



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRİMER SİLİYER DİSKİNEZİ (PCD) HASTALARINDA DIŞ DYNEİN KOLU
(ODA) DEFEKTLERİ İLE SİLYUM ÖN YAPIM PROTEİNLERİNİN İLİŞKİSİNİN
HİSTOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Dr. İlker Levent ERDEM

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

ANKARA

2022



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRİMER SİLİYER DİSKİNEZİ (PCD) HASTALARINDA DIŞ DYNEİN KOLU
(ODA) DEFEKTLERİ İLE SİLYUM ÖN YAPIM PROTEİNLERİNİN İLİŞKİSİNİN
HİSTOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Dr. İlker Levent ERDEM

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Elif BİLGİÇ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2022

TEŞEKKÜR

Eğitim d6nemim ve tez çalışmam sırasında her zaman bana maddi manevi destek ve yol g6sterici olan ve deneyimlerini aktaran çok değerli tez danışmanım Dr. 6ęr. Üyesi Elif Bilgie,

Çalışmamıza değerli g6rüşleri ve ilgi alakası ile katkıda bulunan Prof. Dr. Hayriye Uğur 6zelik, Doç. Dr. Nagehan Emiralioglu ve Uzm. Dr. Halime Nayır Büyükşahin'e,

Uzmanlık eğitimim süresince eğitimime katkıda bulunan Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu, Prof. Dr. Fevziye Figen Kaymaz, Prof. Dr. Petek Korkusuz, Prof. Dr. Pergin Atilla, Prof. Dr. Lale Karakoç S6kmenser, Prof. Dr. Naciye Dilara Zeybek'e,

Tez çalışmam sürecinde bana çok büyük desteği olan başta Dr. Zeynep Bengisu Kaya, Dr. Ayşenur Daniş ve Dr. Sefa Burak am olmak üzere çalışma arkadaşlarım Dr. Serkan Treli, Dr. Kübra Simay Aydın Akkurt, Dr. Merve Ayan, Dr. Erblina Nikshiqi, Dr. Onur Alp Kuloğlu ve Dr. Seda Saraç, değerli uzman arkadaşlarım Uzm. Dr. Deniz Ekin Doğan ve Uzm. Dr. Süleyman Erol'a ve kıymetli personellerimiz Elif Yüce, Emrah Tosun, Hava Duygu, Meltem Sapmaz ve Hüseyin Konukçu'ya,

Uzmanlık eğitimim süresince sevgi ve desteğini esirgemeyen annem şükran Erdem, babam Mehmet Erdem ve kardeşim İlter Burak Erdem'e,

En içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Primer siliyer diskinezi (PCD) hastalarında dış dynein kolu (ODA) defektleri ile silyum ön yapım proteinlerinin ilişkisinin histolojik olarak araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Uzmanlık Tezi, Ankara, 2022.

Primer siliyer diskinezi (PCD), nadir ve otozomal resesif geçişli, sinopulmoner enfeksiyonlar ile karakterize ve motil silyum/flagellumun defektine bağlı oluşan bir hastalıktır. Aksonem yapısında mikrotübül düzenlenmesine sahip olan silyumun içerdiği yapısal proteinlerin PCD'li bireylerin genetik heterojenitesine bağlı olarak defektleri gözlenmektedir. Zinc finger MYND domain-containing protein 10 (ZMYND10); dış dynein kolu (ODA) ve siliyer yapı elementlerinin ön yapımında görevli olan proteindir. GRP78 moleküler bir şaperon olarak çalışmaktadır. Bu araştırmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Bölümü'nde klinik ve genetik olarak PCD ön tanısı (ODA defekti) almış yaşları 14-23 olan 8 adet hasta birey dahil edilmiştir. Hastaların nazal sürüntü örnekleri DNAH5-asetile beta tübülün, RSPH9-ZMYND10 ve RSPH9-GRP78 antikoları ile çift işaretleme yapılmıştır ve floresan mikroskopta değerlendirmeler yapılmıştır. İmmünofloresan işaretlemelerinde DNAH5 mutasyonlu hastaların %75'inde; DNAH5 ve ZMYND10 floresan işaretlenmesi gözlenmemiştir. Kontrol ve hastaların DNAH5 ve ZMYND10 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur. Hastaların %63'ünde GRP78 floresan işaretlenmesi gözlenmemiştir ve kontrole göre anlamlı fark bulunmuştur. Bu bulgular sonucunda aynı DNAH5 geninde farklı mutasyona sahip ODA defekti olan hastaların; silyum ön yapımında görevli ZMYND10 ve şaperon proteini olan GRP78 proteinleri ile ilişkisinin olduğu kalitatif olarak gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Primer Siliyer Diskinezi (PCD), Dış dynein kolu (ODA), Silyum ön yapım proteinleri, Nadir hastalık, Histoloji

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (HÜBAP) (Proje numarası: TSA-2021-19011) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Histological investigation of the relationship between external dynein arm (ODA) defects and cilium preforming proteins in primary ciliary dyskinesia (PCD) patients, Hacettepe University Faculty of Medicine, Histology and Embryology Specialization Thesis, Ankara, 2022. Primary ciliary dyskinesia (PCD) is rare and autosomal recessive, a transmissible disease characterized by sinopulmonary infections and caused by a defect in the motile cilium/flagellum. Defects of the structural proteins contained in the cilium, which has a microtubule arrangement in the axoneme structure, are observed due to the genetic heterogeneity of individuals with PCD. Zinc finger MYND domain-containing protein 10 (ZMYND10); It is the protein that is responsible for the pre-production of outer dynein arm (ODA) and ciliary structure elements. GRP78 function is to work as a molecular chaperone. Eight patients aged 14-23 who had clinically and genetically prediagnosed PCD (ODA defect) in Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Pediatric Chest Diseases were included in this study. Nasal swab samples of the patients were double-labeled with DNAH5-acetylated beta tubulin, RSPH9-ZMYND10 and RSPH9-GRP78 antibodies and evaluated under fluorescent microscope. In 75% of patients with DNAH5 mutations in immunofluorescence markings; No fluorescent labeling of DNAH5 and ZMYND10 was observed. There was a significant difference between the mean values of DNAH5 and ZMYND10 corrected total cell fluorescence (CTCF) measurements of control and patients. Fluorescent labeling of GRP78 was not observed in 63% of the patients, and a significant difference was found compared to the control. As a result of these findings, patients with ODA defect with different mutations in the same DNAH5 gene; it has been shown qualitatively that it has a relationship with ZMYND10, which is involved in cilium preconstruction, and GRP78, which is a chaperone protein.

Keywords: Primary Ciliary Dyskinesia (PCD), Outer dynein arm (ODA), Cilium preforming proteins, Rare disease, Histology

This project is financially supported by HÜBAP (Project number: TSA-2021-19011).

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Primer Siliyer Diskinezi (PCD)	4
2.2. PCD Tanı Algoritması	11
2.2.1. Nazal Nitrik Oksit (nNO) Konsantrasyonu Ölçümü	12
2.2.2. Yüksek Hızlı Video Mikroskopisi (HSVM)	12
2.2.3. İmmünofloresan (IF) İşaretleme	13
2.2.4. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM)	14
2.2.5. Genotipleme	15
2.3. Silyum Yapısı ve Çeşitleri	17
2.3.1. Siliyer Dynein Motor Proteinleri Yapısı	20
2.3.2. DNAH5 Proteininin Yapısı Ve Fonksiyonları	22
2.4. Siliyer Dynein Motor Proteinlerinin Ön-Yapımında Görevli Proteinlerle İlişkisi	23
2.4.1. ZMYND10 Silyum Ön Yapım Proteininin Yapısı ve Fonksiyonları	24
2.4.2. GRP78 Şaperon Proteininin Yapısı ve Fonksiyonları	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Etik Kurul İzin Süreci	29
3.2. Hasta Grupları ve Kontrol Bireylerin Belirlenmesi ve Örneklerin Elde Edilmesi	29
3.2.1. Araştırmaya Dahil Edilen Hastalar	30
3.3. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	30
3.3.1. Dilüsyon Tamponu Hazırlanması	30
3.3.2. %4'lük Paraformaldehit Hazırlanması	30

3.3.3 Triton-X Hazırlanması	30
3.3.4 Blokaj için %1'lik Süt Tozu Hazırlanması	30
3.3.5. DAPI Hazırlanması	31
3.4. Hasta ve kontrol grubundan alınan örneklerin lamlara yayılması	31
3.5. Hasta ve Kontrol Grubundan Alınan Örneklerde DNAH5 ve β Tübülin Çift İmmünofloresan İşaretleme	31
3.6. Hasta ve Kontrol Grubundan Alınan Örneklerde ZMYND10 ve RSPH9 Antikorların Çift İmmünofloresan İşaretleme	32
3.7. Hasta ve Kontrol Grubundan Alınan Örneklerde GRP78 ve RSPH9 Antikorların Çift İmmünofloresan İşaretleme	33
3.8. Düzeltilmiş Toplam Floresan Yoğunluğu (CTCF) Analizi	35
3.9. İstatiksel Analiz	35
4. BULGULAR	37
4.1. Hastaların ve Kontrol Bireylerin Demografik Özellikleri	37
4.2. Hastaların Fizik Muayene ve HSVM Bulguları	37
4.3. Hastaların Genetik Özellikleri	39
4.4. Hasta ve kontrol Grubundan Alınan Örneklerde DNAH5 ve β Tübülin Çift İmmünofloresan İşaretlenmesi	39
4.5. Hasta ve Kontrol Grubundan Alınan Örneklerde ZMYND10 ve RSPH9 Çift İmmünofloresan İşaretlenmesi	49
4.6. Hasta ve Kontrol Grubundan Alınan Örneklerde GRP78 ve RSPH9 Çift İmmünofloresan İşaretlenmesi	59
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ	77
7. KAYNAKLAR	78

SİMGELER ve KISALTMALAR

PCD	: Primer siliyer diskinezi
ODA	: Dış dynein kolu
IDA	: İç dynein kolu
IFT	: İntraflajellar transport
HC	: Ağır zincir
IC	: Orta zincir
LC	: Hafif zincir
DNAAF	: Aksonemal dynein yapım faktörleri
ZMYND10	: Zinc finger MYND type containin 10
ER	: Endoplazma retikulumunda
GRP78	: Glikozla Düzenlenmiş Protein 78
ERAD	: Endoplazma retikulumu ile ilişkili yıkılma
NA	: Uygulanabilir değil
nNO	: Nazal nitrik oksit
HSVM	: Yüksek hızlı video mikroskopisi
IF	: İmmünofloresan
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskopisi
ERS	: European Respiratory Society
ATS	: American Thoracic Society
DNAL1	: Dynein axonemal light chain 1
DNAI1	: Dynein axonemal intermediate chain 1
DNAI2	: Dynein axonemal intermediate chain 2
DNAH5	: Dynein axonemal heavy chain 5
DNAH11	: Dynein axonemal heavy chain 11
DNAH6	: Dynein axonemal heavy chain 6
ARMC4	: Armadillo repeat containing 4
DNAH9	: Dynein axonemal heavy chain 9
MTB	: Mikrotübül bağlama
ATP	: Adenozin trifosfat

HSP90	: Isı şok proteini 90
HSP70	: Isı şok proteini 70
HSC70	: Isı şok cognate proteini
KTU	: Kintoun
DYX1C1	: Dyslexia susceptibility 1 candidate gene 1
SPAG1	: Sperm Associated Antigen 1
PIH1	: Protein interacting with Hsp90
TAH1	: TPR-containing protein associated with Hsp90
LRRC6	: Leucine-rich repeat containing protein 6
C21ORF59	: Chromosome 21 open reading frame 59
CFAP298	: Cilia And Flagella Associated Protein 298
HEATR2	: HEAT Repeat-Containing Protein 2
FKBP8	: FKBP Prolyl Isomerase 8
UPR	: Katlanmamış protein cevabı
ATF6	: Aktivasyon transkripsiyon faktörü 6
PERK	: Protein kinaz RNA benzeri endoplazma retikulum kinaz
IRE1	: İnositol gerektiren enzim 1
RSPH9	: Radial Spoke Head Component 9
PFA	: Paraformaldehit
PBS	: Fosfat tamponlu tuz
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
HGVS	: Human Genome Variation Society
CTCF	: Düzeltilmiş toplam hücre floresan
KS	: Kartagener Sendromu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.2.1.	European Respiratory Society tanı algoritması	11
2.2.3.1.	Silyumlu hücrenin immünofloresan görüntüsü ve hücrenin apikalinde silyum yapısındaki proteinlerin şematik gösterimi.	13
2.3.1.	Silyum yapıları, çeşitleri ve oluşturan kısımlar	19
2.3.2.	Motil silyum proteinlerini etkileyen genlerle ilişkili mutasyonlar	20
2.4.1.1.	ZMYND10'un ODA ve IDA ön yapımında etkileşimleri	26
4.4.1.	Kontrol 1 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi.	40
4.4.2.	Kontrol 2 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi.	40
4.4.3.	Kontrol 3 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi.	41
4.4.4.	Hasta 1 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi.	43
4.4.5.	Hasta 2 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi.	43
4.4.6.	Hasta 3 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi.	44
4.4.7.	Hasta 4 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi.	44
4.4.8.	Hasta 5 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi.	45
4.4.9.	Hasta 6 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi.	45
4.4.10.	Hasta 7 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi.	46
4.4.11.	Hasta 8 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi.	46
4.4.12.	Bireyler arasında DNAH5 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri istatistik grafiği.	49
4.5.1.	Kontrol 1 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	50
4.5.2.	Kontrol 2 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	50

4.5.3.	Kontrol 3 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	51
4.5.4.	Hasta 1 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	53
4.5.5.	Hasta 2 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	53
4.5.6.	Hasta 3 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	54
4.5.7.	Hasta 4 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	54
4.5.8.	Hasta 5 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	55
4.5.9.	Hasta 6 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	55
4.5.10.	Hasta 7 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	56
4.5.11.	Hasta 8 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	56
4.5.12.	Bireyler arasında ZMYND10 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri istatistik grafiği.	58
4.6.1.	Kontrol 1 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	59
4.6.2.	Kontrol 2 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	60
4.6.3.	Kontrol 3 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	60
4.6.4.	Hasta 1 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	62
4.6.5.	Hasta 2 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	62
4.6.6.	Hasta 3 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	63
4.6.7.	Hasta 4 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	63
4.6.8.	Hasta 5 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	64
4.6.9.	Hasta 6 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi.	64

- 4.6.10.** Hasta 7 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi. 65
- 4.6.11.** Hasta 8 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi. 65
- 4.6.12.** Bireyler arasında bireylerin GRP78 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri istatistik grafiği. 67

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1.1. Hareketli silyopatiler ile ilişkili genler(14) NA: Uygulanabilir değil.	6
2.2.1.1. PCD genotiplerinde nazal NO (nNO) seviyeleri	12
2.2.4.1. PCD genotiplerinin elektron mikroskopisinde beklenen siliyer ultrastrüktürü	15
2.2.4.2. PCD ultrastrüktürel tanısı için sınıf 1 ve sınıf 2 defekt sınıflaması	15
2.2.5.1. PCD genleri ve fenotipik tanı ile ilişkisi	16
4.1.1. Hastaların ve Kontrol Bireylerin Demografik Özellikleri	37
4.2.1. Hastaların Fizik Muayene ve HSVM Bulguları	38
4.3.1. Hastaların genetik özellikleri	39
4.4.1. Kontrol bireylerin DNAH5 ve asetile beta tübülün işaretlenmesi	41
4.4.3. Kontrol ve hasta bireylerin DNAH5 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri	48
4.5.1. Kontrol bireylerin RSPH9 ve ZMYND10 işaretlenmesi	51
4.5.2. Hastaların mutasyonları ve RSPH9 ve ZMYND10 işaretlenmesi	57
4.5.3. Kontrol ve hasta bireylerin ZMYND10 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri	58
4.6.1. Kontrol bireylerin RSPH9 ve GRP78 işaretlenmesi	60
4.6.2. Hastaların mutasyonları ve RSPH9 ve GRP78 işaretlenmesi	66
4.6.3. Kontrol ve hasta bireylerin GRP78 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri	67

1. GİRİŞ

Primer siliyer diskinezi (PCD) motil silyum veya flagellumun defektine bağlı oluşan otozomal resesif bir hastalıktır (1, 2). İlk olarak sinüzit, bronşiektazi ve situs inversus üçlüsü ile (Kartagener) tanımlansa da (3), 1976'da patogenezin silyum yapısında/fonksiyonunda defekt ile ilişkili olduğu saptanarak Primer Siliyer Diskinezi (PCD) olarak yeniden adlandırılmıştır (4). PCD'nin dünyada görülme insidansı 1/15-000- 1/40.000 oranında (5) olup; 2019 yılında Avrupa'da retrospektif olarak yapılan çalışmada, PCD'li hastaların mortalite oranı %5 olarak saptanmıştır (6). PCD, genetik heterojenite gösteren ve değişik klinik bulgular ile seyreden nadir bir hastalıktır (7). Akraba evliliği ve buna bağlı genetik geçişli nadir hastalıkların görülme oranının yüksek olduğu ülkemizde de PCD insidansının yüksek olduğu tahmin edilmektedir (8). Proteomik ve genomik veriye göre motil silyumun fonksiyonu ve yapımında yüzlerce protein gerekmektedir (9-12). Genetik heterojenite gösteren PCD ile ilişkili olarak günümüze kadar tanımlanmış 50'den fazla gende mutasyon bildirilmiştir (13, 14). PCD, silyum yapısındaki fonksiyonel bozukluk ve genetik heterojenite ile seyreden bir hastalık olarak tanımlansa da silyogenezis defekti-hücre içi protein yapımı ilişkisi henüz aydınlatılamamıştır.

PCD hastalığı, anormal siliyer fonksiyon nedeniyle infantil dönemden itibaren başlayan kronik sinopulmoner enfeksiyonlarla seyretmektedir (13, 15-17). PCD olgularında bozulmuş mukosiliyer temizlemeden dolayı artmış pürülan sekresyon, kronik öksürük, rinit, sinüzit, otitis media, duyma bozukluğu, üst ve alt solunum sisteminin tekrarlayan enfeksiyonları klinik olarak gözlenmektedir (13, 15-17). Ayrıca silyum yapısının bozulması ile erkek infertilitesi, organların sağ-sol asimetrisi ve kardiyak anomalilerin bulunması da PCD için karakteristiktir (16-18).

Silyumlar, vücudumuzda çoğu hücrede bulunan yaygın yüzey modifikasyonlarıdır (19-21). Özellikle solunum yolları ve erkek üreme sisteminde bulunan motil silyum yapısının periferde 9 çift mikrotübül ile merkezde iki mikrotübülden (9+2) meydana gelen aksonemden oluştuğu bilinmektedir (19-21). Her bir çift mikrotübül, ilişkili bir motor protein olan silyum dyneini içeren 2 adet kol (iç dynein kolları (IDA) ve dış dynein kolları (ODA)) ile bağlantılıdır (19-21).

Dynein motor proteinin kollarının öncüllerinin sentezi sitoplazmada başlamakta ve IFT (intraflajellar transport) ile silyuma (aksonem yapısına) taşınmaktadır (22-25). Aksonemal dynein yapım faktörleri olarak bilinen (DNAAF) proteinleri, şaperon kompleksiyle birlikte çalışarak ODA ve IDA'ların doğru bir biçimde yapılmasında görev almaktadır (26-28). Aksonemal dynein yapım faktörlerinde (DNAAF) görülen defektler, iç dynein kolları (IDA) ve dış dynein kollarında (ODA) kayıpla sonuçlanmaktadır (26, 27, 29-31).

Zinc finger MYND type containin 10 (ZMYND10), 3p21 kromozomunda yer alan DNAAF ailesinden aksonemal dynein ön yapım proteindir ve siliyer yapı elementlerinin ön yapımında görevlidir (32). Sınırlı sayıda çalışmada ZMYND10 mutasyonu ile PCD'nin ilişkili olduğu gösterilmiştir (29, 33-35).

PCD hastalığı, ilişkili genlerin ve proteinlerin motil silyum defektine neden olmasıyla gerçekleşmektedir. Literatürde ODA defektleri ile ilişkili çeşitli mutasyonlar tanımlanmış olsa da dynein protein kollarının yapım aşamasındaki bozukluklar ile PCD ilişkisi sınırlı sayıda çalışılmıştır. Motil silyumun hareketinde görev alan dış dynein kolları, ribozomlarda sentezlendikten sonra endoplazma retikulumunda (ER) şaperonlar ile katlanmakta ve sitoplazmada ön yapım proteinleri ile yapımı tamamlanmaktadır. ZMYND10; IDA, ODA ve siliyer yapı elementlerinin ön yapımında görevli olan ön yapım proteindir (32, 36). Literatürde sınırlı çalışmada ODA defekti ile ZMYND10 proteininin ilişkisi çalışılmıştır. Glikozla Düzenlenmiş Protein 78 (GRP78) fizyolojik olarak moleküler bir şaperon fonksiyonu yapmaktadır. Yanlış katlanmış proteinler ve birleştirilmemiş komplekslere bağlanır ve katlanmamış protein cevabı (UPR) düzenlemesinden sorumlu endoplazma retikulumu ile ilişkili yıkılmayı (ERAD) başlatmaktadır (93). PCD gibi sadece semptomlara yönelik palyatif tedavi dışında; henüz belirli bir küratif tedavisi bulunmayan, siliyer defekt ve rekürren solunum yolu enfeksiyonu nedeni ile mortaliteye sebep olabilen nadir hastalığın patogenezinin aydınlatılmasında silyogenezis defekti-hücre içi protein yapımı ilişkisi önem arz etmektedir. PCD tanısında önemli bir tanı materyali olan silyumun hücre içinde sitoplazmik öncüllerinin yapım aşamasındaki, protein katlanması ve organel ilişkisi henüz aydınlatılmamıştır. Küratif tedavisi sistemik formülasyonlar/uygulamalar ile

gerçekleştirilemeyen pek çok nadir hastalık gibi PCD için de kişiselleştirilmiş tedavi uygulamaları hastalığın çalışıldığı bilimsel topluluklarda son zamanlarda gündeme gelmektedir. Bu çalışmada, ODA mutasyonu olduğu bilinen hastalarda (daha önceden genetik tanı almış) dynein kolu defektinin; silyum ön yapım proteini ZMYND10 ve şaperon proteini olan GRP78 proteinleri ile ilişkisi incelenerek, hastalığın hücre içi histopatogenezinde henüz tam olarak bilinmeyen bir mekanizmanın aydınlatılması ve literatüre katkı sağlanması amaçlanmaktadır. Bu çalışmanın sonucunda, PCD'deki siliyer defektin histolojik olarak hücre içindeki protein sentez basamakları ile ilişkisi gösterilebilirse ileride yapılabilecek fonksiyonel çalışmalar için temel oluşturulabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Primer Siliyer Diskinezi (PCD)

Primer siliyer diskinezi (PCD), nadir ve otozomal resesif geçişli (MIM 244400), sinopulmoner enfeksiyonlar ile karakterize olup motil silyum veya flagellumun defektine bağlı oluşan bir hastalıktır (1, 2). PCD'nin dünyada görülme insidansı 1/15-000- 1/40.000 oranındadır (5). 2019 yılında Avrupa'da retrospektif olarak 151 erişkin hastada yapılan bir çalışmada, PCD'li hastaların mortalite oranı %5 olarak saptanmıştır (6). Ülkemizde de akraba evliliği oranı yüksek olup PCD insidansının yüksek olduğu tahmin edilmektedir ancak kesin insidansı bilinmemektedir (8).

Hastalık ilk olarak 1933'te sinüzit, bronşiektazi ve iç organların sağ-sol asimetrisi (situs inversus) üçlüsü ile Kartagener tarafından tarif edilmiştir (3). Ancak Afzelius 1976'da patogenezin silyum yapısında ya da fonksiyonunda defekt ile ilişkisi olduğunu bildirmiş ve hastalık PCD olarak yeniden tanımlanmıştır (4). Anormal siliyer fonksiyon nedeniyle infantil dönemden itibaren başlayan kronik sinopulmoner enfeksiyonlarla seyreden PCD'de (13, 15-17) bozulmuş mukosiliyer temizlemeden dolayı öksürük, artmış balgam üretimi, rinit, sinüzit, otitis media, duyma bozukluğu, üst ve alt solunum sisteminin tekrarlayan enfeksiyonları sık görülmektedir (13, 15-17). Ayrıca silyum yapısının bozulması ile erkek infertilitesi, iç organların sağ-sol asimetrisi (situs inversus) ve kardiyak anomalilerin bulunması da PCD için karakteristiktir (16-18). Hastalıkta siliyer hareketin azalması (siliyer immotilite) ya da silyum vuruş paterninin değişmesi karakteristiktir (7, 18). Çocukluk çağında başlayıp ilerleyen dönemde hastalarda geri dönüşümsüz akciğer hasarından dolayı akciğer transplantasyonu gerekebilmektedir (37). Flagellum yapısının da bozulması nedeni ile erkek hastalarda spermin azalmış hareketi veya hiç hareketi olmaması nedeniyle infertilite görülmektedir (38, 39). PCD'li kadınlarda oositin tuba uterinada taşınmasında yavaşlama olmakta ve bu da ektopik gebelik ve infertiliteye sebep olmaktadır (38-40).

PCD, genetik heterojenite gösteren ve değişik klinik bulgular ile seyreden nadir bir hastalık olup (7) günümüze kadar PCD ile ilişkili olarak tanımlanmış 50'den fazla

genetik mutasyon bulunmaktadır ve hastalığın fenotipi genetik mutasyonlarına göre değişmektedir (Tablo 2.1.1) (13, 14). Proteomik ve genomik veriye göre motil silyumun fonksiyonu ve yapımında yüzlerce protein gerekmektedir (9-12). Siliyer proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar silyum fonksiyonunda değişikliklere; daha az veya daha kısa silyum yapımına veya silyum yokluğuna neden olmaktadır. Diğer nadir hastalıklarda olduğu gibi PCD'li hastaların tedavisi sınırlıdır ve küratif bir tedavisi bulunmamaktadır (1, 41, 42).

Tablo 2.1.1. Hareketli silyopatiler ile ilişkili genler(14) NA: Uygulanabilir değil.

Gen	Tanı araçları				Klinik göstergeler			
	Nazal Nitrik oksit (NO)	HSVM	TEM	IF anomalisi	Solunum semptomları	Organ sağ-sol asimetrisi	Subfertilite	Hidrosefali
Merkezi çift kısmı								
HYDIN	Azalmış	Hafif anormaliler	Anormali yok	SPEF2	Evet	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı
SPEF2	NA	Hafif anormaliler	Anormali yok	SPEF2	Evet	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı
STK36	Anormali yok	Hafif anormaliler	Anormali yok	Yok	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı	Raporlanmadı
CFAP221	Anormali yok	Hafif anormaliler	Anormali yok	NA	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı	Raporlanmadı
Radial çıkıntı kısmı								
DNAJB13	Anormali yok	Hafif anormaliler	Anormali yok	NA	Evet	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı
RSPH1	Anormali yok	Hafif anormaliler	Anormali yok	RSPH9	Evet	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı
RSPH3	Azalmış	Hafif anormaliler	Anormali yok	NA	Evet	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı
RSPH9	Azalmış	Hafif anormaliler	Anormali yok	RSPH9	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı	Raporlanmadı
RSPH4A	Azalmış	Hafif anormaliler	Anormali yok	RSPH9	Evet	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı
Neksin dynein düzenleyici kompleks kısmı								
DRC1 (CCDC164)	Azalmış	Hafif anormaliler	Anormali yok	GAS8	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı	Raporlanmadı
GAS8 (DRC4)	Anormali yok	Hafif anormaliler	Anormali yok	GAS8	Evet	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı
CCDC65 (DRC2)	Azalmış	Ciddi azalmış amplitüd/Rijid aksonem	Tübül düzensizliği	GAS8	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı	Raporlanmadı
Kuralcı proteini								
CCDC39	Azalmış	Ciddi azalmış amplitüd/Rijid aksonem	Tübül düzensizliği	GAS8 + DNAL1	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
CCDC40	Azalmış	Ciddi azalmış amplitüd/Rijid aksonem	Tübül düzensizliği	GAS8 + DNAL1	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı

Mikrotübül iç proteini								
MNS1	Anormali yok	Hafif anormaliler	Anormali yok	Yok	Raporlanmadı	Evet	Evet	Raporlanmadı
CFAP52 (WDR16)	Anormali yok	NA	NA	NA	Hafif	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı
CFAP53 (CCDC11)	Anormali yok	Hafif anormaliler	Anormali yok	Yok	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı
ENKUR	Anormali yok	Hafif anormaliler	Anormali yok	Yok	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı
NME7	NA	NA	NA	NA	Evet	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı
Dış dynein kolu proteini								
DNAH1	NA	NA	NA	NA	Raporlanmadı	Evet	Evet	Raporlanmadı
DNAH5	Azalmış	Hareketsiz/ Rezidüel titreyen	ODA	DNAH5	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
DNAH11	Azalmış	Hiperkinetik/ Azalmış proksimal bükülme	Anormali yok	Yok	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
DNAH9	Anormali yok	Hafif anormaliler	Anormali yok	DNAH5	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
DNAH8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Evet	Raporlanmadı
DNAH17	NA	NA	Anormali yok	Yok	Hayır	Hayır	Evet	Raporlanmadı
Orta zincir proteini								
DNAI1	Azalmış	Hareketsiz/ Rezidüel titreyen	ODA	DNAH5	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
DNAI2	Azalmış	Hareketsiz/ Rezidüel titreyen	ODA	DNAH5	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
NME8 (TXNDC3)	Azalmış	Hareketsiz/ Rezidüel titreyen	ODA	DNAH5	Evet	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı
Dynein hafif zinciri								
DNAL1	Azalmış	Hareketsiz/ Rezidüel titreyen	NA	NA	Evet	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı
Dış dynein kolu tutturucu kompleks kısmı								
CCDC103	Azalmış	Hareketsiz/ Rezidüel titreyen	ODA	DNAH5	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı

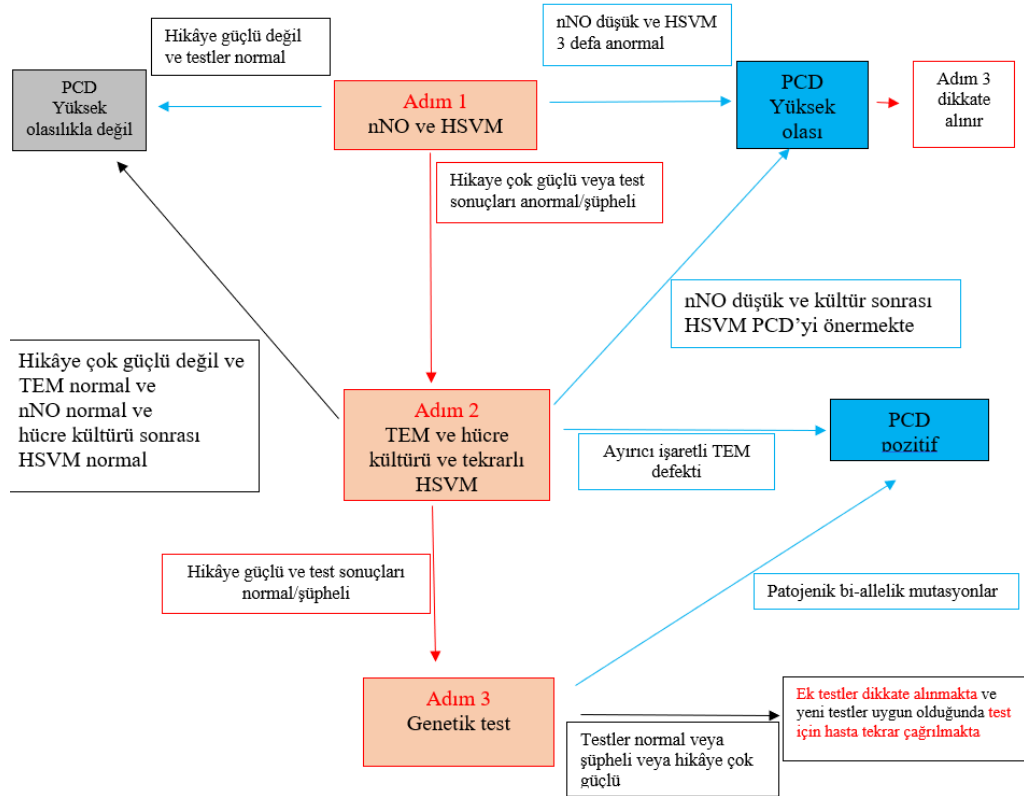
CCDC114	Azalmış	Hareketsiz/ Rezidüel titreyen	ODA	DNAH5	Evet	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı
ARMC4	Azalmış	Hareketsiz/ Rezidüel titreyen	ODA	DNAH5	Evet	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı
CCDC151	Azalmış	Hareketsiz/ Rezidüel titreyen	ODA	DNAH5	Evet	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı
TTC25	Azalmış	Hareketsiz/ Rezidüel titreyen	ODA	DNAH5	Evet	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı
Sitoplazmik dynein aksonemal yapım faktörü								
DNAAF1 (LRRC50)	Azalmış	Hareketsiz	ODA	DNAH5 + DNAL1	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
DNAAF2 (KTU)	Azalmış	Hareketsiz	ODA	DNAH5 + DNAL1	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
DNAAF3 (C19ORF51)	Azalmış	Hareketsiz	ODA	DNAH5 + DNAL1	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
DNAAF4 (DYX1C1)	Azalmış	Hareketsiz	ODA	DNAH5 + DNAL1	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
DNAAF5 (HEATR2)	Azalmış	Hareketsiz	ODA	DNAH5 + DNAL1	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
CFAP298 (C21orf59)	Azalmış	Hareketsiz	ODA	DNAH5 + DNAL1	Evet	Evet	NA	Raporlanmadı
SPAG1	Azalmış	Hareketsiz	ODA	DNAH5 + DNAL1	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
LRRC6	Azalmış	Hareketsiz	ODA	DNAH5 + DNAL1	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
ZMYND10	Azalmış	Hareketsiz	ODA	DNAH5 + DNAL1	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
DNAAF6 (PIH1D3)	Azalmış	Hareketsiz	ODA	DNAH5 + DNAL1	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
CFAP300 (C11orf70)	Azalmış	Hareketsiz	ODA	DNAH5 + DNAL1	Evet	Evet	Evet	Raporlanmadı
TTC12	Azalmış	Anormali yok	Anormali yok	NA	Evet	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı

Silyogenezle ilişkili proteinler								
CCNO	Azalmış	Azalmış silya sayısı	Silya/ Bazal Cisimcik azalmış	Yok	Evet	Raporlanmadı	Evet	Evet
MCIDAS	Azalmış	Azalmış silya sayısı	Silya/ Bazal Cisimcik azalmış	DNAH5	Evet	Raporlanmadı	Evet	Evet
FOXJ1	Anormali yok	Azalmış silya sayısı	Bazal cisimcik yanlış yerleşimli	Yok	Evet	Evet	Evet	Evet
NEK10	Anormali yok	Azalmış silya sayısı	Silya az	Yok	Evet	Raporlanmadı	NA	Raporlanmadı
Siliyer taban yapısı								
RPGR	Anormali yok	NA	NA	Yok	Raporlanmadı	Raporlanmadı	NA	Raporlanmadı
OFD1	NA	Azalmış silya	Bazal cisimcik yanlış yerleşimli	Yok	Raporlanmadı	Evet	NA	Evet
GAS2L2	Anormali yok	Hiperkinetik	NA	Yok	Evet	Evet	Hayır	Raporlanmadı
AK7	Anormali yok	Anormali yok	Anormali yok	Raporlanmadı	Raporlanmadı	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı
IFT ilişkili protein								
LRRC56	Azalmış	Anormali yok	Normal	Yok	Evet	Evet	NA	Raporlanmadı
INVS (NPHP2)	NA	NA	NA	NA	Evet	Evet	NA	Raporlanmadı
CEP290 (NPHP6)	NA	NA	NA	NA	Raporlanmadı	Evet	NA	Raporlanmadı
DYNC2H1	Anormali yok	Anormal	NA	Yok	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı	Raporlanmadı
WDR alan proteini								
CFAP43	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Evet	Evet
CFAP44	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Evet	Raporlanmadı
Armadilo benzeri helikal tekrarlar								
CFAP69	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Evet	Raporlanmadı

Fibröz kılıf birleştirme proteini								
FSIP2	NA	NA	NA	NA	NA	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı
Aksonemal kısım, olası radyal çıkıntı fonksiyonu								
CFAP251 (WDR66)	NA	Koordine olmamış	NA	NA	NA	Raporlanmadı	Evet	Raporlanmadı

2.2. PCD Tanı Algoritması

PCD genetik heterojenitesi ve klinik değişkenliğiyle beraber, çocukluk döneminde hayat kalitesinin düşmesi ve akciğer fonksiyonun kötüye doğru ilerleyiş göstermesiyle mortalite/morbidite açısından tanı konulması önemli bir hastalıktır (39, 41). Uluslararası muayene verilerine göre hastaların %37'si sevk edilmeden önce PCD semptomlarıyla test için doktora başvurmuştur ve PCD'de tanı konulma azlığının tanı merkezlerine ulaşamamaktan kaynaklanması en sık sebeptir (41, 43). Tanı merkezlerine ulaşım zorlukları, doktorların hastalık konusunda bilgi eksiklikleri ve klasik fenotipi tanımadaki azlık nedeniyle tanının konması gecikmektedir (41, 42). Klinikte genel muayenede kullanılan yöntemler ve anamnez ile tanı koymak yeterli olmayıp uluslararası tanı algoritması güncellenmiştir (Şekil 2.2.1)(1, 41, 44). Buna göre kliniğe kronik sinopulmoner enfeksiyonlar ile başvuran hastalarda gerekli fizik muayene gerçekleştirildikten sonra izlenen algoritma açıklanmıştır:



Şekil 2.2.1. European Respiratory Society tanı algoritması (45)

2.2.1. Nazal Nitrik Oksit (nNO) Konsantrasyonu Ölçümü

Hastaların nazal kavitesindeki NO konsantrasyonu gaz analiz edici bir ekipmanla ölçülebilmektedir (genelde 4 yaş üstü) (41, 46). PCD'li hastalarda sağlıklı hastalara göre NO konsantrasyonu 10 kat daha düşüktür (41, 46). Normal nNO seviyeleri hastalığı dışlama konusunda yardımcı olmaktadır fakat tek başına tanı testi olarak yeterli değildir (41, 47, 48). Tablo 2.2.1.1'de PCD'ye neden olan farklı mutasyonlarda farklı nNO seviyelerine rastlanabileceği gösterilmiştir (49).

Tablo 2.2.1.1. PCD genotiplerinde nazal NO (nNO) seviyeleri (49)

Rutin olarak nNO ≤ 77 nL/min		Sınırlı vakada nNO > 77 nL/min	Rutin olarak nNO > 77 nL/min
ARMC4	DNAI2	DNAH9	CCDC103
CCDC39	DNAJB13	TTC12	RSPH1
CCDC40	DNAL1	RPGR	
CCDC114	DRC1	CCNO	
CCDC151	DRC2	FOXJ1	
CFAP57	HYDIN	NEK10	
CFAP298	LRRC6	GAS2L2	
CFAP300	MCIDAS	GAS8	
DNAAF1	NME5	STK36	
DNAAF2	NME8	CFAP221	
DNAAF3	OFD1	SPEF2	
DNAAF4	PHID3	LRRC56	
DNAAF5	RSPH3		
DNAH1	RSPH4A		
DNAH5	RSPH9		
DNAH8	SPAG1		
DNAH11	TTC25		
DNAI1	ZMYND10		

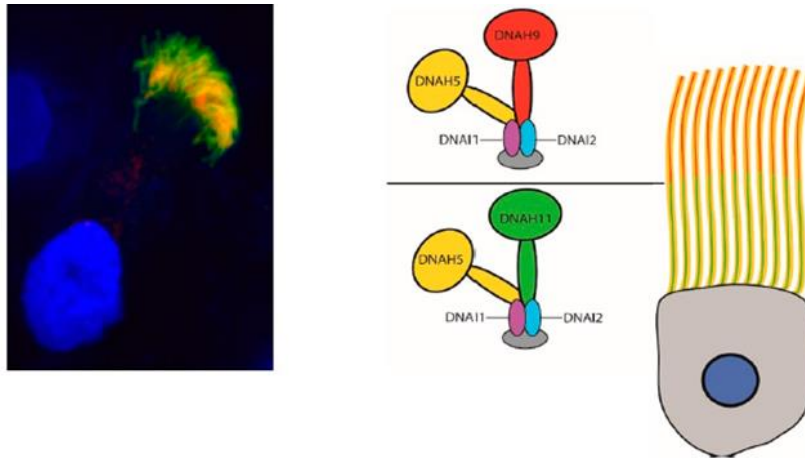
2.2.2. Yüksek Hızlı Video Mikroskopisi (HSVM)

Hastaların nazal sürüntüsü ile elde edilen respiratuvar epitel hücrelerinden silyum hareket frekansını ve vuruş paternini ölçmede kullanılmaktadır. Ex vivo olarak ışık mikroskobuna bütünleşmiş yüksek hızlı video kamera ile silyum gözlenmektedir (41, 50). Silyum, vuruşunu metakronal dalga şeklinde etkin bir vuruş yaptıktan sonra geri dönüş vuruşu yaparak tamamlamaktadır. Gözlemlenen ve kaydedilen değişik

hareket/frekans ile özellikle bazı PCD olgularının genetik varyantlarının saptanabilmesi mümkündür (41, 50).

2.2.3. İmmünofloresan (IF) İşaretleme

İmmünofloresan, spesifik floresan etiketli antikolar kullanarak floresan veya konfokal mikroskopi ile hedef proteinlerin indirekt görüntülenmesine izin vermektedir. Silyumu oluşturan proteinlerine karşı kullanılan antikolar genetik mutasyonun patojenitesini (fenotip olarak) ve silyer proteinin yokluğunun histopatolojik olarak göstermede oldukça değerlidir (51). İmmünofloresan tarafından çoklu genlerdeki mutasyonların tek bir proteinin yokluğu veya yanlış yerleşimine etkileri histopatolojik olarak tespit edilebilmektedir. Bu proteinler silyumun tamamında ya da bir kısmında görülebilmektedir (Şekil 2.2.3.1) (52). 2017'de gerçekleştirilen PCD tanı algoritması konulu panelde histolojik olarak morfolojik hasarı saptayabilmede ve genotip-fenotip korelasyonunu göstermede immünofloresan işaretlenmenin kullanılmasının sensitivite ve spesifite açısından önemli olduğu gösterilmiştir (41, 47, 48).



Şekil 2.2.3.1. Silyumlu hücrenin immünofloresan görüntüsü ve hücrenin apikalinde silyum yapısındaki proteinlerin şematik gösterimi (52)

2.2.4. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM)

TEM siliyer ve hücrel ultrastrüktür hakkında genel bir inceleme sağlamaktadır. TEM her zaman histopatolojisi bilinmeyen PCD vakalarında bile ultrastrüktürün kapsamlı bir tanımını verebilmektedir (53). Geçmişte, TEM ile siliyer ultrastrüktür anormalliklerinin değerlendirilmesi PCD tanısı için “altın standart” olarak değerlendirilmekteydi. Ancak, birkaç yıldır kılavuzlar PCD hastalarının önemli bir alt kümesinin histolojik olarak normal aksonemal ultrastrüktür göstermekte ve TEM ile tanımlanamadıklarını bu nedenle TEM’in, altın standart bir test olarak kabul edilemeyeceğini göstermektedir (54).

Normal silyum, periferde 9 mikrotübül çifti; santralde 2 mikrotübül tekli (9+2), ile aksonem yapısındadır (19, 41). Mikrotübüllerin birbirleri ve motor proteinler ile bağlantısını göstermede; normal/defekli silyum yapısını morfolojik olarak ultrastrüktürel olarak saptamada aksonem yapısının TEM ile incelenmesi büyük önem arz etmektedir (Tablo 2.2.4.1) (41, 45, 55).

Silyumların TEM görüntülenmesinde silyumla ilgili bazı parametrelere bakılmaktadır. Silyumdaki mikrotübüllerin normal mi düzensiz mi yerleştiği, tek tübül veya ekstra tübül yapısı mevcut mu, mikrotübül çiftlerinden biri ya da birkaçı eksik mi, diğer defektler var mı, iç dynein kolları ve dış dynein kollarından herhangi biri veya ikisi de eksik mi ya da normal mi şeklindeki parametrelerle değerlendirilmektedir (56). Sayılan hücrelerden en az 100 adet silyum seçilerek kaçında bu parametrelerde defekt olup olmadığı not edilmekte ve olası mutasyonla ilgili tablo 2.2.4.1’de ve tablo 2.2.4.2 ‘de bahsedildiği üzere tanıya histolojik açıdan katkı sağlamaktadır (56).

Tablo 2.2.4.1. PCD genotiplerinin elektron mikroskopisinde beklenen siliyer ultrastrüktürü (49)

Anormal Elektron Mikrograf		Normal veya Tanımlanmamış Elektron Mikrograf	
Dış Dynein Kolu (ODA) Kusuru		Oligosilyum Kusuru	Santral Çift Kusuru
ARMC4 (<5%)	CCDC103 (<5%)	CCNO (<5%)	DNAJB13 (<5%)
CCDC114 (<5%)	CCDC151 (<5%)	MCIDAS (<5%)	STK36 (<5%)
DNAH1 (<5%)	DNAH5 (<15-29%)	FOXJ1 (<5%)	CFAP221 (<5%)
DNAH9 (<5%)	DNAI1 (<2-10%)	Radiyal Çıkıntı Kusuru	HYDIN (<5%)
DNAI2 (<5%)	DNAL1 (<5%)	RSPH1 (<5%)	SPEF2 (<5%)
NME8 (<5%)	TTC25 (<5%)	RSPH4A (<5%)	Bazal Cisimcik Kusuru
ODA artı İç Dynein Kolu (IDA) Kusuru		NME5 (<5%)	GAS2L2 (<5%)
CFAP300 (<5%)	CFAP298 (<5%)	RSPH3 (<5%)	Diğer/Tanımlanmamış
DNAAF1 (<5%)	DNAAF2 (<5%)	RSPH9 (<5%)	TTC12 (<5%)
DNAAF3 (<5%)	DNAAF4 (<5%)	Neksin Bağlantı Kusuru	OFD1 (<5%)
DNAAF5 (<5%)	LRRC6 (<5%)	DRC1 (<5%)	RPGR (<5%)
SPAG1 (<5%)	ZMYND10 (<5%)	GAS8 (<5%)	NEK10 (<5%)
PIH1D3 (<5%)		DRC2 (<5%)	DNAH8 (<5%)
IDA artı Mikrotübül Disorganizasyon Kusuru		ODA Proksimal Kusuru	LRRC56 (<5%)
CCDC39 (<4-9%)	CCDC40 (<5%)	DNAH11 (<6-9%)	CFAP57 (<5%)

Tablo 2.2.4.2. PCD ultrastrüktürel tanısı için sınıf 1 ve sınıf 2 defekt sınıflaması (56)

Sınıf 1 defektler: Ayırt edici tanı defektleri
Dış dynein kolu (ODA) defekti
Dış dynein kolu ve iç dynein kolu (ODA ve IDA) defekti
Mikrotübül yanlış düzenlenimi ve IDA defekti
Sınıf 2 defektler: Diğer destekleyici kanıtlarla PCD tanısına işaret eden
Merkezi kompleks defekti
Bazal cisimciklerin az veya olmayan silyum ile yanlış yerleşimi
IDA varlığı ile mikrotübül yanlış düzenlenimi
Enine kesitlerin %25-50 'sinde ODA yokluğu
Enine kesitlerin %25-50 'sinde ODA ve IDA yokluğu

2.2.5. Genotipleme

European Respiratory Society (ERS) ve American Thoracic Society (ATS) kılavuzlarında, bilinen PCD genlerinde bialelik patojenik mutasyon veya hemizigot X'e bağlı mutasyon saptanması tanı için gerekli olup; klinik olarak PCD olduğu düşünülen olgularda %65-70 oranında genetik tanı konulabilmektedir (Tablo 2.2.5.1) (41, 45, 57). Ancak birçok birey bilinmeyen önemli varyantlara veya mono alelik heterozigot varyantlara sahip olduklarından fonksiyonel ve yapısal testlere ihtiyaç olmaktadır (HSVM, İmmünofloresan, TEM) (41, 45, 57).

Tablo 2.2.5.1. PCD genleri ve fenotipik tanı ile ilişkisi (58)

Gen	Tanı Testi Sonuçları
Dış dynein kolunda yapısal proteinleri kodlayan genler	
DNAH5, DNAI1, DNAI2, DNALI1, NME8, CCDC114, ARMC4, CCDC151, TTC25	TEM: Sınıf 1 dış dynein kolu defekti HSVM: Çoğunlukla statik IF: Yok veya yanlış yerleşen DNAH5
DNAH11	TEM: Normal HSVM: Azalmış amplitüd ve hızlı frekanslı IF: DNAH11 yok
DNAH9	TEM: Kısmi dış dynein kolu defekti HSVM: Hafif vuruş patern defekti IF: DNAH9 yok
Dynein yapım proteinleri	
DNAAF1 (LRRC50), DNAAF2 (KTU), DNAAF3 (C19ORF51), DNAAF4 (DYX1C1), DNAAF5 (HEATR2), LRRC6, ZMYND10, SPAG1, CFAP298 (C21ORF59), DNAAF6 (PIH1D3), CFAP300(C11ORF70)	TEM: Dış ve iç dynein kolu defekti HSVM: Hareketsiz IF: DNAH5 ve DNALI1 yok
Radiyal çıkıntı ve merkezi kompleks kısımları	
RSPH9, RSPH4A, RSPH1	TEM: Sınıf 2 merkezi kompleks defekti HSVM: Rotasyonel IF: RSPH9 yok
HYDIN, SPEF2	IF: SPEF2 yok
RSPH3, DNAJB13, STK221, CFAP221	Diğer tanı testleri kötü tanımlanmış veya normal
Moleküler kuralcı ve dynein düzenleyici genler	
CCDC39, CCDC40	TEM: Sınıf 1 mikrotübül organizasyon bozukluğu ve iç dynein kolu defekti HSVM: Azalmış bükülme IF: GAS8 ve DNALI1 yok
CCDC65 (DRC2), DRC1 (CCDC164), GAS8 (DRC4)	TEM: Sınıf 1 mikrotübül organizasyon bozukluğu HSVM: Atımda durma ile hafif defekt IF: GAS8 yok
Silyogenez için gerekli proteinler	
CCNO, MCIDAS, FOXJ1, NEK10	TEM: Sınıf 2 çoklu hareketli silyum azlığı ve bazal cisimciklerin yanlış yerleşimi HSVM & IF: Çoklu hareketli silyum azlığı
Primer silyopati ilişkili	
OFD1, RPGR, NHPH	Diğer tanı testleri iyi tanımlanmamış veya normal
Diğer fonksiyonlar	
CCDC103, GAS2L2, TTC12	Diğer tanı testleri iyi tanımlanmamış veya normal

2.3. Silyum Yapısı ve Çeşitleri

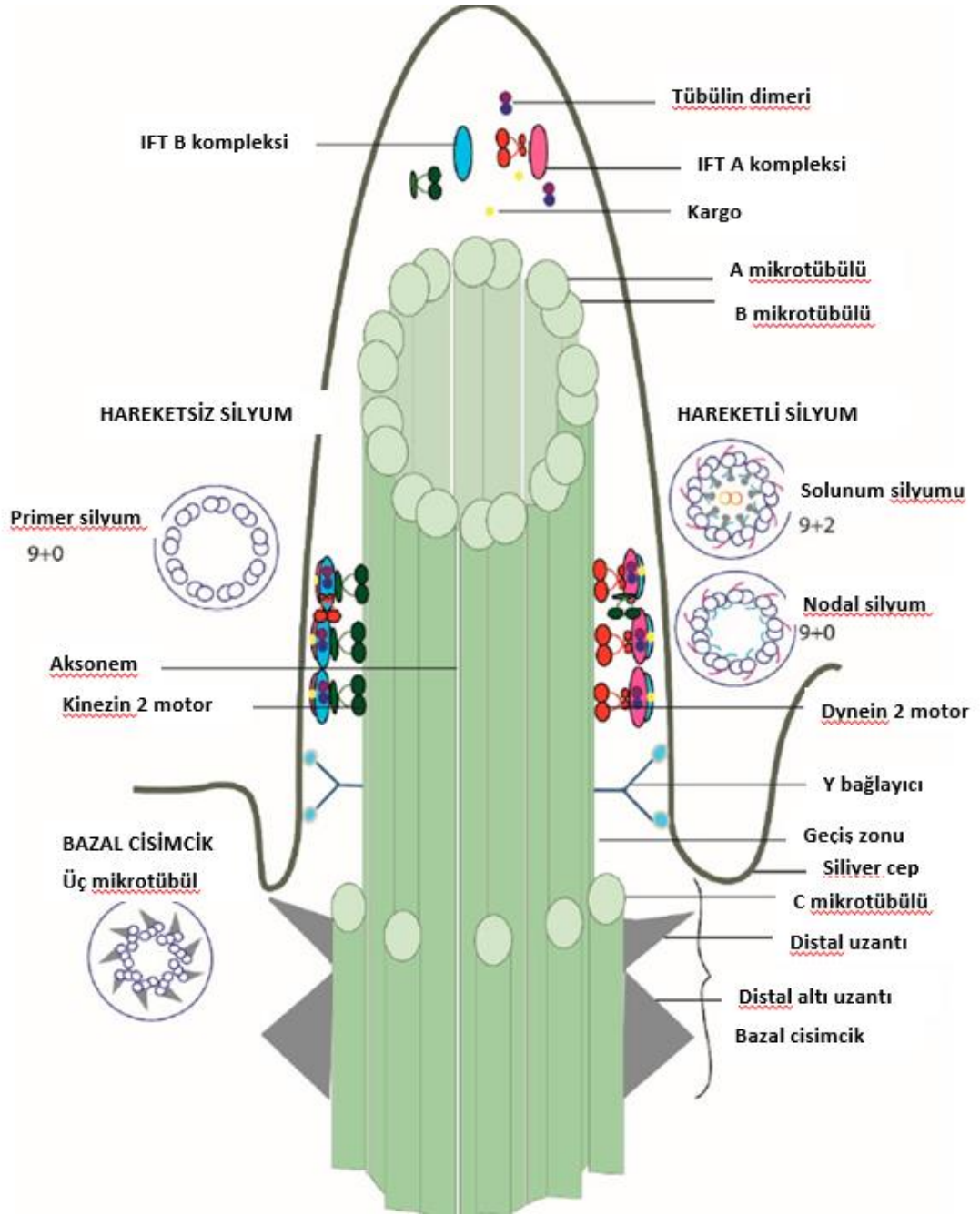
Silyumlar, vücudumuzda çoğu hücrede bulunan yaygın yüzey modifikasyonlarıdır (19-21). Bu yapılar plazma membranı uzantıları olup, iç yapısı mikrotübüllerden oluşan aksonem içermektedir. Aksonem, apikal sitoplazmadaki bazal cisimcikten uzanır. Bazal cisimcik, hücrelerin apikal bölgesinde bulunan sentriyol kaynaklı bir mikrotübül organize edici merkezdir (19-21). Bazal cisimcikler hücre sitoplazmasında sabitlenmelerine yardım eden birkaç aksesuar yapı ile ilişkilidirler (19-21). Silyumlar bazal cisimcikler ve bazal cisimcik ilişkili sabitleyici yapılar ile hücrenin siliyer aparatını oluşturmaktadır (19-21). Genel olarak silyumlar; motil (hareketli), non-motil (hareketsiz) olarak 2 temel kategoride sınıflandırılmaktadırlar (59-64).

Motil silyumlar, epitel hücrelerinin apikal kısmında bulunup en çok çalışma yapılan silyum türüdür (19-21). Motil silyumlar ve benzeri olan flagellumlar, siliyer hareketin indüklenmesi için gerekli ATP'nin oluşturulmasını sağlayan mikrotübül ilişkili motor proteinlere (Dynein protein ailesi) sahiptirler (19-21). Bu silyumlar; yaklaşık 0.25 mikrometre çapında ve 5-10 mikrometre uzunluğunda olup hücrenin serbest yüzeyi boyunca partikülleri ve sıvıyı hareket ettirme yeteneğine sahiptirler (19-21). Elektron mikroskobu ile gözleendiğinde her silyumun bazal cisimciği ayrı birer yapı olarak görünmektedir (19-21). Solunum yollarının yanı sıra (trakea, bronş ve bronşiyoller) kadın (tuba uterina) ve erkek genital sisteminde de (epididimis) yüzey epitel hücrelerinde motil silyumlar bulunmaktadır (19-21).

Ayrıca, erken embriyonik gelişim sırasında 9+0 mikrotübül örüntüsü içeren nodal silyumlar iç organların sol-sağ asimetrisini sağlamaktadır ve motil silyumdan farklı olarak aktif hareket içermemektedir (19, 65-68). Primer silyumlar ise kemosenör, ozmosensör ve mekanosensör olarak fonksiyon görmekte ve vücuttaki birçok organda ışık duyarlılığına, koku ve ses algılanmasına aracılık etmektedirler. Primer silyumlar hareketsizdirler ve 9+0 mikrotübül örüntüsüne sahiptirler (19, 60, 69-71).

Motil silyumun enine kesitinin ultrastrüktürel incelenmesinde, (9+2) örüntüsünde düzenlenmiş periferde 9 çift mikrotübül ile merkezde iki mikrotübülden

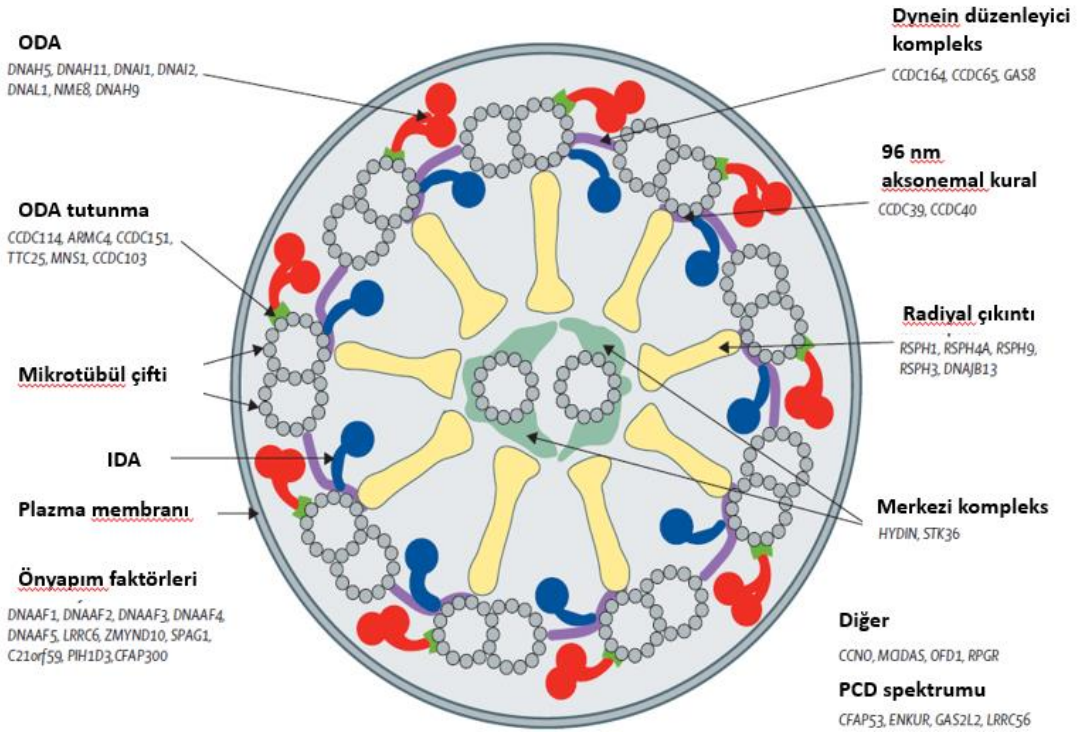
meydana gelen aksonem yapısından oluştuğu gözlenmektedir (Şekil 2.3.1) (19-21). Periferdeki mikrotübül çiftleri A ve B olarak isimlendirilen mikrotübüllerden oluşmaktadır (19-21). A mikrotübülü 13 tübülün protofilamentinin yan yana diziliminden oluşurken, B mikrotübülü ise 10 tübülün protofilamentinden oluşmaktadır (Şekil 2.3.1) (19-21). Silyum hareketleri mikrotübül çiftlerinin dynein kollarının ATPaz aktivitesi ile oluşturulan kayma hareketinden (sliding filaments) kaynaklanmaktadır. (Şekil2.3.1) (19-21). Hareket dynein kolları tarafından başlatılmaktadır. A mikrotübülünün kollarında yer alan silyer dynein, komşu çiftin B mikrotübülü ile geçici çapraz köprüler oluşturmaktadır (19-21) . Bu ATP bağımlı faz nedeniyle rijit haldeki silyum, etkin vuruş (effective stroke) adı verilen hızlı ileri hareket sergilemektedir (19-21). Bu sırada neksin proteinleri ve radyal çıkıntılar tarafından sağlanan pasif elastik bağlantılar silyumun eski pozisyonunu alması için gereken enerjinin birikimini sağlamaktadır. Daha sonra silyum esnek hale gelmekte ve düzelleme vuruşu (recovery stroke) adı verilen ve daha yavaş olan dönüş hareketinde yan tarafa doğru bükülmektedir (19-21). Ardışık sıralardaki silyumlar vuruşlarına her sıra döngüsünde bir sonraki sıradan hafifçe ileride olacak şekilde başlamaktadır (19-21). Böylece epitel boyunca süpüren bir dalga oluşturmaktadır. Silyum hareketi oluşumu sırasında tüm bazal ayaklar bazal cisimcikleri döndürerek aynı etkin vuruş yönüne yönelmektedir. Bu yönelim silyumların metakronal ritim meydana getirmelerine olanak sağlamakta ve bu ritim mukusun epitel yüzeyinde hareket ettirilmesinden ve de tübüler organlarda ya da kanallarda sıvının akışının kolaylaşmasından sorumludur (19-21).



Şekil 2.3.1. Silyum yapıları, çeşitleri ve oluşturan kısımlar (19, 49).

Enine kesitte, TEM ile yüksek çözünürlükte bakıldığında her bir çift mikrotübül, ilişkili bir motor protein olan silyum dyneini içeren 2 adet kol sergilemektedir (Şekil 2.3.1). Dynein kolları A mikrotübülün uzunluğu boyunca 24 nanometre aralıklarla bulunmakta ve komşu çiftin B mikrotübül ile geçici çapraz köprüler kurmak üzere dışa uzanmaktadır. Neksin tarafından oluşturulan pasif elastik bir kısım 96 nanometre

aralıklarla A mikrotübülünü, komşu çiftin B mikrotübülü ile kalıcı olarak bağlamaktadır (19-21). İki merkezi mikrotübül birbirinden ayrıdır fakat silyumun uzunluğu boyunca 14 nanometre aralıklarla bir merkezi kılıf uzantısı ile kısmen çevrelenmiştir (19-21). 9 çiftin her birindeki ortadaki 2 merkezi mikrotübül ile 29 nanometre aralıklarla radial çıkıntılar uzanmaktadır. Radial çıkıntıları oluşturan proteinler ve dıştaki mikrotübül çiftleri arasındaki bağlantılar silyumların yüksek genlikte salınım yapmalarını mümkün kılmaktadır (19-21). Şekil 2.3.2’de silyumun enine kesiti ve yapısındaki proteinlere karşı gelişen mutasyonlar gösterilmiştir (41).



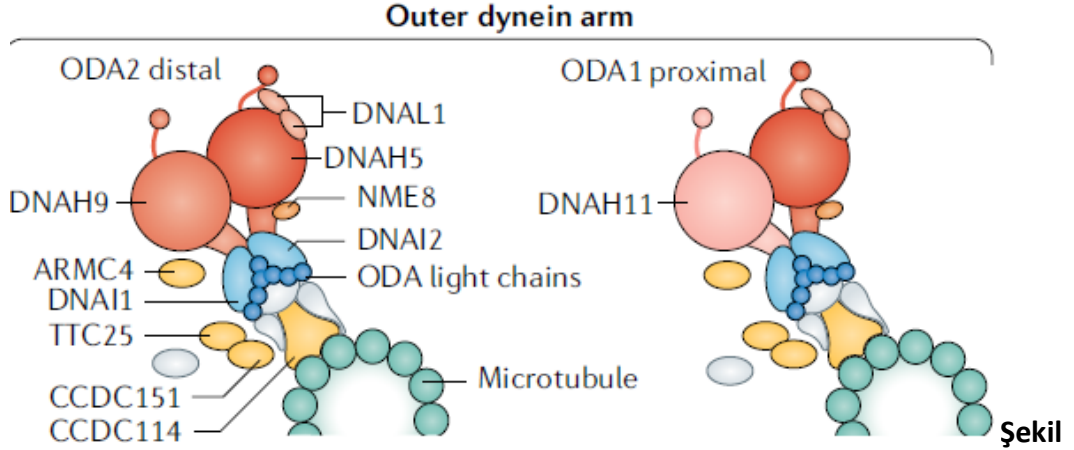
Şekil 2.3.2. Motil silyum proteinlerini etkileyen genlerle ilişkili mutasyonlar (41)

2.3.1. Siliyer Dynein Motor Proteinleri Yapısı

Dynein motor kollarının öncüllerinin sentezi epitel hücre sitoplazmasında yapılır ve intraflagellar transport (IFT) ile silyuma taşınır (22-25). Silyumlar protein sentezi için bir düzeneğe sahip olmadıklarından silyumların parçalarının bir araya gelerek birleşmesi ve büyümesi için gerekli protein iletiminde tek mekanizma IFT’dir.

Silyumun bazalinin yakınına yanaştığı sırada kargo moleküller inaktif sitoplazmik neksin molekülleri de dahil olmak üzere IFT platformuna yüklenmektedir (19, 72, 73). Bu süreçte sitoplazmik dynein aktive edilmekte ve platformu geriye silyumun bazaline getirmek için motor protein olarak kullanılmaktadır (19, 72, 73). IFT kargo proteinleri de dahil olmak üzere bazı proteinler silyogenezis ve ardından fonksiyonel silyumun devamlılığı için önemlidirler. Bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar silyum kaybı ya da silyum fonksiyonunda bozukluk ile sonuçlanmaktadır (19, 72, 73).

Dış dynein kolu (ODA), 2-3 ağır zincir, 2 veya daha fazla orta zincir ve 4-8 hafif zincir kümesi içermektedir (29, 74) (Şekil 2.3.1.1). Çeşitli genler ODA kolunun parçalarını kodlamakta olup defektlerinde PCD hastalığı gözlenmektedir. Örnek olarak; dynein axonemal light chain 1 (DNAL1), dynein axonemal intermediate chain 1 (DNAI1), dynein axonemal intermediate chain 2 (DNAI2), dynein axonemal heavy chain 5, 11 (DNAH5, DNAH11) ve DNAH11, DNAH6'daki mutasyonlarda iç dynein kolunun ağır zincirinde bozukluk oluşmakta siliyer disfonksiyonuna ve heterotaksiye neden olmaktadır (29, 75-79). Loges ve ark. ODA üzerindeki çalışmalarında dynein intermediate chain 2 (DNAI2) geninde/proteindeki mutasyonun PCD ile ilişkili olduğunu saptamıştır. Hastaların nazal sürüntülerinde DNAI2 ekspresyonunun azlığı immünofloresan işaretleme ile gösterilmiştir (78). İnsan solunum epitel hücresi kültürlerinde immünoablota yöntemi ile işaretlenen DNAI2 antikollarının molekül ağırlığı saptanmış ayrıca TEM görüntülerinde ODA defektini destekleyen görüntüler elde etmişlerdir (78). Rim Hjeij ve ark. ODA tutunma kompleksi üzerindeki çalışmalarında, ARMC4 geninde/proteindeki mutasyonun PCD ile ilişkili olduğunu saptamıştır. Hasta nazal sürüntülerinde ARMC4 ekspresyonunun azlığı IF ile boyanmamasıyla gösterilmiştir. TEM görüntülerinde ODA'nın distalindeki DNAH9'ın bulunduğu ama yerinin normal yerinde olmadığı ARMC4 defektini destekleyen görüntüler elde etmişlerdir (80).



2.3.1.1. Dış dynein kolu ve içerdiği proteinler (14)

2.3.2. DNAH5 Proteininin Yapısı Ve Fonksiyonları

DNAH5, alternatif bir birinci ekzon ile 79 ekzon içermektedir. Normal gen ürünü DNAH5, bir 4,624-amino asit proteini olan siliyer dynein aksonemal ağır zincir 5'i kodlamaktadır (13, 81). N-terminal alanı, dış dynein kol kompleksinin gövde alanını oluşturmakta ve diğer ağır, orta ve hafif zincirlerle etkileşime girmektedir. Küresel kafayı oluşturan C-terminal bölgesi, altı korunmuş 6 p-döngü alanı ve korunmuş bir mikrotübül bağlama (MTB) bölgesi içermektedir. İlk p-döngü alanının ATP'yi bağladığı ve hidrolize ettiği bilinmektedir. DNAH5'teki patojenik varyantlar, kusurlu dış dynein kollarına yol açmaktadır (13, 81).

Patojenik varyantları; toplam 42 patojenik varyant alelin yaklaşık %47'sinde beş ekzonda (34, 50, 63, 76 ve 77'de) kümelenmiştir. Patojenik varyantların yüzde on beşi yanlış anlamlıdır ve geri kalanı anlamsız, ek yeri varyantları, eklemeler ve delesyonlardır (13, 81). Ekson 63'te bir patojenik varyant (c.10815delT) Avrupalılarda bulunmuştur ve muhtemelen haplotip analizine dayalı ortak bir kökene sahiptir (13, 81). p.Gln1450Ter varyantı, Amish ve Mennonite topluluklarından PCD'li bireylerde gözlenmiştir (82). Cri du chat sendromu ve PCD'si olan iki bireyde, kromozom 5p delesyonu nedeniyle DNAH5 delesyonu ve kalan alelde bir DNAH5 patojenik varyantı gösterilmiştir (2). Bir kişide, patojenik ek yeri varyantı p.Arg577Thr, erken translasyon sonlandırma sinyallerine neden olduğu tahmin edilen ekson 13'ün çerçeve dışı silinmesine yol açmıştır (81). Bu zamana kadar raporlanmış DNAH5 mutasyonlu

hastalarda, azalmış nazal NO, HSVM'de hareketsiz silyumlar veya rezidüel titreşim hareketi, TEM'de dış dynein kolu defekti, immünofloresan işaretlemede DNAH5 sinyal yokluğu, solunum semptomları, lateralite defektleri saptanmıştır. Hidrosefali ise raporlanmamıştır (14).

2.4. Siliyer Dynein Motor Proteinlerinin Ön-Yapımında Görevli Proteinlerle İlişkisi

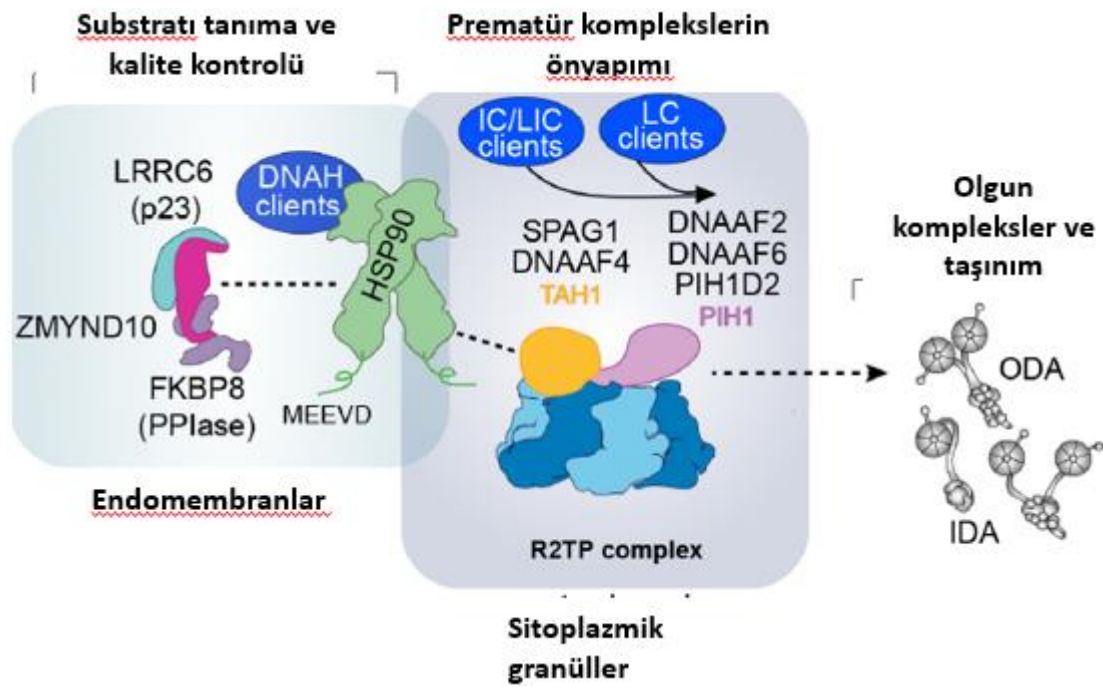
Aksonemal dynein yapım faktörleri olarak bilinen (DNAAF) çok sayıda protein, ODA'nın ön yapımında görev almaktadır (26-28). Dynein yapım faktörlerindeki bozukluk veya mutasyon dynein kollarının ön yapımında defekt oluşturmakta ve PCD oluşumuna sebep olmaktadır (23, 27, 29). Bunlar şaperon kompleksiyle birlikte çalışarak ağır zincirlerin katlanmasına ve orta zincirlerle birleşmesine aracılık etmektedirler (26, 27, 29-31). DNAAF'lardaki defektler iç dynein kolları ve dış dynein kollarında kayıpla sonuçlanmaktadır (26, 27, 29-31). Endoplazma retikulumu (ER) protein sentezi ve katlanması, yapımı, taşınması ile oluşmaya başlayan proteinlerin salgılanmasında görev almaktadır (83). Endoplazma retikulumunun en önemli fonksiyonlarından bir tanesi, şaperonlar ile oluşmaya başlayan proteinlerin kalite kontrolünün yapılmasıdır (84, 85). Şaperonlar diğer proteinlerin katlanma süreçlerini, doğru katlanma yollarını, katlanma için mikroçevre oluşmasını sağlamaktadır (84). Şaperonlar, sentezlenen proteinlerin katlanmasını, yapımını ve ER'ye translokasyonunu sağlamaktadır (85, 86). ER'de proteinler, fonksiyonel oldukları tersiyer ve kuarterner yapılarına getirilip ER lümenine transloke olmaktadır (85). Sonrasında düzgün katlanmış proteinler ER'den çıkmakta ve hücre yüzeyine hücre içi organellere taşınmaktadır. Isı şok proteini 90 (HSP90), aksonemal dynein proteinlerinin translasyon sonrası en az iki farklı düzenleyici modül aracılığıyla olgunlaşmasında merkezi bir molekül olarak ortaya çıkmaktadır (30). DNAAF'ların hem "istemci" dynein zincirleri hem de kurallı şaperonlar ile etkileşimlerinin proteomik tanımlanmasına dayanılarak silyuma özgü yardımcı şaperonlar olarak hareket ettiği düşünülmektedir (26, 30). Bilinen yapım faktörlerinden KTU/DNAAF2 ve DYX1C1/DNAAF4, HSP90 ve ısı şok proteini 70 (HSP70) şaperonlarının yanı sıra ODA ara zincir DNAI2 (IC2) en doğrudan biyokimyasal bağlantılara sahiptir. Bunlara

ek olarak, KTU/DNAAF2, PIH1D3/DNAAF6 ve SPAG1, sırasıyla R2TP-HSP90 şaperon kompleksi, PIH1 ve TAH1'in katalitik olmayan alt yapılarla yapısal alanları paylaşmaktadır (30, 87). R2TP çok alt birimli enzimlerin montajı sırasında özgülük kazandıran HSP90 yardımcı şaperonudur. DDX11/DNAAF4 ve LRRC6'nın her biri CS veya p23 benzeri bir alana sahiptir (30, 36, 87). p23, HSP90 şaperon döngüsünün son adımları boyunca iyi karakterize edilmiş bir HSP90 yardımcı şaperonudur. LRRC6, DNAAF1/LRRC50 ve C21ORF59/Kurly/CFAP298 arasındaki etkileşimlerde yakın zamanda rapor edilmiştir (36). LRRC6 mutant farelerin fenotipik analizi geç etkili bir komplekste, birlikte bu montaj faktörlerinin işlev görebileceğini düşündürmektedir. DNAAF5/HEATR2 ve DNAAF3'ün işlevleri ve şaperonlarla bağlantıları rapor edilmemiştir(36). Mevcut görüş, birçok DNAAF'ın HSP90 yardımcı şaperonlarına; sonunda silyumlara taşınmadan önce dynein motorlarının makromoleküler montajı sırasında geçici olarak katıldığı yönündedir (36).

2.4.1. ZMYND10 Silyum Ön Yapım Proteininin Yapısı ve Fonksiyonları

DNAAF ailesinden olan zinc finger MYND10 (ZMYND10), myeloid, gergin ve DEAF-1(MYND) tip zinc finger domaini içeren ve C-terminus bölgesi protein ön yapımında rol alan, silyumlu hücrelerde silyumsuz hücrelere kıyasla daha çok bulunan bir proteindir (29, 33). Gen yapısı; ZMYND10 12 ekzon içermektedir. ZMYND10, 440 amino asidi kodlayan sitoplazmik bir proteindir ve C-terminal MYND zinc finger domaini içermektedir. ZMYND10 silyumlu olmayan hücrelere kıyasla silyumlu hücrelerde fazlasıyla zengin olarak bulunmaktadır (29). ZMYND10, LRRC6 ile etkileşmektedir. ZMYND10, IDA, ODA ve siliyer yapı elementlerinin ön yapımında görevlidir (13, 32). ZMYND10'da bulunan patolojik varyantlar; hatalı anlamlı ve bir büyük delesyon dahil olmak üzere on üç farklı patojenik alel rapor edilmiştir (13, 88). Bialelik yanlış anlam varyantları c.47T>G (p.Val16Gly) olan bireylerde dynein kollarının kısmi tutulması ile silyum hareketliliğinin kısmi tutulması gösterilmiştir. ZMYND10'daki patojenik varyantlar, dış + iç dynein kolu kusurlarına ve statik silyumlara yol açmaktadır (13, 88).

Literatürde ZMYND10 ve PCD ilişkisi sınırlı sayıda çalışılmıştır. Farelerde yapılan araştırmada, ZMYND10 mutasyonuna eşlik eden ODA proteinlerinin (DNAI1 ve DNAI2) düşük ekspresyonları saptanmış ve ZMYND10'un bu proteinlerin stabilizasyonunu ve yapımını düzenlediği düşünülmüştür (29). Ayrıca DNAI1 ve DNAI2'deki ekspresyon azalmasının DNAH5 protein ekspresyonundaki azalma ile de korelasyonu bildirilmiştir (29). Hayvan modeli ile oluşturulan çalışmalarda DNAAF ZMYND10 şaperon yardımcısı FKBP8 ve şaperon HSP90 ile aksonemal dynein ağır zincirlerinin olgunlaşmasındaki ön yapım yolağında önemli bir adıma aracılık etmektedir. ZMYND10 ifadesi baskılanan farelerde ODA ağır zincir (DNAH5, DNAH9) ve orta zincir (DNAI1 ve DNAI2) proteinlerinin azalmış seviyeleri gözlenmiştir (36, 89, 90). Çalışmalarda ZMYND10'un HSP70 şaperon ailesinden moleküler şaperon olan ısı şok cognate proteini 70 (HSC70) ile etkileşime girdiği ve birlikte dynein kollarının yapımı ve katlanmasında rol oynadığı gözlenmiştir (36, 91). ZMYND10-FKBP8-HSP90 kompleksi dynein ön yapımında FKBP8'in iç zarlara ağır zincir katlanmasını sağlayarak fonksiyon görmektedir. Ön yapımın erken aşamalarında, aksonemal dynein ağır zincirleri ayrıca ZMYND10'un FKBP8 ile olan ilişkisi aracılığıyla ER'nin sitozolik yüzüne lokalize olabilmektedir (36). Ağır zincirler daha sonra ZMYND10'dan bağımsız adımda IC1 / 2 kompleksi gibi diğer alt birimlerle kararlı ilişkilere izin vermek için R2TP kompleksi gibi şaperon kompleksine devredilmektedir (Şekil 2.4.1.1) (36).



Şekil 2.4.1.1. ZMYND10'un ODA ve IDA ön yapımında etkileşimleri (36)

Raidt ve arkadaşlarının PCD'nin genetik varyantlarını içeren çalışmasında ZMYND10 defekti olan hastaların bir kısmında ODA/IDA komplekslerinin defekti ile HSVM'de (High speed video microscopy) immotil silya görülmüştür (50). Kurkowiak ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada, randomize olarak genetik tanı almamış ancak klinik tanısı olan hastalarda ZMYND10 defektinin ODA/IDA ile korele olduğunu sınırlı sayıda hastada immünofloresan işaretleme yöntemi ile saptamıştır (32). Cho ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada, ZMYND10 mutasyonunun farelerde aksonem ODA ve IDA defektlerine sebep olduğu ve siliyer hareketin kaybına sebep olduğunu saptamıştır (29). Bu zamana kadar raporlanmış ZMYND10 mutasyonlu hastalarda, azalmış nazal NO, HSVM'de hareketsiz silyumlar, TEM'de dış dynein kolu defekti, immünofloresan işaretlemede DNAH5 + DNAL1 sinyal yokluğu, solunum semptomları, lateralite defektleri saptanmıştır. Hidrosefali ise raporlanmamıştır (14).

2.4.2. GRP78 Şaperon Proteinin Yapısı ve Fonksiyonları

Glikozla Düzenlenmiş Protein 78 (GRP78) veya ağır immüoglobulin zincir bağlayıcı protein (BiP), ısı şok protein 70 (HSP70) ailesinin bir üyesidir. Tüm ökaryotlarda endoplazma retikulum (ER) hücre zarında bulunmaktadır (92, 93). İnsanda GRP78 kodlamasından sorumlu 4532 nükleotid uzunluğundaki gen 9 numaralı kromozom üzerindedir. 654 amino asitli protein GRP78, katlanma ve montajı düzeltir ve/veya yanlış katlanmış protein alt birimleri veya proteinlerin taşınmasını önlemektedir (93, 94). GRP78 ifadesi, protein glikozilasyon sürecinin engellenmesi veya hücreler arası kalsiyum depolamasının bozulması, hücrenin şekerden kısıtlanması gibi ER stresörleri durumlarında artmaktadır (93, 95). Suda çözünür proteindir ve sadece küçük parçaların hidrofobik olduğu rapor edilmiştir. Bu hidrofobik yamalar bozulmaya yönelik katlanmamış proteinlerin tanınması ve yeniden katlama mekanizmaları için gereklidir (96). GRP78 yapısı iki alana ayrılmıştır; amino terminalinde ATP bağlama alanı (ABD) (veya nükleotid bağlama alanı NBD) ve karboksil terminalinde substrat bağlanma alanı (SBD) (93).

GRP78 moleküler bir şaperon olarak çalışmaktadır. Yanlış katlanmış proteinlere ve birleştirilmemiş komplekslere bağlanır ve katlanmamış protein cevabı (UPR) düzenlemesinden sorumlu ER ile ilişkili yıkılmayı (ERAD) başlatmaktadır (97). SBD ile katlanmamış peptitlere bağlanmakta ve (NBD) içindeki ATP hidrolizi vasıtasıyla agregasyonu önlemek için enerjiyi almaktadır (86). Hücredeki dengenin (homeostaz) standart koşullarında GRP78, aktif olmayan bir biçimde UPR transmembran stres sensörleri olan aktivasyon transkripsiyon faktörü 6'ya (ATF6), protein kinaz RNA benzeri endoplazma retikulum kinaz (PERK) ve inositol gerektiren enzim 1'e (IRE1) bağlıdır (97). Hücre, ER'de biriken katlanmamış proteinlere maruz kaldığında bu stres, GRP78 UPR sensörlerinden serbest bırakıldığında ortaya çıkabilmektedir. UPR'nin aktif formu daha sonra proteinin translasyonu ve doğru katlanmayı arttırmaktadır (93). GRP78 ER dışında da bulunur ve çok yönlü hücresel aktivitelerde de rol almaktadır. Ayrıca, ortaya çıkan kanıtlar gösteriyor ki ER stresinin GRP78'i ER'den ayrılmaya teşvik ettiği çekirdek ve mitokondriyon gibi hücre içi organellere lokalize olarak hücre sinyalinin düzenlemede ve hayatta kalmaya yardımcı olduğu gösterilmiştir

(98). GRP78'in embriyo gelişiminde anti apoptotik, hücre canlılığında ve yaşlanmada rolleri bulunmaktadır (86, 93).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul İzin Süreci

“Primer Siliyer Diskinezi (PCD) hastalarında dış dynein kolu (ODA) defektleri ile silyum ön yapım proteinlerinin ilişkisinin histolojik olarak araştırılması” başlıklı tez çalışması 20.10.2020 tarihinde, 2020/17 numaralı toplantıda 16969557-1448 sayı ve GO 20/989 kayıt numarası ile Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntem başlıklarındaki değerlendirilme sonucu etik açıdan uygun bulunmuştur.

3.2. Hasta Grupları ve Kontrol Bireylerin Belirlenmesi ve Örneklerin Elde Edilmesi

Bu araştırmaya, Türkiye coğrafyasında genetik olarak PCD ön tanısı (ODA defekti) almış bireyler dahil edildi. Yaşları 6-23 olan (toplam n=18 (n=7 erkek; n=11 kız)) kliniğe belirgin kronik burun akıntısı, tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonu, kronik öksürük, bronşiektazi, orta kulak enfeksiyonu ile gelen hastaların fizik muayenesi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Bölümü’nde yapıldı. Aydınlatılmış onamları ve nazal sürüntü örnekleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Bölümü’nde alındı. Hastaların anamnez, fizik muayene, HSV ve genetik bulguları Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Bölümü’nden alındı. Gözlemsel tanımlayıcı araştırma kapsamında ayrıca kontrol grubu olmak üzere normal silyum yapısına sahip 3 bireyden de onam ile nazal sürüntü örnekleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında nazal sürüntü çubuğu dik açı ile nazofarinkse ilerletilip 10 saniye boyunca çevrilerek alındı. Hasta ve kontrol grubu bireylerden alınan nazal sürüntü örnekleri, RPMI medium içeren 15 ml’lik santrifüj tüpü içine nazal sürüntü fırçasının başı koparılarak alındı ve HÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda çalışıldı.

3.2.1. Araştırmaya Dahil Edilen Hastalar

Çalışmaya katılması planlanan 18 hastadan Covid-19 salgını nedeniyle Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran PCD ön tanısı (ODA defekti) olan 8 hasta dahil edildi.

3.3. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Kullanımdan önce tüm solüsyonlar oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi.

3.3.1. Dilüsyon Tamponu Hazırlanması

8.58 gram PBS tuzu 1000 ml distile suyun içinde çözdürüldü. 10 ml 10X Dilüsyon tampon solüsyonuna 90 ml distile su eklenerek 1X PBS dilüsyon tampon solüsyonu elde edildi.

3.3.2. %4'lük Paraformaldehit Hazırlanması

800 mL 1X PBS içine 40 g Paraformaldehit tozu eklendi. Karışım çeker ocakta 60°C'de kaynatmadan karıştırıldı. PFA tozu anında çözünmediği için, berrak bir çözelti oluşana kadar damla damla 5N NaOH eklenildi. Küçük çözünmemiş parçacıklar olabileceğinden çözeltiyi oda sıcaklığına soğutup ve partiküller uzaklaştırmak için süzüldü. 1X PBS ile hacim 1L'ye çıkartıldı. 50 µl Triton X-100 (T8787, SIGMA, AMERİKA) 10 ml distile suya konularak %0,5 Triton X-100 elde edildi ve karışıma eklendi. Karışımın pH'ı 7 ye HCl ve NaOH eklenerek ayarlandı.

3.3.3 Triton-X Hazırlanması

50 µl Triton X-100 (T8787, SIGMA, AMERİKA) 10 ml PBS içine konularak %0,5'lik Triton X-100 elde edildi. 20 µl Triton X-100 (T8787, SIGMA, AMERİKA) 10 ml PBS içine konularak %0,2'lik TritonX-100 elde edildi.

3.3.4 Blokaj için %1'lik Süt Tozu Hazırlanması

0,5 gram süt tozu (70166, SIGMA, AMERİKA) hassas tartıda tartıldı 50 ml 1xPBS içinde hazırlandı ve %1'lik süt tozu elde edildi.

3.3.5. DAPI Hazırlanması

50 mg DAPI (D9542, SIGMA, AMERİKA) hassas tartıda tartıldı ve 10 ml distile su içerisinde çözüldü.

3.4. Hasta ve kontrol grubundan alınan örneklerin lamlara yayılması

İmmünohistokimya için RPMI medium (R0883, SIGMA, AMERİKA) içeren tüpün içindeki nazal sürüntü çubuğu, tüpün içine 40 kere daldırıldı ve örnek alınan kişinin isim soyisim kısaltması ve yayma tarihi yazılan 50 adet lama nazal sürüntü çubuğu ile yayma yapıldı, bir gün kurumaya bırakıldı ve lamlar uygun koşullarda muhafaza edildi.

3.5. Hasta ve Kontrol Grubundan Alınan Örneklerde DNAH5 ve β Tübülün Çift İmmünofloresan İşaretleme

Toplam 11 bireyden 11 adet lam -20 °C'den sabah çıkartılarak 2 saat oda ısısında bırakıldı. Oda ısısına alınan lamların her birine kalıcı kalemle; kod, antikor ismi ve tarih yazıldı. Yumuşak mendil distile su (Milipor) ile köşesinden ıslatılarak, önce lamların arkaları temizlendi. Sonra kenar ve köşeleri lam üzerindeki hasta nazal sürüntü örnekleri çok küçültmemeye dikkat ederek iyice temizlendi. Lam üzerindeki hasta nazal sürüntü örnekleri, likit bloker (dakopen) (Z377821, SIGMA, AMERİKA) ile silinen yerler çizilerek çerçevelendi. Siyah kapağı kapanınca ışık geçirmeyen Humidity chamber'ın içine 6 adet iyi ıslatılmış havlu peçete yayıldı. Her sıraya horizontal olarak 5 lam konuldu. Lamlar PBS (P5368, SIGMA, AMERİKA) ile 5 dakika yıkandı atık lamlardan chamber eğilerek sağ kenara doğru biriktirildi ve sağ kenarda biriken atık dışarı atıldı. Hazırlanan 4% PFA ile 15 dakika her bir lam inkübe edildi. PFA atığı toksik olduğundan atığa atıldı. PBS ile 2x1 dakika yıkandı. Lamlar 10 dk %0,2'lik Triton X-100 (T8787, SIGMA, AMERİKA) ile inkübe edildi. PBS ile 2 defa kısa süreli yıkama (5 dakika) ve 2 defa da uzun süreli yıkama (10 dakika) yapıldı. Likit blokeri silinen lamlarda tekrar çerçeveleme yapıldı. Lamlar blokaj için hazırlanan %1'lik süt tozu (70166, SIGMA, AMERİKA) ile +4 C' de bir gece inkübe edildi.

Ertesi gün blokaj solüsyonu olan lamalar yıkanmadan solüsyon döküldü. Her lam üzerindeki örnekte 300 µl primer antikor içeren solüsyon olması sağlandı. Literatürde kullanılan 1:500 dilüsyonunda DNAH5 (HPA037470, SIGMA, AMERİKA) ve β tübülün (T8328, SIGMA, AMERİKA) antikorları ile 1 gün oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS ile 3 kısa yıkama (1 dakika) ve 2 uzun yıkama (10 dakika) yapıldı. Sekonder antikor işaretlenmesi için her lama 200 µl yeşil floresan veren 1:1000 dilüsyonda Alexa fluor 488 (ab150113, ABCAM, BİRLEŞİK KRALLIK) ve kırmızı floresan veren Alexa fluor 594 (A32740, THERMO, AMERİKA) sekonder antikorları konuldu. 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Hazırlanan DAPI (D9542, SIGMA, AMERİKA) çekirdek boyası ile 10 dakika inkübe edildi. PBS (P5368, SIGMA, AMERİKA) ile 1 kısa (1 dakika), 2 uzun (2x 10 dakika) yıkandı. Örnekleri havlu kâğıda yayıldı, arkaları ve kenarları dikkatlice kurutuldu. Kalan fazla PBS emdirildi. Her lam için 3 damla Dako Mounting medium (Kapatma mediumu) (ab104135, ABCAM, BİRLEŞİK KRALLIK) damlatıldı. Lamel ile hava kalmayacak şekilde lamalar kapatıldı. Lamalar kapatıldıktan sonra, ışıktan koruyarak kuru bir kutuda ağzı kapalı horizontal olarak kurutmaya bırakıldı. Örneklerin en az 2 gün kuruması için beklenip lamaların immünofloresan analizi Leica DM6B mikroskopta LasX programı ile yapıldı.

3.6. Hasta ve Kontrol Grubundan Alınan Örneklerde ZMYND10 ve RSPH9

Antikorların Çift İmmünofloresan İşaretlemesi

Toplam 11 bireyden 11 adet lam -20 °C'den sabah çıkartılarak 2 saat oda ısısında bırakıldı. Oda ısısına alınan lamaların her birine kalıcı kalemle; kod, antikor ismi ve tarih yazıldı. Yumuşak mendil distile su (Milipor) ile köşesinden ıslatılarak, önce lamaların arkaları temizlendi. Sonra kenar ve köşeleri lam üzerindeki hasta nazal sürüntü örnekleri çok küçültmemeye dikkat ederek iyice temizlendi. Lam üzerindeki hasta nazal sürüntü örnekleri, likit bloker (dakopen) (Z377821, SIGMA, AMERİKA) ile silinen yerler çizilerek çerçevesi çizildi. Siyah kapağı kapanınca ışık geçirmeyen Humidity chamber'ın içine 6 adet iyi ıslatılmış havlu peçete yayıldı. Her sıraya horizontal olarak 5 lam konuldu. Lamalar PBS (P5368, SIGMA, AMERİKA) ile 5 dakika yıkandı atık lamlardan chamber eğilerek sağ kenara doğru biriktirildi ve sağ kenarda biriken atık

dışarı atıldı. Hazırlanan 4% PFA ile 15 dakika her bir lam inkübe edildi. PFA atığı toksik olduğundan atığa atıldı. PBS ile 2x1 dakika yıkandı. Lamlar 10 dk %0,2'lik Triton X-100 (T8787, SIGMA, AMERİKA) ile inkübe edildi. PBS ile 2 defa kısa süreli yıkama (5 dakika) ve 2 defa da uzun süreli yıkama (10 dakika) yapıldı. Likit blokeri silinen lamlarda tekrar çerçeveleme yapıldı. Lamlar blokaj için hazırlanan %1'lik süt tozu (70166, SIGMA, AMERİKA) ile +4 C°'de bir gece inkübe edildi.

Ertesi gün blokaj solüsyonu olan lamlar yıkanmadan solüsyon döküldü. Her lam üzerindeki örnekte 300µl primer antikör içeren solüsyon olması sağlandı. Literatürde kullanılan 1:500 dilüsyonunda RSPH9 (HPA031703, SIGMA, AMERİKA) ve 1:250 dilüsyonunda ZMYND10 (sc-398350, SANTACRUZ, AMERİKA) antikörleri ile 1 gün oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS ile 3 kısa yıkama (1 dakika) ve 2 uzun yıkama (10 dakika) yapıldı. Sekonder antikör işaretlenmesi için her lama 200 µl yeşil floresan veren 1:1000 dilüsyonda Alexa fluor 488 (ab150113, ABCAM, BİRLEŞİK KRALLIK) ve kırmızı floresan veren Alexa fluor 594 (A32740, THERMO, AMERİKA) sekonder antikörleri konuldu. 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Hazırlanan DAPI (D9542, SIGMA, AMERİKA) çekirdek boyası ile 10 dakika inkübe edildi. PBS (P5368, SIGMA, AMERİKA) ile 1 kısa (1 dakika), 2 uzun (2x 10 dakika) yıkandı. Örnekleri havlu kâğıda yayıldı, arkaları ve kenarları dikkatlice kurutuldu. Kalan fazla PBS emdirildi. Her lam için 3 damla Dako Mounting medium (Kapatma mediumu) (ab104135, ABCAM, BİRLEŞİK KRALLIK) damlatıldı. Lamel ile hava kalmayacak şekilde lamlar kapatıldı. Lamlar kapatıldıktan sonra, ışıktan koruyarak kuru bir kutuda ağzı kapalı horizontal olarak kurutmaya bırakıldı. Örneklerin en az 2 gün kuruması için beklenip lamların immünofloresan analizi Leica DM6B mikroskopta LasX programı ile yapıldı.

3.7. Hasta ve Kontrol Grubundan Alınan Örneklerde GRP78 ve RSPH9 Antikörlerinin Çift İmmünofloresan İşaretlemesi

Toplam 11 bireyden 11 adet lam -20 °C'den sabah çıkartılarak 2 saat oda ısısında bırakıldı. Oda ısısına alınan lamların her birine kalıcı kalemle; kod, antikör ismi ve tarih yazıldı. Yumuşak mendil distile su (Milipor) ile köşesinden ıslatılarak, önce

lamların arkaları temizlendi. Sonra kenar ve köşeleri lam üzerindeki hasta nazal sürüntü örnekleri çok küçültmemeye dikkat ederek iyice temizlendi. Lam üzerindeki hasta nazal sürüntü örnekleri, likit bloker (dakopen) (Z377821, SIGMA, AMERİKA) ile silinen yerler çizilerek çerçevelendi. Siyah kapağı kapanınca ışık geçirmeyen Humidity chamber'ın içine 6 adet iyi ıslatılmış havlu peçete yayıldı. Her sıraya horizontal olarak 5 lam konuldu. Lamlar PBS (P5368, SIGMA, AMERİKA) ile 5 dakika yıkandı atık lamlardan chamber eğilerek sağ kenara doğru biriktirildi ve sağ kenarda biriken atık dışarı atıldı. Hazırlanan 4% PFA ile 15 dakika her bir lam inkübe edildi. PFA atığı toksik olduğundan atığa atıldı. PBS ile 2x1 dakika yıkandı. Lamlar 10 dk %0,2'lik Triton X-100 (T8787, SIGMA, AMERİKA) ile inkübe edildi. PBS ile 2 defa kısa süreli yıkama (5 dakika) ve 2 defa da uzun süreli yıkama (10 dakika) yapıldı. Likit blokeri silinen lamlarda tekrar çerçeveleme yapıldı. Lamlar blokaj için hazırlanan %1'lik süt tozu (70166, SIGMA, AMERİKA) ile +4 C°'de bir gece inkübe edildi.

Ertesi gün blokaj solüsyonu olan lamlar yıkanmadan solüsyon döküldü. Her lam üzerindeki örnekte 300µl primer antikor içeren solüsyon olması sağlandı. Literatürde kullanılan 1:500 dilüsyonunda RSPH9 (HPA031703, SIGMA, AMERİKA) ve 1:200 dilüsyonunda GRP78 (ab212054, ABCAM, BİRLEŞİK KRALLIK) antikorları ile 1 gün oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS ile 3 kısa yıkama (1 dakika) ve 2 uzun yıkama (10 dakika) yapıldı. Sekonder antikor işaretlenmesi için her lama 200 µl yeşil floresan veren 1:1000 dilüsyonda Alexa fluor 488 (ab150113, ABCAM, BİRLEŞİK KRALLIK) ve kırmızı floresan veren Alexa fluor 594 (A32740, THERMO, AMERİKA) sekonder antikorları konuldu. 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Hazırlanan DAPI (D9542, SIGMA, AMERİKA) çekirdek boyası ile 10 dakika inkübe edildi. PBS (P5368, SIGMA, AMERİKA) ile 1 kısa (1 dakika), 2 uzun (2x 10 dakika) yıkandı. Örnekleri havlu kâğıda yayıldı, arkaları ve kenarları dikkatlice kurutuldu. Kalan fazla PBS emdirildi. Her lam için 3 damla Dako Mounting medium (Kapatma mediumu) (ab104135, ABCAM, BİRLEŞİK KRALLIK) damlatıldı. Lamel ile hava kalmayacak şekilde lamlar kapatıldı. Lamlar kapatıldıktan sonra, ışıktan koruyarak kuru bir kutuda ağzı kapalı horizontal olarak kurutmaya bırakıldı. Örneklerin en az 2

gün kuruması için beklenip lamaların immüno Floresan analizi Leica DM6B mikroskopta LasX programı ile yapıldı.

3.8. Düzeltilmiş Toplam Floresan Yoğunluğu (CTCF) Analizi

Her hasta ve kontrol bireyden en az 3 fotoğraftan floresan ölçümleri yapılmıştır. Çıkan değerler toplam hücre floresan (CTCF) formülüne göre ölçümler hesaplanmıştır. Sonra her fotoğraftan elde edilen ölçümlerin ortalaması alınarak Graphpad Prism programında ortalamalara göre istatistiksel olarak anlamlılık bakılmıştır.

Düzeltilmiş toplam floresan yoğunluğu (CTCF) = Integrated Density (Hepsi seçilerek elde edilen IntDen değeri) – (Area of selected cell (Hepsi seçilerek elde edilen Area değeri) X Mean fluorescence of background readings (Oval seçilerek elde edilen Mean değeri)

Bu formül kullanılarak kontrol ve hasta örneklerine ait IF işaretlemeler analiz edilmiştir.

3.9. İstatistiksel Analiz

Örneklem hesabı G-Power (v. 3.1.9.7) yazılımı kullanılarak yapıldı. Çalışma için ihtiyaç duyulan örneklem genişliği parametrik testlere göre hesaplandı. Gruplardan elde edilen ekspresyon düzeylerinin değişkenliğinin 0.5 birim olduğu ve örneklerden elde edilen ekspresyon düzeylerinin zaman içindeki değişiminin istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığının parametrik yöntemler ile inceleneceği öngörülerek güç analizi yapıldı ve örneklem genişliği belirlendi. Bu öngörüler altında 1 birimlik bir etki genişliğinin %95 güç ile anlamlı bir farklılık olarak tespit edilebilmesi için deney grubuna 18 kişinin dahil edilmesine karar verildi. Fakat hastalardan 8 tanesine ulaşılabildiği için çalışma %36 güç ile tamamlanmıştır.

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 8 programı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu analitik yöntemlerle (Shapiro-Wilk testi) incelendi. İkili karşılaştırmalar Mann-Whitney U, çoklu karşılaştırmalar Kruskal-Wallis testi ve posthoc Dunn testi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık için toplam tip-1

hata düzeyi %5 olarak kullanıldı. Tanımlayıcı istatistiksel veriler ortanca ve çeyrekler arası aralık değerleri kullanılarak sunulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Hastaların ve Kontrol Bireylerin Demografik Özellikleri

Bu araştırmaya, Türkiye coğrafyasında genetik olarak PCD ön tanısı (ODA defekti) almış bireyler dahil edildi. Yaşları 6-23 olan (toplam n=18 (n=7 erkek; n=11 kız)) kliniğe belirgin kronik burun akıntısı, tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonu, kronik öksürük, bronşiektazi, orta kulak enfeksiyonu ile gelen hastaların genel muayenesi ve fizik muayenesi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Bölümü'nde yapıldı. Hastalardan 8 tanesi araştırmaya katılmak için gönüllü oldu. Kontrol bireyler sigara içmemiş, bilinen bir solunum yolu enfeksiyonu ve hastalığı olmayan ve covid-19 enfeksiyonu geçirmemiş 3 kişiden (n=2 erkek; n=1 kız) seçildi.

8 hastadan en küçüğü 14 en büyüğü 22 yaşında olmak üzere 6 kız 2 erkek hasta birey çalışmaya katıldı. Kontrol bireyler olarak 26 yaşında bir kız ve 28 ve 31 yaşlarında erkek birey dahil edildi (Tablo 4.1.1).

Tablo 4.1.1. Hastaların ve Kontrol Bireylerin Demografik Özellikleri

Hastalar	Cinsiyet	Yaş
Hasta 1	E	21
Hasta 2	K	17 y 8 ay
Hasta 3	K	22
Hasta 4	K	18 y 5 ay
Hasta 5	K	19 y 11 ay
Hasta 6	K	16 y 10 ay
Hasta 7	K	16 y 3 ay
Hasta 8	E	14 y 2 ay
Kontroller	Cinsiyet	Yaş
Kontrol 1	K	26 y
Kontrol 2	E	28 y
Kontrol 3	E	31 y

4.2. Hastaların Fizik Muayene ve HSVM Bulguları

8 hastadan hepsi aynı mutasyona sahipken farklı semptomları vardı. Hasta 8 de diğer hastalardan farklı olarak bronşiektazi yokluğu ve işitme kaybı vardı. Hasta 3,

4 ve 5'te situs inversus vardı. Akraba çocukları ise hasta 2, 3, 4, 5'tü. Yüksek hızlı video mikroskopi bulgularında ise çoğu hastada hipokinetik silya mevcuttu. Fakat hasta 2 de hareketli silya ve hasta 7 ve hasta 8 de stiff modele (katlanmayan titreşen silya) sahip silya görünmekteydi. Bu bulgular aynı mutasyona sahip olmalarına rağmen farklı semptom ve bulgulara sahip olabileceklerini ve bunun da varyantların farklı olup başka etmenlerin olabileceğini göstermektedir (Tablo 4.2.1).

Tablo 4.2.1. Hastaların Fizik Muayene ve HSVM Bulguları

Hasta Kısa Adları	Cinsiyet	Yaş	Semptomlar	Bronşektazi	Situs Inversus	Akrabalık	HSVM
Hasta 1	E	21	Rinit, Sinüzit	Pozitif	Negatif	Negatif	Hipokinetik silyumlar
Hasta 2	K	17 y 8 ay	Rekürren akciğer enfeksiyonu, Rinit, Rekürren sinüzit, Düşük nazal NO,	Pozitif	Negatif	Pozitif	Çok sayıda rezidüel hareketli silya görüldü
Hasta 3	K	22	Rekürren akciğer enfeksiyonu, Düşük nazal NO, sinüzit	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Hipokinetik silyumlar
Hasta 4	K	18 y 5 ay	Rekürren akciğer enfeksiyonu	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Hipokinetik silyumlar
Hasta 5	K	19 y 11 ay	Rekürren akciğer enfeksiyonu, Düşük nazal NO, sinüzit, işitme defekti	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Hipokinetik silyumlar
Hasta 6	E	16 y 10 ay	Rekürren akciğer enfeksiyonu, Düşük nazal NO	Pozitif	Negatif	Negatif	Hipokinetik silyumlar ve stiff model
Hasta 7	K	16 y 3 ay	Rekürren akciğer enfeksiyonu, Düşük nazal NO, sinüzit	Pozitif	Negatif	Negatif	Hipokinetik silyumlar
Hasta 8	E	14 y 2 ay	Rinit, işitme defekti, Düşük nazal NO	Negatif	Negatif	Pozitif	Stiff model

4.3. Hastaların Genetik Özellikleri

8 hastada aynı gende DNAH5 geninde mutasyona sahipti. Fakat farklı tipte ve zigosite gösteren protein ve kodlandıkları yerlerin farklı olması fenotiplerinin farklı olmasına sebep olabileceğini düşündürmektedir (Tablo 4.3.1).

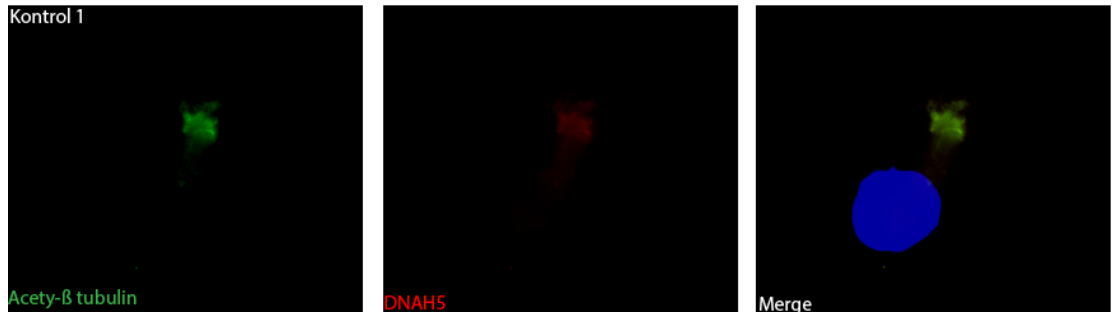
Tablo 4.3.1. Hastaların genetik özellikleri

Hastalar	Cinsiyet	Yaş	Gen	Mutasyon: Kodlama (HGVS isimlendirmesi c.)	Mutasyon: Protein (HGVS isimlendirmesi p.)	Tip	Zigosite
Hasta 1	E	21	DNAH5	c.11740G>A	p.Glu3914Lys	Missense	Comp. Het.
Hasta 2	K	17 y 8 ay	DNAH5	c.13486C>T	p.Arg4496Ter	Nonsense	Hom
Hasta 3	K	22	DNAH5	c.7615T>C	p.Trp2539Arg	Missense	Hom
Hasta 4	K	18 y 5 ay	DNAH5	c.8897C>T	p.Thr2966Met	Missense	Hom
Hasta 5	K	19 y 11 ay	DNAH5	c.5747G>A	p.W1916*	Nonsense	Het
Hasta 6	E	16 y 10 ay	DNAH5	c.2710G>T	p.Glu904Ter	Nonsense	Hom
Hasta 7	K	16 y 3 ay	DNAH5	c.2368G>C	p.Ala790Pro	Missense	Hom
Hasta 8	E	14 y 2 ay	DNAH5	c.9502C>T	p.R3168*	Nonsense	Hom

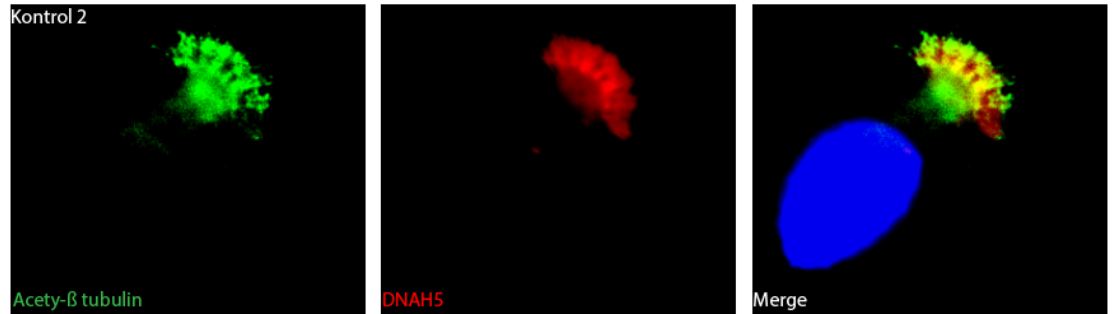
4.4. Hasta ve kontrol grubundan alınan örneklerde DNAH5 ve β Tübülün Çift İmmünofloresan İşaretlenmesi

Kontrol ve hasta bireylere ait örnekler uygun immünofloresan teknikle boyandı. Bu sayede hücre sitoplazmik yapısı, çekirdeği ve silyumu bütün olarak gözlendi. Çekirdekler DAPI ile maviye, silyum aksonem yapısında silyum boyunca boyanan asetile beta tübülün yeşile ve dış dynein kolunda bulunan normalde silyum boyunca ifadelenen DNAH5 proteini ise kırmızıyla ifadelendi. Kontrol 1 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise asetile beta tübülün ile yeşil ifade gözlendi. DNAH5 proteini ise silyum boyunca proksimalden distale doğru kırmızı ifadelendi. Birleşmiş mikrografta asetile beta tübülün işaretlenmesi ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlendi (Şekil 4.4.1). Kontrol 2 bireye ait örnekte de çekirdek

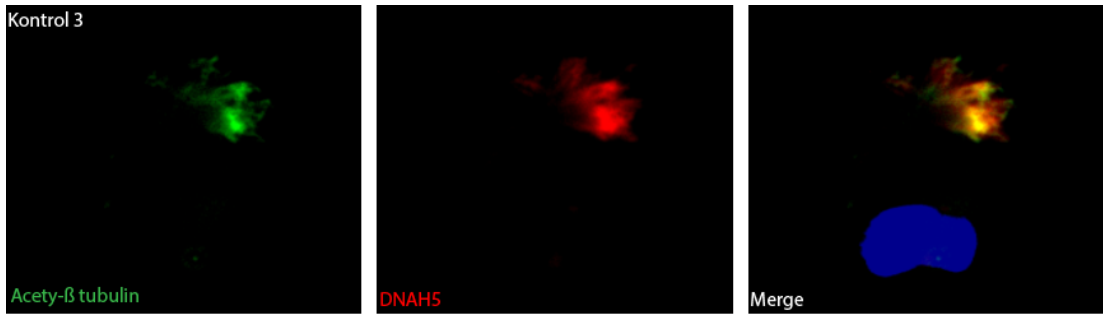
DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise asetile beta tübülün ile yeşil gözlemlendi. DNAH5 proteini ise silyum boyunca proksimalden distale doğru kırmızı ifadelendi. Birleşmiş mikrografta asetile beta tübülün işaretlenmesi ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlemlendi (Şekil 4.4.2). Kontrol 3 bireye ait örnekte de çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise asetile beta tübülün ile yeşil gözlemlendi. DNAH5 proteini ise silyum boyunca proksimalden distale doğru kırmızı ifadelendi. Birleşmiş mikrografta asetile beta tübülün işaretlenmesi ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlemlendi (Şekil 4.4.3).



Şekil 4.4.1. Kontrol 1 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. Asetile beta tübülün silyum boyunca yeşil, DNAH5 proteini silyum boyunca kırmızı, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise silyumlar boyunca asetile beta tübülün ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlemlendi (x100).



Şekil 4.4.2. Kontrol 2 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. Asetile beta tübülün silyum boyunca yeşil, DNAH5 proteini silyum boyunca kırmızı, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise silyumlar boyunca asetile beta tübülün ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlemlendi (x100).



Şekil 4.4.3. Kontrol 3 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. Asetile beta tübülün silyum boyunca yeşil, DNAH5 proteini silyum boyunca kırmızı, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise silyumlar boyunca asetile beta tübülün ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlemlendi (x100).

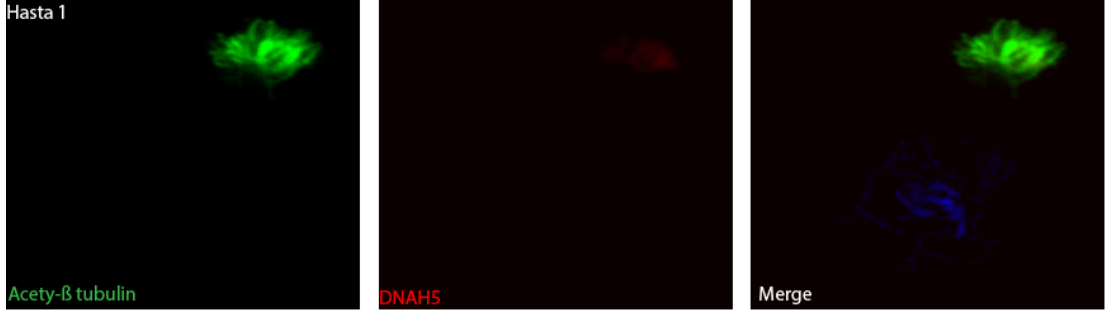
Kontrol bireylerde silyum boyunca asetile beta tübülün ve DNAH5 floresan işaretlenmesi gözlemlendi (Tablo 4.4.1).

Tablo 4.4.1. Kontrol bireylerin DNAH5 ve asetile beta tübülün işaretlenmesi

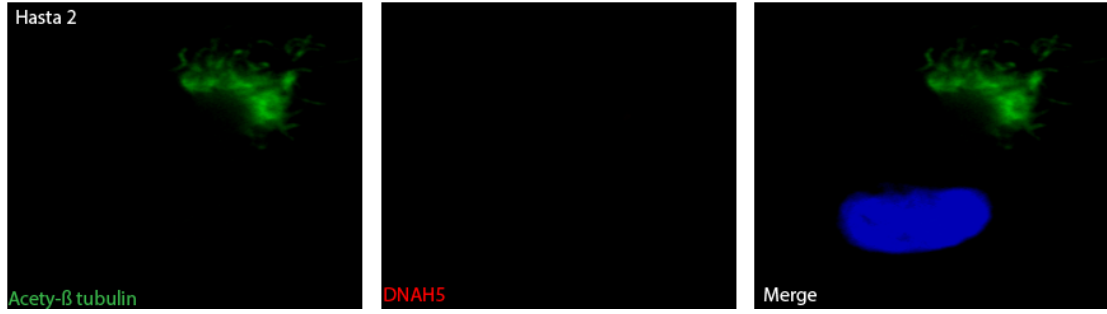
Kontroller	Cinsiyet	DNAH5 IF işaretlenmesi	Asetile beta tübülün IF işaretlenmesi
Kontrol 1	K	Silyum boyunca	Silyum boyunca
Kontrol 2	E	Silyum boyunca	Silyum boyunca
Kontrol 3	E	Silyum boyunca	Silyum boyunca

Hasta 1 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve parçalanmış, silyum varlığı ise asetile beta tübülün ile yeşil gözlemlendi. DNAH5 proteini ise silyumların distalinde çok az kırmızı ifadelendi. Birleşmiş mikrografta silyumlar boyunca asetile beta tübülün işaretlenmesi ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlenmedi (Şekil 4.4.4). Hasta 2 bireye ait örnekte de çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise asetile beta tübülün ile yeşil gözlemlendi. DNAH5 proteini ise silyum boyunca proksimalden distale doğru hiç kırmızı ifadelene göstermedi. Birleşmiş mikrografta silyumlar boyunca asetile beta tübülün işaretlenmesi ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlenmedi (Şekil 4.4.5). Hasta 3 bireye ait örnekte de çekirdek DAPI ile mavi ve parçalı, silyum varlığı ise asetile beta tübülün ile yeşil gözlemlendi. DNAH5 proteini ise silyum boyunca proksimalden distale doğru hiç kırmızı ifadelene göstermedi. Birleşmiş mikrografta

silyumlar boyunca astile beta tblin işaretlenmesi ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlenmedi (ekil 4.4.6). Hasta 4 bireye ait örnekte de ekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise asetile beta tblin ile yeşil ifadelendi. DNAH5 proteini ise silyum boyunca proksimalden distale doğru hiç kırmızı ifadelene göstermedi. Birleşmiş mikrografta astile beta tblin işaretlenmesi ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlenmedi (ekil 4.4.7). Hasta 5 bireye ait örnekte ekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise asetile beta tblin ile yeşil gözlendi. DNAH5 proteini ise silyumların proksimalinde çok az kırmızı ifadelendi. Birleşmiş mikrografta silyumlar boyunca asetile beta tblin işaretlenmesi ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlenmedi (ekil 4.4.8). Hasta 6 bireye ait örnekte de ekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise asetile beta tblin ile yeşil gözlendi. DNAH5 proteini ise silyum boyunca proksimalden distale doğru hiç kırmızı ifadelene göstermedi. Birleşmiş mikrografta silyumlar boyunca astile beta tblin işaretlenmesi ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlenmedi (ekil 4.4.9). Hasta 7 bireye ait örnekte ekirdek DAPI ile mavi ve parçalanmış, silyum varlığı ise asetile beta tblin ile yeşil gözlendi. DNAH5 proteini ise silyumların distalinde kırmızı ifadelendi. Birleşmiş mikrografta silyumların distalinde asetile beta tblin işaretlenmesi ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlendi (ekil 4.4.10). Hasta 8 bireye ait örnekte de ekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise asetile beta tblin ile yeşil gözlendi. DNAH5 proteini ise silyum boyunca proksimalden distale doğru kırmızı ifadelendi. Birleşmiş mikrografta silyumlar boyunca asetile beta tblin işaretlenmesi ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlendi (ekil 4.4.11).



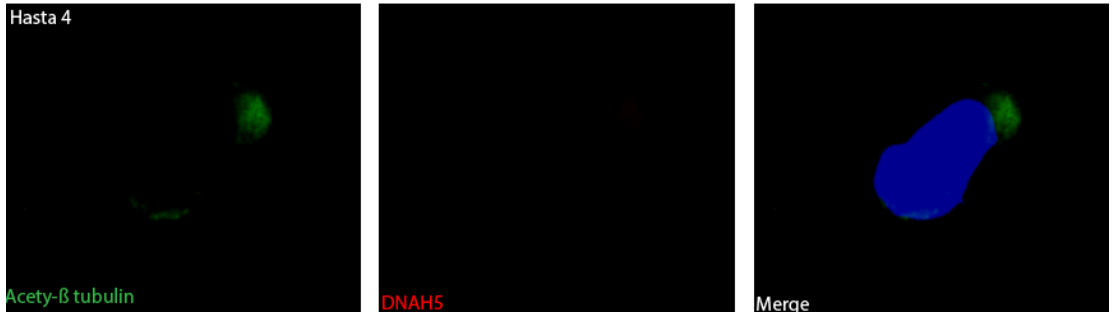
Şekil 4.4.4. Hasta 1 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. Asetile beta tübülün silyum boyunca yeşil, DNAH5 proteini silyum distalinde çok az kırmızı, çekirdek DAPI ile mavi parçalanmış ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise silyumlar boyunca asetile beta tübülün ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlenmedi (x100).



Şekil 4.4.5. Hasta 2 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. Asetile beta tübülün silyum boyunca yeşil ifadelendi, DNAH5 proteini silyum boyunca kırmızı ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise silyumlar boyunca asetile beta tübülün ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlenmedi (x100).



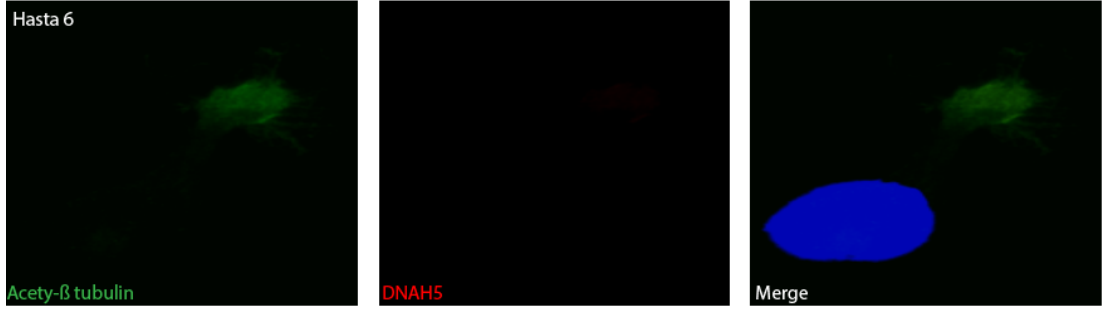
Şekil 4.4.6. Hasta 3 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. Asetile beta tübülün silyum boyunca yeşil ifadelendi, DNAH5 proteini silyum boyunca kırmızı ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi parçalanmış ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise silyumlar boyunca asetile beta tübülün ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlenmedi (x100).



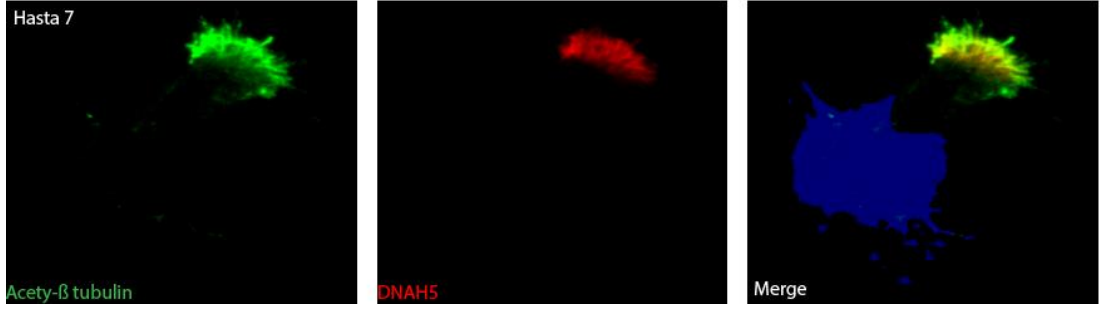
Şekil 4.4.7. Hasta 4 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immünofloresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. Asetile beta tübülün silyum boyunca yeşil ifadelendi, DNAH5 proteini silyum boyunca kırmızı ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise silyumlar boyunca asetile beta tübülün ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlenmedi (x100).



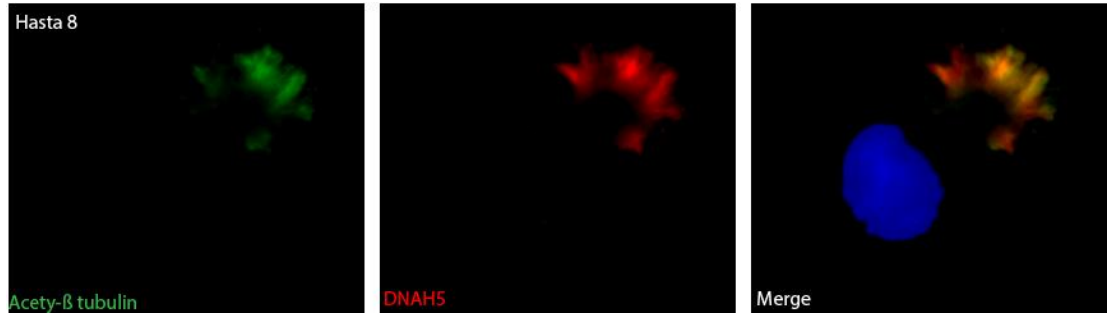
Şekil 4.4.8. Hasta 5 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. Asetile beta tübülün silyum boyunca yeşil, DNAH5 proteini silyum proksimalinde çok az kırmızı, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise silyumlar boyunca asetile beta tübülün ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlenmedi (x100).



Şekil 4.4.9. Hasta 6 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. Asetile beta tübülün silyum boyunca yeşil ifadelendi, DNAH5 proteini silyum boyunca kırmızı ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise silyumlar boyunca asetile beta tübülün ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlenmedi (x100).



Şekil 4.4.10. Hasta 7 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. Asetile beta tübülün silyum boyunca yeşil, DNAH5 proteini silyum distalinde kırmızı, çekirdek DAPI ile mavi parçalanmış ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise silyumların distalinde asetile beta tübülün ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlendi (x100).



Şekil 4.4.11. Hasta 8 bireye ait örneğin DNAH5 ve β tübülün immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. Asetile beta tübülün silyum boyunca yeşil, DNAH5 proteini silyum boyunca kırmızı, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise silyum boyunca asetile beta tübülün ve DNAH5 işaretlenmesi üst üste gözlendi (x100).

Bütün hastalarda silyum boyunca asetile beta tübülün Floresan işaretlenmesi gözlendi. Hasta 2, 3, 4, 6'da DNAH5 Floresan işaretlenmesi gözlenmedi. Hasta 1'de silyum distalinde çok az, hasta 5'te silyum proksimalinde çok az işaretlenme; hasta 7'de ise silyum distalinde ve hasta 8'de silyum boyunca işaretlenme gözlendi (Tablo 4.4.2)

Tablo 4.4.2. Hastaların mutasyonları ve DNAH5 ve asetile beta tübülün işaretlenmesi

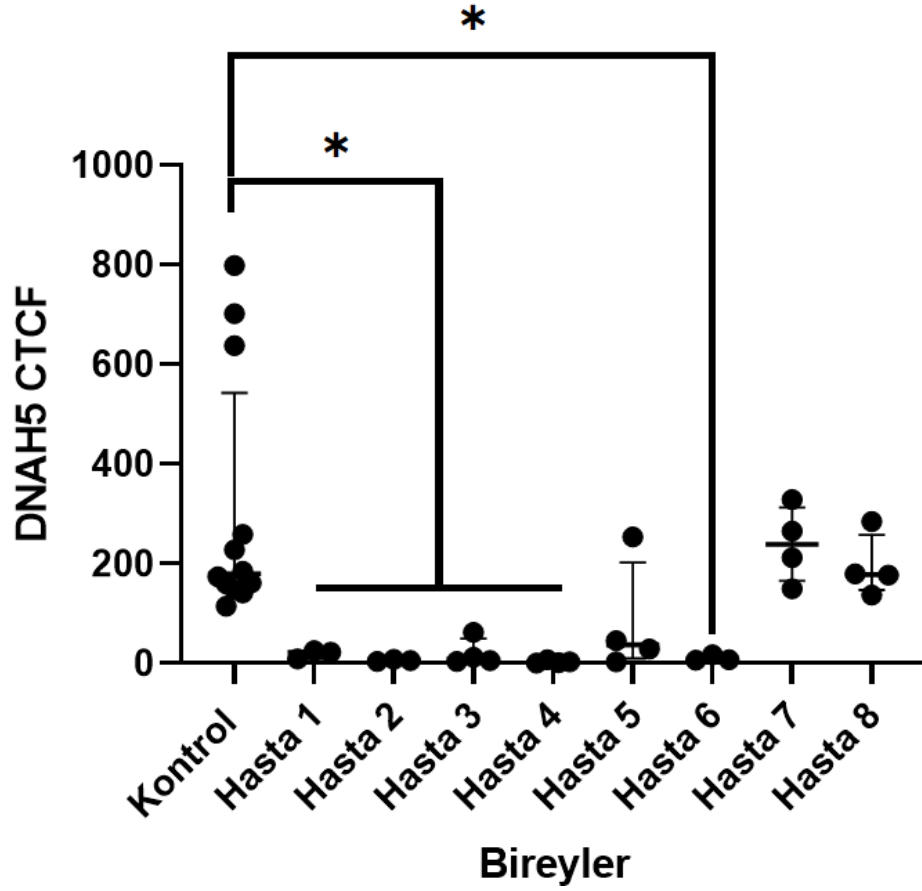
Hastalar	Cinsiyet	Yaş	Gen	Mutasyon: Kodlama (HGVS isimlendirmesi c.)	Mutasyon: Protein (HGVS isimlendirmesi p.)	Tip	Zigosite	Asetile beta tübülün IF işaretlenmesi	DNAH5 IF işaretlenmesi
Hasta 1	E	21	DNAH5	c.11740G>A	p.Glu3914Lys	Missense	Comp. Het.	Silyum boyunca	Silyum distali çok az
Hasta 2	K	17 y 8 ay	DNAH5	c.13486C>T	p.Arg4496Ter	Nonsense	Hom	Silyum boyunca	-
Hasta 3	K	22	DNAH5	c.7615T>C	p.Trp2539Arg	Missense	Hom	Silyum boyunca	-
Hasta 4	K	18 y 5 ay	DNAH5	c.8897C>T	p.Thr2966Met	Missense	Hom	Silyum boyunca	-
Hasta 5	K	19 y 11 ay	DNAH5	c.5747G>A	p.W1916*	Nonsense	Het	Silyum boyunca	Silyum proksimali çok az
Hasta 6	E	16 y 10 ay	DNAH5	c.2710G>T	p.Glu904Ter	Nonsense	Hom	Silyum boyunca	-
Hasta 7	K	16 y 3 ay	DNAH5	c.2368G>C	p.Ala790Pro	Missense	Hom	Silyum boyunca	Silyum distali
Hasta 8	E	14 y 2 ay	DNAH5	c.9502C>T	p.R3168*	Nonsense	Hom	Silyum boyunca	Silyum boyunca

Tablo 4.4.3'te düzeltilmiş toplam hücre floresan ölçümlerinin ortalamaları verilmiştir. Her hasta ve kontrol bireyden en az 3 fotoğraftan floresan ölçümleri yapılmıştır. Çıkan değerler toplam hücre floresan (CTCF) formülüne göre ölçümler hesaplanmıştır. Sonra her fotoğraftan elde edilen ölçümlerin ortalaması alınarak Graphpad Prism 8 programında ortalamalara göre istatistiksel olarak anlamlılık bakılmıştır.

Kontrol bireyler ve hasta 1, 2, 3, 4, 6'nın DNAH5 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri (Tablo 4.4.3) arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$) fakat kontrol bireyler ve hasta 5, 7, 8 arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Şekil 4.4.12).

Tablo 4.4.3. Kontrol ve hasta bireylerin DNAH5 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri

Bireyler	DNAH5 CTCF Ortalamaları
Kontrol	309,1
Hasta 1	18,93
Hasta 2	5,562
Hasta 3	20,74
Hasta 4	2,844
Hasta 5	82,79
Hasta 6	9,953
Hasta 7	239,1
Hasta 8	194,5

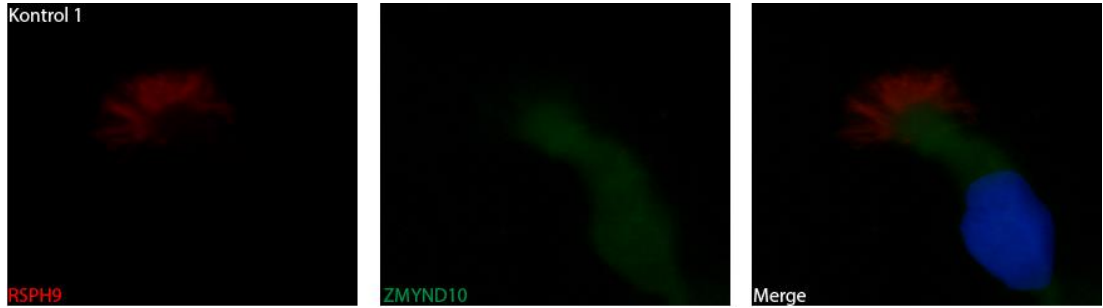


Şekil 4.4.12. Bireyler arasında DNAH5 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri istatistik grafiği. Kontrol bireyler ve hasta 1, 2, 3, 4, 6'nın DNAH5 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$) fakat kontrol bireyler ve hasta 5, 7, 8 arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

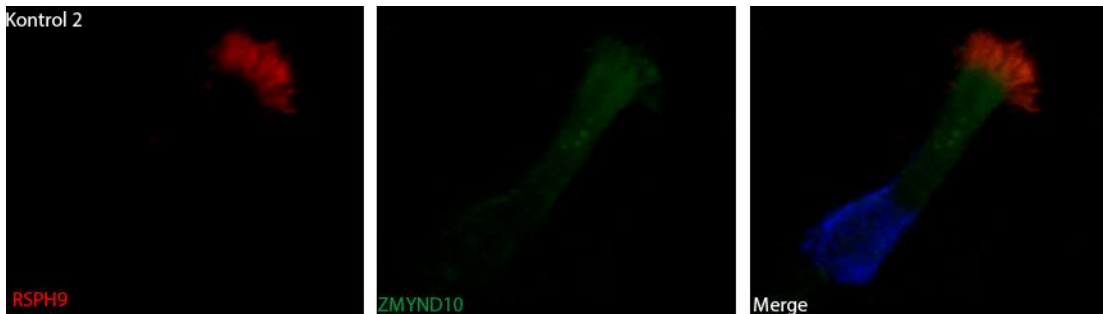
4.5. Hasta ve Kontrol Grubundan Alınan Örneklerde ZMYND10 ve RSPH9 Çift İmmünofloresan İşaretlenmesi

Kontrol ve hasta bireylere ait örnekler uygun immünofloresan teknikle boyandı. Bu sayede hücre sitoplazmik yapısı, çekirdeği ve silyumu bütün olarak gözlendi. Çekirdekler DAPI ile maviye, silyum aksonem yapısında silyum boyunca boyanan RSPH9 kırmızıya ve normalde sitoplazmada bulunan ZMYND10 proteini ise yeşil ifadelendi. Kontrol 1 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı gözlendi. ZMYND10 proteini ise sitoplazmada yeşil ifadelendi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi ve ZMYND10 işaretlenmesi

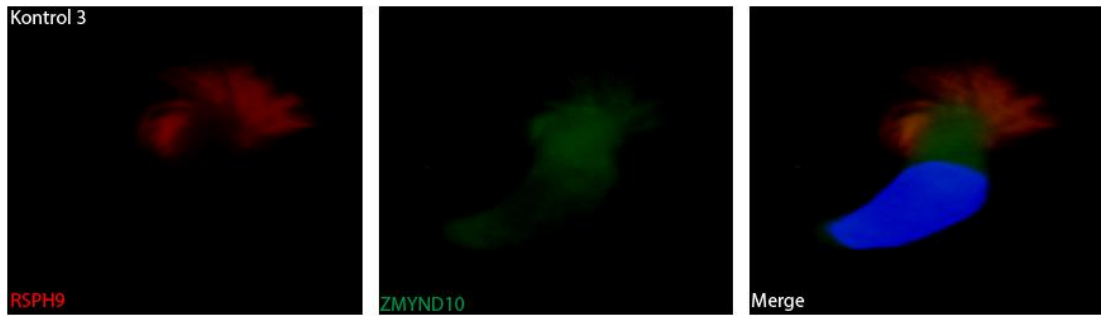
hücrede normal paternde gözlendi (Şekil 4.5.1). Kontrol 2 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve parçalı, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı gözlendi. ZMYND10 proteini ise sitoplazmada granüllerle yeşil ifadelendi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi ve ZMYND10 işaretlenmesi hücrede normal paternde gözlendi (Şekil 4.5.2). Kontrol 3 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı gözlendi. ZMYND10 proteini ise sitoplazmada yeşil ifadelendi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi ve ZMYND10 işaretlenmesi hücrede normal paternde gözlendi (Şekil 4.5.3).



Şekil 4.5.1. Kontrol 1 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, ZMYND10 proteini sitoplazmada yeşil, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 ve ZMYND10 işaretlenmesi hücrede normal paternde gözlendi (x100).



Şekil 4.5.2. Kontrol 2 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı, ZMYND10 proteini sitoplazmada granüllerle yeşil, çekirdek DAPI ile mavi parçalı ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 ve ZMYND10 işaretlenmesi hücrede normal paternde gözlendi (x100).



Şekil 4.5.3. Kontrol 3 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı, ZMYND10 proteini sitoplazmada yeşil, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 ve ZMYND10 işaretlenmesi hücrede normal paternde gözlemlendi (x100).

Bütün kontrol bireylerde silyum boyunca RSPH9 floresan işaretlenmesi gözlemlendi. Bütün kontrol bireylerde ZMYND10 floresan işaretlenmesi sitoplazmada normal paternde gözlemlendi (Tablo 4.5.1).

Tablo 4.5.1. Kontrol bireylerin RSPH9 ve ZMYND10 işaretlenmesi

Kontrol Kısa Adları	Cinsiyet	RSPH9 IF işaretlenmesi	ZMYND10 IF işaretlenmesi
Kontrol 1	K	Silyum boyunca	Sitoplazmada
Kontrol 2	E	Silyum boyunca	Sitoplazmada
Kontrol 3	E	Silyum boyunca	Sitoplazmada

Hasta 1 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. ZMYND10 proteini ise sitoplazmada yeşil ifadelene göstermedi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal gözlemlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi ise hücrede gözlenmedi (Şekil 4.5.4). Hasta 2 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. ZMYND10 proteini ise silyum proksimalinde az ifadelendi ve sitoplazmada yeşil ifadelene göstermedi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal gözlemlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi ise hücrede normal paternde sitoplazmanın büyük bir kısmında gözlenmedi (Şekil 4.5.5). Hasta 3 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. ZMYND10 proteini ise

sitoplazmada yeşil ifadenme göstermedi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal gözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi ise hücrede gözlenmedi (Şekil 4.5.6). Hasta 4 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. ZMYND10 proteini ise sitoplazmada yeşil ifadenme göstermedi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal gözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi ise hücrede gözlenmedi (Şekil 4.5.7). Hasta 5 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve parçalı, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. ZMYND10 proteini ise sitoplazmada yeşil ifadenme göstermedi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal gözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi ise hücrede gözlenmedi (Şekil 4.5.8). Hasta 6 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. ZMYND10 proteini ise sitoplazmada az ifadelendi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal gözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi ise hücrede normal paternde gözlenmedi (Şekil 4.5.9). Hasta 7 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. ZMYND10 proteini ise sitoplazmada yeşil ifadenme göstermedi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal gözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi ise hücrede normal paternde sitoplazmanın büyük bir kısmında gözlenmedi (Şekil 4.5.10). Hasta 8 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve parçalı, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. ZMYND10 proteini ise sitoplazmada yeşil ifadenme göstermedi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal gözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi ise hücrede gözlenmedi (Şekil 4.5.11).



Şekil 4.5.4. Hasta 1 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, ZMYND10 proteini sitoplazmada yeşille ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paterndegözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi hücrede gözlenmedi (x100).



Şekil 4.5.5. Hasta 2 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, ZMYND10 proteini silyum proksimalinde yeşille az ifadelendi ve sitoplazmada ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paterndegözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi hücrede normal paternde sitoplazmanın büyük bir kısmında gözlenmedi (x100).



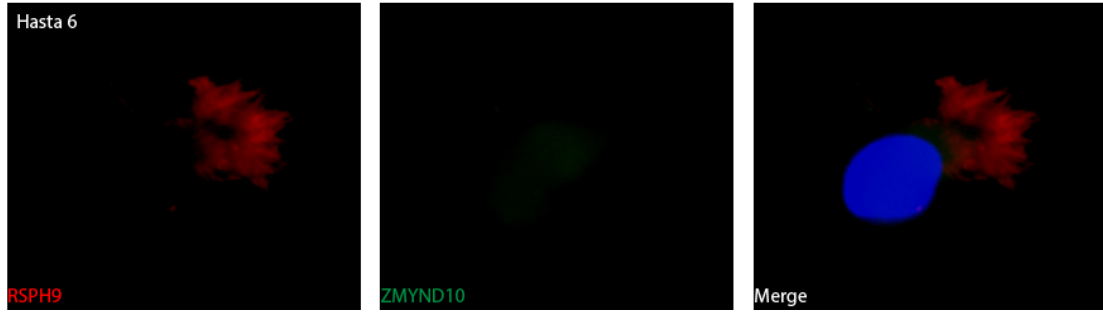
Şekil 4.5.6. Hasta 3 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, ZMYND10 proteini sitoplazmada yeşille ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi hücrede gözlenmedi (x100).



Şekil 4.5.7. Hasta 4 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, ZMYND10 proteini sitoplazmada yeşille ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi hücrede gözlenmedi (x100).



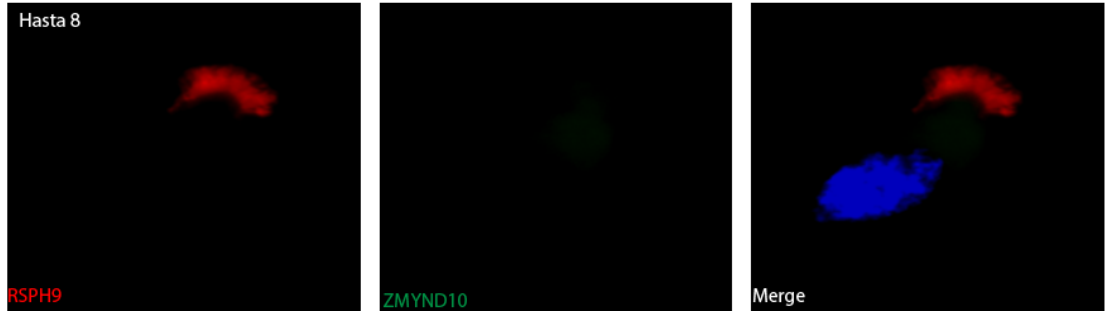
Şekil 4.5.8. Hasta 5 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, ZMYND10 proteini sitoplazmada yeşille ifadelendi, çekirdek DAPI ile mavi parçalı ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi hücrede gözlenmedi (x100).



Şekil 4.5.9. Hasta 6 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı, ZMYND10 proteini sitoplazmada yeşille az ifadelendi, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi hücrede normal paternde sitoplazmanın büyük bir kısmında gözlenmedi (x100).



Şekil 4.5.10. Hasta 7 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, ZMYND10 proteini sitoplazmada yeşille ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi hücrede gözlenmedi (x100).



Şekil 4.5.11. Hasta 8 bireye ait örneğin ZMYND10 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, ZMYND10 proteini sitoplazmada yeşille ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi parçalı ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve ZMYND10 işaretlenmesi hücrede gözlenmedi (x100).

Bütün hasta bireylerde silyum boyunca RSPH9 floresan işaretlenmesi gözlendi. Hasta 2'de ZMYND10 floresan işaretlenmesi silyum proksimalinde az; hasta 6'da sitoplazmada az gözlendi. Diğer hastalarda ise ZMYND10 floresan işaretlenmesi gözlenmedi (Tablo 4.5.2).

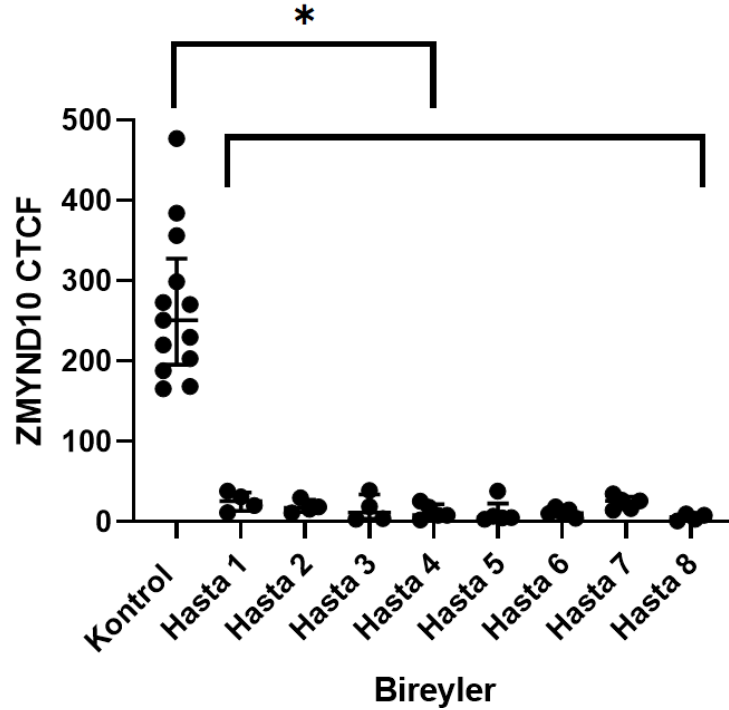
Tablo 4.5.2. Hastaların mutasyonları ve RSPH9 ve ZMYND10 işaretlenmesi

Hasta Kısa Adları	Cinsiyet	Doğum Tarihi	Gen	Mutasyon: Kodlama (HGVS isimlendirmesi c.)	Mutasyon: Protein (HGVS isimlendirmesi p.)	Tip	Zigosite	RSPH9 IF işaretlenmesi	ZMYND10 IF işaretlenmesi
Hasta 1	E	21	DNAH5	c.11740G>A	p.Glu3914Lys	Missense	Comp. Het.	Silyum boyunca	-
Hasta 2	K	17 y 8 ay	DNAH5	c.13486C>T	p.Arg4496Ter	Nonsense	Hom	Silyum boyunca	Silyum proksimalinde az
Hasta 3	K	22	DNAH5	c.7615T>C	p.Trp2539Arg	Missense	Hom	Silyum boyunca	-
Hasta 4	K	18 y 5 ay	DNAH5	c.8897C>T	p.Thr2966Met	Missense	Hom	Silyum boyunca	-
Hasta 5	K	19 y 11 ay	DNAH5	c.5747G>A	p.W1916*	Nonsense	Het	Silyum boyunca	-
Hasta 6	E	16 y 10 ay	DNAH5	c.2710G>T	p.Glu904Ter	Nonsense	Hom	Silyum boyunca	Sitoplazmada az
Hasta 7	K	16 y 3 ay	DNAH5	c.2368G>C	p.Ala790Pro	Missense	Hom	Silyum boyunca	-
Hasta 8	E	14 y 2 ay	DNAH5	c.9502C>T	p.R3168*	Nonsense	Hom	Silyum boyunca	-

Kontrol bireyler ve hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ZMYND10 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri (Tablo 4.5.3) arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.5.12).

Tablo 4.5.3. Kontrol ve hasta bireylerin ZMYND10 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri

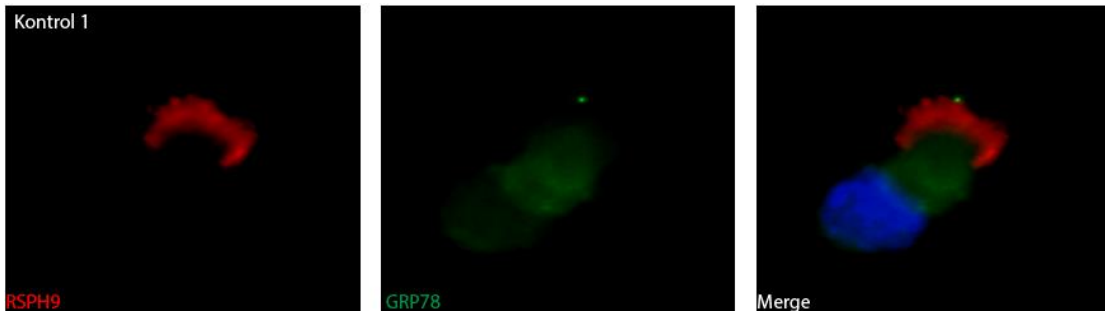
Bireyler	ZMYND10 CTCF Ortalamaları
Kontrol	268,3
Hasta 1	25,14
Hasta 2	18,83
Hasta 3	16,31
Hasta 4	12,50
Hasta 5	11,69
Hasta 6	11,76
Hasta 7	23,68
Hasta 8	5,501



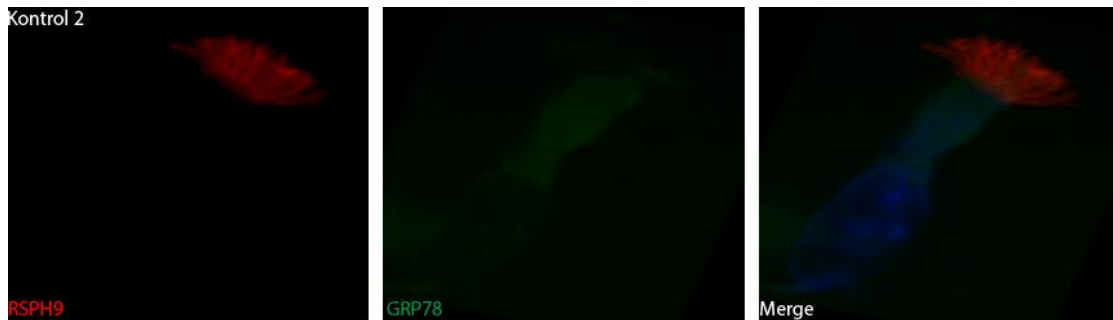
Şekil 4.5.12. Bireyler arasında ZMYND10 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri istatistik grafiği. Kontrol bireyler ve hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ZMYND10 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$).

4.6. Hasta ve Kontrol Grubundan Alınan Örneklerde GRP78 ve RSPH9 Çift İmmünofloresan İşaretlenmesi

Kontrol ve hasta bireylere ait örnekler uygun immünofloresan teknikle boyandı. Bu sayede hücre sitoplazmik yapısı, çekirdeği ve silyumu bütün olarak gözlendi. Çekirdekler DAPI ile maviye, silyum aksonem yapısında silyum boyunca boyanan RSPH9 kırmızıya ve normalde sitoplazmada bulunan GRP78 proteini ise yeşil ifadelendi. Kontrol 1 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı gözlendi. GRP78 proteini ise sitoplazmada yeşil ifadelendi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede normal paternde gözlendi (Şekil 4.6.1). Kontrol 2 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve parçalı, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı gözlendi. GRP78 proteini ise sitoplazmada yeşil ifadelendi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede normal paternde gözlendi (Şekil 4.6.2). Kontrol 3 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve parçalı, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı gözlendi. GRP78 proteini ise sitoplazmada yeşil ifadelendi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede normal paternde gözlendi (Şekil 4.6.3).



Şekil 4.6.1. Kontrol 1 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, GRP78 proteini sitoplazmada yeşil, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede normal paternde gözlendi (x100).



Şekil 4.6.2. Kontrol 2 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, GRP78 proteini sitoplazmada yeşil, çekirdek DAPI ile mavi parçalı ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede normal paternde gözlemlendi (x100).



Şekil 4.6.3. Kontrol 3 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, GRP78 proteini sitoplazmada yeşil, çekirdek DAPI ile mavi parçalı ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede normal paternde gözlemlendi (x100).

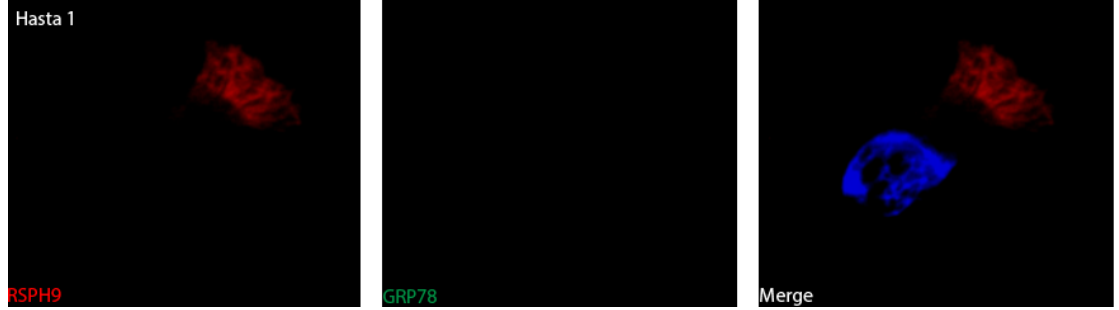
Bütün kontrol bireylerde silyum boyunca RSPH9 Floresan işaretlenmesi gözlemlendi. Bütün kontrol bireylerde GRP78 Floresan işaretlenmesi sitoplazmada gözlemlendi (Tablo 4.6.1).

Tablo 4.6.1. Kontrol bireylerin RSPH9 ve GRP78 işaretlenmesi

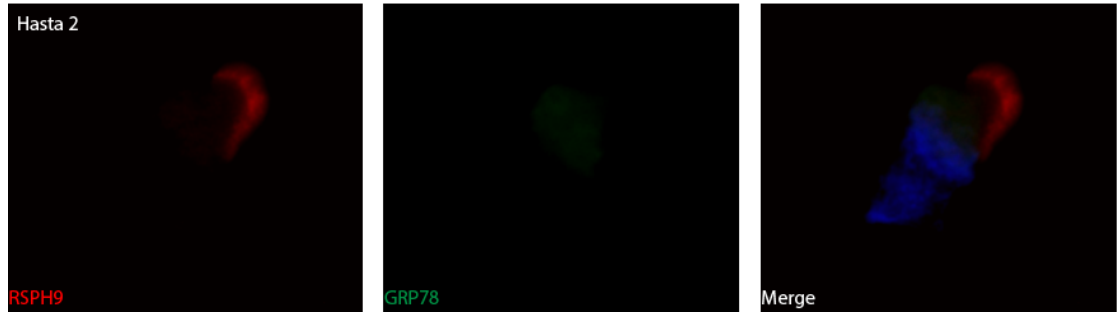
Kontrol Kısa Adları	Cinsiyet	RSPH9 IF işaretlenmesi	GRP78 IF işaretlenmesi
Kontrol 1	K	Silyum boyunca	Sitoplazmada
Kontrol 2	E	Silyum boyunca	Sitoplazmada
Kontrol 3	E	Silyum boyunca	Sitoplazmada

Hasta 1 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve parçalı, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. GRP78 proteini ise sitoplazmada yeşil ifadelene göstermedi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi ise hücrede gözlenmedi (Şekil 4.6.4). Hasta 2 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve parçalı, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. GRP78 proteini ise sitoplazmada yeşille az ifadelendi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi ise hücrede normal paternde sitoplazmanın büyük bir kısmında gözlenmedi (Şekil 4.6.5). Hasta 3 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. GRP78 proteini ise sitoplazmada yeşil ifadelene göstermedi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi ise hücrede gözlenmedi (Şekil 4.6.6). Hasta 4 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve parçalı, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. GRP78 proteini ise hücre apikalinde yeşil ile az ifadelendi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi ise hücrede normal paternde sitoplazmanın büyük bir kısmında gözlenmedi (Şekil 4.6.7). Hasta 5 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. GRP78 proteini ise sitoplazmada yeşille az ifadelendi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi ise hücrede normal paternde sitoplazmanın büyük bir kısmında gözlenmedi (Şekil 4.6.8). Hasta 6 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. GRP78 proteini ise sitoplazmada yeşille ifadelene göstermedi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi ise hücrede gözlenmedi (Şekil 4.6.9). Hasta 7 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve bütün, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. GRP78 proteini ise sitoplazmada yeşil ifadelene göstermedi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi ise hücrede gözlenmedi (Şekil 4.6.10). Hasta 8 bireye ait örnekte çekirdek DAPI ile mavi ve parçalı, silyum varlığı ise RSPH9 ile kırmızı ifadelendi. GRP78 proteini ise sitoplazmada yeşil

ifadelenme göstermedi. Birleşmiş mikrografta RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi ise hücrede gözlenmedi (Şekil 4.6.11).



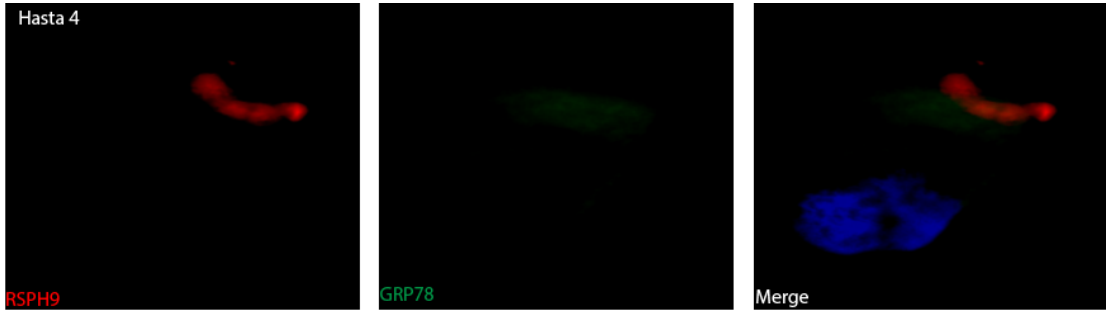
Şekil 4.6.4. Hasta 1 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, GRP78 proteini sitoplazmada yeşille ifadelenme göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi parçalı ifadeleni, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede gözlenmedi (x100).



Şekil 4.6.5. Hasta 2 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, GRP78 proteini sitoplazmada yeşille az ifadeleni, çekirdek DAPI ile mavi parçalı ifadeleni, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede normal paternde sitoplazmanın büyük bir kısmında gözlenmedi (x100).



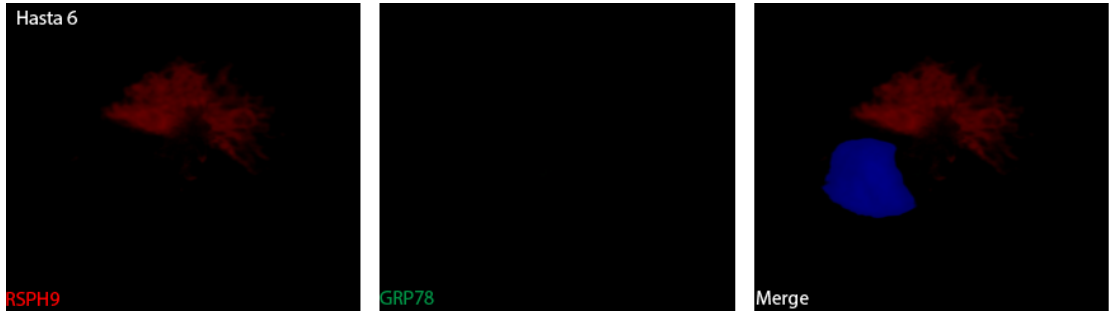
Şekil 4.6.6. Hasta 3 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, GRP78 proteini sitoplazmada yeşille ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede gözlenmedi (x100).



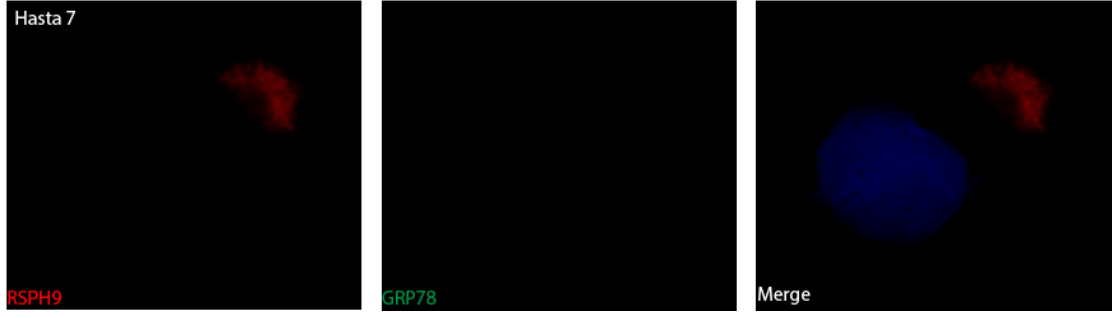
Şekil 4.6.7. Hasta 4 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, GRP78 proteini hücre apikalinde yeşille az ifadelendi, çekirdek DAPI ile mavi parçalı ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede normal paternde sitoplazmanın büyük bir kısmında gözlenmedi (x100).



Şekil 4.6.8. Hasta 5 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, GRP78 proteini sitoplazmada yeşille az ifadelendi, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede normal paternde sitoplazmanın büyük bir kısmında gözlenmedi (x100).



Şekil 4.6.9. Hasta 6 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, GRP78 proteini sitoplazmada yeşille ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi bütün ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede gözlenmedi (x100).



Şekil 4.6.10. Hasta 7 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, GRP78 proteini sitoplazmada yeşille ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi parçalı ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede gözlenmedi (x100).



Şekil 4.6.11. Hasta 8 bireye ait örneğin GRP78 ve RSPH9 immüno Floresan işaretlenmesi mikrograflarda gösterilmiştir. RSPH9 silyum boyunca kırmızı ifadelendi, GRP78 proteini sitoplazmada yeşille ifadelene göstermedi, çekirdek DAPI ile mavi parçalı ifadelendi, birleştirilmiş mikrografta ise RSPH9 işaretlenmesi normal paternde gözlendi ve GRP78 işaretlenmesi hücrede gözlenmedi (x100).

Bütün hasta bireylerde silyum boyunca RSPH9 floresan işaretlenmesi gözlendi. Hasta 2'de GRP78 floresan işaretlenmesi sitoplazmada az; hasta 4'te hücre apikalinde az hasta 5'te sitoplazmada az gözlendi. Diğer hastalarda ise GRP78 floresan işaretlenmesi gözlenmedi (Tablo 4.11).

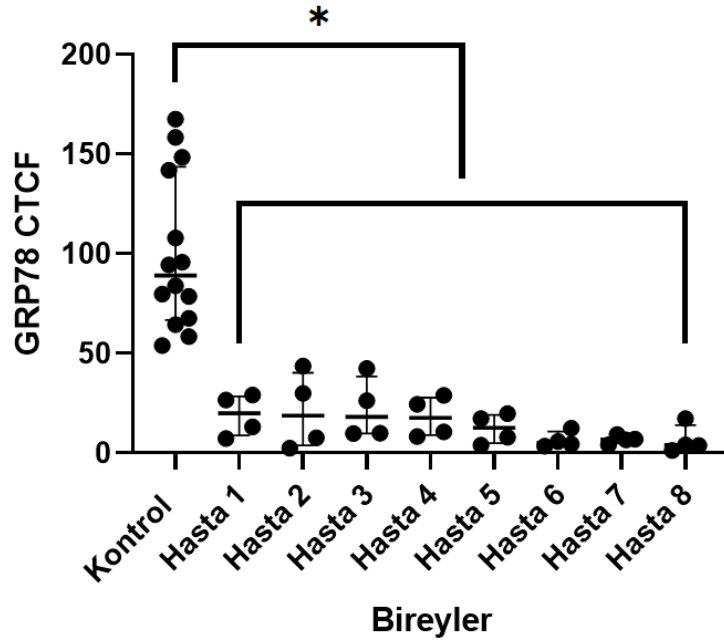
Tablo 4.6.2. Hastaların mutasyonları ve RSPH9 ve GRP78 işaretlenmesi

Hasta Kısa Adları	Cinsiyet	Doğum Tarihi	Gen	Mutasyon: Kodlama (HGVS isimlendirmesi c.)	Mutasyon: Protein (HGVS isimlendirmesi p.)	Tip	Zigosite	RSPH9 IF işaretlenmesi	GRP78 IF işaretlenmesi
Hasta 1	E	21	DNAH5	c.11740G>A	p.Glu3914Lys	Missense	Comp. Het.	Silyum boyunca	-
Hasta 2	K	17 y 8 ay	DNAH5	c.13486C>T	p.Arg4496Ter	Nonsense	Hom	Silyum boyunca	Sitoplazmada az
Hasta 3	K	22	DNAH5	c.7615T>C	p.Trp2539Arg	Missense	Hom	Silyum boyunca	-
Hasta 4	K	18 y 5 ay	DNAH5	c.8897C>T	p.Thr2966Met	Missense	Hom	Silyum boyunca	Hücre apikalinde az
Hasta 5	K	19 y 11 ay	DNAH5	c.5747G>A	p.W1916*	Nonsense	Het	Silyum boyunca	Sitoplazmada az
Hasta 6	E	16 y 10 ay	DNAH5	c.2710G>T	p.Glu904Ter	Nonsense	Hom	Silyum boyunca	-
Hasta 7	K	16 y 3 ay	DNAH5	c.2368G>C	p.Ala790Pro	Missense	Hom	Silyum boyunca	-
Hasta 8	E	14 y 2 ay	DNAH5	c.9502C>T	p.R3168*	Nonsense	Hom	Silyum boyunca	-

Kontrol bireyler ve hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 GRP78 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri (Tablo 4.6.3) arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.6.12).

Tablo 4.6.3. Kontrol ve hasta bireylerin GRP78 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri

Bireyler	GRP78 CTCF Ortalamaları
Kontrol	100,1
Hasta 1	18,99
Hasta 2	20,90
Hasta 3	22,10
Hasta 4	18,05
Hasta 5	12,22
Hasta 6	6,493
Hasta 7	6,714
Hasta 8	6,587



Şekil 4.6.12. Bireyler arasında bireylerin GRP78 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri istatistik grafiği. Kontrol bireyler ve hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 GRP78 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Uzmanlık tezi çalışmamız esas olarak; üç iş paketi ve bunların alt birimlerinden oluşmaktadır. Gerekli etik kurul izni 20.10.2020 tarihinde, 2020/17 numaralı toplantıda 16969557-1448 sayı ve GO 20/989 kayıt numarası ile alındıktan sonra, hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireyler belirlenmiştir. Uygun demografik yapı ve klinik bulgular ile seyreden; önceden tanımlanmış DNAH5 mutasyonu olan bireyler hasta gruba dahil edilmiştir. Yaşları 6-23 olan (toplam n=18 (n=7 erkek; n=11 kız)) kliniğe belirgin kronik burun akıntısı, tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonu, kronik öksürük, bronşiektazi, orta kulak enfeksiyonu ile gelen hastaların genel muayenesi ve fizik muayenesi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Bölümü'nde yapılmıştır. Hastalardan 8 tanesi araştırmaya katılmak için gönüllü olmuştur. 8 hastadan en küçüğü 14 en büyüğü 22 yaşında olmak üzere 6 kız 2 erkek hasta birey çalışmaya katılmıştır. Kontrol bireyler sigara içmemiş, bilinen bir solunum yolu enfeksiyonu ve hastalığı olmayan ve covid-19 enfeksiyonu geçirmemiş 3 kişiden seçilmiştir. Kontrol bireyler olarak 26 yaşında bir kız ve 28 ve 31 yaşlarında erkek birey dahil edilmiştir. Klinik muayene ve tetkikleri tamamlanan bireyler COVID testi için PCR örneklerinin alınmasını takiben ertesi gün çalışma örneklerini toplamak üzere tekrar hastaneye çağırılmıştır.

Primer siliyer diskinezi (PCD), nadir ve otozomal resesif geçişli (MIM 244400), sinopulmoner enfeksiyonlar ile karakterize olup motil silyum veya flagellumun defektine bağlı oluşan bir hastalıktır (1, 2). PCD'nin dünyada görülme insidansı 1/15-000- 1/40.000 oranındadır (5). 2019 yılında Avrupa'da retrospektif olarak 151 erişkin hastada yapılan bir çalışmada, PCD'li hastaların mortalite oranı %5 olarak saptanmıştır (6). Ülkemizde de akraba evliliği oranı yüksek olup PCD insidansının yüksek olduğu tahmin edilmektedir ancak kesin insidansı bilinmemektedir (8). PCD nin alt tipi olarak tanımlanmış olan Kartagener Sendromu (KS) ise PCD'nin tipik klinik belirtilerine ek olarak kronik bronşit, kronik rinosinüzit, kronik otitis medya, bronşiektazi ve kısırlık ile seyretmektedir. KS hastalarında PCD vakalarının %50'sini oluşturan situs inversus görülmektedir (99).

Lina Wang ve ark. 2021 yılında Çin, Amerika Birleşik Devletleri, Çek Cumhuriyeti, Japonya, Portekiz ve İtalya dahil olmak üzere altı ülkeden dokuz yayın arasında 21 pediatrik hastanın dahil olduğu çalışmaları derlemiştir (100). Bu pediatrik hastalar 0 ila 15 yaş arası ve ortalama yaşları 6,52'dir. Bu vakaların on dördünde DNAH5'teki bileşik heterozigot (comp. het.) mutasyonlar gösterilmiştir. Çalışmamızda ise Hasta 1'de bileşik heterozigot, hasta 2, 3, 4, 6, 7, 8 'de sadece homozigot ve hasta 5'te sadece heterozigot zigosite bulunmaktadır. Lina Wang ve ark. 2021 yılında yaptığı derlemede otuz beş nonsense, missense ve frameshift mutasyonları 21 vakada tespit edilmiştir ve 24 tanesi yayınlandığı tarihte yeni mutasyon olarak bildirilmiştir (100). Çalışmamızda ise hasta 1, 3, 4, 7 'de missense; hasta 2, 5, 6, 8 'de ise nonsense mutasyon bulunmaktadır. Lina Wang ve ark. 2021 yılında yaptığı derlemede; 15 vakada TEM yapılmış, 11 vakada (%73,3) dış dynein kolu (ODA) kusurları ve 4 vaka (26.7) hem ODA hem de iç dynein kolunun (IDA) kusurları gösterilmiştir (100). Raidt ve ark. 2014 yılında 66 PCD hastasında yaptığı HSVM çalışmasında DNAH5 mutasyonlu hastalarda minimal rezidüel harekete sahip hipokinetik silyumlara rastlamıştır (50). Çalışmamıza dahil olan hastalarda HSVM bulgusu olarak hasta 1, 3, 4, 5, 6 ve 7'de hipokinetik silyum, hasta 2'de çok sayıda rezidüel hareketli silyum ve hasta 6'da hipokinetik silyuma ek stiff model ve hasta 8'de stiff model bulunmaktadır. Boaretto ve ark. 2016 yılında PCD'li 51 İtalyan vakası bildirmiştir ve bunların 20'sinin (%39) situs inversus bulunmaktadır (101). Çalışmamızda hastalarımızın % 37,5'inde hasta 3, 4 ve 5'te situs inversus bulunmaktadır. Boaretto ve ark. 2016 yılında yaptığı çalışmada genetik testler bu vakaların 24'ü için yapılmıştır ve sekiz tanesinde DNAH5 mutasyonları olduğu saptanmıştır ancak 8 kişiden sadece 1'inde Kartagener Sendromu varlığı gösterilmiştir (101). Çalışmamızda ise 8 hastamızdan üçünde (% 37,5) tekrarlayan akciğer enfeksiyonu, sinüzit, bronşiektazi ve situs inversus birlikteliği ile hasta 3, 4, 5'te Kartagener Sendromu varlığı saptanmıştır. Ferkol ve ark. 2013 yılında PCD'li 19 Amerikan vakası bildirmiştir ve 4'ünde (%21) situs inversus bulunmaktadır. On iki vaka DNAH5 mutasyonları saptanmış ve bunlardan 1'inde Kartagener Sendromu varlığı gösterilmiştir (82). K. Takeuchi ve ark. 2018 yılında 46 vaka bildirmiştir ve bunların 2'sinde (%4,3) situs inversus bulunmaktadır. On vakada

PCD ile ilgili genlerde mutasyonlar bulunmaktadır ve yedi tanesi DNAH5'te ancak sadece 2'sinde Kartagener Sendromu varlığı gösterilmiştir (102). Kim ve ark. 2014 yılında 37 PCD vakası ve bunların 16'sında (%43,2) situs inversus bildirmiştir. Vakalardan 27'sine genetik testler yapılmıştır ve on dördünün DNAH5'te mutasyonları bulunmuştur ve 14 olgunun 7'sinde Kartagener Sendromu varlığı gösterilmiştir (103). Djakow ve ark. 2012 yılında 21 PCD'li vaka ve 15'inde (%48,4) situs inversus bildirmiştir. Bunlardan 27'sine genetik testler yapılmıştır ve yedi vakada DNAH5'te mutasyonlar bulunmuştur ve 7 vakadan 6'sında Kartagener Sendromu varlığı gösterilmiştir (104). Bu pediyatrik hastaların çoğu situs inversus ile PCD'nin tipik klinik belirtilerine sahiptir. Bununla birlikte, bu hastaların kardeşleri, situs inversus olmaksızın sadece PCD semptomları gösterebilmektedir. Bu da Kartagener Sendromu'na neden olan bazı mutasyonların ilgisiz klinik bulgularla sonuçlanabileceğini göstermektedir (103, 104).

Geleneksel olarak, silyumlardaki ultrastrüktürel kusurlar TEM tarafından algılanması PCD teşhisi için altın standart olarak kullanılmaktadır. Siliyer vuruş frekansı ve HSVM tarafından gösterilen model de büyük ölçüde tanıya yardımcıdır (100, 105). Ancak bu yaklaşımlar mukoza ve siliyer ultrastrüktürde olası ikincil değişiklikler ve pediyatrik hastalardan doku örneklemesinin zayıf uyumu ile sınırlı kalmaktadır. Genetik testler artık PCD için yeni bir tanı aracı haline gelmektedir (100). 2017'de gerçekleştirilen PCD tanı algoritması konulu panelde morfolojik hasarı saptayabilmede ve genotip-fenotip korelasyonunu göstermede immünofloresan işaretlenmenin kullanılmasının sensitivite ve spesifite açısından önemli olduğu gösterilmiştir (41, 47, 48). İmmünofloresan, spesifik floresan etiketli antikolar kullanılarak floresan veya konfokal mikroskopi ile hedef proteinlerin indirekt görüntülenmesine izin vermektedir. Silyumu oluşturan proteinlerine karşı kullanılan antikolar genetik mutasyonun patojenitesini (fenotip olarak) ve siliyer proteinin yokluğunun histopatolojik olarak göstermede oldukça değerlidir (51).

Tez çalışmamızın birinci iş paketinde 8 hastadan alınan nazal sürüntü örneklerinde dış dynein kolunda bulunan DNAH5 proteini ve silyumu işaretlemek için asetile beta tübülün proteinleri çift immünofloresan işaretlenmesi yapılmıştır. Bütün

hasta bireylerde silyum boyunca asetile túbülin beta immünofloresan işaretlenmesi gözlenmiştir. Bu da silyum yapısında DNAH5 immünofloresan işaretlenmelerine bakıldığında kontrol bireylerin düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerlerinin ortalaması ile çalışmadaki hastaların % 62,5'u arasında anlamlı fark bulunmuştur, % 37,5'u arasında ise anlamlı fark bulunmamıştır. Detaylı bakacak olursak kontrol bireyler ve hasta 1, 2, 3, 4, 6'nın DNAH5 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur fakat kontrol bireyler ve hasta 5, 7, 8 arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Mikrograflarda da hasta 1'de silyum distalinde çok az, hasta 5'te silyum proksimalinde çok az, hasta 7'de silyum distalinde ve hasta 8'de silyum boyunca DNAH5 işaretlenmesi saptanmıştır.

DNAH5, dış dynein kolunun bir bileşeni olan dynein aksonemal ağır zincir 5 proteini kodlamaktadır. DNAH5 en sık PCD veya KS hastalarında mutasyona uğramaktadır (100). DNAH5'te homozigot veya bileşik heterozigot mutasyonlar ODA kusurları ve anormal silyum hareketi ile sonuçlanmaktadır (75, 100). PCD'li pediatrik hastaların %39-48,4'ü KS veya situs inversus tanısı almıştır, oran bildirilen %50'den biraz daha düşüktür. DNAH5'teki mutasyonlarla pediatrik hastalar mevcut genetik test sonuçları olan tüm vakaların %15,2-51,9'unu oluşturmuştur (100, 104). Bu yüzdedeki yüksek varyasyon muhtemelen etnik grupların çeşitliliğinden kaynaklanmıştır. DNAH5'teki mutasyonlar ile Pediatrik KS hastalarının oranı yüzde ile daha da düşük olan sadece %2,3–25,9 oranında bulunmuştur bu da pediatrik hastalarda tanı eksikliğini düşündürmektedir (100, 104). DNAH5 mutasyonlu çoğu pediatrik hastalar sadece ODA kusurları göstermiştir ve muhtemelen diğer PCD ile ilgili genlerde ek mutasyonların neden olmasından kaynaklı küçük bir kısmı siliyer ultrastrüktürde karışık kusurlar göstermiştir (100, 104). Çalışmamızda yaptığımız immünofloresan işaretlemede mikrograflardan gözlenen ve ölçülen CTCF değerleri dikkate alındığında genetik olarak DNAH5 mutasyonu olduğu bilinen hastalardan hasta 1, 5, 7 ve 8'de DNAH5 proteininin gözlenmesi ve CTCF ölçümlerinde hasta 5, 7 ve 8 ile kontrol bireyler arasında anlamlı fark bulunmaması aynı DNAH5 mutasyonlu hastaların farklı varyantlı mutasyona sahip olmasından ve literatürde bahsedildiği

üzere (103) ek farklı mutasyonların da gözlenmesinden kaynaklı olacağını düşündürmektedir. Fakat hasta sayımızın 8 ile sınırlı kalması ve kantitatif yöntemlerle DNAH5 proteininin ölçümünün gerçekleştirilememesi bu iş paketinin sınırlı kalmasına neden olmuştur.

Tez çalışmamızın ikinci iş paketinde 8 hastadan alınan nazal sürüntü örneklerinde silyum ön yapımında görevli ZMYND10 ve silyumda radyal çıkıntıya ait silyum varlığını gösteren RSPH9 proteinlerinin çift immünofloresan işaretlenmesi yapılmıştır. Bütün hasta bireylerde silyum boyunca RSPH9 immünofloresan işaretlenmesi gözlenmiştir. Mikrograflarda hasta 2'de ZMYND10 floresan işaretlenmesi silyum proksimalinde ve hasta 6'da sitoplazmada düşük düzeyde gözlenmiştir. Diğer hastalarda ise ZMYND10 floresan işaretlenmesi gözlenmemiştir. Kontrol bireyler ve hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ZMYND10 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri arasında anlamlı fark olduğu saptanmıştır. DNAAF ailesinden olan zinc finger MYND10 (ZMYND10), myeloid, gergin ve DEAF-1(MYND) tip zinc finger domaini içeren ve C-terminus bölgesi protein ön yapımında rol alan, silyumlu hücrelerde silyumsuz hücrelere kıyasla daha çok bulunan bir proteindir (29, 33). ZMYND10, LRRC6 ile etkileşmektedir. ZMYND10, IDA, ODA ve siliyer yapı elementlerinin ön yapımında görevlidir (13, 32). ZMYND10'da bulunan patolojik varyantlar; hatalı anlamlı ve bir büyük delesyon dahil olmak üzere on üç farklı patojenik alel rapor edilmiştir (13, 88). Bialelik yanlış anlam varyantları c.47T>G (p.Val16Gly) olan bireylerde dynein kollarının kısmi tutulması ile silyum hareketliliğinin kısmi tutulması gösterilmiştir. ZMYND10'daki patojenik varyantlar, dış + iç dynein kolu kusurlarına ve statik silyumlara yol açmaktadır (13, 88). Literatürde ZMYND10 ve PCD ilişkisi sınırlı sayıda çalışılmıştır. Farelerde yapılan araştırmada, ZMYND10 mutasyonuna eşlik eden ODA proteinlerinin (DNAI1 ve DNAI2) düşük ekspresyonları saptanmış ve ZMYND10'un bu proteinlerin stabilizasyonunu ve yapımını düzenlediği düşünülmüştür (29). Ayrıca DNAI1 ve DNAI2'deki ekspresyon azalmasının DNAH5 protein ekspresyonundaki azalma ile de korelasyonu bildirilmiştir (29). Raidt ve arkadaşlarının 2014 yılında PCD'nin genetik varyantlarını içeren çalışmasında ZMYND10 defekti olan hastaların bir kısmında ODA/IDA komplekslerinin

defekti ile HSVM'de immotil silya görülmüştür (50). Kurkowiak ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada, randomize olarak genetik tanı almamış ancak klinik tanısı olan hastalarda ZMYND10 defektinin ODA/IDA ile korele olduğunu sınırlı sayıda hastada silyumdaki aksonemlerde DNAH5 ve DNAL1'in immünofloresan analizinde yoklukları ile saptamıştır (32). Cho ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada, ZMYND10 mutasyonunun farelerde aksonem ODA ve IDA defektlerine sebep olduğu ve siliyer hareketin kaybına sebep olduğunu saptamıştır (29). Bu zamana kadar raporlanmış ZMYND10 mutasyonlu hastalarda, azalmış nazal NO, HSVM'de hareketsiz silyumlar, TEM'de dış dynein kolu defekti, immünofloresan işaretlemeye DNAH5 + DNAL1 sinyal yokluğu, solunum semptomları, lateralite defektleri saptanmıştır. Hidrosefali ise raporlanmamıştır (14). Sağlıklı kontrol grubuna oranla DNAH5 mutasyonu olan hastaların hepsinde ZMYND10 floresan seviyeleri düşük çıkmıştır. Fakat hasta 2 ve hasta 6'da düşük düzeyde ZMYND10 işaretlenmesi mikrograflarda rastlanılmıştır ama ZMYND10 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerlerinde hastalar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu da aynı DNAH5 mutasyonlu hastaların farklı varyantlı mutasyona sahip olmasından ve literatürde bahsedildiği üzere (103) ek farklı mutasyonların da gözlenmesinden kaynaklı olacağını düşündürmektedir.

Tez çalışmamızın tez öneri formunda olmayan üçüncü iş paketinde 8 hastadan alınan nazal sürüntü örneklerinde sitoplazmada silyum ön yapımında rolü olabileceği düşünülen GRP78 şaperon proteini ve silyum varlığını göstermek için RSPH9 proteinlerinin çift immünofloresan işaretlenmesi yapılmıştır. Bütün hasta bireylerde silyum boyunca RSPH9 floresan işaretlenmesi gözlenmiştir. Mikrograflarda hasta 2'de GRP78 floresan işaretlenmesi sitoplazmada az; hasta 4'te hücre apikalinde az, hasta 5'te sitoplazmada az düzeyde gözlenmiştir. Diğer hastalarda ise GRP78 floresan işaretlenmesi gözlenmemiştir. Kontrol bireyler ve hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 GRP78 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur. GRP78 işlevi moleküler bir şaperon olarak çalışmaktadır. Yanlış katlanmış proteinlere ve birleştirilmemiş komplekslere bağlanmakta ve katlanmamış protein cevabı (UPR) düzenlemesinden sorumlu ER ile ilişkili yıkılmayı

(ERAD) başlatmaktadır (94). Hücredeki dengenin (homeostaz) standart koşullarında GRP78, aktif olmayan bir biçimde UPR transmembran stres sensörleri olan aktivasyon transkripsiyon faktörü 6'ya (ATF6), protein kinaz RNA benzeri endoplazma retikulum kinaz (PERK) ve inositol gerektiren enzim 1'e (IRE1) bağlıdır (94, 97). Hayvan modeli ile oluşturulan çalışmalarda DNAAF ZMYND10 şaperon yardımcısı FKBP8 ve şaperon HSP90 ile aksonemal dynein ağır zincirlerinin olgunlaşmasındaki ön yapım yolağında önemli bir adıma aracılık etmektedir. ZMYND10 ifadesi baskılanan farelerde ODA ağır zincir (DNAH5, DNAH9) ve orta zincir (DNAI1 ve DNAI2) proteinlerinin azalmış seviyeleri gözlenmiştir (36, 88). Çalışmalarda ZMYND10'un HSP70 şaperon ailesinden moleküler şaperon olan HSC70 ile etkileşime girdiği ve birlikte dynein kollarının yapımı ve katlanmasında rol oynadığı gözlenmiştir (36). ZMYND10-FKBP8-HSP90 kompleksi dynein ön yapımında FKBP8'in iç zarlara ağır zincir katlanmasını bağlayarak fonksiyon görmektedir. Ön yapımın erken aşamalarında, aksonemal dynein ağır zincirleri ayrıca ZMYND10'un FKBP8 ile olan ilişkisi aracılığıyla ER'nin sitozolik yüzüne lokalize olabilmektedir (36). Ağır zincirler daha sonra ZMYND10'dan bağımsız adımda IC1 / 2 kompleksi gibi diğer alt birimlerle kararlı ilişkilere izin vermek için R2TP kompleksi gibi şaperon kompleksine devredilmektedir (36). Glikozla Düzenlenmiş Protein 78 (GRP78) veya ağır immünoglobulin zincir bağlayıcı protein (BiP), ısı şok protein 70 (HSP70) ailesinin bir üyesidir. Tüm ökaryotlarda endoplazma retikulumu (ER) hücre zarında bulunmaktadır (93, 94). Hücre, ER'de biriken katlanmamış proteinlere maruz kaldığında bu stres, GRP78 UPR sensörlerinden serbest bırakıldığında ortaya çıkabilmektedir. UPR'nin aktif formu daha sonra proteinin translasyonu ve doğru katlanmayı artırmaktadır (93, 94). GRP78'in embriyo gelişiminde anti apoptotik, hücre canlılığında ve yaşlanmada rolleri bulunmaktadır (93, 97).

Literatüre baktığımızda ZMYND10 ve HSP70 ailesinden şaperon proteinlerin etkileşimi dış dynein kolu ön yapımında gereklidir (36,89). Hastalarda ZMYND10 ve GRP78 düzeltilmiş toplam hücre floresan (CTCF) ölçümlerinin ortalama değerlerinde kontrol bireylerle kıyaslandığında anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Bu iki proteinin düzeylerinin hastalarda azalmasının dış dynein kolu ön yapımında bozukluk oluşturup

DNAH5 proteininin eksikliğine veya yokluğuna sebep olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, 8 hastadan 5'inde genotip fenotip ilişkilendirilmesini immünofloresan işaretleme ile ortaya koyabildik. Ne var ki son yıllarda PCD tanısında önemi vurgulanan (51) immünofloresan işaretleme ile hastalarda DNAH5 proteininin farklı düzeylerde işaretlendiğini saptadık. Bu da bize DNAH5'in farklı mutasyon alt tipine sahip bireylerde, klinik bulgu ortaya çıksa dahi mutasyona bağlı olarak protein yapım/yıkımının ya da yokluğunun farklı düzeylerde etkilenebileceğini düşündürdü. Devon ve ark. 2020 yılında klinik olarak PCD olabileceği düşünülen hastaların üzerinde yaptığı çalışmada, immünofloresan tekniğinin sensitivitesinin % 68,8 spesifitesini n % 100 olduğunu ve tanı aracı olarak immünofloresanın güvenilir olduğunu saptamışlardır (106). Biz de çalışmamıza dahil etmiş olduğumuz hastaların neredeyse tamamında DNAH5 işaretlemesinin genetik bulguları ile ve klinik ön tanıları ile uyumlu olarak negatif olduğunu göstermiş olduk. Hasta grubumuza dahil olan bireylerin aile üyelerinde DNAH5 mutasyonu taşınsa dahi, her birinin mutasyondan farklı oranda etkilenmiş olması da genetik mutasyonun yol açtığı bozukluğun; protein düzeyi ve klinik düzeyde daha farklı boyutta ve çeşitlilikte olabileceğini gösterdi. Bu bulgular ışığında ileri düzeyde, daha geniş hasta topluluğunda ve kantitatif fonksiyonel proteomiks ve metabolomiks ölçümler, geçirimli elektron mikroskobunda tomografik yöntem ve immüno-gold işaretleme ile yapılacak kapsamlı çalışmalar organel fonksiyon bozuklukları ve mutasyonun neden olduğu ve fenotipe yansımayan protein defektlerini daha iyi açıklamaya yardımcı olabilecektir.

Ayrıca, DNAH5 işaretlemesine ek olarak yapmış olduğumuz ZMYND10 ve GRP78 işaretlemeleri ile de protein yapım defektinin daha detaylı incelenmesini gerçekleştirdik. Bu doğrultuda çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ile kontrolden farklı olarak 8 hastanın 2 'sinden birinde sitoplazmada az ve birinde silyum proksimalinde az paternde ZMYND10 ve 8 hastanın 2'sinde sitoplazmada az ve birinde hücre apikalinde az paternde GRP78 işaretlemesi özelliği gösterdiğini saptadık. Farklı paternde ve kontrole göre zayıf floresan işaretlemeler sonucunda ZMYND10 ve GRP78'in silyum yapım proteinlerinde yapım sürecinde etkili olabileceği

sonucuna ulaştık. İleriki çalışmalarda, detaylı kantitatif protein miktarı ve gen ekspresyonu iş paketleri ile ODA defektleri, şaperon ve silyum yapım faktörlerinin korelasyonunun gösterilmesi literatüre hastalık histopatogenezi konusunda oldukça katkı sağlayacaktır.

Şu anda, PCD için iyileştirici bir tedavi bulunmamaktadır. Dynein kollarının yapımı ve hareketli silyumlara taşınması, DNAAF'lar ve şaperonlar dahil olmak üzere; stabilizasyon katlanma ve dynein kol bileşenlerinin multiprotein komplekslerine ön yapımı, periferik mikrotübüllere bağlanmak için aksoneme intraflagellar taşınma gibi birçok düzenleyici işlemi içeren karmaşık bir süreçtir (107). PCD'de erken tanıda hastaların hayat kalitesi için önemlidir. Tanı araçları kesin tanı koymada hala yetersizdir ve immünofloresan işaretleme tanı aracı olarak morfolojik hasarı saptayabilmede ve genotip-fenotip korelasyonunu göstermede önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada DNAH5 geninde mutasyonu olan hastalarda DNAH5, ZMYND10 ve GRP78 proteinlerinin immünofloresan işaretleme yöntemi ile analizleri yapılmıştır. Çalışmamızda silyumun ön yapımında görevli ZMYND10 ve görevli olabilecek GRP78 proteinlerinin düşük düzeyde olduğu kantitatif olarak saptanmıştır. Çalışmanın kantitatif analiz dışında başka ve çalışmaya ancak 8 hastanın gönüllü olarak katılması sayı olarak çalışmamızın sınırlılıkları olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada ODA defektli hastalarda; genotipin fenotipi nasıl etkilediği, ön yapım proteini olan ZMYND10 düzeyleri azalmış mıdır, şaperon proteinlerinde defekt var mıdır sorularını yanıtlamış olduk. Fakat çalışmamızdaki bulgular daha kapsamlı ve kantitatif çalışmalarla desteklendiği takdirde ileride yapılacak çalışmalarda PCD oluşumunda sitoplazmada silyum ön yapımındaki basamakları aydınlatmada katkı sağlayabilecektir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada; literatürde sınırlı olarak çalışılmış olan silyumun sitoplazmik öncüllerinin yapım aşaması, protein katlanması ve organel ilişkisinin ODA defektleri ile ilişkisinin saptanabilmesi ve küratif tedavisi bulunmayan; siliyer defekt ve rekürren solunum yolu enfeksiyonu nedeni ile mortaliteye sebep olabilen PCD'nin hücrel patogenezinin aydınlatılmasını amaçladık. Bu doğrultuda intrasitoplazmik ve silyum içinde farklı bölgelere lokalize olan şaperon protein, endoplazma retikulumu ve silyum ön yapım proteinlerinin hücre içi protein transasyonu-trafiğini aydınlatılmak için DNAH5, ZMYND10, GRP78 proteinlerini immünofloresan yöntemle işaretledik. Elde etmiş olduğumuz bulguları kantitatif olarak değerlendirdik. Sonuç olarak hastaların DNAH5, ZMYND10 ve GRP78 protein işaretlenmesinin kontrole göre anlamlı olarak azalmış olduğunu saptadık. Bu bulgular ile klinik ve genetik olarak PCD ön tanısı almış olan hastalarda histolojik yöntem ile fenotip genotip ilişkisini analiz edebildik. Çalışmamız, aynı DNAH5 geninde farklı alt mutasyona sahip dış dynein kolu (ODA) defekti olan hastaların; silyum ön yapımında görevli ZMYND10 ve şaperon proteini olan GRP78 proteinleri ile ilişkisinin olduğu kalitatif olarak göstermiştir. Bu bakımdan literatüre katkısı olacağını düşündüğümüz bulgularımız ileriki fonksiyonel çalışmalara temel olarak bilimsel dayanak oluşturmuştur.

7. KAYNAKLAR

1. Leigh MW, Ferkol TW, Davis SD, Lee HS, Rosenfeld M, Dell SD, et al. Clinical Features and Associated Likelihood of Primary Ciliary Dyskinesia in Children and Adolescents. *Ann Am Thorac Soc.* 2016;13(8):1305-13.
2. Shapiro AJ, Davis SD, Ferkol T, Dell SD, Rosenfeld M, Olivier KN, et al. Laterality Defects Other Than Situs Inversus Totalis in Primary Ciliary Dyskinesia. *Chest.* 2014;146(5):1176-86.
3. Ciancio N, de Santi MM, Campisi R, Amato L, Di Martino G, Di Maria G. Kartagener's syndrome: review of a case series. *Multidiscip Respir Med.* 2015;10(1):18.
4. Afzelius B. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science.* 1976;193(4250):317-9.
5. Leigh MW, O'Callaghan C, Knowles MR. The Challenges of Diagnosing Primary Ciliary Dyskinesia. *Proceedings of the American Thoracic Society.* 2011;8(5):434-7.
6. Shah A, Shoemark A, MacNeill SJ, Bhaludin B, Rogers A, Bilton D, et al. A longitudinal study characterising a large adult primary ciliary dyskinesia population. *Eur Respir J.* 2016;48(2):441-50.
7. Damseh N, Quercia N, Rumman N, Dell S, Kim R. Primary ciliary dyskinesia: mechanisms and management. *The Application of Clinical Genetics.* 2017;Volume 10:67-74.
8. Emiralioglu N, Karadag B, Ozcelik HU. Quality of Life Questionnaire for Turkish Patients with Primary Ciliary Dyskinesia. *Turkish Thoracic Journal.* 2017;18(1):19-22.
9. Witman GB, Leszyk J, Agrin N, Pazour GJ. Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *Journal of Cell Biology.* 2005;170(1):103-13.
10. Smith JC, Northey JGB, Garg J, Pearlman RE, Siu KWM. Robust Method for Proteome Analysis by MS/MS Using an Entire Translated Genome: Demonstration on the Ciliome of *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Proteome Research.* 2005;4(3):909-19.
11. Broadhead R, Dawe HR, Farr H, Griffiths S, Hart SR, Portman N, et al. Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature.* 2006;440(7081):224-7.
12. Lie H, Zariwala MA, Helms C, Bowcock AM, Carson JL, Brown DE, 3rd, et al. Primary ciliary dyskinesia in Amish communities. *J Pediatr.* 2010;156(6):1023-5.
13. Zariwala M, Lobo J, Noone P. Primary Ciliary Dyskinesia. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine.* 2015;36(02):169-79.

14. Wallmeier J, Nielsen KG, Kuehni CE, Lucas JS, Leigh MW, Zariwala MA, et al. Motile ciliopathies. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):77.
15. Knowles MR, Daniels LA, Davis SD, Zariwala MA, Leigh MW. Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(8):913-22.
16. Praveen K, Davis EE, Katsanis N. Unique among ciliopathies: primary ciliary dyskinesia, a motile cilia disorder. *F1000Prime Reports*. 2015;7.
17. Horani A, Ferkol TW, Dutcher SK, Brody SL. Genetics and biology of primary ciliary dyskinesia. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2016;18:18-24.
18. Davis SD, Ferkol TW, Rosenfeld M, Lee H-S, Dell SD, Sagel SD, et al. Clinical Features of Childhood Primary Ciliary Dyskinesia by Genotype and Ultrastructural Phenotype. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2015;191(3):316-24.
19. Michael H. Ross WP. *Histology, A Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology*. 2016;7th ed.
20. Ishikawa T. *Axoneme Structure from Motile Cilia*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2017;9(1).
21. Ma M, Stoyanova M, Rademacher G, Dutcher SK, Brown A, Zhang R. Structure of the Decorated Ciliary Doublet Microtubule. *Cell*. 2019;179(4):909-22.e12.
22. Fok AK, Wang H, Katayama A, Aihara MS, Allen RD. 22S axonemal dynein is preassembled and functional prior to being transported to and attached on the axonemes. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1994;29(3):215-24.
23. Fowkes ME, Mitchell DR. The role of preassembled cytoplasmic complexes in assembly of flagellar dynein subunits. *Mol Biol Cell*. 1998;9(9):2337-47.
24. Ahmed NT, Gao C, Luckner BF, Cole DG, Mitchell DR. ODA16 aids axonemal outer row dynein assembly through an interaction with the intraflagellar transport machinery. *J Cell Biol*. 2008;183(2):313-22.
25. Li Y, Zhao L, Yuan S, Zhang J, Sun Z. Axonemal dynein assembly requires the R2TP complex component Pontin. *Development*. 2017;144(24):4684-93.
26. Omran H, Kobayashi D, Olbrich H, Tsukahara T, Loges NT, Hagiwara H, et al. Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature*. 2008;456(7222):611-6.
27. Mitchison HM, Schmidts M, Loges NT, Freshour J, Dritsoula A, Hirst RA, et al. Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia. *Nature Genetics*. 2012;44(4):381-9.
28. Desai PBD, A.B.; Mitchell, D.R. . *Cytoplasmic preassembly and trafficking of axonemal dyneins*. The Biology of Dynein Motors. 2018.

29. Cho KJ, Noh SH, Han SM, Choi WI, Kim HY, Yu S, et al. ZMYND10 stabilizes intermediate chain proteins in the cytoplasmic pre-assembly of dynein arms. *PLoS Genet.* 2018;14(3):e1007316.
30. Tarkar A, Loges NT, Slagle CE, Francis R, Dougherty GW, Tamayo JV, et al. DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. *Nat Genet.* 2013;45(9):995-1003.
31. Horani A, Druley Todd E, Zariwala Maimoona A, Patel Anand C, Levinson Benjamin T, Van Arendonk Laura G, et al. Whole-Exome Capture and Sequencing Identifies HEATR2 Mutation as a Cause of Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics.* 2012;91(4):685-93.
32. Kurkowiak M, Zietkiewicz E, Greber A, Voelkel K, Wojda A, Pogorzelski A, et al. ZMYND10--Mutation Analysis in Slavic Patients with Primary Ciliary Dyskinesia. *PLoS One.* 2016;11(1):e0148067.
33. Zariwala Maimoona A, Gee Heon Y, Kurkowiak M, Al-Mutairi Dalal A, Leigh Margaret W, Hurd Toby W, et al. ZMYND10 Is Mutated in Primary Ciliary Dyskinesia and Interacts with LRRC6. *The American Journal of Human Genetics.* 2013;93(2):336-45.
34. Kott E, Duquesnoy P, Copin B, Legendre M, Dastot-Le Moal F, Montantin G, et al. Loss-of-function mutations in LRRC6, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms, cause primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet.* 2012;91(5):958-64.
35. Horani A, Ferkol TW, Shoseyov D, Wasserman MG, Oren YS, Kerem B, et al. LRRC6 mutation causes primary ciliary dyskinesia with dynein arm defects. *PLoS One.* 2013;8(3):e59436.
36. Mali GR, Yeyati PL, Mizuno S, Dodd DO, Tennant PA, Keighren MA, et al. ZMYND10 functions in a chaperone relay during axonemal dynein assembly. *Elife.* 2018;7.
37. Hayes D, Reynolds SD, Tumin D. Outcomes of lung transplantation for primary ciliary dyskinesia and Kartagener syndrome. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2016;35(11):1377-8.
38. Vanaken GJ, Bassinet L, Boon M, Mani R, Honoré I, Papon J-F, et al. Infertility in an adult cohort with primary ciliary dyskinesia: phenotype-gene association. *European Respiratory Journal.* 2017;50(5).
39. Goutaki M, Meier AB, Halbeisen FS, Lucas JS, Dell SD, Maurer E, et al. Clinical manifestations in primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal.* 2016;48(4):1081-95.
40. Blyth M, Wellesley D. Ectopic pregnancy in primary ciliary dyskinesia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2009;28(3):358-.
41. Lucas JS, Davis SD, Omran H, Shoemark A. Primary ciliary dyskinesia in the genomics age. *The Lancet Respiratory Medicine.* 2020;8(2):202-16.

42. Behan L, Dunn Galvin A, Rubbo B, Masefield S, Copeland F, Manion M, et al. Diagnosing primary ciliary dyskinesia: an international patient perspective. *Eur Respir J*. 2016;48(4):1096-107.
43. Kuehni CE, Frischer T, Strippoli MP, Maurer E, Bush A, Nielsen KG, et al. Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. *Eur Respir J*. 2010;36(6):1248-58.
44. Behan L, Dimitrov BD, Kuehni CE, Hogg C, Carroll M, Evans HJ, et al. PICADAR: a diagnostic predictive tool for primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2016;47(4):1103-12.
45. Lucas JS, Barbato A, Collins SA, Goutaki M, Behan L, Caudri D, et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2017;49(1).
46. Walker WT, Jackson CL, Lackie PM, Hogg C, Lucas JS. Nitric oxide in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2012;40(4):1024-32.
47. Wodehouse T, Kharitonov SA, Mackay IS, Barnes PJ, Wilson R, Cole PJ. Nasal nitric oxide measurements for the screening of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2003;21(1):43-7.
48. Marthin JK, Nielsen KG. Choice of nasal nitric oxide technique as first-line test for primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2011;37(3):559-65.
49. O'Connor MG, Horani A, Shapiro AJ. Progress in Diagnosing Primary Ciliary Dyskinesia: The North American Perspective. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(7).
50. Raidt J, Wallmeier J, Hjejij R, Onnebrink JG, Pennekamp P, Loges NT, et al. Ciliary beat pattern and frequency in genetic variants of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2014;44(6):1579-88.
51. Shoemark A, Frost E, Dixon M, Ollosson S, Kilpin K, Patel M, et al. Accuracy of Immunofluorescence in the Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(1):94-101.
52. Antony D, Brunner HG, Schmidts M. Ciliary Dyneins and Dynein Related Ciliopathies. *Cells*. 2021;10(8).
53. Werner C, Kouis P. Should transmission electron microscopy and ultrastructural cilia evaluation remain part of the diagnostic work-up for primary ciliary dyskinesia? *Ultrastruct Pathol*. 2017;41(6):386-9.
54. Kouis P, Yiallourous PK, Middleton N, Evans JS, Kyriacou K, Papatheodorou SI. Prevalence of primary ciliary dyskinesia in consecutive referrals of suspect cases and the transmission electron microscopy detection rate: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Res*. 2017;81(3):398-405.
55. Knowles MR, Leigh MW, Carson JL, Davis SD, Dell SD, Ferkol TW, et al. Mutations of DNAH11 in patients with primary ciliary dyskinesia with normal ciliary ultrastructure. *Thorax*. 2012;67(5):433-41.

56. Shoemark A, Boon M, Brochhausen C, Bukowy-Bieryllo Z, De Santi MM, Goggin P, et al. International consensus guideline for reporting transmission electron microscopy results in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia (BEAT PCD TEM Criteria). *Eur Respir J*. 2020;55(4).
57. Shapiro AJ, Davis SD, Polineni D, Manion M, Rosenfeld M, Dell SD, et al. Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(12):e24-e39.
58. Goutaki M, Shoemark A. Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia. *Clin Chest Med*. 2022;43(1):127-40.
59. Ferkol TW, Leigh MW. Ciliopathies: the central role of cilia in a spectrum of pediatric disorders. *J Pediatr*. 2012;160(3):366-71.
60. Brown JM, Witman GB. Cilia and Diseases. *BioScience*. 2014;64(12):1126-37.
61. Mitchison HM, Valente EM. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *J Pathol*. 2017;241(2):294-309.
62. Cardenas-Rodriguez M, Badano JL. Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2009;151C(4):263-80.
63. Keeling J, Tsiokas L, Maskey D. Cellular Mechanisms of Ciliary Length Control. *Cells*. 2016;5(1).
64. Kempeneers C, Chilvers MA. To beat, or not to beat, that is question! The spectrum of ciliopathies. *Pediatr Pulmonol*. 2018;53(8):1122-9.
65. Shinohara K, Kawasumi A, Takamatsu A, Yoshiba S, Botilde Y, Motoyama N, et al. Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo. *Nat Commun*. 2012;3:622.
66. Hirokawa N, Okada Y, Tanaka Y. Fluid Dynamic Mechanism Responsible for Breaking the Left-Right Symmetry of the Human Body: The Nodal Flow. *Annual Review of Fluid Mechanics*. 2009;41(1):53-72.
67. Ueno H, Ishikawa T, Bui KH, Gonda K, Ishikawa T, Yamaguchi T. Mouse respiratory cilia with the asymmetric axonemal structure on sparsely distributed ciliary cells can generate overall directional flow. *Nanomedicine*. 2012;8(7):1081-7.
68. Odate T, Takeda S, Narita K, Kawahara T. 9 + 0 and 9 + 2 cilia are randomly dispersed in the mouse node. *Microscopy (Oxf)*. 2016;65(2):119-26.
69. Pampliega O, Cuervo AM. Autophagy and primary cilia: dual interplay. *Curr Opin Cell Biol*. 2016;39:1-7.
70. Delling M, DeCaen PG, Doerner JF, Febvay S, Clapham DE. Primary cilia are specialized calcium signalling organelles. *Nature*. 2013;504(7479):311-4.
71. Satir P, Pedersen LB, Christensen ST. The primary cilium at a glance. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 4):499-503.

72. Nakayama K, Katoh Y. Ciliary protein trafficking mediated by IFT and BBSome complexes with the aid of kinesin-2 and dynein-2 motors. *J Biochem.* 2018;163(3):155-64.
73. Jordan MA, Diener DR, Stepanek L, Pigino G. The cryo-EM structure of intraflagellar transport trains reveals how dynein is inactivated to ensure unidirectional anterograde movement in cilia. *Nat Cell Biol.* 2018;20(11):1250-5.
74. Ibanez-Tallon I, Heintz N, Omran H. To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet.* 2003;12 Spec No 1:R27-35.
75. Olbrich H, Haffner K, Kispert A, Volkel A, Volz A, Sasmaz G, et al. Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nat Genet.* 2002;30(2):143-4.
76. Bartoloni L, Blouin JL, Pan Y, Gehrig C, Maiti AK, Scamuffa N, et al. Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(16):10282-6.
77. Pennarun G, Escudier E, Chapelin C, Bridoux A-M, Cacheux V, Roger G, et al. Loss-of-Function Mutations in a Human Gene Related to *Chlamydomonas reinhardtii* Dynein IC78 Result in Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics.* 1999;65(6):1508-19.
78. Loges NT, Olbrich H, Fenske L, Mussaffi H, Horvath J, Fliegauf M, et al. DNAI2 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Defects in the Outer Dynein Arm. *The American Journal of Human Genetics.* 2008;83(5):547-58.
79. Mazor M, Alkrinawi S, Chalifa-Caspi V, Manor E, Sheffield Val C, Aviram M, et al. Primary Ciliary Dyskinesia Caused by Homozygous Mutation in DNAL1, Encoding Dynein Light Chain 1. *The American Journal of Human Genetics.* 2011;88(5):599-607.
80. Hjeij R, Lindstrand A, Francis R, Zariwala Maimoona A, Liu X, Li Y, et al. ARMC4 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Randomization of Left/Right Body Asymmetry. *The American Journal of Human Genetics.* 2013;93(2):357-67.
81. Hornef N, Olbrich H, Horvath J, Zariwala MA, Fliegauf M, Loges NT, et al. DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(2):120-6.
82. Ferkol TW, Puffenberger EG, Lie H, Helms C, Strauss KA, Bowcock A, et al. Primary Ciliary Dyskinesia-Causing Mutations in Amish and Mennonite Communities. *The Journal of Pediatrics.* 2013;163(2):383-7.
83. Zhu J, Hao P, Chen G, Han C, Li X, Zeller FJ, et al. Molecular cloning, phylogenetic analysis, and expression profiling of endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP genes from bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol.* 2014;14:260.

84. Parodi AJ. Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:69-93.
85. Behnke J, Feige MJ, Hendershot LM. BiP and its nucleotide exchange factors Grp170 and Sil1: mechanisms of action and biological functions. *J Mol Biol.* 2015;427(7):1589-608.
86. Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med.* 2004.
87. Kott E, Legendre M, Copin B, Papon JF, Dastot-Le Moal F, Montantin G, et al. Loss-of-function mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with central-complex and radial-spoke defects. *Am J Hum Genet.* 2013;93(3):561-70.
88. Moore Daniel J, Onoufriadis A, Shoemark A, Simpson Michael A, zur Lage Petra I, de Castro Sandra C, et al. Mutations in ZMYND10, a Gene Essential for Proper Axonemal Assembly of Inner and Outer Dynein Arms in Humans and Flies, Cause Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics.* 2013;93(2):346-56.
89. Martino F, Pal M, Munoz-Hernandez H, Rodriguez CF, Nunez-Ramirez R, Gil-Carton D, et al. RPAP3 provides a flexible scaffold for coupling HSP90 to the human R2TP co-chaperone complex. *Nat Commun.* 2018;9(1):1501.
90. Yamaguchi H, Oda T, Kikkawa M, Takeda H. Systematic studies of all PIH proteins in zebrafish reveal their distinct roles in axonemal dynein assembly. *Elife.* 2018;7.
91. Liu T, Daniels CK, Cao S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2012;136(3):354-74.
92. Brocchieri L, Conway de Macario E, Macario AJ. hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol Biol.* 2008;8:19.
93. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci.* 2019;226:156-63.
94. Hendershot LM, Valentine VA, Lee AS, Morris SW, Shapiro DN. Localization of the gene encoding human BiP/GRP78, the endoplasmic reticulum cognate of the HSP70 family, to chromosome 9q34. *Genomics.* 1994;20(2):281-4.
95. Lee AS. Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells. *Trends in Biochemical Sciences.* 1987;12:20-3.
96. Ting J, Lee AS. Human gene encoding the 78,000-dalton glucose-regulated protein and its pseudogene: structure, conservation, and regulation. *DNA.* 1988;7(4):275-86.

97. Pfaffenbach KT, Lee AS. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23(2):150-6.
98. Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J.* 2011;434(2):181-8.
99. Fliegau M, Olbrich H, Horvath J, Wildhaber JH, Zariwala MA, Kennedy M, et al. Mislocalization of DNAH5 and DNAH9 in respiratory cells from patients with primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(12):1343-9.
100. Wang L, Zhao X, Liang H, Zhang L, Li C, Li D, et al. Novel compound heterozygous mutations of DNAH5 identified in a pediatric patient with Kartagener syndrome: case report and literature review. *BMC Pulm Med.* 2021;21(1):263.
101. Boaretto F, Snijders D, Salvaro C, Spalletta A, Mostacciuolo ML, Collura M, et al. Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia by a Targeted Next-Generation Sequencing Panel: Molecular and Clinical Findings in Italian Patients. *J Mol Diagn.* 2016;18(6):912-22.
102. Takeuchi K, Kitano M, Kiyotoshi H, Ikegami K, Ogawa S, Ikejiri M, et al. A targeted next-generation sequencing panel reveals novel mutations in Japanese patients with primary ciliary dyskinesia. *Auris Nasus Larynx.* 2018;45(3):585-91.
103. Kim RH, D AH, Cutz E, Knowles MR, Nelligan KA, Nykamp K, et al. The role of molecular genetic analysis in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Ann Am Thorac Soc.* 2014;11(3):351-9.
104. Djakow J, Svobodova T, Hrach K, Uhlik J, Cinek O, Pohunek P. Effectiveness of sequencing selected exons of DNAH5 and DNAI1 in diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol.* 2012;47(9):864-75.
105. Maimoona A Zariwala MRKaMWL. Primary Ciliary Dyskinesia. *GeneReviews.* 2019.
106. Baz-Redon N, Rovira-Amigo S, Fernandez-Cancio M, Castillo-Corullon S, Cols M, Caballero-Rabasco MA, et al. Immunofluorescence Analysis as a Diagnostic Tool in a Spanish Cohort of Patients with Suspected Primary Ciliary Dyskinesia. *J Clin Med.* 2020;9(11).
107. Kobayashi D, Takeda H. Ciliary motility: the components and cytoplasmic preassembly mechanisms of the axonemal dyneins. *Differentiation.* 2012;83(2):S23-9.