

KÜBRA SAMUNCUOĞLU

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2021



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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MYASTHENİA GRAVIS FARE MODELİNDE RANK YOLAĞINDA
YER ALAN LGR4 VE CTSH GENLERİNİN ANLATIM
SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

KÜBRA SAMUNCUOĞLU

**DANIŞMAN
PROF. DR. BURÇAK VURAL
GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MYASTHENİA GRAVIS FARE MODELİNDE RANK YOLAĞINDA
YER ALAN LGR4 VE CTSH GENLERİNİN ANLATIM
SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

KÜBRA SAMUNCUOĞLU

**EŞ DANIŞMAN
DOÇ. DR. VUSLAT YILMAZ**

**SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
SİNİRBİLİM PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

TEZ ONAY



BEYAN



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tezi yazarken bana bilimsel desteğini esirgemeyen, hocam Prof. Dr. Burçak VURAL'a ve hocam Doç. Dr. Vuslat YILMAZ'a çalışmalarımda yardımını aldığım sevgili Didem Altındirek'e teşekkür ederim.

Her daim yanımda olduğunu bildiğim ve beni destekleyen eşim Serhat Samuncuoğlu'na, her zaman gülen yüzü ile beni yalnız bırakmayan canım oğlum Selman Fuad Samuncuoğlu'na teşekkür ederim.

Ayrıca canım annem Emine Güneş ve sevgili Sedanur Samuncuoğlu'na, saygıdeğer Kirkit ve Çetiner ailelerine yardımları ve oğlum ile geçirdikleri zamanlar ile tezim için vakit ayırmama vesile oldukları için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İV
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
TABLolar LİSTESİ.....	VIIİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İİX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Myasthenia Gravis Hastalığının Epidemiyolojisi.....	3
2.2. MG Semptomları.....	3
2.3. MG Tanısı	6
2.4. MG alttipleri ve kullanılan tedavi yöntemleri.....	6
2.5. MG Patogenezi	8
2.6. Myasthenia Gravis RANK Yolağı.....	11
2.7. MG ve RANK Yolağı.....	14
2.8. <i>LGR4</i>	14
2.9. <i>CTSH</i>	16
2.10. DOMG Fare Modeli.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
4. BULGULAR.....	23
5. TARTIŞMA.....	26
KAYNAKLAR.....	29
ETİK KURUL KARARI.....	35
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	36
ÖZGEÇMİŞ.....	37

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Myasthenia Gravis Amerika Derneği'nin düzenlediği klinik sınıflandırma...	5
Tablo 2-2: MG alttipleri.....	7
Tablo 3-1: cDNA eldesi için kullanılan kit içeriği.....	20
Tablo 3-2: cDNA eldesi için uygulanan sıcaklık koşulları.....	20
Tablo 3-3: Gerçek zamanlı PZR için hazırlanan karışım.....	21
Tablo 3-4: Çalışmada kullanılan Gerçek Zamanlı PZR döngü koşulları.....	21
Tablo 3-5: Çalışmada kullanılan primer dizileri.....	22
Tablo 4-1: RNA izolasyonu ölçüm sonuçları.....	23

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: MG'nin NMB'deki patofizyolojisi	9
Şekil 2-2: Anti-AChR antikorları nöromüsküler iletimi etkilediği 3 yol.....	10
Şekil 2-3: RANKL/RANK/OPG'nin kemik homeostazı ve immün sistem üzerindeki rolü.....	12
Şekil 2-4: RANKL-RANK etkileşimi ve inhibitörleri.....	16
Şekil 4-1.: <i>LGR4</i> geni transkripsiyon düzeyi ve gen profili.....	24
Şekil 4-2: <i>CTSH</i> geni transkripsiyon düzeyi ve gen profili.....	25



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- MG:** Myasthenia Gravis
- DOMG:** Deneyisel otoimmün Myasthenia Gravis
- RANK:** Reseptör aktivator nükleer kappa B
- RANKL:** RANK ligand
- OPG:** Osteoprotegrin
- LGR4:** Lösin açısından zengin G proteinine bağlı reseptör 4
- CTSH:** Katepsin H
- AChR:** Asetilkolin reseptörü
- ACh:** Asetilkolin
- NMB:** Nöromüsküler bileşke
- CFA:** Complete Freund's Adjuvanı
- GC:** Glukokortikoid
- OPGL:** Osteoprotegrin ligand
- ODF:** Osteoklast farklılaşma faktörü
- TRANCE 11:** Tümör nekroz faktörü ligand süper aile üyesi 11
- TRAF:** TNF reseptörü ilişkili faktör
- AchE:** Antikolinesteraz
- MuSK:** Kas-spesifik kinaz
- MGFA:** Myasthenia Gravis Amerika Derneği
- IgG:** İmmünoglobulin G
- Th1:** Tip 1 yardımcı “T Helper”
- Th2:** Tip 2 yardımcı “T Helper”
- M-SCF:** Makrofaj koloni uyarıcı faktör
- GIOP:** Glukokortikoid kaynaklı osteoporozun
- TNF:** Tümör nekroz faktörü
- IFN:** İnterferon
- sRANKL:** Çözünür RANKL
- RT-PZR:** Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

ÖZET

Samuncuoglu K. Myasthenia Gravis Fare Modelinde RANK yolağında yer alan *LGR4* ve *CTSH* genlerinin anlatım seviyelerinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2021.

Myasthenia Gravis (MG), otoimmünite temelli bir zayıflamış kas ileti hastalığıdır. Otoantikorlar, geliştikleri antijenik yapılara bağlanarak postsinaptik membranda morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere neden olur, sonrasında nöromüsküler iletim bozukluğu ve kas güçsüzlüğü meydana gelir. RANK yolağı, kemiklerin ana hücreleri olan osteoblastların, osteoklastlara farklılaşması gibi işlevlerini içeren bir yoldur. RANK'ın ligandı olan RANKL'ye bağlanması ile dendritik hücre canlılığı, apoptoz ve immün sistemi uyarma kapasitesi etkilenmektedir. RANK yolağında yer alan bazı genlerin otoimmün hastalıklar ile bağlantısının olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Bu çalışmada, deneysel otoimmün MG (DOMG) fare modelinde, RANK yolağı temelli olduğu bilinen ve birçok otoimmün hastalıkta rol alan *LGR4* ve *CTSH* genlerinin ifade düzeylerinin incelenmesi amaçlandı. Değerlendirilen fare lenf gangliyonu hücreleri önceki projede (Proje No: TYL-2017-27428) kullanılan farelerin sıvı azotta saklanan örnekleridir. Deney grubu olarak MG hastalığına özgü antikor olan torpedo Asetilkolin reseptörü ile immünize edilmiş dişi farelerden (n=4) alınan total lenf gangliyonu hücreleri ve kontrol grubu olarak Complete Freud's Ajdvanı (CFA) enjekte edilmiş dişi farelerden (n=4) alınan total lenf gangliyonu hücreleri kullanıldı. Gerçek zamanlı PZR ile gen anlatım düzeyleri belirlenerek gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı. DOMG modellenmiş farelerde, kontrol grubuna kıyasla; *LGR4* ekspresyon düzeylerinin azalma eğilimi (p=0,8846), *CTSH* ekspresyon düzeylerinin ise artma eğilimi gösterdiği (p=0,6857) gözlemlendi. DOMG grubundaki *LGR4* ekspresyon düzeyindeki azalma ve *CTSH* ekspresyon düzeyindeki artma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu çalışma, *LGR4* ile *CTSH*'in hastalık patogenezindeki rolünü belirlemek için ilk defa DOMG fareler üzerinde yapılmış bir araştırma olup, daha detaylı analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Myasthenia Gravis, DOMG, RANK, *LGR4*, *CTSH*

ABSTRACT

Samuncuoglu K. Investigation of expression levels of *LGR4* and *CTSH* genes in the RANK pathway in the Myasthenia Gravis Mouse Model. Istanbul University Institute of Health Sciences, Genetics Department. Master Thesis. Istanbul. 2021.

Myasthenia Gravis (MG) is a weakened muscle disease with autoimmune based. Autoantibodies bind to the antigenic structures in which they develop, causing morphological and functional changes in the postsynaptic membrane, and then neuromuscular conduction disorder and muscle weakness occur. The RANK pathway is a pathway that includes functions such as the differentiation of osteoblasts, the main cells of bones, into osteoclasts. Binding of RANK to its ligand, RANKL, affects dendritic cell viability, apoptosis, and the capacity to stimulate the immune system. There are studies showing that some genes in the RANK pathway are associated with autoimmune diseases.

In this study, it was aimed to examine the expression levels of *LGR4* and *CTSH* genes, which are known to be based on the RANK pathway and play a role in many autoimmune diseases, in an experimental autoimmune MG (DOMG) mouse model. Evaluated mouse lymph ganglia cells are samples of mice used in the previous project (Project No: TYL-2017-27428), stored in liquid nitrogen. Total lymph ganglion cells from female mice (n=4) immunized with torpedo AChR, an antibody specific for MG disease, were used as the experimental group, and total lymph ganglion cells from female mice (n=4) injected with Complete Freud's Adjuvant's (CFA) were used as the control group. Gene expression levels were determined by RT-PCR and compared between groups. In DOMG modeled mice, compared to the control group; It was observed that *LGR4* expression levels tended to decrease ($p=0.8846$), while *CTSH* expression levels showed a tendency to increase ($p=0.6857$). The decrease in *LGR4* expression level and the increase in *CTSH* expression level in the DOMG group were not statistically significant. This is the first study conducted on DOMG mice to determine the role of *LGR4* and *CTSH* in the pathogenesis of the disease, and more detailed analyzes are needed.

Keywords: Myasthenia Gravis, EAMG, RANK, *LGR4*, *CTSH*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Myasthenia Gravis (MG), otoimmün temelli nörolojik bir hastalıktır. MG olgularında, kolay yorulma, yutma güçlüğü ve nefes darlığı gibi klinik bulgular görülmektedir. Hastaların % 80 'inden fazlasında nöromusküler bileşkedeki asetil kolin reseptörüne (AChR) karşı gelişen otoantikorlar reseptöre bağlanarak, postsinaptik membranda morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere neden olur. Sonuç olarak, nöromusküler bileşkede iletim bozukluğu gelişir ve kas gücünde zayıflama gelişir [1, 2, 3].

MG'de kullanılan ilaçlara da bağlı olarak kemik yoğunluğunun değiştiği bilinmektedir. Kemiklerin ana hücreleri olan osteoblastların osteoklastlara farklılaşmasını sağlayan reseptör aktivatör nükleer kappa B yolağının (RANK) aktif hale gelmesi ile, kemiklerin ana hücreleri olan osteoblastların osteoklastlara farklılaşması sağlanır ve kemik yoğunluğu değişir. RANK yolağı ile ilgili olarak, ilk önce osteoprotegrin (OPG) proteini, daha sonra kemik rezorpsiyonunu kontrol eden, osteoklastlarda bulunan ve kemik yıkımına neden olan RANK ve onun uyarıcısı reseptör aktivatör nükleer kappa B ligandı (RANKL) keşfedilmiştir. Bu yolağın içerisinde OPG'nin görevi, RANKL'ye bağlanıp, RANKL'nin RANK'a bağlanmasını bloke ederek osteoklast farklılaşmasını engellemektir. OPG ve RANKL'nin zıt çalışması sayesinde kemikten madde kaybı olmamaktadır [4].

Kemik rezorpsiyonunun immün sistem tarafından düzenlendiği ve RANKL'nin T hücrelerinde ifade edildiği bilinmektedir [5, 6]. RANKL ile birlikte OPG de Tip 1 Diyabet, Multiple Skleroz ve Romatoid Artrit gibi pek çok otoimmün hastalıkta kemik yoğunluğu ile ilişkili bulunmuştur [3, 7].

Otoimmünitinin, sinir-kas kavşağı hastalığı olan MG patofizyolojisine katkısı önemli düzeydedir. RANK yolağının da iskelet-kas ve immün sistemdeki etkin rollerinden yola çıkılarak MG hastalığının, RANK yolağı ile ilişkili olabileceğini düşünülmektedir.

Lösın açısından zengin G proteinine bağlı reseptör 4 (*LGR4*), RANK'a benzer şekilde osteoklastlar üzerinde eksprese edilmekte, fakat RANK'ın aksine, çoklu mekanizmalar yolu ile osteoklast farklılaşmasını negatif yönde regüle etmekte ve RANKL'ye bağlanmak için RANK ile rekabet etmektedir [4]. OPG ve *LGR4*, RANK sinyallemede inhibitor görevi olan diğer moleküllerdir [1].

Katepsin H (CTSH), aminopeptidaz aktivitesine sahip bir lizozomal sistein proteazdır ve immün hücrelerde ekspresyonu bulunmaktadır [8]. *CTSH* gen mutasyonu ve otoreaktif T hücreler arasındaki olası ilişki sebebiyle, otoimmün hastalıklarda CTSH'nin bir katkısı olabileceği düşünülmektedir [9]. *CTSH*'nin MHC II eksprese eden monositler ve B hücrelerinde yüksek oranda var olduğu ve bu şekilde antijen sunumuyla ilişkisi bulunabileceği de bildirilmiştir [10]. *CTSH* geni; Multiple skleroz ve Tip1 diyabet gibi otoimmünite temelli birçok hastalıkta, B hücrelerinin düzenlenmesi ve hücre apoptozugibi farklı görevlerde bulunmaktadır [9, 10]. Ayrıca, CTSH'nin osteoklastlarda lokalize olması RANK yolağı ile ilişkili olabileceği yönünde düşündürmektedir.

Bu çalışmada hedef, MG patogenezinde RANK yolağının olası rolünün, DOMG fare modeli kullanılarak, lenf gangliyonu hücrelerinde RANK-RANKL yolağındaki, *LGR4* ve *CTSH* gen ifade düzeylerinin değerlendirilmesi yoluyla araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hastalığın Epidemiyolojisi

MG, otoimmünite temelli bir kas ileti sistemi hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Nöromusküler bileşkenin bir bozukluğu olan MG'de, otoantikörler postsinaptik membranın morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerine neden olur, bu da nöromusküler ileti bozukluğu sonucunda kas güçsüzlüğüne oluşmasına yol açar. MG'nin genel insidansının, yılda milyon kişi başına 2,1-5 arasında olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, MG'deki azalan ölüm oranına ve tanılabilirliğin gelişerek artmasının bir sonucu olarak 1950'lerden beri yaygınlık oranı artmıştır. 1990'dan beri yapılan bölgesel çalışmalara göre, insidansı 100.000'de yaklaşık 7-20 arasında değişmektedir [11].

Hastalık, sıklıkla sadece oküler semptomlarla ortaya çıkmakta (% 40) ve jeneralize devam etmektedir. MG 'nin başlangıcında sadece oküler tutulum gösteren hastaların, 2 yılın sonunda yalnızca % 16'sında hala sadece oküler hastalık görülmektedir. MG'li hastaların yaklaşık % 15-20'si yaşamları boyunca, tipik olarak tanıdan sonraki ilk 2 yıl içinde kriz geçirmektedir [12].

Son 50 yılda MG krizinde ölüm oranı % 50-80 arasındadır. Genel hastane içi mortalite oranının % 2,2'ye gerilediği bilinmektedir. MG krizi, ileri yaş için solunum yetmezliği ile ölüme sebebiyet verebilmektedir [13, 14].

2.2. MG Semptomları

MG hastaları; ağrısız, spesifik kas güçsüzlüğü ile başvurur. Miyastenik zayıflık, tipik olarak ekstraoküler, bulbar veya proksimal kasları etkilemektedir. MG hastalarının ilk başvurusunda en yaygın semptom olan göz kapaklarının düşmesi veya çift görme, vakaların % 75'inden fazlasında rastlanmaktadır. Yutma güçlüğü, geveleyerek veya nazal konuşma, çiğneme güçlüğü, yüz, boyun ve ekstremiteler güçsüzlüğü de ayrıca ortaya çıkabilir. Öte yandan, semptomlar yıllarca ekstraoküler ve göz kapağı kasları ile sınırlı da kalabilir.

MG'nin ayırt edici özelliği, kasların tekrar tekrar kullanıldığında zayıflamasıdır. Kaslardaki zayıflığı, spesifik olmayan yorgunluk veya uyku halinden klinik olarak ayırt etmek önemlidir. MG'li hastalarda uyku apnesi veya kötü uyku hijyeni prevalansı daha yüksektir; bu nedenle uyku bozukluğu sekonder uyku hali MG ile bir arada olabilir [15].

MG'nin klinik ayırt edici özelliği, aktivite sonrası kötüleşen ve istirahatte düzelen, dalgalanma şeklinde yorgun kas güçsüzlüğünün varlığıdır. MG hastalarının % 50-85'i, genel zayıflığı olan veya olmayan oküler semptomlarla başvurmaktadır. Başlangıçta, izole oküler tutulum ile başvuran MG hastalarının % 50-60'ı, çoğunlukla semptomların başlamasından sonraki üç yıl içinde, genelleşmiş halsizlik durumu geliştirmeye devam etmektedir.

Hastalık seyri boyunca, hastaların % 15-25'inde özellikle yalnızca oküler tutulum devam eder. MG'li hastaların yaklaşık % 20'si belirgin bulber semptom görülmektedir. Baş gerilmesi ile oluşan bulbar kas zayıflığı da yaygındır. Kaslarda oluşan zayıflık, hafiften şiddetliye doğru, alevlenmeler halinde ve hastalık belirtilerinin azalması ile haftalarca veya aylarca ilerleme gösterir [7]. Hastalık progresyonunu etkileyen faktörler; ameliyat, aşılama, duygusal stress, viral enfeksiyon, immünsüresyonun azaltılması, hamilelik veya doğum sonrası dönem, diğer otoimmün hastalıkların varlığı ve ilaç kullanımı (aminoglikozidler, siprofloksasin, telitromisin, klindamisin, fenotiyazinler, klorpromazin, diazepam, halotan, ketamin, lidokain, prokain, depolarize edici olmayan nöromüsküler bloke edici ajanlar, klorokin, prokain, lityum, fenitoin, beta blokerler, quinidin, kalsiyum kanal blokörleri, d-penisilamin, yüksek doz prednizon) sayılabilir.

Asetilkolinesteraz inhibitörlerini, immünosüpresif ilaçları, plazmaferezi, immünoterapiyi ve bir yoğun bakım ünitesi ortamında destekleyici bakımı birleştiren mevcut tedavi göz önüne alındığında, MG'li hastaların çoğunun normale yakın bir yaşam süresine sahip olduğunu söylemek mümkündür. Ölüm oranı şu anda % 3-4 olarak bilinmektedir. Başlıca risk faktörleri hastaların 40 yaşın üzerinde olması, hastalığın ilerlemiş olması ve timoma oluşumudur [13]. Kas zayıflığının solunum kaslarını tutması sonucu solunum yardımı gerektirecek kadar şiddetli miyastenik krizler gelişebilmektedir.

Myasthenia Gravis Amerika Derneği (MGFA), MG'yi Tablo 2-1'de görüldüğü üzere beş ana sınıfa ve birkaç alt sınıfa (MG Fonksiyonel Değerlendirme Klinik Sınıflaması) ayırmaktadır. Bu sınıflama, farklı klinik özellikleri paylaşan MG'li hastaların alt gruplarını tanımlamak için tasarlanmıştır [16].

Tablo 2-1: Myasthenia Gravis Amerika Derneği'nin düzenlediği klinik sınıflandırma (MGFA skorları)

Sınıf I	Herhangi bir oküler kas zayıflığı; diğer tüm kas gücü normal.
Sınıf II	Oküler kaslar dışındaki kasları etkileyen hafif güçsüzlük; ayrıca herhangi bir şiddette oküler kas zayıflığı olabilir. Sınıf IIa: Ağırlıklı olarak uzuv, eksenel kasları veya her ikisini birden etkileyen; ağız ve yutak kaslarının daha az tutulumu olabilir. Sınıf IIb: Ağırlıklı olarak ağız ve yutak, solunum kasları veya her ikisini etkileyen; ayrıca uzuv, eksenel kaslar veya her ikisinin daha az veya eşit tutulumu olabilir.
Sınıf III	Oküler kaslardan başka kasları etkileyen orta derecede zayıflık; ayrıca herhangi bir şiddette oküler kas zayıflığı olabilir. Sınıf IIIa: Ağırlıklı olarak uzuv, eksenel kaslar veya her ikisini birden etkileyen; ağız ve yutak kasların daha az tutulumu olabilir. Sınıf IIIb: Ağırlıklı olarak ağız ve yutak, solunum kasları veya her ikisini etkileyen; ayrıca uzuv, eksenel kaslar veya her ikisinin daha az veya eşit tutulumu olabilir.
Sınıf IV	Oküler kaslar dışında başka kasları etkileyen şiddetli güçsüzlük; ayrıca herhangi bir şiddette oküler kas zayıflığına sahip olabilir. Sınıf IVa: Ağırlıklı olarak uzuv, eksenel kasları veya her ikisini birden etkileyen; ağız ve yutak kasların daha az tutulumu olabilir. Sınıf IVb: Ağırlıklı olarak ağız ve yutak, solunum kasları veya her ikisini etkileyen; ayrıca uzuv, eksenel kaslar veya her ikisinin daha az veya eşit tutulumu olabilir.
Sınıf V	Rutin ameliyat sonrası yönetim sırasında kullanılması haricinde, mekanik ventilasyonlu veya ventilasyonsuz entübasyon ihtiyacına göre tanımlanır. Entübasyonsuz beslenme tüpünün kullanılması hastayı IVb sınıfına sokar.

2.3. MG Tanısı

Tanıda kısa etkili edrofonyum klorid (Tensilon) veya daha uzun etkili neostigmin bromid (Prostigmin) kullanılır. Edrofonyum'un etkisi birkaç saniyede başlar ve birkaç

dakikada sona erer. MG için kullanılan en kesin tanı yöntemi, AChR'ye karşı gelişen antikorların, serumda RIA veya ELISA yöntemleriyle tespit edilmesidir. Testin özgüllüğü % 100'e yakındır. Anti-AChR antikor testi, jeneralize MG'si olan hastaların % 85 kadarında pozitif sonuç, tamamen oküler MG'si olan hastaların sadece % 50'sinde pozitif sonuç vermektedir [17].

MG'siz timoması bulunan hastalarda, Lambert-Eaton miyastenik sendromu bulunan, küçük hücreli akciğer kanseri veya romatoid artrit hastalarında, son olarak da 70 yaş üstü nüfusun % 1-3'ünde Anti-AChR antikor testinin yanlış pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Bu durumda aşağıdaki antikorların serumda tespit edilmesi de tanı için yararlı olabilmektedir:

- Anti-kas-spesifik kinaz(Anti-MuSK) antikoru (anti-AChR antikoru için negatif sonuçlara sahip hastaların yaklaşık yarısında bulunur)
- Anti-lipoprotein ile ilgili protein 4 (LRP4) antikoru
- Anti-agrin antikoru
- Anti-striasyonel antikor (timoma ve MG'li hemen hemen tüm hastalarda ve ayrıca 50 yaş veya üzerinde MG başlangıcı olan MG hastalarının yarısında mevcuttur)
- Anti-kortaktin antikoru

Tüm MG vakalarında timoma veya timik büyümeyi belirlemek veya dışlamak için bilgisayarlı göğüs tomografisi önemlidir. Manyetik rezonans görüntüleme, kraniyal sinirleri sıkıştıran kitle lezyonlarının veya beyin sapı lezyonlarının değerlendirilmesinde yardımcı olmaktadır. Bu şekilde oküler MG'yi taklit eden beyin sapı lezyonlarında belirlenmiş olmaktadır. Elektrodiagnostik çalışmalarda MG teşhisi için kullanılabilecek yöntemler arasındadır.

2.4. MG alttipleri ve kullanılan tedavi yöntemleri

MG'nin nispeten daha az görülen üç alt tipi, Anti-MuSK antikorlu MG (MuSK MG), geç başlangıçlı MG ve oküler MG'yi de içeren; MG'ye neden olduğu bilinen antikorların varlığına ve hastaların kliniklerine göre Tablo 2-2'te görüldüğü gibi hastalık alt gruplara ayrılmaktadır [18, 19].

Tablo 2-2: MG alttipleri

	Yaş	Timus	HLA	Antikor
Oküler	Her yaş	Normal	Bilinmiyor	% 50 AChR-Ab
Erken	<40	Hiperplazi	B8, DR3	Genellikle AChR-Ab
Geç	>40	Normal	B7, DR2	Genellikle AChR-Ab
Timoma	Genellikle 30-60	Timoma	yok	Hepsinde AChR-Ab
MuSK-Ab+	Her yaş ama genç kadınlarda sık	Normal veya atrofik	DR14, DQ5 (iki yazı)	MuSK-Ab
AChR/MuSK-Ab-	Her yaş	%50 Normal %50 Hiperplazi	yok	Düşük afinite, LRP4, diğer

Semptomatik tedavi, Antikolinesteraz (AChE) inhibitörleri ile tedavi, Piridostigmin tedavisi MG hastalığı için kullanılan tedavi yöntemlerinden bazılarıdır [20, 21]. Ayrıca, son yapılan çalışmalar immün sisteminin Teriflunomid aracılı inhibisyonunun MuSK otoimmünitesini stabilize ettiğini ve Nöromusküler Bileşke (NMB) hasarını kısmen zayıflattığını göstermektedir [22].

Bunların yanında Neostigmin genellikle yalnızca Piridostigmin mevcut olmadığında kullanılmaktadır. Hızlı etki eden veya kısa süreli immünomodülatör ajanlar, uzun süreli immünosüpresyon da kullanılan tedavilerdendir.

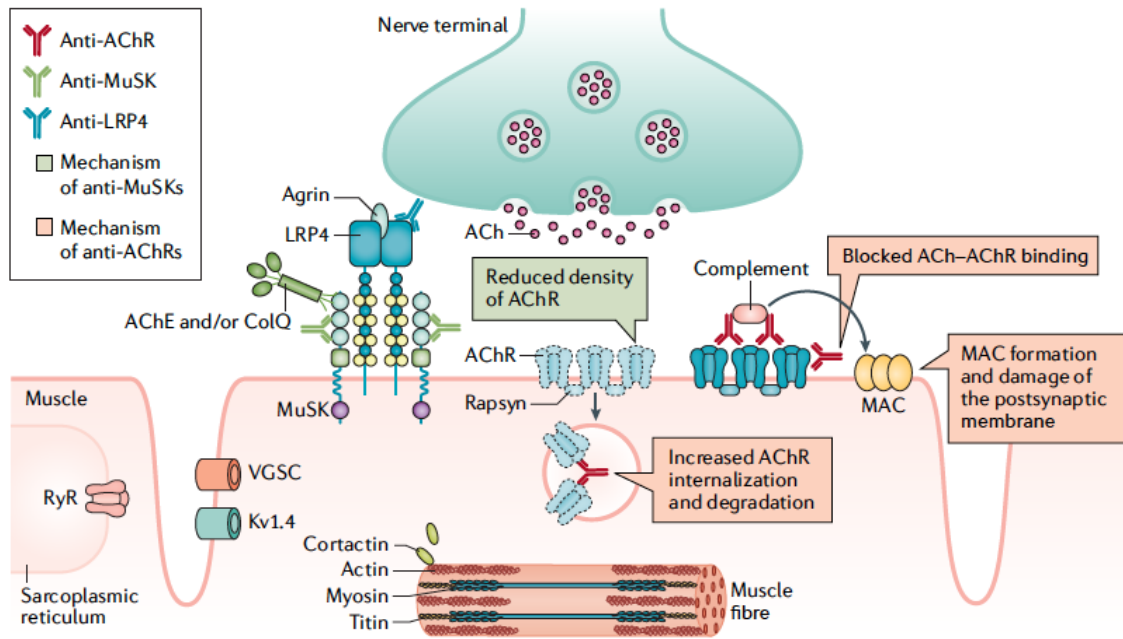
MG'nin immünopatogenezi hedefleyen yeni ortaya çıkan monoklonal antikor tedavileri; Eculizumab ve Rituksimab'dır. Rituksimab, B lenfositlerdeki CD20 transmembran antijeni yoluyla otoreaktif B hücrelerinin eliminasyonunu sağlayarak özellikle MuSK MG'de başlangıç için seçilebilecek etkin bir tedavi yöntemidir.

Hastalıkta primer organ olarak görev yapan timusun çıkarılması (timektomi), başta timomalı olan hastalar olmak üzere, tercihen anti-AChR antikoru pozitif olan erken başlangıçlı hastalarda uygulanmaktadır. Timektomi, MG semptomlarını azaltırken, 3 yıllık bir süre içinde de prednizon ve diğer immünosupresanlara olan ihtiyacı ortadan kaldırdığı gösterilmiştir [23].

Hayati tehlikesi olan durumlarda, şiddetli bulber disfonksiyonu olan hastalarda, hızlı tedavi yanıtı gerektiren durumlarda, diğer tedavi seçeneklerinin yetersizliği durumunda kısa süreli olarak intravenöz immunglobulin kullanımı ve plazmaferez önerilir.

2.5. MG Patogenezi

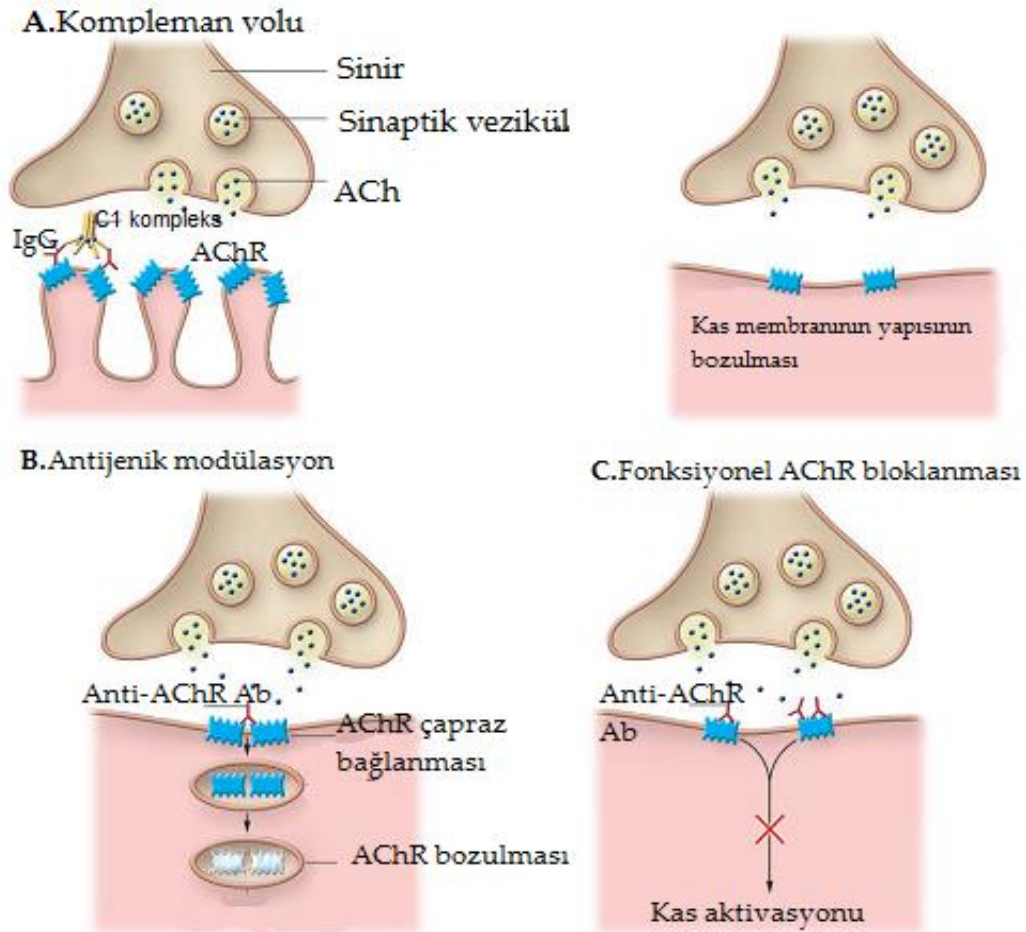
NMB, Asetilkolin (ACh) yapımının gerçekleştiği presinaptik motor sinir terminali, sinaptik aralık ve postsinaptik kas membranından oluşmaktadır (Şekil 2.1). Bu yapı, sinir sistemi ile kas arasındaki iletişimi sağlayan motor sinirin ucu, sarkolemma ve ikisinin aralarındaki sinapstan oluşmaktadır. Motor sinir aksonu, kas liflerine giden çok sayıda dallanma yapar. Hedef lifine ulaşan bu presinaptik akson uçları, miyelin kılıfından yoksundur ve ACh yüklü birçok vezikül bulundurur. NMB'deki sinaptik boşluk, AchE ile NMB yapısını stabilize eden protein ve proteoglikanları içerir. Sarkolemma, ligand kapılı bir kanal olan nikotinik AchR ve diğer iyon kanallarının yoğun kümeler şeklinde bulunduğu girintili çıkıntılı bir yapıya sahiptir. Sinir aksiyon potansiyeli, sinaptik uca ulaştığında presinaptik voltaj kapılı Ca^{2+} kanalları açılır. Ca^{2+} 'nın hücre içine doğru akmasıyla, ACh dolu sinaptik veziküllerin presinaptik membranla birleşip, sinaptik boşluğa salınmasına neden olur. Sinaptik boşluğa salınan ACh molekülleri, postsinaptik membrandaki AchR'lerine bağlandığında kanal yapısı açılır ve kas lifi içine Na^+ akışı olur. Bu akım sonucunda depolarizasyon ve kasın kontraksiyonu gerçekleşir. Gevşemenin oluşabilmesi için Ca^{2+} iyonunun yeniden ortamdan çekilmesi gerekmektedir.



Şekil 2-1: MG'nin NMB'deki patofizyolojisi [24].

NMB'de bulunan diğer proteinlere karşı otoantikorlar gelişmektedir. MuSK, LRP4 ve agrin gibi diğer kas bileşenlerine karşı da antikor gelişebilir (Şekil 2-1). Myastenik bir NMB'de birçok reseptör harabolmuş ve otoantikorlar ile etkileşen asetilkolin-AChR miktarı azalmıştır. Bunun sonucunda (kas-sinir) kavşaklar(ın)da son plak potansiyeli düşer ve bir kısmında son plak potansiyelleri aksiyon potansiyeli oluşturacak amplitüde erişemez. Birçok kavşakta aksiyon potansiyeli oluşamazsa kas zaafı ortaya çıkar.

Anti-AChR antikorları nöromusküler iletimi en az üç yolla etkiler: NMB'ye bağlanır ve kompleman sistemini aktive eder, AChR'ne çapraz bağlanarak AChR moleküllerinin hücre içine alımını ve degradasyonunu artırır (antijenik modülasyon), AChR'nün Ach bağlanma bölgesine bağlanarak fonksiyonel olarak AChR'yi bloke eder. (Şekil 2-2)



Şekil 2-2: Anti-AChR antikorları nöromusküler iletimi etkilediği üç yol [25].

Çoğu durumda, otoimmün saldırının ana hedefi iskelet kası nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR) olmasına rağmen, NMB bileşenleri olan diğer antijenik hedefler de dahil olmaktadır [26].

Hayvanlarda saflaştırılmış antijenik proteinlerle veya antijene özgü İgG (İmmünoglobulin G) tipi antikorlarla MG'nin deneysel hayvan modeli oluşturulabilmektedir. Ayrıca otoantikorların transplasental geçişi de hastalık nedeni olabilmektedir. Bu şekilde, MG patogenezinde otoimmüitenin yer aldığı kabul edilen bir “model hastalık” ya da “anti-reseptör otoimmün hastalık” olarak tanımlanabilmektedir.

MG verileri, hastalık patogenezinde antikor gelişimini düzenleyen T hücrelerinin rolü oynadığını göstermektedir. Tip 1 yardımcı T (Th1) sitokinler, makrofajların nöromusküler alana infiltrasyonunu ve B hücrelerinin olgunlaşmasını sağlamakta ve anti-AChR antikor yapımına yardımcı olmaktadır. Tip 2 yardımcı T hücrelerinden (Th2) salgılanan sitokinlerin ise, AChR'ye özgül B hücrelerinin proliferasyonunu ve anti-AChR antikor yapımını arttırabileceği, hastalık progresyonundan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir. B hücreleri de, mikrobik ürünler, antijen ya da T hücrelerine yanıt olarak sitokin salgılayabilmektedir. Ayrıca B hücreleri farklı efektör hücre gruplarına farklılaşmakta ve sitokin salgılayan B hücreleri de T hücre yanıtlarını etkileyebilmektedir. B hücreleri sitokin salgılamak için T hücrelerinden yardım almakta, yardımcı T hücre gruplarından gelen sinyallere göre sitokin salgılar hale gelmektedir. Bu şekilde, immün sistemin aktif bir şekilde değiştiği ve cevap oluşturduğu bir hastalık tablosu ortaya çıkmaktadır.

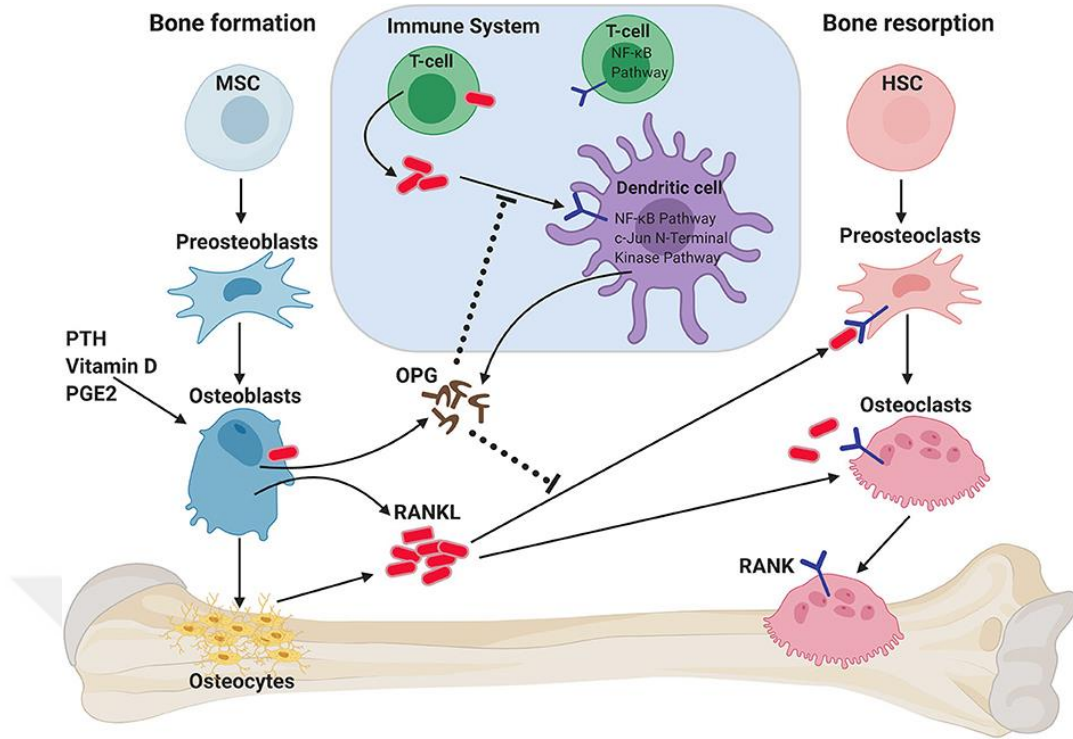
2.6. RANK Yolağı

Görüldüğünün aksine, kemiklerin sürekli değişen canlı bir doku olduğu bilinmektedir [27]. Dünya çapında yaklaşık 200 milyon insan osteopeni ve osteoporozdan muzdariptir. Elli yaşın üzerindeki her üç kadından birinde ve her beş erkekte birinde bazı kemik anormallikleri bulunmaktadır [28]. Yaşlanan nüfusla birlikte, yakın gelecekte kemik hastalıklarının prevalansının artacağı da tahmin edilmektedir.

Osteoblastlar hematopoietik kök hücrelerden, osteoklastlar ise osteoprogenitörler ve preosteoblastlar gibi bazı aşamalarsonrasında mezenkimal kök hücrelerden kökenlenmektedir [29].

Osteoklastlar, kemik erimesinden sorumlu ana hücrelerdir. Kemiklerin yüzeyine yerleşmekte ve işlevleri gereği çukurlar oluşturmaktadırlar. Aktif osteoklastlar, kemiklerdeki bağ dokularını tahrip eden proteolitik enzimleri serbest bırakmakta ve kemiklerin mineral kısmını çözen bazı asitler salgılamaktadırlar. Osteoblast farklılaşmasının farklı aşamalarında, osteojenik biyobelirteçlerin (osteokalsin, Runx2, alkalın fosfataz ve osterix) düzeyleri önemli ölçüde değişmektedir. Öte yandan, monositler osteoklasta farklılaşmayı modüle etmek için, osteoblastlar OPG ve RANKL reseptör aktivatörünün yanı sıra makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-SCF) de salgılamaktadırlar [20].

RANKL / RANK, Wnt / b-catenin ve Jagged1 / Notch1, osteoblastların ve osteoklast fonksiyonlarının düzenlenmesi yoluyla kemik kütle yoğunluğunu etkileyen osteoblastlar tarafından modüle edilen üç önemli yolaktır [21]. RANKL / RANK / OPG yolunda, RANKL, reseptörü olarak RANK'a bağlanmakta ve sonunda osteoklast öncüllerinin olgunlaşmasına yol açmaktadır. OPG'nin, RANKL için bir tuzak reseptör olduğu bilinmekte ve RANKL-RANK bağlanmasını ve sonraki reaksiyonları önlemektedir [30]. Şekil 2-3'te RANK yolağının kemik homeostazı ve immün sistemi üzerindeki etkisi görülmektedir.



Şekil 2-3: RANKL/RANK/OPG'nin kemik homeostazı ve immün sistem üzerindeki rolü [31]

Kemiklerde, artan kas kütlesi ve mekanik stresin osteoblast aktivitesinin artmasına neden olduğu kabul edilmektedir [32].

RANK yolağının, osteoklast olgunlaşması, kemik modellemesi ve kemiğin yeniden şekillenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. RANK'ın reseptör aktivatörü, RANKL'nin reseptör aktivatörü ve OPG, bu sinyalizasyon sisteminin ana bileşenleri olarak kabul edilmektedir.

Bir homotrimerik protein olan RANKL (aynı zamanda osteoprotegrin ligand(OPGL), osteoklast farklılaşma faktörü (ODF) ve Tümör nekroz faktörü ligand süper aile üyesi 11 (TRANCE 11) olarak da bilinmektedir), osteoblastlar ve aktif T hücreleri tarafından üretilmektedir [33]. Salgılanan RANKL, proteolitik bölünmenin sonucu olmaktadır [34]. Matriks metaloproteazlar (MMP3 veya 7) ve ADAM'ın (bir disintegrin ve metaloproteaz alanı), RANKL'ın proteolitik bölünmesinden sorumlu olduğu da bilinmektedir [35].

Preosteoblastlar, osteoblastlar ve periosteal hücrelerin salgıladığı RANKL [36], osteoklastlar ve öncüleri tarafından ifade edilen RANK'ı aktive eder [37]. RANKL'nin preosteoklastların farklılaşması [38], osteoklastların kemik dokusuna yapışması [39] ile

bunların aktivasyonu [40] ve devamlılığını [41] uyarmak yönünden görevleri olduğu bilinmektedir.

RANKL ayrıca timus, lenf düğümleri, akciğer ve meme bezleri gibi diğer organların yanı sıra, dalak ve kemik iliği tarafından da üretilmektedir. RANKL, hamilelik sırasında meme bezlerinin lobüllerindeki epitel hücrelerinden salgılanır [42].

RANK, TNF ailesinden bir homotrimerik endritic ane reseptörüdür ve birincil ekspresyonu osteoklast öncü hücreleri, endritic hücreler ve olgun osteoklastlarla sınırlıdır [33]. RANK, diğer TNF ailesi reseptörlerinin aksine, doğal protein kinaz aktive edici aktiviteye sahip değildir. TNF reseptörü ilişkili faktör (TRAF) 2, 5 ve 6'nın tümü, RANK'a bağlanır ancak kemik sağlığı için sadece TRAF 6 gerekmektedir [43].

Kemik hücrelerinin yanı sıra, RANK, meme kanseri veya prostat kanseri gibi bazı karsinomlarda eksprese olabilmekte ve ayrıca meme bezinde eksprese edilmektedir [44]. RANK'ın dikkat çeken pek çok rolleründen biri de kanser hücresi çoğalmasındaki rolüdür; bu, gelecekteki kanser tedavileri için RANK'ı ilginç kılmaktadır.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, B hücrelerinin, kemik iliği OPG ekspresyonunun % 64'ünden sorumlu olduğunu ileri sürülmektedir [45]. TNF süper ailesinin bir üyesi olarak OPG, RANKL'a bağlanarak anti osteoklastogeneze rol oynamaktadır [46].

Osteoblastlar, osteoklastlar ve diğer kemik hücreleri, sitokinler gibi çeşitli endojen ve ekzojen faktörlerden etkilenmektedir. Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler iskelet modelleme ve yeniden modellemede önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir. Çalışmalar, artrit gibi eklem bozukluklarının asimetrik pro ve anti inflamatuvar sitokinler oluşturarak kemik kaybına yol açabileceğini göstermektedir [47]. Egzersiz, antiinflamatuvar sitokinleri artırabilmekte ve inflamatuvar sitokinlerde iyileşmeye neden olabilmektedir [48].

Osteoklastların lokal regülasyonuna ek olarak, RANKL T hücrelerinde de eksprese olmaktadır [49]. RANK-RANKL'ın T ve dendritik hücreler arasındaki etkileşimlerin önemli bir düzenleyicisi olabileceği ve T hücresine bağlı immün yanıtın düzenlenmesinde rolü olabileceği düşünülmektedir.

2.7. MG ve RANK Yolağı

MG tedavisindeki iki tip strateji: a) esas olarak hastalığın alevlenmesi sırasında kas güçsüzlüğünde hızlı bir iyileşme sağlamak için kullanılan plazmaferez veya

intravenöz immünoglobulinlere, b) kronik immünosupresyon, glukokortikoidlere ve diğer kortikosteroid koruyucu ajanlara dayanmaktadır [50]. Tedavi amaçlı verilen orta ve yüksek dozda glukokortikoidlerin birden fazla yan etkisi vardır. İlk olarak endişe uyandıran ise osteoporoza yol açan kemik metabolizması üzerine olan etkisidir [51]. Uzun süreli glukokortikoid tedavisinde, MG'li hastalarda osteoporoz sıklığı bildirilmiştir. Japonya'daki bir çalışmada (n = 36), MG'li kadınların % 31'inde azalmış kemik mineral yoğunluğu ve glukokortikoid tedavisi altında MG'li hastaların % 11,5'inde osteoporoz bildirilmektedir [52]. Shingo Konno ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları araştırmada, glukokortikoid kullanan MG hastalarının (n = 283) % 6'sında osteoporotik kırıklar olduğunu bildirmektedir. Dahası, kırık varlığı glukokortikoid tedavisinin süresi ile ilişkili olup ve MG hastalarında yaşam kalitesini anlamlı derecede kötüleştirmektedir [53].

Glukokortikoid kaynaklı osteoporozun (GIOP) patogeneğinde bir dizi mekanizma yer almaktadır. Başlangıçta, glukokortikoidler osteoklastogenezi ve kemik rezorpsiyonunu arttırmaktadır. Ardından, osteoblast apoptozunu artırması sonucu gelişen belirgin kemik oluşumu bir azalması sebebiyle, aslında kemik mikro hasarının saptanması ve iyileşmesine katkıda bulunduğu düşünülen osteoblast apoptozunun da artışı gerçekleşmektedir. Osteoblastların hızlandırılmış apoptozu, kemik kalitesinin ve kemik gücünün azalmasına neden olabilmektedir [54].

Yapılan fonksiyonel genomik ve biyokimyasal analizler, RANK aracılığıyla RANKL sinyalleşmesini osteoklastogenez için zorunlu bir faktör olarak tanımlarken, OPG'nin RANKL'ın RANK'a bağlanmasını önleyen bir tuzak reseptör gibi davranarak osteoklast gelişiminin negatif bir düzenleyicisi olduğu göstermektedir.

2.8. *LGR4*

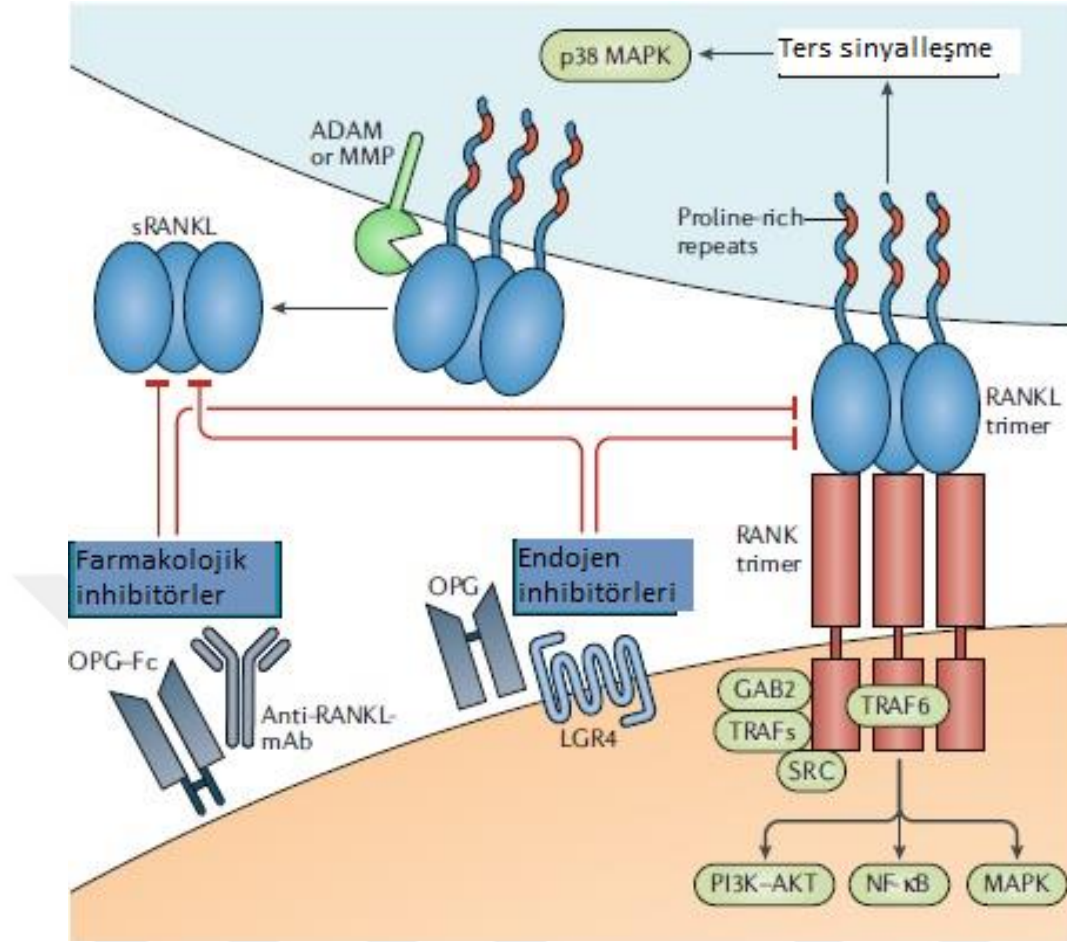
LGR4, RANKL için başka bir reseptör olarak 2016 yılında tanımlanmıştır [55]. RANK'a benzer şekilde, *LGR4* osteoklastlar üzerinde ifade edilmekte, ancak RANK'tan farklı olarak *LGR4*'ün bağlanması, osteoklastların farklılaşmasını, RANKL bağlanması için RANK ile rekabet de dahil olmak üzere, birden çok mekanizma yoluyla negatif olarak düzenlemektedir.

Bu durumda OPG ve *LGR4*, RANK sinyalleşmesinde inhibitor görevi görmektedirler. Şekil 2-4'de RANKL-RANK etkileşimi ve inhibitörleri görülmektedir. RANK, bir transmembran proteindir. Bu reseptörün RANKL ile ligasyonu, kanonik ve

kanonik olmayan NF- κ B, MAPK ve PI3K – AKT yolları gibi aşağı akış sinyal yollarının aktivasyonuna yol açmaktadır. RANK'ın kendisi kinaz aktivitesinden yoksundur ve sinyalleşmesi, başlangıçta tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü ile ilişkili faktör (TRAF) proteinleri (TRAF6 dahil), GRB ile ilişkili bağlayıcı protein 2 (GAB2) ve SRC gibi adaptör molekülleri tarafından aracılık edilmektedir.

RANKL'nin, SRC homoloji 2 (SH2) alan içeren proteinlerle etkileşimlere aracılık eden, çok sayıda prolin bakımından zengin tekrar motifleri içeren bir sitoplazmik kuyruğu olan bir tip II transmembran protein olduğu bilinmektedir. RANKL ligasyonunu takiben ters sinyalleşme, osteoblastogenezin in vitro modellerini kullanan çalışmalarda da bildirilmiştir. Ayrıca, p38 MAPK-bağımlı sinyal yolu yoluyla CD4 + T hücrelerinden IFN γ salgılanmasını modüle edebilmektedir.

RANKL monomerleri, reseptör bağlanması için üç yarık içeren bir trimer oluşturmak üzere oligomerize olmakta ve hedef hücrede sinyalleşme, RANK trimerleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. RANK yoluyla sinyalleşme, zara bağlı RANKL veya çözünür RANKL (sRANKL) ile indüklenebilmektedir. sRANKL, alternatif ekleme veya proteolitik bölünme yoluyla zara bağlı formdan türetilmektedir.



Şekil 2-4: RANKL-RANK etkileşimi ve inhibitörleri [1].

RANKL-RANK etkileşimlerinin endojen inhibitörleri, her ikisi de RANKL'ye bağlanan bitişik hücrelerde sunulan çözünür OPG ve LGR4 içermektedir.

İnsanlardaki RANK sinyalleşmesinin farmakolojik inhibitörleri, anti-RANKL monoklonal antikor denosumab ve bir OPG-Fc füzyon proteindir. Bu inhibitörler, RANKL'ın hem çözünür hem de zara bağlı formlarını hedef almaktadır [1].

2.9. CTSH

CTSH, aminopeptidaz aktivitesine sahip bir lizozomal sistein proteazdır ve immün hücrelerde ekspresyonu bulunmaktadır [8]. CTSH gen mutasyonu ile otoreaktif T hücreler arasındaki olası ilişki sebebiyle otoimmün hastalıklarda CTSH'nin bir katkısı olabileceği düşünülmektedir [9]. CTSH'nin MHC II eksprese eden monositler ve B hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği ve bu şekilde antijen sunumu ile olan olası ilişkisi de bildirilmiştir [2]. CTSH geni; Multiple skleroz ve Tip1 diyabet gibi

otoimmünite temelli birçok hastalıkta, B hücrelerinin düzenlenmesi ve hücre apoptozunda rol alması gibi farklı görevlerde bulunmaktadır [9, 10].

Ayrıca, CTSH'nin osteoklastlarda lokalize olması, bu yönüyle RANK yolağı ile otoantikor üretimi [56], antijen sunumu [57] ve pro inflamatuvar sitokinlerin sekresyonunu [58] içeren üç mekanizma aracılığıyla otoimmüniteyi teşvik ettiği öne sürülmektedir. MG'nin otoimmün bir hastalık oluşu ve CTSH'nin otoimmünitedeki rolü olduğunun bilinmesi, yapılacak olan araştırma için yol gösterici olmaktadır.

2.10. DOMG Fare Modeli

DOMG, hem klinik hem de immünopatojenik yönleriyle insan MG'sini taklit etmektedir. DOMG, otoimmün hastalık patogenezinin hücresel ve moleküler mekanizmalarını incelemek ve spesifik tedavileri tasarlamak için en uygun modeli sağlamaktadır. Safılaştırılmış antijenik yapılar veya antijene özgü IgG tipi antikorlar, deney hayvanlarına enjekte edilerek MG'nin deneysel hayvan modeli oluşturulabilmektedir. Bu model, özellikle antikor aracılı otoimmün hastalıklar için bir prototiptir ve model ile hem T hem de B hücrelerinin hastalık patogenezinde katkısı belirlenebilmektedir [59].

DOMG modeline ilk olarak 1973 yılında *Electrophorus electricus* balığının elektrik organından pürifiye edilen AChR ile tavşanların immünize edilmesi ve MG klinik semptomlarının gözlenmesiyle başlanmıştır [7]. Tavşanlarda kas ve timüs homojenatları ile immünizasyonla DOMG model oluşturma çalışmaları sonraki yıllarda da devam etmiş ve daha sonra DOMG modeli sıçan, kobay, fare hatta maymunlarda oluşturulmuştur.

DOMG modeli iki şekilde oluşturulabilir: Spesifik bir antijen veya antijeni içeren dokuların uygulanmasıyla aktif immünizasyon ya da hasta veya hastalık modeline sahip hayvanların antikorlarının ya da ticari monoklonal veya poliklonal AChR antikorlarının naif hayvanlara enjeksiyonuyla pasif transfer şeklinde olabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.a. Örnekler

Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'ndan temin edilen, aynı enstitünün Sinirbilim Anabilim Dalı'nda MG hastalığına özgü antijen olan AchR ve adjuvan olarak Complete Freund's Adjuvant (CFA) ile immünize edilerek oluşturulan DOMG dişi farelerin total lenf ganglionu kullanılmıştır. Deney grubu olarak torpedo AChR proteini enjekte edilmiş (CFA ile birlikte) dört fareden alınan total lenf ganglionu ve kontrol grubu olarak CFA enjekte edilmiş dört ayrı fareden alınan total lenf ganglionu olarak toplamda sekiz örnek kullanılmıştır. Bu çalışma için etik kurul onayı, Bezmialem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Karar No:28.02.2019) tarafından verilmiştir.

3.1.b. Malzemeler

- Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (Cat. No: 74134)
- NEB The ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat. No: E6300S)
- NEB Luna Universal qPCR Master Mix kiti (Cat. No: M3003S)
- Spesifik primerler
- %70'lik Etanol

3.1.c. Ekipmanlar

- Buzdolabı (+4°C) (Panasonic)
- Derin dondurucular (-20°C ve -80°C) (mdf-u537D)
- PCR cihazı (LightCycler 480, Roche)
- Santrifüj (Beckman Coulter Allegra x-30r)
- Mikropipet seti
- Vorteks (Biosan)
- Nanodrop (NanoDrop Spektrofotometre, ND-2000)
- Buz makinası (Cornelius)
- Mikrosantrifüj tüpü

- Mikropipet ucu
- UV Kabini

3.2. YÖNTEM

3.2.a. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (Cat. No: 74134) kullanılarak yapıldı. RLT buffer içinde bulunan örnek dokuları -80°C'den alındı ve buz üzerine konuldu. Mikro pipet kullanılarak tüp içindeki RLT buffer ve örnek karışımının miktarı belirlendi. %70'lik etanol hazırlandı ve RLT buffer miktarı kadar %70lik etanol eklendi. Pipet ile homojenize edildi. Kitin içeriğinde bulunan RNeasy kolonuna örnek, RLT buffer ve etanol karışımından 700µl aktarıldı. 8000 g de 15 sn. santrifüj edildi. Ölçülen miktarı 700µl den daha fazla olan örnek varsa işlem tekrarlandı.

Kolondan geçerek kolonun altındaki tüpte toplanan süpernatant tüple birlikte atılarak, kolon yeni tüpe aktarıldı. Kolona 700µl Buffer RW1 eklenerek 15 sn. 8000 g de santrifüj edildi. Kolon tekrar temiz tüpe alınarak süpernatant atıldı. Kolonun üzerine 500µl Buffer RPE eklendi. 15 sn. 8000 g'de santrifüj edilerek süpernatant bulunan tüp atılarak kolon temiz tüpe alındı. 500µl lik Buffer RPE tekrar eklenerek bu kez iki dk. 8000 g de santrifüj yapılarak kolon temiz tüpe aktarıldı. Kolon boş olarak bir dk. 12000 g de santrifüj edildi.

Daha sonra kolonun altındaki tüp atılarak, kolon 1,5 ml'lik eppendorfa alındı. 40µl RNase free su eklenerek, bir dk. 8000 g de santrifüj edildi. Kolon atılarak eppendorf -20°C de 15 dakika bekletildi. RNA izolasyonundan sonra tüm örnekler vorteksenerek, RNA konsantrasyonları ve saflıkları Thermo Scientific Nanodrop 2000 cihazı kullanılarak ölçüldü. Nanodrop'ta 260/280 ve 260/230 oranlarına bakılarak RNA kalite ve kantitite tayini yapıldı. 260/280 nm dalga boyunda 1,80-2,00 aralığı örneklerin intaktlığı için kolarak tayin edildi. Ölçüm sonrası RNA'lar -80°C e kaldırıldı.

3.5. cDNA Sentezi

cDNA eldesi için hazır ticari kit kullanıldı. NEB markasının The ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kiti (Cat. No: E6300S) kullanılarak cDNA sentezi

gerçekleştirildi. Kit içeriği Tablo 3-1’de görülmektedir. Tablo 3-2’deki sıcaklık koşulları uygulanarak cDNA sentezi elde edildi.

Tablo 3-1: cDNA eldesi için kullanılan kit içeriği

Oligo d(T)23 VN
M-MuLV Enzyme Mix
M-MuLV Reaction Mix

Tablo 3-2: cDNA eldesi için uygulanan sıcaklık koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
70	5
42	60
80	5

RNA’lar ve kit içeriğindeki bileşenler çözüldü ve buza konuldu. Örnek sayısınınca tüp hazırlandı. Tüplere altı µl örnek RNA ve kit içeriğinde bulunan Oligo d(t)’den iki µl konuldu. Toplamda sekiz µl olacak şekilde tüpler vortekslendi. Bio-Rad Thermal Cyclor cihazına konuldu. RNA molekülüne Oligo d(t) primerinin bağlanması için 70°C de beş dk inkübe edildi. Tüpler buza alınıp beş dk bekletildi.

Ayrı bir tüpte, tüp başına 10 µl Reaksiyon mix ve iki µl Enzim mix gelecek şekilde karışım hazırlandı ve 12 µl şer olarak örnek tüplerine dağıtıldı ve pipet ile karıştırıldı. Negatif kontrol ayrı olarak 10 µl Reaksiyon mix ve iki µl su olarak hazırlandı. 20 µl lik karışım bulunan tüpler ve negatif kontrol Bio-Rad Thermal Cyclor cihazına konuldu, 42°C’de 60 dk ve 80°C’de beş dk inkübe edilerek cDNA sentez işlemi tamamlandı. Elde edilen cDNA’lar -20°C de muhafaza edildi.

3.6. *LGR4* ve *CTSH* gen ekspresyon düzeylerinin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR) yöntemi ile belirlenmesi

Gerçek zamanlı PZR işlemi için hazır ticari kit kullanıldı. NEB markasının Luna Universal qPCR Master Mix kiti (Cat. No: M3003S) ile Gerçek zamanlı PZR işlemi gerçekleştirildi. Kit içeriği ve primerler buz içerisine konuldu. cDNA’lar -20 C° den

çıkarılıp 1:1 oranında sulandırıldı. Mix negatif kontrol de dahil olarak 96 well plate içine dağıtıldıktan sonra, mix dağıtılan kuyucuklara örnek sırasına uygun olarak cDNAlar eklendi.

Aşağıdaki tablo 3-3’de verilen ölçüler ile toplamda 20 µl olacak şekilde her bir kuyucuktaki karışım hazırlandı.

Tablo 3-3: Gerçek zamanlı PZR için hazırlanan karışım

Su	7 µl
Primer Forward	0,5 µl
Primer Reverse	0,5 µl
qPCR Master Mix	10 µl
cDNA	2 µl

Plate santrifüj edilip LightCycler 480 cihazına konuldu. Reaksiyon için aşağıdaki Tablo 3-4’te belirtilen koşullar kullanıldı.

Tablo 3-4: Çalışmada kullanılan Gerçek Zamanlı PZR döngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	1 dk.	1
95	15 sn.	45
60 (Primere göre)	30 sn.	45
95	5 sn	1

Çoğaltılacak gen bölgelerine uygun kullanılacak primerler Primer 3 programı kullanılarak dizayn edilmiş, NCBI Primer Blast program kullanılarak kontrol edilmiştir. Çalışmada ikinci housekeeping gen olarak *GAPDH* kullanılmış ancak istenilen düzeyde sonuç elde edilemediği ve kullanılan dişi fare örneklerine uygun bir gen dizilimi olmadığı için çalışmadan çıkarılmıştır. Tablo 3-5’teki primer dizileri kullanılmıştır.

Tablo 3-5: Çalışmada kullanılan primer dizileri

Gen	Dizi	Tm
<i>LGR4</i> F	GGAGCTATAACACTTGTATTTGGTAGG	60°C
<i>LGR4</i> R	CACTATGTTTAAGATTGCACTGTCC	60°C
<i>CTSH</i> F	AAGACGTACAGCTCGGTGGA	60,89°C
<i>CTSH</i> R	CAGGCCCCCTGATTTTTCCT	60,55°C
<i>ACTB</i> F (housekeeping gen)	CTGGCTCCTAGCACCATGAA	61,3°C
<i>ACTB</i> R (housekeeping gen)	CTGGCTCCTAGCACCATGAA	59,2°C

3.7. İstatiksel Analiz

Yapılan çalışmada hasta grubu ile kontrol grubu (CFA enjeksiyonu yapılan grup) arasındaki gen ekspresyon düzeyindeki farklılıklar Graph Pad programında Mann-Whitney testi ile karşılaştırılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alınmıştır [60].

4. BULGULAR

4.1. İzole Edilen RNA'ların Kalite ve Kantititesi

Hücrelerden RNA'ların izolasyonu sırasında eldeki örneklerin dökülmesi ve az kalan örneklerle deneye devam edilmesi sonucunda, spektrofotometrik olarak belirlenen konsantrasyonun beklenen düzeyde olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca toplam çalışılan örnek sayısı deney grubu n=6 ve kontrol grubu n=4 olarak karşılaştırılmış. İstenilen düzeyde sonuç elde edilememesi sonucunda 7 Ach ve 1 Ach no'lu örnekler çalışmadan çıkarılmıştır. Çalışılan örnek isimleri ve RNA izolasyon ölçümleri Tablo 4-1'de görülmektedir.

Tablo 4-1: RNA izolasyonu ölçüm sonuçları

ÖRNEK	Konsantrasyon(ng/μl)	260/280	260/230
12 Ach	2,6	1,5	0,08
11 Ach	3,1	1,4	0,09
10 Ach	2,6	1,5	0,1
8 Ach	2,3	1,7	0,15
2 CFA	3,6	1,6	0,03
5 CFA	3	2	0,05
4 CFA	1,4	1,6	0,16
1 CFA	3,3	1,7	0,03

4.2. Gen Ekspresyon Düzeyleri

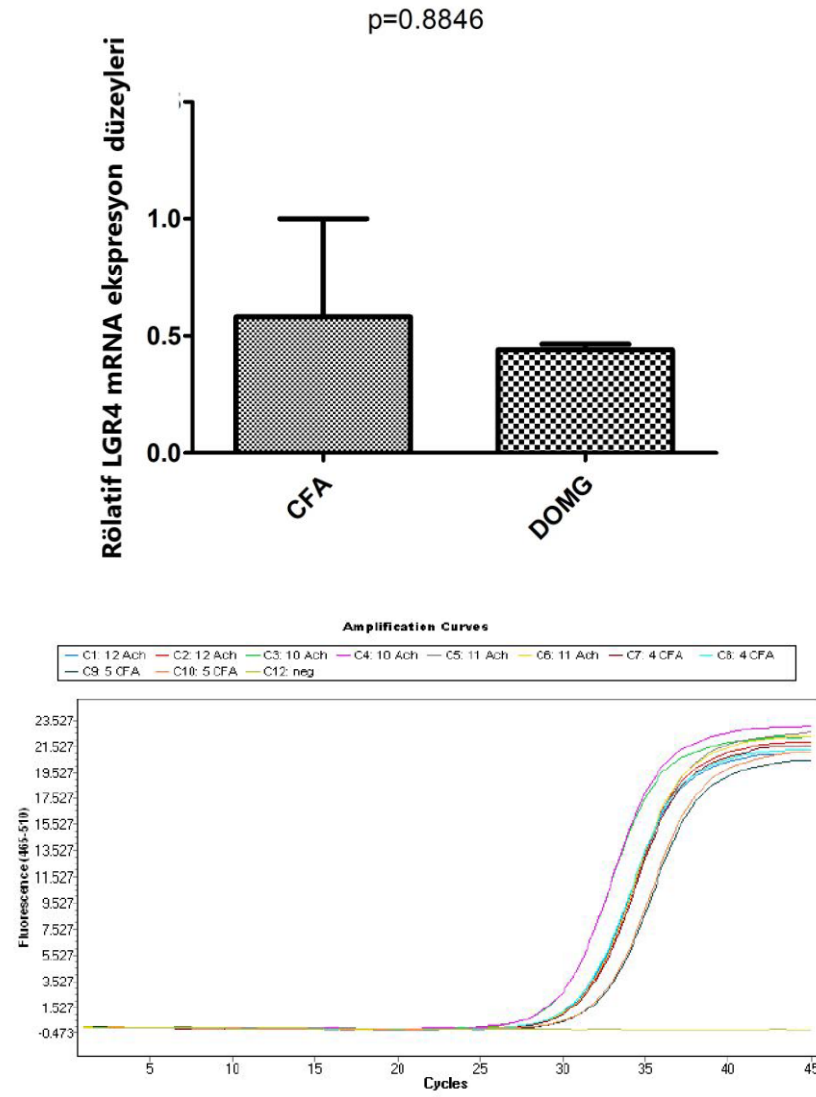
Hesaplanan Ct değerleri ile $2^{-\Delta\Delta CT}$ [60] formülü kullanılarak, hasta fare grubunun (DOMG) gen anlatım düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Beta-actin geni housekeeping gen olarak kullanıldı.

Bu çalışmada, deney grubu dört fareden, kontrol grubu ise dört fareden oluşmaktaydı.

Gerçek Zamanlı PZR analizi sonuçlarına göre *LGR4* ($p=0,88$; $p<0,05$) ve *CTSH* ($p=0,68$; $p<0,05$). genlerinin ifadesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

4.2.1. *LGR4* Geni Transkripsiyon Düzeyleri

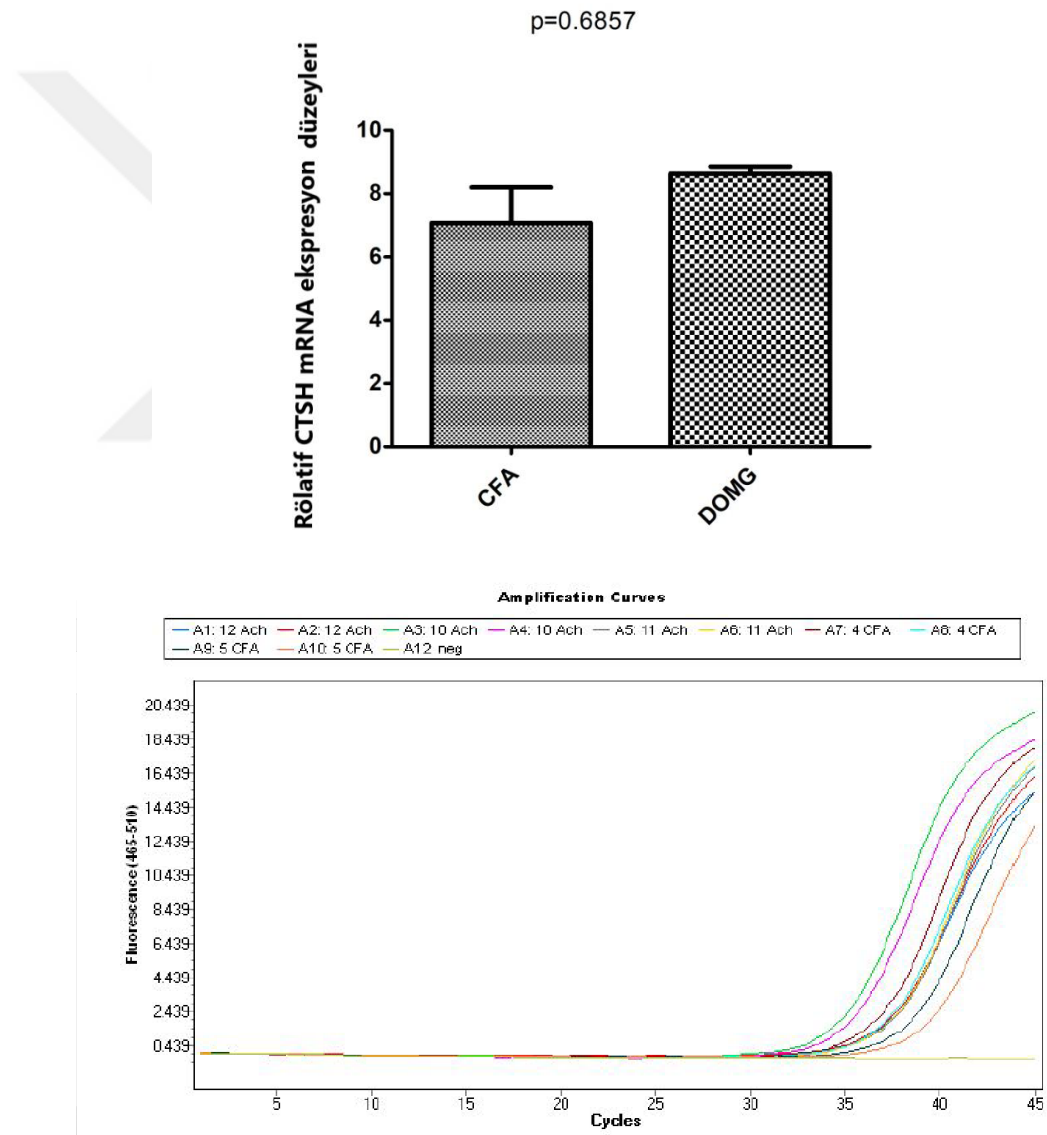
Kontrol ve DOMG oluşturulmuş farelerin total lenf ganglion hücrelerinden elde edilen RNA’larda *LGR4* geni ekspresyon düzeyleri Şekil 4-1’de görülmektedir. Gerçek Zamanlı PZR sonuçları için gruplar arasında *LGR4* gen ekspresyonu bakımından istatistiksel düzeyde anlamlılığa ulaşan farklılık bulunmamıştır ($p=0,88$; $p<0,05$). Genlerin ekspresyon düzeyleri β -Aktin’e göre normalize edilmiştir. Normalize edilen sonuçlara $2(-\Delta\Delta CT)$ formülü uygulanmıştır.



Şekil 4-1: *LGR4* geni transkripsiyon düzeyi ve gen profili.

4.2.3. CTSH Geni Transkripsiyon Düzeyleri

Kontrol ve DOMG oluşturulmuş farelerin total lenf ganglion hücrelerinden elde edilen RNA’larda *CTSH* geni ekspresyon düzeylerinin kıyaslanması Şekil 4-2’de yapılmıştır. Gerçek Zamanlı PZR sonuçları gruplar arasında *CTSH* gen ekspresyonu açısından farklılık bulunmamıştır ($p=0,68$; $p<0,05$). Genlerin ekspresyon düzeyleri β -Aktin’e göre normalize edilmiştir. Normalize edilen sonuçlara $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ formülü uygulanmıştır.



Şekil 4-2: *CTSH* geni transkripsiyon düzeyi ve gen profili.

5.TARTIŞMA

MG kas sistemini tutan ve sinir iletiminin bloke olması ile gerçekleşen bir kas hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Çabuk yorulma ile seyreden nikotinik asetilkolin reseptörlerine karşı anti-AChR antikoru gelişimi, kompleman ile reseptör hasarı oluşumu ile karakterize otoimmün nöromusküler bir hastalık olarak kabul edilmektedir [14].

RANK yolağı ise kemiklerdeki ana hücre olarak kabul edilen osteoblastları, RANK'a, RANKL'nin bağlanması sonucu osteoklastlara ve dolaylı olarak kemiklerde hücre ölümüne götüren bir süreci tamamlayan bir sistemdir.

RANK yolağı ile ilgili, ilk olarak OPG olarak adlandırılan protein, daha sonra kemik rezorpsiyonunu kontrol eden, osteoklastlarda bulunan ve kemik yıkımına neden olan reseptör aktivatör RANK ve onun uyarıcısı RANKL keşfedilmiştir. OPG proteini ise RANKL ile ters sistemde çalışan ve RANKL'nin RANK'a bağlanmasını engelleyen bir görevi yürütmektedir [21].

Bu tez çalışmasında; RANK-RANKL'nin T ve dendritik hücreler arasındaki etkileşimlerin önemli bir düzenleyicisi olabileceği, T hücresine bağlı immün yanıtın düzenlenmesinde rolü olabileceği ve MG tedavisinde sıklıkla kullanılan glukokortikoidlerin kemik yoğunluğu üzerine olan etkisinin bu hastalık özelinde sebep mi yoksa sonuç mu olabileceği araştırıldı.

Çalışma kapsamında deney grubu olarak; torpedo AChR proteini enjekte edilmiş 4 farklı dişi fareden alınan total lenf ganglionu ve kontrol grubu olarak CFA enjekte edilmiş 4 ayrı dişi fareden alınan total lenf ganglionu olarak toplamda 8 örnek kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PZR ile RANK-RANKL yolağındaki *LGR4* ve *CTSH* genlerinin anlatım düzeyleri belirlenmiştir.

Deney için seçmiş olduğumuz *LGR4* geni, osteaklast farklılaşmasını negatif regüle eden ve OPG benzeri işlev gören bir gendir. Yapılan araştırmalar MG'li hastalarda kronik immünosupresyonu amaçlayan tedavi yöntemlerinden glukokortikoidler ve diğer kortikosteroid koruyucu ajanların yan etkileri olarak kemik hastalıklarını arttırdığını göstermektedir. Glukokortikoidler osteoklastogenezi ve kemik

rezorpsiyonunu arttırmaktadır ve osteoblast apoptozunu artırarak kemik oluşumunda belirgin bir azalmaya yol açmaktadır. [53].

DOMG'de anti-tAChR antikorlarının oluşturduğu immün yanıtların kas zayıflığına sebep olurken kemik kaybına eşlik etmesi olasıdır. DOMG farelerinde azalmış kas kuvvetinin, kemik mineral yoğunluğunu belirlemeyi hedef alan bir çalışmada, DOMG farelerinin femurları, CFA ile immünize farelere kıyasla kemik mineral yoğunluğunun anlamlı olarak düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca kemik mineral yoğunluğundaki bu azalma, hastalık şiddeti ile de paralel görünmektedir. Aynı çalışmada, CFA enjekte edilen farelerde, hiçbir şey enjekte edilmemiş farelere kıyasla kemik mineral yoğunluğunda azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Bu ilişkiler bize; innate ve adaptif immün sistemin uyarılmasının, osteoklastogenezi ve kemik kaybını tetikleyen tümör nekroz faktörü ile ilişkili sitokinleri tetiklediğini de göstermektedir [61].

Bir diğer çalışmada, MG'li seksen hasta ve 62 sağlıklı kontrol ile yapılan bir çalışmada, kemik yoğunluğu ve bir dizi kemik ile ilişkili progenitör faktör ve sitokin serum düzeyleri ölçüldü. Kontrollerle karşılaştırıldığında hastaların, lomber, femur boynu ve tüm vücutta kemik mineral yoğunluğunun önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. MG hastalarının % 14'ünde lomber omurgada ve % 2,5 femur boynunda osteoporoz mevcuttu. Bu çalışmada hastalar sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, MG'li hastalar daha düşük osteokalsin, adrenokortikotropik hormon, paratiroid hormonu, sklerostin, TNF- α ve DKK-1 ve daha yüksek FGF-23, leptin ve IL-6 düzeylerine sahip olduğu görülmüştür.. Bunun yanında kümülatif glukokortikoid dozu ile serum kalsiyumu, lomber omurga T-skoru, femur boynu BMD, T-skoru ve Z-skoru arasında negatif korelasyon belirlenmiştir.. Ayrıca daha yüksek TNF- α düzeylerine sahip olanların daha düşük kemik kütlesine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada kortikoterapi altındaki MG hastalarının ilaç etkisi sebebiyle düşük kemik yoğunluğu ve değişmiş kemik belirteç düzeyleri göstermesi, ilaç kullanmayan naif hastalarda bu tip çalışmaların yapılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır [62].

Bu araştırmalara dayanarak yapılan bu tez çalışmasında, *LGR4* gen ekspresyon oranının DOMG grubunda azalması beklenmekteydi. Çalışma sonuçlarımıza göre DOMG modellenmiş farelerde kontrol grubuna kıyasla *LGR4* ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasada azalma eğilimi gözlenmiştir.

CTSH, otoimmünite ile bağlantılı olan ve protein geri dönüşümü, antijen işleme, peptit-MHC II etkileşimi dahil olmak üzere birçok hücresel süreçte önemli rol oynayan bir endozomal / lizozomal enzimdir. Önceki çalışmalar, *CTSH*'nin monositler ve B hücreleri gibi MHC II pozitif immün hücrelerde yüksek oranda eksprese olduğunu ileri sürmektedir [2]. Aynı zamanda *CTSH* geninin osteoklastlarda lokalize olduğu da bilindiği için yapılan bu çalışmada *CTSH* gen ekspresyonunun artması beklenmekteydi.. İstatiksel olarak anlamlı olmasada DOMG farelerde kontrol grubuna oranla *CTSH* ekspresyon düzeylerinde artma eğiliminde olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına bakıldığında, *LGR4* geni ekspresyon düzeylerinde ve *CTSH* geni ekspresyon düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmasa da *LGR4* ekspresyon düzeyi düşme eğilimi, *CTSH* ekspresyon düzeyi ise yükselme eğilimi göstermektedir. Gen ekspresyonunda istatistiksel anlamlılığa ulaşmayan farklılıkların çalışmaya dahil edilen fare sayısının azlığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın, *LGR4* ve *CTSH* ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olmasa da MG patogenezindeki öneminin belirlenmesine olanak sağlayacağı öngörülmektedir. Buradan yola çıkarak gelecek çalışmalar için katkı sağlayabilmesi ve farklı bakış açıları kazandırabilmesi beklenmektedir. Bu çalışma, *LGR4* ile *CTSH*'nin hastalık patogenezindeki rolünü belirlemek için ilk defa DOMG fareler üzerinde yapılmış bir araştırma olup, sonuçların validasyonu açısından daha detaylı analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Ahern, E., Smyth, M.J., Dougall, W.C., & Teng, M.W. (2018). Roles of the RANKL–RANK axis in antitumour immunity — implications for therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15, 676-693.
2. Kostenuik PJ, Shalhoub V. (2001) Osteoprotegerin: A Physiological and Pharmacological Inhibitor of Bone Resorption. *Curr Pharm Des.* 7: 613-35.
3. Söderström M, Salminen H, Glumoff V, Kirschke H, Aro H, Vuorio E. Cathepsin expression during skeletal development. *Biochim Biophys Acta*1999;1446:35–46.
4. Heymann, D., Renema, N., Navet, B. et al. (2 more authors) (2016) RANK-RANKL signalling in cancers. *Bioscience Reports*, 36 (4). e00366. ISSN 1573-4935.
5. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*. 2000 Nov 30;408(6812):600-5.
6. Takayanagi H. (2005) Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodont Res.* 40: 287–93.
7. Patric J, Lindstrom JM. Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science*. 1973. 180:871.
8. Lafuse WP, Brown D, Castle L, Zwilling BS. IFN- γ increases cathepsin H mRNA levels in mouse macrophages. *J Leukoc Biol.* 1995;57:663–9.
9. Faraco J, Lin L, Kornum BR, et al. ImmunoChip study implicates antigen presentation to T cells in narcolepsy. *PLoS Genet.* 2013;9:e1003270.
10. Allan ERO, Yates RM. Redundancy between cysteine cathepsins in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One.* 2015;10:e0128945.
11. Martignago S, Fanin M, Albertini E, Pegoraro E, Angelini C. Muscle histopathology in Myasthenia Gravis with antibodies against MuSK and AChR. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2009 Feb. 35(1):103-10.](Keller DM. Late-Onset Myasthenia Gravis Linked to Higher Cancer Risk. *Medscape Medical News.* Jul 2 2013.

12. Liu CJ, Chang YS, Teng CJ, et al. Risk of extrathymic cancer in patients with Myasthenia Gravis in Taiwan: a nationwide population-based study. *Eur J Neurol*. 2012 May. 19(5):746-51.
13. Gajdos P, Chevret S, Toyka K. Intravenous immunoglobulin for Myasthenia Gravis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Jan 23. CD002277.
14. Wong SH, Huda S, Vincent A, Plant GT. Ocular Myasthenia Gravis: controversies and updates. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2014; 14:421.
15. Strauss AJL, Seigal BC, Hsu KC. Immunofluorescence demonstration of a muscle binding complement fixing serum globulin fraction in Myasthenia Gravis. *Proc Soc Exp Biol*. 1960. 105:184.
16. Jaretzki A 3rd, Barohn RJ, Ernstoff RM, et al. Myasthenia Gravis: recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. *Neurology*. 2000 Jul 12. 55(1):16-23.
17. Padua L, Stalberg E, LoMonaco M, Evoli A, Batocchi A, Tonali P. SFEMG in ocular Myasthenia Gravis diagnosis. *Clin Neurophysiol*. 2000 Jul. 111(7):1203-7.
18. Gilhus NE, Verschuuren JJ. Myasthenia Gravis: subgroup classification and therapeutic strategies. *Lancet Neurol*. 2015 Oct. 14 (10):1023-36.
19. Deymeer F. Myasthenia gravis: MuSK MG, late-onset MG and ocular MG. *Acta Myol*. 2020 Dec 1;39(4):345-352.
20. W. R. Tompson, C. T. Rubin, and J. Rubin, "Mechanical regulation of signaling pathways in bone," *Gene*, vol. 503, no. 2, pp. 179–193, 2012.
21. B. F. Boyce and L. Xing, "Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 473, no. 2, pp. 139–146, 2008.
22. Yilmaz V, Ulusoy C, Hajtovic S, Turkoglu R, Kurtuncu M, Tzartos J, Lazaridis K, Tuzun E. Effects of Teriflunomide on B Cell Subsets in MuSK-Induced Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis and Multiple Sclerosis. *Immunol Invest*. 2020 Jun 29:1-14.
23. Wolfe GI, Kaminski HJ, Aban IB, Minisman G, Kuo HC, et al. Randomized Trial of Thymectomy in Myasthenia Gravis. *N Engl J Med*. 2016 Aug 11. 375 (6):511-22.

24. Gilhus NE, Tzartos S, Evoli A, Palace J, Burns TM, Verschuuren JJGM. Myasthenia gravis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 May 2;5(1):30.
25. Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ. Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest*. 2006;116(11):2843-2854.
26. Peeler CE, De Lott LB, Nagia L, et al. Clinical utility of acetylcholine receptor antibody testing in ocular Myasthenia Gravis. *JAMA Neurol* 2015; 72:1170–1174.
27. L. Vannucci, “Calcium intake in bone health: a focus on calcium-rich mineral waters,” *Nutrients*, vol. 10, no. 12, 2018.
28. C. Cooper, G. Campion, and L. J. Melton III, “Hip fractures in the elderly: a world-wide projection,” *Osteoporosis International*, vol. 2, no. 6, pp. 285–289, 1992.
29. S. A. Seem, Y. V. Yuan, and J. C. Tou, “Chocolate and chocolate constituents influence bone health and osteoporosis risk,” *Nutrition*, vol. 65, pp. 74–84, 2019.
30. B. F. Boyce and L. Xing, “RANKL/RANK/OPG pathway,” *Current Osteoporosis Reports*, vol. 5, no. 3, pp. 98–104, 2007.
31. Ming J, Cronin SJF, Penninger JM. Targeting the RANKL/RANK/OPG Axis for Cancer Therapy. *Front Oncol*. 2020 Aug 7;10:1283.
32. J. L. Fleg, “Aerobic exercise in the elderly: a key to successful aging,” *Discovery Medicine*, vol. 13, no. 13, pp. 223–228, 2012.
33. T. Wada, T. Nakashima, N. Hiroshi, and J. M. Penninger, “RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease,” *Trends in Molecular Medicine*, vol. 12, no. 1, pp. 17–25, 2006.
34. T. Ikeda, M. Kasai, M. Utsuyama, and K. Hirokawa, “Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus,” *Endocrinology*, vol. 142, no. 4, pp. 1419–1426, 2001.
35. C. C. Lynch, A. Hikosaka, H. B. Acuff et al., “MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL,” *Cancer Cell*, vol. 7, no. 5, pp. 485–496, 2005.

36. P. Collin-Osdoby, "Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin," *Circulation Research*, vol. 95, no. 11, pp. 1046–1057, 2004.
37. T. Nakashima, M. Hayashi, T. Fukunaga et al., "Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression," *Nature Medicine*, vol. 17, no. 10, pp. 1231–1234, 2011.
38. D. L. Lacey, E. Timms, H.-L. Tan et al., "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation," *Cell*, vol. 93, no. 2, pp. 165–176, 1998.
39. N. Bucay, I. Sarosi, C. R. Dunstan et al., "osteoprotegerindeficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification," *Genes & Development*, vol. 12, no. 9, pp. 1260–1268, 1998.
40. J. Li, I. Sarosi, X.-Q. Yan et al., "RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 4, pp. 1566–1571, 2000.
41. J. Li, "Combination of TNF-alpha and IL-1 beta induced osteoclast formation and bone resorption is dependent on RANK signal transduction," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 16, 2001.
42. J. E. Fata, Y.-Y. Kong, J. Li et al., "The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development," *Cell*, vol. 103, no. 1, pp. 41–50, 2000.
43. H.-H. Kim, D. E. Lee, J. N. Shin et al., "Receptor activator of NF-kappaB recruits multiple TRAF family adaptors and activates c-Jun N-terminal kinase," *FEBS Letters*, vol. 443, no. 3, pp. 297–302, 1999.
44. N.-S. Kim, H.-J. Kim, B.-K. Koo et al., "Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26, no. 3, pp. 1002–1013, 2006.
45. Y. Li, G. Toraldo, A. Li et al., "B cells and Tcells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo," *Blood*, vol. 109, no. 9, pp. 3839–3848, 2007.

46. R. Lala, P. Matarazzo, S. Bertelloni, F. Buzi, F. Rigon, and C. de Sanctis, "Pamidronate treatment of bone fibrous dysplasia in nine children with McCune-Albright syndrome," *Acta Paediatrica* (Oslo, Norway: 1992), vol. 89, no. 89, pp. 188–193, 2000.
47. G. Schett, "Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone," *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 41, no. 12, pp. 1361–1366, 2011.
48. H. Ullum, P. M. Haahr, M. Diamant et al., "Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC," *Journal of Applied Physiology*, vol. 77, no. 1, pp. 93–97, 1994.
49. B. Specker, N. W. *iex, and R. G. Sudhagoni, "Does exercise influence pediatric bone? A systematic review," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 473, no. 11, pp. 3658–3672, 2015.
50. B. F. Boyce and L. Xing, "Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 9, no. Suppl 1, p. S1, 2007.
51. Grossman JM, Gordon R, Ranganath VK, Deal C, Caplan L, Chen W, Curtis JR, Furst DE, McMahon M, Patkar NM, Volkmann E, Saag KG (2010) American College of Rheumatology 2010 recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arthritis Care Res* 62:1515–1526.
52. Wakata N, Nemoto H, Sugimoto H (2004) Bone density in Myasthenia Gravis patients receiving long-term prednisolone therapy. *Clin Neurol Neurosurg* 106:139–141.
53. Konno S, Suzuki S, Masuda M, Nagane Y, Tsuda E, Murai H, Imai T, Fujioka T, Suzuki N, Utsugisawa K (2015) Association between glucocorticoid-induced osteoporosis and Myasthenia Gravis: a cross-sectional study. *PLoS One* 10:17.
54. Maricic M, Gluck O (2004) Densitometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Densitom* 7:359–363.
55. Luo, J. et al. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Nat. Med.* 22, 539–546 (2016).

56. Orban T, Sosenko JM, Cuthbertson D, Krischer JP, Skyler JS, Jackson R, et al. Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the diabetes prevention trial-type 1. *Diabetes Care* 2009;32(12):2269–74.
57. Serreze DV, Fleming S, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* (Baltimore, Md: 1950) 1998;161:3912–8.
58. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* 2000;1(6):475–82.
59. Christadoss, P., Henderson, R., and Keve, S. 1991. Daunomycin treatment prevents clinical expression of experimental autoimmune Myasthenia Gravis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 59:246-255.
60. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
61. Oshima, M., Iida-Klein, A., Maruta, T., Deitiker, P.R., Atassi, M.Z. Decreased bone mineral density in experimental myasthenia gravis in C57BL/6 mice. *Autoimmunity.* 2017 Sep;50(6):346-353.
62. Braz, N.F.T., Rocha, N.P., Vieira, E.L.M., Gomez, R.S., Barbosa, I.G., Malheiro, O.B., Kakehasi, A.M., Teixeira, A.L. Negative impact of high cumulative glucocorticoid dose on bone metabolism of patients with myasthenia gravis. *Neurol Sci.* 2017 Aug;38(8):1405-1413.

ETİK KURUL



MIYASTENİ GRAVIS FARE MODELİNDE RANK YOLAĞINDA YER ALAN LGR4 VE CTSH GENLERİNİN ANLATIM SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI-2

ORJİNALLİK RAPORU

%**9**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**7**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**5**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

%**2**

2

Submitted to Kirikkale University

Öğrenci Ödevi

%**1**

3

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

%**1**

4

acikerisim.kirklareli.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**1**

5

issuu.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

kasder.org.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

www.noroloji.org.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%**1**

www.sporbilim.com

ÖZGEÇMİŞ

