T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI SİNİR BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

FASİOSKAPULOHUMERAL MUSKÜLER DİSTROFİ (FSHD) HÜCRE HATTINDA ÖSTROJENİN ROR1 DÜZEYİNE ETKİSİ

Şermin EROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sevilhan ARTAN

Eskişehir, 2022

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI SİNİR BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

FASİOSKAPULOHUMERAL MUSKÜLER DİSTROFİ (FSHD) HÜCRE HATTINDA ÖSTROJENİN ROR1 DÜZEYİNE ETKİSİ

Şermin EROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sevilhan ARTAN

Eskişehir, 2022

ETİK BEYAN

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

Şermin EROĞLU

ÖZET

Başlık: Fasioskapulohumeral Musküler Distrofi (FSHD) Hücre Hattında Östrojenin ROR1 Düzeyine Etkisi

Amaç: Fasioskapulohumeral Distrofi (FSHD) otozomal dominant kalıtılan en sık görülen üçüncü kas hastalığı olarak karşımıza çıkmaktadır. Kliniği heterojen seyretmekte; hastalığın başlangıç yaşı ve semptomları bireyler arasında farklılık göstermektedir. Hastalığa ilişkin klinik bulguların, erkeklerde kadınlara göre daha erken yaşta başlayarak daha hızlı progrese olması ve özellikle menapoz sonrası kadınlarda hastalığın prognozunun şiddetlenmesi dikkati çekmektedir. Bu çalışmanın amacı; kadınlardaki hastalığın geç başlangıçı ve menapoz sonrasında prognozun ağırlaşmasından yola çıkılarak östrojen hormonunun hastalığın patogenezinde kilit rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Yöntem: Altı farklı hastada ve farklı cinsiyetteki hastalar arasından 47 yaşındaki kadın FSHD tanılı bireye ait biyopsi örneğinden hazırlanmış hücre hattında, i) östradiol eklenmeyen kontrol, ii) EtOH pozitif kontrolü, iii) 10nM 30-dakika, 2. ve 4. saat östradiol eklenmiş gruplarda olmak üzere beş farklı grup oluşturulmuştur. Bu beş farklı gruptan elde edilen hücre lizatları; ROR1 transkripsiyon faktörünün varlığı yönünden western blot yöntemiyle incelenmiştir.

Bulgular: 47 yaşındaki kadın hasta örneğinde östrodiol ile muamele edilmemiş kontrol ve pozitif kontrol olarak kullanılan EtOH eklenmiş örneklerde ROR1 ekspresyonunun varlığı tespit edilirken, östrodiol ile muamele edilmiş örneklerde herhangi bir ekspresyon gözlenmemiştir.

Sonuç: ROR1 proteini embriyonik dönemde eksprese edilirken yetişkin dönemde ifade edilmemektedir. FSHD hastalarında ROR1 protein ekspresyon varlığı ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Östrojen ilavesi ile ROR1 ekspresyonunun baskılandığı da görülmektedir. ROR1'in östradiol muamelesi sonrasında azalması; östrojenin FSHD patofizyolojisinde koruyucu olabileceğinin düşündürmüştür. Östrojenin hastalığın patofizyolojisine olan etkisinin ortaya çıkarılabilmesi için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Östradiol, ROR1, FSHD

ABSTRACT

Title: Effect of Estrogen on ROR1 Level in Fasioscapulohumeral Muscular Dystrophy (FSHD) Cell Line.

Objective: Facioscapulohumeral Dystrophy (FSHD) is the third most common autosomal dominant inherited muscle disease. Clinic is heterogeneous; the onset age and symptoms of the disease differ between individuals. It is notable that the clinical findings of the disease start at an earlier age in men than in women, and the prognosis of the disease intensifies, especially in postmenopausal women. The aim of this study; based on the late onset of the disease in women and the worsening of the prognosis after menopause, it was thought that estrogen hormone may play a key role in the pathogenesis of the disease.

Method: The cell lines prepared from six different paitients and in both genders were used. But only 47-year-old womens primary myoblast cell lines could be cultured and used in this study. Five different groups as i) control group without estradiol, ii) EtOH negative control group, iii) 10nM 30-minute, iv) 10nM 2-hour and v) 10nM 4-hour estradiol treatment were created cell lysates obtained from FSHD myoblasts belonging to these five different groups; the presence and amount of the ROR1 transcription factor was examined by western blot method.

Results: The presence of ROR1 expression was detected in the 47-year-old female sample untreated with estradiol and in the samples with EtOH added as negative control, while no expression was observed in the samples treated with estradiol.

Conclusion: While the ROR1 protein is expressed in the embryonic period, it is not expressed in the adult period. The presence of ROR1 protein expression in FSHD patients was revealed for the first time with this study. It is also seen that ROR1 expression is suppressed with the addition of estrogen. The decrease of ROR1 after estrogen treatment supports the protective role of estrogen in the pathophysiology of FSHD. More comprehensive studies are needed to reveal the effect of estrogen on the pathophysiology of the disease.

Keywords: Estradiol, ROR1, FSHD

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI.....
ETİK BEYAN.....
TEŞEKKÜR SAYFASI.....
ÖZET i
ABSTRACT..... ii
İÇİNDEKİLER iii
TABLOLAR DİZİNİ v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ……vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER..... 2
2.1. FSHD'nin Tanımlanması ve Tarihçesi 2
2.2. FSHD'nin Görülme Sıklığı..... 3
2.3. FSHD'nin Klinik Özellikleri 3
2.3.1. Genel klinik bulgular..... 3
2.3.2. Fshd'de tedavi seçenekleri 3
2.4. FSHD'nin Patogenezi 5
2.4.1. FSHD'nin moleküler ve genetik özellikleri 5
2.4.1.1. FSHD'nin genetik altyapısı..... 5
2.4.1.1.1. D4Z4 Tekrar dizileri..... 5
2.4.1.2. FSHD'de gen ekspresyon çalışmaları 11
2.4.2. FSHD'nin epigenetik altyapısı 11
2.4.3. MiRNA'ların FSHD'deki rolü 13
2.4.4. FSHD patogenizinde multifaktöriyel altyapı 14
2.5. ROR1 Proteini 15
2.6. Çalışmanın Amacı 17
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER 18
3.1. Miyoblast Hücre Hatları 18
3.2. Miyoblast Hücre Hatlarının Kültürü..... 19
3.2.1. Hücre kültürü aşamaları 19
3.2.1.1. Miyoblast örneğinden primer hücre kültürü protokolü..... 19
3.2.2. Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar 21
3.2.3. İşlemler..... 22

3.3. Protein İzolasyonu 23
3.3.1. Gerekli solüsyonlar 23
3.3.2. İşlemler 23
3.4. Elde Edilen Proteinlerin Miktar Tayini 24
3.5. Western Blot Aşaması 25
3.5.1. İşlemler 25
3.5.2. Proteinlerin hazırlanması ve jel elektroforezi (sds-page) 25
3.5.3. Elde edilen proteinlerin membrana transferi 27
3.5.4. Primer ve sekonder antikor muamelesi 28
3.6. Bantların İstatistiksel Hesaplanması 29
3.7. Deneylerde Kullanılan Makina-Techizatların Listesi 30
4. BULGULAR 31
4.1. Hücre Kültürü ait Bulgular 31
4.2. 47 Yaşında Kadın Hastaya ait Hücre Hattı Bulguları 32
4.2.1. ROR1 proteinine ait bulgular 32
5. TARTIŞMA 34
5.1. 47 Yaşındaki Kadın Hasta Örneğine ait Sonuçların Değerlendirilmesi 36
5.2. ROR1 Bulgularının Tartışılması 36
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 38
7. KAYNAKLAR DİZİNİ 39
8. EKLER DİZİNİ 49
EK-1. Turnitin Raporu
9. ÖZGEÇMİŞ.....51
10. YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI 52

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Amerika ve Avrupa'da yaygın olarak kullanılan FSHD hastalığının klinik şiddet (clinical severity score-CSS) skorlaması..... 4

Tablo 3.1. FSHD hücre hatlarına ait moleküler ve klinik veriler..... 18

Tablo 3.2. Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) solüsyonu içeriği..... 23

Tablo 3.3. % 4 Yükleme Jelinin içeriği..... 25

Tablo 3.4. % 12 Ayırma Jelinin içeriği 26

Tablo 3.5. TBS ve TBS-T solüsyonlarının içerikleri 28

Tablo 4.1. ROR1 ve β-aktin proteinlerinin molekül ağırlıkları ve bant büyüklüğü.. 31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. FSHD hastalığını gösteren bir aile pedigrisi..... 2

Şekil 2.2. Dizi artışı (A) ve azalışı (B) olarak DNA kayma mekanizması..... 6

Şekil 2.3. Dördüncü kromozomun uzun kolunda yerleşim gösteren D4Z4 dizisi..... 7

Şekil 2.4. Southern Blot yöntemi sonucu üç farklı vakadan elde edilen elektroforez görüntüsü. 8

Şekil 2.5. FSHD hastalığının tanısında kullanılan FISH yöntemi 9

Şekil 2.6. A bölgesinde DUX4 proteinin yapısında ki iki homeodomain (HD1/HD2) kısmı, B'de aminoasit dizilimi, C'de ise DUX4'ün bağlandığı DNA dizilimi..... 10

Şekil 3.1. Protein büyüklük belirteci..... 27

Şekil 4.1. 47 yaşındaki FSHD hastasına ait hücrelerin morfolojik görüntüleri..... 32

Şekil 4.2. 47 yaşındaki kadın FSHD hastasına ait hücrelerde östrojen varlığında zamana bağlı 130-135 kDa ROR1 protein ifadesinin western blot yöntemi ile β-aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi.....33

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AGO	: Argonuate
bFGF	: basic-Fibroblast Growth Faktörü
CSS	: Clinical Severity Score, Klinik Şiddet Skoru
DMD	: Duchenne Musküler Distrofi
DNMT3B	: DNA Metiltransferaz 3 Beta
DUX4c	: DUX4 kısa form
DUX4-fl	: DUX4 uzun form
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FZD	: Frizzled
FBS	: Fötal Dana Serumu
FSHD	: Fasioskapulohumeral Musküler Distrofi
IL-6	: Interlökin-6
KO	: Knock-out
lncRNA	: long non-coding RNA
MRFs	: Kas Düzenleyici Faktör
miRNA	: mikroRNA
PCR	: Polimerase Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
ROR1	: Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 1
RT-PCR	: Revers Transcriptaz-Polimerase Zincir Reaksiyonu
SMCHD1	: Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1
SNP	: Tek Nükleotit Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
µl	: mikrolitre
µm	: mikrometre
nM	:nanomol

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fasioscapulohumeral Musküler Distrofi (FSHD), kas distrofilerinin en yaygın türlerinden biridir. Otozomal dominant olarak geçiş gösteren genetik temelli bir hastalıktır.

FSHD kliniğine bakıldığında, öncelikle yüz, kürek kemiği ve omurga çevresi olmak üzere tüm vücut kaslarını tutabilen asimetrik ilerleyici güç kaybı ile kendini gösteren bir hastalıktır. Hastalığın ortaya çıkışı ve ilerleyişi heterojen olsa da genellikle ikinci ve üçüncü dekadda ortaya çıkmaktadır.

FSHD kliniğinde erkek ve kadın hastaların muayene bulgularına bakıldığında aralarında anlamlı bir farklılık olduğu görülmektedir. Özellikle kadın hastalarda mensturasyon döneminden menapoza kadar geçen süreç hafif olurken, menapoz sonrasında şiddetlenerek artan bir seyir gözlenmektedir. Bu durum klinik açıdan değerlendirildiğinde, östrojenin hastalığın prognozu üzerinde önemli bir faktör olabileceğini göstermektedir.

FSHD'nin patofizyolojisinin araştırılmasında moleküler mekanizmalara ilişkin çok sayıda araştırma yapılsa da hastalar arasındaki farklılığın ve FSHD'nin patogenezinin hala tam olarak aydınlatılamadığı görülmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bilenen en önemli protein, aynı zamanda bir transkripsiyon faktörü olan DUX4'tür. DUX4 haricinde benzer yapıdaki transkripsiyon faktörlerinin de kilit proteinler arasında olabileceği düşünülmektedir. Bunlardan biri de reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesi olan ROR1 proteinidir.

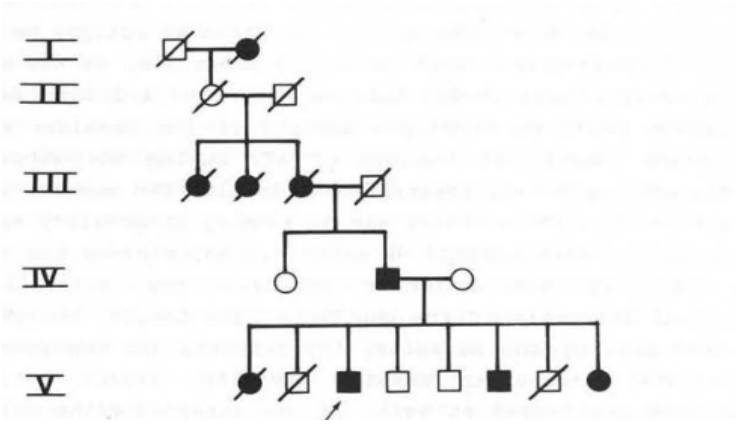
Bu çalışmada erkek ve kadın hastalar arasındaki farklılılığın ortaya konmasında östrojenin etkisini moleküler düzeyde araştırmak amacıyla ROR1 protein düzeyi incelenecektir. Bu hipotez doğrultusunda FSHD hastalarından elde edilen hücrelerde östrojen ile muamele öncesi ve sonrasındaki örneklerden immünoblotlama yöntemiyle ROR1 proteininin varlığı belirlenerek, östrojenin etkisinin hedef proteinler üzerinde anlamlı bir etki oluşturup oluşturmadığının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. FSHD'nin Tanımlanması ve Tarihçesi

Sinir-kas (nöromusküler) kavşağında görülen hastalıklara ilişkin kavram çok geniş bir hastalık yelpazesini içine alan bir tanımdır. Bu tanımlamaya dahil edilen hastalıklar, sinirlere veya kas tamamlayıcısına zarar verir. Bu hasar vücudun Schwann hücrelerinde, aksonlarda ve sinir hücrelerinde olabileceği gibi nöromüsküler kavşakta veya kas yapısının kendisinde, daha komplike olarak tüm bu yapıların bir kombinasyonu olarak da ortaya çıkabilir (Morrison, 2016).

FSHD'ye bakıldığında sadece kas yapısını tutan nöromüsküler bir hastalık olduğu bilinmektedir. Tarihsel süreç içerisinde FSHD'yi diğer kas hastalıklarından ayırt etmek kolay değildir (Padberg, 1982). 19. yüzyılın ortalarında kronik müsküler atrofi, bir ön keratoz olarak kabul edilirdi; ancak Duchenne müsküler distrofisiyle ilgili birkaç çalışma, mevcut FSHD tanımıyla neredeyse tamamen uyumlu vakaları tanımladı. 1868 tarihli bir makalede, Duchenne Musküler Distrofiye ilişkin kas yapısındaki değişikliklere vurgu yapıldı. Eulenburg ve Cornheim tarafından beyin ve omuriliğin etkilenmediğini gösteren otopsi raporları yayınlandı ve başka bir ileri kas vakasında omurilik ve periferik sinirlerin tamamen etkilenmediği belirtildi. Bu vaka muhtemelen tarihteki ilk belirsiz otopsi FSHD vakasıdır (Şekil 2.1.). Primer miyopati kavramını tanımlamak birkaç yıl aldı.



Şekil 2.1. FSHD hastalığını gösteren bir aile pedigrisi

2.2. FSHD'nin Görülme Sıklığı

Literatüre bakıldığında FSHD (OMIM#158900), dünya üzerinde kas distrofileri arasında üçüncü sık görülen kas hastalığıdır. Görülme sıklığına bakıldığında 1/15,000-1/20,000 arasında değişmektedir (Statland & Tawil, 2014). Yapılan bir çalışmada Hollanda'da insidansın ise 0.3:/100.000 ve prevelansında iki kattan daha yüksek 12/100.000 olduğu belirtilmiştir (Deenen, Arnts vd., 2014). Son yıllarda yapılan yeni çalışmalar sonrasında hastalığın 1/7500 görülme sıklığına sahip olduğu belirtilmektedir (Denny & Heather, 2017).

2.3. FSHD'nin Klinik Özellikleri

2.3.1. Genel klinik bulgular

FSHD'nin kliniği, hastalığın adını da belirleyen özellikle yüz bölgesi, omuz kasları ve bazen debacak kaslarında güç kaybı ve asimetrik olarak ilerleyici bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Tawil, 2008; Fitzsimons, 2011).

Genel olarak hastalığın ortaya çıkış zamanı 20'li ve 30'lu yaşlar (Tawil, 2008) olarak tanımlansada hastalar arasında hastalığın klinik şiddeti ve hastalığın ilerleyişi bireyler arasında farklılık göstermektedir. Bazı hastalarda hastalık hafif ve yavaş seyirli olarak ilerlerken, bazı hastalar için prognoz çok şiddetli olabilir ve bu hastalar yirmi yaşında hastalanır, daha sonraki yaşamlarında tekerlekli sandalyeye bağlı kalırlar. Amerika ve Avrupa'da sık kullanılan; klinik prognoz sınıflaması olarak kullanılan skorlama (clinic severity score-CSS) sistemi ile FSHD'nin progresyonu incelenmektedir (Ricci, Galluzzi vd., 1999; Van Overveld, Enthoven vd., 2005) (Tablo 2.1.).

2.3.2. FSHD'de tedavi seçenekleri

FSHD, kas distrofileri arasında en sık görülen üçüncü kas distrofisidir. Henüz tam anlamıyla bir tedavisi bulunmamaktadır. Genetik bir hastalık olmasından dolayı, yapılan tedavi denemeleri özellikle DUX4 proteini üzerine odaklanılmış ve bu proteini hedefleyen küçük RNA parçaları olmuştur (Vanderplanck, Tassin vd., 2018). Yapılan tedavi stratejilerinden şimdiye kadar fayda sağlanabilecek bir sonuç çıkmamıştır. Yapılan bir çalışmada ise; histidil-tRNA sentetaz enzimine çok benzer nitelikte bir protein kullanılmış ve üç ay süren bir terapi ile sadece erken başlangıçlı

hastalarda önemli bir fayda sağlanabildiği belirtilmiştir (Walker, Butterfield vd., 2017).

Tablo 2.1. Amerika ve Avrupa'da yaygın olarak kullanılan FSHD hastalığının klinik şiddet (clinical severity score-CSS) skorlaması

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

Birçok çalışmada, erkek ve kadın hastalar arasında önemli klinik farklılıklar tanımlanmıştır. Bu çalışmalara bakıldığında özellikle erkek FSHD'li hastalarda klinik bulgular daha şiddetli ve daha erken ortaya çıkmaktadır (Lin, Wang vd., 2015). Bebek vakalarında erkekler ve kadınlar arasında böyle bir farklılık gözlenmemiştir (Klinge, Eagle vd., 2006). FSHD bir kas hastalığı olarak isimlendirilse de göz, kulak, diş ve kemiklerdeki anormallikler de hastalıkla birlikte seyredebilir ve prognozla ilişkilendirilebilmektedir (Matsuzaka, Sakuragawa vd., 1986; Balatsouras, Korres vd., 2007; Fitzsimons, 2011). FSHD'de var olan klinik bulgular haricinde sensörinöral işitme kaybı, retina damar hastalığı, kalbin sağ dal bloğu ve restriktif akciğer hastalığı da görülebilmektedir (Tawil, Kissel vd., 2015). Epilepsi ve zeka geriliği gibi şiddetli FSHD'li pediatrik olgularda merkezi sinir sistemi tutulumu görülebilmektedir (Saito, Miyashita vd., 2007).

2.4. FSHD’nin Patogenezi

2.4.1. FSHD’nin moleküler ve genetik özellikleri

FSHD hastalığı genetik olarak otozomal dominant kalıtım modeli ile ortaya çıkmaktadır. FSHD hastalığı üç ana başlık altında değerlendirilir. Bunlar; genetik, epigenetik ve multifaktöriyel etkenlerdir.

2.4.1.1. FSHD’nin genetik altyapısı

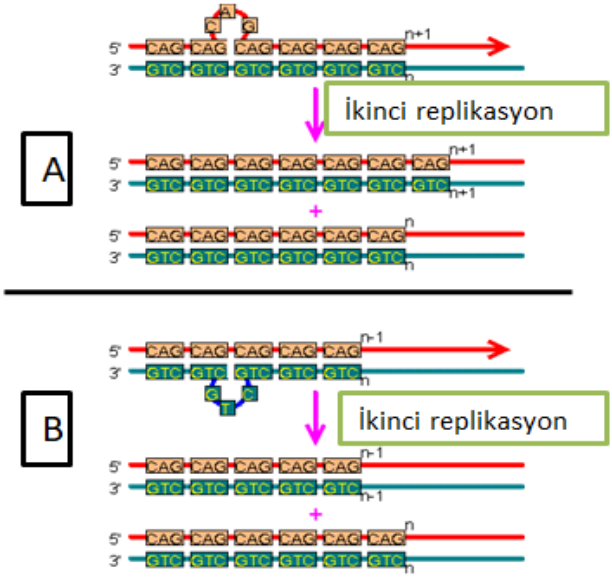
2.4.1.1.1. D4Z4 tekrar dizileri

İnsan genomunda takribi 3,2 milyar baz olduğu bilinmektedir. Beklentilerin aksine bu büyük genomun küçük bir kısmı proteinleri kodlar. Kodlama bölgeleri genler ve gen ile ilgili bölgelerdir. Bunlar benzersiz diziler olarak sınıflandırılır; kodlama bölgesi, promotör bölgesi, enhanser bölgesi. Protein kodlamayan bölgelere intergenik bölgeler denir. Çoğu intergenik DNA, "repetitive DNA" adı verilen tekrarlayan dizilerden oluşur. Tekrarlanan diziler, tekrar eden birimin boyutuna ve evrimsel kökenine göre sınıflandırılır.

Dünya üzerinde yaşayan insanların DNA dizi benzerliği %99.9'dur. Geriye kalan %0,1 ise bireyler arasında farklılıkları oluşturur ve buna genetik varyasyon (polimorfizm) denir. Polimorfizmler, belirli hastalıkları artırma eğiliminde olmalarına veya koruma özelliklerine sahip olmalarına rağmen, mutasyonlardan farklı olarak hastalıklara neden olmazlar. İnsan genomundaki polimorfizm; tek nükleotid düzeyinde (SNP; tek nükleotid polimorfizmi) olabilir veya daha büyük alanlar içerebilir. Genomdaki tekrarlayan dizilerin çoğu da polimorfiktir; kişiden kişiye değişir. Bu tekrarlayan dizilerin her birinin normal kabul edilen bir aralığı vardır. Normal aralığın ötesinde tekrarlayan dizilerin sayısının dinamik mutasyonlarla birlikte artması veya azalması, tekrarlayan dizi hastalıkları olarak adlandırılan bir grup hastalık oluşturur.

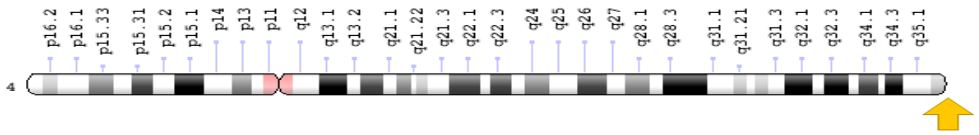
Tekrar dizi artışı ile seyreden hastalıkara bakıldığında özellikle 1-6 nükleotidlik mikrosatellit dizilerinde artışlar gözlenebilmektedir. Bu artışlar ile seyreden hastalıklar arasında; Myotonik Distrofi, Frajil X, Huntington hastalığı gibi hem nöromusküler hem de nörodejeneratif olan hastalıklar bulunmaktadır. Bu hastalıklara bakıldığında hem ekzonik hem de intronik bölgede değişimler

olabilmektedir (Budworth & McMurray, 2013). Eğer tekrar eden dizi artışı ekzonik bölgede görülüyorsa hatalı protein oluşumu ile birlikte protein birikimine sebebiyet vermektedir. Tekrar dizi artışı intronik bölgede ise; alternatif kırpılmada ve/veya gen ifadesinin kontrolünde bozulmalar yaratabilmektedir. Bahsi geçen tüm bu değişiklikler sonucunda hastalık ortaya çıkmaktadır. Familyal olarak görülen bireylerde nesilden nesile tekrar sayısı daha da artarak; hastalığın ortaya çıktığı yaşın çok daha erken zamanlarda görülmesine ve hastalığın şiddetinin de artmasına sebep olmaktadır. Bu fenomen genetik beklenti veya antispasyon olarak adlandırılmaktadır. Birçok farklı genetik mekanizma bu beklentinin oluşmasına ve tekrar sayı değişikliğine neden olabilmektedir. DNA replikasyonu sırasında DNA kayma (slippage) olarak ifade edilen mekanizmada iki farklı durum meydana gelebilir. Bunlardan ilki, sentezi yapılan DNA zincirinin kendi üstüne doğru katlantı yapmasıyla insersiyon oluşumuna (tekrar artışına) sebebiyet vermektedir (Şekil 2.2.A). Görülen ilk durum, özellikle Huntington hastalığı ve Frajil X gibi tekrar dizi artışı ile seyreden hastalıklarda önem arz etmektedir. Bahsi geçen ikinci durumdaysa kalıp DNA zinciri kendi üstüne katlantı oluşturabilir ve bu durum sanki kopyalanmamış gibi bir delesyona oluşumuna sebep olur (Şekil 2.2.B). Bu ikinci durum özellikle FSHD için söz konusu olabilir. Çünkü FSHD tekrar dizi artışı ile değil, makrosatellit tekrar dizi kısalması olan bir hastalıktır.



Şekil 2.2. Dizi artışı (A) ve azalışı (B) olarak DNA kayma mekanizması

Yapılan genetik bağlantı çalışmalarına bakıldığında FSHD hastalarının yaklaşık %95'inin dördüncü kromozomun q kolunda (4q35.2) bulunan D4Z4 tekrar dizisinde azalma ile ilişkili olduğu görülmektedir (Wijmenga, Frants vd., 1990; Wijmenga, Hewitt vd., 1992; Wijmenga, Sandkuijl vd., 1992) (Şekil 2.3.).

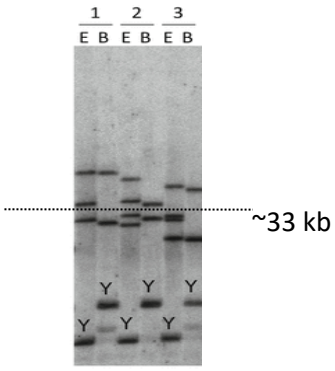


Şekil 2.3. Dördüncü kromozomun uzun kolunda yerleşim gösteren D4Z4 dizisi

D4Z4 bölgesi normal bireylerde her biri 3.3 kb büyüklüğünde on bir ila yüz arasında değişiklik gösteren tekrar dizilerinden meydana geldiği bilinmektedir. Bilindiği üzere FSHD hastalarının azalmış (bir ila on civarı) tekrar dizisi içerdiği bildirilmektedir (Hewitt, Lyle vd., 1994).

FSHD hastalarının tekrar dizi sayıları yaklaşık 3,3 kb olduğu için Southern Blotlama ya da moleküler kombin yöntemleri kullanılabilmektedir (Lemmers, Wohlgemuth vd., 2007; Nguyen, Walrafen vd., 2011). FSHD'nin bazı ayırt edilebilir semptomları olmasına rağmen kesin tanı sağlayabilecek bir biyobelirteç bulunmamaktadır. Yapılan bazı biyokimyasal değerlendirmeler (kreatin kinaz gibi) FSHD'yi diğer kas hastalıklarından ayırt etmek için yeterli değildir. Southern blot, D4Z4 tekrarlarının kısalmasını göstermek için en eski ve en etkili yöntemdir. Bu yöntemin uygulanmasında öncelikle hastalardan yüksek miktarlarda DNA elde edilmesi gerekmektedir. DNA'nın 4q35 bölgesinde D4Z4 dizisi için seçici olan BlnI ve EcoRI restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve PFGE ile kesimi yapılan DNA büyüklüklerinin incelenmesi işlemine dayandırılmaktadır. İnsan genomunda bahsi geçen bölgenin birden çok paraloğunun olması nedeniyle uygulanan yöntemde sorunlar oluşabilmektedir (Clapp, Mitchell vd., 2007). Bunlardan hemen hemen hiçbiri FSHD ile ilişkilendirilmemiştir (Ehrlich, Jackson vd., 2007; Klooster, Straasheijm vd., 2009). 4q35'de bulunan D4Z4 dizisiyle %97 homolojiye sahip olan 10q26'da lokalize D4Z4 tekrar dizisi bulunmaktadır. Burada görülen en önemli sorun, yüksek derecede homoloji gösteren bu bölgeler nedeniyle EcoRI enzim kesimi yapıldıktan sonra 4. kromozomda yer alan bölgeden iki fragman elde edilmesi

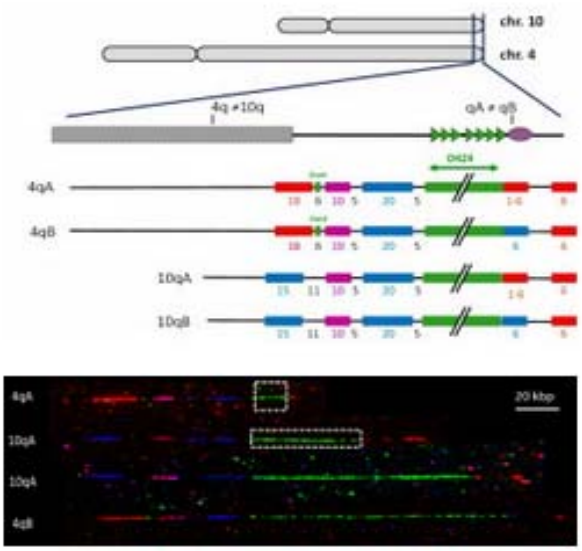
gerekirken 10. kromozom bölgesinden dört fragman elde edilmesidir. Hastalığa sebep olan tekrar dizisinin kısalmasının gösterilmesinde 4. kromozom bölgesinin diğer diziden farklı olan %3'lük kesimden yaralanılarak ikinci bir kesim enzimi olan BlnI enziminin kullanılması gerekliliği doğmuştur. Bu enzimde sadece 10. kromozom bölgesini daha küçük parçalar ayırırken 4. kromozom bölgesini kesmemektedir, böylelikle 10. kromozom dışlanabilmektedir. FSHD tanısında kullanılan southern blot yönteminin aynı kişiye ait iki farklı örneği Şekil 2.5.'de gösterilmektedir. Bu sayede genetik tanı koyulabilmektedir.



Şekil 2.4. Southern Blot yöntemi sonucu üç farklı vakadan elde edilen elektroforez görüntüsü

Bahsi geçen bölgeler arasındaki yüksek dereceli benzerlik, bu iki kromozomal lokasyon arasında gen dönüşümlerine sebep olmaktadır (Lemmers, Van Overveld vd., 2004). Gen konversiyonunun bu iki kromozom arasında hangi alanları içerdiğine bağlı olarak çok farklı kombinasyonlar olabilmektedir. Gen dönüşümleri ve dizinin uzun oluşu hastalığın tanısında ciddi zorluklar yaratmaktadır.

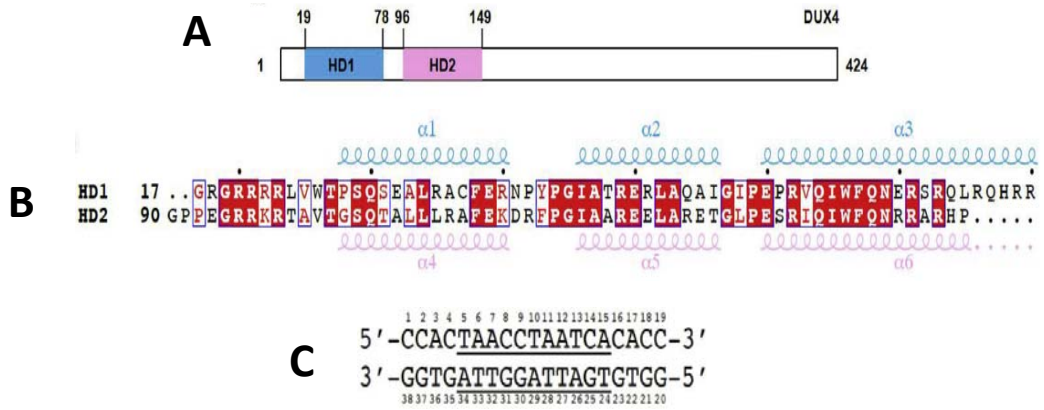
Hastalığın tanısında görülen bu zorlukların aşılabilmesi için moleküler kombinasyon adı verilen yeni yöntem geliştirilmiştir (Nguyen, Walrafen vd., 2011). Bu yeni yöntemde çoklu problar kullanılarak floresan in situ hibridizasyon (FISH) yapılmaktadır (Şekil 2.5.). Bu yeni metod şimdiye kadar sadece Fransa'da kullanılmaktadır.



Şekil 2.5. FSHD hastalığının tanısında kullanılan FISH yöntemi

FSHD'nin patogenizinde var olduğu bilinen ve D4Z4 tekrar dizisi dışında da gösterilmesi gereken başka bir dizi bulunmaktadır. Bu dizi D4Z4 tekrar dizisine çok yakın bir bölgede görülen tek nükleotitlik bir değişimdir (Lemmers, Wohlgemuth vd., 2007; Spurlock, Jim vd., 2010). Dördüncü kromozomun uzun kolunda yer alan, bahsi geçen dizinin içinde yerleşik konumda olan, DUX4 mRNA'sı için özellikle poliadenilasyon sinyali yaratarak DUX4 mRNA'sının stabilize olmasını sağlayan qA aleli olarak adlandırılan ve 10q26'da neredeyse hiç görülmeyen bir allelin varlığıdır (Kowaljow, Marcowycz vd., 2007; Lemmers, Van Der Vliet vd., 2010).

Dördüncü kromozomun uzun kolunda bulunan ve D4Z4 tekrar dizilerinin içinde şimdiye kadar tespit edilmiş tek gen olan, revers transkriptaz enzimi vasıtasıyla RNA'nin DNA'ya dönüştürülerek genoma tekrar sokulan bir DUX4 retrogendir. FSHD hastalığı ile ilişkilendirilen DUX4 retrogeni, D4Z4 tekrar kısmının sadece sonunda bulunmaktadır (Kowaljow, Marcowycz vd., 2007; Snider, Geng vd., 2010). DUX4 geninin, sağlıklı ve erişkin bireylerde sadece testis dokusu içerisinde (Snider, Geng vd., 2010) transkripsiyona uğradığı bildirilmiştir. Diğer doku ve organlarda ifade edilmemektedir. Bu gen iki homedomain içeren (Lyle, Wright vd., 1995; Winokur, Bengtsson vd., 1996) (Şekil 2.6.) ve hücre çekirdeğinde yer alan bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır (Dixit, Ansseau vd., 2007).



Şekil 2.6. A bölgesinde DUX4 proteinin yapısında ki iki homeodomain (HD1/HD2) kısmı, B'de aminoasit dizilimi, C'de ise DUX4'ün bağlandığı DNA dizilimi

Yapılan çalışmalar ve analizlerde DUX4 geninin evrimsel olarak korunduğu belirtilmektedir (Leidenroth & Hewitt, 2010). DUX4 geninin kendisine ait bir promoter olmasına karşın poliadenilasyon sinyalinin olmadığı belirlenmiş (Gabriels, Beckers vd., 1999), şimdiye kadar herhangi bir FSHD hastasında D4Z4 dizisinin tamamen delesyona uğradığı görülmemiştir (Tupler, Berardinelli vd., 1996). Hastalığın oluşumundaki esas görülen durumun susturulması gereken bir genin aslında fonksiyonel olarak bir kazanım olduğudur. Yapılan detaylı analizlerde, yaklaşık her bin adet FSHD nükleusunun ya da miyoblast hücrelerinin bir tanesi DUX4 mRNA'sının tümü veya proteini için pozitif olarak bulunmaktayken, diğer kültürlerin DUX4 için negatif olduğu saptanmıştır (Snider, Geng vd., 2010). DUX4 etkisini, ifadesini değiştirdiği genler üzerinden gösteren bir transkripsiyon faktörüdür (Dixit, Ansseau vd., 2007). Bu yönde yapılmış çalışmalarda; DUX4'ün tamamının ifadesinin indüklenmesi kas atrofisine ilişkin genlerin de ifadesinin artışına, bazı hücrelerin ölümüne ve anormal görünümlü miyotüplerin oluşmasına sebep olduğu bulunmuştur (Bosnakovski, Xu vd., 2008; Vanderplanck, Ansseau vd., 2011). DUX4'ün tamamının yapmış olduğu bu etki DNA'ya bağlanarak oluşur; ancak DNA dizisine bağlanan bölgelerin mutantları oluşturulduğu zaman bahsi geçen etkinin gözlenmediği bildirilmiştir (Mitsuhashi, Mitsuhashi vd., 2013).

DUX4 transkriptlerinin varyantlarının olduğu son zamanlarda yapılan çalışmalarda bildirilmektedir. FSHD hastalığı ile ilişkilendirilen DUX4-fl pA (DUX4c veya DUX4s olarak adlandırılmış) formunun COOH terminalindeki

değişiklikten dolayı kaynaklanan farklı bir uç birleştirme formu bulunmaktadır (Dixit, Ansseau vd., 2007; Snider, Geng vd., 2010). Hem daha kısa hem de ters yerleşimli olan başka bir D4Z4 tekrarı ise 4q35 bölgesinden 42 kb uzaklıkta yer alır (Wright, Wijmenga vd., 1993). Bu tekrar bölgesi de açık okuma dizisi içermektedir. Bahsi geçen bu bölge DUX4'e çok benzer olup, otuz iki aa dizilimi içeren ve yaklaşık 47 kDa ağırlığındaki daha kısa bir formu olan DUX4c proteinini de kodlamaktadır. Her bir kas çekirdeğinde DUX4c'nin bulunduğu bir başka çalışmada da ifade edilmiştir (Vanderplanck, Tassin vd., 2018). Yapılan çalışmanın önem arz eden bu bulgusu da, DUX4'ün FSHD kas hücrelerinde her bin hücreden sadece bir tanesinde olduğuna ilişkin ifadeden (Snider, Geng vd., 2010) farklılık göstermektedir.

2.4.1.2. FSHD'de gen ekspresyon çalışmaları

Birçok farklı gen ifadesi üzerine yapılan çalışmalar FSHD miyoblast hücre hatları ve hasta biyopsileri üzerinde yapılmıştır (Osborne, Welle vd., 2007; Cheli, Francois vd., 2011; Tsumagari, Chang vd., 2011). Bu çalışmalar arasında farklılıklar olsa da; FSHD patogenizinde çok sayıda genin ifadesinde meydana gelen değişik ifade edilmektedir (Tupler, Perini vd., 1999; Winokur, Chen vd., 2003; Celegato, Capitanio vd., 2006; Osborne, Welle vd., 2007; Arashiro, Eisenberg vd., 2009). Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, embriyolojik süreçteki farklılaşma aşamalarında, apoptotik süreçlerde farklı fonksiyonları ve görevleri olan çok sayıda genin ekspresyon farkları bulunmaktadır. Bu kadar çok gen ekspresyon çalışması yapılmasına karşın FSHD'den sorumlu net bir gen tanımlanamamıştır.

2.4.2. FSHD'nin epigenetik altyapısı

Bilindiği gibi geleneksel genetik tanımlamasında, nükleotit dizilimi ifade edilir. Epigenetik kavramı ise DNA dizisi üzerinde olmayan değişiklikleri tanımlamak için kullanılmaktadır. DNA dizisi üzerinde herhangi bir değişim gerçekleşmeden gelen bu modifikasyonlar, genlerin ekspresyon seviyelerinde değişiklik oluşturarak etkilerini göstermektedir. Bu değişiklikler geri dönüşümlü olabilmektedir. Son yıllarda epigenetik üzerine yapılan geniş çaplı araştırmalar ile; beslenme ve çevre koşullarının genler üzerine etkisinin nasıl, ne şekilde oluştuğunu ve aynı DNA dizilimine sahip kişiler arası farklılıkların nasıl görülebildiğini

anlamamızı sağlamıştır. Epigenetik modifikasyonlara bakıldığında; DNA metilasyonu, histonların asetilasyon/deasetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon, sumolasyon, sitrulinasyon ve ribozilasyon gibi kovalent modifikasyonlar ile miRNA ve lncRNA benzeri translasyona uğramayan RNA ailelerine ait transkripsiyon sonrası modifikasyonlar olarak belirtilebilir.

Her ne kadar yapılan çalışmalar ile FSHD hastalarının %95'inin D4Z4 tekrar dizisindeki kısalmalara bağlı olduğu belirtilmişse de, hastalığın patofizyolojisini açıklamaya yeterli olamamıştır. Bunun da en iyi açıklamalarından biri 4q35 bölgesindeki D4Z4 alanında beş tekrar dizisi taşıyan ve semptom göstermeyen hastaların varlığı ya da tam tersine ara durum (interzone) olarak ifade edilen ve sadece 11 ila 12 tekrarı olan kişilerde bile FSHD'ye ilişkin semptomların ortaya çıkmış olması nedeniyle daha ileri çalışmaların yapılması gerekliliği doğmuştur. Bu farklılıkların da D4Z4 dizisindeki metilasyon seviyesi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir.

D4Z4 dizisinde meydana gelen delesyonlar haricinde ve %5'lik kısımda yer aldığı düşünülen FSHD hastalarının DNMT3B ve SMCHD1 genlerinin metilasyona uğradığı bilinmektedir. DNMT3B geni; yirmi numaralı kromozomun uzun kolunda yer almaktadır. SMCHD1 geni ise; on sekiz numaralı kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır. Dimer yapısı göstererek DNA metilasyonuna sebebiyet vermektedir (Yamanaka, Goto vd., 2004; De Greef, Lemmers vd., 2009). Bahsi geçen bu iki genden herhangi birinde mutasyon gözlendiğinde DNA düzeyinde genel bir hipometilasyon oluştuğu belirtilmektedir. Normal bireylerde metile konumda olması gereken bu genlerin herhangi bir mutasyon sonucu genel bir metilasyon azlığına neden olduğu görülmektedir. Hipometilasyon ile birlikte qA alelini taşıyan, kısalmış bir D4Z4 dizisi de bulunuyorsa FSHD'nin ortaya çıktığı belirtilmiştir (Lemmers, Tawil vd., 2012; Van den Boogaard, Lemmers vd., 2016).

Yapılan bu çalışmalar ışığında metilasyon değişikliklerine özgü yeni yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Özellikle hasta bireyler ile sağlıklı bireyler arasındaki farkı tespit etmeye yönelik bisülfit modifikasyon tabanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılmaktadır. Böylelikle D4Z4 bölgesindeki metilasyona

ilişkin bilgilerle hastalığın tanısına gidilebileceği düşünülmektedir (Gaillard, Roche vd. 2014; Jones, Yan vd., 2014).

2.4.3. MiRNA'ların FSHD'deki rolü

Posttranskripsyonel bir modifikasyon olan ve epigenetik regülasyonda görev alan miRNA'lar yaklaşık 19-25 nükleotit uzunluğunda kodlanmayan RNA moleküleridir (Bartel, 2004). İnsan genomundaki genlerin en az 3'te 1'inin miRNA'larla etkileşiminin olduğu ve RNA polimeraz II enzimi aracılığıyla sentezlendiği bilinmektedir (Lewis, Burge vd., 2005). MiRNA'lar, mRNA'ların 3' ucuna bağlanarak, Argonaute (AGO) proteinlerini kendisine doğru yaklaştırmaktadır. Buna göre 3 farklı yolla AGO proteinleri mRNA'dan protein sentezini önlemektedir. Bunlar; ilgili mRNA'nın yıkımı, ilgili mRNA'da deadenilasyon oluşturma ve ilgili mRNA üzerindeki translasyonel kompleksin ilerleyişini durdurmak suretiyle protein sentezini (translasyon) inhibe etme şeklindedir (Huntzinger & Izaurralde 2011).

Yapılan bir çalışmada Real-time Polimeraz Zincir Teaksiyonu (RT-PCR) tabanlı analizde FSHD kas hücrelerinde ve normal hücrelerde D4Z4'ten kaynaklanan çok sayıda hem sense hem de antisense transkriptlerin olduğu belirtilmiştir (Snider, Asawachaicharn vd., 2009). Yapılan analizlere göre; translasyonu yapılmayan 5' uçta yer alan kısım ile ekzonik ve intronik bölgede ve yine translasyona uğramayan 3' uçta bulunan kısımlarda da miRNA fragmanlarının oluştuğu belirtilmiştir. Özellikle, DUX4'ün promoter kısmından transkripsiyonunun yapılacağı bölgeyi hedefleyen siRNA vasıtasıyla DUX4'ün azaldığı; miRNA oluşumda önemli bir rolü olan DICER enziminin ve Argonaute'ın susturulması ile DUX4 düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Elde edilen bu verilerle DUX4 düzeyinin miRNA'ların kontrolünde olduğu ortaya çıkarılmıştır (Lim, Snider vd., 2015).

FSHD'ler üzerine yapılan bir çalışmada, miRNA profilinin çıkarılmasında miR-411'in ekspresyon düzeyi üzerinde önemli farklılıklar olduğu belirtilmiştir (Harafuji, Schneiderat vd., 2013). Primer miyoblastlar üzerine yapılan bir diğer transkriptom çalışmasında ise; farklı düzeylerde ifade bulan yirmi dokuz ayrı (sekiz downregüle ve yirmi bir upregüle) miRNA tespit edilmiştir. DUX4 aşırı ifadesinin bu yirmi dokuz adet miRNA'nın yukarı yönlü düzenlenen on iki tanesi ile örtüştüğü belirtilmektedir (Dmitriev, Stankevicins vd., 2013). Bir diğer çalışmada ise; FSHD

tanılı vakalardan alınan biyopsi materyalleri ile kontroller karşılaştırıldığında sekiz miRNA'nın ifadesinde farklılık olduğu belirtilmiştir (miR-625, miR-34a, miR-517, miR-331-5p, miR-582-5p, miR-516b, miR-380-3p ve miR-330) (Portilho, Alves vd., 2015).

Kas hücrelerinin farklılaşması esnasında ve miyogenezde çoğalma süreçlerindeki miRNA ekspresyon farklılıklarını incelemek amacıyla yapılan ve yeni nesil dizileme ile beraber kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin kullanıldığı bir çalışmada kontrol grubunda otuz dörtü upregüle olmak üzere toplam otuz sekiz adet miRNA olduğu belirtilmiştir. FSHD hastalarına ait hücrelerde bu sayı çok daha az olmakla beraber, FSHD'ye spesifik altı farklı miRNA'nın (miR1268, miR1268b, miR1908, miR4258, miR4508 ve miR4516) düzeyinin değiştiği tespit edilmiştir (Colangelo, Francois vd., 2014). Yapılan önemli bir çalışmada ise FSHD1 ve FSHD2'de birbirinden farklı miRNA'ların değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (Lim, Wong vd., 2018). Bu sayede klinikleri birbirine çok benzer olan FSHD1 ve FSHD2'nin oluşumda farklı moleküler mekanizmaların olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Duchenne Musküler Distrofi (DMD)'de kan/serum biyobelirteçleri olarak belirtilen ve tanı testlerine alternatif olarak kullanılabilmesi amacıyla üç adet miRNA'nın (miR-1, miR-206 ve miR-133a) sekiz FSHD hastasının serumunda incelenmiş ancak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Matsuzaka, Kishi vd., 2014).

In vivo temelli yapılan bir çalışmada, farelerde DUX4'ün miRNA mimikleri ile susturulmasının miyoblast hücrelerdeki yoğunluğun azalmasını önlediği gösterilmiştir (Wallace, Liu vd., 2012).

2.4.4. FSHD patogenizinde multifaktöriyel altyapı

Yapılan çalışmalara bakıldığında; FSHD patogenizinde hem genetik hem de epigenetik faktörlerin rolü olabileceği kabul edilmektedir. Hastalığı oluşturan patofizyolojinin henüz net bir şekilde aydınlatılamamış olması nedeniyle hastalığın oluşumunda birden çok genin mi etkileşime girdiği, çevresel bazı faktörlerin genler üzerine olan etkileri nedeniyle mi hastalığın geliştiği soruları gündeme gelmektedir.

FSHD'ye ait bazı klinik özellikler ile moleküler mekanizmalara bakıldığında hastalığın kompleks bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Bilinen bazı özelliklere bakıldığında hastalık; kliniklerinin birbirine çok yakın olduğu bilinen FSHD1 ve FSHD2'nin moleküler mekanizmalarının birbirlerinden farklı olması, FSHD hastalığından sorumlu olduğu düşünülen DUX4'ün bireyler arasında heterojenitesinin olması, gen ifadesine yönelik yapılan çalışmalarda aday genin belirlenememiş olması, bireyler arası farklılık ve klinik açıdan vakaların aynı aile üyelerinde bile hastalığın başlangıç yaşı-seyri-şiddetinin ve hastalığın kas tutulum seçiciliğinin aynı olmaması şeklinde özetlenebilir. Bazı FSHD hastalarındaki farklılıklar metilasyon analizleri ile ilişkilendirilmişse de, farklı metilasyon değişiklikleri hala gizemini korumaktadır (Gaillard, Roche vd., 2014).

2.5. ROR1 Proteini

ROR1 proteinleri bir reseptör tirozin kinazdır (RTK) ve ROR ailesini oluşturmaktadır. Nörotrofik tirozin kinaz ile ilişkili (NTRKR1/2) protein olarak tanımlanan ROR2 geni ROR1 ile %58 oranında amino asit benzerliği göstermektedir (Masiakowski & Carroll, 1992). Yapılan çalışmalarda, ROR proteinlerinin hücre dışında Immünoglobulin-benzeri (Ig-like), diğer reseptör proteinlerde rastlanmayan Kringle (KRD) bölgeleri ve sisteinden zengin Frizzled (FZD) bölgelerini içerdiği gösterilmiştir (Masiakowski & Carroll, 1992; Forrester vd., 1999). ROR proteininin hücre içi bölümündeyse sırasıyla; tirozin kinaz (TKD), serin/treonin zengin (Ser/Thr) ve prolince zengin (PRD) bölgelerden oluştuğu belirtilmiştir (Borcherding vd., 2014).

Her iki ROR proteininin (ROR1/ROR2) hesaplanan moleküler ağırlığı yaklaşık 104 kDa'dur. Ancak ROR1 proteinin translasyon sonrası modifikasyonlara bağlı olarak glikozillendiğinden dolayı western blot analizlerinde farklı (100, 115 ve 130 kDa) boylardaki varyantlar görülmektedir (Oishi vd., 1999). Özellikle bu glikozillenme ile oluşan 130 kDa boyutundaki ROR1 proteini, hücre yüzeyine yerleşmekte ve sinyal iletiminde önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Kaucka vd., 2011). Bunun yanısıra aynı varyant mono-ubiquitinasyona da uğrayabilmektedir. Reseptör Tirozin Kinaz benzeri Orphan Reseptör olarak isimlendirilen ROR ailesinin, kinaz aktivitesi olmadığı ve tanımlanmış bir ligandının da olmadığı

düşünülmektedir. Ancak çeşitli çalışmalar ile ROR1 proteininde bulunan FZD bölgesinin, reseptör ligand etkileşiminde rol aldığı gösterilmiştir. Fukuda ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; özellikle Wnt5a'nın fiziksel olarak ROR1 ile etkileşime girerek, NF-kB sinyal yolağını aktive ettiği ifade edilmektedir (Fukuda vd., 2008). Daha sonra yapılan çalışmalara bakıldığında ROR1'in ligandı olarak Nöregulin1 (NRG1) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) de tanımlanmıştır (Li vd., 2017; Yamaguchi vd., 2012). Bir başka çalışmada ayrıca ROR1 ile HER3'ün Nöregulin1 varlığında heterodimer yaparak uzun kodlama yapmayan RNA'lar (lnRNA) aracılığı ile Hippo/YAP yolağında rol oynadığı bildirilmiştir (Li vd., 2017). ROR1'in psödokinaz olduğu ifade edilmesine karşın, akciğer kanserinde kinaz aktivitesinden bağımsız ve bağımlı olarak hücre sağ kalımını uyardığı gösterilmiştir (Yamaguchi vd., 2012). ROR1 proteinin kinaz aktivitesi göstermeden MET aracılı fosforilasyonu ile hücre sağ kalımına katkı sağladığı ve MET onkogeninin substratı gibi görev aldığı gösterilmiştir (Gentile vd., 2011). Tüm yapılan bu çalışmalar ile hem ROR1'in kinaz aktivitesi olduğu hem de kinaz aktivitesine bağımlı veya bağımsız olarak sinyal iletiminde görev aldığı ve ligandlarının bir kısmının tanımlanmış olduğu belirtilmektedir. Embriyonik dönemde gelişimin farklı basamaklarında ROR1 proteininin eksprese edildiği belirtilmektedir (Matsuda vd., 2001). Her iki ROR proteininin (ROR1/2) fare embriyo ve fetüslerinde iskelet, kalp, sinir sistemi ve akciğerlerinde eksprese edildikleri, fakat ROR1 proteininin erken dönemde nöral krest hücrelerinde ve sephalik mezankimde, geç dönemde ise alveollerde ve kalpte bulunduğu bildirilmiştir (Matsuda vd., 2001; Al-Shawi vd., 2001). Matsuda'nın başka bir çalışmasında geç embriyogenez döneminde sinir siteminde ROR1 ekspresyonunun kaybolduğu, buna karşın ROR2 ifadesinin ise devam ettiği belirtilmektedir. Ayrıca ROR1 ve ROR2 proteinlerinin ekspresyonunun memelilerin nöron uzaması ile sinaps oluşumunda görev aldıkları ve merkezi sinir sistemi gelişimi sırasında gelişimsel olarak düzenlenmekte olduğu saptanmıştır (Paganoni & Ferreira, 2003). ROR1 proteininin embriyogenez ve fetal hayattadaki ekspresyonunun önemi gösterilmesine karşın sağlıklı erişkin dokularında ROR1 ekspresyonu ya çok az miktardadır ya da hiç bulunmamaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda sağlıklı dokulardaki bu düşük ekspresyona karşın, ROR1'in hem solid

tümörlerde hem de hematolojik malignitelerde artmış ekspresyonu gösterilmiştir. Bu sebeple ROR1 proteinine onkofetal protein de denilmektedir.

2.6. Çalışmanın Amacı

Şimdiye kadar incelen vakalarda belirlenen iki klinik veri doğrultusunda; menapozdan sonra kadın hastalarda hastalık şiddetinde artışın gözlemlenmesi ve kadın-erkek hastalar arasındaki prognoz farkından yola çıkılarak acaba östrojen FSHD patogenezinde önemli rol oynayabilir mi? sorusu ana hipotezi oluşturmaktadır. Yapılan bu çalışmada; FSHD'de hipotezi oluşturan östrojenin etkisinin olup olmadığının, östrojen ve ROR1 proteinininde bu etkileşim içerisinde de var olup olmadığının FSHD hücrelerinde gösterilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada, FSHD'li hastalardan biyopsi ile alınan primer miyoblast hücre hatlarında östrojenin; ROR1 proteininin ifadesi üzerinde etkisi immunoblotlamat ile incelenmiştir. Öncelikle bu durumun karşılaştırılabilmesi amacıyla östrojen içermeyen kontrol grubu, östrojenin çözüldüğü etanol içerikli kontrol grunu ile östrojen eklenmiş hücrelerden 30. dakika ile 2. ve 4. saatlerdeki üç ana grup üzerinde deneyler yapılmıştır.

3.1. Miyoblast Hücre Hatları

Bu çalışmada kullanılan hücre hatları, FSHD klinik bulgularına sahip, D4Z4 bölgesinde tekrar dizi kısalması bulunan ve gönüllü vericilerin etkilenmiş iskelet kaslarından elde edilen miyoblast hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler ABD'de bulunan Massachussets Üniversitesi'nden temin edilmiştir. Primer miyoblast hücreleri, Prof. Dr. Rabi Tawil tarafından gönderilmiştir. Deneylerde kullanılan ve altı farklı yaş grubunda olan FSHD'li hastalara ait hücre hatları araştırmada kullanılmıştır. Hücre hatlarının oluşturulmasında kullanılan biyopsi materyallerinin patolojik verileri tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. FSHD hücre hatlarına ait moleküler ve klinik veriler

Bx* anındaki yaş	Cinsiyet	Hastalığın Başlangıç Yaşı	CSS**	4q35 D4Z4 tekrar DNA uzunluğu	Bx alınan kas grubu
63	E	15	6	23 kb A	Vastus Lateralis
71	E	40	8	31 kb A	Deltoid
58	K	15	6	28 kb A	Vastus Lateralis
57	K	47	0-1	19 kb A	Vastus Lateralis
60	K	40	3	26 kb A	Vastus Lateralis
40	E	21	2	26 kb A	Vastus Lateralis

* Bx: Biyopsi

**CSS (Clinic Severity Score): Hastalığın klinik şiddeti ile ilgili bir skorlamadır.

3.2. Miyoblast Hücre Hatlarının Kültürü

3.2.1. Hücre kültürü aşamaları

Primer hücrelere ait kültürlerin devam ettirilebilmesini içeren protokol için hücrelerin gönderildiği üniversiteden temin edilmiştir.

Tarafımıza gönderilen hücreler için gönderilen protokol aşağıda verilmektedir. Hücreleri temin ettiğimiz üniversitede hücreler 19. protokole kadar getirilmiş ve tez süreci boyunca bu maddeden itibaren çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. Miyoblast örneğinden primer hücre kültürü protokolü

1. Transport amaçlı olarak hazırlanan besiyeri ortamı uzaklaştırılır ve biyopsi materyali 10ml PBS (Phosphate-buffered saline) ile yıkanır.

2. Ortamdan PBS uzaklaştırılır ve yeniden 5ml PBS eklenir.
3. Yıkaması gerçekleştirilmiş materyal steril bir petri kabına konulur ve iki steril neşter yardımıyla parçalara bölünür.
4. Pipetle alınabilecek kadar ufak parçalara ayrılan biyopsi örneğinin hepsi 15ml'lik steril tüpe aktarılır. 5ml PBS ilave edilerek materyal yıkanır.
5. Belli bir süre beklendikten sonra doku parçaçıklarının kendiliğinden çökmesi sağlanır ve yıkama işlemi için kullanılan PBS ortamdan dikkatlice uzaklaştırılır.
6. Örneklerin üzerine yeni 10ml PBS eklenir. Örneklerin birbirine karışması sağlanır. Belli bir süre sonunda çökelme takip edilir ve ortamdan PBS uzaklaştırılır.
7. Aynı işlem bir kez daha tekrarlanır.
8. PBS uzaklaştırılarak örneğin üzerine 50 µl 0.2M $CaCl_2$, 1.6 ml Dispase II çözeltisi ve 2ml kollajenaz IV eklenir.
9. 37°C temiz su banyosunda 15 dk boyunca inkübe edilir.
10. Örnek pipetaj yapılarak homojenize edilir. Ardından en az 15 dk daha 37°C su banyosunda bırakılır.
11. Pipetaj işlemi tekrarlanır.
12. Doku parçalarının ayrılmadığı gözlenirse işlem tekrar edilir.
13. Daha önceden PBS ile hazırlanmış 100µm naylon hücre filtresi 50 ml'lik tüpün üzerine yerleştirilir.

14. Biyopsi materyalinden elde edilen dokuya ait parçalar dikkatlice filtreden geçirilir ve 5ml PBS ile yıkama işlemi yapılır.

15. Çökelme sonucunda tüpün üzerinde bulunan süpernatant atılır ve üzerine 10 ml besiyeri eklenir.

16. Hücreler 90 dakika boyunca T75 flasklarda bekletilir. Bu süre içerisinde miyoblastlar haricindeki fibroblastların tutunması sağlanır. Ancak miyoblast hücreleri henüz tutunamaz.

17. Bu süre zarfından sonra elde edilen süspansiyon yeni bir T75 flaska aktarılır.

18. Kültür işlemi sonrası üç veya dördüncü günde besiyerine 1ml F10 mediumu içinde homojenize olmuş 4µl'lik bFGF ilave edilir, bu esnada hala miyoblastlar flask yüzeyine yapışmamış olabileceğinden normal morfolojisinde görünmeyebilir.

19. Geçen bu süre zarfından sonraki günlerde hücreler daha yuvarlak görünümde ve hepsi yapışmamış durumda olabilir. Hücrelerin büyüyüp çoğalması ve uygun morfoloji kazanması bir hafta sürebilir. Ancak alınan numune eğer küçük boyuttaysa bu süre daha da uzayabilir.

20. Flasklara her birkaç gün arayla taze büyüme faktörü ilave edilmelidir. İlk değişim için eğer flasklarda küçük hücre odakları görülürse bir hafta içinde değişim yapılabilir. Ancak hala hücre odakları oluşmamış ise besiyerine yine 3-4 günde bir 4µl bFGF takviyesi yapılmalı ve aynı besiyeri içerisinde en az 10 gün süre daha tutulmalıdır.

Eğerki ilk değişim bir haftadan önce yapılması gerekiyorsa, yapışmayan hücrelerin kaybedilmeden yapılması gerekmektedir.

21. Büyüme odakları görülmeye başladıktan sonra artık haftada iki kez değişim yapılabilir. Ancak büyüme odakları kontrol altında tutulmalı çok fazla büyümeleri engellenmelidir. Aksi halde miyosit farklılaşması olabilir.

22. Bu aşamada eğer büyüme odakları artmaya başlarsa yeniden dağıtım yapılmalıdır. Besiyeri flask ortamından uzaklaştırılarak 10ml PBS ile yıkama yapılır. Daha sonra PBS ortamdan uzaklaştırılmalıdır. 1 ml miktarında ve % 0.1'lik tripsin ilave edilerek tüm flask yüzeyine yayılması sağlanır. Sonrasında birkaç dakika bekledikten sonra hafifçe flaska vuru yapılarak hücrelerin flask yüzeyinden kalkması sağlanır. Bu aşamada inverted mikroskop altında hücrelerin durumu gözlenir.

23. Kültür ortamındaki hücreler flask içerisinde yaklaşık %60-80 yoğunluğa ulaşması sağlanır. Bu yoğunluğa ulaşan hücreler tripsinizasyonla kaldırılarak birkaç farklı flaska dağıtımı yapılır. Her seferinde taze hazırlanmış 10 ml besiyeri flasklara eklenmelidir.

24. Pasajlaması yapılan hücreler tekraradan yaklaşık %60-80 yoğunluğa ulaşıncaya değin kültüre edilmeye devam edilir. Tekraradan istenilen yoğunluğa ulaşınca tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilir. Böylece hücreler tekrar kaldırılmış olur. Hücreler besiyerinden kalktıktan sonra tripsinin aktivitesini durdurmak amacıyla 10ml F10 besiyeri eklenir. Bu aşamadan sonra hücreler toplanır falkon tüplere aktarılarak yavaş devirde beş dakika santrifüj edilir.

25. Çökelme gerçekleştikten sonra süpernatant ortamdan uzaklaştırılır. Falkon tüp altında kalan pelet saklama besiyerine aktarılır. Bu aşamada; hücre yoğunluklarına göre hücrelerin saklanması sağlanır. Bu aşama artık iki numaralı pasaj olarak değerlendirilmektedir. Daha uzun süreler hücreler saklanacaksa sıvı azot içerisinde bekletilmelidir.

3.2.2. Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar

Biyopsi materyallerinden elde edilen hücrelerin kültüre edilmesinde kullanılan F10 besiyerinin bileşenleri:

- F10 Besiyeri (Gibco)

İçeriğine bakıldığında; Fenol Kırmızısı ve L-glutamin ile beraber birçok esansiyal aminoasit, mineral ve vitamin bulunmaktadır. İçerisinde herhangi bir büyüme hormonu ya da protein bulunmamaktadır. Bu yüzden fötal dana serumu (FBS) gibi ilavelere ihtiyaç duyulmaktadır.

- %20 FBS (Gibco)

Kültür ortamı içerisinde büyütülen hücrelerin yaşaması, büyümesi ve bölünmesini sağlayan; içerisinde de dana serum antijeni (BSA) ve birçok farklı proteini içeren bir kültür bileşenidir.

FBS 37°C‘de erimesi sağlanır; 56C°’de su banyosunda ısı ile inaktivasyonu yapılır; hücre kültürü ile uyumlu filtrelerden geçirilir. En son aşamada son hacim %20 oranında olamsı gereken şekilde F10 besiyerine ilave edilir.

- 10 ng/ml bFGF (Promega) (Büyüme Hormonu)

FGF2 olarakta bilinen, bFGF (basic Fibroblast Büyüme Faktörü)'dür. Biyopsi materyallerinden elde edilen primer hücrelerin büyütülmesinde kullanılmaktadır. Öncelikle suspense etmek amacıyla 25 µg bFGF içeren flakonun üzerine 1 ml PBS eklenir. Tamamiyle karışması sağlanır ve stoklar hazırlanır. Bu stoklar -20°C'de saklanır. Her kültür aşamasında flasklara eklenmek üzere stoklar eritilerek her yeni 10 m'lik besiyerine 4µl olacak şekilde ilave edilir.

- %1 Penisilin/Streptomisin (Gibco)

Hücre kültürü aşamalarında kontaminasyonu engellemek amacıyla Penisilin/Streptomisin antibiyotik karışımı besiyeri ortamına ilave edilir. Kültür ortamına %1 olacak şekilde ilave edilir.

- 1 µM Dexamethazone

Hücre kültürü esnasında, hücrelerin kendiliğinden apoptozisini önlemek amacıyla hücre kültürü ortamına ilave edilir. Hazırlanan stoktan (1 µM) her 10 ml besiyeri içine 10 µl olacak miktarda eklenir.

Hücre kültürü için her değişim öncesinde ve kültür aşamasında bahsi geçen solüsyonlar taze olarak hazırlanmalıdır.

3.2.3. İşlemler

ABD'de yer alan Massachussets Üniversitesi tarafından tarafımıza gönderilen FSHD'li hastalar ait miyoblast hücreleri yine aynı üniversite tarafından hazırlanan protokol çerçevesinde büyütülmüştür. Buna göre yukarıda verilen protokol kapsamında kültüre edilecek olan hücreler için 10 ml F-10 besiyeri kullanılmıştır. Hücrelerin 75 cm^2'lik flasklara ekimi yapılmış, sağlıklı bir şekilde büyütülebilmesi için insan iç ortamı ile aynı özellikte olan %5 CO_2 içeren 37°C'deki inkübatörde (Newbrunswick-Galaxy 170R) hücrelerin çoğalması sağlanmıştır. Hücrelerin sağlıklı bir şekilde tutunabilmesi için besiyerleri 2-3 gün içerisinde yenilenmiştir. Bu işlem bir hafta kadar sürdürülmüştür. Hücrelerin istenilen morfolojiye gelmesi ve yoğunluklarının %60-%80 değerlerine ulaşmasının ardından besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin flasklardan kaldırılması amacıyla tripsinizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu aşama için hücreler 2 ml'lik PBS ile yıkanıp 3 ml tripsin-EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit) (%0,1) ile %5 oranında CO_2 içeren

etüvde (Life Technologies) 3 dk. kadar bekletilmiştir. Hücrelerin zarar görmesinin engellenmesi amacıyla ortama tekraradan F10 besiyeri eklenmiştir. Bu sayede tripsin aktivitesi durdurulmuştur. Daha sonra hücreler santrifüj yapılmak üzere falkonlara alınmıştır. 1800 rpm'de 7 dk boyunca santrifüj yapıldıktan sonar çökelti üzerindeki süpernatant atılmış, çökelti üzerine 1 ml taze besiyeri konulmuştur. Pipetaj işlemleri yavaş ve nazik bir şekilde yapılarak homojen hale getirilmiştir. Bu aşamadan sonra hücre sayımına geçilmiştir. Hücre sayımı için hemositometre kullanılmıştır. Hücre sayısına bağlı olarak hücreler ya tekrar pasajlanmıştır ya da deneylerin bir sonraki aşamasına geçilinceye kadar uygun ortam şartlarında saklanmıştır.

3.3. Protein İzolasyonu

3.3.1. Gerekli solüsyonlar

Tablo 3.2. Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) solüsyonu içeriği

Malzeme Adı	**Miktarı/Molaritesi/Yüzdesi**
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
NaCl	150 mM
Na_2EDTA	1 mM
EGTA (etilenglikolbis(β-aminoetileter))	1mM
NP-40 (nonilfenoksipolietoksiletanol)	%1
Sodyum Deoksikolat	%1
Sodyum Pirofosfat	2,5mM
β-gliserofosfat	1 mM
Na_2VO_4	1 mM
Leupeptin	1µg/ml

3.3.2. İşlemler

Hücrelerin sağlıklı ve uygun morfolojide büyütülmesi aşamasından sonra her hücre hattı için tekrar 75 cm^2'lik flasklara; $1,5x10^6$ oranında olacak şekilde üç farklı hücre ekimi yapılır. Hücrelerin tekrar flask yüzeyine tutunabilmeleri amacıyla %5 CO2'lik ortamda 37°C'de inkübe edilir. Flask yüzeyine yapışan hücrelere belirli sürelerde (30 dakika, 2 ve 4 saat) 10 nM östradiol (E2) uygulaması yapılmıştır. Sonrasında 37°C'de %5 CO_2 içeren etüvde bekletilmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan östrodiol içermeyen hücreler ve östrodiolün çözündüğü etanol kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Ekim aşamasını ve östrodiol uygulamasını takiben hücreler PBS ile yüzeyden kaldırılmıştır. Daha sonra 2 dakika boyunca 13200 rpm'de çöktürülmesi sağlanmıştır. Supernatant atılması sonrasınıda pellet üzerine RIPA solüsyonu lizis tamponu olarak eklenmiştir. Bu solüsyonun içeriği tablo 3.2.'de belirtilmiştir. (Pellete aktarın öncesinde RIPA solüsyonu içerisine phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), proteaz aktivitesi ile proteinlerin parçalanmasını önlemek amacıyla eklenmiştir.) Hazırlanan hücreler 20 dk. süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamadan sonra tekrar 20 dk. boyunca 13200 rpm'de +4°C'de santrifüj işlemine tabi tutulmuşlardır. Santrifüj sonrasında üstte kalan faz yeni bir toplama tüpüne alınarak miktar ölçümleri yapılmıştır. Bir sonraki deney aşamasına kadar hazırlanan numuneler -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.4. Elde Edilen Proteinlerin Miktar Tayini

Bir önceki aşamada elde edilen proteinlerin miktarlarının ölçülebilmesi amacıyla Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford 1976). Bu yöntemde ilk olarak BSA'yı kullanarak standart bir eğri çizilmiştir. Standart eğri çizilmesinde sırasıyla 1 µg/µl-5µg/µl BSA örneklerinin üzerlerine 200 µl olacak şekilde Bradford çözeltisi (fosforik asit, coomassie blue ve etil alkol) eklenmiştir. Daha sonra 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak çizim işlemi yapılmıştır. Bu aşamadan sonra elde edilen protein numunelerinden birer mikrolitre alınıp üzerlerine 200 µl Bradford çözeltisi eklenmiştir. Yine aynı dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Absorbans/konsantrasyon eğrisinin eğim eşitliği kullanılmak suretiyle, absorbans değerleri de bilinen miyoblast örneklerininde içerdiği protein konsantrasyonları

belirlenmiştir. Konsantrasyonu bilinen örnekler için eşit bir yükleme yapmak amacıyla yükleme hacimleri belirlenmiştir.

3.5. Western Blot Aşaması

3.5.1. İşlemler

FSHD hastalığındaki östrojenin etkinliğinin protein seviyesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla; farklı sürelerde östrojen eklenmiş hücreler ile eklenmemiş hücrelerin hipotez doğrultusunda kıyaslanabilmesi amacıyla western blot yöntemi ile ROR1 proteininin ifadesi incelenmiştir.

3.5.2. Proteinlerin hazırlanması ve jel elektroforezi (SDS-PAGE)

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

Tablo 3.3. %4 Yükleme Jelinin içeriği

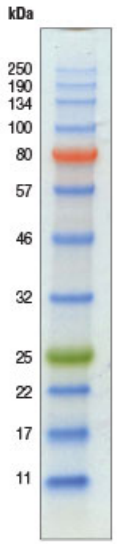
Yükleme Jelinde Kullanılan Kimyasallar	Miktarı(2 jel için)
ddH_2O	3075 µl
0,5M Tris (pH=6,8)	1250 µl
%30 akrilamid	670 µl
%10 SDS (sodyum dodesil sülfat)	50 µl
%10 APS (amonyum per sülfat)	40 µl
TEMED	5 µl

Tablo 3.4. % 12 Ayırma Jelinin içeriği

Ayırma Jelinde Kullanılan Kimyasallar	Miktarı(2 jel için)
ddH_2O	3400 µl
1,5M Tris (pH=6,8)	2500 µl
%30 akrilamid	4 ml
%10 SDS (sodyum dodesil sülfat)	100 µl
%10 APS (amonyum per sülfat)	100 µl
TEMED	10 µl

Hücre kültürlerinin içerisine yükleme miktarları eşit olacak şekilde (kontrol, EtOH kontrol, 30 dakika, 2. ve 4. saat östrojen içeren) 2xLaemli buffer (Sigma Aldrich-Merck) ile karıştırılmıştır. Eklenen bu solüsyon hazır olarak alınmıştır. Solüsyon içeriğine bakıldığında; 2-merkaptoetanol vasıtasıyla disülfit bağlarının yıkımı, SDS (sodyum dodesil sülfat) vasıtasıyla proteinlere negatif yük kazandırılması ve denatürasyonu, bromfenol mavisi ile jelde yürütülürken görüntülemenin sağlanması ve gliserol vasıtasıyla örneklerin kuyucuklara çökmesi sağlanmaktadır. Yükleme yapılmadan önce tüm lizatların 95 °C'de 5 dakika süre ile denatüre edilmesi gerekmektedir.

Hazırlanan FSHD hastalarına ait hücre kültürleri, kontrol, östrodiolün çözündüğü EtOH kontrolü, 30 dakika, 2. ve 4 saat olmak üzere beş farklı örnek ile birlikte boyutları için 11-250 kDa (11, 17, 22, 25, 32, 46, 57, 80, 100, 134, 190, 250 kDa) aralığındaki markerla birlikte SDS-PAGE yapılmıştır (Şekil 3.6.). Hazır olarak satın alımı yapılan Tris-Gly-SDS-1X yürütme tamponu içerisinde kullanılarak 80-90 volt aralığında yaklaşık 1 saat boyunca yürütüldükten sonra 4 saat süreyle de 100 voltta yürütme gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Protein büyüklük belirteci

3.5.3. Elde edilen proteinlerin membrana transferi

SDS-PAGE yapılan örnekler, iBlot2 yarı-kuru sisteme sahip cihazda (Life Technologies) nitroselülöz membrane vasıtasıyla 20 Volt'da 7 dakika süreyle transfer aşaması gerçekleştirilmiştir. Transfer aşaması tamamlandıktan sonra, 1 saat süre boyunca %5'lik yağsız süt tozu (% 0,1 Tween 20 içeren 1x TBS (Tris buffered saline)) ile bloklama işlemi yapılmıştır. Hazırlanan solüsyonlara ait içerik tablo 3.5.'te verilmiştir.

Tablo 3.5. TBS ve TBS-T solüsyonlarının içerikleri

TBS 10x	**Miktarı**
NaCl	88,6 gr
Tris Base	12,11 gr
pH:8 'e ayarlanarak , dH_2O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.	

TBS 1x	**Miktarı**
TBS	100 ml
dH_2O	900 ml

TBS-T 1x	**Miktarı**
TBS-Tween	100 ml
dH_2O	900 ml

3.5.4. Primer ve Sekonder Antikor Muamelesi

Bloklama işlemini takiben yine %5'lik yağsız süt tozu içerisinde hazırlanan primer antikor ROR1 (D6T8C) rabbit monoklonal antikor (Cell Signaling 16540) 1'e 1000 dilüsyonda +4°C'de overnight inkübasyonu bırakılmıştır. İşaretleme yapıldıktan sonra 5 dk. boyunca ve üçer tekrarlı olacak şekilde membran 1xTBS-T (tris buffered saline-tween 20) ile yıkanmıştır. Yine %5'lik yağsız süt tozu içerisinde hazırlanan ve membranda bulunan primer antikorun yapısına göre (rabbit ya da mouse) 1/5000 dilüsyonda HRP (horse radish peroxidase) (Cell Signaling 7076) bağlı anti özellikte sekonder antikorlar ile 60 dk. boyunca +4°C'de inkübasyonları yapılmıştır. Benzer işlemin aynısı atasal olarak korunmuş ve sürekli eksprese edildiği bilinen, housekeeping gen olarak seçilen β-aktin (Cell Signaling) için de uygulanmıştır.

Strip off; İncelenmesi istenen protein ile housekeeping protein aynı anda incelenmiştir. Bunun için öncelikle işaretleme yapılmış sonrasında ise stripe aktarılmıştır. Strip aşaması için hazırlanan solüsyon ile membrane 45 dk. boyunca 50°C'de muamele yapılmıştır. Bu işlemin ardından membran birkaç saat boyunca lavabo altında yıkanmıştır. Son aşamada ise TBS-T'de 5 dk. yıkama işleminden sonra, β-aktinin primer ve sekonder antikorları ile muamele edilmesi sağlanmıştır. Görüntüleme amacıyla ışıma eldesince ECL (ThermoFisher Scientific) kullanılmıştır. ECL içeriğinde iki farklı bileşen vardır. Bunlar luminol ve peroksit solüsyonudur. Her iki solüsyondan eşit miktarlar alınarak enzimatik aktivitenin gerçekleştirilmesi amacıyla oda sıcaklığında membrane alüminyum folyaya sarılmıştır. Tüm bu işlemler solüsyonun etkinliğinin azalmaması için karanlık ortamda yapılmıştır. ECL ile muamele edildikten sonra membrane Syngene cihazında görüntüleme yapılmıştır.

3.6. Bantların İstatistiksel Hesaplanması

Strip analizleri sonrasında elde edilen bantların analizi amacıyla ImageJ" programı kullanılmıştır. Bu programın temeli siyah ve beyaz bantlardaki kontrast farklılıklarına bağlı olarak görüntü alanının çizilmesi ve piksel yoğunluğunun ölçülmesi işlemine dayanmaktadır. Sapma olmaması amacıyla her bant üç kere ölçülerek ortalaması alınmıştır. Ölçüm değerleri excel programına aktarılmıştır. ROR1 proteininden elde edilen değerler kontrol olarak kullanılan housekeeping gen olan β-aktin ile oranlanıp standardize edilmiştir. Böylece oluşabilecek hatalara karşın sapmalar elemine edilmiştir.

3.7. Deneylerde Kullanılan Makina-Techizatların Listesi

İnkübatör (Newbrunswick-Galaxy 170R),
Santrifüj (Nüve, NF800),
Inverted ışık mikroskobu (Nikon eclipse TS100),
Otoklav (nüve steamart- OT 90L),
Su banyosu (Lab Companion, JEIO TECH, Bs11),
Laminer flow (scanlaf-mars safety classe 2),
Mikrosantrifüj (Thermoscientific, MikroCL21R),
pH metre (Inolab pH7110),
Steril Kabin (Scanlaf Mars SafetyClasse 2),
Hassas terazi (Pioneer, Ohaus),
Vorteks (JEIO TECH, Lab Companion),
Etüv (JEIO TECH, Lab, Companion),
Dikey elektroforez sistemi (clever omnipage cvs10),
Membran görüntüleme cihazı (Syngene).

4. BULGULAR

Çalışmanın hipotezini oluşturan erkek ve kadın FSHD'li hastalar arasındaki farklılığın yanı sıra, kadınlarda erkeklere nazaran hastalığın daha hafif seyretmesi ancak menopoz sonrasında kadınlarda prognozun şiddetlenmesi nedeniyle östrojenin FSHD hastalığında koruyucu bir rolü olup olamayacağının araştırılması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda FSHD patogenizinde rolü olabileceği düşünülen ve literatürde ilk kez çalışılmış olan ROR1 proteininin östrojen muamelesi öncesi ve sonrasındaki ekspresyon değişiklikleri incelenmiştir. Bu amaçla kullanılması planlanan hücreler ABD'de yer alan Massachussets Üniversitesi'den temin edilmiştir. Gönüllülerden alınan biyopsi materyallerinden primer hücreler elde edilmiş ve tarafımıza o şekilde gönderilmiştir. Gönderilen hücreler FSHD hastası olan ve D4Z4 bölgesinde tekrar dizi azlığı olan 3 erkek ve 3 kadına aittir. Primer hücrelerin hücre kültürlerinde östrojen eklenmemiş kontrol grubu, östrojenin çözdürüldüğü sadece etanol eklenmiş kontrol grubu ve 10nM östrodiol eklenmiş ve 30. dk., 2. ve 4. saatler sonrasında yapılan izolasyon sonrası protein değişikliklerine bakılmıştır.

Çalışmada kullanılan proteinlerin moleküler ağırlığı ve bant yerleşimlerine ilişkin bilgiler (Tablo 4.1.)'de verilmiştir.

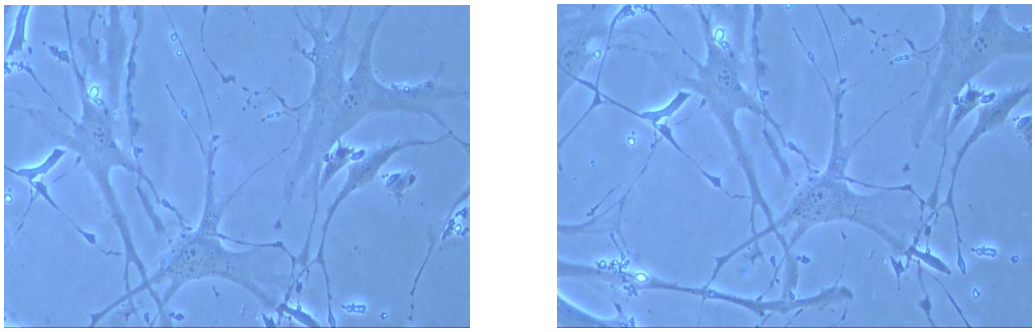
Tablo 4.1. ROR1 ve β-aktin proteinlerinin molekül ağırlıkları ve bant büyüklüğü

	Moleküler Ağırlık	Gözlenen (yaklaşık) Protein Yerleşimi
ROR1	130-135 kDa	100-134 kDa
β-aktin	45 kDa	32-46 kDa

4.1. Hücre Kültürüne Ait Bulgular

Tarafımıza gönderilen 6 adet FSHD'li hastaya ait primer hücrelerden sadece 47 yaşındaki kadın hastaya ait hücrelerin üremesi sağlanmıştır. Bu hücrelere östrodiol uygulaması sonrasında miyoblast hücreler fibroblastik uzantılarını kaybetmiştir. Sonrasında yuvarlak şekilli bir morfoloji kazanmıştır. Elde edilen hücrelere en fazla 4 pasaj yapılmıştır. Böylece miyositlere farklılaşmadan analiz

yapılabilmiştir. Diğer hastalara ait hücrelerde kültüre edilmiştir; ancak istenilen miktarda üreme sağlanamadığı için protein izolasyonları yetersiz kalmış ve sonuç elde edilememiştir. 47 yaşındaki kadın hastaya ait hücrelere 30 dk., 2. ve 4 saat E2 muamelesi yapıldıktan sonra hücre sayısında ve yoğunluğunda azalma olduğu görülmüştür. (Şekil 4.1.).

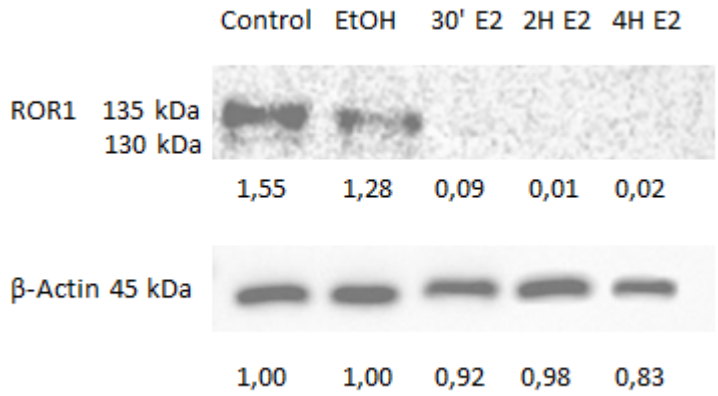


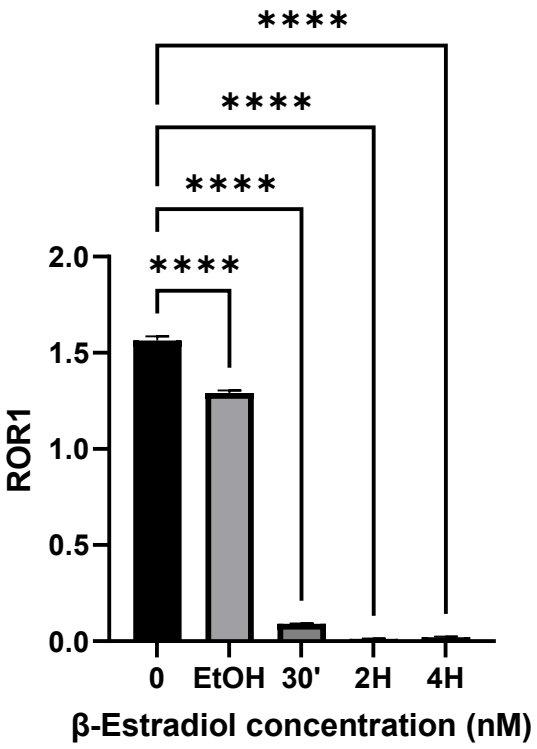
Şekil 4.1. 47 yaşındaki FSHD hastasına ait hücrelerin morfolojik görüntüleri

4.2. 47 Yaşında Kadın Hastaya ait Hücre Hattı Bulguları

4.2.1. ROR1 proteinine ait bulgular

Bu hücre hattında östrojen eklenmemiş ve pozitif kontrol olarak kullanılan grup ve östrodiol çözücüsü olarak kullanılan ve negatif kontrol grubunu oluşturan EtOH'de bant görüntüleri elde edilmiştir. Aynı hücre hattında 30 dakika, 2. ve 4. saatlerde östrodiol uygulaması sonrasında bant görüntüsü elde edilememiştir (Şekil 4.2.).





Şekil 4.2. 47 yaşındaki kadın FSHD hastasına ait hücrelerde östrojen varlığında zamana bağlı 130-135 kDa ROR1 protein ifadesinin western blot yöntemi ile β-aktin ekspresyonuna oranlanarak gösterilmesi

5. TARTIŞMA

FSHD hastalığı tüm dünyada en sık görülen kas hastalıkları arasında üçüncü sırada olup, 1/7500 görülme sıklığına sahiptir (Denny & Heather, 2017). Hastalığın bulgularına bakıldığında özellikle kol, bacak yüz ve omuz kasları olmak üzere tüm vücutta görülebilen ve hastadan hastaya klinik şiddeti değişebilen bir nöromusküler bir hastalıktır (Tawil, 2008).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda FSHD hastalığına ilişkin bilinen en önemli moleküler mekanizma D4Z4 tekrar dizisindeki azalma veya aynı bölgedeki hipometilasyon varlığıdır. Ancak tüm bu verilere bakıldığında hastalığın patofizyolojisini açıklamaya yetmemektedir (Gaillard, Roche vd., 2014; Jones, Yan vd., 2014). Özellikle hastalar arasındaki klinik şiddetin değişken olması, hastalar arasında farklı kas bölgelerinde tutulum olması, hastalığın aynı kişide ilerleyen zamanlarda şiddetinin değişmesi veya otozomal dominant kalıtım kalıbına sahip olmasından ötürü, tekrar sayılarının aynı olduğu aile bireylerindeki hastalığın birbirleri arasındaki şiddetinin farklı olması, özellikle erkek hastalarda hastalığın prognozunun daha erken yaşlarda ve daha ağır seyretmesi önemli bulgular arasında yer almaktadır (Lin, Wang vd., 2015). Bu bulgular ışığında FSHD hastalarının özellikle hormonal değişikliklerden etkilendiği düşünülmektedir. FSHD hastaları arasında kadınların erkeklere nazaran hastalığı daha hafif bulgularla geçiriyor olması ve menapoz sonrası hastalığın prognozunun şiddetleniyor olması östrojenin hastalığın patofizyolojisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan bir çalışmada FSHD hastaları arasında meme kanserine yakalanan ve anti-östrojen tedavisi gören hastalarda hastalığın dahada şiddetlendiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada bu tedaviyi almayan FSHD hastalarında hastalığın prognozunda herhangi bir ilerleme olmadığı belirtilmiştir (Teveroni, Pellegrino vd., 2017). Çalışmanın devamında östrojenin etkisinin DUX4 üzerine olan bir etkisi görülmese de, DUX4 hedef genlerinin ifadesinde azalma olduğu vurgulanmıştır. Gözlemlenen bu ekspresyon azalmasının H4K4 bölgesindeki transkripsiyonel aktivasyon bölgesindeki trimetilasyonu azaltarak gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Bu sonuçlar ışığında epigenetik değişiklikler ile östrojen arasında bir korelasyon olduğu görülmektedir (Teveroni, Pellegrino vd., 2017).

Yapılan bir diğer klinik araştırmada östrojen maruziyeti ile FSHD hastalığının prognozu arasında bir ilişki olmadığı vurgulanmıştır (Mul, Horlings vd., 2018). Meme kanseri hücre hattı olan, östrojen ve progesteron reseptörü pozitif olan duktal karsinoma kaynaklı ve invaziv olmayan T47D üzerine yapılan bir çalışmada DUX4'ün, ligand ile uyarılan transkripsiyonel aktivasyonunun ve progesteron reseptörünün baskıladığı bulunmuştur. Ancak aynı hücre hattına eklenen testosteron, östrojen ya da progesteronun DUX4 sitotoksisitesinden korunduğu tespit edilmiştir (Teveroni, Pellegrino vd., 2017). Bu sonuçların da östrojenin FSHD hastalığında koruyucu bir etkisi olabileceğini destekler niteliktedir.

Yapılan çalışmalara bakıldığında kadın ve erkek FSHD hastalarındaki klinik farklılık ve özellikle gebelik sürecinde ve doğum sonrasında FSHD'li kadınlarda hastalığın daha hafif seyretmesi, FSHD'nin hormonal değişikliklerden etkinlendiğini göstermektedir. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada östradiol muamelesi ile DUX4, PAX3/7 ve β-katenin protein düzeylerinin değiştiği ortaya konulmuştur. DUX4'ün östradiol muamelesi sonrasında azalması, β-kateninin östradiol muamelesi sonrasında artması, PAX3/7 protein ailesinden 56 kDa'luk formun östradiol muamelesinden sonraki dördüncü saatte ilgili proteinin uyarılmasıyla, östrojenin FSHD patofizyolojisinde koruyucu rol oynadığını destekler nitelikte olduğu belirtilmiştir (Hangül, Çelik et al. 2020).

Yaptığımız çalışmada özellikle FSHD patogenezinde klinik olarak gözlemlenen erkek ve kadın bireyler arasındaki prognozun değişkenliğinden yola çıkılarak, hormonal bir etkinin (östrojen) FSHD hücrelerine olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bahsi geçen bireyler arasındaki farklılığın oluşumunda östrojenin etkisinin FSHD patofizyolojisinde rol alabileceği düşünülen ROR1'in ekspresyon değişikliğine bakılması planlanmıştır. Biyopsi materyallerinden elde edilen miyoblast hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri ileri derece farklılaşmasından ötürü kültüre edilebilme zorluğudur. Bir diğer önemli sorun ise uzun süreli kültürü yapılan hücrelerin miyosit hücrelerine farklılaşabilmesidir. Tüm bu yaşanabilecek zorlukların aşılabilmesi için hücrelerin her gün takip edilmesi ve az pasajlama ile hücrelerin miyosite farklılaşmadan deneylerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Yapılan deneyler sonucunda bazı sorunlarla karşılaşılmıştır. Öncelikle elimizde bulunan farklı yaş ve cinsiyete sahip FSHD hastalarından sadece 47 yaşındaki kadın hastanın hücreleri çoğaltılabilmiştir. Buradaki sorunlar arasından en önemlisi primer hücrelerin kültüre edilmesindeki zorlukların yanı sıra miyoblast hücrelerinin de kültüre edilmesindeki sorunlar olmuştur. Her ne kadar tüm hasta numunelerinde kültür başarısı sağlanmış olsa da; elde edilen hücre sayısı protein izolasyonu için yeterli olamamıştır. Kültür başarısı sağlanmış olan hastada ise protein miktarı çok düşük düzeyde elde edilmiştir.

5.1. 47 Yaşındaki Kadın Hastaya ait Sonuçların Değerlendirilmesi

Elimizde bulunan farklı yaş grubundaki ve her iki cinsiyette bulunan FSHD hastalarına ait miyoblastlarda hücre hattı örneklerinden sadece 47 yaşındaki kadın hastaya ait primer hücrelerde tutunma ve çoğalma gerçekleşmiştir. Deney hipotezinde kullanılan östrodiolün miyoblast hücrelerin gelişimi üzerine herhangi bir etkisi bulunmamaktadır. Hatta yapmış olduğumuz deneylerde östrojen muamelesi sonrasında hücre yoğunluğunda azalma görülmüştür (Kahlert, Grohe vd., 1997). Özellikle erkek FSHD'li hastalarda kadınlara nazaran testosteron düzeyi ve vücut kas yoğunluğunun daha fazla olması, hastalığın ilerleyişinin erkek bireylerde daha hızlı olması sonucunu doğurduğu düşünülmektedir. (Herbst & Bhasin, 2004).

5.2. ROR1 Bulgularının Tartışılması

Reseptör tirozin kinaz ailesi üyesi olan ROR1, erken embriyogenez sırasında eksprese edilen orphan-reseptör tirozin kinaz benzeri yüzey antijeni olarak ifade edilmektedir. Birçok farklı organizmada evrimsel süreç boyunca korunmuştur. Her ne kadar ROR2 mutasyonları boy kısalığında, konjenital iskelet defektlerinde gösterilsede ROR1 mutasyonlarına ilişkin herhangi bir hastalık bildirilmemiştir. Yapılan çalışmalarda fare gelişiminde ROR1'in önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. ROR1 proteini hücre dışı immünoglobulin benzeri bir domaine, sistein açısından zengin bir Frizzled domainine ve membran proksimal kringle alanına sahiptir. Ayrıca ROR1, tirozin kinaz domain, iki serin/tireonince zengin domain ve prolince zengin domaine bulunan hücre içi bir bölüme de sahiptir. Özellikle ROR1 birkaç anahtar aminoasitten yoksundur ve enzimatik fonksiyonu bilinmemektedir. Yapılan biyokimyasal analizlerde ROR1'in katalitik aktiviteden yoksun bir pseudo-kinaz

olduğu belirtilmektedir. WNT5a, ROR1 ve ROR2 için potansiyel bir ligand görevi görmektedir. ROR1 ve ROR2, lösemi kemotaksisini ve proliferasyonunu destekleyen Wnt5a sinyali için gereklidir. ROR1 kendini hemen hemen tüm normal yetişkin dokularda ifade edilmese de, çoğu zaman birçok dokuda özellikle bazı B-hücresi maligniteleri ve çeşitli kanser hücre dizilerinde yeniden eksprese edilir. ROR1 özellikle akut lenfositik lösemi, renal karsinom, meme kanseri, akciğer kanseri, adenokarsinom ve melanoma gibi çeşitli tümörlerde önemli ölçüde daha fazla ifade edilmiştir. ROR1 ayrıca akciğer adenokarsinomu için potansiyel biyobelirteç olarak kabul edilmiştir. Son çalışmalar, kronik lenfositik lösemi (KLL) hastalarında ROR1'e karşı doğal humoral ve hücresel bağışıklığın bulunduğunu ve ROR1'in yüksek seviyelerde ifade edilmesinin kanser hücresi aktivasyonunu ve hayatta kalmayı destekleyebileceği bildirilmiştir. Ayrıca ROR1'in embriyogenez ve kanser metastazı sırasında kök hücrelerin farklılaşmamış özelliklerini koruyarak epitelyalden mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir.

Literatürde de belirtildiği üzere normal dokularda ROR1 ekspresyonuya çok az ya da hiç bulunmamaktadır. Yaptığımız analizler sonucunda FSHD hastasında miyoblast hücrelerinde östrojen öncesi ROR1 ekspresyonu gözlenmiştir. Bununda hastalık progresyonunda önemli bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca hipotezimiz doğrultusunda östrojen ile muamele edilen aynı hastanın miyoblast hücrelerinde ROR1 protein ifadesinin olmadığı görülmüştür. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar sadece tek bir cinsiyete aittir. Diğer hasta örneklerinden sonuç elde edilememiştir. Bu yüzden östrojen seviyesindeki artışın hastalığın tedavisine yönelik önemi konusunda net bir veri bulunmamaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın en önemli dayanağı, farklı cinsiyetteki hastalar arasında gözlemlenen klinik farklılıklar nedeniyle östrojen kullanımının hastalığın progresyonunda herhangi bir etkisinin olup olmayacağı üzerine bir hipotez kurulmuştur. Bunun sonucu olarak da östrojenin FSHD tedavisi üzerine katkıda bulunabilmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışmada FSHD örneğinden elde edilen bulgulara bakıldığında embriyonik dönemde eksprese edilen ve yetişkinlik döneminde ifade bulmayan ROR1'in, FSHD hastasının kas biyopsisinden elde edilen primer hücrelerinde ROR1 ekspresyonunun varlığı tespit edilmiştir. Bu bulgu literatürde ilk kez FSHD hastalığında ROR1 ekspresyonunun gösterilmesi açısından önemli bir veridir. Ancak bu veri tek bir hücre hattından elde edildiği için daha fazla moleküler çalışmaya ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir.

Çalışmanın ikinci önemli sonucu ise; hipotezden de yola çıkılarak östrojenin FSHD hastalarında koruyucu bir rolü olup olamayacağının belirlenmesi amacıyla aynı hastanın primer hücrelerinde ROR1 ekspresyonunun östrojen muamelesi sonrasında azaldığı görülmüştür. Her ne kadar östradiolün FSHD hastaları üzerinde koruyucu bir etkisinin olabileceği düşünülse de, erkek bireylerdeki etkisinin ne olduğuna ilişkin herhangi bir verinin olmayışı ve tek bir FSHD hastasına ait verilerin elde edilmiş olması nedeniyle bu alanda daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Tüm bu veriler ışığında hala net bir tedavi protokolü olmayan ve patafizyolojisi aydınlatılamış FSHD için daha fazla sayıda moleküler çalışmanın yapılması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

Al-Shawi, R., Ashton, S. V., Underwood, C., & Simons, J. P. (2001). Expression of the Ror1 and Ror2 receptor tyrosine kinase genes during mouse development. *Development Genes & Evolution*, *211*(4).

Arashiro, P., Eisenberg, I., Kho, A. T., Cerqueira, A. M., Canovas, M., Silva, H. C., ... & Zatz, M. (2009). Transcriptional regulation differs in affected facioscapulohumeral muscular dystrophy patients compared to asymptomatic related carriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(15), 6220-6225.

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

Borcherding, N., Kusner, D., Liu, G. H., & Zhang, W. (2014). ROR1, an embryonic protein with an emerging role in cancer biology. *Protein & cell*, *5*(7), 496-502.

Bosnakovski, D., Lamb, S., Simsek, T., Xu, Z., Belayew, A., Perlingeiro, R., & Kyba, M. (2008). DUX4c, an FSHD candidate gene, interferes with myogenic regulators and abolishes myoblast differentiation. *Experimental neurology*, *214*(1), 87-96.

Bosnakovski, D., Toso, E. A., Hartweck, L. M., Magli, A., Lee, H. A., Thompson, E. R., ... & Kyba, M. (2017). The DUX4 homeodomains mediate inhibition of myogenesis and are functionally exchangeable with the Pax7 homeodomain. *Journal of cell science*, *130*(21), 3685-3697.

Bosnakovski, D., Xu, Z., Ji Gang, E., Galindo, C. L., Liu, M., Simsek, T., ... & Kyba, M. (2008). An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies. *The EMBO journal*, *27*(20), 2766-2779.

Budworth, H., & McMurray, C. T. (2013). A brief history of triplet repeat diseases. *Trinucleotide Repeat Protocols*, 3-17.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Celegato, B., Capitanio, D., Pescatori, M., Romualdi, C., Pacchioni, B., Cagnin, S., ... & Gelfi, C. (2006). Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes. *Proteomics*, *6*(19), 5303-5321.

Cheli, S., François, S., Bodega, B., Ferrari, F., Tenedini, E., Roncaglia, E., ... & Meneveri, R. (2011). Expression profiling of FSHD-1 and FSHD-2 cells during myogenic differentiation evidences common and distinctive gene dysregulation patterns. *PloS one*, *6*(6), e20966.

Clapp, J., Mitchell, L. M., Bolland, D. J., Fantes, J., Corcoran, A. E., Scotting, P. J., ... & Hewitt, J. E. (2007). Evolutionary conservation of a coding function for D4Z4, the tandem DNA repeat mutated in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *The American Journal of Human Genetics*, *81*(2), 264-279.

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

Denny, A. P., & Heather, A. K. (2017). Are antioxidants a potential therapy for FSHD? A review of the literature. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*.

Dixit, M., Ansseau, E., Tassin, A., Winokur, S., Shi, R., Qian, H., ... & Chen, Y. W. (2007). DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(46), 18157-18162.

Ehrlich, M., Jackson, K., Tsumagari, K., Camaño, P., & Lemmers, R. J. (2007). Hybridization analysis of D4Z4 repeat arrays linked to FSHD. *Chromosoma*, *116*(2), 107-116.

Fitzsimons, R. B. (2011). Retinal vascular disease and the pathogenesis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. A signalling message from Wnt?. *Neuromuscular Disorders*, *21*(4), 263-271.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

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

Forrester, W. C., Dell, M., Perens, E., & Garriga, G. (1999). A C. elegans Ror receptor tyrosine kinase regulates cell motility and asymmetric cell division. *Nature*, *400*(6747), 881-885.

Fukuda, T., Chen, L., Endo, T., Tang, L., Lu, D., Castro, J. E., ... & Kipps, T. J. (2008). Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(8), 3047-3052.

Gabriels, J., Beckers, M. C., Ding, H., De Vriese, A., Plaisance, S., Van Der Maarel, S. M., ... & Belayew, A. (1999). Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element. *Gene*, *236*(1), 25-32.

Gaillard, M. C., Roche, S., Dion, C., Tasmadjian, A., Bouget, G., Salort-Campana, E., ... & Magdinier, F. (2014). Differential DNA methylation of the D4Z4 repeat in patients with FSHD and asymptomatic carriers. *Neurology*, *83*(8), 733-742.

Gentile, A., Lazzari, L., Benvenuti, S., Trusolino, L., & Comoglio, P. M. (2011). Ror1 is a pseudokinase that is crucial for Met-driven tumorigenesis. *Cancer research*, *71*(8), 3132-3141.

Hangul, C., Celik, E. G., Kaya, H., Eroglu, O., Uysal, H., & Karauzum, S. B. (2021). Estradiol differentially regulates DUX4, β-catenin and PAX3/PAX7 in primary myoblasts of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. *Turkish Journal of Biochemistry*, *46*(4), 435-444.

Herbst, K. L., & Bhasin, S. (2004). Testosterone action on skeletal muscle. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *7*(3), 271-277.

Hewitt, J. E., Lyle, R., Clark, L. N., Valleley, E. M., Wright, T. J., Wijmenga, C., ... & Williamson, R. (1994). Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystropothhy. *Human molecular genetics*, *3*(8), 1287-1295.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Jones, T. I., Yan, C., Sapp, P. C., McKenna-Yasek, D., Kang, P. B., Quinn, C., ... & Jones, P. L. (2014). Identifying diagnostic DNA methylation profiles for facioscapulohumeral muscular dystrophy in blood and saliva using bisulfite sequencing. *Clinical epigenetics*, *6*(1), 1-16.

Kahlert, S., Grohé, C., Karas, R. H., Löbbert, K., Neyses, L., & Vetter, H. (1997). Effects of estrogen on skeletal myoblast growth. *Biochemical and biophysical research communications*, *232*(2), 373-378.

Kaucká, M., Krejčí, P., Plevová, K., Pavlová, Š., Procházková, J., Janovská, P., ... & Bryja, V. (2011). Post-translational modifications regulate signalling by Ror1. *Acta physiologica*, *203*(3), 351-362.

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

Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic acids research*, *29*(14), 2905-2919.

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

Klooster, R., Straasheijm, K., Shah, B., Sowden, J., Frants, R., Thornton, C., ... & Van Der Maarel, S. (2009). Comprehensive expression analysis of FSHD candidate genes at the mRNA and protein level. *European Journal of Human Genetics*, *17*(12), 1615-1624.

Kowaljow, V., Marcowycz, A., Ansseau, E., Conde, C. B., Sauvage, S., Mattéotti, C., ... & Rosa, A. L. (2007). The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscular Disorders*, *17*(8), 611-623.

Leidenroth, A., & Hewitt, J. E. (2010). A family history of DUX4: Phylogenetic analysis of DUXA, B, C and Duxbl reveals the ancestral DUXgene. *BMC evolutionary biology*, *10*(1), 1-13.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

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

Lemmers, R. J., Van Overveld, P. G., Sandkuijl, L. A., Vrieling, H., Padberg, G. W., Frants, R. R., & van der Maarel, S. M. (2004). Mechanism and timing of mitotic rearrangements in the subtelomeric D4Z4 repeat involved in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *The American Journal of Human Genetics*, *75*(1), 44-53.

Lemmers, R. J., Wohlgemuth, M., van der Gaag, K. J., van der Vliet, P. J., van Teijlingen, C. M., de Knijff, P., ... & van der Maarel, S. M. (2007). Specific sequence variations within the 4q35 region are associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *The American Journal of Human Genetics*, *81*(5), 884-894.

Li, C., Wang, S., Xing, Z., Lin, A., Liang, K., Song, J., ... & Yang, L. (2017). A ROR1–HER3–lncRNA signalling axis modulates the Hippo–YAP pathway to regulate bone metastasis. *Nature cell biology*, *19*(2), 106-119.

Li, Y., Wu, B., Liu, H., Gao, Y., Yang, C., Chen, X., ... & Gan, J. (2018). Structural basis for multiple gene regulation by human DUX4. *Biochemical and biophysical research communications*, *505*(4), 1161-1167.

Lin, F., Wang, Z. Q., Lin, M. T., Murong, S. X., & Wang, N. (2015). New insights into genotype-phenotype correlations in Chinese facioscapulohumeral muscular dystrophy: a retrospective analysis of 178 patients. *Chinese medical journal*, *128*(13), 1707-1713.

Lyle, R., Wright, T. J., Clark, L. N., & Hewitt, J. E. (1995). The FSHD-associated repeat, D4Z4, is a member of a dispersed family of homeobox-containing repeats, subsets of which are clustered on the short arms of the acrocentric chromosomes. *Genomics*, *28*(3), 389-397.

Masiakowski, P., & Carroll, R. D. (1992). A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(36), 26181-26190.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Matsuda, T., Nomi, M., Ikeya, M., Kani, S., Oishi, I., Terashima, T., ... & Minami, Y. (2001). Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development. *Mechanisms of development*, *105*(1-2), 153-156.

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

Matsuzaka, Y., Kishi, S., Aoki, Y., Komaki, H., Oya, Y., Takeda, S. I., & Hashido, K. (2014). Three novel serum biomarkers, miR-1, miR-133a, and miR-206 for Limb-girdle muscular dystrophy, Facioscapulohumeral muscular dystrophy, and Becker muscular dystrophy. *Environmental health and preventive medicine*, *19*(6), 452-458.

Mitsuhashi, H., Mitsuhashi, S., Lynn-Jones, T., Kawahara, G., & Kunkel, L. M. (2013). Expression of DUX4 in zebrafish development recapitulates facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Human molecular genetics*, *22*(3), 568-577.

Morrison, B. M. (2016, October). Neuromuscular diseases. In *Seminars in neurology*, *36*(5): 409-418.

Mul, K., Horlings, C. G., Voermans, N. C., Schreuder, T. H., & Van Engelen, B. G. (2018). Lifetime endogenous estrogen exposure and disease severity in female patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, *28*(6), 508-511.

Nguyen, K., Walrafen, P., Bernard, R., Attarian, S., Chaix, C., Vovan, C., & Lévy, N. (2011). Molecular combing reveals allelic combinations in facioscapulohumeral dystrophy. *Annals of neurology*, *70*(4), 627-633.

Oishi, I., Takeuchi, S., Hashimoto, R., Nagabukuro, A., Ueda, T., Liu, Z. J., ... & Minami, Y. (1999). Spatio-temporally regulated expression of receptor tyrosine kinases, mRor1, mRor2, during mouse development: implications in development and function of the nervous system. *Genes to Cells*, *4*(1), 41-56.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

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

Padberg, G. W. A. M. (1982). Facioscapulohumeral disease: faculty of medicine. *Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden University*.

Paganoni, S., & Ferreira, A. (2003). Expression and subcellular localization of Ror tyrosine kinase receptors are developmentally regulated in cultured hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research*, *73*(4), 429-440.

Pedersen, B. K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Keller, P., Plomgaard, P., ... & Saltin, B. (2003). Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate?. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, *24*(2), 113-119.

Ricci, E., Galluzzi, G., Deidda, G., Cacurri, S., Colantoni, L., Merico, B., ... & Felicetti, L. (1999). Progress in the molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy and correlation between the number of KpnI repeats at the 4q35 locus and clinical phenotype. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, *45*(6), 751-757.

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

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res. 1813,* 878–888. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.

Snider, L., Geng, L. N., Lemmers, R. J., Kyba, M., Ware, C. B., Nelson, A. M., ... & Miller, D. G. (2010). Facioscapulohumeral dystrophy: incomplete suppression of a retrotransposed gene. *PLoS genetics*, *6*(10), e1001181.

Spurlock, G., Jim, H. P., & Upadhyaya, M. (2010). Confirmation that the specific SSLP microsatellite allele 4qA161 segregates with fascioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) in a cohort of multiplex and simplex FSHD families. *Muscle & nerve*, *42*(5), 820-821.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

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

Tawil, R., Kissel, J. T., Heatwole, C., Pandya, S., Gronseth, G., & Benatar, M. (2015). Evidence-based guideline summary: Evaluation, diagnosis, and management of facioscapulohumeral muscular dystrophy: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Issues Review Panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology*, *85*(4), 357-364.

Teveroni, E., Pellegrino, M., Sacconi, S., Calandra, P., Cascino, I., Farioli-Vecchioli, S., ... & Moretti, F. (2017). Estrogens enhance myoblast differentiation in facioscapulohumeral muscular dystrophy by antagonizing DUX4 activity. *The Journal of clinical investigation*, *127*(4), 1531-1545.

Tsumagari, K., Chang, S. C., Lacey, M., Baribault, C., Chittur, S. V., Sowden, J., ... & Ehrlich, M. (2011). Gene expression during normal and FSHD myogenesis. *BMC medical genomics*, *4*(1), 1-19.

Tupler, R., Berardinelli, A., Barbierato, L., Frants, R., Hewitt, J. E., Lanzi, G., ... & Tiepolo, L. (1996). Monosomy of distal 4q does not cause facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Journal of medical genetics*, *33*(5), 366-370.

Tupler, R., Perini, G., Pellegrino, M. A., & Green, M. R. (1999). Profound misregulation of muscle-specific gene expression in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(22), 12650-12654.

Van Overveld, P. G., Enthoven, L., Ricci, E., Rossi, M., Felicetti, L., Jeanpierre, M., ... & Van Der Maarel, S. M. (2005). Variable hypomethylation of D4Z4 in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, *58*(4), 569-576.

Vanderplanck, C., Ansseau, E., Charron, S., Stricwant, N., Tassin, A., Laoudj-Chenivesse, D., ... & Belayew, A. (2011). The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression. *PloS one*, *6*(10), e26820.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Vanderplanck, C., Tassin, A., Ansseau, E., Charron, S., Wauters, A., Lancelot, C., ... & Coppée, F. (2018). Overexpression of the double homeodomain protein DUX4c interferes with myofibrillogenesis and induces clustering of myonuclei. *Skeletal muscle*, *8*(1), 1-16.

Walker, G., Butterfield, R., Mathews, K., Servais, L., Day, J., Gidaro, T., ... & Maggi, L. (2017). Results of a phase 1b/2 study of ATYR1940 in adolescents and young adults with early onset facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)(ATYR1940-C-003). *Neuromuscular Disorders*, *27*, 199.

Wang, L. H., Yang, X. Y., Zhang, X., Huang, J., Hou, J., Li, J., et al. (2004). Transcriptional inactivation of STAT3 by PPARgamma suppresses IL-6-responsive multiple myeloma cells. *Immunity 20*, 205–218.

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

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

Wijmenga, C., Sandkuijl, L. A., Moerer, P., Van Der Boorn, N., Bodrug, S. E., Ray, P. N., ... & Frants, R. R. (1992). Genetic linkage map of facioscapulohumeral muscular dystrophy and five polymorphic loci on chromosome 4q35-qter. *American journal of human genetics*, *51*(2), 411-415.

Winokur, S. T., Bengtsson, U., Vargas, J. C., Wasmuth, J. J., & Altherr, M. R. (1996). The evolutionary distribution and structural organization of the homeobox-containing repeat D4Z4 indicates a functional role for the ancestral copy in the FSHD region. *Human molecular genetics*, *5*(10), 1567-1575.

Winokur, S. T., Chen, Y. W., Masny, P. S., Martin, J. H., Ehmsen, J. T., Tapscott, S. J., ... & Flanigan, K. M. (2003). Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Human molecular genetics*, *12*(22), 2895-2907.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Wright, T. J., Wijmenga, C., Clark, L. N., Frants, R. R., Williamson, R., & Hewitt, J. E. (1993). Fine mapping of the FSHD gene region orientates the rearranged fragment detected by the probe p13E-11. *Human molecular genetics*, *2*(10), 1673-1678.

Yamaguchi, T., Yanagisawa, K., Sugiyama, R., Hosono, Y., Shimada, Y., Arima, C., ... & Takahashi, T. (2012). NKX2-1/TITF1/TTF-1-Induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma. *Cancer cell*, *21*(3), 348-361.

Zhang, Q., Wang, H. Y., Marzec, M., Raghunath, P. N., Nagasawa, T., & Wasik, M. A. (2005). STAT3-and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(19), 6948-6953.

Zhang, Q., Wang, H. Y., Woetmann, A., Raghunath, P. N., Odum, N., & Wasik, M. A. (2006). STAT3 induces transcription of the DNA methyltransferase 1 gene (DNMT1) in malignant T lymphocytes. *Blood*, *108*(3), 1058-1064.

Zhang, Q., Zhao, K., Shen, Q., Han, Y., Gu, Y., Li, X., ... & Cao, X. (2015). Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6. *Nature*, *525*(7569), 389-393.