, Blake DJ. SGCE missense mutations that cause myoclonus-dystonia syndrome impair ϵ -sarcoglycan trafficking to the plasma membrane: modulation by ubiquitination and torsinA. *Hum Mol Genet* 2007;**16**:327-342.
56. Sciandra F, Bozzi M, Bianchi M, Pavoni E, Giardina B, Brancaccio A. Dystroglycan and muscular dystrophies related to the dystrophin-glycoprotein complex. *Ann Ist Super Sanità* 2003;**39**:173-181.
57. Burton EA, Tinsley JM, Holzfeind PJ, Rodriques MR, Davies KE. A second promoter provides an alternative target for therapeutic up-regulation of utrophin in Duchenne muscular dystrophy. *PNAS* 1999;**96**:14025-14030.
58. Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, Hagiwara Y, Yoshida M. From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 1998;**21**:421-38.
59. Hack AA, Ly CT, Jiang F, Clendenin CJ, Sigrist KS, Wollmann RL, McNally EM. γ -Sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J Cell Biol* 1998;**142**:1279-1287.
60. Hack AA, Cordier L, Shoturma DI, Lam MY, Sweeney HL, McNally EM. Muscle degeneration without mechanical injury in sarcoglycan deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:10723-10728.
61. Bönnemann CG. Limb-girdle muscular dystrophies: an overview. *J Child Neurol* 1999;**14**:31-3.
62. Matsumura K, Tome FMS, Ionasescu V, Ervasti JM, Anderson RD, Romero NB, Simon D, Recan D, Kaplan JC, Fardeau M, Campbell KP. Deficiency of dystrophin associated proteins in Duchenne muscular dystrophy patients lacking COOH-terminal domains of dystrophin. *J Clin Invest* 1993;**92**:866-871.
63. Passos-Bueno MR, Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Zatz M. Linkage analysis in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (AR-LGMD) maps a sixth form to

5q33-34 (LGMD2F) and indicates that there is at least one more subtype of AR LGMD. *Hum Mol Genet* 1996;**5**:814-20.

64. McNally E, Passos-Bueno MR, Bonnemann C ve ark. Mild and severe muscular dystrophy caused by a single γ -sarcoglycan mutation. *Am J Hum Genet* 1996;**59**:1040-1047.

65. Henry MD, Campbell KP. Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol* 1999;**11**:602-607.

66. Yang B, Jung D, Motto D, Meyer J, Koretzky G, Campbell KP. SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem* 1995;**270**:11711-11714.

67. Sotgia F, Lee JK, Das K, Bedford M, Petrucci TC, Macioce P, Sargiacomo M, Bricarelli FD, Minetti C, Sudol M, Lisanti MP. Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of β -dystroglycan: identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem* 2000;**275**:38048-38058.

68. Gesemann M, Cavalli V, Denzer AJ, Brancaccio A, Schumacher B, Ruegg MA. Alternative splicing of agrin alters its binding to heparin, dystroglycan and the putative agrin receptors. *Neuron* 1996;**16**:755-67.

69. Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of the cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 1995;**80**:675-9.

70. Kramarcy NR, Vidal A, Froehner SC, Sealock R. Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian M 58,000 dystrophin-associated protein (syntrophin). *J Biol Chem* 1994;**269**:2870-2876.

71. Madhavan R, Massom LR, Jarrett HW. Calmodulin specifically binds three proteins of the dystrophin-glycoprotein complex. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;**185**:753-759.

72. Sander M, Chavoshan B, Harris SA, Iannaccone ST, Stull JT, Thomas GD, Victor RG. Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:13818-13823.

73. Peter MF, Puccio HMS, Grady RM, Kramarcy NR, Kunkel LM, Sanes JR, Sealock R, Froehner SC. Differential membrane localization and intermolecular associations of α -dystrobrevin isoforms in skeletal muscle. *J Cell Biol* 1998;**142**:1269-1278.
74. Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. Cavolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends Mol Med* 2001;**7**:435-41.
75. Herrmann R, Straub V, Blank M, Kutzick C, Franke N, Jacob EN, Lenard HG, Kroger S, Voit T. Dissociation of the dystroglycan complex in caveolin-3 deficient limb girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2000;**9**:2335-40.
76. Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, Nonaka I, Arahata K, Brown RH. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 2001;**10**:1761-1766.
77. Chiba Y ve ark. Two sisters with dysferlinopathy manifesting different clinical phenotypes. *Rinsho Shinkeigaku* 2003;**43**:188-191.
78. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, Vafiadaki E, Pollitt C, Davison K, Moss JA, Keers S, Pyle A, Shaw PJ, Mahjneh I, Argov Z, Greenberg CR, Wrogemann K, Bertorini T, Goebel HH, Beckmann JS, Bashir R, Bushby KMD. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromusc Disord* 2000;**10**:553-559.
79. Aoki M ve ark. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology* 2001;**57**:271-278.
80. Anderson LV ve ark. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet* 1999;**8**:855-861.
81. Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 1995;**270**:28495-28498.
82. Rizo J, Sudhof TC. C2-domains, structure and function of a universal Ca^{2+} -binding domain. *J Biol Chem* 1998;**273**:15879-15882.
83. Davis DB, Doherty KR, Delmonte AJ, McNally EM. Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *J Biol Chem* 2002;**277**:22883-22888.

84. Ullrich B ve ark. Functional properties of multiple synaptotagmins in brain. *Neuron* 1994;**13**:1281-1291.
85. Augustine GJ. How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr Opin Neurobiol* 2001;**11**:320-326.
86. Han R, Bansal D, Miyake K, Muniz V, Weiss RM, McNeil PL, Campbell KP. Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stres-induced left ventricular injury. *J Clin Invest* 2007;**117**:1805-1813.
87. Durbeej M, Campbell KP. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current Mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 2002;**12**:349-361.
88. Tagawa K, Ogawa M, Kawabe K, Yamanaka G, Matsumura T, Goto K, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK. Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese mescular dystrophy patients. *J Neurol Sci* 2003;**211**:23-8.
89. Cenacchi G, Fanin M, De Giorgi LB, Angelini C. Ultrastructural changes in dysferlinopathy support defective membrane repair mechanism. *J Clin Pathol* 2005;**58**:190-195.
90. Terasaki M, Miyake K, McNeil PL. Large plasma membrane distruptions are rapidly resealed by Ca²-dependent vesicle-vesicle fusion events. *J Cell Biol* 1997;**139**:63-74.
91. Lennon NJ ve ark. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem* 2003;**278**:50466-50473.
92. Galvin JE, Palamand D, Strider J, Milone M, Pestronk A. The muscle protein dysferlin accumulantes in the Alzheimer brain. *Acta Neuropathol* 2006;**112**:665-671.
93. Oh SH, Kang SW, Lee JG, Na SJ, Kim TS, Choi YC. Clinical and pathological characteristics of four Korean patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *J Korean Med Sci* 2004;**19**:447-52.

FORMLAR

Gönüllü Olur Formu

Araştırmanın Adı: " Western blot yöntemi ile müsküler distrofi proteinlerinin tanımlanması"

Bu araştırma, İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalında yapılacaktır. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalına başvuran ve müsküler distrofi tanısı konan hastalara yapılacak olan rutin tanı yöntemlerine ek bir inceleme yöntemidir.

Müsküler distrofiler ilerleyici kas güçsüzlüğü ve kaybıyla karakterize olmuş geniş bir kalıtsal hastalık grubudur. Bu hastalıklara genlerdeki mutasyonlar sonucu dokularda ortaya çıkan protein eksiklikleri ve bozuklukları sebep olur. Bu gruba giren hastalıklar birbirlerine benzer fenotipik özellikler gösterir. Bu nedenle bu hastaların ayırıcı tanısında moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bu araştırmada Duchenne/Becker müsküler distrofi, Limb-Girdle müsküler distrofi tip 1C, Limb-Girdle müsküler distrofi tip 2A, Limb-Girdle müsküler distrofi tip 2B, α sarkoglikanopati (limb-girdle müsküler distrofi tip 2D), β sarkoglikanopati (limb-girdle müsküler distrofi tip 2E), γ sarkoglikanopati (limb-girdle müsküler distrofi tip 2C), δ sarkoglikanopati (limb-girdle müsküler distrofi tip 2F), merozin-negatif konjenital müsküler distrofi fenotipik özellikleri gösteren hastaların protein düzeyinde ayırıcı tanısının konması amaçlanmaktadır. Hastaların klinik tanıların doğru olarak tedavi sürecine katkı sağlamak nihai hedeftir.

Çalışma bir yıl sürecektir. Çalışma süresi zorunlu kalınması durumunda en fazla 6 ay uzatılacaktır. Çalışmaya yaklaşık otuz gönüllü müsküler distrofi hastası katılacaktır.

Araştırmada hastadan rutin olarak histopatolojik inceleme için alınan doku örneklerinden artan 20-30mg'lık kas dokusu kullanılacaktır. Rutin olarak yapılan işlemler sırasında alınacak kas dokusu kullanılacağı için hastaya ek bir yan etki oluşturmayacaktır. Sadece kas dokusu alınması işlemi sırasında çok az bir enfeksiyon riski bulunmaktadır.

Araştırmada İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalında müsküler distrofi tanısı konmuş hastaların rutin incelemeleri için alınan kas dokusu kullanılacaktır. Projede 20-30 mg'lık kas dokusu kullanılacaktır. Doku Multipleks Western Blot yöntemi kullanılarak analiz edilecektir. Bu yöntem kas dokusunda bulunan proteinlere özgü monoklonal antikor kullanılarak etkin şekilde uygulanabilen bir yöntemdir. İşlem sonunda müsküler distrofi hastalığına yol açan proteinlerin kas dokusunda tanımlanması yapılacaktır.

Bu proje sonunda hastaların tedavi süreçlerine katkı sağlayacak Western Blot yönteminin rutin olarak yapılması hedeflenmektedir. Bu sayede müsküler distrofilere yol açan birçok protein kas dokusunda aynı anda analiz edilebilecektir. Klinik muayenelerde fenotipik olarak birbirlerinden ayırt edilmesi zor olan müsküler distrofi hastalarının protein düzeyinde ayırıcı tanıları yapılacaktır. Ayrıca moleküler yöntemlerle klinik tanısı doğrulanmış olan hastalara daha doğru genetik danışma verilebilmesi mümkün olacaktır.

Gönüllü hakları:

- Araştırmaya katılmayı red etme hakkına sahiptir.
- Araştırma sırasında istediğiniz anda haber vererek çalışmadan çekilebilir yada araştırmacı tarafından gerek görüldüğünde araştırma dışı bırakılabilirsiniz.
- Araştırmayı kabul etmemeniz durumunda veya herhangi bir nedenle çalışma programından çıkartılmanız veya çıkmanız halinde, hastalığınız ile ilgili tedavide bir aksama olmayacaktır.
- Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyeceksiniz. Ayrıca çalışmada yapılacak işlemler için size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.
- Gönüllüden alınacak kas dokusu örnekleri sadece " Western blot yöntemi ile müsküler distrofi proteinlerinin tanımlanması" adlı çalışmada kullanılacaktır.
- Çalışma sırasında kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Çalışma sonunda elde edilecek bilgiler sizin ve hekiminiz dışındaki üçüncü bir şahıslara aktarılmayacaktır.
- Yapılacak çalışma herhangi bir tedavi yöntemi değildir.

Sayın Dr. Piraye Oflazer tarafından Deney Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Piraye Oflazer'e (0212) 4142000- 1968 telefon numarası ve İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı adresinden arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllü Onay Formu

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı-soyadı, İmzası, Görevi

ETİK KURUL KARARI



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 11/10/2006

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Pembe Salon

Toplantı Sayısı : 10

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Nihan ÜNALTUNA'nın üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Tıbbi Biyolog Eda BECER'in yürüteceği 2006/1829 protokol numaralı "Western blot yöntemi ile müsküler distrofi proteinlerinin tanımlanması" başlıklı tez çalışması kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI

Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL

İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Cahide GÖKKUŞU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM

Tıp tarihi ve Deontoloji A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN

Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP

I.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Sevinç EMRE

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Veli UYSAL

Patoloji A.D.

Prof.Dr. Yeşim ERBİL

Genel Cerrahi A.D.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Eda	Soyadı	Becer
Doğ.Yeri	Gazimağusa/Kıbrıs	Doğ.Tar.	19.08.1984
Uyruğu	TC/KKTC	TC Kim No	10987061406
Email	becereda@yahoo.com	Tel	0555 527 28 87

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik	
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler	2005
Lise	Gazimağusa Türk Maarif Koleji	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi	85	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	76	76	77
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Mikrosoft ofis programları	iyi