

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**FASİOSKAPULOHUMERAL MUSKÜLER
DİSTROFİLİ OLGULARDA 4q35'TE LOKALİZE D4Z4 TEKRAR
DİZİLERİNDEKİ DELESYONLARIN GÖSTERİLMESİ**

Özge Burcu ŞAHAN

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2012

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**FASİOSKAPULOHUMERAL MUSKÜLER
DİSTROFİLİ OLGULARDA 4q35'TE LOKALİZE D4Z4 TEKRAR
DİZİLERİNDEKİ DELESYONLARIN GÖSTERİLMESİ**

Özge Burcu ŞAHAN

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sibel BERKER**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2010.02.0122.012)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya,2012

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir. .../.../...

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sibel BERKER
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Nidai ÖZEŞ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Güven Lüleci
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Hilmi Uysal
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. İbrahim Keser
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

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

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Otozomal dominant bir miyopati olan Fasioskapulohumeral Musküler Distrofi (FSHD), en sık karşılaşılan üçüncü kas hastalığı olup; yüz, omuz ve üst kol kaslarındaki progresif kas güçsüzlüğü ile karakterizedir. FSHD hastalığına, 4q35 bölgesindeki D4Z4 tekrarlarındaki delesyonlar sebep olmaktadır. Otozomal dominant kalıtım gösteren bu hastalıkta, FSHD hastalarının %95'inden fazlasında, normal bireylerde 11 ila 100 tekrar içeren D4Z4 tekrar dizileri, 1 ile 11 tekrar içermektedir.

Bu çalışmada Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'nda klinik açıdan FSHD ön tanısı almış 14 olgu (5'i kadın, 9'u erkek) ele alındı. Yaş ortalaması 39 olan bu olguların periferik kanlarından tuzla çöktürme metodu ile DNA izolasyonu yapıldı. 4 numaralı kromozomun q35 lokusunda yer alan D4Z4 tekrar dizilerindeki delesyonu gösterebilmek için Southern blot yöntemi kullanıldı. Aynı zamanda klinik olarak normal bireylerden elde edilen 3 DNA örneği de kontrol olarak çalışıldı. Kontrol grubundaki D4Z4 tekrarları, normal sınırlar içinde bulunurken (11 tekrardan fazla), 14 FSHD olgunun tekrar sayısının, klinik göstergeyle paralel olarak normal sınırların altında (11 tekrardan az) olduğu belirlendi.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, Southern blot yöntemi hastalıkla ilişkili 4 numaralı kromozom üzerindeki D4Z4 tekrarlarındaki delesyonların belirlenmesi için uygun bir yöntem olarak gözlenmiştir. Klinik bulguyu desteklemesi, hastalıkta kesin tanıyı sağlaması ve genetik danışma açısından da büyük önem taşımasından dolayı bu yöntemin rutine uygulanması halinde fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: FSHD, D4Z4 tekrarları, Southern blot, 4 numaralı kromozom

ABSTRACT

Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy (FSHD), which is characterized by progressive weakness of muscles in the face, shoulder girdle and upper arms, is the third most common muscular disease. FSHD is caused by deletions of the D4Z4 repeats in the 4q35 region. In this autosomal dominantly inherited disease, more than 95% patients have only 1-10 repeats instead of 11-100 repeats observed in healthy controls.

In this study, 14 (9 male, 5 female) patients with the average age 39, were handled after the preclinical diagnosis by the Akdeniz University Medical Faculty department of Neurology. DNA was extracted from those patients' peripheral blood, using salting-out method. In order to detect the deletions of D4Z4 tandem repeats at the q35 locus on chromosome 4, Southern blot method was used. Besides, DNA samples which were obtained from 3 healthy individuals were studied as control group. According to our results, even though the number of D4Z4 repeats in control group was found to be in the normal range (more than 11 repeats), 14 FSHD patients' repeat numbers were observed to be under the normal range (less than 11 repeats) as parallel to clinical profile.

According to the data we obtained, Southern blot is an applicable strategy for determination of the D4Z4 repeat deletions on chromosome 4. Due to reasons that support the clinical profile and provide definitive diagnosis, also genetic counseling which has great importance; this method can be beneficial when is used in routine practice .

Key Words: FSHD, D4Z4 repeats, Southern blot, chromosome 4

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen tez çalışmama yön vermemde engin bilgileriyle ve deneyimleriyle büyük katkıları olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sibel BERKER'e,

Eğitimim sırasında yardımlarını benden esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaştıran Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ'e,

Bilgisiyle, deneyimleriyle, sonsuz sabrıyla ve ilgisiyle çalışmalarına her daim yardımcı olan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Türker BİLGİN'e,

Çalışmalarımın öncesinde ve süresince bana her zaman güleryüzlülüğüyle, ilgisiyle ve sabrıyla destek olan bilgi ve tecrübelerini benimle paylaştıran, hiçbir zaman yardımını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Hilmi UYSAL'a,

Tezimin yürütmesinde büyük emeği olan, her zaman beni teşvik eden ve destek olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Ferah KIZILAY'a,

Hollanda'da tez çalışmamla ilgili bilgiler edinmemi sağlayan Dr. Richard J.F. LEMMERS'a, Dr. Patrick J. van der VLIET'e ordaki staja kabul edilmemi sağlayan Dr. Silvere van der MAAREL'e ve hoşgörülerıyla ve yardımlarıyla destek olan Leiden Üniversitesi Tıbbi Merkez İnsan Genetiği Departmanının tüm çalışanlarına,

Çalışmalarımda kullandığım yöntem hakkında, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Ar. Gör. Süray PEHLİVANOĞLU ve Arş.Gör.Gökhan GÖRGİŞEN'e,

Her zaman olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de sevgi ve desteğini esirgemeyen aileme,

Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman bana destek olan Arş. Gör Fatma Zehra HAPİL başta olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

İlgisi ve hoşgörüsüyle iyi kötü her günde yanımda olan, sonsuz sabırla her zaman bana destek olan Mehmet Çağatay VASFİ'ye,

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.'deki tüm hocalarıma, sekreterlerimize, enstitümüz çalışanlarına ve teknisyen arkadaşlarıma, birlikte olduğumuz süre içerisinde gösterdikleri hoşgörü ve hep en güzel yönlerini benimle paylaşarak verdikleri destek için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Klinik	4
2.2. Gen Haritalama Çalışmaları	4
2.2.1. D4F104S1 Lokusu	4
2.2.2. D4Z4 Tekrarları	6
2.2.3. 4q35 ve 10q26 Homolojisi	6
2.3. Somatik Mozaikizm	7
2.4. Genotip/Fenotip ilişkisi	7
2.5. Cinsiyet Etkisi	8
2.6. Moleküler Teşhis	8
2.7. Kas biyokimyası ve Fizyolojisi	9
2.8. <i>FSHD</i> geni araştırmaları	10
2.9. Double Homeobox 4 (<i>DUX4</i>) geni	10
2.10. FSHD Aday Genleri	11
2.10.1. <i>FSHD</i> Region Gene 1 (<i>FRG1</i>)'in Tanımlanması	12
2.10.2. Tubulin, beta Polypeptide 4, Member Q (<i>TUBB4q</i>)	12
2.10.3. FSHD Region Gene 2 (<i>FRG2</i>)	13
2.10.4. Adenin Nukleotit Translokator (<i>SLC25A4</i> , <i>ANT1</i>)	13
GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Periferal Kandan DNA izolasyonu	15
3.1.1. Kullanılan Solüsyonlar	15
3.1.2. İşlemler	16
3.1.3. DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümü	17
3.2. Enzim Kesimi	17
3.3. PFGE (Pulsed Field Gel Elektroforezi)	18

3.3.1.	İşlemler	18
3.4.	Blotlama İşlemi	19
3.4.1.	Kullanılan Solüsyonlar	19
3.4.2.	İşlemler	19
3.5.	Prehibridizasyon ve Hibridizasyon	20
3.5.1.	Kullanılan Solüsyonlar	20
3.5.2.	İşlemler	21
BULGULAR		22
SONUÇLAR		26
5.1.	Olguların D4Z4 Tekrarlarının Değerlendirilmesi	27
TARTIŞMA		29
KAYNAKLAR		33
ÖZGEÇMİŞ		38

SİMGELER VE KISALTMALAR

ANT1	: Adenin Nükleotit Translokator
AmAc	: Amonyum Asetat
cDNA	: Komplementer DNA (Complementary DNA)
CEN	: Sentromer
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dH₂O	: Distile Su
DUX4	: Double homeobox 4
DUX4C	: Double homeobox 4 like 9
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr	: Etidiyum Bromür
FBS	: Fetal Bovin Serum
FRG1	: FSHD region gene 1
FRG2	: FSHD region gene 2
FSHD	: Fasioskapulohumeral Musküler Distrofi
g	: Gram
Kb	: Kilobaz
KHCO₃	: Potasyum Bikarbonat
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
µM	: Mikromolar
NaCl	: Sodyum Klorür
NaHPO₄	: Sodyum Fosfat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NH₄Cl	: Amonyum Klorür
OD	: Optik Dansite
O/N	: Gece Boyu (Over night)

ORF	: Açık Okuma Çerçevesi (Open Reading Frame)
PBS	: Fosfat Tuz Tampon (Phosphate Buffer Saline)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
³²PdCTP	: ³² P İşaretli dNTP Solüsyonu
PITX1	: Paired-like homeodomain 1
PLAM1	: L- amicosyl-4-0- methyl transferase
PTPC	: Permeability Transition Pore Complex
RNA	: Ribonükleik Asit
Rpm	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SSC	: Salin-Sodyum-Sitrat (Salin-Sodium-Citrat)
SF	: Sulandırma Faktörü
TBE	: Tris Borat EDTA
TE	: Tris EDTA
TUBB4q	: Tubulin, Beta Polypeptide 4, Member Q
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
VNTR	: Değişken Sayılı Ardışık Tekrarlar (Variable Number of Tandem Repeats)
WBL	: Beyaz Kan Hücresi Lizis Tamponu (White Blood Cell Lysis Buffer).

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	FSHD aday bölgesi olan 4q35'in kesim haritası	5
2.2.	4q35'te FSHD bölgesinde çalışılmış aday genlerin lokalizasyonları.	12
4.1.	1,2,3 ve 4 numaralı ailelere ait pedigriler	23- 25
5.1.	1,2,3,4,5,6, 7 numaralı olguların ve 1 numaralı kontrolün otoradyografi sonrası D4Z4 tekrarlarını yansıtan bant profili.	26
5.2.	8,9,10,11,12,13 ve 14 numaralı olguların otoradyografi sonrası D4Z4 tekrar sayısını yansıtan bant profili	27

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
4.1.	14 olgunun DNA Verimi ve Miktar Tayini	22
4.2.	Kontrollerin DNA Verimi ve Miktar Tayini	23
5.1.	14 Olgunun Klinik ve Moleküler Genetik Verileri	28
5.2.	Kontrollerin Klinik ve Moleküler Genetik Verileri	28

GİRİŞ VE AMAÇ

Fasioskapulohumeral Musküler Distrofi (FSHD1A, MIM158900) otozomal dominant bir miyopati olup, ilk olarak 1885 yılında Fransız Nörologlar Landouzy ve Dejerine tarafından tanımlanmıştır [1]. Klinik özellikler daha sonra 1950’de Utah’da büyük bir ailede ve 1982 yılında Hollanda’da yapılan popülasyon bazlı çalışmalarda tanımlanmıştır [2]. FSHD 1:20000 insidansla Duchenne Musküler Distrofi ve Myotonik Distrofi’den sonra en çok karşılaşılan üçüncü nöromusküler kalıtsal hastalık olup [3], yüz, kol ve omuz kaslarındaki atrofi ile karakterizedir. Birçok hastada hastalık yavaş ilerlemekte olup hastalığın gidişatına bağlı olarak; genel kas zayıflığı ve atrofi, pelvik kası ve distal kas sisteminin de etkilendiği görülebilmektedir [4]. Hastalığın erken dönemlerde ortaya çıkması, genellikle hastalığın daha şiddetli gelişmesiyle ilişkilidir [5]. Hastaların çoğunluğunda semptomlar ikinci dekattan (20 yaşından) sonra ortaya çıkar. Hastalığın başlangıcının 10 yaşından önce görülmesi sık karşılaşılan bir durum değildir, yine de % 5’e yakın hastada, yüz kaslarının belirgin olarak zayıflığı söz konusudur. FSHD olgularının bir kısmında genel belirtiler dışında, retinal vaskülopati ve yüksek-tonal sağırılık görülmektedir [6, 7]. Bazı FSHD ailelerinde hastalığın mental retardasyon ve epilepsi ile de ilişkisi bulunmaktadır [6, 8]. Hastalığın şiddetine bağlı olarak hastaların yaklaşık %20’si daha 40 yaşında, distal kasların da tutulumuyla tekerlekli sandalyeye bağımlı hale gelmektedirler [9]. Hastalığın aynı aile içinde de klinik tablosu değişkenlik gösterebilmektedir [Lunt *et al.* 1995]. Erkek ve dişi bireylerde hastalığın görülme insidansında bir farklılık yokken nedeni bilinmemekle beraber erkekler, kadınlardan daha çok etkilenmektedirler [10].

Klinik olarak FSHD hastalarını diğer kas hastalıklarından ayıran belirgin özellikler olsa dahi tam teşhis için moleküler testlere gerek duyulmaktadır. FSHD hastalığının asıl sebebi, 4 numaralı kromozomun subtelomerik bölgesindeki D4Z4 tekrar dizilerinin sayısındaki azalmadır. Normal bireylerde 11 ile 100 arasında değişen tekrar sayısı, FSHD hastalarında delesyon sonucu 1-11 tekrar arasında değişmektedir. 4 numaralı kromozomda lokalize olan D4Z4 tekrarları 10 numaralı kromozom üzerinde bulunan D4Z4 tekrar dizilerine %98’den fazla homoloji göstermekle birlikte, 10q26’daki D4Z4 tekrarlarının, FSHD hastalığı ile bir ilişkisi olduğuna yönelik herhangi bir bulgu yoktur [11].

D4Z4 tekrarları özellikle bu bölgenin hemen proksimalinde yer alan p13E-11 bölgesi için uygun olan radyoaktif işaretli prob kullanılarak, Southern blot yöntemiyle belirlenebilmektedir. Bu yöntem uygulanırken 4 numaralı kromozoma özgü D4Z4 tekrarlarını içeren fragmentleri özellikle, 10 numaralı kromozomdaki D4Z4 tekrar dizilerinden ayırt etmek için 3 enzim kesimi yapılmaktadır. Kısa fragmentler için yüksek çözünürlüğü sağlaması ve bu bölgenin diğer bölgelerden farklı olarak yüksek oranda GC dizisi içermesi sebebiyle, FSHD tanısında ağırlıklı olarak radyoaktif işaretli Southern blot yöntemi kullanılmaktadır.

Moleküler testlerin gelişmesiyle, son yıllarda tekrar bölgesine yakın olan genlerin hastalığa sebep olabileceği düşünülmüş ve gen ekspresyon çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. D4Z4 delesyonları sonucunda kromatin yapısının değişmesi ve histon modifikasyonları sonucu olduğu düşünülen hem tekrar bölgesindeki hem de komşu bölgedeki genlerin ekspresyon seviyelerinin değiştiği gösterilmiştir. Normalde düşük ekspresyon seviyesine sahip FRG1, FRG2, ANT1, TUBB4q genlerinin ve normalde ekspresyonu gözlenmeyen DUX4 geninin FSHD hastalarının kas dokusu alınarak myoblast hücreleriyle yapılan çalışmalarda overeksprese olduğu görülmüştür [12]. Bizim çalışmamızda da FSHD hastalarından alınan biyopsi materyalinden primer myoblast kültürü yaparak, RNA izolasyonu ve RNA'dan özellikle *DUX4* genine yönelik cDNA elde edilerek genlere özgü primerler kullanarak gerçek zamanlı PCR (Real Time PCR) metoduyla genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi de amaçlanmıştır. Biyopsi yapılacak FSHD hastası bulma, primer primer myoblast doku kültürü kurulduktan sonra oluşan bakteri ve mantar kontaminasyonlardan dolayı yaşanan ve direk kas dokusundan RNA elde edilmesi konusundaki zorluklar nedeniyle projenin ikinci kısmına yönelik gen ekspresyon çalışması sonuçlandırılmamıştır.

Bu çalışmada FSHD ön tanısı ile gelen 14 olgunun ve 3 kontrol bireyin DNA örneklerinden, radyoaktif Southern blot yöntemi kullanılarak D4Z4 tekrar sayılarının gösterilmesi ve bu bulguların FSHD kliniği ile kıyaslanarak ailelere sağlıklı bir genetik danışmanın verilebilmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

FSHD hastalığı, ilk olarak 1800'lerin sonlarında iki Fransız nörolog Louis Landouzy ve Joseph Dejerine tarafından 11 yıl boyunca bir ailenin gözlemlenmesinin ardından tanımlanmıştır [13]. Bu araştırmacılar FSHD'nin ana belirtilerinin; erken evrede görülen yüzde tutulum, omuz ve kol kaslarının progresif güçsüzlüğü ve atrofisi olduğunu, hastalığın kalıtsal geçiş gösterdiğini ve aynı ailede etkilenmiş bireyler arasında klinik farklılıklar gösterdiğini rapor etmişlerdir. 1950 yılında, Tyler ve Stephens [14] tarafından Utah'da 6 kuşak içeren 1249 kişilik çok geniş bir aile bulunmuş, bu büyük ailenin bireylerinin 1840 yılında Utah'a göç eden İngiliz bir erkek hastanın soyundan geldiği gösterilmiştir. Araştırmacılar bu ailenin sadece 240 üyesini inceleyebilmişler ve 58 üyesinin etkilenmiş olduğunu bulmuşlardır. Bu bulgular Loundazy ve Dejerine'in klinik heterojeniteye ve otozomal dominant kalıtımına yönelik raporunu doğrulamıştır. 1982 yılında Padberg'in geriye yönelik FSHD tanısı olan 107 hasta üzerinde yaptığı bir çalışmayla, detaylı bir şekilde hastaların şikayetleri, klinik progresyonu ve laboratuvar bulguları yayınlanmıştır.

FSHD tanısında klinik kriterler 1991 yılındaki uluslararası konsorsiyumda yayınlanmıştır. Buna göre;

- Hastalığın başlangıcı yüzde veya omuz kaslarında tutulum ve ekstraoküler, farinjiyal, lingual ve kalp kası harici tutulumunun gösterilmesi
- Etkilenmiş aile bireylerinin %50'sinde yüz kası zayıflığının belirlenmesi
- Ailesel olgularda otozomal dominant kalıtım modelinin varlığı
- En az bir hasta bireyde elektromiyografi ve kas biyopsisine bakılarak miyopatinin kanıtlanması, tanı kriterlerini oluşturmuştur.

Bu kriterlerinin yayınlanmasından sonra 1998 yılında yapılan bir çalışmada kalp kası tutulumu da belgelendirilmiştir [15]

Tanı kriteri olarak bu klinik veriler oluşturulduktan sonra esas gelişmeler, FSHD ile ilişkili genetik çalışmalarla oluşmuştur. Bu gelişmelerle, FSHD tanısı için moleküler testler ve aile üyeleri için genetik danışmanlığın ilerlemesi sağlanmıştır. Moleküler testlerin uygulanabilirliği, klinik fenotipin oluşum spektrumunu da genişletmiştir.

2.1. Klinik

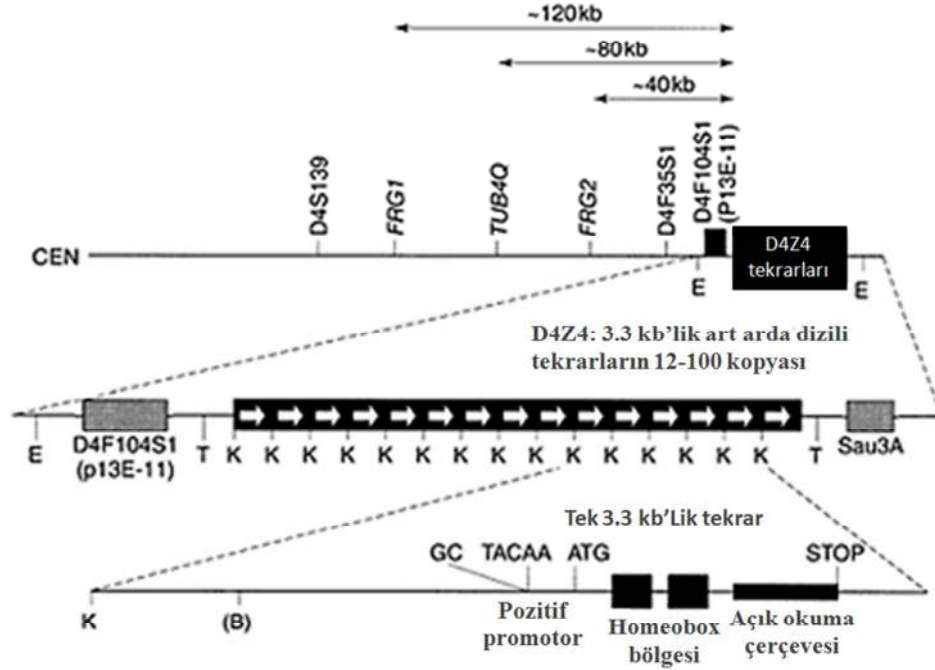
FSHD hastalığı; adından da anlaşıldığı gibi özellikle yüz (facio), omuz (scapulo) ve üst kol (humerus) kaslarını etkilemektedir [5, 16, 17]. Özellikle spesifik kasların etkilenmesi, FSHD hastalığının kliniğinin diğer musküler distrofilerden ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. FSHD hastalarının çoğu, genellikle yaşamlarının ikinci ve üçüncü dekatında vücudun üst kısmındaki hareketlerle ilgili şikayetle gelmektedirler [1, 18]. Padberg'in geriye yönelik yaptığı bir çalışmada; hastaların %82'sinde ilk semptom olarak omuz kaslarında, %10'unda yüz kaslarında, %8'inde ise ayak dorsifleksor kasında güçsüzlük rapor edilmiştir [1]. İlk semptom bunlar olmasına rağmen tüm FSHD hastaları birlikte ve detaylı olarak incelendiğinde çarpıcı biçimde, %94 hastanın yüz kasında zayıflık, %93'ünde omuz kaslarında, %67'sinde ayak dorsifleksor kasında ve %50'sinde pelvik kaslarında güçsüzlük olduğu belirlenmiştir.

2.2. Gen Haritalama Çalışmaları

FSHD lokusu kromozom 4q35'te genetik olarak haritalanmıştır [19, 20]. Bu bölge kompleks bir lokus olan D4F104S1 lokusunun çok yakınında lokalizedir (Şekil 2.1). FSHD hastalığında genetik heterojenite olduğuna dair bazı kanıtlar vardır. Büyük FSHD ailelerinin çoğunluğunda hastalığın 4q35 bölgesiyle ilişkili olduğunun kanıtlanmasına rağmen, çok az sayıda FSHD ailesi bu lokusun dışında kalmaktadır [21]. Bu genetik çalışmalar doğrultusunda 4q35 bölgesi dışında kalan ve başka herhangi bir lokusa spesifik olmayan hastalık FSHD1B (FSHD2) olarak adlandırılmaktadır.

2.2.1. D4F104S1 Lokusu

D4F104S1 lokusuna spesifik p13E-11 probu, hem 4q35 hem 10q26 ile homoloji gösteren *Eco*RI restriksiyon fragmentini tanımaktadır. p13E-11 probu D4F104S1 lokusunun, p13E-11'in art arda dizili tekrar birimlerinin proksimaline lokalize, tek kopya genomik diziyi tanımaktadır. Bireylerdeki her biri 4q35 ve 10q26 'dan kaynaklanan ardışık tekrarların kesin sayılarında çeşitlilik gözlenmektedir. Bunun sebebi, D4F104S1 lokusunda değişken sayıda ardışık tekrarlı (VNTR) dizilerin bulunmasıdır. D4F104S1 lokusu, VNTR'ları tanımlayan iki spesifik *Eco*RI restriksiyon bölgesini içermektedir; Birinci bölge p13E-11 probunun dizi homologunun proksimaline lokalizedir, ikincisi ise ardışık dizili tekrar bölgelerinin hemen distalinde bulunmaktadır (Bkz. Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. FSHD aday bölgesi olan 4q35'in kesim haritası: FRG1, TUBB4Q, FRG2, genlerinin, D4F104S1(p13E11) lokusunun ve D4Z4 tekrarlarının lokalizasyonları. EcoRI fragmenti p13E11 probuyla, çoğunlukla normal bireylerde 12-100 arası FSHD'li hastalarda genellikle <10 3.3 kb art arda dizili tekrar eden kopya sayılarını belirler. Her 3.3 kb tekrar iki homeodomain (siyah kutucuklar) bir ORF, başlama kodonu (ATG) ve stop kodonu içerir. Aynı zamanda DUX4 genini kodlar. DUX4'nın promotor-benzeri dizisinde, GC ve TACAA kutucuklarının pozisyonu belirtilmektedir. B: *BlnI* restriksiyon bölgesi, E: *EcoRI* kesim bölgesi; K: *KpnI* restriksiyon bölgesi; T: *Tru91* restriksiyon bölgesi

Normal bireylerden elde edilen *EcoRI* kesimli yüksek moleküler ağırlığa sahip genomik DNA içeren ve p13E-11 probuyla hibridize edilen fragmentlerin boyutları, Southern blot yöntemiyle bakıldığında 35-38 kb ile 300 kb arasında çeşitlilik gösteriyorken, FSHD hastalarında 10 ile 35-38 kb arasında çeşitlilik göstermektedir. Klasik Southern blot yöntemiyle 50 kb'nin üzerindeki fragment boyutlarını analiz etmek zor olduğundan, çözünürlüğü arttırmak için pulsed-field elektroforez kullanılmaktadır. Bireylerin çoğunluğu homolog kromozomların iki kopyasını da taşıdığından, bir bireyin DNA'sı analiz edildiğinde 4 farklı boyutta fragment görülme potansiyeli vardır. Her fragment 4q35 lokusundan türeyen iki allel ve 10q26 lokusundan gelen iki allel olmak üzere farklı dört D4F104S1 alleli gösterebilir.

EcoRI'ın enzim kesimi ile farklı fragmentlerin varlığının, sporadik FSHD hastalarındaki çalışmalarda da *de novo* olarak oluşumunun gösterilmesi ve klinik olarak etkilenmemiş bireylerin hiçbirinde var olmadığının kanıtlanmasıyla *EcoRI* fragmenti ve FSHD arasındaki bağlantı kuvvetlenmiştir. Ancak hem sporadik hem de ailesel olguların küçük bir kısmında kısa *EcoRI* fragmenti bulunmaz. Bunun

sebebi ise ya bu olgularda farklı mutasyonel mekanizmalar gelişmiştir, ya bu olgular esas FSHD lokusu olan 4q35 FSHD1A lokusuyla bağlantılı değildir ya da başka genetik varyasyonlarla hastalık ortaya çıkmıştır.

Eğer tek bir kısa D4F104S1 alleleline sahip olmak hastalık fenotipini göstermek için yeterliyse (FSHD dominant bir hastalıktır ve bu yüzden, FSHD geninin iki kopyasının sadece birindeki değişiklik yeterlidir) D4F104S1 allellerinden birinin tamamen kaybı daha şiddetli bir fenotip göstergesi olmalıdır. Birkaç bireyde sitogenetik analizle belirlenebilen özellikle 4q35 bölgesini içeren delesyonlar tanımlanmıştır. Bu olgular, 4q35'den kaynaklanan D4F104S1 lokusunun tek kopyası için monozomiktirler. Şaşırtıcı bir şekilde, bu bireylerde, FSHD'ye ait herhangi bir klinik bulgu gözlenmemiştir [5]. Bu bulgular, FSHD hastalığının 4q delesyonu olan bölgede kısmî veya tam bir genin kaybından çok, büyük ihtimalle dominant negatif (fonksiyon kazanımı) mutasyonel mekanizmasının etkisiyle ortaya çıktığını düşündürmektedir. Bu gözlemler D4F104S1 lokusunun kendisine dayalı, FSHD geninin, ve özellikle bölgedeki D4Z4 tekrarlarının araştırılmasının önünü açmıştır.

2.2.2. D4Z4 Tekrarları

D4Z4 tekrar birimleri 3.3 kb'lik ardışık tekrar dizilerini içeren ve GC'ce zengin bölgelerdir. Akrosentrik kromozomların kısa kolu üzerinde, perisentromerik bölgelerde (özellikle 1 numaralı kromozomda) ve 4 ve 10 numaralı kromozomların uzun kolunun telomerik bölgelerinde lokalize olan büyük bir ailenin üyesidir [22, 23]. Normal bireylerde D4F104S1 lokusu üzerinde D4Z4 tekrarları 12 ile 100 arasında değişmektedir. Buna nazaran FSHD ile ilişkili D4F104S1 alleli, 1 ile 11 arası D4Z4 tekrar birimleri içermektedir.

Normalde D4Z4 tekrarları oldukça kapalı kromatin konfigürasyonuna sahiptir, tekrar kontraksiyonunun bir sonucu olarak daha açık bir kromatin konfigürasyonuna adaptasyon sağlamaktadır. DNA metilasyon, histon modifikasyonları ve diğer kromatin tekrarları konusundaki çalışmalar bu hipotezi desteklemektedir [24-27]. FSHD de D4Z4 spesifik bölgeler test edildiğinde ise DNA metilasyonunda %30- 40 azalma vardır. Aynı zamanda Kromatin İmmüno Presipitasyon (ChIP) analizleri, normal D4Z4 tekrarlarının transripsiyonel olarak represyona ve histon modifikasyonlarına sebep olduğunu, FSHD'de ise represif histon modifikasyonları ile ilişkili kayıplar olduğunu göstermektedir ve bu kromatin yapısı D4Z4 bölgesi ile sınırlı gözükmemektedir. ChIP analizleri aynı zamanda FSHD hastalarında diğer kromatin faktörlerinin kaybı ve kazanımını göstermektedir: örneğin FSHD tanılı hastalarda HP1 γ , YY1 (kohezin kompleks) kaybı ve CTCF (CCCTC-binding factor (zinc finger protein))kazanımı vardır [26, 28].

2.2.3. 4q35 ve 10q26 Homolojisi

Çeşitli çalışmalarla D4F104S1 lokusunun ikinci kopyasının, 10 numaralı kromozomun heterokromatin yapıdaki subtelomerik bölgesi içerisinde 10q26'da lokalize olduğunun gösterilmesi [29] sonucunda hem 4q35 hem de 10q26 D4F104S1

lokuslarından yapılan detaylı sekans analizleriyle, D4Z4 tekrarlarının yüksek seviyede dizi homolojisi (98-100%) gösterdiği doğrulanmıştır ve de, 4q35- kökenli D4Z4 tekrarlarında olmayan fakat 10q26 tekrar birimlerinden kaynaklanan D4Z4 tekrarlarının her kopyasında bulunan, özgün bir B/nI enzim kesim bölgesi tanımlanmıştır [29].

4q35 ve 10q26 D4F104S1 bölgeleri arasındaki yüksek seviyedeki dizi homolojisi iki lokus arasında interkromozomal değişimlerin meydana geldiğini düşündürmektedir. Bu subtelomerik değişimler süresince, tanımlanan tekrar dizileri (hem 4q35-derive B/nI dirençli D4Z4 tekrarları, veya 10q26- kaynaklı B/nI duyarlı tekrarlar) bir kromozomal lokasyondan diğerine transfer olmaktadır.

Bu boyutlara sahip genomik fragmentlerin içerdiği interkromozomal değişimler en iyi PFGE’de görülmektedir; bir çok çalışma, çalışılan olguların çoğunda tekrar dizilerinin tamamının ‘transloke’ olduğunu göstermiştir[30-32]. Genetik materyalin mevcut fiziksel translokasyonu ve interkromozomal gen konversiyonunun daha akla yatkın bir mekanizma olarak görülebileceğine dair kesin kanıt olmadığı belirtilmektedir [33].

İlginç bir şekilde kromozomlar arası, bu dinamik subtelomerik bölge değişimlerinin, FSHD fenotipine sebep olmadığı görülmektedir [30]. 4q35 , 10q26 bölgelerinin subtelomerik değişimlerinin normal bireylerde de %20 oranında olarak görülmesi, bu subtelomerik değişimlerin FSHD’ye yol açmadığını desteklemektedir [22]. Ayrıca bu subtelomerik değişimlerin altında yatan moleküler mekanizmalar hala aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

2.3. Somatik Mozaikizm

Embriyonik hayatın erken evresinde hem somatik hücrelerde hem de germ hücrelerinde çeşitli derecelerde somatik mutasyon oluşmaktadır. Gonozomal mozaik bireyler etkilenmiş çocuk sahibi olabilme riski altındadır. Çoğunlukla yeni bir mutasyon ilk olarak mozaik formda görülmekte, genellikle klinik olarak normal görünümde olan birey, yapısal olarak etkilenmiş çocuk sahibi olabilmektedir. FSHD hastalığında da somatik mozaikizm bildirilmiştir [34, 35]. Van der Maarel *et al.* (2000) *de novo* FSHD aileleriyle yaptığı çalışmada %14 etkilenmemiş ebeveyn ve %26 *de novo* FSHD olgusu olmak üzere, bireylerin %40’ında somatik mozaikizmi tanımlamıştır. İlginç bir şekilde, bu çalışmada somatik mozaikizm belirlenmiş FSHD tanılı erkeklerin kadınlara oranla daha fazla olduğu vurgulanmıştır [36].

2.4. Genotip/Fenotip İlişkisi

D4F104S1 alellerinin boyutlarındaki farklılıkla FSHD hastalığının ekspresyon şiddetinin bağlantısı olabileceğine yönelik hipotezler doğrultusunda; çok sayıda etnik grupta, EcoRI fragmentinin boyutu ile hastalığın başlama yaşı (daha kısa EcoRI fragmentleri hastalığın daha şiddetli formlarıyla ilişkili olması) arasındaki ilişki gösterilmiştir [37-40]. Çocukluk çağında teşhis edilen olgularda D4F104S1 EcoRI

fragment boyut aralığı genel olarak 10-18 kb iken, ergenlik çağda 18-34 kb arasında, daha geç yaşta başlayan olgularda ise 30 kb'den fazla olduğu gösterilmiştir [37].

İki Japonya kaynaklı çalışma bu gözlemleri doğrulamaktadır, çoğu bireyde çok erken devrede hastalığın şiddetli formuyla ortaya çıkan FSHD'ye, çoğunlukla epilepsi ve mental retardasyon da eşlik etmektedir, kısa *EcoRI/BlnI* fragmentlerinin en kısasının uzunluğu 10 kb olarak belirtilmiştir [41, 42]. Borderline denilen 8-14 D4Z4 tekrarları içeren bireylerde genotiple fenotip arasında net bir korelasyon yoktur [43], bu bireylerde aynı tekrar sayısına sahip bazı bireyler etkilenmişken, bazılarında hastalığa dair herhangi bir bulgu yoktur.

Bu hastalıkta , aile içi veya aileler arası olası hastalık ekspresyonlarının yüksek derecede çeşitlilik göstermesine karşın bir ailenin tüm etkilenmiş bireyleri aynı boyutta D4F104S1 alleli sergileyebilmektedir. Örneğin tipik üç jenerasyon bir FSHD ailesinde klinik görüntüye bakıldığında, aynı ailede etkilenmiş bireyler arasında klinik çeşitlilik spektrumu gözle görülebilmektedir. Bu ailede, baba orta derecede etkilenmişken, büyükbaba sadece çok hafif etkilenmiştir. Proband olan en büyük torun en şiddetli etkilenen birey, 10 yaşında tekerlekli sandalyeye bağımlı duruma gelmiştir. Bu ailede moleküler analiz yapıldığında *EcoRI/BlnI* fragmenti, her üç etkilenmiş bireyde de aynı boyuttadır [44]. Bu durum fragment boyutuna ek olarak, mozaizizimin de hastalığın şiddetine anlamlı derecede katkısının olabileceği ile açıklanabilmektedir.

D4Z4 ve klinik şiddet arasındaki korelasyon, multiprotein kompleksinin (YY1, HMGB2, nükleolin) D4Z4'e bağlandığının ve 4q35'de lokalize olan *FRG1*, *FRG2* ve *ANT1* genlerinin ekspresyon seviyesini düşürdüğüne bulunmasıyla desteklenmiştir. D4Z4 delesyonu sonucunda bu genlerin patolojik overekspresyonu [45] ortaya çıkmaktadır. Daha da fazlası, overekspresyon seviyesi hem in vivo hem in vitro da D4Z4 tekrarlarıyla ters orantılıdır, bu da FSHD fenotipinin ortaya çıkışında, D4Z4 tekrar sayısının transkripsiyonel misregulasyonunu düzenlemek için kritik olduğuna işaret eder [45].

2.5. Cinsiyet Etkisi

FSHD'de hastalık sürecinin hızına ve hastalığın derecesinde, cinsiyet-spesifik bir etki olduğu görülmektedir. Hastalığın başlama yaşı, hastalığın daha ılımlı formunu gösteren dişi bireylerde daimi olarak daha geç zamandadır [46-48]. Erkeklerde genellikle ikinci dekattan, dişilerde ise üçüncü dekattan sonra hastalık gelişmeye başlamaktadır. Dişi bireyde salınan hormonların bir şekilde koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu görüşle paralel olarak, menopoza takiben dişi hastalarda hastalık süreci belirgin olarak hızlanmaktadır, bu zamanlarda kas gücünde genel olarak bir azalma görülmeye başlanmaktadır [49].

2.6. Moleküler Teşhis

FSHD hastalığının teşhisinde 4q35 bölgesinde polimorfik D4Z4 tekrarlarının kısmi delesyonunun gösterilmesi için yapılan, *EcoRI*-kesimli DNA'da, p13E-11 probunun hibridizasyonu sağlanarak gösterilmesi ve *EcoRI/BlnI* kullanılarak

yapılan çift kesimlerin FSHD'nin yüksek oranda kesin teşhisini sağlamasına rağmen, 4q35 ve 10q26 kromozom bölgelerinin yüksek homolojisi ve interkromozomal değişimlerinin dinamik kompleksi karmaşıklık yaratmıştır [30]. Daha sonradan 4q35 ve 10q26 bölgelerinden köken alan D4Z4 tekrar birimlerini içeren hibrit dizilerin oluşturulması sonucunda subtelomerik değişimler gösterilerek teşhisteki karmaşıklık azaltılmıştır [31]. FSHD'li olguların %5'inin moleküler teşhisinde subtelomerik değişimler sorunlara yol açabilmektedir [30, 50]. İlave bir restriksiyon enziminin (*XapI*) bulunması FSHD'nin moleküler olarak kesin teşhisini %98'e kadar yükseltmiştir.

Bunların dışında:

1. FSHD ailelerindeki lokus heterojenliği,
2. Kompleks hastalık mekanizması: Bazı FSHD hastalarının, hastalıkla ilişkili kısa D4F104S1 *EcoRI/BlnI* allelini göstermemesi,
3. Somatik ve germline mozaizmin yüksek insidansı da FSHD'nin karmaşık moleküler teşhisini güçleştirmektedir.

Son yıllarda FSHD'nin %98 doğrulukla moleküler teşhisine rağmen, kullanılan yöntemin halen Southern blot analizinin kullanımına dayalı olması nedeniyle bu teşhis mekanizmasının temelini geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Teknolojik avantajlarla birlikte PCR tabanlı moleküler analizlerle sonuç alınabilmesine rağmen, yüksek çözünürlüğün sağlanamaması ve 4-5 fragmentin üzerindeki fragmentlerin ayırt edilememesi nedeniyle Southern blot yöntemi tercih edilmektedir. Yine de PFGE'nin kullanımını gerektirmeyecek yüksek çözünürlüğü sağlayabilecek basit güvenilir bir teste acil ihtiyaç vardır.

FSHD hastalarında mutant genotipiyle klinik fenotip arasındaki ilişki daha önceden rapor edilmesine. ve tüm etkilenmiş aile üyelerinde D4F104S1 alelinin aynı şekilde delesyonunun varlığına rağmen, halen yüksek interfamilyal çeşitliliğe sahip herhangi bir FSHD tanılı bireyde hastalık şiddetini tahmin etmenin imkanı yoktur.

2.7. Kas Biyokimyası ve Fizyolojisi

FSHD kas dokusuyla ilişkili bir çok çalışma yapılmaktadır. FSHD kası sarkolemmasının organizasyonun değiştiği ve kontraktıl aparatların temelini oluşturan bu bağlantıların sıkışıklığı hastalarda gösterilmiştir. Buna ek olarak FSHD myoblastlarının oksidatif strese duyarlı hale geldiği de belirlenmiştir [6, 51, 52]

Myoblastlar süperoksit anyon jeneratörü olan parakuat'ın (bitki öldürücü ilaç) değişik konsantrasyonları kullanılarak oksidatif strese maruz bırakılmıştır [6, 53]. FSHD myoblastları düşük konsantrasyonda parakuat kullanıldığında kontrol myoblastlarına göre daha kolay dejenere olmuştur. İlaven, FSHD myoblastlarının bölünme kapasitesi ve morfolojik görünümü birbirleriyle benzer özellik göstermektedir.

2.8. FSHD Geni Araştırmaları

D4F104S1 lokus delesyonları ve hastalık ekspresyonu arasındaki yakın ilişkinin tanımlanmasının ardından, FSHD geninin hızlı bir şekilde tanımlanacağı ve karakterize edileceği düşünölmüştür. D4F104S1 delesyonlarının FSHD ile bir şekilde yakın ilişkide olmasına rağmen, FSHD'den sorumlu gen ya da genlerin tanımlanması ve lokalizasyonu hala belirsiz kalmıştır.

FSHD geni araştırmaları, tekrar dizilerinin proksimalinde lokalize olan genomik bölgeler üzerine odaklanmaktadır. Kapsamlı dizi analizleri ve bu genomik bölgeye, veri tabanı arama araçları olan BLAST (basic local alignment search tool) uygulaması, ekspresse sekans tag (EST)' veritabanı ekranında herhangi bir ekspresse sekans tanımlanırsa, olası genleri ve lokalizasyonlarını araştırmayı üstlenmektedir.

Bu genomik bölge: (i) zengin tekrar eden dizi ve (ii) pek çok lokusa homolog tüm genom boyunca dağılmış, birçok sayıda gen-benzeri dizileri içermekte bu nedenle pseudogenleri temsil ediyor olarak görölmektedir [54]. 4q35 bölgesinin yüksek tekrarlı dizi içerişiyor olması, olası FSHD aday geni için araştırmaları ciddi şekilde güçleştirmektedir; özellikle cDNA seğıilimi gibi birçok hibridizasyon-tabanlı gen tanım metodlarının kullanılması için tek-kopya DNA problemlerinin tanımlanması gerekli olduğundan dolayı daha da zordur. FSHD bölgesinin 4q telomerine çok yakın olması muhtemelen, birçok klonlama çalışmalarını engellemektedir; benzer subtelomerik bölgelerin çok az fonksiyonel gen içerdiği bilinmektedir. Başka olası problem FSHD geninin, gelişme evresinin bazı spesifik noktalarında normal olarak fonksiyon gösteriyor olabileceğidir; gelişim evrelerine spesifik genler, geğıici olarak ekspresse edilebilmekte ve sonrasında sadece belli dokularda ekspresse olmaları nedeni ile bu genlerin klonlanma çalışmaları sonuçsuz kalmaktadır.

Bütün bu gen belirlemedeki girişimlerin sonucunda 4q35'te D4Z4 tekrarının *DUX4* (*Double Homeobox 4*) genini içerdiği gösterilmiştir [55]. *DUX4* proteininin FSHD hastalarının myoblastlarında ekspresse olduğu, fakat normal kaslarda ekspresse olmadığı gösterilmiştir [56, 57]. Aynı zamanda D4Z4 lokusunun 50 kb sentromerinde lokalize, 3.3 kb lik D4Z4 tekrar ailesinin üyesi olan kesik ve ters dönmüş *DUX4* ile benzer diziyeye sahip *DUX4C* geni de tanımlanmıştır [58].

2.9. *Double Homeobox 4 (DUX4)* Geni

4 numaralı kromozomun q35 tekrar dizisi içinde lokalize olan *DUX4* geninin; tekrar dizisi ve açık okuma çerçevesi (ORF) tüm memelilerde korunmuştur. *DUX4* açık adından anlaşıldığı gibi iki homeobox içerir, yani DNA'ya bağlanabilir ve transkripsiyon faktörü olarak hareket edebilir.

DUX4'ün kodladığı proteininin simetri oluşumunda büyük görevi olduğu bilinen *PITX1*'in transripsiyonel aktivatörü olduğu bildirilmiştir [59]. *DUX4*'ün testislerde güçlü bir şekilde ekspresse olması, büyük ihtimalle germ hücrelerinde ekspresse edildiğini düşöndürmektedir. Double Homeobox ailesinin diğer üyeleri çoklu intron

içerirken, *DUX4* geni tek ekzon içerir, bu da *DUX4*'ün intron içeren *DUX4* geninin retrotranspose mRNA'sı olarak genoma entegre olduğunu göstermektedir.

Normal gelişimde veya hastalıkta *DUX4* geninin mRNA'sının ekspresyonunun tanımlanmasında ilk girişimler başarısız olmuştur. Başlangıçta sadece FSHD kas örneklerinde *DUX4* mRNA'sı bulunmuş, *DUX4* mRNA'nın poliadenilasyon bölgesi en son D4Z4 tekrarının hemen telomerik bölgesinde haritalanmıştır. Bölge D4Z4 tekrarı ve komşu dizileri içeren ve pLAM-1 denilen faj klonundan klonlanmıştır [27].

D4Z4 dizisinin kısalmasının *DUX4* retrogeninin transkripsiyonu sonucu oluşabileceği fikri ortaya atılmıştır [59], fakat elde edilebilen *DUX4* mRNA'nın miktarının ve proteinin çok az olması bu konudaki çalışmaları yavaşlatmıştır.

Sonraki bir çalışmada bunlara ek olarak; hem FSHD hem normal bireylerin kaslarında D4Z4 ve *DUX4* transkriptleri ve her ikisi de tanımlanmıştır. D4Z4 bölgesi boyunca hem sense hem antisense transkriptlerinde rastgele RNA priming tanımlanmıştır [60].

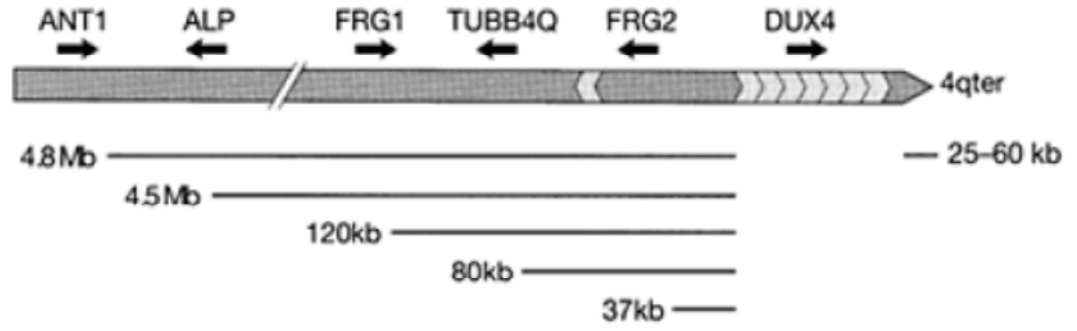
Transkript miktarlarının az olması ile siRNA veya miRNA boyutlu fragmentlerin varlığı birbiri ile korelasyon gösterir ve bu çift yönlü transkriptler ve small RNA'lar bu bölgenin heterokromatin supresyonuna katkıda bulunmaktadır. pLAM-1 adenilasyon bölgesi kullanılarak, çok sayıda *DUX4* poliadenile mRNA'sı tanımlanmıştır, fakat bu *DUX4* transkriptlerinin miktarı da oldukça az bulunmuştur [61].

Yapılan çalışmalarda yüksek *DUX4* ekspresyon seviyesinin kas hücrelerinde ve diğer hücre tiplerinde oldukça patolojik olduğu kanıtlanmıştır [61, 62], bu nedenle FSHD hastalığında normal zamanda ekspresyonu görülmeyen *DUX4* eksprese olursa, oluşan kas patolojisinden sorumlu tutulabilecektir.

Bu bulgular *DUX4* geninin fonksiyonu ve ekspresyon fazlalığında oluşan toksik etkisi nedeni ile FSHD hastalığına sebep olan esas genin *DUX4* olduğunu düşündürmektedir [63].

2.10. FSHD Aday Genleri

Bütün birbirinden farklı gen tanımlama stratejileri başlangıç olarak, olası ve FSHD hastalığının teşhisinde en umut verici genler olarak dört farklı geni işaret etmektedir. Gen içeriği fakir olan FSHD bölgesi içinde, aday genler (*DUX4*'den uzak) ; *FRG1*, *TUBB4Q*, *ANT1* ve *FRG2* olarak adlandırılmıştır. (Bkz. Şekil 2.2.)



Şekil2.2. 4q35'te FSHD bölgesinde çalışılmış aday genlerin lokalizasyonları.

2.10.1. *FSHD Region Gene 1 (FRG1)*'in Tanımlanması

FRG1 (FSHD region gene 1)'in, evrim boyunca korunduğu, RNA prosesinde rol aldığı ve normal düzeylerde eksprese edildiğinde kas gelişimini ve rejenerasyonunu sağladığı bilinmektedir [52, 64]. FSHD hastalarında FRG1'in kas spesifik upregülasyonu ve D4Z4 tekrarına yakın pozisyonu (120 kb), FRG1'i aday gen yapmaktadır. FRG1 geninin 10 numaralı kromozomda olmaması belki hastalığın 4 numaralı kromozoma spesifitesini açıklayabilir. Pozisyon etkileri sonucunda olduğu şüphelenilen bir çok insanda görülen hastalığa ait 4q35 bölgesi transkripsiyonel regülasyonda rol oynayan yüksek derecede korunmuş proteinler içermektedir. Transkripsiyonel stokiyometrinin bu proteinler için mutlak gerekli olduğu hipotezi kurulmuştur [65]. Bu görüş doğrultusunda, yüksek derecede korunmuş FRG1 proteininin RNA biyogenezindeki potansiyel pozisyon etkisi rolü nedeni ile FSHD hastalığında FRG1 geninin etkili bir aday gen olduğunu düşündürmektedir.

2.10.2. *Tubulin, beta Polypeptide 4, Member Q (TUBB4q)*

TUBB4q bir çok kromozomda kopyası bulunan geniş bir aile olan β -tübülün ailesine mensup olup hücre iskeletinde önemli rol oynamaktadır. PCR ve dizi analizleri sonucunda 1,9,12,16,18 numaralı kromozomlarda ve Y kromozomunda *TUBB4q* geni ilişkili dizi gösterilmiştir [66]. Bir çok fonksiyonel olmayan β -tübülün homologları, intronca yoksun pseudogenler olarak tanımlanmıştır [Lee *et al.*, 1983]. *TUBB4q*'de muhtemelen bir pseudogendir çünkü; kodlanmış bölgelerde bile yüksek alelik sekans çeşitliliği gösterilmiştir. En önemli değişim başlangıç kodonu olan metiyoninin treonin ile yer değiştirmiş olmasıdır [66]. Buna ek olarak Real Time PCR (RT-PCR)'a dayalı yoğun çalışmalarda herhangi bir dokuda ekspresyonunun tanımlanmasındaki başarısızlıklar [66], *TUBB4q*'nın pseudogen olduğunu düşündürmektedir. Yine de D4Z4 tekrarlarının azalmasına ek olarak lokal kromatin konformasyonunun değişmesi, *TUBB4q*'un ektopik olarak eksprese edildiğini düşündürmektedir. Bunun sonucu olarak, fonksiyonel olmayan mutasyonlu protein β -tübülün, ailesinin fonksiyonel üyeleri üzerinde dominant negatif etki

yaratabilmekte ve böylece fonksiyonunu engelleyebilmektedir. Bu durum *TUBB4q*'yu FSHD için ideal gen olarak düşündürmektedir.

2.10.3. FSHD Region Gene 2 (FRG 2)

FRG2, D4Z4 tekrarının sadece 37 kb proksimalinde lokalizedir. Yeniden düzenlenme bölgesine yakın lokalize genlerin transkripsiyonel regülasyonunun daha uzaktaki genlerden daha etkili olduğu rapor edilmiştir [67]. İkinci olarak, farklılaşmış myoblastlarda ve kas biyopsilerinde FRG2'nin transkripsiyonel upregülasyonu, hastalıkla ilişkili olduğunu ve kas dokusuna spesifik rolü olduğunu düşündürmektedir.

En son olarak miyogenezden sonra kas farklılaşmasında önemli rolü olan MyoD proteininin, ekspresyonunu indüklemesi FRG2'nin kas rejenerasyonunda rolü olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, iki FSHD ailesinde Lemmers ve arkadaşları D4Z4 tekrarının proksimal bölgesinde FRG2 geninin tamamıyla delesyona uğradığını göstermişlerdir [68]. Bu ailelerden birinde, sağlıklı baba normal D4Z4 tekrarı içermekteyken, FRG2'nin delesyonuna bağlı olarak bir kopya FRG2 içermektedir. FSHD hastası oğlunda ise, D4Z4 tekrarlarını da içeren daha geniş bir delesyon gözlenmektedir. İkinci ailede de sağlıklı bireylerde FRG2 ve D4Z4'ün tam delesyonu olmasına rağmen klinik olarak normal fenotipe sahip olmalarıyla etkilenmiş bireylerden belirgin bir şekilde ayrılmaktadırlar. Bu sonuçlar FRG2'nin FSHD patogeneziindeki potansiyel rolü olduğu yönündeki görüşlerle çelişmektedir.

2.10.4. Adenin Nukleotit Translokator (SLC25A4 ,ANT1)

ANT1 mitokondrial bir protein olup, 893 bp uzunluğunda 4 ekzon transkriptinden kodlanmaktadır. *ANT1* geni D4Z4'ün 5 mb proksimalinde lokalizedir ve iskelet kası, beyin ve kalp gibi postmitotik hücrelerde eksprese olmaktadır [69, 70]. 4q35 bölgesinde haritalanan *ANT1* geni [71], bu iskelet kas hücrelerindeki fonksiyonu ve ekspresyonundan dolayı, FSHD hastalığı için aday bir gen haline gelmiştir. Tanımlanan iki FSHD olgusundan biri mitokondrial miyopati ve hepatomegali ile birlikte seyreden FSHD hastasıdır ve mitokondrial solunum zinciri üzerinde complex III defekti de belirlenmiştir [72, 73]. Daha sonra ANT1'in sekans analizinde hastalar ve kontroller arasında bir fark görülmemiştir [74]. ANT1 regülasyonu; "FSHD pozisyon etkisiyle oluşmaktadır" hipoteziyle doğru orantılı olarak FSHD kasında upregülasyonunun gösterilmesiyle kanıtlanmıştır [45].

Diğer yanda, ANT'nin transkripsiyonel up-regülasyonu, mitokondrial fonksiyonu ve iskelet kas hücrelerindeki ekspresyonu *ANT1* 'in FSHD için aday gen olabileceğini düşündürmektedir. ANT1'in overekspresyonu, mitokondrinin ana bileşeni olan PTPC'nin(permeability transition pore complex) bir parçası olması apoptotik işlemlerde artışa neden olduğunu düşündürmektedir. Yine de, FSHD kası DMD kası ile karşılaştırıldığında subsarkolemmada sadece çok küçük seviyelerde apoptotik hücreler ve heterojen kaspaz 3 aktivitesi gözlemlenmiştir [75]. Buna ek olarak, FSHD hastalarında klinik fenotiple, apoptotik hücre sayısı arasında bir

korelasyon bulunmaması bu hastalık için programlanmış hücre ölümünün hastalık için ilerde belirgin bir sonuç vermeyeceğine işaret etmektedir. Bu sonuçlar ve ANT1 ile D4Z4 tekrarı (5 mb) arasındaki uzun mesafe, *ANT1* 'in FSHD hastalığı için aday gen olabilme ihtimalini zorlaştırmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı tarafından Fasioskapulohumeral Musküler Distrofi ön tanısı ile moleküler analiz için Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na gönderilen 14 hastanın kanlarından DNA'ları izole edildikten sonra Leiden Üniversitesi Tıbbi Merkez'de radyoaktif işaretli prob kullanılarak Southern blot yöntemi uygulandı. Bu çalışmaya 14 FSHD tanısı alan hastalar dışında, ailesinde FSHD öyküsü olmayan 2 kontrol ve ailesinde FSHD öyküsü olan fakat klinik olarak normal olan 1 kontrol olmak üzere toplam 3 birey de dahil edildi.

3.1. Periferal Kandan DNA izolasyonu

FSHD ön tanısı ile gönderilen her olgudan 10 ml periferal kan örnekleri alınıp K₃EDTA'lı tüplere konulduktan sonra, tuzla çöktürme (salting-out) yöntemi ile DNA izolasyonları gerçekleştirildi.

3.1.1. Kullanılan Solüsyonlar

Lizis Tampon:

155mM NH₄Cl (Sigma)

10mM KHCO₃ (Sigma)

0.5 M EDTA (Sigma)

1000 ml lizis tamponu hazırlamak için, 8.28 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃ ve 4 ml 0.5M EDTA distile suda çözüldü. Solüsyon otoklavda steril edildi.

EDTA (0.5M, pH: 7.4):

18.61 g EDTA (Sigma) üzerine 80 ml distile su eklenip NaOH (Merck) kullanılarak, EDTA çözüldükten sonra, asetik asit ile pH 7.4'e ayarlandı ve otoklavda steril edildi.

WBL (White Blood Lysis) Tamponu:

4 M NaCl (Merck)

0.5 M EDTA (Sigma)

4 M NaCl solüsyonu hazırlamak için, 23.4 g NaCl 100 ml distile suda çözüldü. 100 ml WBL tamponu hazırlamak için, 4 M NaCl'den 2.5 ml, 0.5 M EDTA'dan 5ml alınarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Solüsyonu (%10'luk):

10 g SDS (Boehringer Mannheim) tartılarak, 100ml steril distile suda çözüldükten sonra 0.22 µm filtre'den (Costar) geçirildi.

Proteinaz K Solüsyonu (10 mg/ml):

100 mg Proteinaz K (Boehringer Mannheim) 10 ml Tris-HCl (1mM pH 7.5)'da çözüldü.

AmAc (Amonyum Asetat) Solüsyonu (9.5 M):

73.226 g AmAc (Sigma) tartılarak 30 ml steril distile suda çözüldü, tamamen çözüldükten sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.2. İşlemler

1. K3EDTA'lı tüpe (Venoject) 10ml periferik kan alındı.
2. K3EDTA'lı tüpe alınan 10 ml kan alt üste edilerek karıştırıldıktan sonra, 50 ml'lik steril santrifüj tüpüne (Cellstore) boşaltıldı.
3. Üzerine 1:3 oranında lizis tamponu eklendi, tüp vorteksde (Nüve) ve alt üste edilerek karıştırıldı.
4. 20 dakika, -20°C'de inkübe edildi.
5. 1500 rpm'de +4°C'de, 10 dakika soğutmalı santrifüjde (Sigma) santrifüj edildi.
6. Dökelti atıldı, çökelti önce elle vurularak, sonra da vortekste iyice homojenize edildi.
7. Üzerine 20 ml olacak şekilde lizis tamponu eklendi, vorteksde ve alt üste edilerek karıştırıldı.
8. 5 dakika, -20°C'de inkübe edildi.
9. 1500 rpm'de +4°C'de, 10 dakika santrifüj edildi.

10. Dökelti atıldı. Önce elle vurarak çökelti kaldırıldı, sonra vortekste karıştırılarak, üzerine 9,4 ml WBL tampon eklendi.
11. Karışıma 500 µl %10 SDS ve 100ul proteinaz K eklendi.
12. Kapağı kaldırılan tüp, parafilmle 37°C etüvde (Nüve) bir gece inkübe edildi.
13. İnkübasyon sonrası 1.0:3.7 oranında 3,7 ml 9.5 M AmAc eklendi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı.
14. 5000 rpm’de, 25°C’de 30 dakika santrifüj tüpüne alındı.
15. Üst faz yeni bir steril 50’ml lik santrifüj tüpüne alındı.
16. Üzerine 1:2 oranında %96’lık etanol eklenip, tüp alt üst edilerek DNA’nın çökmesi sağlandı.
17. DNA, içinde 500 µl, %70’lik etanol bulunan ependorf tüpüne alınarak 13000 rpm’de, 25°C’de 10 dakika santrifüj edildi.
18. Dökelti boşaltılıp, ependorf tüpün ağzı açık bırakılarak, 37°C’de etüve kondu ve alkol uçuruldu. Daha sonra, DNA 150-200 µl steril distile suda çözüldü. DNA’lar çalışılana kadar +4°C de saklandı.

3.1.3. DNA örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü

İzole edilen DNA’ların miktar ve saflık tayinini yapmak üzere, NanoDrop (Thermo) ile ölçümleri yapıldı. Ölçüm için örnekler 1/200 oranında sulandırıldı.

Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında örneklerin ölçümleri yapılarak DNA miktarları aşağıda belirtilen formül ile hesaplandı. Mini jel ile DNA’ların elektroforetik kontrolleri yapıldı.

$\text{DNA miktarı} = \text{Optik Dansite (O.D)} \times \text{Sulandırma Faktörü (S.F)} \times 50$
--

3.2. Enzim Kesimi

1. Tüp	2.Tüp	3.Tüp
3 µl B buffer (Roche)	3 µl Hor K buffer (Roche)	3 µl Y tango (Fermentas)
1 µl Spermidin (sigma)	1 µl Spermidin	1 µl Spermidin
1.5 µl EcoRI (Roche)	1.5 µl EcoRI	2 µl XapI
1.5 µl Hind III (Roche)	1.5 µl BlnI (Takara)	-----
23- x µl dH ₂ O	23- x µl dH ₂ O	24- x µl dH ₂ O
x µL DNA (5 µg)	x µL DNA (5 µg)	x µL DNA (5 µg)
Toplam: 30 µl	Toplam: 30 µl	Toplam: 30 µl

Her hasta için 3 tüp hazırlanarak, 1. tüpe EcoRI/Hind III ile 2. tüpe EcoRI/BlnI ve 3. tüpe XapI enzimi ve çift enzim kesimine uygun sırasıyla B, Hor K ve Y tango tampon solüsyonları, her tüpe su ve spermidin konularak toplam 30 µl'ye tamamlandı.

Reaksiyon hazırlandıktan sonra 37°C su banyosunda O/N bekletildi.

3.3. PFGE (Pulsed Field Gel Elektroforezi)

0.5 X TBE (Tris Borat EDTA):

0.5 X TBE hazırlamak için 10X TBE'den 250 ml alınıp bidistile su ile 5 litreye tamamlandı.

75 µl EtBr (10mg/ml) eklendi, karıştırmak için kaptan kaba aktarıldı.

Agaroz jel:

Yaklaşık %0.88'lik agaroz jel çözeltisi hazırlamak için 2.65 gr agaroz tartıldı (MP agaroz, Roche), 0.5 X TBE tamponundan 300 ml alınarak, çözelti berrak renk alana kadar kaynatılarak çözüldü, 70°C'ye kadar soğutuldu ve üzerine 4.5 µl EtBr solüsyonundan eklenerek karıştırıldı. Uygun tarak yerleştirildikten sonra, jel küvete boşaltıldı (20X20 cm). 4°C 'de yaklaşık 15 dakika polimerleşme için bırakıldı.

3.3.1. İşlemler

30 µl'lik kesim ürünlerinin üzerine 5x bromfenol mavi yükleme tamponu eklenerek kısa bir santrifüj edildi, daha sonra tamamı jele yüklendi. Kesim ürünlerinin jelde yürüdüğü mesafeyi belirlemek için 1. marker olarak λ HindIII digest marker yine yükleme tamponuyla karıştırılarak, 2. marker olarak Midrange PFGE Marker (50 µg/mL, NEB) ilk ve son kuyucuklara yüklendi.

Elektroforez:

Tanka 2.5 lt taze hazırlanan tampon konuldu. Jel elektroforez tankına (BioRad Chef II) yerleştirildikten sonra, jelin 1 cm kadar üstüne çıkacak şekilde biraz daha tampon eklendi. Başlangıç 1. dakikaya bitiş 20. dakikaya 21.5°C (10 saat 2 döngü) olacak şekilde ayarlandı. Voltaj 6.0'a program 9.5 'a ayarlandı. 1 saat sonra pompaj (tamponun geri dönüşümü için) için açma-kapama düğmesine basıldı.

3.4. Blotlama İşlemi

3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar

Denatürasyon Solüsyonu: 2M NaOH, 3M NaCl

80 g NaOH, 175 g NaCl tartılarak 5 litre suda çözülerek içeriği NaOH/NaCl, olan denatürasyon solüsyonu hazırlandı.

Tris solüsyonu: 0.5 M Tris-Hcl (Ph 7.5) , 3M NaCl

30.275 ml Tris ve 87.66 g NaCl tartılarak 400 ml bidistile suda çözüldükten sonra pH 7.5 a ayarlandı ve toplam hacim 500 ml 'ye tamamlandı.

10 X SSC: 1.5 M NaCl, 0.15 M Na-Sitrat

87.65 g Nacl ve 44.1 g Na-Sitrat tartılarak 1 litre suda çözüldü.

2X SSC: 10 X SSC'den 200 ml alındı, bidistile suyla 1 lt'ye tamamlandı.

3.4.2. İşlemler

1. İlk olarak jel denatürasyon solüsyonunda 2 defa 15'er dakika çalkalanarak bekletildi.
2. Pozitif yüklü naylon membran (Amersham Hybond, XL; charged nylon membran) jelin boyutuna uygun büyüklükte kesilip, jele paralel işaretlendi. İçinde distile su bulunan bir kaptan 1- 2 dakika bekletildikten sonra, denatürasyon tamponuna alındı.
3. Denatürasyon tamponunu jele taşıyan büyük bir kromotografi kağıdı (3MM Whatman) tanka uygun boyutta kesildi ve cam levha üzerine yerleştirildikten sonra, tank tamponla dolduruldu. Üstte kalan yüzeyin altında hava kalmaması, cam bagetle sürülerek sağlandı. Kromotografi kağıdının üzerine jelin kenarlarına uygun bir şekilde kesilmiş plastik saydam bir çerçevelik , jel, bunun üzerine ters gelecek şekilde kondu.
4. Jel üzerine sırasıyla naylon membran, bunun da üzerine naylon membranla aynı boyutta kesilmiş ilk iki denatürasyon tamponunda ıslatılmış kurutma kağıdı konulup hava kabarcıkları yine bagetle giderildi. Üçüncü kurutma kağıdı üstüne kuru bir şekilde konulup baget yardımıyla tam ortadan bir üste bir alta hafifçe sürülerek ıslanması sağlandı. Bunların da üzerine uygun boyutlarda katlanmış kağıt havlular yerleştirilip, üzerine çok ağır olmayacak şekilde bir ağırlık koyuldu.

5. Sistem bu haliyle 1 gece bekletildi: Süre sonunda, düzeneekten üstteki ağırlık ve kurutma kağıtları alındı. Naylon membran, DNA bulunan yüzeyi yukarı gelecek şekilde bir kurutma kağıdı üzerine alınıp, 1-2 dakika bekletildikten sonra DNA bulunan yüzeyi alta gelecek şekilde, 60 saniye kadar UV 'de DNA'nın sabitlenmesi için kroslink (Stratagene 1200) oluşması sağlandı.

3.5. Prehibridizasyon ve Hibridizasyon

3.5.1 Kullanılan Solüsyonlar

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Solüsyonu (%20'luk):

400 g SDS (Boehringer Mannheim) tartılarak, 2000 ml steril distile suda çözüldükten sonra 0.22 µm filtre'den (Costar) geçirildi.

Hibridizasyon solüsyonu:

Fosfat tamponu: 44.45 gram Na₂HPO₄ (Ph 7.2) tartılarak 500 ml 2 lt'lik beherde çözüldü, pH'sı fosforik asit eklenerek (%85, 2-3 ml) 7.2'ye ayarlandı.

Hazırlanan fosfat tamponuna : 100 ml NaCl (5M), 4ml 0.5 M EDTA (pH: 8.0), 700 ml %20 SDS solüsyonu, 200 g PEG-6000 (polietilen glikol 6000) eklendi ve distile su ile 2 litreye tamamlandı, su banyosunda 65°C'ye kadar ısıtıldı, PEG ve SDS çözümlene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

Megaprime Katoloğuna (Amersham) göre prob hazırlanması:

Lambda DNA Probu:

Megaprime kitinde bulunan kontrol amaçlı 4 µL lambda DNA (25 ng) , 2 µL primer ve 7.5 µL H₂O ile hazırlanan karışım 95°C de 5 dakika denatüre edildi, 5 dakika oda sıcaklığında tutuldu ve ardından kısa bir santrüfjü yapıldı. Denatüre DNA örneğine 1 µL Klenow, 4 µL 5X buffer, - 1.5 µL ³²PdCTP (6.5 µL) ve TE (Tris EDTA) eklenerek 500 µl 'ye tamamlandı.

3.5.2. İşlemler

Prehibridizasyon:

Fish sperm*(salmon sperm DNA, 100ug/ml) 95°C de 10 dakika denatüre edildikten sonra 100 ml fosfat tamponuna 1 ml konuldu. Hazırlanan hibridizasyon solüsyonunun 90 ml'si steril bir kaba konularak 65°C 'de ısıtıldıktan sonra (solüsyonun sıcaklığının hazır olması için), membran hibridizasyon solüsyonu içine konularak 1 saat 65°C de çalkalamalı su banyosunda tutuldu

Hibridizasyon:

1 saatlik prehibridizasyon sonrası kaptaki prehibridizasyon solüsyonu dökülüp yerine işaretli prob içeren hibridizasyon solüsyonu konuldu ve yine çalkalamalı su banyosunda 1 gece 65°C de inkübasyona bırakıldı.

Kullanılmış olan işaretli prob içeren Hibridizasyon solüsyonu -20°C de dondurularak saklandı ve gerektiğinde oda ısısında çözöldükten sonra, 75°C de 10 dakika denatüre edilip tekrar kullanıldı.

Yıkama:

2X yıkama solüsyonu: 2xSSC, 0.1% SDS

Daha önce hazırlanmış olan stok 2X SSC solüsyonunun 495 ml'sine %10'luk SDS solüsyonundan 5ml ekleyerek hazırlandı.

İşlemler:

Prob içeren hibridizasyon solüsyonu 16 saat inkübasyon sonrasında hibridizasyon tüpünden uzaklaştırıldıktan sonra, naylon membran, daha önce 65°C ye getirilmiş olan 50 ml 2X SSC yıkama solüsyonuyla 3 kez 8-10 dakika yıkandı.

Görüntüleme:

Phosphor imager (Bio-Rad) cihazına membran yerleştirildikten yaklaşık 2 saat sonra görüntü alındı.

BULGULAR

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı tarafından FSHD ön tanısı ile, laboratuvarımıza gönderilen 14 hastada, ailesinde FSHD'li olgu olan, fakat klinik olarak normal 2 birey ve ailesinde FSHD öyküsü olmayan ve klinik olarak normal 1 birey olmak üzere toplam 3 kontrol bireyde moleküler genetik çalışmalar yapılmıştır. 14 olgunun ve 3 kontrol bireyin DNA verimi ve miktar tayini sırasıyla tablo 4.1. ve 4.2. de görülmektedir.

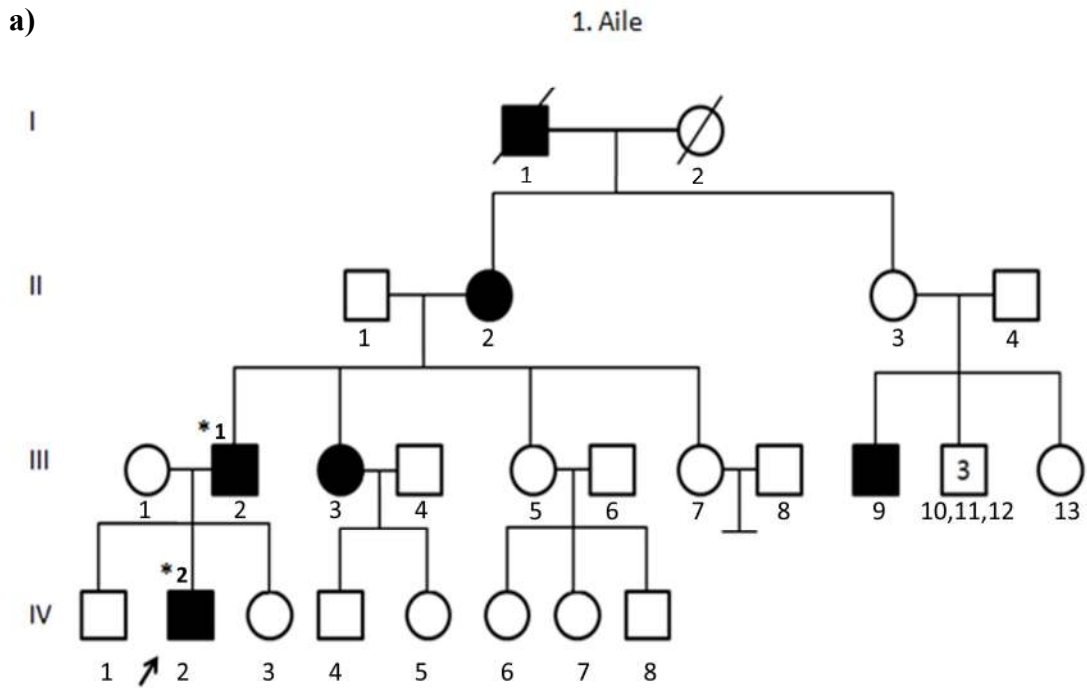
Tablo 4.1. 12 olgunun DNA Verimi ve Miktar Tayini

Olgular	OD260	OD280	OD260/280	Konsantrasyon
1	0.111	0,068	1,63	1110 µg/ml
2	0,062	0,037	1,67	620 µg/ml
3	0,111	0,063	1,76	1111 µg/ml
4	0,056	0,029	1,93	562 µg/ml
5	0,047	0,028	1,67	480 µg/ml
6	0,027	0,015	1,8	272 µg/ml
7	0,048	0,031	1,54	481 µg/ml
8	0,058	0,036	1,61	580 µg/ml
9	0,186	0,103	1,81	1860 µg/ml
10	0,111	0,071	1,56	1110 µg/ml
11	0,133	0,076	1,75	1330 µg/ml
12	0,122	0,074	1,64	1220 µg/ml
13	0,054	0,032	1,68	542 µg/ml
14	0.0142	0.084	1.69	1420 µg/ml

Tablo 4.2. Kontrollerin DNA Verimi ve Miktar Tayini

Olgular	OD260	OD280	OD260/280	Konsantrasyon
1	0.123	0.072	1.71	1230 µg/ml
2	0.035	0.021	1.67	350 µg/ml
3	0.368	0.202	1.82	3680 µg/ml

Çalışmaya dahil edilen olgular da cinsiyet ayrımı yoktur. Olgular 5 ile 70 yaş arasında olup hepsinde aile öyküsü vardır. (Bkz. Tablo 4.3). Olgular toplam 4 aileden gelmektedirler: 1. aileden çalışmaya 2 olgu, 2. aileden toplam 5 olgu, 3. aileden 2 olgu 4. aileden 5 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Ailelerin soy ağaçları şekilde gösterilmiştir. (Bkz Şek. 4.1).

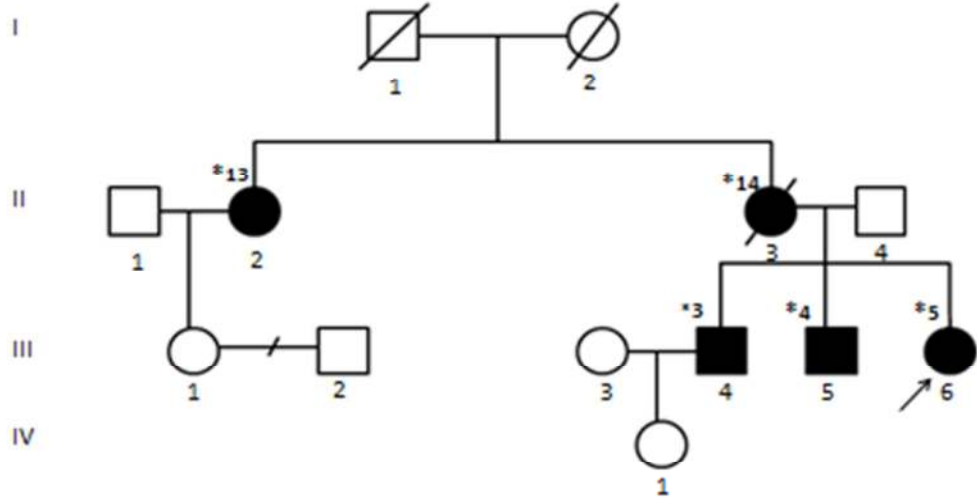


Şekil 4.1. Çalışmaya Katılan Ailelerin Pedigrileri, a) 1. ailenin pedigrisi

* Olguların çalışma numarasını göstermektedir.

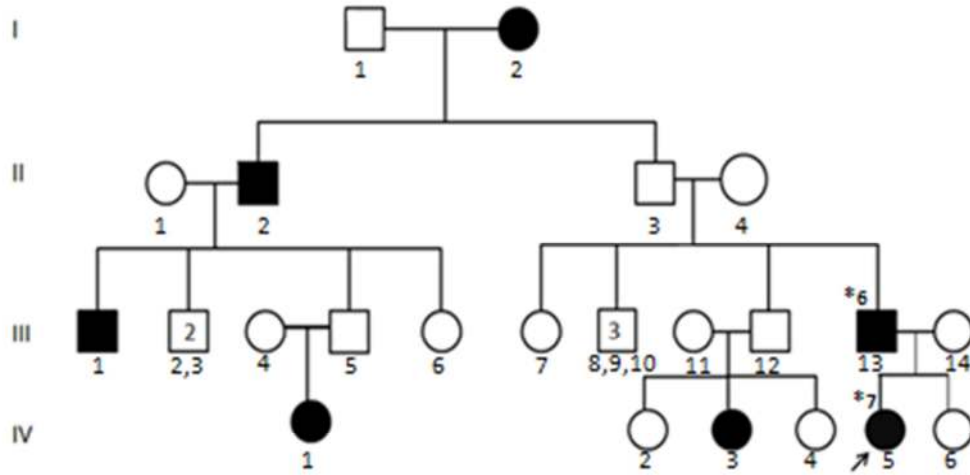
b)

2. Aile



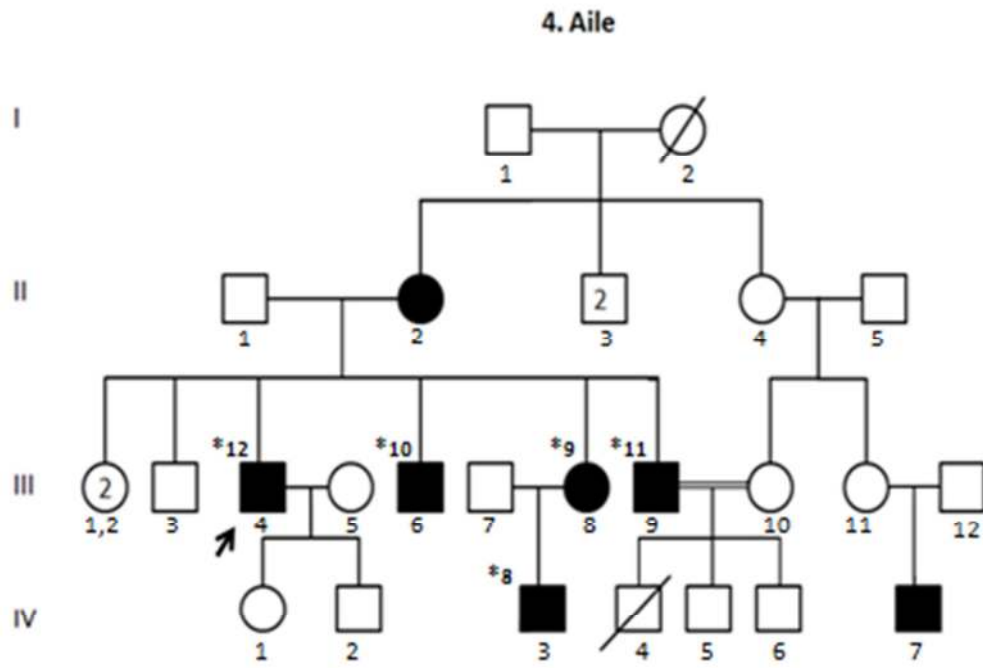
c)

3. Aile



b,c) 2. ve 3. ailelerin pedigrileri

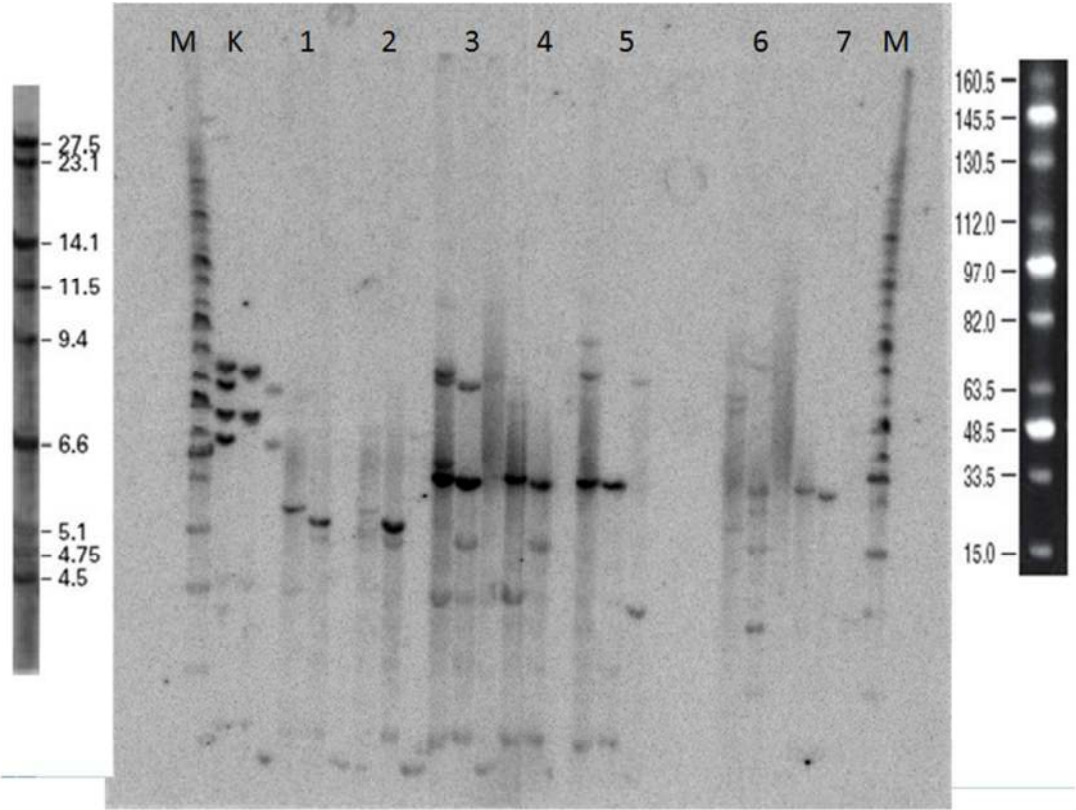
d)



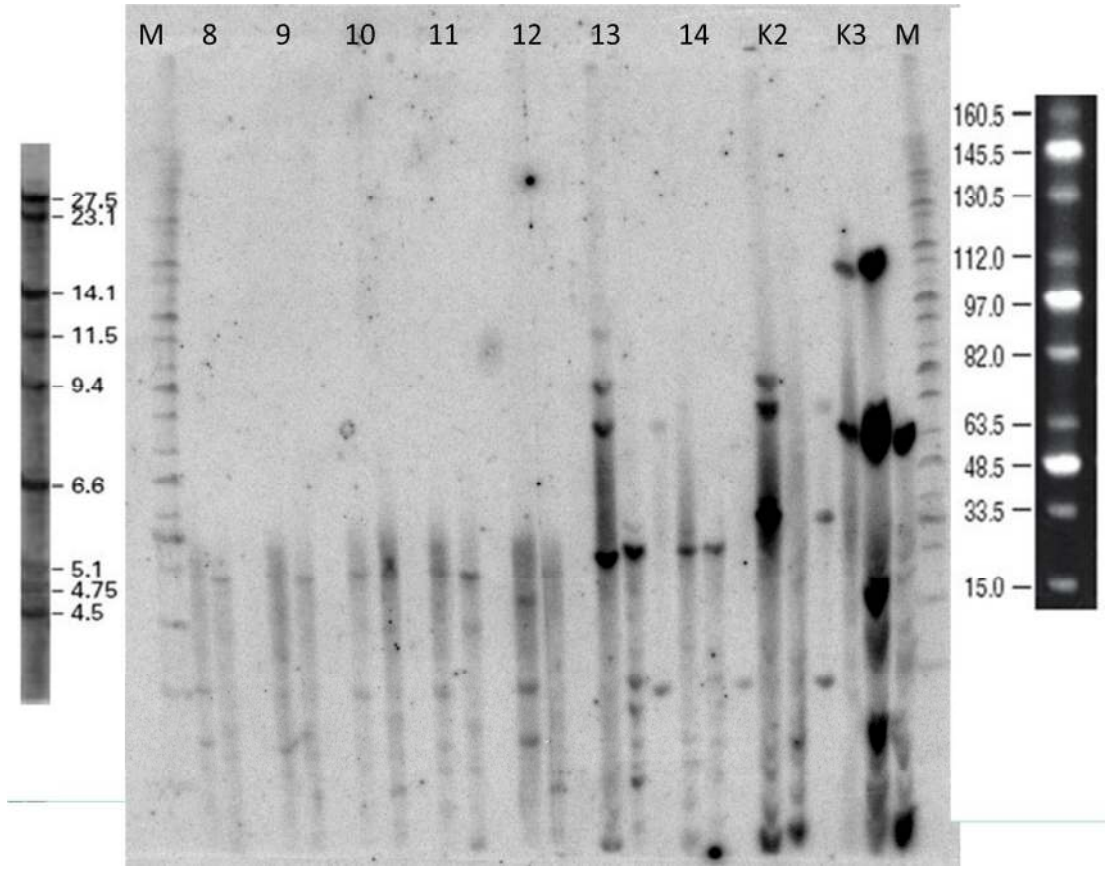
d) 4. ailenin pedigrisi.

SONUÇLAR

14 olgunun moleküler genetik çalışma sonucu elde edilen ve D4Z4 tekrar sayısını yansıtan bantlar. (Bkz. Şekil 5.1., Şekil 5.2.)



Şekil 5.1. 1,2,3,4,5,6, 7 nolu olguların ve 1 nolu kontrolün otoradyografi sonrası D4Z4 tekrarlarını yansıtan bant profili. M(sol); Marker (Marker Hind III),M(sağ); Marker (Mind Range Marker) K; Normal Kontrol



Şekil 5.2. 8,9,10,11,12,13 ve14 nolu olguların otoradyografi sonrası D4Z4 tekrar sayısını yansıtan band profili. M1; Marker (Marker Hind III), M2; Marker (Mind Range Marker) K2,K3: Normal Kontrol

5.1. Olguların D4Z4 Tekrarlarının Değerlendirilmesi

Beklenildiği gibi hem aile öyküsü olan hem de FSHD olarak ön tanı almış olgularda klinik özellikleriyle paralel olarak D4Z4 tekrarları hastalığın belirteci olan 1-11 tekrar aralığındadır (Bkz. Tablo 5.1). 1. aileden olan ilk iki olgunun bant uzunluğu yaklaşık 18 kb ($\approx 4-5$ bant), 2. aileden olan 3. 4. 5. ve 13. 14. olguların bant uzunluğu yaklaşık 30 kb ($\approx 7-8$), 3. aileden 6. ve 7. olguların bant uzunluğu yaklaşık 26 kb ($\approx 6-7$) ve 4. aileden 8. 9. 10. 11. ve 12. olguların bant uzunluğu yaklaşık 25 kb (≈ 6)'dir. Kontrollerde ise 1. kontrolde 49 kb ($\approx 14-15$), 2. kontrolde yaklaşık 65 kb ($\approx 19-20$), 3. kontrolde ise yaklaşık 72 kb ($\approx 21-22$) bant uzunluğu vardır. (Bak. Tablo 5.2)

Tablo 5.1. 14 FSHD'li Olgunun Klinik ve Moleküler Genetik Verileri

Aile No	No	Cinsiyet/ Yaş	Ön Tanı	Aile Öyküsü	Başlangıç Yaşı	Yüz , Kol, Omuz, Bacak Kası Tutulumu	Yaklaşık Tekrar Sayısı
1	1	E/50	FSHD	+	13	Y,K,O	4-5
	2	E/17	FSHD	+	13	Y,K,O	4-5
2	3	E/51	FSHD	+	13	Y,K,O,B*	7-8
	4	E/48	FSHD	+	18	Y,K,O,B	7-8
	5	K/47	FSHD	+	46	Y,K,O,B	7-8
	13	K/70	FSHD	+	60	Y,K,O,B	7-8
	14	K/62	FSHD	+	58	Y,K,O,B	7-8
3	6	E/51	FSHD	+	13	Y,K,O	6-7
	7	K/13	FSHD	+	10	Y,K,O	6-7
4	8	E/5	-	+	3	Y	6
	9	K/25	FSHD	+	20	Y,K,O	6
	10	E/35	FSHD	+	18	Y,K,O,B	6
	11	E/31	FSHD	+	16	Y,K,O,B	6
	12	E/39	FSHD	+	18	Y,K,O,B	6

* Tekerlekli sandalyeye bağımlı

Tablo 5.2. 3 Kontrol Bireyin Klinik ve Moleküler Verileri

No	Cinsiyet/Yaş	Ön Tanı	Aile Öyküsü	Yaklaşık Tekrar sayısı
1	E/35	-	+	14-15
2	K/24	-	+	19-20
3	K/25	-	-	21-22

TARTIŞMA

Fasioskapulohumeral Musküler Distrofi (FSHD) otozomal dominant bir miyopati olup, genel olarak yüz, omuz ve üst kol kaslarını etkilemektedir. 1:20000 insidansla, Duchenne ve Myotonik Distrofi'den sonra en çok karşılaşılan kalıtsal nöromusküler hastalıktır [33, 76].

FSHD hastalığı (FSHD1A, FSHD1), 4 numaralı kromozomun q35 bölgesindeki polimorfik D4Z4 makrosatellitlerinin tekrarlarındaki delesyonlarla karakterizedir [77]. Normal bireyler 11 ile 100 (35-300 kb) arasında, FSHD hastaları ise 1 ile 11 (10-35 kb) D4Z4 ardışık tekrar dizilerine sahiptirler.

FSHD tanılı olgularda D4Z4 tekrar dizilerinde meydana gelen delesyonların moleküler teşhisinde, PCR ve Southern Blot yöntemleri kullanılmaktadır. PCR yöntemi bu hastalığın tanısı için kolay bir yöntemdir, ayrıca kısa zamanda sonuç alınması, nonradyoaktif bir yöntem olması ve az miktarda DNA gerektirmesi Southern blot yöntemine göre avantaj olarak gözükmektedir. Klasik PCR yönteminin dezavantajı ise kısa fragmentler için yüksek çözünürlüğü sağlayamaması ve FSHD bölgesinin yüksek oranda GC içeriği sebebiyle bölgenin sekonder yapısından kaynaklanan denatürasyon problemleridir. Bu bölgenin ileri derecedeki sekonder yapısının daha gevşek yapı kazanmasına yardımcı olmak için denatürasyon sıcaklığının yükseltilmesi, DMSO, Gliserol kullanımıyla bölgenin daha iyi denatüre olması sağlanmaya çalışılmış ve reaksiyon sırasında enzim eklenmesiyle enzim aktivitesinin reaksiyon boyunca korunması sağlanarak fragmentlerin daha iyi gözükebileceği düşünülmüştür; fakat yapılan Long PCR çalışmalarında 5 fragmentin altında olan hastalar için teşhis sağlarken, 5 fragmentin üstünde başarılı olunamamaktadır. Ayrıca proteinlerin ve tuzların iyi uzaklaştırılamamasından kaynaklanan düşük kaliteli DNA, PCR amplifikasyonu için uygun olmamakta ve yanlış sonuç elde edilebilmektedir [9, 78]. Southern blot yöntemi PCR yöntemine nazaran başarılı sonuçlar alınan bir yöntemdir; özellikle kısa fragmentler için yüksek çözünürlüğü sağlaması yönünden avantajlıdır. Dezavantajı ise çok vakit alması, radyoaktif bir yöntem olması, yüksek dikkat ve sabır gerektirmesi ve çok miktarda DNA kullanılmasıdır.

Southern blot yönteminde radyoaktif işaretli prob kullanılmasıyla, iyi sonuçlar alınmasına rağmen, son derece hassas, tehlikeli bir yöntem olması, daha çok zaman harcanmasına neden olması ve aynı zamanda daha çok maddi imkan gerektirmesi nedeniyle nonradyoaktif metodların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Hollanda'da yapılan ve başarılı sonuçlar alınan radyoaktif çalışmanın ardından Tıbbi Biyoloji ve Genetik laboratuvarında, Southern blot yöntemi nonradyoaktif olarak otutturulmaya çalışılmıştır. İlk başta radyoaktif yöntemle birebir *EcoRI*, *HindIII* enzim kesimleri yapılmış, elektoroforez yöntemiyle örnekler yürütülerek ve görüntülenerek kesimlerin başarılı olduğu gösterilmiştir. Örneklerin, membrana

transferinde bir sorun olmadığı da UV’de görüntüleyerek belirlenmiştir. Tüm Southern blot işlemlerinden sonra Marker görüntülenebilirken, kesim bölgelerine ait herhangi bir bant görüntülenememiştir. Marker’ın görülmesi yapılan işlemlerin başarılı olduğunu ve hazırlanan Southern blot solüsyonlarında bir sorun olmadığını göstermektedir. Probda sorun olabileceği düşüncesiyle, probun antikorla işaretlenip işaretlenmediği ve ne kadar miktar probun yeterli olduğu test edilmiş ve sonuçta probun işaretlendiğine dair sinyaller görüntülenmiş ve net miktarı da belirlenmiştir. Pek çok tekrardan sonra tüm denemelerde başarısız olunmuş, daha sonraki çalışmalarda DNA fragmentlerinin jelden membrana daha etkili bir şekilde transfer olmasını sağlamak için 15 kb’den büyük DNA fragmentlerinin depürizasyonu ve denatürasyonunu kolaylaştırmak için HCl solüsyonu hazırlanmış ve denatürasyon ve nötralizasyon işlemlerinden önce HCl solüsyonunda bekletilmiştir; fakat tüm çabalara rağmen sonuç elde edilememiştir. Radyoaktif yöntemde bantlar elde edilirken, nonradyoaktif yöntemde hiçbir bant elde edilememesinin sebebinin, radyoaktif yöntemde alınan sinyalin çok kuvvetli, buna karşılık nonradyoaktif yöntemde alınan sinyallerin, zayıf olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

FSHD tanısında D4Z4 fragmentlerinin tanımlanması önemlidir; fakat bu fragmentler 4 nolu kromozom dışında, 10 nolu kromozomun q26 bölgesinde de bulunmaktadır ve 4 nolu kromozoma ait D4Z4 fragmentleriyle %98< homoloji göstermektedir [79]. Bu homolojinin yüksekliğine rağmen 10 nolu kromozom üzerindeki D4Z4 delesyonlarının FSHD hastalığıyla ilişkisi bulunmamıştır [80]. İki bölge arasındaki yüksek homoloji ve dolayısıyla oluşan translokasyonlar FSHD tanısını güçleştirmektedir.

D4Z4 tekrar bölgesi, EcoRI enzimiyle kesilen DNA’yı takiben p13E-11 (D4F104S1) probuyla hibridizasyon sağlanarak Southern blot yöntemiyle görüntülenmektedir. p13E-11 probu 4q35’ten gelen iki alel ve 10q26’dan gelen iki alel olmak üzere toplam 4 EcoRI fragmentini tanımaktadır. 4 numaralı kromozoma ait kısa fragmenti belirlemek için ayrı bir enzim kesimine ihtiyaç vardır. BlnI enzimi sayesinde sadece 4 numaralı kromozoma ait fragmentler görülmekte ve buna ek olarak kesin tanı için XapI enzimiyle kesilerek 10 numaralı kromozoma ait fragmentler görüntülenebilmektedir.

Nonradyoaktif yöntemde yaşanan zorluklar nedeniyle Hollanda’da yapılan çalışma baz alınmış olup bu çalışmamızda her hasta için EcoRI/HindIII kesimi, EcoRI/BlnI çifte enzim kesimi ve XapI enzim kesimi yaptıktan sonra radyoaktif işaretli p13E11 probu kullanarak, 4 ve 10 numaralı kromozomlara ait fragmentleri gösterilmiştir.

Fragment boyutlarına bakarak bizim hastalarımızda 4 ve 10 numaralı kromozomlar arasında translokasyonlar yok gibi görülmekte ve her iki kromozoma da ait iki alel gözükmemektedir. FSHD tanısı konulan hastaların kliniğiyle paralel olarak 4 numaralı kromozoma ait fragmentlerden birinin tüm hastalarda 35 kb ‘den kısa olduğu görülmektedir. Ailesinde FSHD hastalığı olan ve olmayan sağlıklı kontrol bireylerde ise yine klinikle paralel olarak 4 numaralı kromozoma ait fragmentin 35 kb’den büyük olduğu gözükmemektedir.

Literatüre göre kısa fragmente sahip bireyler daha ağır fenotipe sahip olmaktadır [13]. Bizim çalışmamızda en kısa fragmente sahip aile 1 numaralı ailedir (18 kb);

fakat bireylerin fenotipine bakıldığında yüz, omuz ve kol kaslarına ilaveten bacak kaslarının etkilenmiş olması nedeniyle tekerlekli sandaleye bağımlı bir profil beklenirken, bu ailede baba oğul 2 hastada da bacaklarda herhangi bir tutulum gözükmemektedir.

2 numaralı ailede klinik fenotipi olan 5 hastadan 3'ü kadın 2'si erkektir. Moleküler analizi sonucunda FSHD profili desteklenen hastaların (30 kb), hastalığın başlangıç yaşı erkeklerde birinci dekattan sonrayken, kadınlarda 4. ve 5. dekattan sonra ortaya çıkmıştır. Bu ailenin profiline bakıldığında, kadınlarda erkeklere oranla daha geç zamanda hastalığın ortaya çıkması ve menopoza takiben hastalık süreci belirgin olarak hızlanıyor olması, menopozla beraber kas gücünde genel olarak bir azalma görülmeye başlamakta olduğu yönündeki literatürlerle uyumludur [49].

3 numaralı ailede baba-kız aynı klinik özelliklere sahip olup, başlangıç yaşları da cinsiyet farkı göstermemektedir ve hastalık iki olguda da 1. dekattan sonra ortaya çıkmıştır. Moleküler araştırması yapılan bu ailede de kısa fragment (26 kb) gösterilerek klinik özellikler desteklenmektedir. Literatürde aynı aile içerisinde de fragment boyutunun aynı olmasına rağmen epigenetik değişiklikler sonucunda klinik çeşitlilik söz konusu olabilmektedir [81]. Bu ailenin klinik özelliklerine ve aile öyküsüne bakıldığında ortak benzerlikler olmasına rağmen ileriki yaşlarda aradaki fark şu anda tahmin edilememektedir.

Literatürde FSHD hastalığında antisipasyon olduğu, dolayısıyla her nesilde daha ağır fenotipe sahip bireyler ortaya çıkabileceği [39, 82] ve kadınlarda erkeklere nazaran hastalığın daha hafif bulgu verdiği söylenmektedir [37, 82]. Fragment boyutu en kısa ikinci aile olan (25 kb) 4 numaralı ailede erkek bireylerde fenotipin, genel olarak daha ağır seyrettiği görülürken, dişi bireylerde çok daha hafif seyretilmektedir. Başlangıç yaşı literatürle paralel olarak 3 erkek bireyde 1. dekattan sonra ortaya çıkmış, dişi bireyde ise 2. dekatta ortaya çıkmıştır. Ailede hastalığın ilk görüldüğü büyükannenin kliniğinin hafif seyretmesi antisipasyonu akla getirmektedir; çünkü oğulları ve kızı daha ağır etkilenmiş ve genellikle 2. dekattan sonra ortaya çıkması beklenen fenotip; ailenin en küçük bireyinde 3 yaşından itibaren ilk belirtilerden biri olan yüzde mimiklerin kaybolması ile başlamış ve bu bireyin henüz klinik bir tanı almamasına rağmen moleküler araştırma sonucunda FSHD hastası olduğu anlaşılmıştır.

FSHD hastalığı için çalışılan bu 4 ailede fragment boyutları arasında aileler arasında farklılık olmasına rağmen aile içinde D4Z4 kısa fragment boyutunun tüm aile üyelerinde aynı olduğu görülmektedir.

Bu çalışmamızda yer alan 4 aileyi kıyasladığımızda en kısa fragment boyutuna sahip aile 1 numaralı ailedir (18 kb); bireylerin fenotipinin, diğer ailelerle kıyaslandığında beklentinin tersine [13] daha büyük D4Z4 fragmentine sahip 2 ailenin (2 ve 4 numaralı aileler) üyelerinden daha hafif olduğu gözlenmektedir.

Çalışmaya dahil edilen ailelerden ayrıntılı hikaye alınarak, fragment boyutu ile klinik fenotip arasında ilişki kurulmaya çalışılmasına rağmen, aynı D4Z4 fragment boyutuna sahip olsa da bireylerin aile içinde bile, yaş ile klinik özelliklerin bağlantısı kurulamamakta ve dolayısıyla aile içinde heterojenite varken aileler arasında FSHD hastalığına ait ortak bir profil bulmak, ortak bir bulgu ortaya koymak çok zordur.

Klinik şiddetin farkını ya da benzer özelliklerini gösterebilmek ve tam olarak fragment boyutuyla ilişkisini ve antipasyon bağlantısını gösterebilmek için bu ailelerin uzun süre takip edilmesi gerekmektedir. Kalan diğer tüm hasta ve normal aile üyelerine ve Türkiye’de FSHD hastalığına sahip daha çok aileye ulaşarak popülasyon bazlı bir çalışmanın yapılması kaçınılmaz olmuştur. FSHD hala “tedavi edilemez” bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, FSHD konusunda yapılan çalışmalara ülkemizin de katkısını sağlayarak hız kazandırmak gerekmektedir. Bu hastalık üzerine ülkemizde başka herhangi bir moleküler genetik çalışma olmamasından dolayı, daha çok FSHD hastasına ulaşarak genel bir profil çıkarılması, insidansının belirlenmesi ve istatistiksel moleküler verilerin ortaya konulması kaçınılmazdır.

Son yıllarda yapılan çalışmada D4Z4 delesyonları sonucunda kromatin yapısının değişmesi ve histon modifikasyonları sonucu olduğu düşünülen hem tekrar bölgesindeki hem de komşu bölgedeki genlerin ekspresyon seviyelerinin değiştiği gösterilmiştir. Normalde düşük ekspresyon seviyesine sahip FRG1, FRG2, ANT1, TUBB4q genlerinin ve normalde ekspresyonu gözlenmeyen DUX4 geninin FSHD hastalarının kas dokusu alınarak myoblast hücreleriyle yapılan çalışmalarda overeksprese olduğu görülmüştür [12]. FSHD moleküler tanısının konulmasında D4Z4 fragmentleri, epigenetik mekanizma, genlerin susturulması gibi moleküler teknikler üzerine ve özellikle toksik etkisi bilinen *DUX4* genine yönelik çalışmaların yapılması ve yöntemlerin geliştirilmesi bu hastalığın mekanizmasını çözmekte avantajlar sağlayacaktır.

Bizim çalışmamızda uyguladığımız Southern blot yöntemi araştırma amaçlı olup rutinde uygulanmamaktadır. Bu yöntemin rutine uygulanması halinde, tekrar sayılarının belirlenmesinde nonradyoaktif yöntemin henüz etkin olmadığı bu nedenle radyoaktif yöntemin uygulanmasının daha yararlı olacağı ve bu sayede ailelere genetik danışma verilebileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Pandya, S., W.M. King, and R. Tawil, *Facioscapulohumeral dystrophy*. Phys Ther, 2008. **88**(1): p. 105-13.
2. Tawil, R. and S.M. Van Der Maarel, *Facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Muscle Nerve, 2006. **34**(1): p. 1-15.
3. van der Kooi, A.J., et al., *Extension of the clinical range of facioscapulohumeral dystrophy: report of six cases*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2000. **69**(1): p. 114-6.
4. Brouwer, O.F., et al., *Early onset facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Muscle Nerve, 1995. **2**: p. S67-72.
5. Cabianca, D.S. and D. Gabellini, *The cell biology of disease: FSHD: copy number variations on the theme of muscular dystrophy*. J Cell Biol, 2010. **191**(6): p. 1049-60.
6. Winokur, S.T., et al., *Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) myoblasts demonstrate increased susceptibility to oxidative stress*. Neuromuscul Disord, 2003. **13**(4): p. 322-33.
7. Padberg, G.W., et al., *On the significance of retinal vascular disease and hearing loss in facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Muscle Nerve, 1995. **2**: p. S73-80.
8. Grosso, S., et al., *Epilepsy, speech delay, and mental retardation in facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Eur J Paediatr Neurol, 2011. **15**(5): p. 456-60.
9. Goto, K., I. Nishino, and Y.K. Hayashi, *Rapid and accurate diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Neuromuscul Disord, 2006. **16**(4): p. 256-61.
10. Ciafaloni, E., et al., *Pregnancy and birth outcomes in women with facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Neurology, 2006. **67**(10): p. 1887-9.
11. Orrell, R.W., et al., *Definitive molecular diagnosis of facioscapulohumeral dystrophy*. Neurology, 1999. **52**(9): p. 1822-6.
12. Klooster, R., et al., *Comprehensive expression analysis of FSHD candidate genes at the mRNA and protein level*. Eur J Hum Genet, 2009. **17**(12): p. 1615-24.
13. Klinge, L., et al., *Severe phenotype in infantile facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Neuromuscul Disord, 2006. **16**(9-10): p. 553-8.
14. van der Maarel, S.M., R.R. Frants, and G.W. Padberg, *Facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(2): p. 186-94.
15. Laforet, P., et al., *Cardiac involvement in genetically confirmed facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Neurology, 1998. **51**(5): p. 1454-6.
16. Fisher, J. and M. Upadhyaya, *Molecular genetics of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)*. Neuromuscul Disord, 1997. **7**(1): p. 55-62.

17. Kazakov, V.M. and D.I. Rudenko, *Clinical variability of facioscapulohumeral muscular dystrophy in Russia*. Muscle Nerve, 1995. **2**: p. S85-95.
18. Faber, C.G., M.M. Klaver, and J.H. Wokke, [*A winged scapula*]. Ned Tijdschr Geneesk, 2002. **146**(37): p. 1717-20.
19. Upadhyaya, M., et al., *A genetic linkage study of facioscapulohumeral (Landouzy-Dejerine) disease with 24 polymorphic DNA probes*. J Med Genet, 1989. **26**(8): p. 490-3.
20. Wijmenga, C., et al., *Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4*. Lancet, 1990. **336**(8716): p. 651-3.
21. Gilbert, J.R., et al., *Evidence for heterogeneity in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)*. Am J Hum Genet, 1993. **53**(2): p. 401-8.
22. Hewitt, J.E., et al., *Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(8): p. 1287-95.
23. Lyle, R., et al., *The FSHD-associated repeat, D4Z4, is a member of a dispersed family of homeobox-containing repeats, subsets of which are clustered on the short arms of the acrocentric chromosomes*. Genomics, 1995. **28**(3): p. 389-97.
24. Jiang, G., et al., *Testing the position-effect variegation hypothesis for facioscapulohumeral muscular dystrophy by analysis of histone modification and gene expression in subtelomeric 4q*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(22): p. 2909-21.
25. van Overveld, P.G., et al., *Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Nat Genet, 2003. **35**(4): p. 315-7.
26. Zeng, W., et al., *Specific loss of histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma/cohesin binding at D4Z4 repeats is associated with facioscapulohumeral dystrophy (FSHD)*. PLoS Genet, 2009. **5**(7): p. e1000559.
27. van der Maarel, S.M., R. Tawil, and S.J. Tapscott, *Facioscapulohumeral muscular dystrophy and DUX4: breaking the silence*. Trends Mol Med, 2011. **17**(5): p. 252-8.
28. Ottaviani, A., et al., *The D4Z4 macrosatellite repeat acts as a CTCF and A-type lamins-dependent insulator in facio-scapulo-humeral dystrophy*. PLoS Genet, 2009. **5**(2): p. e1000394.
29. Deidda, G., et al., *Physical mapping evidence for a duplicated region on chromosome 10qter showing high homology with the facioscapulohumeral muscular dystrophy locus on chromosome 4qter*. Eur J Hum Genet, 1995. **3**(3): p. 155-67.
30. van Deutekom, J.C., et al., *Evidence for subtelomeric exchange of 3.3 kb tandemly repeated units between chromosomes 4q35 and 10q26: implications for genetic counselling and etiology of FSHD1*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(12): p. 1997-2003.
31. van der Maarel, S.M., et al., *A new dosage test for subtelomeric 4;10 translocations improves conventional diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)*. J Med Genet, 1999. **36**(11): p. 823-8.

32. Matsumura, T., et al., *Chromosome 4q;10q translocations; comparison with different ethnic populations and FSHD patients*. BMC Neurol, 2002. **2**: p. 7.
33. Upadhyaya, M. and D.N. Cooper, *Molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Expert Rev Mol Diagn, 2002. **2**(2): p. 160-71.
34. Upadhyaya, M., et al., *Germinal mosaicism in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)*. Muscle Nerve, 1995. **2**: p. S45-9.
35. Kohler, J., et al., *Germline mosaicism in 4q35 facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD1A) occurring predominantly in oogenesis*. Hum Genet, 1996. **98**(4): p. 485-90.
36. van der Maarel, S.M., et al., *De novo facioscapulohumeral muscular dystrophy: frequent somatic mosaicism, sex-dependent phenotype, and the role of mitotic transchromosomal repeat interaction between chromosomes 4 and 10*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(1): p. 26-35.
37. Lunt, P.W., et al., *Phenotypic-genotypic correlation will assist genetic counseling in 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Muscle Nerve, 1995. **2**: p. S103-9.
38. Zatz, M., et al., *High proportion of new mutations and possible anticipation in Brazilian facioscapulohumeral muscular dystrophy families*. Am J Hum Genet, 1995. **56**(1): p. 99-105.
39. Tawil, R., et al., *Evidence for anticipation and association of deletion size with severity in facioscapulohumeral muscular dystrophy*. The FSH-DY Group. Ann Neurol, 1996. **39**(6): p. 744-8.
40. Hsu, Y.D., et al., *Application of chromosome 4q35-qter marker (pFR-1) for DNA rearrangement of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients in Taiwan*. J Neurol Sci, 1997. **149**(1): p. 73-9.
41. Funakoshi, M., et al., *[Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)]*. Nihon Rinsho, 1997. **55**(12): p. 3181-5.
42. Miura, K., et al., *Two cases of chromosome 4q35-linked early onset facioscapulohumeral muscular dystrophy with mental retardation and epilepsy*. Neuropediatrics, 1998. **29**(5): p. 239-41.
43. Butz, M., et al., *Facioscapulohumeral muscular dystrophy. Phenotype-genotype correlation in patients with borderline D4Z4 repeat numbers*. J Neurol, 2003. **250**(8): p. 932-7.
44. Upadhyaya, M., M. MacDonald, and D. Ravine, *Prenatal diagnosis for facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)*. Prenat Diagn, 1999. **19**(10): p. 959-65.
45. Gabellini, D., M.R. Green, and R. Tupler, *Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle*. Cell, 2002. **110**(3): p. 339-48.
46. Tawil, R., et al., *Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): design of natural history study and results of baseline testing*. FSH-DY Group. Neurology, 1994. **44**(3 Pt 1): p. 442-6.
47. Padua, L., et al., *Quality of life and pain in patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Muscle Nerve, 2009. **40**(2): p. 200-5.
48. de Greef, J.C., et al., *Clinical features of facioscapulohumeral muscular dystrophy 2*. Neurology, 2010. **75**(17): p. 1548-54.

49. Welle, S., R. Tawil, and C.A. Thornton, *Sex-related differences in gene expression in human skeletal muscle*. PLoS One, 2008. **3**(1): p. e1385.
50. Deidda, G., et al., *Direct detection of 4q35 rearrangements implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)*. J Med Genet, 1996. **33**(5): p. 361-5.
51. Barro, M., et al., *Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(1-2): p. 275-89.
52. Cheli, S., et al., *Expression profiling of FSHD-1 and FSHD-2 cells during myogenic differentiation evidences common and distinctive gene dysregulation patterns*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20966.
53. Homma, S., et al., *A unique library of myogenic cells from facioscapulohumeral muscular dystrophy subjects and unaffected relatives: family, disease and cell function*. Eur J Hum Genet, 2012. **20**(4): p. 404-10.
54. van Deutekom, J.C., et al., *Search for the FSHD gene using cDNA selection in a region spanning 100 kb on chromosome 4q35*. Muscle Nerve, 1995. **2**: p. S19-26.
55. Gabriels, J., et al., *Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element*. Gene, 1999. **236**(1): p. 25-32.
56. Belayew, A., *[Functional study of a gene candidate for Landouzy-Dejerine muscular dystrophy]*. Bull Mem Acad R Med Belg, 2004. **159**(5-6): p. 343-8; discussion 348-9.
57. Bosnakovski, D., et al., *An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies*. EMBO J, 2008. **27**(20): p. 2766-79.
58. Bosnakovski, D., et al., *DUX4c, an FSHD candidate gene, interferes with myogenic regulators and abolishes myoblast differentiation*. Exp Neurol, 2008. **214**(1): p. 87-96.
59. Dixit, M., et al., *DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(46): p. 18157-62.
60. Snider, L., et al., *RNA transcripts, miRNA-sized fragments and proteins produced from D4Z4 units: new candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(13): p. 2414-30.
61. Vanderplanck, C., et al., *The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26820.
62. Snider, L., et al., *Facioscapulohumeral dystrophy: incomplete suppression of a retrotransposed gene*. PLoS Genet, 2010. **6**(10): p. e1001181.
63. Tsumagari, K., et al., *Gene expression during normal and FSHD myogenesis*. BMC Med Genomics, 2011. **4**: p. 67.
64. Darabi, R., et al., *Engraftment of embryonic stem cell-derived myogenic progenitors in a dominant model of muscular dystrophy*. Exp Neurol, 2009. **220**(1): p. 212-6.
65. Engelkamp, D. and V. van Heyningen, *Transcription factors in disease*. Curr Opin Genet Dev, 1996. **6**(3): p. 334-42.

66. van Geel, M., et al., *Identification of a novel beta-tubulin subfamily with one member (TUBB4Q) located near the telomere of chromosome region 4q35*. Cytogenet Cell Genet, 2000. **88**(3-4): p. 316-21.
67. Bedell, M.A., N.G. Copeland, and N.A. Jenkins, *Multiple pathways for Steel regulation suggested by genomic and sequence analysis of the murine Steel gene*. Genetics, 1996. **142**(3): p. 927-34.
68. Lemmers, R.J., et al., *D4F104S1 deletion in facioscapulohumeral muscular dystrophy: phenotype, size, and detection*. Neurology, 2003. **61**(2): p. 178-83.
69. Doerner, A., et al., *Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans*. FEBS Lett, 1997. **414**(2): p. 258-62.
70. Stepien, G., et al., *Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation*. J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 14592-7.
71. Li, K., et al., *A human muscle adenine nucleotide translocator gene has four exons, is located on chromosome 4, and is differentially expressed*. J Biol Chem, 1989. **264**(24): p. 13998-4004.
72. Hudgson, P., W.G. Bradley, and M. Jenkinson, *Familial "mitochondrial" myopathy. A myopathy associated with disordered oxidative metabolism in muscle fibres. 1. Clinical, electrophysiological and pathological findings*. J Neurol Sci, 1972. **16**(3): p. 343-70.
73. Slipetz, D.M., et al., *Deficiency of complex III of the mitochondrial respiratory chain in a patient with facioscapulohumeral disease*. Am J Hum Genet, 1991. **48**(3): p. 502-10.
74. Haraguchi, Y., et al., *Genetic mapping of human heart-skeletal muscle adenine nucleotide translocator and its relationship to the facioscapulohumeral muscular dystrophy locus*. Genomics, 1993. **16**(2): p. 479-85.
75. Sandri, M., et al., *Caspase 3 expression correlates with skeletal muscle apoptosis in Duchenne and facioscapulo human muscular dystrophy. A potential target for pharmacological treatment?* J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(3): p. 302-12.
76. Tawil, R., *Facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Neurotherapeutics, 2008. **5**(4): p. 601-6.
77. Wijmenga, C., et al., *Genetic linkage map of facioscapulohumeral muscular dystrophy and five polymorphic loci on chromosome 4q35-qter*. Am J Hum Genet, 1992. **51**(2): p. 411-5.
78. Ki, C.S., et al., *Clinical and genetic analysis of Korean patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy*. J Korean Med Sci, 2008. **23**(6): p. 959-63.
79. van Geel, M., et al., *Genomic analysis of human chromosome 10q and 4q telomeres suggests a common origin*. Genomics, 2002. **79**(2): p. 210-7.
80. Tsumagari, K., et al., *FSH dystrophy and a subtelomeric 4q haplotype: a new assay and associations with disease*. J Med Genet, 2010. **47**(11): p. 745-51.
81. Tamhankar, P.M. and S.R. Phadke, *Clinical profile and molecular diagnosis in patients of facioscapulohumeral dystrophy from Indian subcontinent*. Neurol India, 2010. **58**(3): p. 436-40.

82

ÖZGEÇMİŞ

Özge Burcu Şahan 7 Aralık 1986 yılında Ankara’da doğmuştur. Lise eğitimini Ankara Gölbaşı Anadolu Lisesi’nde tamamlamış, 2004 yılında Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Lisans Eğitimine başlamıştır. 2008 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Prof. Dr. Candan Tamerler Behar’ın danışmanlığı altında 6 haftalık stajını tamamlamıştır. 2009 yılı Haziran ayında Biyoloji bölümünden mezun olmuş, Eylül 2009 tarihinden itibaren Prof.Dr.Sibel Berker’in danışmanlığı altında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Yüksek Lisans Programı’nda öğrenim görmeye başlamıştır. 2011 Mayıs ayında Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından gerçekleştirilen Deney Hayvanları Sertifika Programı’na katılarak deney hayvanları kullanım sertifikası almıştır. Yine 2011 yılının Haziran ayında Hollanda Leiden Üniversitesi Tıp Merkezi İnsan Genetiği Departmanında Dr. Richard Lemmers’in danışmanlığı altında FSHD grubunda 3 hafta staj yaparak FSHD’nin moleküler teşhis yöntemlerini öğrenmiştir. Akademik kariyerine Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda kayıtlı yüksek lisans öğrencisi olarak devam etmektedir.