

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

**OTOZOMAL RESESİF LİMB-GİRDLE KAS DİSTROFİSİ TANISI ALAN  
AİLELERDE YENİ GEN ARAŞTIRILMASI**

**Gölsüm KAYMAN KÜREKÇİ**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2014**

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

**OTOZOMAL RESESİF LİMB-GİRDLE KAS DİSTROFİSİ TANISI ALAN  
AİLELERDE YENİ GEN ARAŞTIRILMASI**

**Gölsüm KAYMAN KÜREKÇİ**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Pervin DİNÇER**

**ANKARA  
2014**

**Anabilim Dalı:** Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Program:** Yüksek Lisans

**Tez Başlığı:** Otozomal resesif limb-girdle kas distrofisi tanısı alan ailelerde yeni gen araştırılması

**Öğrenci Adı-Soyadı:** Gülsüm Kayman Kürekçi

**Savunma Sınavı Tarihi:** 21 ocak 2014

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Nurten AKARSU  
Hacettepe Üniversitesi

Tez danışmanı: Prof. Dr. Pervin DİNÇER  
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Çetin KOCAEFE  
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU  
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç. Dr. Beril TALİM  
Hacettepe Üniversitesi

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU  
Müdür

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana yol gösteren, cesaret veren ve sürekli desteğini benden esirgemeyen, tez çalışmamın bu aşamaya gelmesini sağlayan değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Pervin Dinçer'e, çok değerli önerileri ve katkıları için Yrd. Doç. Dr. Beril Talim'e, çalışmamı okuyarak değerli yorumlarını benimle paylaşan tez jüri üyeleri Prof. Dr. Nurten Akarsu, Doç. Dr. Çetin Kocaefe ve Doç. Dr. Banu Peynircioğlu'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirildiği Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve eğitimime katkıda bulunan tüm hocalarıma, çalışanlarına, laboratuvar tekniklerini öğrenmeme yardımcı olan sevgili Öğr. Gör. Dr. Burcu Hayta ve araştırmacı arkadaşlarıma, yol arkadaşım ve sevgili dostum Cansın Güler'e ve tüm bölüm arkadaşlarıma bana gösterdikleri ilgi ve dostluktan dolayı teşekkür ederim.

Uzaktadayken benden manevi desteklerini asla esirgemeyen sevgili annem, canım babam, biricik kardeşim ve ablama sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışma süresince sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla bana destek veren, her zaman yanımda olacağını bildiğim, tüm güzellikleri hak eden ve bana yaşatan eşim Yusuf Mustafa Kürekçi'ye en derin sevgilerimi sunarım.

Bu tez TÜBİTAK tarafından 112S271 projesi ile desteklenmiştir.

## ÖZET

**Kayman Kürekçi, G. Otozomal resesif limb-girdle kas distrofisi tanısı alan ailelerde yeni gen araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2014.** Limb-girdle kas distrofileri (LGMD) proksimal kaslarda simetrik olarak ilerleyen kas güçsüzlüğünün görüldüğü, klinik ve genetik heterojenite ile karakterize olan kalıtsal kas hastalığı grubudur. Bu tezde, otozomal resesif LGMD (LGMD2) klinik tanısı alan ve bilinen LGMD2 lokuslarına bağlantı göstermeyen, ebeveynlerin akraba olduğu dört farklı aile çalışılmıştır. Tez çalışmasında, 250K Nspl çipleri ile yapılan genom boyu SNP (tek nükleotid polimorfizmi) genotipleme verileri kullanılarak homozigotluk haritalaması yaklaşımı ile LGMD2'den sorumlu yeni bir mutant genin kromozomdaki lokalizasyonunun saptanması amaçlanmıştır. Üç hasta bireyin bulunduğu bir ailede, 1q25 kromozom bölgesinde kısa bir homozigot haplotip tespit edilmiştir. DNA dizi analizi sonucunda, LAP1B (*lamina-associated polypeptide 1B*) proteinini kodlayan *TOR1AIP1* (*torsin A-interacting protein 1*) geninde hastalarda homozigot c.186delG mutasyonu (p.E62fsTer25) saptanmıştır. Kantitatif gerçek zamanlı PZR ile hasta çizgili kas dokusunda *TOR1AIP1* mRNA ifadesinin 5,88 kat azaldığı tespit edilmiştir. Western blot ve immünfloresan boyama çalışmaları ile hastada 66,3kDa büyüklüğündeki LAP1B izoformunun kas hücrelerinde ifade olmadığı saptanmıştır. Kas liflerinin çekirdeklerinde, çekirdek membranı parçalanması ve anormal kromatin yoğunlaşması gibi yapısal bozukluklar gözlenmiştir. LAP1B çekirdek iç membranında yerleşim gösteren, A ve B laminlere bağlanan ve torsin A ATPazının regülasyonunda görevli bir integral membran proteindir. Bu tez çalışması, çekirdek zarfı hastalıklarına neden olan mutant gen spektrumunu genişletmiş ve LAP1B'nin çizgili kasta kritik bir role sahip olduğunu göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Limb-girdle kas distrofisi, homozigotluk haritalaması, TOR1AIP1, LAP1.

**Destekleyen Kurum:** TÜBİTAK, Proje 112S271.

## ABSTRACT

**Kayman Kürekçi, G. Genetic study of families diagnosed with autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Master of Science Thesis in Medical Biology, Ankara, 2014.** Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) are a clinically and genetically heterogeneous group of hereditary muscle disorders characterized by symmetric, proximal and progressive muscular weakness. In this thesis, four consanguineous families diagnosed with autosomal recessive LGMD (LGMD2) which are not linked to any of the known LGMD2 loci were studied. The aim of this thesis was to identify the chromosomal localization of a novel mutant gene responsible for LGMD2 by performing genome-wide homozygosity mapping using 250K NspI SNP array data. In one family, the disease was mapped to a homozygous haplotype in chromosomal region 1q25. DNA sequencing of *TOR1AIP1* encoding LAP1B (lamina-associated polypeptide 1B) in this critical chromosomal region showed a homozygous c.186delG mutation (p.E62fsTer25) in the three affected individuals. Relative quantitation of *TOR1AIP1* mRNA by quantitative real-time PCR showed that the level of expression in the skeletal muscle of the patient was 5,88-fold lower than in the control sample. Western blot and immunofluorescent staining demonstrated that LAP1B was absent in the patient's skeletal muscle fibres. Ultrastructural examination showed alterations of the nuclear envelope including nuclear fragmentation and altered chromatin condensation. LAP1B is an integral protein of the inner nuclear membrane that binds to both A-type and B-type lamins, and is involved in the regulation of torsin A ATPase. This thesis expands the spectrum of genes associated with nuclear envelopopathies and underlies a critical role for LAP1B in striated muscle.

**Keywords:** Limb-girdle muscular dystrophy, homozygosity mapping, TOR1AIP1, LAP1.

**Supporting institution:** TÜBİTAK, Project 112S271.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Limb-Girdle Kas Distrofileri	4
2.2. Tek Gen Hastalıklarından Sorumlu Mutant Genlerin Tanımlanması	6
2.3. Homozigotluk Haritalaması	8
2.4. Aday Gen Belirleme	9
2.5. Mutasyonun Saptanması	10
2.6. Amaç	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	12
3.1. Bireyler ve Gereçler	12
3.1.1. Çalışmada incelenen aileler	12
3.1.2. Homozigotluk haritalaması	12
3.1.3. Primer dizilerinin oluşturulması	12
3.1.4. Polimeraz zincir reaksiyonu	13
3.1.5. DNA agaroz jel elektroforezi	13
3.1.6. DNA dizi analizi	13
3.1.7. cDNA sentezi	14

3.1.8. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu	14
3.1.9. Protein izolasyonu ve miktar tayini	14
3.1.10. SDS poliakrilamid jel elektroforezi	14
3.1.11. <i>Western blot</i>	15
3.1.12. İmmünfloresan boyama	16
3.2. Yöntemler	17
3.2.1. Homozigotluk haritalaması	17
3.2.2. Aday gen belirleme	18
3.2.3. Aday gen <i>TOR1AIP1</i> için yapılan PZR ve DNA dizi analizi çalışmaları	19
3.2.4. cDNA sentezi	23
3.2.5. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu	24
3.2.6. Kontrol ve hasta kas dokularından protein izolasyonu	26
3.2.7. Protein miktar tayini	27
3.1.8. <i>Western blot</i> alışması	27
3.2.9. İmmünfloresan boyama	30
3.2.10. Eř immünfloresan boyama	31
4. BULGULAR	33
4.1. Homozigotluk Haritalaması Sonuçları	33
4.2. Aday Genlerin Araştırılması	37
4.3. A Ailesinde Aday Gen <i>TOR1AIP1</i> İçin Yapılan DNA Dizi Analizi alışması	40
4.4. Sağlıklı Türk Toplumunu Taraması	46
4.5. <i>TOR1AIP1</i> İfadesinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Analiz Edilmesi	47
4.6. <i>TOR1AIP1</i> Tarafından Kodlanan LAP1B Proteini İfadesinin <i>Western Blot</i> ile İncelenmesi	50
4.7. LAP1B Yerleşiminin İmmünfloresan Boyama ile İncelenmesi	51
5. TARTIşMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
6.1. Sonuç	63



6.2. Öneriler	64
KAYNAKLAR	67
EKLER	
EK 1. Etik Kurul izni raporu	
EK 2. A ailesinin hasta bireylerine ait klinik ve histopatolojik bulgular	
EK 3. A ailesinden IV:2 nolu hasta kasına ait elektron mikroskopisi bulguları	
EK 4. A ailesinden IV:2 nolu hasta kasında LAP1B'nin etkileşimde olduğu lamin A/C, lamin B ve emerlin yerleşimlerini gösteren immünfloresan boyama görüntüleri	
EK 5. A ailesinde IV:2 nolu hasta kasında LULL1 protein ifadesini gösteren <i>western blot</i> bulguları	
EK 6. A ailesinden IV:2 nolu hasta kasında LAP1B ile etkileşimde olan torsin A ve LULL1 proteinlerinin yerleşimlerini gösteren immünfloresan boyama görüntüleri	
EK 7. 18. Dünya Kas Cemiyeti Uluslararası Kongresi, Kalifornia, ABD (1-5 Ekim 2013) toplantısında sunulan sözlü bildirinin özeti	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

° C	Derece santigrad
ACTB	Beta-aktin
APS	Amonyum persülfat
bç	Baz çifti
BCA	<i>Bichinconinic Acid</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMD	Becker kas distrofisi
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cDNA	Komplementer DNA
CK	Kreatin kinaz
CMD	Konjenital kas distrofisi
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
C <sub>t</sub>	<i>Cycle of threshold</i>
DAPI	4', 6-diaminodino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirokarbonat
dk.	dakika
DMD	Duchenne kas distrofisi
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
EDMD	<i>Emery Dreifuss</i> kas distrofisi
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
g	gravity
H&E	Hematoksilen-Eozin
HRP	<i>Horseradish</i> peroksidaz
kDa	Kilo dalton
kG-PZR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
LAP1B	<i>Lamina-associated polypeptide 1B</i>

LGMD	Limb-girdle kas distrofisi
LULL1	<i>Luminal domain like LAP1</i>
Mb	Megabaz
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NspI	NspI restriksiyon endonükleaz
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Tuzlu fosfat tamponu
PFA	Paraformaldehit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
sn.	Saniye
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
TAE	Tris-asetat-EDTA
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS-T	Tuzlu Tris Tamponu ve Tween 20
TOR1AIP1	<i>Torsin A-interacting protein 1</i>
TOR1AIP2	<i>Torsin A-interacting protein 2</i>
U	Ünite
VIGENOS	<i>Visual Genome Studio</i>
vs.	vesaire

## ŞEKİLLER

	Sayfa
1.1. Tez çalışmasında incelenen dört aileye ait aile ağaçları	3
4.1. A ailesi için yapılan genom boyu homozigotluk haritalaması sonucu 1q25.2 kromozom bölgesinde tespit edilen homozigot haplotip	34
4.2. B ailesi için yapılan genom boyu homozigotluk haritalaması sonucu 4p13 ile 4q13.2 arasında tespit edilen 26Mb uzunluğundaki homozigot haplotip	35
4.3. LAP1B proteininin yapısı ve yerleşimi	38
4.4. Saflaştırılan PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü	41
4.5. <i>TOR1AIP1</i> ekson 1 bölgesinin A ailesinin hasta bireylerine ait kromatogram görüntüleri	42
4.6. <i>TOR1AIP1</i> c.186delG mutasyonunu heterozigot formda taşıyan A ailesi bireylerine ait kromatogram görüntüleri	43
4.7. LGMD2 tanısı alan A ailesinde <i>TOR1AIP1</i> c.186delG mutasyonunun aile içi segregasyonu	46
4.8. <i>TOR1AIP1</i> ekson 1 bölgesinin sağlıklı bireye ait kromatogram görüntüsü	47
4.9. Kontrol ve hasta kas dokusunda <i>ACTB</i> mRNA ifade düzeyinin analizi	48
4.10. Kontrol ve hasta kas dokusunda <i>TOR1AIP1</i> mRNA ifade düzeyinin analizi	49
4.11. Kantitatif gerçek-zamanlı PZR çalışması sonucunda hesaplanan <i>TOR1AIP1</i> transkriptinin göreceli konsantrasyonu	50
4.12. Anti-LAP1 antikoru ile yapılan western blot çalışması sonucu	51
4.13. LAP1B proteininin kontrol ve hasta IV:2 iskelet kası immünfloresan boyama görüntüleri	52
4.14. LAP1B (yeşil) ve laminin alfa-2 (kırmızı) eş boyama görüntüleri	53
5.1. <i>TOR1AIP1</i> 'de c.186delG mutasyonunun protein dizisi üzerindeki etkisi	57
5.2. LAP1, LULL1 ve torsin A ilişkisi modeli	61

## TABLOLAR

	Sayfa
2.1. Mutant olmaları durumunda LGMD2 fenotipine neden olan genler	5
3.1. A ailesine ait aile ağacı dosyası	17
3.2. <i>TOR1AIP1</i> primer dizileri	19
3.3. Kantitatif gerçek zamanlı PZR primer dizileri	24
3.4. BCA protein <i>assay</i> için standart örneklerin sulandırım oranları	27
4.1. 250K Nspl SNP genotipleme oranları	33
4.2. C ve D ailelerinde homozigotluk haritalaması sonucunda farklı kromozomlarda tespit edilen homozigot haplotipler	36
4.3. 1q25.2 kromozom bölgesinin 178.100.703 ile 179.925.538 baz çiftleri arasında yer alan genler	37
4.4. Çekirdek zarfı proteinlerini kodlayan genler, gen ürünleri ve mutant olmaları durumunda neden oldukları kas distrofisi fenotipleri	39
4.5. Saflaştırılmış <i>TOR1AIP1</i> PZR ürünlerinin nanospektrofotometrik ölçüm değerleri	41

## 1. GİRİŞ

Kas distrofileri ilerleyici iskelet kası dejenerasyonu ve zayıflığı ile karakterize olan klinik ve genetik heterojenitenin olduğu bir grup kalıtsal kas hastalığıdır (1). Klinik seyirleri farklı olan *Duchenne* (DMD), *Becker* (BMD), *Limb-girdle* (LGMD), Konjenital (CMD), Fasioskopulohumeral, Miyotonik, Okülofaringeal, Distal ve *Emery-Dreifuss* (EDMD) olmak üzere dokuz gruba ayrılır (2).

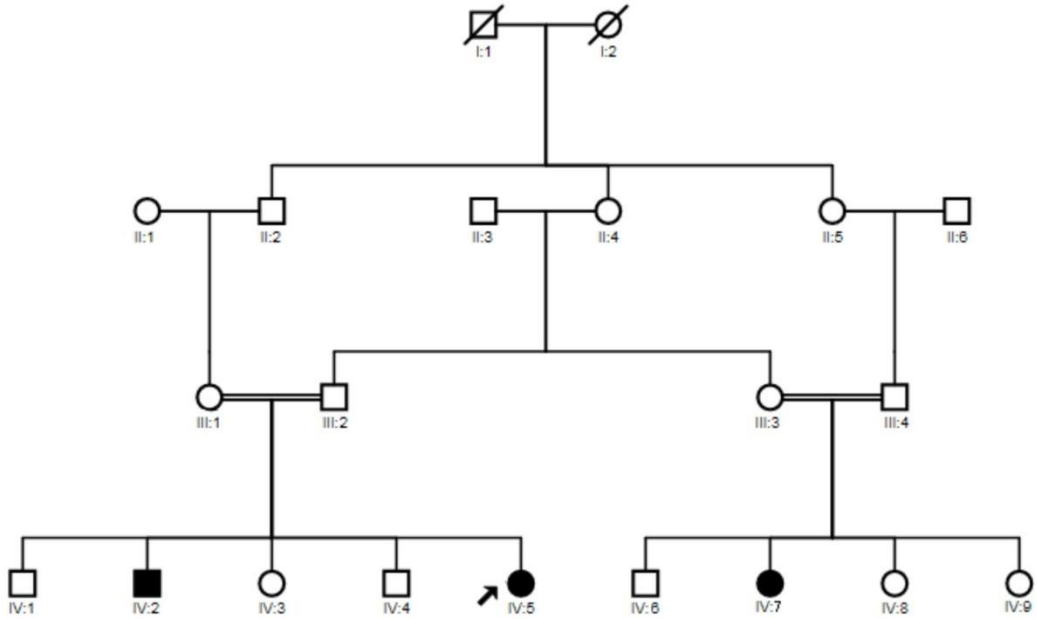
Limb-girdle kas distrofileri (LGMD) pelvik ve omuz kuşağındaki kaslarda simetrik, ilerleyici kas güçsüzlüğü ile karakterize bir hastalık grubudur (3). Otozomal dominant (LGMD1) ve otozomal resesif (LGMD2) olarak aktarılmaktadır (4). Ülkemizde akraba evlilikleri oranının özellikle doğu ve güneydoğu bölgelerinde %39'a ulaşması, otozomal resesif kalıtım gösteren LGMD2 grubunun insidansını artırmaktadır (5). Ülkemizde LGMD2 ailelerinin %90'ında akraba evliliği gözlenmiş olup mevcut verilere göre LGMD2 grubunun toplumumuzdaki prevalansının 1:8250 olduğu bulunmuştur (6).

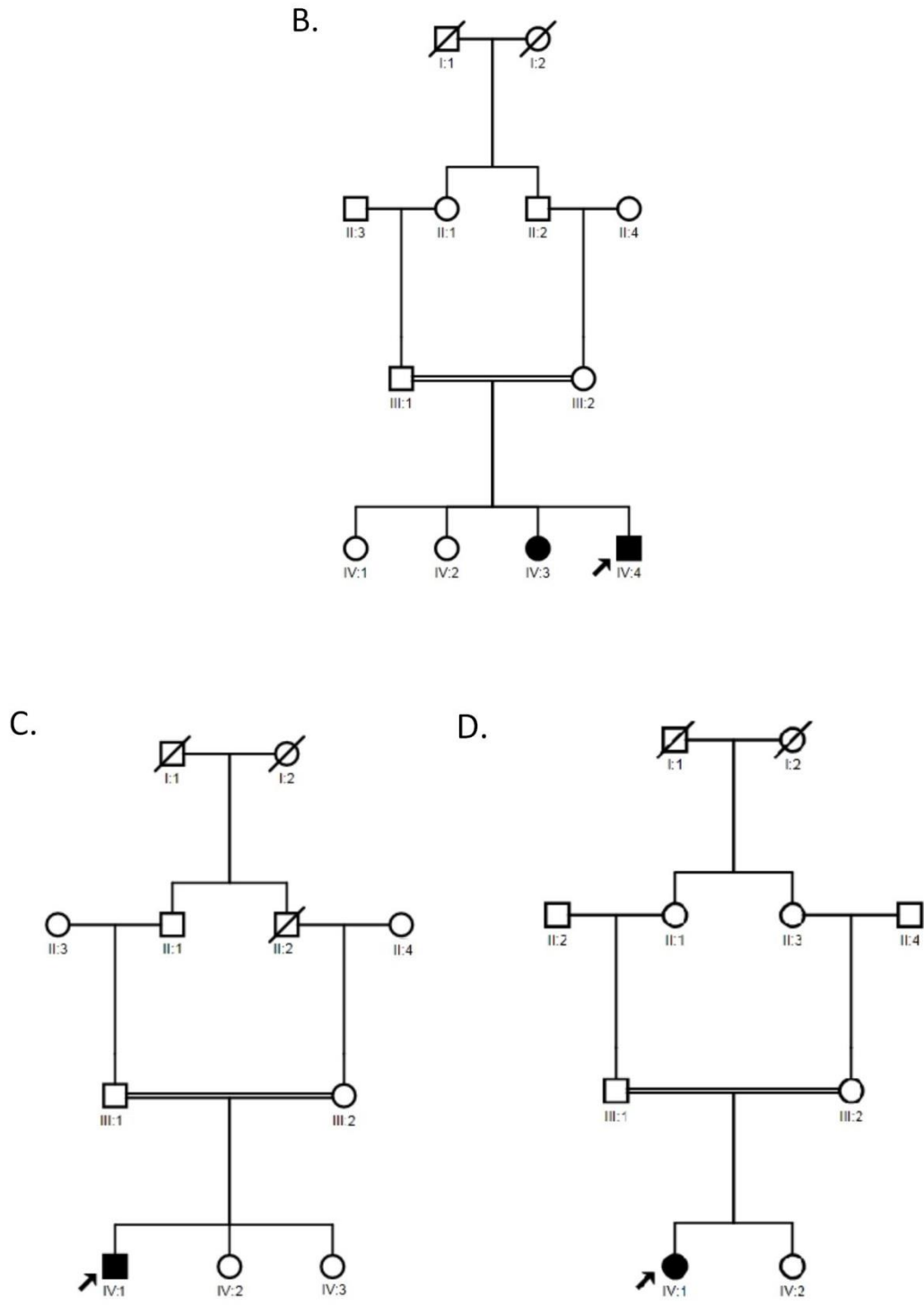
Günümüze kadar LGMD2 grubundan sorumlu 20 farklı mutant gen tanımlanmıştır (7-10). Bununla birlikte, bilinen lokuslara bağlantı göstermeyen birçok LGMD2 ailesinin varlığı, kasın normal işlevindeki görevlerinin henüz bilinmediği birçok gen ürününün daha olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, kas distrofisi tanısı alan ancak hastalığın genetik etiyolojisinin bilinmediği aileler, kas dokusunun bütünlüğüne ve normal işlevine katkı sağlayan yeni gen ve gen ürünlerinin tanımlanması için büyük önem taşımaktadır.

Tek gen hastalıklarından sorumlu yeni mutant genlerin tanımlanmasında pozisyona dayalı klonlama yaklaşımı sıklıkla kullanılmaktadır (11, 12). Özellikle otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalık durumunda ve akraba evliliğinin görüldüğü ailelerde, SNP array sistemleri kullanılarak tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) genom boyu analizi ile homozigotluk haritalaması yaklaşımı etkili bir yöntem olabilmektedir (13). Son yıllarda geliştirilen eksom dizileme teknolojisi de otozomal resesif kalıtılan hastalıklar ile ilişkili nadir varyasyonların saptanmasını kolaylaştırmaktadır (14).

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, daha önce tanımlanmış hiçbir LGMD2 lokusuna bağlantı göstermeyen ve akraba evliliğinin görüldüğü dört ailede 250K Nspl SNP çipleri ile yapılan genom boyu genotipleme verilerini homozigotluk haritalaması yaklaşımı ile analiz ederek hastalıktan sorumlu yeni bir kromozom aralığının tespit edilmesi hedeflenmiştir (Şekil 1.1). Çalışma sonucunda, sırayla üç hasta ve iki hasta bireyin bulunduğu iki ailede (Şekil 1.1A-B), hastalıktan sorumlu olabilecek genin bulunabileceği birer kromozom aralığı tanımlanabilmiştir. Ayrıca, üç hasta ve sekiz sağlıklı bireyin bulunduğu ve aile içinde iki kolda akraba evlilikleri görülen A ailesinde, belirlenen kromozom aralığındaki aday genler araştırılmış ve DNA dizi analizi ile kas distrofininden sorumlu yeni bir mutant gen (*TOR1AIP1*) tespit edilmiştir.

A.





**Şekil 1.1.** Tez çalışmasında incelenen dört aileye ait aile ağaçları: A. A ailesi. B. B ailesi. C. C ailesi. D. D ailesi. Ok işareti *probandı* göstermektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Limb-Girdle Kas Distrofileri

Limb-girdle kas distrofileri, klinik ve genetik olarak heterojen bir kas hastalığı grubudur (3, 4). Pelvik ve omuz kuşağındaki kaslarda simetrik, ilerleyici kas güçsüzlüğü ve yüksek serum CK (kreatin kinaz) düzeyi ile karakterizedir (15). LGMD alt grupları arasında hastalığın başlangıç yaşı ve klinik seyri açısından fenotipik farklılıklar görülmektedir (16). LGMD'de gözlenen klinik bulgular Becker kas distrofisi, miyotonik distrofi tip II ve Bethlem miyopatisi gibi farklı nöromusküler hastalıklarda da gözlenmektedir (16). Diğer yandan proksimal kas güçsüzlüğüne distal kasların tutulumu, kontraktür ve kardiyomiyopati bulgularının eşlik ediyor olması, Emery-Dreifuss kas distrofisi ile uyumlu bulgulardır (17, 18). Bu nedenle, proksimal kas zayıflığının yanında ek klinik bulguların değerlendirilip ayırıcı tanının yapılması, doğru tedavi yaklaşımlarının uygulanması açısından oldukça önemlidir (16).

Limb-girdle kas distrofileri %10 oranında otozomal dominant (LGMD1) ve %90 oranında otozomal resesif (LGMD2) olmak üzere iki kalıtım modeli ile aktarılmaktadır (4). LGMD'nin otozomal dominant ve otozomal resesif formları arasında klinik özellikleri açısından ayırt edici herhangi bir farklılık bulunmamaktadır. Mutant olmaları durumunda otozomal resesif kalıtılan LGMD (LGMD2)'ye neden olan 20 farklı gen tanımlanmıştır (Tablo 2.1). Bu gen ürünlerinin arasında, sarkolemanın bazal lamina ve hücre iskeleti ile bağlantısını sağlayan distrofin-glikoprotein kompleksi üyeleri ve ilişkili olduğu proteinler (*SGCB, SGCD, SGDG, SGCA, FKRP, POMT1, POMT2, FKTN, POMGnT1, DAG1, GMPPB*), bir sarkolemma proteini (*DYSF*), sarkomer ilişkili proteinler (*TCAP, TTN, CAPN3, TRIM32*), hücre iskeleti ile ilişkili proteinler (*PLEC-1f, DES*), hücre içi vezikül transportu ile ilişkili bir protein (*TRAPPC11*) ve işlevi henüz bilinmeyen bir glikoprotein (*ANO5*) bulunmaktadır. Bu proteinlerin bir kısmı kas dokusunda yapısal işleve sahip iken, diğer kısmı enzimatik görevler üstlenmiştir.

**Tablo 2.1.** Mutant olmaları durumunda LGMD2 fenotipine neden olan genler.

Fenotip	OMIM	Kromozom	Gen	Protein	Ref.
LGMD2A	253600	15q15.1	<i>CAPN3</i>	Kalpain	19
LGMD2B	253601	2p13	<i>DYSF</i>	Disferlin	20, 21
LGMD2C	253700	13q12	<i>SGCG</i>	Gama-sarkoglikan	22
LGMD2D	608099	17q12-q21.33	<i>SGCA</i>	Alfa-sarkoglikan	23
LGMD2E	604286	4q12	<i>SGCB</i>	Beta-sarkoglikan	24
LGMD2F	601287	5q33	<i>SGCD</i>	Delta-sarkoglikan	25
LGMD2G	601954	17q11-q12	<i>TCAP</i>	Titin-kap	26
LGMD2H	254110	9q31-q34	<i>TRIM32</i>	<i>Tripartite motif-containing 32</i>	27
LGMD2I	607155	19q13.3	<i>FKRP</i>	Fukutin-ilişkili protein	28
LGMD2J	608807	2q31	<i>TTN</i>	Titin	29
LGMD2K	609308	9q34.1	<i>POMT1</i>	Protein-O-mannozil transferaz 1	30
LGMD2L	611307	11p14.3	<i>ANO5</i>	Anoktamin 5	31
LGMD2M	611588	11p13-p12	<i>FKTN</i>	Fukutin	32
LGMD2N	613158	14q24	<i>POMT2</i>	Protein-O-mannozil transferaz 2	33
LGMD2O	613157	1p34	<i>POMGnT1</i>	Protein O-bağlı mannoz beta1,2 N-asetil glukozaminiltransferaz 1	34
LGMD2P	613818	3p21.31	<i>DAG1</i>	Alfa-distroglikan	35
LGMD2Q	613723	8q24.3	<i>PLEC-1f</i>	Plektin izoform 1f	36
LGMD2R	615325	2q35	<i>DES</i>	Desmin	8
LGMD2S	615356	4q35.1	<i>TRAPPC11</i>	<i>Trafficking</i> protein partikül kompleksi, alt ünite 11	9
LGMD2T	615352	3p21.31	<i>GMPPB</i>	GDP-mannoz pirofosforilaz beta	10

Fenotip ile genotip arasında korelasyonun kurulabilmesi için, LGMD2'den sorumlu yeni mutant genlerin ve yeni patojenik varyasyonların tespit edilmesi çok büyük önem taşımaktadır. Yeni genlerin bulunması, LGMD2'nin etiyolojisinin ve patofizyolojisinin aydınlatılmasının yanında, kas dokusunun normal işlevinin anlaşılması için de oldukça değerlidir. Günümüzde kas işlevi ile ilişkili yeni genler tanımlandıkça, kas distrofilere ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* gen tedavi yaklaşımlarının araştırılması büyük bir ivme kazanmıştır (37-39). Bu nedenle mutant gene özgül ve ardından bireye özgül tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesi için henüz

tanımlanmamış mutant genlerin tanımlanması son derece önemlidir.

## 2.2. Tek Gen Hastalıklarından Sorumlu Mutant Genlerin Tanımlanması

Hastalıklardan sorumlu mutant genlerin tanımlanmasında yararlanılan iki temel yaklaşım bulunmaktadır: işleve dayalı klonlama yaklaşımı ve pozisyona dayalı klonlama yaklaşımı (12, 40). Kalıtsal bir hastalığın oluşumundan sorumlu mutant genin kromozomdaki yerleşimi bilinmeksizin, gen ürününün işlevi ve hastalık ile olan bağlantısı hakkında ipucu niteliğinde olan bilgilerin olması durumunda, işleve dayalı klonlama stratejisi uygulanabilmektedir (40). Bu yol ile tespit edilen aday genlerdeki bir değişikliğin gen işlevi üzerindeki etkisi ve hastalık ile ilişkisi araştırılabilmektedir.

Pozisyona dayalı klonlama yaklaşımı, hastalıktan sorumlu olabilecek mutant gene ait herhangi bir işlev bilgisi olmaksızın sadece kromozomdaki yerleşiminin tespit edilmesi ile genin tanımlanmasına dayalı bir stratejidir (11, 12, 41). Bu amaçla olabildiğince dar bir aday kromozom bölgesi belirlenir ve bu bölgedeki aday genlerde mutasyon taraması yapılır. Günümüzde aday kromozom aralığının tespiti için iki alelik olan tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) genom boyu analizi tercih edilmektedir (42). İnsan genomunda yaklaşık 300 baz çiftinde bir SNP'nin bulunması ve kromozomdaki yerleşimlerinin bilinmesi, tüm genomu kapsayan haritaların oluşturulmasını sağlamıştır (43, 44). Geliştirilmiş yüksek çözünürlüklü SNP çip (*microarray*) sistemlerinin bir bireyde 10.000 ile 1.000.000 SNP'nin aynı anda incelenmesini mümkün kılması, bu teknolojinin oldukça güçlü bir genotipleme aracı olarak yıllardır kullanılmasını sağlamıştır (45).

Genetik hastalıklardan sorumlu genetik faktörlerin kromozomdaki yerleşiminin belirlenmesi gen haritalaması olarak adlandırılmaktadır (11). Kalıtsal bir hastalığa neden olan gen/genlerin bulunması için öncelikle hastalığın genetik açıdan doğru modellenmiş olması gerekmektedir. Bu nedenle ilk aşama, aile ağacının incelenmesi ile kalıtım modelinin belirlenmesi aşamasıdır. Genetik modellemenin doğru yapılması, hastalık geni haritalamasının etkinliğini, ileri aşamalarda uygulanacak analiz yaklaşımlarını belirleyerek doğrudan etkilemektedir (11).

Tek gen hastalıklarında kullanılan gen haritalama yöntemi temel olarak

bağlantı analizidir (11, 12). Bağlantı analizi yaklaşımı, aile ağaçlarından elde edilen kalıtım bilgileri kullanılarak mutant hastalık alelinin çeşitli genetik belirteçler (*genetic marker*) ile birlikte kalıtılma olasılığının hesaplanmasına dayalıdır. Genetik belirteçlerin kromozomdaki pozisyonları kullanılarak, onlarla en sıkı bağlantıyı veren yani en yakın yerleşimli lokuslar tespit edilebilmektedir. Bağlantı analizinde bağlantı ve yakınlık derecesi rekombinasyon oranı ile ölçülmektedir. Rekombinasyon oranının sıfır olması, kullanılan genetik belirteçler ile hastalık arasında sıkı bir bağlantının olduğu ve kuşaklar boyu beraber kalıtıldıkları anlamına gelmektedir.

Çalışılan hastalığın aile içindeki kalıtım modelinin bilinmesi durumunda, parametrik (model bağımlı) bağlantı analizi yöntemi tercih edilmektedir (11, 46). Ancak bu yaklaşımın etkin olabilmesi için, birkaç kuşaklı geniş aileler ile çalışılması ve kalıtım kalıbı, mutasyonun toplumda görülme frekansı ve bireylerin hastalığı fenotipe yansıtma oranı (penetrans) gibi birtakım parametrelerin bilinmesi gerekmektedir (11, 12). Parametrik bağlantı analizinde, ilgilenilen hastalık lokusu ile kullanılan genetik belirteçler arasındaki genetik bağlantının derecesi LOD skor olarak ifade edilmektedir (47). Analiz esnasında her bir kromozom için LOD skor değeri hesaplanmaktadır ve genel olarak 3 ve üstü değerleri genetik bağlantıyı anlamlı kılmaktadır (47).

Kompleks hastalıklarda olduğu gibi hastalık hakkında herhangi bir kalıtım modeli öngörülemediğinde, parametrik olmayan (modelden bağımsız) ilişkilendirme çalışmaları yapılmaktadır (11, 12). Bu tür analizler, geniş ailelerin kullanımı yerine vaka-kontrol ya da kohort araştırmaları olarak yürütülmektedir. Hastalık ile genetik belirteç alelleri arasındaki ilişki, vaka ve kontrol toplumundaki anlamlı alel frekansı farklılıkları hesaplanarak gösterilmektedir (11).

### **2.3. Homozigotluk Haritalaması**

Otozomal resesif kalıtılan hastalıklardan sorumlu mutant genlerin tanımlanmasında en çok kullanılan yöntem homozigotluk haritalamasıdır (13). Bu yaklaşım gendeki homozigot mutasyonun ortak bir atadan, anne ve baba aracılığı ile gelmesine, yani '*identical by descent*' olmasına dayalıdır. Homozigot mutasyonun

etrafındaki genetik belirteçlerin lokusa yakın oldukları için rekombinasyonla ayrılma ihtimallerinin düşük olduğu ve mutasyon ile birlikte kalıtıldığı varsayımı yapılır. Bireylerin tüm genomu polimorfik belirteçler ile tarandıktan sonra sorumlu mutant gen hastalara özgül olan homozigot haplotiplerde aranır. Sonuç olarak tespit edilen kromozom aralığında bulunan tüm genler arasından hastalık ile ilişkileri açısından önceliklendirilen aday genlerde DNA dizi analizi ile mutasyon taraması yapılmaktadır.

Bu yaklaşımda, akraba evliliği durumunda rekombinasyon ile mutant resesif alellerin bir araya gelme olasılığı arttığı için, akraba evliliğinin görüldüğü aileler büyük önem taşımaktadır. Unutmamak gerekir ki, tüm bireylerin genomunda doğal rekombinasyon olayları sonucunda oluşmuş 100-500 kb uzunluğunda homozigot haplotipler yaygın olarak gözlenmektedir (48, 49). Akraba evliliğinin olduğu ailelerde, hastalıktan sorumlu mutasyonun uzun homozigot haplotiplerde yer alması beklenmektedir. Net bir kriterin olmaması ile birlikte, anne ve babanın birinci dereceden akraba oldukları durumlarda, en az 4-5 Mb uzunluğundaki homozigot bloklar risk faktörü taşıma yönünden anlamlı kabul edilmektedir (49). Fakat köken aldığı toplum ya da akraba evliliği derecesi gibi faktörlere göre homozigot haplotiplerin uzunlukları çok değişken olabilmektedir. Hastanın ebeveynleri arasındaki akrabalık derecesi ne kadar uzak olur ise, nesiller arasındaki rekombinasyon olayları o kadar artmış olur ve mutant genin yer aldığı homozigot haplotipin dar olması beklenir. Yapılan bir çalışmada hastalıktan sorumlu lokusun sadece 0,9 Mb uzunluğundaki bir homozigot haplotipte yer aldığı bulunmuştur (50).

Bununla beraber, çalışılan ailede az sayıda hasta bireyin olması, haritalama sonucunda ortaya çıkan homozigot haplotiplerin çok sayıda olmasına ya da birçok aday gen içermesine neden olup, sorumlu mutasyonun tespitini güçleştirebilmektedir. Buna ek olarak, hastalık ile ilişkili varyasyonun bileşik heterozigot halde bulunması, homozigotluk haritalaması yöntemi ile tespit edilmesini zorlaştırmaktadır (51). Diğer yandan akraba evliliğinin olduğu bir aile içerisinde lokus ya da alelik heterojenitenin olması durumunda homozigotluk haritalaması yanlış sonuçlar verebilmektedir (52).

Son yıllarda otozomal resesif kalıtılan hastalıklara neden olan genlerin

tanımlanmasında homozigotluk haritalaması eksom dizileme yaklaşımı ile birleştirilerek uygulanmaktadır (53-55). En sık uygulanan yaklaşım, eksom dizileme ile elde edilen tüm varyantların arasından, homozigotluk haritalaması ile belirlenen homozigot haplotiplerin içerisinde yer alan varyantlara odaklanması şeklindedir (54).

#### **2.4. Aday Gen Belirleme**

Hastalık fenotipi ve aile ağacı bilgileri doğrultusunda uygulanan doğru yaklaşım sonucunda belirlenen kromozom aralığında/aralıklarında yerleşim gösteren tüm genler ve özellikleri çeşitli veri bankaları (*NCBI-Map Viewer, Ensembl Genome Browser, GeneCards* vs.) kullanılarak araştırılmaktadır. Bu şekilde, bu genlerin hastalık ile ilişkili aday gen olma ihtimalleri incelenmektedir (56).

Öncelikle aday genlerin bilinen herhangi bir/birkaç hastalık ile ilişkisinin olup olmadığı tespit edilmelidir. Daha sonra, aday genin farklı dokulardaki ifade düzeyi araştırılmalıdır. Hastalık fenotipinin gözlemlendiği doku/dokularda genin ifade olması beklenmektedir. Ayrıca dokuya özgül izoformlarının olup olmadığı tespit edilmelidir. Bir çok genin birden fazla dokuda benzer ifade düzeylerine sahip olması, gen ifadesinin genin işlevi hakkında yeterince bilgi verici olamamasına neden olabilmektedir. Bu nedenle, aday gen ürününün tanımlanmış işlevleri, görev aldığı yollar ve etkileşimde olduğu proteinler araştırılmalıdır.

Aday genin henüz tanımlanmış bir işlevinin bulunmaması durumunda, karşılaştırmalı genomik yaklaşımı kullanılabilir (57). Aday genin türler arası yapısal ve/veya işlevsel korunmuşluğa sahip olması, genin önemli bir işlevi olduğuna işaret etmektedir.

#### **2.5. Mutasyonun Saptanması**

Aday gen belirlendikten sonra, ilk olarak DNA dizi analizi ile gendeki varyasyon tipi (yanlış anlamlı, anlamsız, sessiz, vs.) belirlenmelidir. Bulunan varyasyonun aile içi kalıtımı izlenip, gözlenen kalıtım kalıbı ile uyumlu olması beklenmektedir. Otozomal resesif kalıtılan bir hastalıkta ailede akraba evliliğinin

görülmesi durumunda, hasta bireyde mutasyonun yüksek olasılıkla homozigot olarak bulunması, anne ve babada ise mutasyonun tek bir alelde taşınması (heterozigotluk) gerekmektedir. Ailedeki diğer sağlıklı bireyler ise mutant aleli heterozigot olarak veya normal aleli homozigot olarak taşıyor olmalıdırlar. Daha sonra, aday gende tespit edilen bu varyasyonun bilinen bir polimorfizm olup olmadığını kontrol etmek amacıyla, çeşitli veri bankaları (dbSNP veri bankası, *HapMap* ve *1000 Genomes* proje sonuçları) incelenmelidir. Ayrıca, bu varyasyonun, varyasyonun tespit edildiği bireyin ait olduğu popülasyonun sağlıklı bireylerinde de taranmalıdır. Mutasyonun tipine bağlı olarak değişmekle birlikte ortalama 100 alel incelenmelidir ve varyasyonun patojenik niteliği gösterilmelidir: %1'den az ise patojenik varyasyon, yüksek ise nonpatojenik varyasyon olarak tanımlanmaktadır. Belirlenen varyasyonun özgüllüğü ve kalıtımı araştırıldıktan sonra, hastalıktan sorumlu olmasına neden olabilecek patojenik etkisi incelenmelidir (56). Mutasyonun RNA ve protein düzeyindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla *in vitro* ve *in vivo* işlev analizleri gerçekleştirilmelidir.

## 2.6. Amaç

Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışması kapsamında, klinik ve histopatolojik değerlendirmeler sonrasında LGMD2 tanısı konmuş fakat daha önce tanımlanmış LGMD2 lokuslarına bağlantı göstermediği 50K SNP genotipleme (yayınlanmamış veri) ile belirlenmiş dört aile incelenmiştir. Akraba evliliğinin görüldüğü bu ailelerde sırası ile 3 hasta (A ailesi), 2 hasta (B ailesi) ve birer hasta (C ve D aileleri) bulunmaktadır. Yüksek çözünürlüklü 250K Nspl SNP çipleri ile genom boyu genotipleme verileri kullanılarak homozigotluk haritalaması yaklaşımı ile hastalarda homozigot haplotiplerin tespit edilmesi ve hastalıktan sorumlu yeni bir kromozom aralığının belirlenmesi araştırmanın amacını oluşturmuştur. A ve B ailelerinde birden fazla hasta bireyin bulunması, aday bölgenin daraltılabilmesi açısından, ilk aşamada analizlerin önceliğinin bu ailelere verilmesini gerektirmiştir. A veya B ailelerinden birinde aday bir kromozom bölgesinin tespit edilmesi durumunda, hastalıktan sorumlu lokusun birden fazla ailede ortak olabilme olasılığı

göz önünde bulundurulmuştur. Bunun için, diğer ailelerdeki hasta bireyler yeni bir kromozom bölgesinin tanımlandığı aile ile birlikte analiz edilip ortak homozigot haplotiplerin olup olmadığının test edilmesi planlanmıştır. Analizler sonucunda belirlenen kromozom aralığında/aralıklarında bulunan tüm genlerin hastalık ile ilişkili olma ihtimalleri çeşitli veri bankaları aracılığı ile incelenmiştir. Seçilen aday genler DNA dizi analizine alınarak hastalıktan sorumlu olabilecek varyasyonlar yönünden araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda, A ailesinde hastalıktan sorumlu gen (*TOR1AIP1*<sup>1</sup>) DNA, RNA ve protein düzeyinde yapılan analizler ile saptanmıştır.

---

<sup>1</sup> Bu tez çalışmasında, "*TOR1AIP1*" geni ve transkripti, "*LAP1B*" kodlanan proteini ifade etmek için kullanılmıştır.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Bireyler ve Gereçler

##### 3.1.1. Çalışmada incelenen aileler

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında otozomal resesif kalıtım gösteren limb-girdle kas distrofisi tanısı almış ve akraba evliliği görülen toplam 4 aile ile çalışılmıştır. A ailesi üç hasta birey (IV:2, IV:5 ve IV:7), B ailesi iki hasta birey ( IV:3 ve IV:4), C ve D aileleri ise birer hasta bireyden (sırası ile IV:1 ve IV:1) oluşmaktadır (Bkz. Şekil 1.1).

Hastaların klinik ve patolojik değerlendirmeleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı ve Pediatrik Patoloji Ünitesinde (A-D aileleri) ve İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'nda (A ailesi) yapılmıştır.

Yapılan tüm çalışmalar, ailelerden "Bilgilendirilmiş Onam Formu" ve Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı alınarak (16.02.2012 tarihli 2012/01, Karar no: TBK 11/11-02) gerçekleştirilmiştir (Bkz. EK 1).

##### 3.1.2. Homozigotluk haritalaması

250K Nspl SNP genotipleme çalışmasına alınan bireyler:

- A ailesinde III:1, III:2, IV:2, IV:5 ve IV:7 nolu bireyler.
- B ailesinde III:1, III:2, IV:2, IV:3 ve IV:4 nolu bireyler.
- C ailesinde III:1, III:2, IV:1 ve IV:3 nolu bireyler.
- D Ailesinde III:1, III:2, IV:1 ve IV:2 nolu bireyler.

*VIGENOS (Visual Genome Studio)* yazılımı (Hemosoft).

##### 3.1.3. Primer dizilerinin oluşturulması

Tez çalışmasında kullanılan primer dizileri *Primer3 Input* (version 4.0.0) ve *NCBI-Primer BLAST* programları ile tasarlanmıştır.

### 3.1.4. Polimeraz zincir reaksiyonu

Taq DNA polimeraz, 5U/ $\mu$ l (Fermentas)

10x Taq Tamponu ( $NH_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren MgCl<sub>2</sub> içermeyen (Fermentas)

MgCl<sub>2</sub>, 25 mM (Fermentas)

dNTP karışımı, 2,5 mM

Primer *Forward* (F) ve *Reverse* (R), 20 pmol/ $\mu$ l

Dimetilsülfoksit (DMSO) (AppliChem)

*GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems)

PZR ürünlerinin saflaştırılması için *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, A9282) kiti kullanılmıştır.

### 3.1.5. DNA agaroz jel elektroforezi

Agaroz, moleküler biyoloji kullanımı saflığında (Prona)

Tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu (50X, pH 8,0): Son konsantrasyon

Tris baz, 2M:	242 g	40 mM
---------------	-------	-------

Glasiyal asetik asit:	57,1 ml	20 mM
-----------------------	---------	-------

Na <sub>2</sub> EDTA, 0,5M:	100 ml	1 mM
-----------------------------	--------	------

dH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Yükleme tamponu (6X):

Gliserol:	5,5 ml
-----------	--------

1xTAE tamponu:	4,5 ml
----------------	--------

<i>Orange G</i> boya (Merck):	0,01 gr
-------------------------------	---------

Etidyum bromür (Sigma):	10 mg/ml distile su
-------------------------	---------------------

100 baz çifti DNA moleküler ağırlık belirteci (New England Biolabs, N3231S)

### 3.1.6. DNA dizi analizi

*BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, 4336917)

Primer *Forward* (F) ya da *Reverse* (R), 3,2 pmol/ $\mu$ l

Sodyum asetat, 3M, pH 5

Etanol, %100 ve %70

*Hi-Di Formamid* (Applied Biosystems, 4311320)

### 3.1.7. cDNA sentezi

*RNase Zap* (Ambion, AM9780)

cDNA sentezi için "*QuantiTect Reverse Transcription*" kiti (Qiagen, 205311) kullanılmıştır.

### 3.1.8. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

*SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix MgCl<sub>2</sub>* içermeyen (Sigma, S5193)

MgCl<sub>2</sub>, 25 mM (Fermentas)

Primer *Forward* (F) ve *Reverse* (R), 5-10 pmol/μl

*Rotor-Gene 6000* (Corbett Life Science)

### 3.1.9. Protein izolasyonu ve miktar tayini

- 1X Koruyucu Tampon, pH 7,4:

Tris HCl, 0,5M pH 6,8:	0,625 ml
EDTA, 0,5 M:	0,050 ml
SDS, %20:	2,500 ml
dH <sub>2</sub> O:	1,825 ml
<u>Proteaz inhibitörü tablet:</u>	<u>½ adet</u>
Toplam:	5,000 mL

- *VibraCell* sonikatör (Sonics & Materials Inc)

- Dokulardan izole edilen protein miktarı *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific Inc., 23227) kiti kullanılarak belirlenmiştir.

### 3.1.10. SDS poliakrilamid jel elektroforezi

- SDS poliakrilamid jel:

Akrilamid-bisakrilamid karışımı, %30

Tris Baz, 1M pH 8,8

Tris Baz, 1M pH 6,8

Sodyum dodesil sülfat (SDS), %10

Amonyum persülfat (APS), %10

Temed

dH<sub>2</sub>O

- İzopropanol

- Yükleme Tamponu:

*NuPAGE Sample Reducing Agent, 10X* (Invitrogen, NP0004)

*NuPAGE LDS Sample Buffer, 4X* (Invitrogen, NP0008)

- 1X Yürütme Tamponu, pH 8,6: Son konsantrasyon

Tris baz: 3,02 g 25 mM

Glisin: 14,4 g 192 mM

SDS: 1 g %0,1

dH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

- Protein ağırlık belirteci:

*ColorPlus™ Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa)* (New England Biolabs, P7711S)

- *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Biorad)

### 3.1.11. Western blot

- Nitroselüloz membran, 0,45 µm kalınlığında (Thermo Scientific)

- Whatmann kağıdı

- 1X Transfer Tamponu, pH 8,3: Son konsantrasyon

Tris baz: 5,82 g 48 mM

Glisin: 2,93 g 39 mM

SDS : 0,37 g 1 mM

Metanol: 200 ml %20

dH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

- *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* cihazı

- 1X Tuzlu Tris tamponu (TBS), pH 7,6: Son konsantrasyon

Tris baz: 6,1 g 50 mM

NaCl: 9 g 154 mM

dH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

- Yıkama Tamponu (TBS-T), %0,05:

1x TBS: 1000 ml

*Tween 20* (Sigma): 500 µl

- Bloklama Çözeltisi:

Süt tozu: 0,5 g

TBS-T, %0,05: 10 ml

- Primer Antikor: *rabbit* anti-LAP1 (Dr. William T. Dauer, Michigan Üniversitesi, ABD).

- Sekonder Antikorlar: *goat* anti-*rabbit* IgG (H+L) *horseradish* peroksidaz (HRP) işaretli sekonder antikor (Molecular Probes)

- Eşit yükleme kontrolü için: *horseradish* peroksidaz (HRP) işaretli anti-beta aktin (Abcam)

- *Coomassie Brilliant Blue, Ponceau S* çözeltisi (Sigma)

- Boya çıkarıcı (*destaining*) çözelti:

Glasiyal asetik asit: 35 ml

Metanol: 100 ml

dH<sub>2</sub>O ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

- Görüntüleme: *ChemiFast* Kemilüminesans Subtrat kiti (Syngene) ve *GeneGnome5* kemilüminesans görüntüleme cihazı (Syngene).

### 3.1.12. İmmünfloresan boyama

Paraformaldehit, %4 (Sigma)

1X Tuzlu fosfat tamponu (PBS) pH 7,4

Triton X-100 (Sigma)

Tween 20 (Sigma)

*Bovine Serum Albumin* (BSA), 0,1 g/ml (Sigma)

Primer antikorlar: *rabbit* poliklonal anti-TOR1AIP1 (Merck Millipore, 06-1001) ve *mouse* anti-laminin alfa-2 (Chemicon, MAB1922)

Sekonder antikorlar: *Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 568 Goat Anti-Mouse IgG* (Molecular Probes, A11029)

4', 6-diaminodino-2-fenilindol (DAPI), 1mg/ml stok

*ProLong Gold Antifade Reagent* (Invitrogen, P36930)

*Pappen*

*Leica* DMIL floresan mikroskop

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Homozigotluk haritalaması

Ailelerde VIGENOS (*Visual Genome Studio*) yazılımı (Hemosoft, Ankara) kullanılarak homozigotluk haritalaması çalışması yapılmıştır. Bunun için *GeneChip Human Mapping 250K Nspl Array* (Affymetrix) çipleri ile genom boyu genotipleme çalışmasından elde edilen genotip verileri kullanılmıştır. Çip verilerinin güvenilirliği *SNP Call Rate* oranları incelenerek kontrol edilmiştir.

Homozigotluk haritalaması için "Aile ağacı Dosyası" ve "Genotipleme Dosyası" olmak üzere iki farklı dosya kullanılmıştır. Ayrıca analiz komutlarının belirtildiği "Model Dosyası", otozomal resesif kalıtım modeline uygun bir şekilde düzenlenmiştir.

#### Aile ağacı dosyası

Her bir aile için ayrı hazırlanan aile ağacı dosyası çip, örnek, aile ve anne/baba kimlikleri (aile ağacında yer almıyor ise 0), cinsiyet (F: Kadın, M: Erkek) ve hastalık durumu (U: Sağlıklı, A: Hasta) bilgilerini barındırmaktadır (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1. A ailesine ait aile ağacı dosyası.**

Çip Adı	Örnek_ID	Aile_ID	Baba_ID	Anne_ID	Cinsiyet	Hastalık Durumu
Chip1	1	1	0	0	F	U
Chip2	2	1	0	0	M	U
Chip3	3	1	2	1	F	A
Chip4	4	1	2	1	F	A
Chip5	5	1	2	1	M	A

#### Genotipleme dosyası

Her bir bireye ait çip bilgileri *GeneChip Scanner* (Affymetrix) cihazında taranmış ve SNP genotip bilgileri *GTYPE* (Affymetrix) yazılımı kullanılarak .chip uzantılı çip dosyaları halinde elde edilmiştir. Bu dosyalar VIGENOS yazılımına aktarılmıştır.

VIGENOS programı, kapsamlı ve yüksek miktardaki genotip verisinin kolay görünebilir ve incelenebilir hale getirilmesine olanak sağlamaktadır (36, 58, 59).

Bunun için, aile ağacı ve model dosyalarında belirtilen hasta bireylerden biri, genom boyu haplotiplerin kurulması için referans birey olarak seçilmektedir. Referans birey ile aynı olan homozigot genotipler (referans: AA, diğer birey: AA) mavi renk ile, karşı alellerden oluşan homozigot genotipler (referans: AA, diğer birey: BB) beyaz renk ile ve heterozigot genotipler (referans: AA, diğer birey: AB) turuncu renk ile gösterilmiştir. Buna ilaveten, bilgi verici olmayan SNP genotipleri (örneğin baba: AB, anne: AA, referans: AB, diğer hasta: AB) sarı renk ile, ve eksik bir SNP genotip bilgisi gri renk ile ifade edilmiştir.

### 3.2.2. Aday gen belirleme

Homozigotluk haritalaması çalışması ile tespit edilen kromozom aralığı/ aralıklarındaki tüm tanımlanmış ve tanımlanmamış gen dizileri incelenip, kas distrofisi fenotipi ile ilişkili olma ihtimalleri aşağıda belirtilen veri bankaları aracılığı ile araştırılmıştır.

- *NCBI-Map Viewer* (Sürüm 104) ve *Ensembl Genome Browser* (Sürüm 73.37) veri bankaları ile kromozom aralığında yer alan tüm diziler belirlenmiştir (60, 61).
- *NCBI-Gene* ve *GeneCards (Weizmann Institute of Science)* veri bankaları ile aday genlerin bilinen işlevleri ve ifadeleri bulunan doku/dokular belirlenmiştir (62).
- *NCBI-OMIM* ve *MalaCards (Weizmann Institute of Science)* veri bankaları ile aday genlerin bilinen herhangi bir hastalık ile ilişkileri olup olmadığı belirlenmiştir (63, 64).
- *NCBI-PROTEIN*, *UniProt* ve *STRING* (9.05) veri bankaları ile aday gen ürünlerinin aminoasit dizileri, işlevsel bölgeleri ve etkileşimde oldukları diğer proteinler belirlenmiştir (65, 66).

### 3.2.3. Aday gen *TOR1AIP1* için yapılan PZR ve DNA dizi analizi çalışmaları

A ailesinde aday olarak seçilen *TOR1AIP1* (NM\_015602.3) genine ait 10 kodlanan ekson için *Primer3 Input* (versiyon 0.4.0) ve *NCBI-Primer BLAST* programları kullanılarak amplifikasyon primer dizileri tasarlanmıştır. PZR

çalışmasında *TOR1AIP1* geninin 1. eksonu iki parçaya (1a ve 1b), 10. eksonu dört parçaya (10a, 10b, 10c ve 10d) bölünerek analiz edilmiştir (Tablo 3.2).

**Tablo 3.2. *TOR1AIP1* primer dizileri.**

Ekson	Primer <i>Forward</i>	Primer <i>Reverse</i>	Ürün (bp)
1a	5'-CAGGAGAACCTAGGGTCCATAA-3'	5'-TCGTCCGAGAACCTCACTTC-3'	244
1b	5'-GCCTGCGTACAGAACTCCT-3'	5'-GCCTGCGTACAGAACTCCT-3'	467
2	5'-AATGCATAATCTGTGCCATGA-3'	5'-ACGTGTCTGCCCTTGTCTT-3'	258
3	5'-CGCAACAGTTGTCACCTAGAAAAG-3'	5'-ACAGAGGGGACAGGGAGATTT-3'	354
4	5'-GTGTCCTCATGTTTCATTTTCT-3'	5'-GGCTCTGTTCCCACTTCTTAAA-3'	282
5	5'-CCCAGAGGACACAAATTGAGA-3'	5'-AAGCAAATTCATGGAATACAAA-3'	359
6	5'-ACCTGGGAGTTACCCGAAT-3'	5'-ACCAAGCTCACAGGAAGACA-3'	215
7	5'-ACAAGCAAAATGTCTGTGCAAC-3'	5'-ACAGAGCAAGACATCGTCTCAA-3'	212
8	5'-GCTTTTATTGTTTTCTCCCTA-3'	5'-TGCTGCCAGTCCAAGAAAT-3'	354
9	5'-CTGCTTCTGGCTGATCTCTG-3'	5'-GCATCGAGTCATACTGCTGTC-3'	280
10a	5'-AGTCACTTGCCCTGAATCTA-3'	5'-GACCGAGGATGGGAGCTAT-3'	315
10b	5'-CAAGAGTTCCAGAACCAGATGA-3'	5'-GCCATTCTTAAATCCATTGCT-3'	321
10c	5'-CGGATTGATGGGACAGATAAA-3'	5'-GATTGTAGGAGTTGGGTGTGTTA-3'	325
10d	5'-TTGGAGGAAGAGACACTTGGA-3'	5'-AGAGCTCTGAATTCTGTCTCTGG-3'	296

### **TOR1AIP1 PZR çalışması**

#### **Ekson 1a, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10b, 10c ve 10d**

#### **Son konsantrasyon**

10X Taq Tamponu:	5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM):	3 µl	1,5 mM
dNTP karışımı (2,5 mM):	2 µl	0,1 mM
Primer F (20 pmol/µl):	2 µl	0,8 pmol
Primer R (20 pmol/µl):	2 µl	0,8 pmol
DNA:	1 µl	
Taq Polimeraz (5U/µl):	0,2 µl	0,02 U
<u>dH<sub>2</sub>O:</u>	<u>34,8 µl</u>	
<b>Toplam:</b>	<b>50 µl</b>	



Reaksiyon koşulları

94 °C	5 dk.	
94 °C	30 sn.	} x 35
55 °C	15 sn.	
72 °C	45 sn.	
72 °C	3 dk.	
4 °C	∞	

Ekson 1b ve 7

		Son konsantrasyon
10x Taq Tamponu:	5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM):	3 µl	1,5 mM
dNTP karışımı (2,5 mM):	2 µl	0,1 mM
Primer F (20 pmol/µl):	2 µl	0,8 pmol
Primer R (20 pmol/µl):	2 µl	0,8 pmol
DNA:	1 µl	
Taq Polimeraz (5U/µl):	0,2 µl	0,02 U
DMSO:	5 µl	%10
<u>dH<sub>2</sub>O:</u>	<u>29,8 µl</u>	
Toplam:	50 µl	

Reaksiyon koşulları

95 °C	5 dk.	
95 °C	30 sn.	} x7*
59-53 °C	30 sn.	
72 °C	30 sn.	
95 °C	30 sn.	} x23
55 °C	30 sn.	
72 °C	30 sn.	
72 °C	3 dk.	
4 °C	∞	

\* Her döngüde *annealing* sıcaklığı 1 °C düşürülerek *touchdown* PZR yapılmıştır.

**Ekson 10a**

		<b>Son konsantrasyon</b>
10x Taq Tamponu:	5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM):	3 µl	1,5 mM
dNTP karışımı (2,5 mM):	2 µl	0,1 mM
Primer F (20 pmol/µl):	2 µl	0,8 pmol
Primer R (20 pmol/µl):	2 µl	0,8 pmol
DNA:	1 µl	
Taq Polimeraz (5U/µl):	0,2 µl	0,02 U
<u>dH<sub>2</sub>O:</u>	<u>34,8 µl</u>	
<b>Toplam:</b>	<b>50 µl</b>	

**Reaksiyon Koşulları**

94 °C	5 dk.	
94 °C	30 sn.	} x 35
56 °C	30 sn.	
72 °C	45 sn.	
72 °C	3 dk.	
4 °C	∞	

**PZR ürünlerinin saflaştırılması**

PZR ürünleri *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) kiti kullanılarak aşağıda belirtilen protokol uygulanarak saflaştırılmıştır.

- 45 µl miktarındaki PZR ürünlerinin üzerine eşit miktarda (45 µl) *Membrane Binding* çözeltisi eklenmiştir. Her bir örneğin tamamı SV Mini Kolonlara aktarılıp 1 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Örnekler 16.000 g'de 1 dk. çöktürülmüş ve DNA'nın membrana bağlanması sağlanmıştır. Kolondan süzülüp toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır.
- Her kolona 700 µl Yıkama çözeltisi eklendikten sonra örnekler 16.000 g'de 1 dk. çöktürülmüştür. Kolondan süzülüp toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır.

- Her kolona 500 µl Yıkama çözeltisi eklendikten sonra örnekler 16.000 g'de 5 dk. çökeltilip tekrar yıkanmıştır. Kolondan süzülüp toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır.
- Yıkama çözeltisinde bulunan etanolün tamamen uzaklaştırılması için örnekler 16.000 g'de 1 dk. daha çökeltiştir.
- Her bir kolon temiz bir eppendorf tüpüne yerleştirilip 50 µl nükleazsız su eklenerek 1 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnekler 16.000 g'de 1 dk. çöktürülmüştür.
- Saflaştırılmış PZR ürünlerinin nanospektrofotometrik ölçümleri *NanoDrop ND-1000* cihazında gerçekleştirilmiştir.

<b><u>DNA dizi analizi için reaksiyon koşulları</u></b>	<b>Son konsantrasyon</b>	
3.1 BigDye Terminator:	2 µl	
5X Reaksiyon Tamponu:	4 µl	1X
Primer <i>Forward</i> ya da <i>Reverse</i> (3,2 pmol/µl):	1 µl	0,16 pmol
DNA (40 ng/µl):	1 µl	
<u>dH<sub>2</sub>O:</u>	<u>12 µl</u>	
Toplam:	20 µl	

#### **Reaksiyon Koşulları**

94 °C	5 dk.	}	x 25
94 °C	15 sn.		
50 °C	15 sn.		
60 °C	4 dk.		
60 °C	1 dk.		
4 °C	∞		

#### **DNA dizi analizi reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması**

Her bir DNA dizi analizi reaksiyon ürününe 2 µl sodyum asetat (3M, pH 5) eklenmiştir. Eppendorf tüplerine aktarıldıktan sonra, örnekler bir gece boyunca -20 °C'de saf etanol içinde bekletilmiştir. Maksimum hızda 30 dk. çöktürülmüş

örneklerin üst fazı atılmış ve üzerilerine %70 etanol eklenmiştir. İkinci maksimum hızda 30 dk. çöktürme işleminin ardından, üst faz atılmış ve DNA örneklerinden oluşan peletin kuruması sağlanmıştır. Örnekler 20 µl *Hi-Di Formamid* içinde çözülerek, 94 °C'de 10 dk. denatüre edilmiştir.

DNA dizi analizi sonuçları *Chromas* (versiyon 2.4.1) programı ile incelenmiştir.

### 3.2.4. cDNA sentezi

A ailesinden IV:2 nolu hasta bireyden daha önce tanı amaçlı alınan kas biyopsisinin bir kısmından *RNeasy Fibrous Tissue MiniKit* (Qiagen) kiti kullanılarak RNA elde edilmiştir. İzole edilen RNA miktarı belirlendikten sonra, RNA'dan cDNA sentezi *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan malzemeler *RNase Zap* ve %0,1'lik DEPC ile ribonükleazlardan arındırılmıştır.

<b>Genomik DNA <i>Wipeout</i> reaksiyonu:</b>		<u>Son konsantrasyon</u>
7X <i>gDNA Wipeout</i> Tamponu:	2 µl	1X
Kalıp RNA:	7,5 µl	500 ng/µl
<u><i>RNase free</i> dH<sub>2</sub>O:</u>	<u>4,5 µl</u>	
Toplam:	14 µl	

Örnek 42 °C'de 5 dk. bekletilmiştir.

Örneğe aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmış 6 µl Revers Transkripsiyon Karışımı eklenmiştir (toplam 20 µl) ve belirtilen koşullarda *Gene Amplification PCR System 9700* (ABI) cihazında inkübe edilmiştir.

### Revers transkripsiyon karışımı:

<i>Quantiscript RT</i> :	1 µl
5X <i>Quantiscript RT</i> Tampon:	4 µl
<u>RT Primer Karışımı:</u>	<u>1 µl</u>
Toplam:	6 µl

42 °C - 30 dk.

95 °C - 5 dk.

4 °C - ∞

Sentezlenen cDNA nükleazdan arındırılmış dH<sub>2</sub>O ile ¼ oranında sulandırılmıştır.

### 3.2.5. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

*TOR1AIP1* transkriptinin c.186delG mutasyonuna bağlı olarak kontrol kas dokusuna oranla hasta kas dokusunda ifade düzeyinin nasıl etkilendiğini belirlemek amacıyla kantitatif gerçek zamanlı PZR (kGZ-PZR) çalışması yapılmıştır. *TOR1AIP1* geninin 1. ekson bölgesine özgül *forward* primer ve 2. eksonuna özgül *reverse* primer tasarlanmıştır (Tablo 3.3).

**Tablo 3.3. Kantitatif gerçek zamanlı PZR primer dizileri.**

Gen	Primer <i>Forward</i>	Primer <i>Reverse</i>	Ürün (bp)
<i>TOR1AIP1</i>	5'-GAAATGAAGACGCGAAGGAC-3'	5'-GAGCCTCTGTATGCTCCTGA-3'	190
<i>ACTB</i>	5'-CGCAAAGACCTGTACGCCAAC-3'	5'-GAGCCGCCGATCCACACG-3'	164

Çalışmada A ailesinden IV:2 nolu hasta bireyin cDNA örneği ve kontrol cDNA örneği üçlü tekrar halinde kullanılmıştır. Normalizatör gen olarak *ACTB* kullanılmıştır.

Kontrol ve hasta cDNA'ları kullanılarak *ACTB* ve *TOR1AIP1* amplifikasyon reaksiyonları aşağıda belirtilen koşullarda *Corbett Life Sciences Rotor-Gene 6000* cihazında gerçekleştirilmiştir.

#### **ACTB için kGZ-PZR koşulları:**

#### **Son konsantrasyon**

<i>SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix</i> MgCl <sub>2</sub> içermeyen:	5 µl	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM):	1,2 µl	3 mM
Primer <i>Forward</i> (10 pmol/µl):	0,4 µl	0,4 pmol
Primer <i>Reverse</i> (10 pmol/µl):	0,4 µl	0,4 pmol
dH <sub>2</sub> O:	1 µl	
<u>cDNA:</u>	<u>2 µl</u>	
<b>Toplam:</b>	<b>10 µl</b>	

Reaksiyon koşulları

Denatürasyon:	94 °C	2dk.	
Amplifikasyon:	94 °C	15 sn.	} x40
	59 °C	60 sn.	
Erime:	72 °C'dan 95 °C'a, her aşamada 1 °C artarak.		

**TOR1AIP1 için kGZ-PZR koşulları:**Son konsantrasyon

<i>SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix</i> MgCl <sub>2</sub> içermeyen:	5 µl	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM):	1,2 µl	3 mM
Primer <i>Forward</i> (5 pmol/µl):	0,4 µl	0,2 pmol
Primer <i>Reverse</i> (5 pmol/µl):	0,4 µl	0,2 pmol
dH <sub>2</sub> O:	1 µl	
<u>cDNA:</u>	<u>2 µl</u>	
Toplam:	10 µl	

Reaksiyon koşulları

Denatürasyon:	94 °C	2dk.	
Amplifikasyon:	94 °C	5 sn.	} x40
	58 °C	10 sn.	
	72 °C	15 sn.	
Erime:	72 °C'dan 95 °C'a, her aşamada 1 °C artarak.		

Elde edilen veriler, *Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7* yazılımı ile analiz edilmiştir. Standart dilüsyonlar (1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> ve 10<sup>-3</sup>) kullanılarak standart eğri oluşturulmuş ve  $\Delta\Delta C_t$  yöntemi ile göreceli kantitasyon hesabı yapılmıştır (67). Ayrıca amplifikasyonun özgüllüğü erime eğrileri çizilerek ve amplifikasyon ürünleri TAE ile hazırlanmış %3'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülerek doğrulanmıştır. Hasta ve kontrolde *TOR1AIP1* transkriptinin göreceli ifadesi, *ACTB* ifadesine göre normalize edilerek hesaplanmıştır. Deney üç kere tekrar edilerek, hasta kası için elde edilen üç ayrı *TOR1AIP1* göreceli ifade değerlerinin ortalaması alınmıştır.

### 3.2.6. Kontrol ve hasta dokularından protein izolasyonu

A ailesinden IV:2 nolu hasta bireyden alınmış kas biyopsi materyalinden protein izolasyonu yapılmıştır. Herhangi bir patolojik bulgu göstermeyen (tanı amaçlı alınmış olan ancak normal histopatolojik bulgulara sahip) insan kas, karaciğer ve böbrek dokuları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

- -80 °C'de saklanan 2-3 mm<sup>3</sup> büyüklükteki doku örnekleri sıvı azotta çözünmesi engellenerek porselen havanda dövülüp toz haline getirilmiştir.
- Toz halindeki dokular eppendorf tüpüne aktarılıp tartılmış ve yaklaşık 3 katı kadar Koruyucu Tampon çözeltisi içerisine alınmıştır.
- Örnekler 3 dk. 100 °C'de kaynar suda bekletilmiştir.
- Örnekler buz üzerine alınıp sonikatör cihazında 20 sn.'lik sinyaller ile ve %50 amplitüde, homojen olana dek parçalanmıştır.
- Parçalanmış dokular +4 °C'de 10 dk. 14.000 rpm'de çöktürülmüştür.
- Çöken hücre artıkları atılarak, proteinlerin bulunduğu üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.

### 3.2.7. Protein miktar tayini

Dokulardan izole edilen proteinlerin miktarları *bicinchoninic acid* (BCA) yöntemi ile *BCA Protein Assay* kiti kullanılarak tayin edilmiştir.

Standart eğri %1 SDS içerisinde BSA sulandırılmaları halinde hazırlanan standartlar kullanılarak çizilmiştir (Tablo 3.4).

**Tablo 3.4.** BCA *protein assay* için standart örneklerin sulandırım oranları.

Standart	%1 SDS (µl)	BSA (µl)	Son Konsantrasyon (µg/µl)
<i>Blank</i>	50,0	0	0
1	47,5	2,5	0,1
2	45,0	5,0	0,2
3	40,0	10,0	0,4
4	30,0	20,0	0,8
5	20,0	30,0	1,2

Dokulardan izole edilen protein örnekleri %1 SDS içerisinde 1:20 oranında seyreltilmiştir. Çalışma çözeltisi (*Working Reagent*) 50A:1B oranında A ve B çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir örneğe 1 ml çalışma çözeltisi eklenmiş ve 37 °C'ye ayarlı etüvde 30 dk. bekletilmiştir.

*NanoDrop ND-1000* cihazında standartlar ölçülerek standart eğri çizilmiş ve izole edilen proteinlerin miktarları sulandırım oranı göz önünde bulundurularak tayin edilmiştir.

### 3.2.8. *Western blot* çalışması

#### SDS poliakrilamid jel elektroforezi

Proteinler iki katmanlı (*resolving* ve *stacking*) jel sisteminde %10 SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılmıştır.

<b><u>%10 SDS Poliakrilamid Jel</u></b>	<b><i>Resolving</i> Jel</b>	<b><i>Stacking</i> Jel</b>	<b>Son konsantrasyon</b>
dH <sub>2</sub> O:	2 ml	3,4 ml	
%30 Akri/Bisakri karışımı:	1,7 ml	0,83 ml	
Tris 1M pH 8,8:	1,3 ml	0 ml	260 mM
Tris 1M pH 6,8:	0 ml	0,63 ml	126 mM
%10 SDS:	0,05 ml	0,05 ml	%1
%10 APS:	0,05 ml	0,05 ml	%1
Temed:	0,005 ml	0,005 ml	%0,1

Dikey elektroforez sisteminin camları 3 kere etanol ile silindikten sonra, düzenek hazırlanarak camlar arasına *resolving* jel dökülmüştür. *Stacking* jel için bırakılan 1 cm boşluğa izopropanol homojen bir şekilde eklenerek jel yüzeyinin düz olması sağlanmıştır. *Resolving* jel polimerize olduktan sonra *stacking* jel dökülmüş ve tarak yerleştirilmiştir. Jel tamamen katılınca tarak çıkartılmış ve jel *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Biorad) tankına yerleştirilmiştir.

Her bir protein örneğinden 40 µg kullanılmıştır. Örnekler 1µl indirgeyici Ajan ve 2,5 µl LDS Yükleme tamponu eklenerek, örnekler dH<sub>2</sub>O ile 10 µl son hacimde hazırlanmıştır. 4 dk. 100 °C'lik kaynar suda bekletildikten sonra örnekler buz üstüne



alınmıştır.

Jelin kuyucukları temizlendikten sonra, moleküler ağırlık belirteci (8 $\mu$ l) ve örnekler yüklenmiştir. 80 V'da 10 dk. boyunca örneklerin *stacking/resolving* jel sınırında toplanmaları sağlandıktan sonra örnekler 150 V'da 3 saat boyunca ayrıştırılmıştır.

#### **Yarı-kuru (*semi-dry*) transfer**

Elektroforez sonrası *stacking* jel kesilip atılmıştır. *Resolving* jel ve jel boyutlarına göre hazırlanmış 1 adet nitroselüloz membran ve 5 adet Whatmann kağıdı transfer tamponu içerisine alınmıştır.

*Semi-dry* blotlama cihazının (Biorad) plakaları distile su ve transfer tamponu ile silindikten sonra, hava kabarcığı oluşması engellenerek sırası ile 3 adet *Whatmann* kağıdı, nitroselüloz membran, jel ve 2 adet *Whatmann* kağıdı yerleştirilmiştir. Cihazın üst plakası kapatılarak 17 V'da 1 saat boyunca proteinlerin jelden membrana transferi sağlanmıştır.

Transfer sonrası membran *Ponceau S* çözeltisi ile boyanarak proteinlerin jelden membrana transfer edilip edilmedikleri kontrol edilmiştir. Ayrıca, jel *Coomassie Brilliant Blue* boyasında 1 saat bekletildikten sonra, bir gece boyu *Destaining* (boya giderici) çözeltisinde bekletilmiş ve iskelet kası örneklerinde gözlenen miyozin protein bantı internal eşit yükleme kontrol proteini olarak kullanılmıştır.

#### **Hibridizasyon**

Membran %0,05 TBS-T içinde %5 süt tozundan oluşan bloklama çözeltisi içerisinde çalkalayıcı üzerinde 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Primer antikör *rabbit* anti-LAP1 (Dr. William T. Dauer, Michigan Üniversitesi, ABD) %0,05 TBS-T içinde %5 süt tozundan oluşan sulandırım çözeltisi içerisinde 1:2500 oranında seyreltilmiş ve membran üstünde 16 saat boyunca +4 °C'de inkübe edilmiştir. Membran yıkama tamponu ile 3 kez 10 dk. yıkanmıştır.

Sulandırım çözeltisinde 1:3000 oranında sulandırılmış IgG (H+L) *horseradish* peroksidaz (HRP) işaretli *goat anti-rabbit* sekonder antikoru ile membran çalkalayıcı

üzerinde 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası yıkama tamponunda 3 kez 10 dk. yıkama yapılmış ve bağlanmayan antikorlar membrandan uzaklaştırılmıştır.

Kontrol karaciğer ve böbrek örnekleri için eşit yükleme proteini olarak beta-aktin kullanılmıştır. Membran yıkandıktan sonra, 1:25000 oranında seyreltilmiş HRP-işaretli anti-beta aktin antikorunu 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Görüntüleme çözeltisi *ChemiFast* kemilüminesans kitinde bulunan A ve B çözeltilerinin 1:1 oranında karışımından hazırlanmıştır. Karanlık ortamda membran görüntüleme karışımı ile 5 dk. inkübe edilmiş ve *GeneGnome* kemilüminesans görüntüleme cihazında 10 sn.'lik poz süreleri ile fotoğraflar çekilmiştir.

### 3.2.9. İmmü Floresan boyama

Hasta ve kontrol kas dokularında LAP1B proteini yerleşimi, proteini luminal bölgesinden tanıyan *rabbit* poliklonal anti-TOR1AIP1 (Merck Millipore, 06-1001) antikorunu kullanılarak aşağıda belirtilen protokol izlenerek immü floresan boyama yöntemi ile incelenmiştir.

Kontrol ve A ailesinden IV:2 nolu hasta bireye ait lam üzerine alınmış ve -80 °C'da muhafaza edilen 7 µm'lik iskelet kası kesitleri kullanılmıştır.

- Dondurucudan çıkarılan kesitler 30 dk. oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, dokuların etrafı *Pappen* ile işaretlenmiştir.
- Dokular 10 dk. oda sıcaklığında %4'lük PFA çözeltisinde bekletilerek dokunun lam üzerine fiksasyonu sağlanmıştır.
- Fiksasyon sonrası PFA uzaklaştırılmış ve dokular 2 kez 5 dk. 1x PBS ile yıkanmıştır.
- Dokular 10 dk. oda sıcaklığında, 1x PBS içerisinde hazırlanmış %0,5 Triton X-100 permeabilizasyon çözeltisinde bekletilmiştir.
- Permeabilizasyon çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra, 3 kez 5 dk. 1x PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Preparatlar üzerine 1x PBS içinde hazırlanmış %5 BSA (0,1 gr/ml)'dan oluşan Bloklama Çözeltisi 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek uygulanmıştır.

- Primer antikor sulandırım çözeltisi (1x PBS içinde hazırlanmış %5 BSA) içerisinde 1:400 oranında sulandırılmış ve 1 saat süre ile oda sıcaklığında preparatlar üzerinde bekletilmiştir.
- 3 kez 5 dk. 1x PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Sekonder antikor *Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit IgG* sulandırım çözeltisi (1x PBS içinde hazırlanmış %5 BSA) içerisinde 1:500 oranında sulandırılıp 1 saat süre ile oda sıcaklığında kesitler üzerinde bekletilmiştir.
- 3 kez 5 dk. 1x PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Çekirdek boyaması 1x PBS ile 1:1000 oranında seyreltilmiş DAPI çözeltisi kesitler üzerinde 1 dk. oda sıcaklığında bekletilerek yapılmıştır.
- Dokular 1x PBS ile 1 kere 5 dk. yıkanmıştır.
- Kesitlerin üzerine *Prolong Gold Antifade* çözeltisi damlatılarak lamel kapatılmış ve ışık görmeyecek şekilde +4 °C'de saklanmıştır.

Preparatlar *Leica DFC 320* floresan mikroskopta uygun filtreler kullanılarak görüntülenmiş ve fotoğraflar *Leica Application Suite* yazılımı kullanılarak çekilmiştir.

### 3.2.10. Eş immünfloresan boyama

Hasta ve kontrol kas dokularında LAP1B proteini yerleşimi ile birlikte iskelet kası hücrelerinin membranlarının boyanması amacı ile laminin alfa-2 proteini boyanmıştır. Bu amaçla anti-TOR1AIP1 (Merck Millipore) ve anti-laminin alfa-2 (Chemicon) antikorları kullanılarak aşağıda belirtilen protokol izlenerek eş immünfloresan boyama uygulanmıştır.

Lam üzerine alınmış ve -80 °C'de saklanan kontrol ve IV:2 nolu hasta bireye ait 7 µm'lik iskelet kası kesitleri kullanılmıştır.

- Kesitler 30 dk. oda sıcaklığında kurutulmuş ve dokuların etrafı *Pappen* ile işaretlenmiştir.
- Dokular 10 dk. oda sıcaklığında %4'lük PFA çözeltisinde fikse edilmiştir.
- PFA uzaklaştırıldıktan sonra dokular 2 kez 5 dk. 1x PBS ile yıkanmıştır.

- Dokular 10 dk. oda sıcaklığında, 1x PBS içerisinde hazırlanmış %0,5 Triton X-100 permeabilizasyon çözeltisinde bekletilmiştir.
- Permeabilizasyon çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra, 3 kez 5 dk. 1x PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Preparatlar üzerine 1x PBS içinde hazırlanmış %5 BSA (0,1 gr/ml)'dan oluşan Bloklama Çözeltisi 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek uygulanmıştır.
- Birinci primer antikör olarak kullanılan anti-TOR1AIP1 antikörü, sulandırım çözeltisi (1x PBS içinde hazırlanmış %5 BSA) içerisinde 1:400 oranında sulandırılmış ve 1 saat süre ile oda sıcaklığında preparatlar üzerinde bekletilmiştir.
- 3 kez 5 dk. 1x PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Sekonder antikör *Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit IgG* sulandırım çözeltisi (1x PBS içinde hazırlanmış %5 BSA) içerisinde 1:500 oranında sulandırılıp 1 saat süre ile oda sıcaklığında kesitler üzerinde bekletilmiştir.
- 3 kez 5 dk. 1x PBS ile yıkama yapılmıştır.
- İkinci primer antikör olarak kullanılan anti-laminin alfa-2 antikörü, sulandırım çözeltisi (1x PBS içinde hazırlanmış %5 BSA) içerisinde 1:2000 oranında sulandırılmış ve 1 saat süre ile oda sıcaklığında preparatlar üzerinde bekletilmiştir.
- 3 kez 5 dk. 1x PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Sekonder antikör *Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG* sulandırım çözeltisi (1x PBS içinde hazırlanmış %5 BSA) içerisinde 1:500 oranında sulandırılıp 1 saat süre ile oda sıcaklığında kesitler üzerinde bekletilmiştir.
- 3 kez 5 dk. 1x PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Çekirdek boyaması 1x PBS ile 1:1000 oranında seyreltilmiş DAPI çözeltisinin kesitler üzerinde 1 dk. oda sıcaklığında bekletilerek yapılmıştır.

- Dokular 1x PBS ile 1 kere 5 dk. yıkanmıştır.
- Kesitlerin üzerine *Prolong Gold Antifade* çözeltisi damlatılarak lamel kapatılmış ve ışık görmeyecek şekilde +4 °C'da saklanmıştır.

Preparatlar *Leica DMIL* floresan mikroskopta uygun filtreler kullanılarak görüntülenmiş ve fotoğraflar *Leica Application Suite* yazılımı kullanılarak çekilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Homozigotluk Haritalaması Sonuçları

250K Nspl SNP genotipleme çalışma sonucunda, çiplerdeki genotip verilerinin güvenilirliğini belirten SNP genotipleme oranı (*call rate*) ortalama % 95,11 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

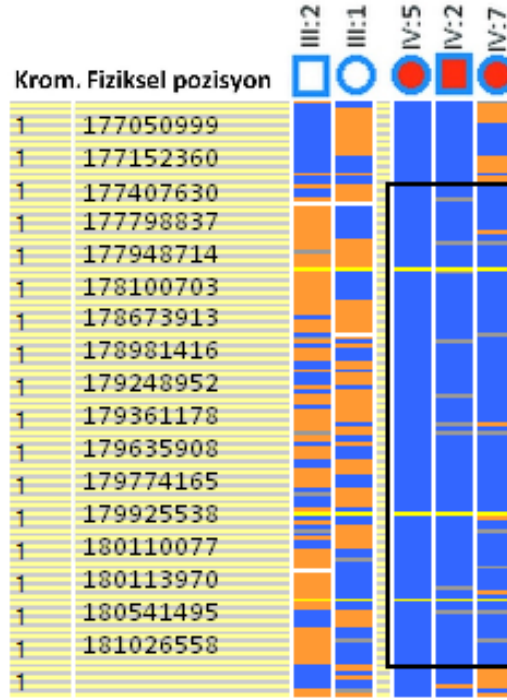
**Tablo 4.1.** 250K Nspl SNP genotipleme oranları.

Aile	Birey	SNP genotipleme oranı (%)
A	III:1	95,68
A	III:2	93,04
A	IV:2	94,52
A	IV:5	93,25
A	IV:7	94,34
B	III:1	94,57
B	III:2	95,55
B	IV:2	94,07
B	IV:3	96,83
B	IV:4	92,66
C	III:1	95,71
C	III:2	95,23
C	IV:1	96,18
C	IV:3	94,92
D	III:1	96,43
D	III:2	96,23
D	IV:1	96,28
D	IV:2	96,57

#### **Homozigotluk haritalaması: A ailesi**

A ailesinde (Şekil 1.1A) IV:5 nolu hasta birey referans birey olarak seçilmiştir. Buna göre, diğer iki hasta bireyin (IV:2 ve IV:7) haplotipleri oluşturulmuştur. Ayrıca IV:2 ve IV:5 nolu hasta bireylerin anne ve babasına (III:1 ve III:2) ait genotipleme bilgileri de kullanılarak tüm kromozomlar homozigotluk açısından incelenmiştir. Üç hasta bireyde ortak bir şekilde homozigotluğun bozulmadığı ve anne-babanın

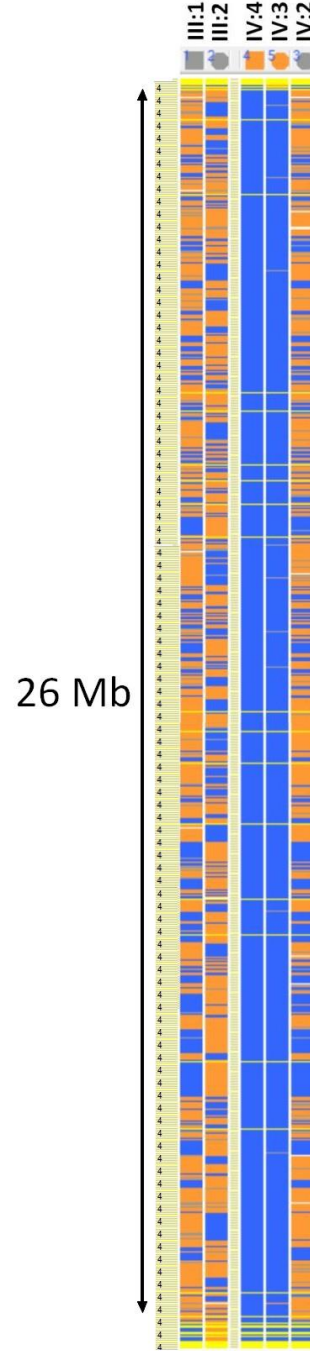
heterozigot olduğu bir tek anlamlı bölge tespit edilmiştir. 1q25.2 kromozom bölgesinde yer alan 3,6 Mb uzunluğundaki bu haplotip, SNP\_A-2179216 ve SNP\_A-4230029 genetik belirteçleri arasında toplam 117 SNP genetik belirtecini kapsamaktadır (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** A ailesi için yapılan genom boyu homozigotluk haritalaması sonucu 1q25.2 kromozom bölgesinde tespit edilen homozigot haplotip. Üç hasta bireyde (IV:5, IV:2 ve IV:7) ortak bir homozigot haplotip (çerçeve içerisinde) gözlenirken, baba (III:2) ve annede (III:1) bu bölgede yer alan SNP'lerin heterozigot (turuncu) olduğu görülmektedir. (Krom.: kromozom numarası).

#### **Homozigotluk haritalaması: B ailesi**

B ailesinde (Şekil 1.1B) yapılan homozigotluk haritalaması için, IV:4 nolu hasta birey referans birey olarak kullanılarak hasta kardeşin (IV:3), sağlıklı kardeşin (IV:2) ve anne-babanın (III:1 ve III:2) genom boyu haplotipleri oluşturulmuştur. İki hasta bireyde ortak olan en uzun homozigot haplotip toplam 26 Mb uzunluğundadır ve 4. kromozomda 4p13 ile 4q13.2 bölgeleri arasında yer almaktadır (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** B ailesi için yapılan genom boyu homozigotluk haritalaması sonucu 4p13 ile 4q13.2 arasında tespit edilen 26Mb uzunluğundaki homozigot haplotip. IV:4 ve IV:3 nolu hasta bireylerde ortak homozigot haplotip (mavi) gözlenmektedir. Bu bölgedeki SNP'lerin baba (III:1), anne (III:2) ve sağlıklı kardeşte (IV:2) heterozigot (turuncu) olduğu görülmektedir.



### Homozigotluk haritalaması: C ve D aileleri

C ve D ailelerinde (Şekil 1.1C, 1.1D) yapılan homozigotluk haritalaması sonucunda, ailelerde sadece birer hasta birey olması nedeni ile, birden fazla geniş homozigot haplotip tespit edilmiştir: C ailesinde 3, D ailesinde 10 geniş homozigot haplotip gözlenmiştir. Tespit edilen homozigot haplotiplerin genişliği (10 Mb ve üstü) tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** C ve D ailelerinde homozigotluk haritalaması sonucunda farklı kromozomlarda tespit edilen homozigot haplotipler.

Kromozom	C ailesi	D ailesi
2		17,0 Mb
3		10,9 Mb 24,0 Mb
4		59,0 Mb
5	20,7 Mb	11,9 Mb
6	23,4 Mb	
7		20,3 Mb 27,1 Mb
10		12,9 Mb
14		14,9 Mb
17		31,7 Mb
18	28,0 Mb	

Tüm aileler kendi içlerinde ayrı ayrı homozigotluk haritalaması ile analiz edildikten sonra, ailelerdeki hasta bireyler birleştirilerek tekrar homozigotluk haritalaması çalışması yapılmıştır. Bu şekilde, hastalıktan sorumlu lokusun birden fazla ailede ortak olma olasılığı durumunda sorumlu kromozom aralığının daraltılması olasılığı düşünülmüştür. İlk olarak, C ve D ailelerinde tek bir aday kromozom aralığının bulunmaması sebebi ile, bu ailelerdeki hasta bireyler, ayrı ayrı A ve B aileleri ile birleştirilerek homozigotluk haritalaması çalışmasına alınmıştır. Ayrıca, dört ailedeki tüm hastalar tek bir analizde birleştirilerek de incelenmiştir. Sonuç olarak, aileler arasında herhangi bir ortak homozigot haplotip tespit edilmemiştir.

## 4.2. Aday Genlerin Araştırılması

### Aday gen araştırması: A ailesi

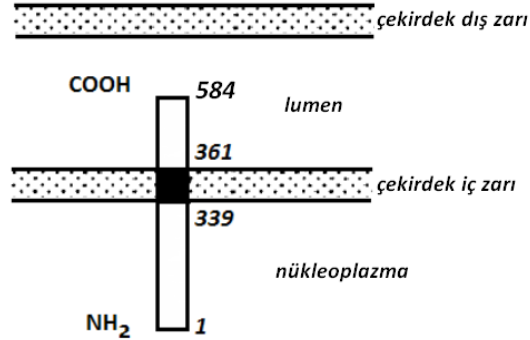
A ailesinde tespit edilen homozigot haplotipin kapsadığı bölge, *NCBI-Map Viewer* (Sürüm 104) ve *Ensembl Genome Browser* (Sürüm 73.37) araçlarında hg19 referans olarak kullanılarak incelenmiştir. 1q25.2 kromozom bölgesinin 177.427.005 ile 181.026.558 baz çiftleri arasında toplam 22 protein kodlayan genin bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** 1q25.2 kromozom bölgesinin 177.427.005 ile 181.026.558 baz çiftleri arasında yer alan genler.

<i>SEC16B</i>	<i>SEC16 homolog B</i>
<i>RASAL2</i>	<i>RAS protein activator like 2</i>
<i>TEX35</i>	<i>testis expressed 35</i>
<i>RALGPS2</i>	<i>Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2</i>
<i>ANGPTL1</i>	<i>angiopoietin-like 1</i>
<i>FAM20B</i>	<i>family with sequence similarity 20, member B</i>
<i>TOR3A</i>	<i>torsin family 3, member A</i>
<i>ABL2</i>	<i>v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2</i>
<i>SOAT1</i>	<i>sterol O-acyltransferase 1</i>
<i>AXDND1</i>	<i>axonemal dynein light chain domain containing 1</i>
<i>NPHS2</i>	<i>nephrosis 2, idiopathic, steroid-resistant (podocin)</i>
<i>TDRD5</i>	<i>tudor domain containing 5</i>
<i>FAM163A</i>	<i>family with sequence similarity 163, member A</i>
<i>TOR1AIP2</i>	<i>torsin A-interacting protein 2</i>
<i>TOR1AIP1</i>	<i>torsin A-interacting protein 1</i>
<i>CEP350</i>	<i>centrosomal protein 350 kDa</i>
<i>QSOX1</i>	<i>quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1</i>
<i>LHX4</i>	<i>LIM homeobox 4</i>
<i>ACBD6</i>	<i>acyl-CoA binding domain containing 6</i>
<i>XPR1</i>	<i>Xenotropic and polytropic retrovirus receptor</i>
<i>STX6</i>	<i>syntaxin 6</i>
<i>MR1</i>	<i>major histocompatibility complex, class I-related</i>

Homozigot haplotipte yer alan genler ifade, işlev ve bilinen hastalıklar ile ilişkileri açısından çeşitli veri bankaları ve literatür bilgileri kullanılarak incelendikten sonra, *TOR1AIP1* (*torsin A-interacting protein 1* [MIM 614512]) geni LGMD2 fenotipinden sorumlu güçlü bir aday olarak seçilmiştir.

*TOR1AIP1* gen ürünü, ilk defa sıçan karaciğer dokusunda çekirdek membranına özgül üç izoform halinde "lamina-ilişkili polipeptid 1" (LAP1A, LAP1B ve LAP1C) isimli proteinler olarak tanımlanmıştır (68). İnsanda, *LAP1* genine benzer dizilerin araştırılması sonucunda insan *LAP1* geni tanımlanmış ve sıçan *LAP1B* izoformuna benzerliğinden dolayı, *LAP1B* olarak adlandırılmıştır (69). LAP1B proteini 584 amino asit uzunluğundadır ve üç domainden oluşmaktadır: nükleoplazmik, transmembran ve lumenal domainler (Şekil 4.3) (69). İç çekirdek membranında yer alan tip-2 integral membran proteini olan LAP1, nükleoplazmik domaini (1-339. amino asitler) ile A ve B laminlere, lumenal domaini (361-584. amino asitler) ile torsin A proteini ile etkileşime girmektedir (68-71).



**Şekil 4.3.** LAP1B proteininin yapısı ve yerleşimi. LAP1B transmembran domaini (340-360. amino asitler) sayesinde çekirdek iç zarında yerleşim göstermektedir.

Son yıllarda LAP1 proteininin lumenal domaini aracılığı ile nörolojik bir hastalık olan DYT1 distonisinden sorumlu torsin A proteini ile etkileşimde olduğunun tespit edilmesi, LAP1'in torsin A-etkileşimli protein 1 (*TOR1AIP1*) olarak adlandırılmasına neden olmuştur (72, 73). Torsin A ile etkileşime giren bir diğer protein, *TOR1AIP2* (*torsin A-interacting protein 2*) tarafından kodlanan LULL1 (luminal domain like LAP1) proteindir (72, 73). Genomda ardarda yerleşim gösteren

*TOR1AIP1* ve *TOR1AIP2* genlerinin duplikasyon yolu ile meydana geldikleri düşünülmektedir (72). Nitekim, LAP1 ve LULL1 proteinlerinin, torsin A ile etkileşimi sağlayan lümenal bölgeleri %60 oranında homoloji göstermektedir (72). Ancak, transmembran bölgelerinin farklı olması, LAP1'in çekirdek iç zarında, LULL1'in ise ER'de yerleşim göstermesini sağlamaktadır. *TOR1AIP1* geninin aralarında iskelet kası da olmak üzere birçok dokuda ifadesi bulunmaktadır (72, 74).

Çekirdek zarf yapısında yer alan lamin A/C, lamin B, lamin B reseptörü, emerin, nesprin-1, nesprin-2 ve timopoetin gibi çeşitli proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonların çekirdek zarfı bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir (75-77). Laminopatiler veya çekirdek zarfı hastalıkları (*nuclear envelopathies*) olarak adlandırılan bu hastalık grubu, kas distrofisi, kardiyomiyopati, lipodistrofi, mandibuloakral displazi, nöropati, progeria, restriktif dermopati, artrogripozis, Pelger-Huet anomalisi, lökodistrofi gibi farklı klinik sendromları barındırmaktadır. Mutant oldukları durumda kas distrofisi fenotipine neden olan çekirdek zarfı proteinlerini kodlayan genler ve neden olduğu kas distrofilere aşağıda yer alan tabloda belirtilmiştir (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4.** Çekirdek zarfı proteinlerini kodlayan genler, gen ürünleri ve mutant olmaları durumunda neden oldukları kas distrofisi fenotipleri.

Gen	Protein	Fenotip	Referans
<i>LMNA</i>	Lamin A/C	Emery-Dreifuss kas distrofisi, 2, AD	78
		Emery-Dreifuss kas distrofisi, 3, AR	79
		Dilate kardiyomiyopati, 1A	80
		Limb-girdle kas distrofisi, 1B	81
		Konjenital kas distrofisi	82
<i>EMD</i>	Emerin	Emery-Dreifuss kas distrofisi 1, X'e bağlı	83
<i>SYNE1</i>	Nesprin-1	Emery-Dreifuss kas distrofisi, 4, AD	76
<i>SYNE2</i>	Nesprin-2	Emery-Dreifuss kas distrofisi, 5, AD	76
<i>TMPO (LAP2)</i>	Timopoietin	Dilate kardiyomiyopati, 1T	77

Yukarıda bahsedilen tüm literatür bulgularına, A ailesindeki hastaların bazı klinik bulgularının (Bkz. Tartışma sayfa 55) Emery-Dreifuss kas distrofisi fenotipi ile benzerlikler taşımasının da eklenmesi ile, *TOR1AIP1* mutant olması durumunda çekirdek zarfı hastalığına neden olan yeni bir gen olarak düşünülmüş ve DNA dizi analizine alınmıştır.

#### **Aday gen araştırması: B ailesi**

B ailesinde 4. kromozomda 4p13 ile 4q13.2 bölgeleri arasında tespit edilen homozigot haplotipin kapsadığı bölgede yer alan genler *NCBI-Map Viewer* (Sürüm 104) ve *Ensembl Genome Browser* (Sürüm 73.37) veri tabanları kullanılarak incelenmiştir. Yaklaşık 43.884.368 bç ile 70.325.709 bç arasındaki bölgede 100'den fazla protein kodlayan gen tespit edilmiştir. Bu genler arasında LGMD2E fenotipinden sorumlu *SGCB* geni bulunmaktadır. *SGCB*, bu ailede DNA dizi analizi ile incelenmiş ve gende patojenik bir varyasyon tespit edilmemiştir.

Veri tabanı ve literatür incelemesinden sonra, aday genler arasından *HOPX* geni (MIM 607275) LGMD2 fenotipinden sorumlu olabilecek bir aday gen olarak seçilmiştir. *HOPX* geninin aday olarak seçilmesinin sebebi, Hop Homeobox (*HOPX*) proteininin EPC1 proteini ile etkileşime girerek, iskelet kası farklılaşmasında rol oynaması ve *HOPX-null* fare modelinde miyoblast farklılaşma sürecinin etkilenmesi olmuştur (84).

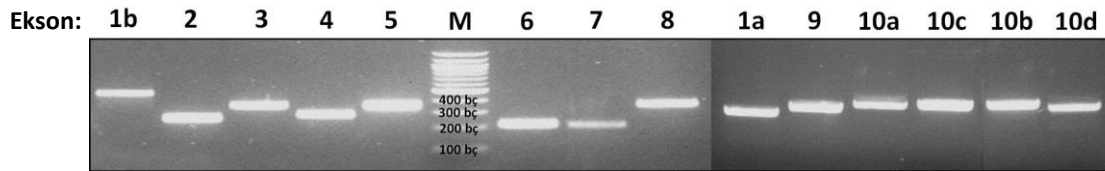
*HOPX* proteininin 4 izoformuna özgül kodlanan eksonlar DNA dizi analizi ile incelenmiştir. İncelenen B ailesinin hasta bireylerinde, *HOPX* geni dizisinde patojenik nitelikte herhangi bir varyasyon tespit edilmemiştir.

#### **4.3. A Ailesinde Aday Gen *TOR1AIP1* İçin Yapılan DNA Dizi Analizi Çalışması**

Aday gen olarak seçilen *TOR1AIP1*'e ait 10 kodlanan ekson PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünleri saflaştırıldıktan sonra, saflaştırılan örneklerin konsantrasyonu ve saflığı nanospektrofotometrik ölçümler ile belirlenmiştir (Tablo 4.5). Ayrıca amplifikasyon ürünlerinin özgüllüğü agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.4).

**Tablo 4.5.** Saflaştırılmış *TOR1AIP1* PZR ürünlerinin nanospektrofotometrik ölçüm değerleri.

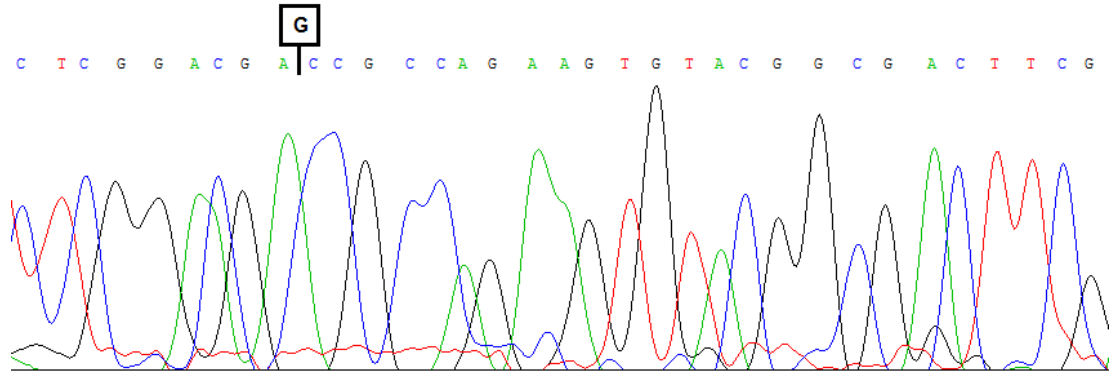
Ekson	Konsantrasyon Değeri (ng/μl)	260/280 Absorbans Değeri (OD)
1a	41.6	1.86
1b	26.4	1.82
2	46.2	1.82
3	38.5	1.87
4	34.5	1.76
5	46.8	1.90
6	35.9	1.82
7	26.6	1.87
8	43.1	1.83
9	43.4	1.81
10a	33.1	1.88
10b	43.4	1.81
10c	45.8	1.78
10d	27.9	1.79



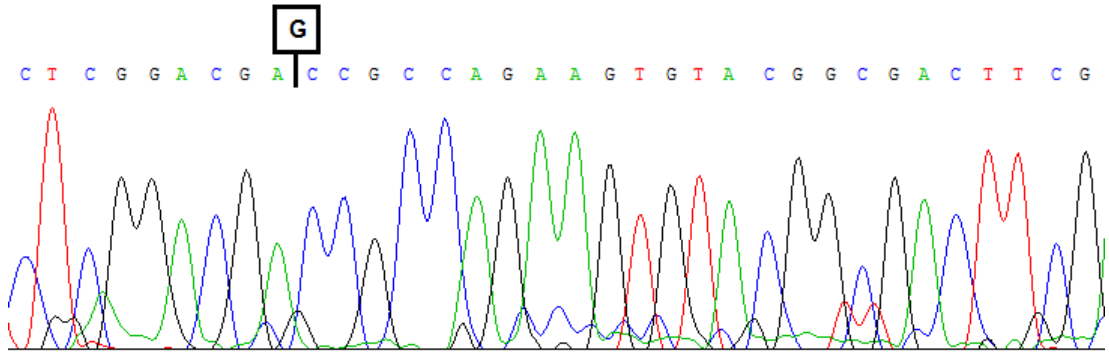
**Şekil 4.4.** Saflaştırılan PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. M: 100 bç moleküler ağırlık belirteci.

Aday gen *TOR1AIP1*'e (NM\_015602.3) ait 10 kodlanan ekson ve ekson-intron sınırları için yapılan DNA dizi analizi sonuçları incelenmiştir. İncelenen hasta bireylerde, *TOR1AIP1*'in 1. eksonunda 186. pozisyondaki guaninin delesyona uğradığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5A, B, C).

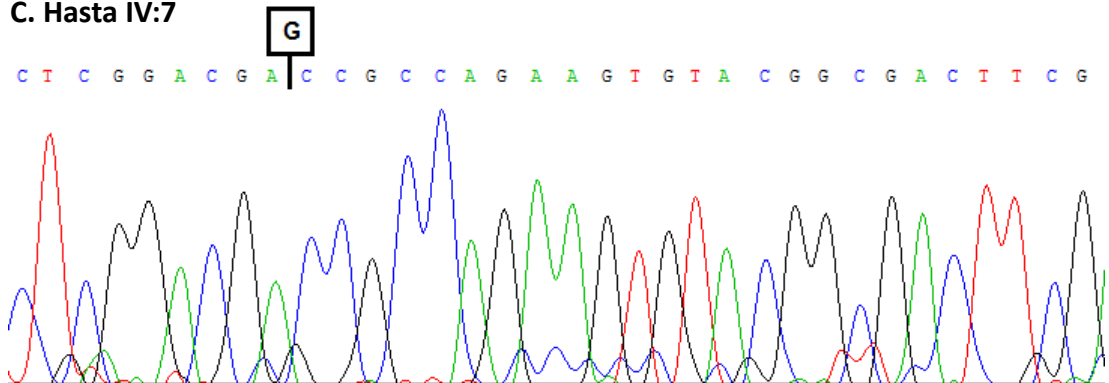
**A. Hasta IV:5**



**B. Hasta IV:2**



**C. Hasta IV:7**

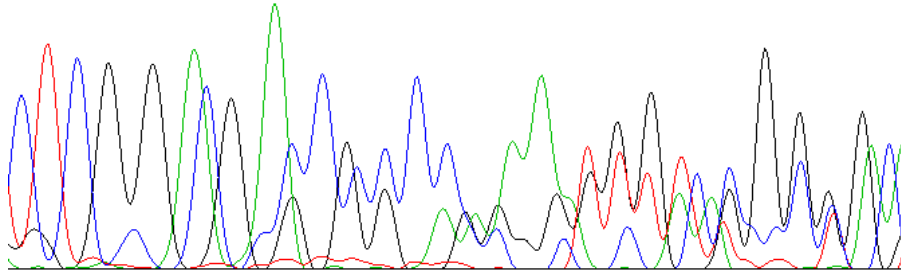


**Şekil 4.5.** *TOR1AIP1* ekson 1 bölgesinin A ailesinin hasta bireylerine ait kromatogram görüntüleri: A. IV:2 nolu hasta birey. B. IV:5 nolu hasta birey. C. IV:7 nolu hasta birey.

A ailesindeki sağlıklı bireylerin *TOR1AIP1* geninde c.186delG mutasyonunu taşıyıp taşımadıkları DNA dizi analizi ile incelenmiştir. Ailedeki sağlıklı ebeveynler (II:4, III:1, III:2, III:3 ve III:4) ve kardeşlerde (IV:1, IV:3 ve IV:4) heterozigot c.186delG mutasyonu saptanmıştır ve taşıyıcı oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.6A-H).

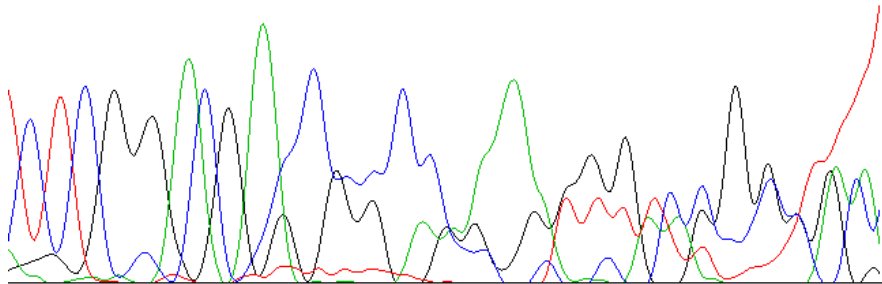
#### A. Taşıyıcı II:4

C T C G G A C G A G C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A *Yabani alel*  
 C T C G G A C G A C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A C *Mutant alel*



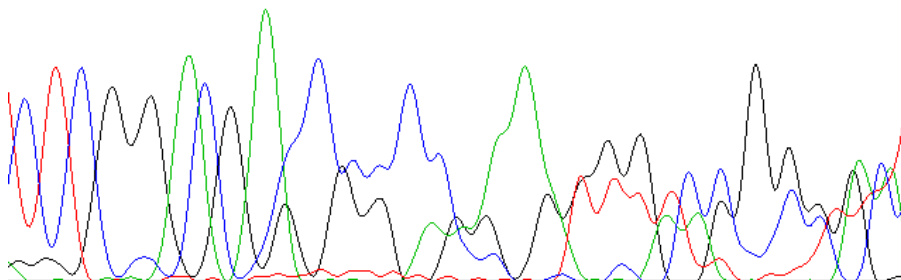
#### B. Taşıyıcı III:1

C T C G G A C G A G C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A  
 C T C G G A C G A C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A C



#### C. Taşıyıcı III:2

C T C G G A C G A G C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A  
 C T C G G A C G A C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A C

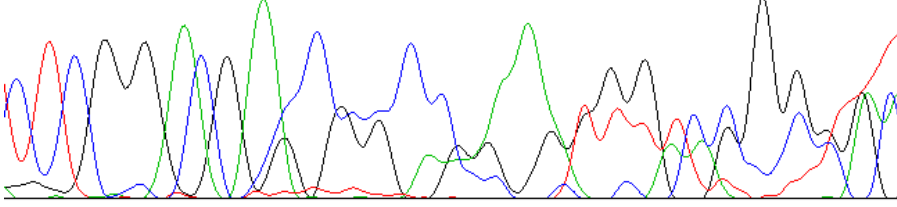


**Şekil 4.6.** *TOR1AIP1* c.186delG mutasyonunu heterozigot formda taşıyan A ailesinin bireylerine ait kromatogram görüntüleri: A II:4 nolu birey. B. III:1 nolu birey. C. III:2 nolu birey.

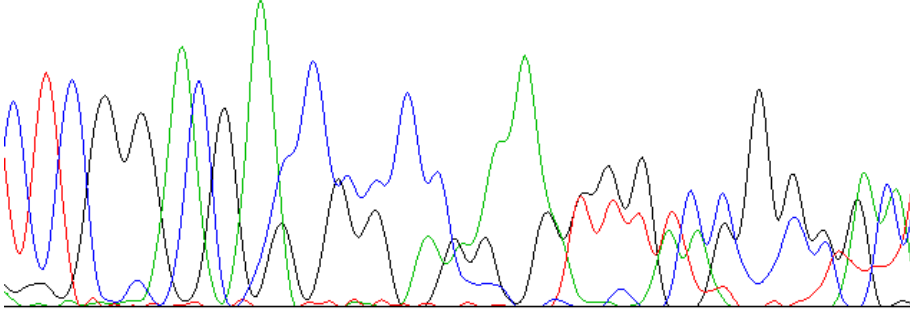


**D. Taşıyıcı III:3**

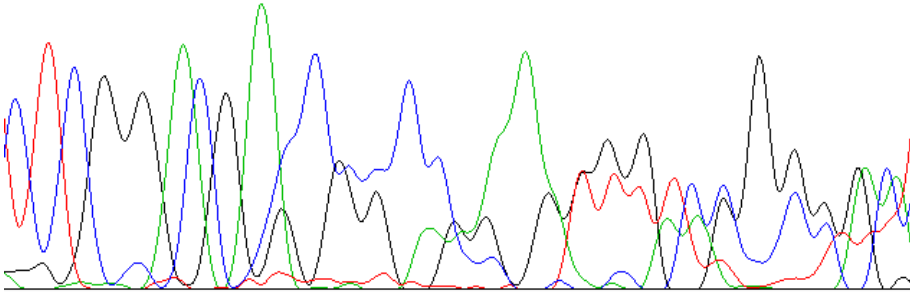
C T C G G A C G A G C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A  
 C T C G G A C G A C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A C

**E. Taşıyıcı III:4**

C T C G G A C G A G C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A  
 C T C G G A C G A C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A C

**F. Taşıyıcı IV:1**

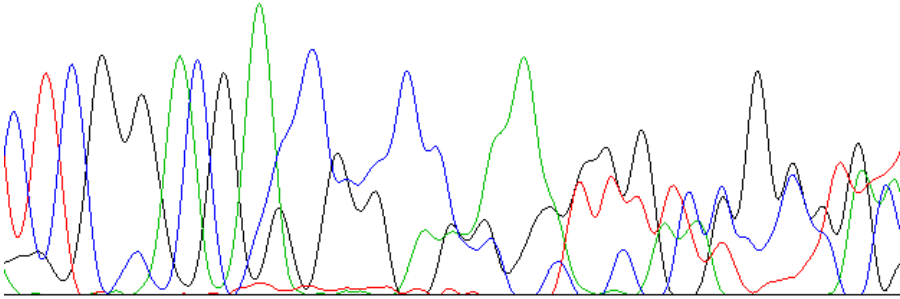
C T C G G A C G A G C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A  
 C T C G G A C G A C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A C



**Şekil 4.6. (Devam).** *TOR1AIP1* c.186delG mutasyonunu heterozigot formda taşıyan A ailesinin bireylerine ait kromatogram görüntüleri: D. III:3 nolu birey. E. III:4 nolu birey. F. IV:1 nolu birey.

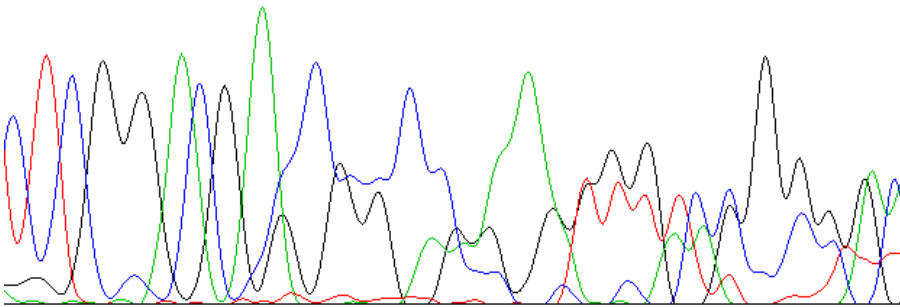
### G. Taşıyıcı IV:3

C T C G G A C G A G C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A  
 C T C G G A C G A C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A C



### H. Taşıyıcı IV:4

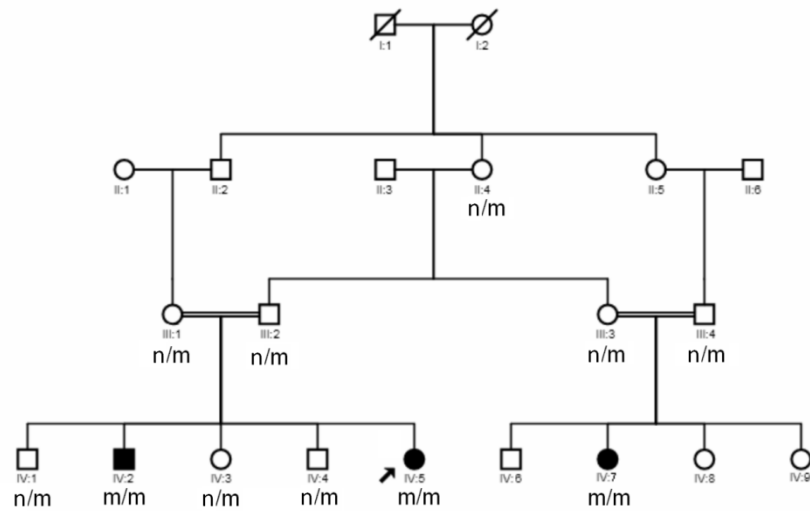
C T C G G A C G A G C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A  
 C T C G G A C G A C C G C C A G A A G T G T A C G G C G A C



**Şekil 4.6. (Devam).** *TOR1AIP1* c.186delG mutasyonunu heterozigot formda taşıyan A ailesinin bireylerine ait kromatogram görüntüleri: G. IV:3 nolu birey. H. IV:4 nolu birey.

A ailesinde DNA dizi analizine alınan sağlıklı bireylerin taşıyıcı olduğu saptanmıştır: c.186 pozisyonunda normal alelde G bulunurken, mutant alelde G delesyonu gözlenmiştir. Taşıyıcı bireylerde, delesyon öncesi DNA dizisinde homozigot bölgedeki nükleotidler tek pik olarak gözlenmektedir. Ancak G delesyonundan sonra, mutant alel dizisi bir nükleotid kıaldığı için, okuma çerçevesinde bir kayma sözü konusudur ve aynı pozisyonda iki farklı nükleotit üst üste çıkışarak heterozigotluk oluşmaktadır.

Mutasyonun aile içindeki segregasyonu aile ağacı üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.7).



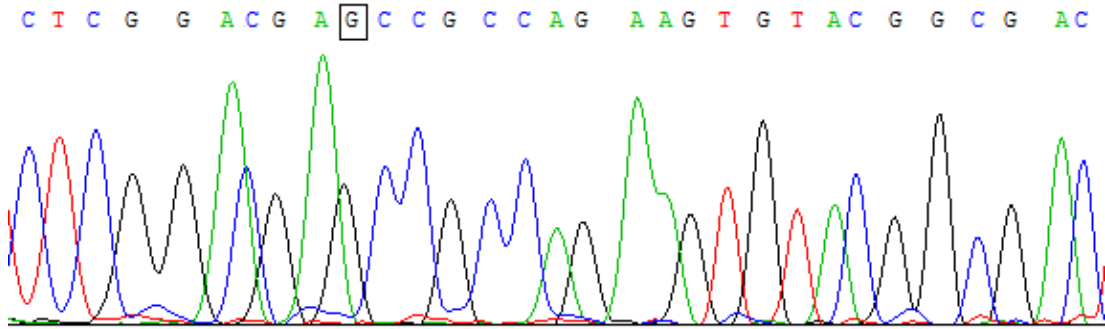
**Şekil 4.7.** LGMD2 tanısı alan A ailesinde *TOR1AIP1* c.186delG mutasyonunun aile içi segregasyonu. n: normal alel, m: mutant alel.

A ailesinde *TOR1AIP1* geninde saptanan c.186delG varyasyonu *dbSNP* ve *Ensembl* veri tabanları ile *1000 Genomes* ve *HapMap* proje verilerinde gözlenmemiştir.

#### 4.4. Sağlıklı Türk Toplumunu Taraması

50 sağlıklı birey<sup>2</sup> (100 alel) DNA dizi analizi ile A ailesinde tespit edilen *TOR1AIP1* c.186delG mutasyonu açısından taranmış ve hiçbir bireyde bu varyasyon saptanmamıştır (Şekil 4.8). Buna ek olarak, LGMD2 tanısı alan, birbiri ile akrabalık ilişkisi olmayan 80 hastada c.186delG mutasyonu taranmıştır ve bu hastalarda mutasyon tespit edilmemiştir.

<sup>2</sup> Sağlıklı birey toplumu DMD, Spinal Müsküler Atrofi ve Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarının aralarında akrabalık ilişkisi olmayan sağlıklı ebeveynlerinden oluşturulmuştur.

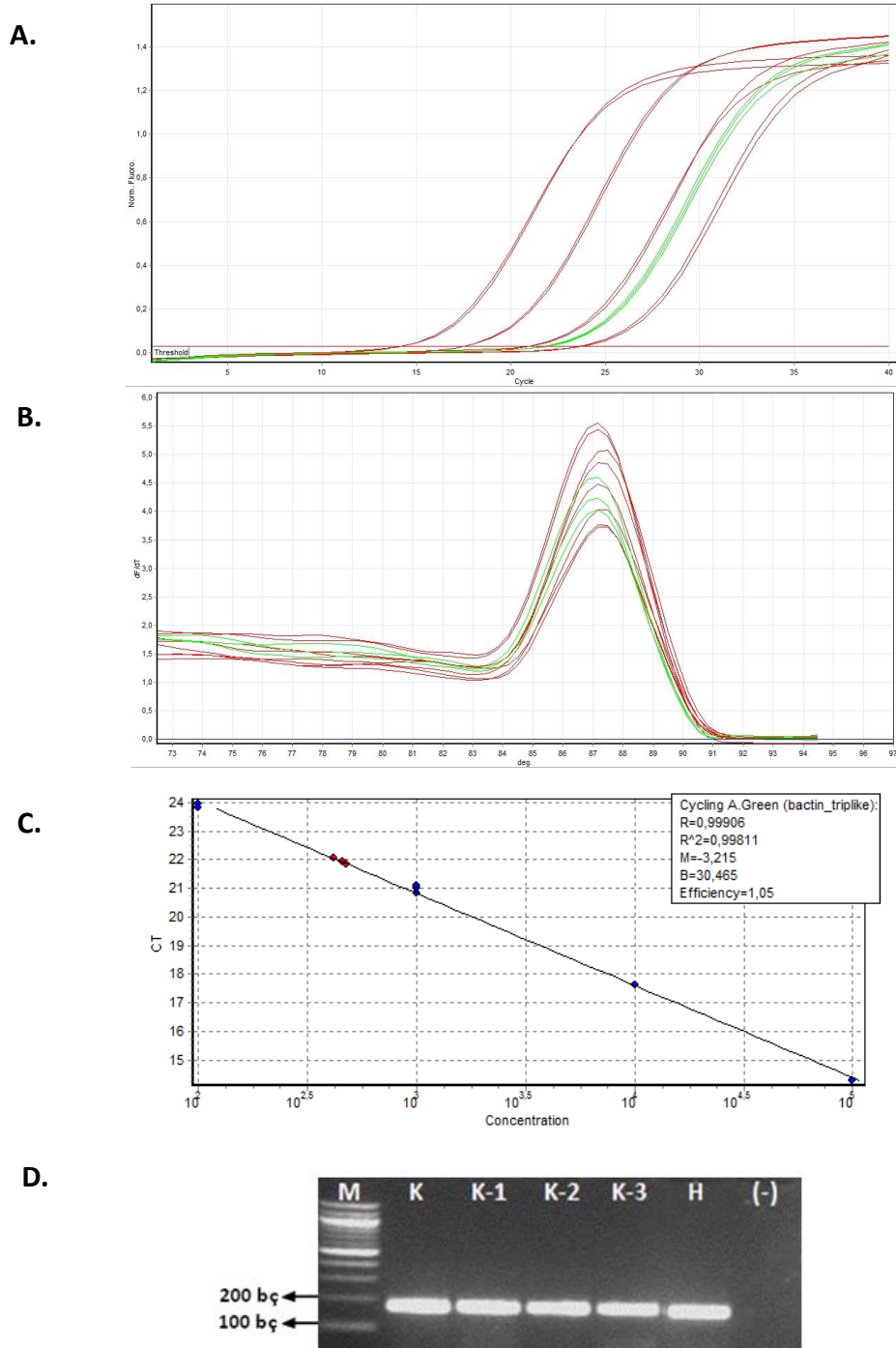


**Şekil 4.8.** *TOR1AIP1* ekson 1 bölgesinin sağlıklı bireye ait kromatogram görüntüsü.

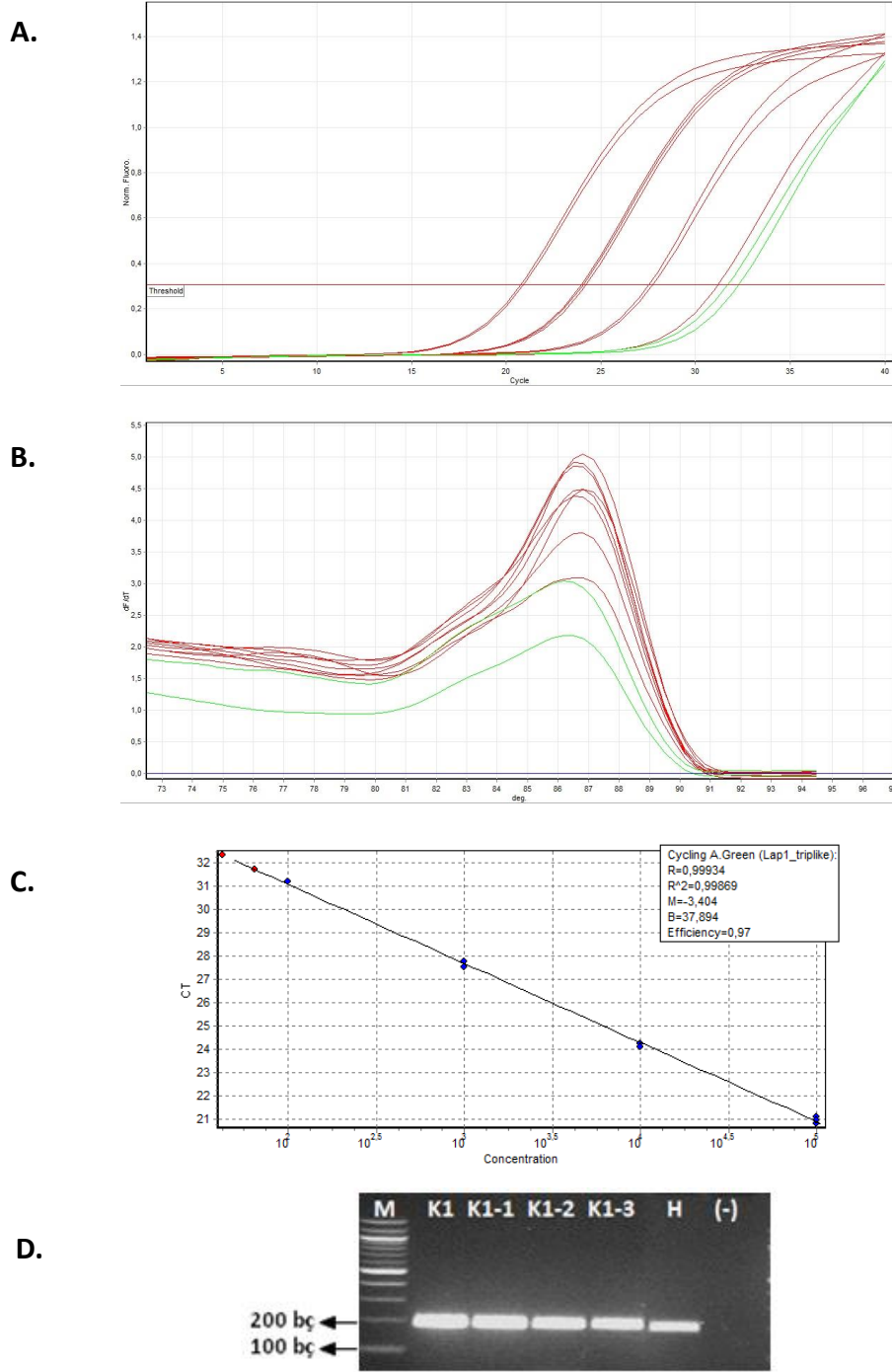
*TOR1AIP1* geninde 186. pozisyonundaki G işaretlenmiştir.

#### 4.5. *TOR1AIP1* İfadesinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Analiz Edilmesi

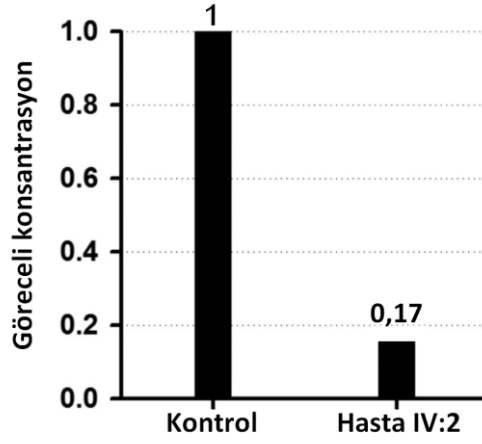
A ailesinden IV:2 nolu hasta birey ve kontrol kas dokularında *TOR1AIP1* mRNA ifade düzeyi kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi ile tespit edilmiştir. Çalışmada *TOR1AIP1* transkriptinin göreceli ifadesi, *ACTB* ifadesine göre normalize edilmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Deney üç kere tekrar edildikten sonra, her bir deneyde hesaplanan hasta kas dokusundaki *TOR1AIP1* transkriptinin göreceli ifadelerinin ortalaması alınmıştır. Buna göre, kontrol kas dokusuna oranla, IV:2 nolu hasta kas dokusunda *TOR1AIP1* mRNA göreceli konsantrasyon değerinin 1'e karşı 0,17 olduğu hesaplanmıştır. Bu sonuç, hasta kas dokusunda *TOR1AIP1* mRNA düzeyinin 5,88 kat azalmış olduğunu göstermektedir (Şekil 4.11).



**Şekil 4.9.** Kontrol (kırmızı) ve hasta (yeşil) kas dokusunda *ACTB* mRNA ifade düzeyinin analizi: A) *ACTB* amplifikasyon eğrisi. B) *ACTB* erime eğrisi. C) *ACTB* standart eğri. D) *ACTB* transkriptine özgül amplifikasyon ürünü (164 bç) %3'lük agaroz jelde incelenmiştir. K: Standart kontrol örneği, K-1:  $10^{-1}$  standart dilüsyon, K-2:  $10^{-2}$  standart dilüsyon, K-3:  $10^{-3}$  standart dilüsyon, H: Hasta örneği, (-): Negatif Kontrol. M: 100 bç moleküler ağırlık belirteci.



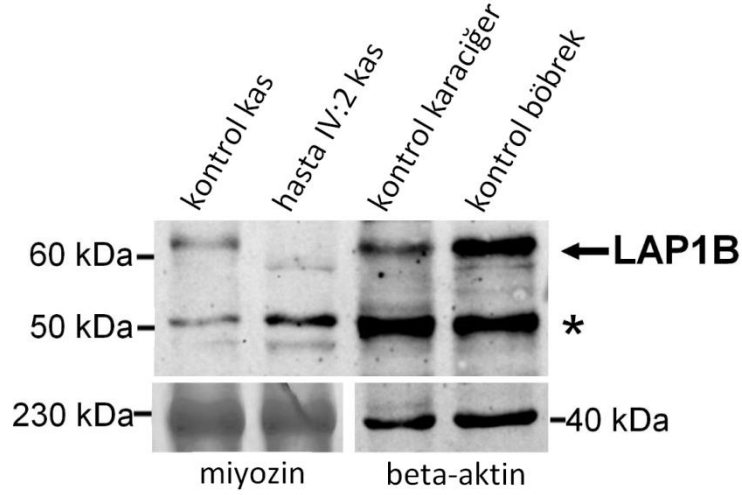
**Şekil 4.10.** Kontrol (kırmızı) ve hasta (yeşil) kas dokusunda *TOR1AIP1* mRNA ifade düzeyinin analizi: A) *TOR1AIP1* amplifikasyon eğrisi. B) *TOR1AIP1* erime eğrisi. C) *TOR1AIP1* standart eğri. D) *TOR1AIP1* transkriptine özgül amplifikasyon ürünü (190 bç) %3'lük agaroz jelde incelenmiştir. K: Standart kontrol örneği, K-1:  $10^{-1}$  standart dilüsyon, K-2:  $10^{-2}$  standart dilüsyon, K-3:  $10^{-3}$  standart dilüsyon, H: Hasta örneği, (-): Negatif kontrol. M: 100 bç moleküler ağırlık belirteci.



**Şekil 4.11.** Kantitatif gerçek-zamanlı PZR çalışması sonucunda hesaplanan TOR1AIP1 transkriptinin göreceli konsantrasyonu. Hasta kas dokusunda *TOR1AIP1* mRNA göreceli ifade düzeyi kontrol kasa göre 5,88 kat azalmıştır.

#### **4.6. *TOR1AIP1* Tarafından Kodlanan LAP1B Proteinini İfadesinin *Western Blot* ile İncelenmesi**

Anti-LAP1 antikorunu kullanılarak yapılan *western blot* çalışması sonucunda, örneklerde iki bant gözlenmiştir (Şekil 4.12). Kontrol iskelet kası, karaciğer ve böbrek dokularında gözlenen LAP1B proteinine karşılık gelen 66,3 kDa büyüklükteki bantın hasta iskelet kasında olmadığı tespit edilmiştir. Ek olarak, moleküler ağırlığı yaklaşık 50 kDa olan ikinci bir bant örneklerin tümünde gözlenirken, bu bantın hasta iskelet kasında kontrol kasa oranla daha yüksek oranda ifade edildiği görülmektedir (Şekil 4.12, \*).



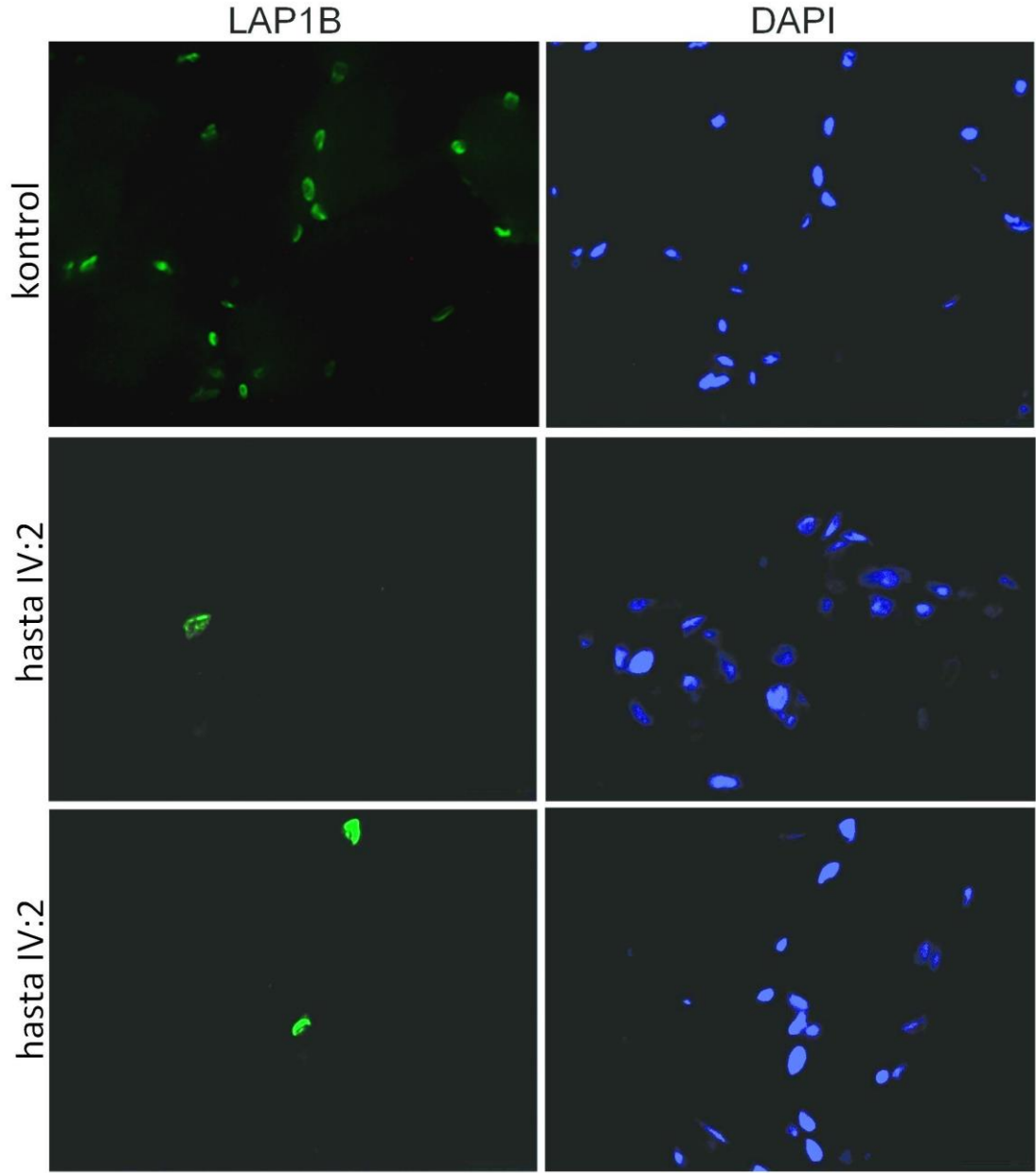
**Şekil 4.12.** Anti-LAP1 antikoruna ile yapılan *western blot* çalışması sonucu (poz süresi: 10sn.). Kontrol örneklerde tespit edilen 66,3 kDa büyüklükteki LAP1B bantı, hasta kas örneğinde gözlenmemiştir. Tüm örneklerde tespit edilen 50 kDa civarındaki ikinci bir bantın, kontrol kasa oranla hasta kasında daha yüksek ifade edildiği görülmektedir (\*). Miyozin bantı kas örnekleri için eşit yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Karaciğer ve böbrek örnekleri için eşit yükleme kontrolü olarak beta-aktin proteini kullanılmıştır (poz süresi: 10 sn.).

#### 4.7. LAP1B Yerleşiminin İmmüno Floresan Boyama ile İncelenmesi

Hasta ve kontrol kas dokusundaki LAP1B yerleşimi, proteinin lümenal bölgesine karşılık gelen anti-TOR1AIP1 antikoruna kullanılarak immüno floresan boyama tekniği ile tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada kontrol kas dokusunda tüm çekirdeklerde LAP1B boyanması saptanırken, hasta kas dokusunda çekirdeklerin büyük çoğunluğunda boyanma gözlenmemiştir (Şekil 4.13), sadece çok az sayıda çekirdek LAP1B ile pozitif boyanma göstermiştir.

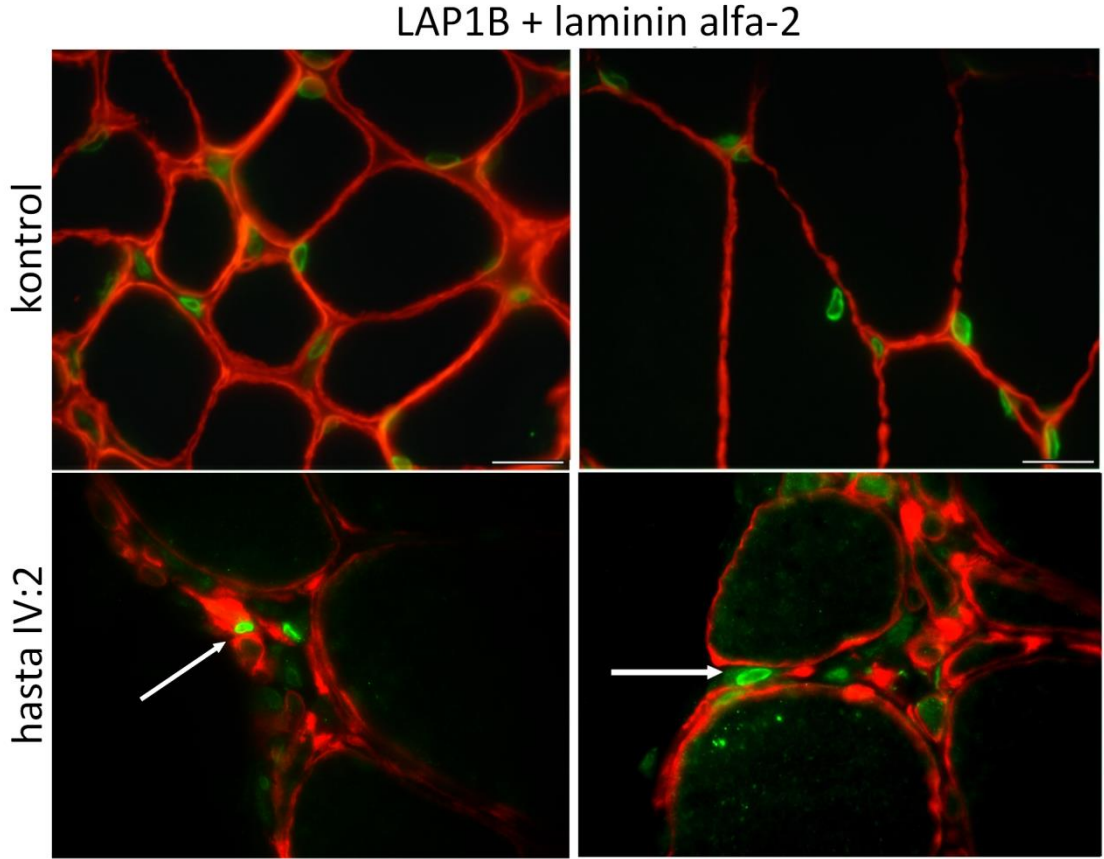




**Şekil 4.13.** LAP1B proteininin kontrol ve hasta IV:2 iskelet kası immünfloresan boyama görüntüleri. LAP1B boyaması (solda) ile DNA'yı boyayan DAPI boyaması (sağda) karşılaştırıldığında, kontrol kasta tüm çekirdeklerde LAP1B'nin pozitif boyandığı gözlenmektedir (orjinal büyütme 40X). Hasta dokusunda, LAP1B boyamasında çekirdeklerin büyük çoğunluğunun boyanmadığı görülmektedir (orjinal büyütme 100X).

Boyanan çekirdeklerin kas dokusunda yer alan hangi hücelere ait olduklarını anlamak amacı ile, kontrol ve IV:2 nolu hasta kas dokularında LAP1B ve laminin alfa-

2 proteinlerinin eş immünfloresan boyaması yapılmıştır. Laminin alfa-2 proteininin iskelet kası hücrelerinin bazal membranında yerleşim gösteren bir protein olması, kas liflerinin membran çevrelerini görüntülemeyi sağlamıştır. Bu boyama, hasta kas dokusunda LAP1B'nin pozitif boyandığı çekirdeklerin kas hücrelerine değil, endomizyal hücelere ait olduklarını göstermiştir (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** LAP1B (yeşil) ve laminin alfa-2 (kırmızı) eş boyama görüntüleri (orjinal büyütme 100X). Hasta IV:2 kas dokusunda LAP1B pozitif boyanan çekirdeklerin (ok işaretleri) kas hücrelerine ait olmadıkları gözlenmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışması sonucunda, mutant olması durumunda kas distrofisi fenotipine neden olan yeni bir gen tespit edilmiştir. Dört ailede yapılan homozigotluk haritalaması çalışmaları sonucunda, iki ailede kritik aday kromozom bölgesi tespit edilmiş ve birer gen DNA dizi analizi ile incelenmiştir. Bir ailede *TOR1AIP1* geninde tespit edilen homozigot c.186delG mutasyonunun mRNA ve protein üzerindeki etkisi, histolojik ve moleküler düzeyde gerçekleştirilen analizler ile ortaya konulmuştur.

Tez çalışması kapsamında homozigotluk haritalaması yöntemi uygulanarak dört LGMD2 ailesinde hastalıktan sorumlu aday kromozom bölgeleri araştırılmıştır. Bu dört ailede önceki yıllarda 50K Xbal çipleri (*Affymetrix*) ile SNP genotipleme çalışması yapılmış fakat çok sayıda geniş homozigot haplotipin tespit edilmesinden dolayı, hastalıktan sorumlu aday bir bölge seçilememiştir (yayınlanmamış veri). Bu durum, çalışma esnasında ailelerde hasta birey sayısının bir ile sınırlı olmasından kaynaklandığı gibi, aranan sorumlu lokusun 50K SNP çipleri ile yeterince kapsanmamış olması ile de ilgilidir. Bu nedenle bu aileler 50K çiplerine oranla daha çok sayıda SNP genetik belirtecini içeren ve daha kapsamlı bir genotipleme sağlayan 250K Nspl SNP çipleri kullanılarak genotipleme çalışmasına alınmıştır (85).

A ailesinde tek bir hasta ile 50K SNP çipleri kullanılarak yapılan homozigotluk haritalaması toplam 11 homozigot haplotipi ortaya çıkarmıştır. Aileye iki hasta bireyin eklenmesi ve 250K çiplerinin kullanılması ile ortak homozigot haplotip sayısı bire inmiştir. B ailesinde, aileye bir hasta bireyin eklenmesi ve 250K çiplerinin kullanılmasıyla, 50K çipleri ile tespit edilen homozigot haplotip sayısı 13'ten bire inmiştir. Hasta birey sayısının artması ile akraba evliliğinin meydana getirdiği rastgele homozigotluklar elenerek, hastalıktan sorumlu ortak homozigot bölge öne çıkarılmıştır. Fakat C ve D ailelerinde 50K ve 250K çalışmalarının her ikisinde de tek bir hasta bireyin bulunması, 250K çipleri ile genomun daha kapsayıcı bir şekilde genotiplenmiş olmasına rağmen, homozigot haplotiplerin daraltılması için yeterli olmamıştır.

Günümüzde çekirdek ailelerde tek hasta bireyin getirdiği kısıtlılığın eksom dizileme yöntemi ile aşılabilmesi hedeflenmektedir (55). Eksom dizilemeden elde edilen büyük miktardaki genotip verisi, homozigotluk haritalaması sonuçları doğrultusunda değerlendirilip hastalıktan sorumlu varyasyon sayısı en aza indirgenebilmektedir. Nitekim, akraba evliliğinin olduğu ve bir tek hasta bireyin bulunduğu bir ailede, Özgül ve diğ. (55), retinitis pigmentosa hastalığına neden olan yeni bir gen saptamışlardır. Eksom dizileme sonucunda tespit edilen 38 farklı gendeki toplam 52 homozigot varyant arasından, homozigotluk haritalaması ile belirlenen dokuz homozigot haplotipin içerisinde yer alanlara öncelik verilerek, aday gen sayısı ikiye indirgenebilmiştir. Bu tez çalışmasında yapılan homozigotluk haritalaması sonucunda, B ailesinde homozigot haplotipin geniş olması ve 100'den fazla sayıda gen içermesi ve C ile D ailelerinde birden fazla geniş haplotipin olması, bu ailelerde hastalıktan sorumlu mutant genlerin, ileride yapılacak eksom dizileme yaklaşımı ile bulunmasını gerektirmiştir.

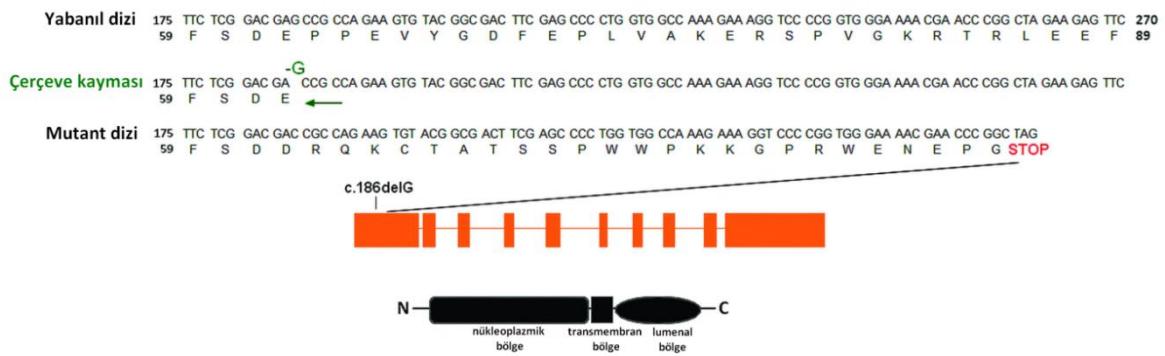
Tez çalışmasında, A ailesinde 1q25 kromozom bölgesinde bulunan homozigot haplotipin aday genler açısından incelenmesinin ardından, *TOR1AIP1* (*torsin A-interacting protein 1*) öncelikli aday gen olarak seçilmiştir. Bu genin aday olarak seçilmesinin temel nedeni, kodladığı LAP1B (*lamina-associated polypeptide 1B*) proteininin çekirdek iç membranında yerleşik ve nükleer laminaya bağlanan bir integral membran proteini olmasıdır (68-71). Benzer yerleşim gösteren lamin A/C, emerin, nesprin-1, nesprin-2 ve timopoetin proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların çeşitli kas distrofisi fenotiplerine neden olduğu bilinmektedir (76-83). Buna ek olarak, hastalarda gözlenen distal tutulum, kontraktürler ve kardiyomiyopati gibi bazı klinik bulguların, çekirdek zarfı hastalıkları arasına giren Emery-Dreifuss kas distrofisi (EDMD) fenotipi ile benzerlikler taşıması, *TOR1AIP1*'in yeni bir çekirdek zarfı hastalığı geni olma hipotezini desteklemiştir (17, 18). Ailede ilk olarak erken yaşlarda IV:5 nolu hasta bireyin muayenesi yapıldığında, limb-girdle kas distrofisi bulguları gözlenmiştir ve hastaya LGMD2 tanısı konmuştur. 2013 yılında yapılan son muayenelerde, ailedeki hastalarda proksimal ve distal kas güçsüzlüğü ve atrofi, *rigid spine* bulgusu ve ayak bileği ile el eklemlerindeki kontraktürlere ek olarak kalp

ve solunum sistemi tutulumu görülmüştür (Bkz. EK 2). Bu klinik özelliklerin, LGMD fenotipi ile birebir uyuşmamasıyla beraber, özellikle IV:2 nolu hasta bireyde distal kaslarda görülen zayıflık ve atrofinin derecesi, bilinen hiçbir EDMD fenotipi ile de bağdaşmamaktadır. Sonuç olarak, bu hastalarda kontraktürlerin eşlik ettiği limb-girdle fenotipi mevcuttur. Hasta IV:2'nin iskelet kası liflerinde çekirdek membranı parçalanması, farklı derecelerde kromatin yoğunlaşması, çekirdek membranından kromatin tomurcuklanması gibi gözlenen yapısal bozukluklar, laminopatilerde görülen çekirdek membranı anomalileri ile uyumluluk göstermektedir (Bkz. EK 3) (86, 87). Bu tip yapısal bozukluklar, miyositik plazma membranında başlayan bozukluklardan meydana gelen dejeneratif yapısal değişikliklerden farklıdır ve mutasyonun primer olarak çekirdeği etkilediğini desteklemektedir (36).

*TOR1AIP1* tarafından kodlanan LAP1B proteini çekirdek iç membranında yerleşim gösteren ve A/C ve B laminlere bağlanan tip-2 integral membran proteindir (68-71). Sıçan, fare ve çeşitli hücre hatlarında genel olarak 3 izoform halinde ifade olan LAP1 proteini için insanda tanımlanmış tek bir transkript bulunmaktadır: *TOR1AIP1* (NM\_015602.3) (68, 69). *TOR1AIP1* dizisinin sıçan *LAP1B* izoformu dizisine benzerliğinden dolayı, kodladığı protein insan LAP1B proteini olarak adlandırılmıştır (69). Ayrıca, LAP1, ağır bir nörolojik hastalık olan DYT1 torsiyon distonisinden sorumlu, AAA+ (*ATPases associated with a variety of cellular activities*) ATPaz ailesi üyesi olan torsin A ATPazının regülasyonu ile ilişkili bir proteindir (72, 74). Torsin A daha yoğun olarak endoplazmik retikulumda bulunmakla birlikte, endoplazmik retikulumun uzantısındaki çekirdek membranında da gözlenmektedir (88, 89). Torsin A ile etkileşime giren bir diğer protein, *TOR1AIP2* (*torsin A-interacting protein 2*) tarafından kodlanan ve endoplazmik retikulumda yerleşik olan *luminal domain like LAP1* (LULL1) proteindir (72, 73). LAP1 ve LULL1'in torsin A ile etkileştikleri luminal domainleri %60 oranında homoloji göstermektedir (72). Ayrıca *TOR1AIP1* ve *TOR1AIP2* dizilerinin genomda ardışık olması, bu iki genin duplikasyon yolu ile meydana geldiğini düşündürmektedir (72).

A ailesinin hasta bireylerinde *TOR1AIP1*'de saptanan c.186delG çerçeve kayması mutasyonu, erken stop kodonu oluşmasına neden olmaktadır

(p.E62fsTer25)<sup>3</sup> (Şekil 5.1). 584 amino asit uzunluğundaki LAP1B proteininin 86 amino asit uzunluğundaki erken sonlandırılmış bir peptit halinde sentezlenmesinin mutant mRNA'nın anlamsızlık aracılıklı yıkım (*nonsense-mediated decay*) mekanizması ile engelleneceği öngörülmüştür. Nitekim, gerçekleştirilen kantitatif PZR çalışmasında hasta kas dokusunda kontrol kas örneğine oranla TOR1AIP1 mRNA ifadesinde 5,88 katlık bir azalma tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.11). Bu sonuç, *TOR1AIP1* genindeki c.186delG mutasyonunun, mRNA stabilitesinin bozulmasına yol açtığını göstermektedir. Western blot ve immünofloresan boyama çalışmalarında ise, hasta kas hücrelerinde LAP1B proteininin olmadığı tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.12, 4.13 ve 4.14).



**Şekil 5.1.** *TOR1AIP1*'de c.186delG mutasyonunun protein dizisi üzerindeki etkisi. G delesyonu sonucunda, mRNA okuma çerçevesi kaymaktadır ve ekson 1'de erken stop kodonu oluşmaktadır.

İnsanda tanımlanmış tek bir LAP1 izoformunun olması ve bu izoformun hastada bulunmaması nedeni ile, hastanın kas biyopsisinde LAP1B'nin tamamen negatif olması beklenmiştir. Fakat western blot ve immünofloresan boyama çalışmalarından elde edilen bulgular, hastaya ait bazı endomizyal hücrelerde kas çekirdeklerinde ifade olan izoform dışında farklı bir LAP1 izoformunun bulunduğu doğrultusundadır (Bkz. Şekil 4.12, 4.13). Sağlıklı kontrol kas ile karşılaştırıldığında

<sup>3</sup> Protein dizisinde 62. pozisyonadaki glutamik asitten itibaren çerçeve kaymasını (*frameshift*) ve 25 amino asit sonra erken stop kodonu (Ter) oluşumunu ifade etmektedir.

hastanın distrofik kasında endomizyal hücre sayısının daha fazla olması, western blot deneyinde 50 kDa civarındaki bantın hasta kasında kontrole göre daha yoğun olarak gözlenmesine sebep olduğu düşünülebilir (Bkz. Şekil 4.12 \*). Bu protein bantının, immünfloresan boyamada mutasyona rağmen endomizyal hücrelerde ifade olduğu gözlenen izoforma karşılık gelmesi muhtemeldir (Bkz. Şekil 4.13, 4.14). İnsanda tanımlanmış tek transkript olan LAP1B proteinini kodlayan *TOR1AIP1* (NM\_015602.3) transkriptine ek olarak, *Ensembl* veri tabanında protein kodlayan ancak tüm dizinin bilinmediği olası 6 farklı transkript bulunmaktadır. Bu transkriptler incelendiğinde tez çalışmasında insan kas, karaciğer ve böbrek dokularında tespit edilen ikinci izoformun alternatif *splicing* ile oluştuğu öngörülebilir.

Sıçanda klonlanan LAP1C izoformu dizisine benzer 8 farklı cDNA tespit edilmiştir (90). Ayrıca sıçan LAP1B izoformunda, LAP1C dizisine ek olarak 4. ve 10. eksonlarda insersiyonlar bulunmaktadır (90). Farede ise tanımlanmış üç LAP1 izoformu 7.-10. eksonlar arasında farklılıklar göstermektedir. Sıçan ve farede gözlenen farklı LAP1 izoformlarının alternatif *splicing* ile meydana geldiği bilinmektedir (90).

Farelerde *LAP1*'in susturulması perinatal dönemde ölüme neden olmaktadır (74). Ancak *LAP1* geninin yalnızca çizgili kaslarda susturulması (*LAP1-conditional knockout*) farede kas distrofisi fenotipine yol açmaktadır (91). Buna ek olarak, fare hepatositlerinde *LAP1*'in susturulmasının karaciğer işlevini etkilemediği belirlenmiştir (91). Çizgili kasa özgül *LAP1-conditional knockout* fare modelinde gözlenen kas distrofisi fenotipi, *LAP1*'in çizgili kasta diğer dokulara göre farklı bir işleve sahip olduğunu ispatlamakta ve insan kasındaki LAP1B eksikliğinin işlevsel etkisini modellemektedir (91). Bu tez çalışması, insanda 66,3 kDa ağırlığındaki LAP1B izoformunun, karaciğer ve böbrekte de ifade olmasının yanında, işlev kaybının sadece kas dokusunu etkilemesi ile kas dokusunda henüz tanımlanmamış özgül ve kritik bir rol oynadığını göstermektedir.

Yeni yayınlanmış bir çalışmada, *LAP1*'in emerinin ile nükleoplazmik domaini aracılığıyla etkileşimde olduğu gösterilmiştir (91). Araştırma bulgularından biri, çizgili kasa özgül *LAP1-conditional knockout* farelerden izole edilen kas hücrelerinin

yaklaşık %10'unda emerinin ve lamin A/C proteinlerinin çekirdek membranından ayrılıp çekirdek içerisinde kümelenmediği şeklindedir (91). Yapılan çalışmada, emerinin-*null* farelerde insanın aksine patolojik fenotipin gözlenmemesi, iki tür arasında emerinin ve LAP1 ifade düzeylerinin farklı olmasına bağlanmıştır. Emerinin ifade düzeyinin farede insana göre daha düşük olduğu ve paralel olarak LAP1 ifadesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir (91). Bu nedenle, farede emerinin işlevinin insanda olduğu kadar kritik olmayabileceği ve eksikliğinin daha yüksek oranda ifade olan LAP1 tarafından telafi edilebileceği öne sürülmüştür. Son olarak, farelerde sadece emerinin susturulması kas distrofisine neden olmaz iken, LAP1 ile emerinin birlikte susturulmasının EDMD fenotipini daha iyi modellediği bulunmuştur (91). Tüm bu bulgular, LAP1'in çizgili kastaki rolünün emerinin kadar önemli ve kritik olduğu yönündedir. Ancak, tez çalışması sonunda elde ettiğimiz ön bulgu insanda emerinin-LAP1 ilişkisinin farede gözlemediği şekilde olmadığıdır. IV:2 nolu hastada LAP1B izoformunun olmaması durumunda, emerinin ve LAP1 ile etkileşimde olan diğer proteinlerin (lamin A/C ve lamin B) yerleşimlerinde kontrole göre bir farklılık gözlenmemiştir (Bkz. EK 4).

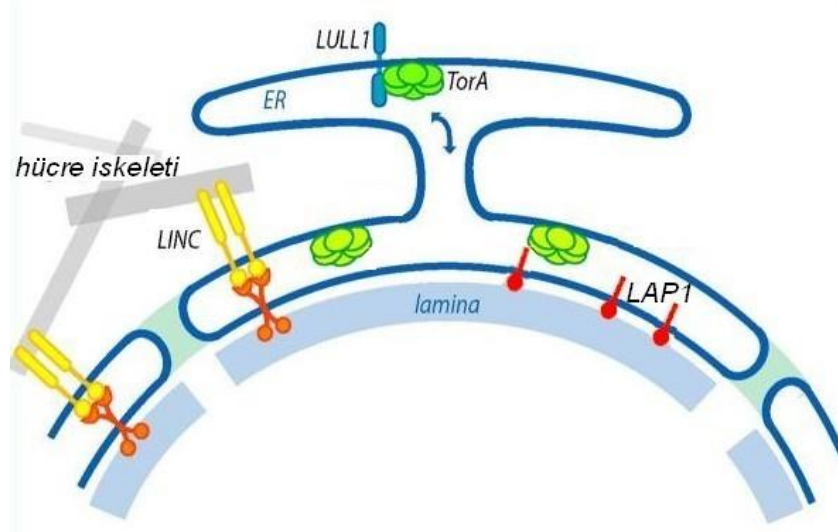
Aynı mutant proteinlerin ayrı türlerde patolojik farklılıklar gösterebileceğinin bir diğer örneği, DMD modeli olan *mdx* farede distrofin-utrofin proteinleri arasında görülen ilişkidir (92, 93). Farelerde Duchenne kas distrofisinden sorumlu distrofinin tek başına susturulması (*mdx* fareler) orta seyirli bir miyopatiye neden olurken, *mdx* farelerde ek olarak distrofine benzer işleve sahip utrofinin susturulması DMD'ye yakın bir fenotipe yol açmaktadır. Sonuç olarak, bir proteinin türler arasında farklı işlevlere sahip olması, o proteini kodlayan gendeki mutasyonların farklı türlerde fenotipe farklı derecelerde yansımalarına neden olabileceği görülmektedir.

Farelerde *LAP1* geninin tamamen susturulması perinatal dönemde ölüme sebep olmaktadır (74). Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, insanda c.186delG mutasyonunun LAP1B'nin işlev görmemesine neden olarak, kas distrofisi oluşturduğu şeklindedir. Bunun nedeninin, farede görülen emerinin ile LAP1 etkileşimine benzer şekilde, insanda LAP1B eksikliğinin yol açtığı fenotip üzerinde LULL1'in telafi edici etkisi olduğu düşünülebilir. Nitekim, LAP1 fare modellerinde



LULL1 ifade düzeyi araştırılmamış olsa da, bu çalışmada IV:2 nolu hasta bireyde LULL1 ifadesinin kontrole göre daha yüksek olduğu western blot ile tespit edilmiştir (Bkz. EK 5).

Farelerde perinatal ölüm ile sonuçlanan LAP1 işlev kaybı modelinde, hücrelerde torsin A-*null* hücrelerde görülen çekirdek membranı bozukluklarına çok benzer yapısal bozukluklar meydana gelmektedir (74). Torsin A'nın ATPaz aktivitesinin LAP1 veya LULL1 varlığında uyarılması, bu iki proteinin torsin A'yı regüle eden kofaktörler olarak görev aldıklarını desteklemektedir (73). Torsin A'nın mutant olduğu hücrelerde, LAP1 veya LULL1 ifade artışı ile mutant torsin A ER'den çekirdek membranına doğru yönlendirilmektedir (Şekil 5.2) (94). LAP1 veya LULL1'in herhangi birinin ifadesinin baskılanmasının, torsin A'nın ifadesini ve yerleşimini etkilemediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (95). Nitekim bu tez çalışmasında da, hasta kasında LAP1B eksikliği durumunda torsin A yerleşiminde kontrole göre farklılık gözlenmemiştir (Bkz. EK 6B). Ancak hasta kasında LULL1'in yerleşimi değişmemekle beraber ifade düzeyi artmış görünmektedir (Bkz. EK 5, 6A). LAP1 ve LULL1'in torsin A üzerinde benzer işleve sahip oldukları düşünülmektedir (73). Torsin A ATPaz aktivitesinin ve ER ile çekirdek membranı arasındaki dağılımının, kendisini regüle eden kofaktörlerin dozuna bağımlı olduğu öne sürülmüştür (73). Ayrıca Vander Heyden ve diğ. (94), torsin A'nın LULL1 ile etkileşime girdiğinde, çekirdek membranına yönlendirildiğini göstermiştir. Bu hipotezler birleştirildiğinde, hastada LULL1 ifade artışı LAP1B eksikliği ile ilişkilendirilebilmektedir ve bu iki proteinin birbiri üzerinde telafi edici etkisi olabileceğini düşündürmektedir.



**Şekil 5.2.** LAP1, LULL1 ve torsin A ilişkisi modeli. Torsin A ER'de LULL1 ile etkileşime girdiğinde, çekirdek membranına doğru yönelmektedir. Torsin A çekirdek membranında LAP1 ve LINC kompleksi üyeleri (Sun1, Sun2, nesprin-2 ve nesprin-3) ile etkileşime girmektedir. (Resim referans 94'ten değiştirilmiştir).

*TOR1AIP1* geninin her dokuda ifade edilmesine rağmen, mutant *TOR1AIP1*'in patolojik fenotipi yalnızca kasta oluşmaktadır. Bilinen diğer çekirdek zarfı hastalıklarında da görülen bu doku özgüllüğünün nedeni tam olarak bilinmemekle beraber, iki model sunulmuştur (96).

Birinci model, iskelet ve kalp kası hücreleri gibi bazı hücre tiplerinin çekirdeklerinin diğer hücrelere göre daha önemli bir mekanik strese maruz kaldıkları ve yapısal bozukluklara daha duyarlı oldukları ileri sürmektedir (97). Bu modele göre, hasta kasındaki LAP1B eksikliği ile çekirdek membranının lamina ile bağlantısının bozulmasından dolayı yapısal ve mekanik stabilitesinin etkilendiği düşünülebilir. Ayrıca LAP1, torsin A ile çekirdek membranında etkileşime giren tek protein değildir. Sun1, Sun2 ve nesprinler gibi LINC kompleksi üyelerinin de çekirdek membranındaki torsin A ile etkileşimleri tanımlanmıştır (Şekil 5.2) (95, 98). Torsin A'nın bu proteinlere bağlanarak çekirdek membranı ile hücre iskeleti arasında köprü görevi görebileceği de düşünülmektedir (99). Bu çerçevede, torsin A'nın ATPaz aktivitesinin LAP1 tarafından regülasyonunun sağlanamaması sonucunda

etkileşimde olduğu diğer proteinlere bağlanamadığı ve hücre iskeleti ile çekirdek arasındaki etkileşimin bozulduğu düşünülebilir. Bu çalışmada hastada torsin A normal bir yerleşim gösteriyor olsa da (Bkz. EK 6B), yerleşiminde farkedilebilir bir değişiklik gözlenmeden işlevinin bozulabileceği de göz ardı edilmemelidir.

Doku özgüllüğünü açıklamaya çalışan ikinci hipotez ise, çekirdek membranı proteinlerindeki bozuklukların dokuya özgül gen ifadesinin regülasyonunun bozulmasına neden olduğu hipotezidir (96, 97). Lamin A/C ve emerinin kas dokusunun transkripsiyonel yolağında görev aldıkları bilinmektedir (100-104). Foisnier ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (70), LAP1'in bir bağlayıcı (*linker*) protein vasıtasıyla dolaylı olarak mitotik kromozomlara bağlanabileceği öne sürülmüştür. LAP1B'nin kromatine ya da bir transkripsiyon düzenleyicisine bağlanabileceği öngörüldüğünde, hasta kas dokusunda gözlenen heterokromatin organizasyonundaki bozukluğun, çizgili kasa özgül genlerin ifadesini etkileyebileceği düşünülebilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuç

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

- Çalışma kapsamında çalışılan akraba evliliğinin görüldüğü dört aileden ikisinde 250K Nspl SNP çiplerinden elde edilen veriler ile homozigotluk haritalaması yaklaşımı kullanılarak LGMD2'den sorumlu yeni birer kromozom aralığı tespit edilmiştir (1q25.2 ve 4p13-q13.2).
- Üç hasta bireyden oluşan bir ailede hastalıktan sorumlu mutasyonun *TOR1AIP1* geninde homozigot c.186delG mutasyonu olduğu saptanmıştır. Bu şekilde mutant *TOR1AIP1* geninin ilk defa bir hastalığa neden olduğu belirlenmiştir.
- Yapılan detaylı klinik ve histopatolojik değerlendirmeler sonucunda, otozomal resesif kalıtım gösteren proksimal ve distal kas zayıflığı, rijit omurga ve kalp tutulumlu yeni bir kontraktürlü limb-girdle miyopatisi tanımlanmıştır.
- *TOR1AIP1* tarafından kodlanan LAP1B proteininin çekirdek iç membranında yerleşim göstermesi nedeni ile, *TOR1AIP1* çekirdek zarfı hastalıklarından sorumlu yeni bir gen olarak tanımlanmıştır.
- Hasta kas biyopsi materyalinde yapılan histolojik ve moleküler analizler sonucunda, *TOR1AIP1* genindeki c.186delG mutasyonunun çerçeve kayması ve erken stop kodonu oluşumuna (p.E62fsTer25) neden olarak LAP1B proteininde işlev kaybı oluşturduğu belirlenmiştir.
- LAP1 izoformlarının insan iskelet kası, karaciğer ve böbrek dokularındaki ifadeleri incelenmiş ve ilk defa insanda bu dokularda iki farklı izoformun ifade olduğuna dair ön bulgular elde edilmiştir. Özellikle 66,3 kDa büyüklüğündeki LAP1B izoformunun iskelet kası dokularının çekirdek membranında kritik bir role sahip olduğu gösterilmiştir. 50 kDa ağırlığındaki ikinci izoformun da karaciğer, böbrek ve endomizyal hücrelerde ifade edildiği gösterilmiştir.

- Mutasyon sonucunda gözlenen patolojik fenotipin çizgili kas ile sınırlı olması ve sadece LAP1B izoformunun işlev kaybına uğraması, *TOR1AIP1* geninin dokuya özgül alternatif *splicing* ile kontrol edilebileceği hipotezini desteklemiştir.
- Hastada LAP1B işlev kaybı durumunda LULL1 proteininin ifadesinin artması, LAP1B ve LULL1'in aynı yolakta görev aldıkları ve/veya benzer işlevlere sahip oldukları düşüncesini desteklemiş ve birbiri üzerinde telafi edici etkileri olabileceği hipotezinin öne sürülmesini sağlamıştır.
- Yüksek lisans tez çalışmasından elde edilen bulgular ve sonuçlar, 18. Dünya Kas Cemiyeti Uluslararası Kongresi, Kalifornia, ABD (1-5 Ekim 2013) toplantısında "*late breaking news*" oturumunda "Torsin A-interacting protein 1/Lamina-associated polypeptide 1B in a form of limb girdle muscular dystrophy: a novel gene related to nuclear envelopathies." başlığı altında sözlü bildiri olarak sunulmuştur (Bkz. EK 7).

## 6.2. Öneriler

Aileler arası ve aile içi heterojenitenin sıklıkla görüldüğü kas distrofisi tanısı alan ailelerin klinik muayenesi esnasında klinik açıdan ayırt edici klinik bulguların detaylı olarak tanımlanması, hastalıktan sorumlu mutant genin henüz tanımlanmamış olduğu ailelerde aday gen yaklaşımı ile tespit edilmesini kolaylaştıracaktır.

Bu tez çalışması sonucunda, kontraktürlü limb-girdle miyopatisi fenotipi ile benzer klinik özellikleri taşıyan ve mutant genin bilinmediği ailelerin, *TOR1AIP1* mutasyonları açısından incelenmesi önerilmektedir. Ayrıca bu çalışma, LAP1B proteininin insan çizgili kasındaki normal işlevinin aydınlatılması ve kas distrofisi patogenezindeki rolünün anlaşılması adına çok önemli bir yere sahiptir. Ancak, çalışma sonucunda *TOR1AIP1* genindeki c.186delG mutasyonu üç hasta bireyden oluşan tek bir ailede bulunabilmiştir. Varyasyonun patojenik etkisinin ispatlanması adına RNA ve protein düzeyinde gerçekleştirilen analizlere ek olarak, mutasyonu taşıyan ikinci bir ailenin bulunması LAP1B'nin hastalıkla ilişkilendirilmesi açısından çok değerli olacaktır. İkinci bir ailenin bulunamaması durumunda, bu ailedeki

hastalarda eksom dizilenerek diğer genlerin patojenik varyasyon içermediğinin gösterilmesi de mutant LAP1'in hastalıktan sorumlu olduğunun kanıtlanması için yeterli olacaktır. En bilgi verici olanı ise ailedeki mutasyona özgül *in vitro* ve *in vivo* modeller kullanılarak LAP1'in işlevinin ortaya konması olacaktır.

- Kas distrofisine neden olan mutasyonların *in vitro* ortamda araştırılmasında kullanılacak hücreler aşağıda belirtilmiştir:
  - C2C12 fare miyoblast hücre hattı (104-106).
  - Kontrol/hasta fibroblast hücreleri.
  - Hasta primer miyoblast hücreleri. Bir mutasyonun doğal çevresindeki etkisinin incelenmesi için kullanılacak en güvenilir *in vitro* model, hasta kas biyopsisinden izole edilen hasta primer miyoblast hücreleridir. İnsan primer miyoblast hücrelerinin kullanımını güçleştiren iki faktör hücre kültürünün saflığı (miyoblast dışındaki hücrelerden arındırılmış olması) ve miyoblast hücrelerinin sınırlı çoğalma yeteneğidir. Son yıllarda, hasta biyopsi dokusundan izole edilen ve zenginleştirilen miyoblastlarda transfeksiyon ya da transdüksiyon yolu ile *hTERT* (*human telomerase reverse transcriptase*) ve *CDK4* (*cyclin-dependent kinase-4*) ifadeleri sağlanıp, miyoblastlar ölümsüzleştirilebilmektedir (107-110).
- Bu modeller kullanılarak yapılabilecek çalışmalardan bazıları aşağıda belirtilmiştir:
  - Kontrol fibroblast/miyoblast hücrelerinde *TOR1AIP1* geninin susturulduğu veya c.186delG mutasyonunun ifade edilmeye zorlandığı durumlarda LULL1 ifade düzeyinin araştırılması ve LULL1 ifade düzeyinin artırılmasının etkisinin incelenmesi.
  - Mutant genin ifade edildiği hasta fibroblast/miyoblast hücrelerinde, yabancı genin ifade edilmesi sağlanarak LULL1 ifade düzeyinin araştırılması.
  - C2C12 fare miyoblast ve insan miyoblast hücre hatlarında

*TOR1AIP1* c.186delG mutasyonunun miyoblast farklılaşma sürecindeki etkisinin araştırılması.

- Mutasyonun fibroblast/miyoblast hücrelerinde çekirdek membranı yapısındaki etkisinin incelenmesi.
  - Çekirdek membranında yerleşim gösteren farklı proteinlerin ve özellikle LAP1 ile etkileşimde olduğu bilinen lamin A/C, lamin B ve emerin proteinlerinin yerleşiminin LAP1 işlev kaybı durumunda detaylı olarak incelenmesi.
  - İnsan kontrol, hasta fibroblast ve hasta miyoblast hücrelerinde *TOR1AIP1* geni tarafından kodlanan çeşitli izoformların hücreye özgül ve farklılaşmamış miyoblast ve miyotüpe farklılaşmış miyoblastlarda ifade düzeylerinin araştırılması.
- *In vivo* olarak, gen *knockdown/knockout* yaklaşımı ile hayvan kas distrofisi modeli oluşturularak LAP1 proteininin işlevi ortaya konabilir. Mevcut *LAP1 knockout* ve kasa özgül *LAP1* şartlı *knockout* fare modelleri bu çalışmada sunulan hastalık patogenezi ile birebir uyumlu olmamakla beraber, kasa özgül *LAP1* şartlı *knockout* fare modeli LAP1'in kas dokusunda kritik bir işleve sahip olduğunu ortaya koymuştur (74, 91). Embriyoların çok sayıda olması ve kolay manipüle edilmesi, zebra balığının (*Danio rerio*) kas distrofilere için hayvan modeli olarak kullanımını artırmıştır (111). İlgilenilen genin ifadesi *morpholino* ile geçici olarak baskılanabilmektedir (112). Buna ek olarak, son yıllarda genom düzenleme araçları olan TALEN ve CRISPR-Cas sistemlerinin zebra balığında uygulamaları başarılı olmuştur (113, 114). Bu araçlar kullanılarak, mutant geni ifade eden transgenik zebra balığı modeli oluşturulabilir.

## KAYNAKLAR

1. Emery, A.E. (1998). The muscular dystrophies. *British Medical Journal*, 317(7164), 991-995.
2. Department of Health and Human Services (2006). Report to Congress on Implementation of the Muscular Community Assistance, Research and Education Amendments of 2001. National Institutes of Health.
3. Bushby, K.M. (1995). Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies: report of the ENMC Consortium on limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, 5(1), 71-74.
4. Guglieri, M., Straub, V., Bushby, K. ve Lochmüller, H. (2008). Limb-girdle muscular dystrophies. *Current Opinion in Neurology*, 21(5), 576–584.
5. Tunçbilek, E. (2001). Clinical outcomes of consanguineous marriages in Turkey. *Turkish Journal of Pediatrics*, 43(4), 277-9.
6. Dinçer, P. (2006). **Consanguinity and neuromuscular disorders in Turkey** [Bildiri], 11<sup>th</sup> International Congress on Neuromuscular Diseases (ICNMD). İstanbul, Türkiye.
7. Kaplan, J.-C. ve Hamroun, D. (2012). The 2013 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders. *Neuromuscular Disorders*, 22(12), 1108-1135.
8. Cetin, N., Balci-Hayta, B., Gundesli, H., Korkusuz, P., Purali, N., Talim, B. ve diğerleri. (2013). A novel desmin mutation leading to autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy: distinct histopathological outcomes compared with desminopathies. *Journal of Medical Genetics*, 50(7), 437-43.
9. Bogershausen, N., Shahrzad, N., Chong, J. X., von Kleist-Retzow, J.-C., Stanga, D., Li, Y. ve diğerleri. (2013). Recessive TRAPPC11 mutations cause a disease spectrum of limb girdle muscular dystrophy and myopathy with movement disorder and intellectual disability. *American Journal of Human Genetics*, 93(1), 181-190.
10. Carss, K. J., Stevens, E., Foley, A. R., Cirak, S., Riemersma, M., Torelli, S. ve diğerleri. (2013). Mutations in GDP-mannose pyrophosphorylase B cause congenital and limb-girdle muscular dystrophies associated with hypoglycosylation of alpha-dystroglycan. *American Journal of Human Genetics*, 93(1), 29-41.
11. Akarsu, N.A. ve Çakır, B. (2004). Psikiyatrik genetik araştırmalarda kullanılabilir genetik yöntemler IV-A. Hastalık geni haritalaması. *3P Dergisi*, 12, Ek.1,31-49.
12. Vink, J.M. ve Boomsma, D.I. (2002). Gene finding strategies. *Biological Psychology*, 61(1-2), 53-71.



13. Lander, E.S. ve Botstein, D. (1987). Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science*, 236(4808), 1567-1570.
14. Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H.G. ve Veltman, J.A. (2012). Disease gene identification strategies for exome sequencing. *European Journal of Human Genetics*, 20(5), 490-497.
15. Bushby, K.M.D. (1999). The limb-girdle muscular dystrophies: multiple genes, multiple mechanisms. *Human Molecular Genetics*, 8(10), 1875-1882.
16. Guglieri, M. ve Bushby, K. (2008). How to go about diagnosing and managing the limb-girdle muscular dystrophies. *Neurology India*, 56(3), 271-80.
17. Muntoni, F., Lichtarowicz-Krynska, E.J., Sewry, C.A., Manilal, S., Recan, D., Llense, S. ve diğerleri. (1998). Early presentation of X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy resembling limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, 8(2), 72-76
18. Bonne, G., Mercuri, E., Muchir, A., Urtizbera, A., Becane, H.M., Recan, D. ve diğerleri. (2000). Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene. *Annals of Neurology*, 48(2), 170-180.
19. Richard, I., Bourx, O., Allamand, V., Fougereuse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N. ve diğerleri. (1995). Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*, 81(1), 27-40.
20. Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M. ve diğerleri. (1998). A novel mammalian gene related to the *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B). *Nature Genetics*, 20(1), 37-42.
21. Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini C. ve diğerleri. (1998). Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics*, 20(1), 31-36.
22. Noguchi, S., McNally, E.M., Ben Othmane, K., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M. ve diğerleri. (1995). Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science*, 270(5237), 819-822.
23. Roberds, S.L., Leturcq, F., Allamand, V., Piccolo, F., Jeanpierre, M., Anderson, R.D. ve diğerleri. (1994). Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell*, 78(4), 625-633.
24. Bönnemann, C.G., Modi, R., Noguchi, S., Mizuno, Y., Yoshida, M. ve diğerleri. (1995). Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nature Genetics*, 11(3), 266-273.
25. Nigro, V., de Sa Moreira, E., Piluso, G., Vainzof, M., Belsito, A., Politano, L. ve diğerleri. (1996). Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nature Genetics*, 14(2),

195-198.

26. Moreira, E.S., Wiltshire, T.J., Faulkner, G., Nilforoushan, A., Vainzof, M, Suzuki, O.T. ve diğerleri. (2000). Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nature Genetics*, 24(2), 163-166.
27. Frosk, P., Weiler, T., Nylén, E., Sudha, T., Greenberg, C.R., Morgan, K. ve diğerleri. (2002). Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *American Journal of Human Genetics*, 70(3), 663-672.
28. Brockington, M., Yuva, Y., Prandini, P., Brown, S.C., Torelli, S., Benson, A.M. ve diğerleri. (2001). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Human Molecular Genetics*, 10(25), 2851-2859.
29. Hackman, P., Vihola, A., Haravuori, H., Marchand, S., Sarparanta, J., de Seze, J. ve diğerleri. (2002). Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *American Journal of Human Genetics*, 71(3), 492-500.
30. Balci, B., Uyanik, G., Dincer, P., Gross, C., Willer, T., Talim, B. ve diğerleri. (2005). An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromuscular Disorders*, 15(4), 80-90.
31. Bolduc, V., Marlow, G., Boycott, K.M., Saleki, K., Inoue, H., Kroon, J. ve diğerleri. (2010). Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *American Journal of Human Genetics*, 86(2), 213-221.
32. Godfrey, C., Escolar, D., Brockington, M., Clement, E.M., Mein, R., Jimenez-Mallebrera, C. ve diğerleri. (2006). Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, 60(5), 603-610.
33. Biancheri, R., Falace, A., Tessa, A., Pedemonte, M., Scapolan, S., Cassandrini, D. ve diğerleri. (2007). POMT2 gene mutation in limb-girdle muscular dystrophy with inflammatory changes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(4), 1033-1037.
34. Clement, E.M., Godfrey, C., Tan, J., Brockington, M., Torelli, S., Feng, L. ve diğerleri. (2008). Mild POMGnT1 mutations underlie a novel limb-girdle muscular dystrophy variant. *Archives of Neurology*, 65(1), 137-141.
35. Hara, Y., Balci-Hayta, B., Yoshida-Moriguchi, T., Kanagawa, M., Beltran-Valero de Bernabe, D., Gundesli, H. ve diğerleri. (2011). A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. *New England Journal of Medicine*, 364, 939-946.
36. Gundesli, H., Talim, B., Korkusuz, P., Balci-Hayta, B., Cirak, S., Akarsu, N.A. ve diğerleri. (2010). Mutation in exon 1f of PLEC, leading to disruption of plectin

- isoform 1f, causes autosomal-recessive limb-girdle muscular dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 87(6), 834–841.
37. Filareto, A., Parker, S., Darabi, R., Borges, L., Iacovino, M., Schaaf, T. ve diğerleri. (2013). An ex vivo gene therapy approach to treat muscular dystrophy using induced pluripotent stem cells. *Nature Communications*, 4, 1549.
  38. Ousterout, D.G., Perez-Pinera, P., Thakore, P.I., Kabadi, A.M., Brown, M.T., Qin, X ve diğerleri. (2013). Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from Duchenne Muscular Dystrophy patients. *Molecular Therapy*, DOI: 10.1038/mt.2013.111
  39. Xu, L., Lu, P.J., Wang, C.H., Keramaris, E., Qiao, C., Xiao, B. ve diğerleri. (2013). Adeno-associated virus 9 mediated FKRP gene therapy restores functional glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan and improves muscle functions. *Molecular Therapy*, 21(10), 1832-1840.
  40. Ramanathan, Y., Zhang, H., Aris, V., Soteropoulos, P., Aaronson, S.A. ve Toliaş, P.P. (2002). Functional cloning, sorting, and expression profiling of nucleic acid-binding proteins. *Genome Research*, 12(8), 1175-1184.
  41. Collins, F.S. (1995). Positional cloning moves from the perditional to the traditional. *Nature Genetics*, 9(4), 347-350.
  42. Kennedy, G.C., Matsuzaki, H., Dong, S., Liu, W., Huang, J., Liu, G. ve diğerleri. (2003). Large scale genotyping of complex DNA. *Nature Biotechnology*, 21(10), 1233-1237.
  43. Ke, X.M., Taylor, M.S. ve Cardon, L.R. (2008). Singleton SNPs in the human genome and implications for genome-wide association studies. *European Journal of Human Genetics*, 16(4), 506-515.
  44. Goddard, K.A.B. ve Wijsman, E.M. (2002). Characteristics of genetic markers and maps for cost-effective genome screens using diallelic markers. *Genetic Epidemiology*, 22(3), 205-220.
  45. Evans, D.M. ve Cardon, L.R. (2004). Guidelines for genotyping in genomewide linkage studies: single-nucleotide polymorphism maps versus microsatellite maps. *American Journal of Human Genetics*, 75(4), 687-692.
  46. Kruglyak, L., Daly, M.J., Reeve-Daly, M.P. ve Lander, E.S. (1996). Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *American Journal of Human Genetics*, 58(6), 1347-1363.
  47. Strachan, T., ve Read, A.P. (2011). *Human Molecular Genetics*. 4<sup>th</sup> edition. New York: Garland Science/Taylor & Francis Group.
  48. McQuillan, R., Leutenegger, A.L., Abdel-Rahman, R., Franklin, C.S., Pericic, M., Barac-Lauc, L. ve diğerleri. (2008). Runs of homozygosity in European populations. *American Journal of Human Genetics*, 83(3), 359-372.
  49. Kirin, M., McQuillan, R., Franklin, C.S., Campbell, H., McKeigue, P.M. ve Wilson, J.F. (2010). Genomic runs of homozygosity record population history and

- consanguinity. *PLoS ONE*, 5(11), e13996.
50. Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y. ve diğeri. (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 465(7295), 223-227.
  51. Miano, M.G., Jacobson, S.G., Carothers, A., Hanson, I., Teague, P., Lovell, J. ve diğeri. (2000). Pitfalls in homozygosity mapping. *American Journal of Human Genetics*, 67(5), 1348-1351.
  52. Benayoun, L., Spiegel, R., Auslender, N., Abbasi, A.H., Rizel, L., Hujeirat, Y. ve diğeri. (2009). Genetic heterogeneity in two consanguineous families segregating early onset retinal degeneration: the pitfalls of homozygosity mapping. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 149A(4), 650-656.
  53. Becker, J., Semler, O., Gilissen, C., Li, Y., Bolz, H.J., Giunta, C. ve diğeri. (2011). Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *American Journal of Human Genetics*, 88(3), 362-71.
  54. Pippucci, T., Benelli, M., Magi, A., Martelli, P.L., Magini, P., Torricelli, F. ve diğeri. (2011). EX-HOM (Exome HOMozygosity): a proof of principle. *Human Heredity*, 72(1), 45-53.
  55. Ozgöl, R.K., Siemiatkowska, A.M., Yücel, D., Myers, C.A., Collin, R.W., Zonneveld, M.N. ve diğeri. (2011). Exome sequencing and cis-regulatory mapping identify mutations in MAK, a gene encoding a regulator of ciliary length, as a cause of retinitis pigmentosa. *American Journal of Human Genetics*, 89(2), 253-264.
  56. Gündeşli, H. (2011). **Limb Girdle Kas Distrofisi Fenotipinden Sorumlu Yeni Gen Araştırılması**. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
  57. Zhu, M. ve Zhao, S. (2007). Candidate gene identification approach: progress and challenges. *International Journal of Biological Sciences*, 3(7), 420-427.
  58. Uz, E., Alanay, Y., Aktas, D., Vargel, I., Gucer, S., Tuncbilek, ve diğeri. (2010). Disruption of ALX1 causes extreme microphthalmia and severe facial clefting: expanding the spectrum of autosomal recessive ALX-related frontonasal dysplasia. *American Journal of Human Genetics*, 86(5), 789-796.
  59. Kayserili, H., Uz, E., Niessen, C., Vargel, I., Alanay, Y., Tuncbilek, G. ve diğeri. (2009). ALX4 dysfunction disrupts craniofacial and epidermal development. *Human Molecular Genetics*, 18(22), 4357-4366.
  60. NCBI-MapViewer. Erişim: Mart 2013, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>
  61. Ensembl-Genome Browser. Erişim: Mart 2013, <http://www.ensembl.org/index.html>
  62. GeneCards (Weizmann Institute of Science). Erişim: Mart 2013, <http://www.genecards.org/>
  63. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. Erişim: Mart 2013, <http://omim.org/>

64. MalaCards (Weizmann Institute of Science). Erişim: Mart 2013, <http://www.malacards.org/>
65. UniProt. Erişim: Mart 2013, <http://www.uniprot.org/>
66. STRING. Erişim: Mart 2013, <http://string-db.org/>
67. Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
68. Senior, A. ve Gerace, L. (1988). Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *Journal of Cell Biology*, 107(6 Pt 1), 2029-2036.
69. Kondo, Y., Kondoh, J., Hayashi, D., Ban, T., Takagi, M., Kamei, Y. ve diğerleri. (2002). Molecular cloning of one isotype of human lamina-associated polypeptide 1s and a topological analysis using its deletion mutants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(4), 770-708.
70. Foisnier, R. ve Gerace, L. (1993). Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell*, 73(7), 1267-1279.
71. Maison, C., Pyrpasopoulou, A., Theodoropoulos, P.A. ve Georgatos, S.D. (1997). The inner nuclear membrane protein LAP1 forms a native complex with B-type lamins and partitions with spindle-associated mitotic vesicles. *EMBO Journal*, 16(16), 4839-4850.
72. Goodchild, R.E. ve Dauer, W.T. (2005). The AAA+ protein torsinA interacts with a conserved domain present in LAP1 and a novel ER protein. *Journal of Cell Biology*, 168(6), 855-862.
73. Zhao, C., Brown, R.S., Chase, A.R., Eisele, M.R. ve Schlieker, C. (2013). Regulation of Torsin ATPases by LAP1 and LULL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), E1545-E1554.
74. Kim, C.E., Perez, A., Perkins, G., Ellisman, M.H. ve Dauer, W.T. (2010). A molecular mechanism underlying the neural-specific defect in torsinA mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(21), 9861-9866.
75. Worman, H.J., Östlund, C. ve Wang, Y. (2010). Diseases of the nuclear envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(2), a000760.
76. Zhang, Q., Bethmann, C., Worth, N.F., Davies, J.D., Wasner, C., Feuer, A. ve diğerleri. (2007). Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery-Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Human Molecular Genetics*, 16(23), 2816-2833.
77. Taylor, M. R. G., Slavov, D., Gajewski, A., Vlcek, S., Ku, L., Fain, P. R. ve diğerleri. (2005). Thymopoietin (lamina-associated polypeptide 2) gene mutation associated with dilated cardiomyopathy. *Human Mutation*, 26(6), 566-574.

78. Bonne, G., Di Barletta, M. R., Varnous, S., Becane, H. M., Hammouda, E. H., Merlini, L. ve diğerleri. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genetics*, 21(3), 285-288.
79. Raffaele di Barletta, M., Ricci, E., Galluzzi, G., Tonali, P., Mora, M., Morandi, L. ve diğerleri. (2000). Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 66(4), 1407-1412.
80. Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M. R., Porcu, M., Frenneaux, M. ve diğerleri. (1999). Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *New England Journal of Medicine*, 341(23), 1715-1724.
81. Muchir, A., Bonne, G., van der Kooi, A. J., van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P. A. ve diğerleri. (2000). Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Human Molecular Genetics*, 9(9), 1453-1459.
82. Mercuri, E., Poppe, M., Quinlivan, R., Messina, S., Kinali, M., Demay, L. ve diğerleri. (2004). Extreme variability of phenotype in patients with an identical missense mutation in the lamin A/C Gene: from congenital onset with severe phenotype to milder classic Emery-Dreifuss variant. *Archives of Neurology*, 61(5), 690-694.
83. Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Mancini, M., Regis, S., Romeo, G. ve diğerleri. (1994). Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genetics*, 8(4), 323-327.
84. Kee, H. J., Kim, J.-R., Nam, K.-I., Park, H. Y., Shin, S., Kim, J. C. ve diğerleri. (2007). Enhancer of polycomb1, a novel homeodomain only protein-binding partner, induces skeletal muscle differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 7700-7709.
85. Gundesli, H., Cirak, S. ve Dincer, P. (2011). Pitfall of identifying a disease locus by using low-resolution SNP arrays. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 5(1), 264.
86. Sewry, C.A., Brown, S.C., Mercuri, E., Bonne, G., Feng, L., Camici, G. ve diğerleri. (2001). Skeletal muscle pathology in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy with lamin A/C mutations. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 27(4), 281-290.
87. Arbustini, E., Pilotto, A., Repetto, A., Grasso, M., Negri, A., Diegoli, M. ve diğerleri. (2002). Autosomal dominant dilated cardiomyopathy with atrioventricular block: a lamin A/C defect-related disease. *Journal of American College of Cardiology*, 39(6), 981-990.

88. Naismith, T.V., Dalal, S. ve Hanson, P.I. (2009). Interaction of TorsinA with its major binding partners is impaired by the dystonia-associated deltaGAG deletion. *Journal of Biological Chemistry*, 284(41), 27866-27874.
89. Giles, L.M., Chen, J., Li, L. ve Chin, L.-S. (2008). Dystonia-associated mutations cause premature degradation of torsinA protein and cell-type-specific mislocalization to the nuclear envelope. *Human Molecular Genetics*, 17(17), 2712-2722.
90. Martin, L., Crimando, C. ve Gerace, L. (1995). cDNA cloning and characterization of lamina-associated polypeptide 1C (LAP1C), an integral protein of the inner nuclear membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 15(270), 8822-8828.
91. Shin, J.Y., Méndez-López, I., Wang, Y., Hays, A.P., Tanji, K., Lefkowitz, J.H. ve diğerleri. (2013). Lamina-associated polypeptide-1 interacts with the muscular dystrophy protein emerin and is essential for skeletal muscle maintenance. *Developmental Cell*, 26(6), 1-13.
92. Deconinck, A.E., Rafael, J.A., Skinner, J.A., Brown, S.C., Potter, A.C., Metzinger, L. ve diğerleri. (1997). Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 90(4), 717-727.
93. Grady, R.M., Teng, H., Nichol, M.C., Cunningham, J.C., Wilkinson, R.S. ve Sanes, J.R. (1997). Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 90(4), 729-738.
94. Vander Heyden, A.B., Naismith, T.V., Snapp, E.L., Hodzic, D. ve Hanson, P.I. (2009). LULL1 retargets TorsinA to the nuclear envelope revealing an activity that is impaired by the DYT1 dystonia mutation. *Molecular Biology of the Cell*, 20(11), 2661-2672.
95. Jungwirth, M., Kumar, D., Jeong, D. ve Goodchild, R. (2011). The nuclear envelope localization of DYT1 dystonia torsinA-DeltaE requires the SUN1 LINC complex component. *BMC Cell Biology*, 12, 24.
96. Worman, H.J. ve Courvalin, J.-C. (2004). How do mutations in lamins A and C cause disease? *Journal of Clinical Investigation*, 113(3), 349-351.
97. Roux, K.J. ve Burke, B. (2007). Nuclear envelope defects in muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772(2), 118-127.
98. Nery, C.F., Zeng, J., Niland, B.P., Hewett, J., Farley, J., Irimia, D. ve diğerleri. (2008). TorsinA binds the KASH domain of nesprins and participates in linkage between nuclear envelope and cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 20), 3476-3486.
99. Gerace, L. (2004). TorsinA and torsion dystonia: Unraveling the architecture of the nuclear envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(24), 8839-8840.
100. Holaska, J.M., Lee, K.K., Kowalski, A.K. ve Wilson, K.L. (2003). Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF)

- compete for binding to emerin in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 6969-6975.
101. Haraguchi, T., Holaska, J.M., Yamane, M., Koujin, T., Hashiguchi, N., Mori, C. ve diğerleri. (2004). Emerin binding to Btf, a death-promoting transcriptional repressor, is disrupted by a missense mutation that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *European Journal of Biochemistry*, 271(5), 1035-1045.
  102. Melcon, G., Kozlov, S., Cutler, D.A., Sullivan, T., Hernandez, L., Zhao, P. ve diğerleri. (2006). Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration. *Human Molecular Genetics*, 15(4), 637-651.
  103. Markiewicz, E., Ledran, M. ve Hutchison, C.J. (2005). Remodelling of the nuclear lamina and nucleoskeleton is required for skeletal muscle differentiation in vitro. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 2), 409-420.
  104. Favreau, C., Higuete, D., Courvalin, J.C. ve Buendia, B. (2004). Expression of a mutant lamin A that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy inhibits in vitro differentiation of C2C12 myoblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 24(4), 1481-1492.
  105. Amack, J.D., Reagan, S.R. ve Mahadevan, M.S. (2002). Mutant DPMK 3'-UTR transcripts disrupt C2C12 myogenic differentiation by compromising MyoD. *The Journal of Cell Biology*, 3(159), 419-429.
  106. Hakelien, A.M., Delbarre, E., Gaustad, K.G., Buendia, B. ve Collas, P. (2008). Expression of the myodystrophic R453W mutation of lamin A in C2C12 myoblasts causes promoter-specific and global epigenetic defects. *Experimental Cell Research*, 314(8), 1869-1880.
  107. Zhu, C.H., Mouly, V., Cooper, R.N., Mamchaoui, K., Bigot, A., Shay, J.W. ve diğerleri. (2007). Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Ageing Cell*, 6(4), 515-523.
  108. Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot, A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A. ve diğerleri. (2011). Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skeletal Muscle*, 1(1), 34.
  109. Stadler, G., Chen, J.C.J., Wagner, K., Robin, J.D., Shay, J.W., Emerson, C.P.J.J. ve diğerleri. (2011). Establishment of clonal myogenic cell lines from severely affected dystrophic muscles – CDK4 maintains the myogenic population. *Skeletal Muscle*, 1(1), 12.
  110. Yoon, S., Stadler, G., Beermann, M.Y., Schmidt, E.V., Windelborn, J.A., Schneiderat, P. ve diğerleri. (2013). Immortalized myogenic cells from congenital muscular dystrophy type 1A patients recapitulate aberrant caspase activation in pathogenesis: a new tool for MDC1A research. *Skeletal Muscle*, 3, 28.



111. Berger, J. ve Currie, P.D. (2012). Zebrafish models flex their muscles to shed light on muscular dystrophies. *Disease Models and Mechanisms*, 5, 726-732.
112. Nasevicius, A. ve Ekker, S.C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature Genetics*, 26 (2), 216–220.
113. Zu, Y., Tong, X., Wang, Z., Liu, D., Pan, R., Li, Z. ve diğerleri. (2013). TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nature Methods*, 10(4), 329-331.
114. Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D. ve diğerleri. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3), 227-229.

## EKLER

## EK 1: Etik Kurul izni raporu



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0(312) 3051082-Faks:0(312) 3100580  
E-posta:selmak@hacettepe.edu.tr

Sayı: B.30.2.HAC.0.20.05.04/106

17 Şubat 2012

## ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 16.ŞUBAT.2012 PERŞEMBE  
**Toplantı No** : 2012/01  
**Proje No** : TBK 11/11 (Değerlendirme Tarihi 16.02.2012)  
**Karar No** : TBK 11/11-02

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Pervin Dinçer'in sorumlu araştırmacısı olduğu, Prof. Dr. Haluk Topaloğlu, Yrd. Doç. Dr. Beril Talim, Dr. Bureu Hayta, Doç. Dr. İnci Batmaz ve Doç. Dr. Erdem Karabulut ile birlikte çalışacakları TBK 11/11 kayıt numaralı ve "**Limb Girdle Kas Distrofisi Fenotipinden Sorumlu Yeni Gen Araştırması**" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten Akarsu	(Başkan)	10 Prof. Dr. Songül Vaizoglu	(Üye)
2. Prof. Dr. Nüket Örnek Büken	(Üye)	11. Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan	(Üye)
3. Prof. Dr. Hakan S. Örer	(Üye)	12. Doç. Dr. R. Köksal Özgül	(Üye)
4. Prof. Dr. F. Sevda Müftüoğlu	(Üye)	13. Doç. Dr. Cansın Saçkesen	(Üye)
5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer	(Üye)	14. Doç. Dr. Melahat Görduysus	(Üye)
6. Prof. Dr. Bülent Sivri	(Üye)	15. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan	(Üye)
7. Prof. Dr. Meral Aksoy	(Üye)	16. Yrd. Doç. Dr. H. Hüseyin Turnagöl	(Üye)
8. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay	(Üye)	17. Av. Meltem Onurlu	(Üye)
9. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal	(Üye)		

## EK 2: A ailesine ait klinik ve histopatolojik bulgular

### Klinik bulgular

A ailesinin indeks vakası (IV:5), ilk proksimal kas güçsüzlüğü belirtilerini 7 yaşında göstermiş olan 29 yaşında bir bayandır. Hasta yardım almadan yürüyebilmekte fakat yerden kalkamamaktadır. Ellerde proksimal ve distal interfalangeal eklemlerde fleksiyon kontraktürleri gözlenmiştir. Aynı zamanda servikal bölgede orta derecede *rigid spine* bulgusu vardır. Hastanın kreatin kinaz (CK) düzeyi  $89 \text{ U L}^{-1}$  (normal aralık:  $26-126 \text{ U L}^{-1}$ ) olarak kaydedilmiştir. 29 yaşında yapılan ekokardiyografi hastanın normal kalp işlevine sahip olduğunu göstermiştir fakat solunum fonksiyon testi ile kısıtlayıcı solunum fonksiyonu tespit edilmiştir.

İndeks vakanın 36 yaşındaki ağabeyi (IV:2) benzer kas güçsüzlüğü bulgularına sahiptir. Hastalık belirtileri 17 yaşında yorgunluk şeklinde hissedilmeye başlarken, 30'lu yaşlarda proksimal ve distal kas zayıflığı şeklinde ilerlemiştir. El eklemlerinde, omurgada ve ayak bileklerinde orta derecede kontraktürlerin yanı sıra, *interossei*, *abductor pollicis brevis* ve *medial gastrocnemius* kaslarında belirgin atrofi gözlenmiştir. Hastanın serum CK düzeyi  $483 \text{ U L}^{-1}$  olarak tespit edilmiştir. Hastanın elektromiyografi bulguları, dissemine miyojenik tutulum yönünde olmuştur. 36 yaşında yapılan ekokardiyografi, kız kardeşinin aksine, hastada orta derecede diyastolik ve sistolik disfonksiyon olduğunu göstermiştir. Ayrıca hastada kısıtlayıcı solunum fonksiyonu kaydedilmiştir.

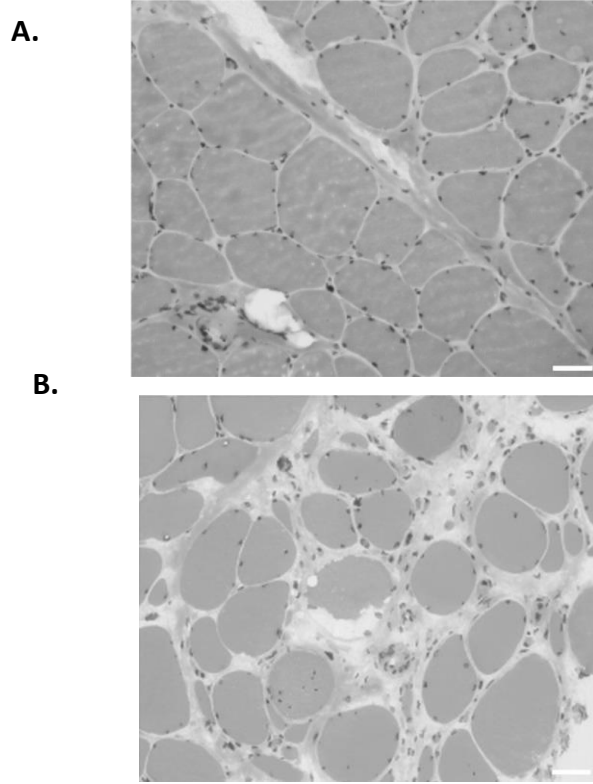
Ailede iki hasta bireyin amca çocuğu olan diğer bir hasta birey (IV:7) bulunmaktadır fakat bu hastanın klinik muayenesi yapılmamıştır.

### Histopatolojik bulgular

Hacettepe Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Patoloji Ünitesinde indeks vakadan (IV:5) 13 yaşında iken tanı amaçlı alınan ve  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan kas biyopsi örneğinden 7-8  $\mu\text{m}$  kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin-eozin (H&E) boyaması yapılmıştır. Hasta kasında lif çaplarında değişkenlik, çekirdek internalizasyonu, birkaç lifde dejenerasyon ile endomizyal bağ dokusunda artış şeklinde orta derecede distrofik bulgular gözlenmiştir (Şekil EK 2.A).

İmmünohistokimyasal incelemede laminin alfa-2, distrofin ve alfa-sarkoglikan pozitif boyanmıştır.

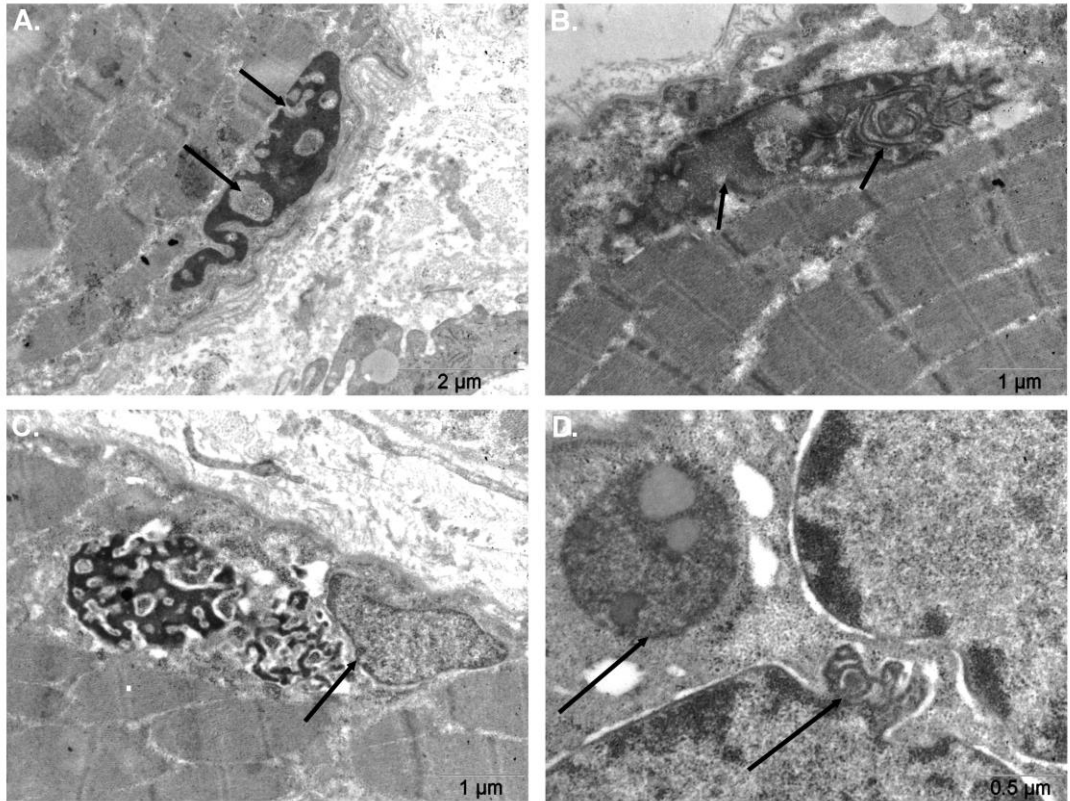
IV:2 nolu hasta bireyden 35 yaşında tanı amaçlı alınan kas biyopsi örneğinden 7-8 µm kalınlığında kesitler hazırlanmış ve H&E boyaması ile incelenmiştir. Hasta kasında değişken lif çapları, çekirdek internalizasyonu ve liflerde yuvarlaklaşma gözlenmiştir. Bazı bölgelerde çok küçük lifler ve endomizyal bağ dokusunda belirgin artış görülmüştür (Şekil EK 2.B). Atrofik liflerin bazılarında çekirdek kümelenmesine benzer yapılar dikkat çekmiştir. Rejenerasyon ve inflamasyon bulguları saptanmamıştır. Histokimyasal boyamalarda tip 2 liflerin çoğunlukta olduğu tespit edilmiştir; lipid, glikojen ve lizozomal aktivitede artış görülmemiştir.



**Şekil EK 2.** Histopatolojik bulgular: A) IV:5 nolu indeks vakaya ait kas biyopsisinde lif çaplarında çeşitlilik, çekirdek internalizasyonu ve hafif endomizyal bağ dokusu artışı gözlenmektedir (H&E boyaması, orjinal büyütme 20X). B) IV:2 nolu hasta bireye ait kas biyopsi örneğinde kas liflerinin çaplarında farklılıklar, merkezi çekirdekli hücreler ve endomizyal bağ dokusunda belirgin artış görülmektedir (H&E boyaması, orjinal büyütme 20X).

### EK 3. A ailesinden IV:2 nolu hasta kasına ait elektron mikroskopisi bulguları

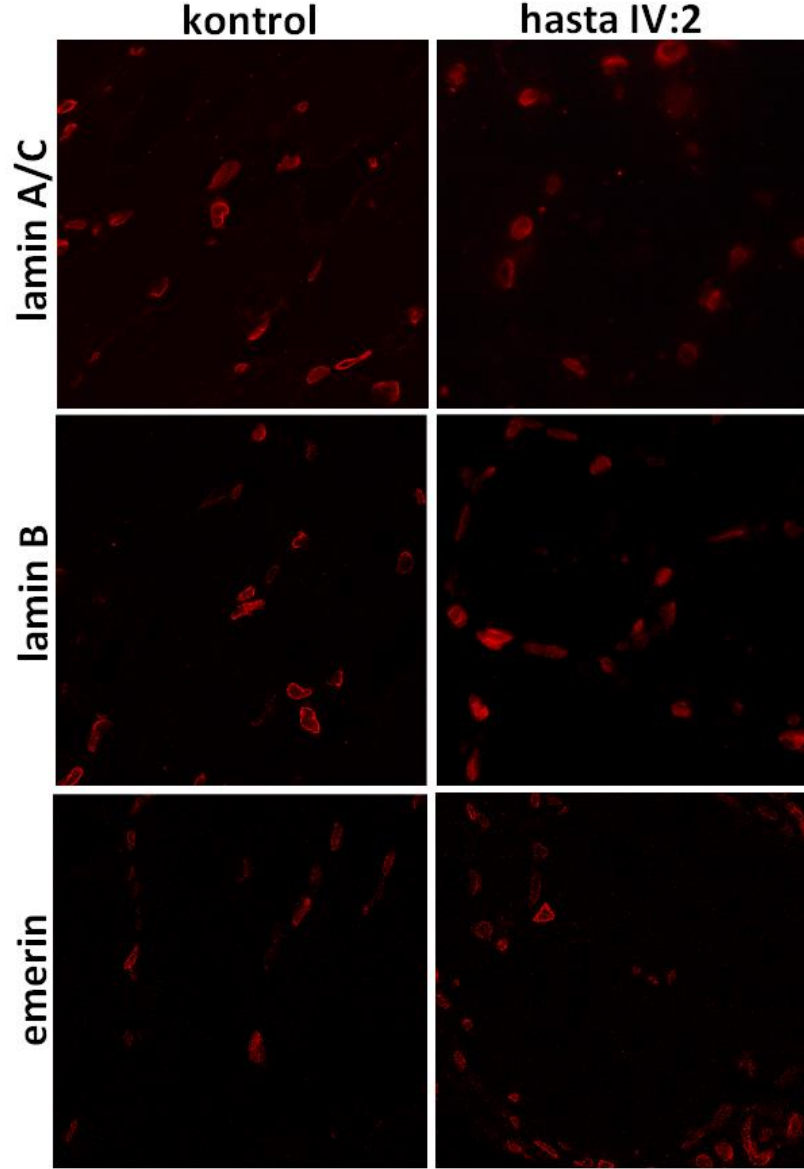
Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda IV:2 nolu hasta bireyden tanı amaçlı alınan kas biyopsi örneğinden elde edilen kesitlerde dokunun yapısal özellikleri geçirimli elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Hasta IV:2'nin iskelet kası liflerinde Z disklerinin normal olduğu, miyofibril bütünlüğünün korunduğu ve sitoplazmik sarkomerik organizasyonun bozulmadığı gözlenmiştir. Fakat bazı çekirdeklerde normal kromatin yapısından farklı olarak, farklı derecelerde kromatin yoğunlaşması ve birikimi gözlenmiştir. Ayrıca çekirdek membranında meydana gelen kopukluklar ve karyoplazmik içeriğin sarkoplazmaya boşalması sonucunda, çekirdek parçalanması, kromatin tomurcuğu (*bleb*) oluşumu ve membrandan yoksun çıplak kromatin şeklinde yapılar saptanmıştır (Şekil EK 3).



**Şekil EK 3.** Elektron mikroskopisi ile incelenen hasta kas çekirdeklerinde gözlenen yapısal bozukluklar: A) Parçalanmış çekirdek membranı (ok) ve aşırı yoğunlaşmış heterokromatin (koyu renkte) gözlenmektedir (orjinal büyütme 15000X). B) Çekirdek

membranı kopuklukları ve çekirdek içi kanal oluşumu (ok) görülmektedir (orjinal büyütme 20000X). C) Dejenere olmuş çekirdek (ok) ve sarkoplazmada bulunan çıplak heterokromatin (koyu renkte) görülmektedir (orjinal büyütme 20000X). D) Çekirdek membranından kopmakta olan kromatin tomurcuğu (sağ ok) ve çıplak kromatin (sol ok) gözlenmektedir (orjinal büyütme 40000X).

**EK 4: A ailesinde IV:2 nolu hasta kasında LAP1B'nin etkileşimde olduğu lamin A/C, lamin B ve emerlin proteinlerinin immünfloresan boyama görüntüleri**

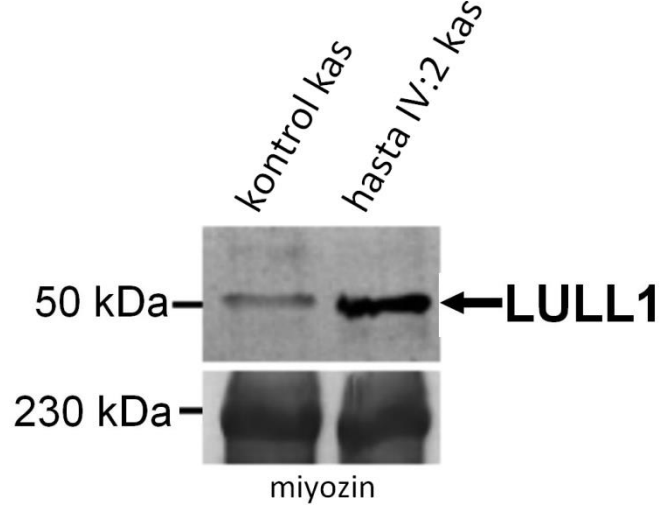


**Şekil EK 4.** LAP1B ile etkileşimde olan lamin A/C, lamin B ve emerlin proteinlerinin kontrol ve hasta kas dokularındaki boyanmasını gösteren immünfloresan boyama sonuçları (orjinal büyütme 63X). Boyamalar için sayfa 29-31'de yer alan protokol uygulanmıştır. Lamin A/C, 1:15 oranında sulandırılmış *goat* anti-lamin A/C (Santa Cruz) antikoru ve 1:500 oranında sulandırılmış *Alexa Fluor 568 rabbit anti-goat* sekonder antikoru birer saat oda sıcaklığında inkübe edilerek işaretlenmiştir. Lamin B, 1:50 oranında seyreltilmiş *goat* anti-lamin B (Santa Cruz) antikoru ve *Alexa Fluor*

568 *rabbit anti-goat* sekonder antikoru birer saat oda sıcaklığında inkübe edilerek işaretlenmiştir. Emerin, *mouse anti-emerin* (Novocastra) antikoru 1:10 oranında sulandırılıp ve 1:500 oranında sulandırılmış *Alexa Fluor 568 goat anti-mouse* sekonder antikoru birer saat oda sıcaklığında inkübe edilerek kullanılmıştır. Kontrol ve hasta kas dokuları arasında bir fark gözlenmemiştir, tüm antikolarla çekirdeklerde boyanma saptanmıştır.

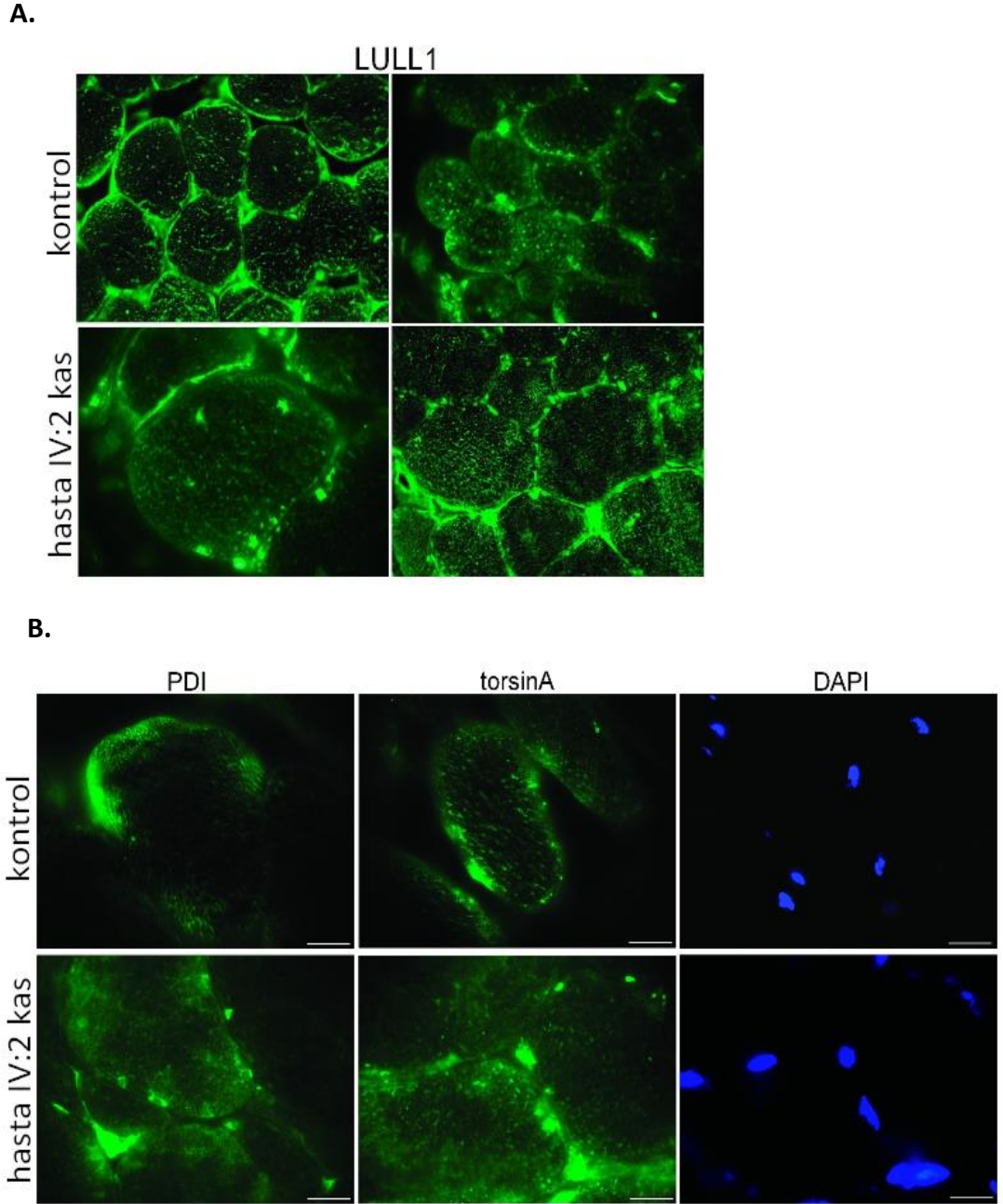


**EK 5: A ailesinde IV:2 nolu hasta kasında LULL1 protein ifadesini gösteren western blot bulguları**



**Şekil EK 5.** Kontrol ve IV:2 nolu hasta bireye ait iskelet kası örneklerinde, LULL1 proteinini tanıyan *rabbit* poliklonal anti-TOR1AIP2 (81-95, Sigma Aldrich) antikoru kullanılarak sayfa 27-29'da yer alan western blot protokolü uygulanmıştır. Membran 1:750 oranında sulandırılmış anti-TOR1AIP2 (81-95, Sigma Aldrich) antikoru ile +4 °C'de 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sekonder antikor olarak 1:3000 oranında seyreltilmiş IgG (H+L) *horseradish* peroksidaz işaretli *goat* anti-*rabbit* antikoru 1 saat oda sıcaklığında membran ile inkübe edilerek kullanılmıştır. Miyozin bantı protein eşit yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Fotoğraf 10 sn.'lik poz süresi ile çekilmiştir. Sonuç olarak, hasta kas dokusunda kontrol kas örneğine oranla LULL1 ifade düzeyinin artmış olduğu gözlenmektedir.

**EK 6: A ailesinden IV:2 nolu hasta kasında LAP1B ile etkileşimde olan torsin A ve LULL1 proteinlerini gösteren immünfloresan boyama görüntüleri**



**Şekil EK 6.** LULL1 ve torsinA proteinlerinin kontrol ve hasta kas dokularındaki yerleşimlerini gösteren immünfloresan boyama sonuçları. Boyamalar için sayfa 29-31'de yer alan protokol uygulanmıştır.

A) LULL1 proteini, 1:50 oranında sulandırılmış *rabbit* poliklonal anti-TOR1AIP2 (81-95, Sigma Aldrich) antikoru ve 1:500 oranında sulandırılmış *Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit* sekonder antikoru birer saat oda sıcaklığında inkübe edilerek işaretlenmiştir. Kontrol ve IV:2 nolu hasta kas dokularında, LULL1 sarkoplazmik retikulumda yerleşim göstermektedir (orjinal büyütme 100X).

B) TorsinA proteini, 1:50 oranında seyreltilmiş *mouse* monoklonal anti-TorsinA (MAB5550, Merck Millipore) antikoru ve *Alexa Fluor 488 goat anti-mouse* sekonder antikoru birer saat oda sıcaklığında inkübe edilerek işaretlenmiştir. Ayrıca sarkoplazmik retikulum belirteci olarak *mouse* monoklonal anti-PDI (protein disülfid izomeraz) [RL19] (ab2792, Abcam) antikoru 1:100 oranında sulandırılıp 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek kullanılmıştır. Kontrol ve hasta kas dokularında, torsinA'nın sarkoplazmik retikulumda PDI ile benzer yerleşim gösterdiği görülmüştür. Kontrol ve hasta kas dokuları arasında bir fark gözlenmemiştir.

**EK 7: 18. Dünya Kas Cemiyeti Uluslararası Kongresi, Kalifornia, ABD (1-5 Ekim 2013) toplantısında sunulan sözlü bildirinin özeti**

18th International Congress of the World Muscle Society

2013

**LBO.4**

**Torsin A-interacting protein 1 / Lamina-associated polypeptide 1B in a form of limb girdle muscular dystrophy: a novel gene related to nuclear envelopathies.**

*Kayman-Kurekci G.<sup>1</sup>, Talim B.<sup>1</sup>, Korkusuz P.<sup>1</sup>, Sayar N.<sup>2</sup>, Sarioglu T.<sup>3</sup>, Oncel II, Sharafi P.<sup>1</sup>, Gundesli H.<sup>1</sup>, Balci-Hayta B.<sup>1</sup>, Purali N.<sup>1</sup>, Serdaroglu P.<sup>3</sup>, Topaloglu H.<sup>1</sup>, Dincer P.<sup>1</sup>.*

*<sup>1</sup>Hacettepe University, Faculty of Medicine, Ankara, Turkey, <sup>2</sup>Bilkent University, Faculty of Science, Department of Molecular Biology and Genetics, Ankara, Turkey, <sup>3</sup>Istanbul University, Faculty of Medicine, İstanbul, Turkey.*

We performed genome-wide homozygosity mapping by using Affymetrix 250K SNP array and mapped an autosomal recessive limb girdle phenotype with contractures to chromosomal region 1q25 in a consanguineous Turkish family with three affected individuals. The index case is a 27 year-old woman with onset from age 7. She presents with distal involvement in the form of rigid spine and contractures of proximal and distal interphalangeal hand joints. She is ambulant. Her 39 year-old brother is similarly affected. He additionally has dilated cardiomyopathy. Muscle biopsies show severe variation in fiber size, increase in internal nuclei, endomysial fibrosis and few degenerating fibers. Their serum CK levels are 89 u/L and 489 u/L, respectively (N: 39-308). Family history is consistent with a paternal aunt being affected. DNA sequencing of *TOR1AIP1* revealed a homozygous c.186delG mutation that causes a frameshift resulting to a premature stop codon. By quantitative real-time PCR and western blot expression of TOR1AIP1 (also named as LAP1B) was absent in the patient muscle. Immunofluorescent staining revealed loss of TOR1AIP1 staining in the muscle fibers compared to control muscle. Ultrastructural examination showed alterations of the nuclear envelope. TOR1AIP1 is a type II integral protein localized in the inner nuclear membrane through a single transmembrane domain. TOR1AIP1 binds to both A- and B- type lamins in the nucleus and is implicated in the regulation of TorsinA ATPase which is known to cause the severe movement disorder DYT1 dystonia. The absence of TOR1AIP1 in the muscle might influence the mechanical stability of the nuclear envelope due to the impaired binding to the nuclear lamina. Subsequently, interaction of cytoskeletal components with the nuclear envelope might be altered through the misregulation of TorsinA in the absence of TOR1AIP1. This study expands the spectrum of genes associated with nuclear envelopathies.