

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

**DESMİN GENİ c.1289-2A>G MUTASYONUNUN DESMİN PROTEİNİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Uzm. Biol. Nilgün ÇETİN

**Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

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

**ANKARA
2012**

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Program: Doktora

Tez Başlığı: Desmin geni c.1289-2A>G mutasyonunun desmin proteinine etkisinin incelenmesi

Öğrenci Adı-Soyadı: Nilgün ÇETİN

Savunma Sınavı Tarihi: 29 Kasım 2012

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Engin YILMAZ
Hacettepe Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Pervin DİNÇER
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Hayat YURTER
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sevim ERDEM ÖZDAMAR
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Işık YULUĞ
Bilkent Üniversitesi

ONAY

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

Prof.Dr. Ersin FADILLIOĞLU
Müdür

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmama katkılarını esirgemeyen doktora tez danışmanım Prof. Dr. Pervin DİNÇER'e;

Yol göstereci düşünce ve yorumları ile doğru yolda ilerlememizi sağlayan tez izleme komitemdeki hocalarım Prof. Dr. Hayat YURTER'e ve Doç. Dr. Işık YULUĞ'a;

Sabırlı ve öğretici yaklaşımları ile bana zaman ayırdıkları için Prof. Dr. Nuhan PURALI, Prof. Dr. Beril TALİM ve Prof. Dr. Petek KORKUSUZ'a ;

Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında bulunan öğrendiğim bir kelimedede dahi katkısı olan tüm hocalarıma canı gönülden teşekkür ediyorum.

Doktora eğitimim süresince bana destek olan ve bu süreçte en büyük kazanımım olan sevgili arkadaşlarıma, Dr. Ayşe YÜZBAŞIOĞLU'na, sonsuz mutlulukları hak ederken benimle birlikte sıkıntı çeken, asla şikayet etmeyen eşim Kürşat ÇETİN'e, canım kardeşim Nilüfer ÇEKİN'e ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Çetin, N. Desmin geni c.1289-2A>G mutasyonunun desmin proteinine etkisinin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2012. Otozomal resesif limb-girdle kas distrofisi (LGMD2) proksimal kaslarda gelişen güçsüzlük ve atrofi ile tanımlanan klinik ve genetik heterojenite gösteren bir hastalık grubudur. Akraba evliliği sonucu dünyaya gelmiş iki hasta kardeş, klinik ve histopatolojik bulguları sonucu LGMD2 tanısı almıştır. Bu tez çalışmasında LGMD2 tanısı alan iki hasta kardeşde desmin geninde c.1289-2A>G *splice site* mutasyonu saptanmıştır. Desmin geninde ilk kez saptanmış olan bu mutasyon, okuma çerçevesini kaydırmadan RNA dizisine 48 baz ve proteinin kuyruk domainine 428. amino asitten itibaren 16 amino asitin eklenmesine sebep olmaktadır. Mutasyon, anne ve babanın birer allelinde saptanmış olup anne ve baba tamamen sağlıklıdır. İndeks vakada desmin proteinin ifade edildiğinin gösterilmesi, c.1289-2A>G *splice site* mutasyonunun desmin proteinini işlev kaybına uğratmadığını göstermiştir. Ayrıca, hastanın kas biyopsi örneklerinde yapılan elektron mikroskobu görüntülemesi ve histopatolojik değerlendirmeler sonucunda, Z disklerinde kayma olmaması, hücre içi sitoplazmik birikimler gözlenmemesi, fizyopatolojinin nedeninin desmin proteininin etkileşimde olduğu protein/proteinler ile etkileşiminin bozulması olduğunu düşündürmüştür. c.1289-2A>G *splice site* mutasyonu ile proteinin kuyruk domainine 428. amino asitten itibaren eklenen 16 amino asit, literatür bilgisine göre lamin B proteininin desmine bağlanma bölgesini ortadan kaldırmaktadır. Desmin-lamin B etkileşimini araştırmak amacıyla yapılan çift immunfloresan boyama bulguları konfokal mikroskobu ile görüntülenmiş ve hastada desmin ile lamin B'nin etkileşiminin olmadığı gösterilmiştir. Bu etkileşimin bozulmasının çekirdek morfolojisinde bir deformasyon oluşturmamakla birlikte sarkoplazma ile çekirdek arasındaki bağlantıyı zayıflattığını, bu nedenle kasılma ve gevşeme sırasındaki mekanik strese karşı kasın direncini azalttığını, buna bağlı olarak da kas dejenerasyonu olduğunu öngörüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Desmin, mutant desmin, desmin-lamin B etkileşimi

ABSTRACT

Çetin, N. Investigation of the effects of c.1289-2A>G desmin mutation at the protein level. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Medical biology, Ankara, 2012. Autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) is clinically and genetically heterogeneous group of diseases that are characterized by progressive atrophy and weakness of proximal muscles. Two siblings of a consanguineous marriage are diagnosed LGMD2 according to clinical and histopathological findings. In this thesis study, c.1289-2A>G *splice site* mutation on desmin gene is determined in these two siblings diagnosed with LGMD2. The mutation in the desmin gene, defined for the first time, causes in-frame insertion of 48 bp to RNA sequence and insertion of 16 amino acids a to protein sequence in tail domain following 428th residue. The identical mutation was also detected in single allele of both parents, who both were healthy. Illustrating the desmin protein expression in the index case, led us to conclusion that c.1289-2A>G *splice site* mutation doesn't cause loss of function of desmin protein. As a result of the electron microscopy and histopathological examination of the muscle biopsy specimens no sliding on Z-discs was detected and no intracellular deposits were observed, which led us to conclusion that the physiopathology is a consequence of the disruption of protein-protein interactions. According to previous literature data, insertion of 16 amino acids a to desmin protein sequence in tail domain following 428. residue, results in removal of lamin B binding region of desmin protein. To display desmin-lamin B interaction, double-labelled immunofloresance staining followed by confocal microscopy examination was performed, desmin and lamin B interaction was shown to be destroyed. Although the loss of interaction does not lead to a deformation in nuclear morphology, it impairs the nuclear-sarcoplasmic connection; therefore we propose that this impairment weakens muscle resistance against shear stress, which consecutively results in muscle degeneration.

Keywords: Desmin, Mutant desmin, desmin-lamin B interaction

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Desmin ve Desmin Geni	2
2.2. Desmin Yapılanması	4
2.3. Desmin İfadesi ve İşlevi	5
2.4. Desminopati	6
2.5. Desminopatinin Kalıtım Şekli	7
2.6. Desmin Geni Mutasyonları	8
2.7. Miyofibriller Miyopati	10
2.8. Desminle Etkileşen Proteinler	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Gereçler	18
3.1.1. Çalışmada Analiz edilen Aile	18

3.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu	19
3.1.3. DNA Agaroz Jel Elektroforezi (TAE ile)	19
3.1.4. DNA Dizi Analizi	19
3.1.5. RNA İzolasyonu	20
3.1.6. cDNA Sentezi	20
3.1.7. İmmunfloresan Boyama	20
3.1.8. Protein İzolasyonu	21
3.1.9. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	21
3.1.10. Western Blot	21
3.2. Yöntemler	22
3.2.1. <i>DES</i> Aday Geni için Yapılan PZR ve DNA Dizi Analizi Çalışmaları	22
3.2.2. Hasta ve Kontrol Kanından Lenfosit İzolasyonu	25
3.2.3. Hasta ve Kontrol Lenfosit dokusundan RNA İzolasyonu	26
3.2.4. cDNA Sentezi	27
3.2.5. cDNA'den Desmin Mutasyon Bölgesinin PZR Çalışması	28
3.2.6. İmmunfloresan Boyama	29
3.2.7. Protein izolasyonu	34
3.2.8. Protein Konsantrasyon Tayini	35
3.2.9. Western Blot	35
3.2.10. Hasta Biyopsi Materyalinin Elektron Mikroskopunda Değerlendirilmesi	37
3.2.11. Hasta kas biyopsi materyalinin konfokal mikroskopta değerlendirilmesi	37
4. BULGULAR	40
4.1. Klinik Bulgular	40
4.2. c.1289-2A>G Mutasyonunun Aile Bireylerinde Analizi	40

4.3. RNA Dizisi Bulguları	43
4.4. Western Blot Bulguları	46
4.5. Histopatolojik Bulgular	46
4.6. İmmünfloresan Boyama Bulguları	47
4.7. Elektron Mikroskobu Bulguları	48
4.8. Protein Veri Tabanları Kullanılarak Aday Proteinlerin Belirlenmesi	49
4.9. Aday proteinlerin belirlenmesi ve İmmunfloresan Boyama Bulguları	51
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bag3	Bcl-2 associated athanogene 3
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
bç	Baz çifti
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Complementary DNA
CK	<i>Creatin Kinase</i>
°C	Derece santigrad
DAG	Dystrophin Assosiated Glycoprotein complex
dk.	Dakika
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HRP	<i>Horse Radish Peroksidase</i>
kDa	Kilo Dalton
LGMD2	<i>Limb Girdle Muscular Dystophy</i>
LINC	<i>Linkers of the Nucleocytoskeleton to the Cytoskeleton</i>
MgCl ₂	<i>Magnesium Cloride</i>
Mb	Mega base
mM	Mili Mol
mm ³	Milimetre küp
µl	Microlitre
nm	Nanometre
ng	Nanogram
PAGE	Poliakrilamid Gel Elektroforesis
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

PFA	Paraformaldehit
pM	Piko Mol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Revolutions per minute
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	Single Nuclotide Polymorfism
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
Taq	<i>Thermophilus Aquaticus</i>
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20
U	<i>Unite</i>
ZASP	<i>Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1	Desmin yapılanmasının şematik görüntüsü	5
2.2	Bugüne Kadar Tanımlanan Desmin Geni Mutasyonları ve Yerleşimleri	8
2.3	Desminin Hücre İçindeki Organizasyonu	13
2.4	LINC Kompleksi	16
3.1	Analiz edilen Aile Ağacı	18
3.2	<i>Flouresance bleed through</i> görüntüsü	38
4.1	I:1 nolu bireyin DNA dizi analizi	41
4.2	I:2 nolu bireyin DNA dizi analizi	41
4.3	II:1 nolu bireyin DNA dizi analizi	42
4.4	II:2 nolu bireyin DNA dizi analizi	42
4.5	II:4 no'lu bireyin DNA dizi analizi	43
4.6	Mutasyon bölgesinin cDNA dizi analizi	44
4.7	Lenfosit cDNA'dan PZR ile mutasyon bölgesinin çoğaltılması	45
4.8	c.1289-2A>G mutasyonunun RNA ve protein üzerindeki yerleşimi	45
4.9	Desmin proteinine özgü antikorla yapılan western blot analizi	46
4.10	Hasta iskelet kas biyopsi kesitinin histopatolojik boyaması	47
4.11	Hasta iskelet kası biyopsi kesitinde desmin antikoruyla yapılan immunfloresan boyama	48
4.12	Hasta iskelet kasının boyuna kesitinin elektron mikroskobu görüntüsü	49
4.13	Desmin ve mutant desmin proteinlerinin üç boyutlu yapısının karşılaştırılması	51
4.14	Desmin ve sinemin proteinlerinin hasta ve kontrol kas dokusunda çift immunfloresan boyaması	53
4.15	Desmin ve sinkoilin proteinlerinin hasta ve kontrol kas dokusunda çift immunfloresan boyaması	54
4.16	Hasta ve kontrol kas dokusunda desmin ve plektin proteinlerinin çift immunfloresan boyama sonuçlarının konfokal mikroskobu görüntüsü	55

4.17	c.1289-2A>G <i>splice site</i> mutasyonu sonucu desmin proteinine eklenen 16 amino asitin ve lamin B'nin desmine bağlanma bölgesinin desmin proteini üzerinde gösterilmesi	56
4.18	Kontrol kas biyopsi kesitinde desmin (yeşil) ve lamin B (kırmızı) çift immunfloresan boyaması	57
4.19	Hasta kas biyopsi kesitinde desmin (yeşil) ve lamin B (kırmızı) çift immunfloresan boyaması	58
4.20	Hasta kas biyopsi kesitinde rejenere bir kas hücresinde gözlenen merkezi çekirdekte desmin (yeşil) ve lamin B (kırmızı) çift immunfloresan boyaması	58
4.21	Hasta kas biyopsi kesitinde desmin (yeşil) ve lamin B (kırmızı) çift immunfloresan boyaması	59
4.22	Kontrol kas biyopsi kesitinde sekonder antikor ile boyama özgüllüğünün kontrolü	59
4.23	Hasta iskelet kas kesitinde çekirdek yapısını ve yerleşimini gösteren elektron mikroskobu görüntüsü	60
4.24	Çekirdek proteinlerinin yerleşimi	61
4.25	Kontrol ve hasta kas biyopsi kesitinde Lamin A/C ve Emerin yerleşimini ve ifadesini gösteren immunfloresan boyama	61
4.26	Kontrol ve hasta kas biyopsisinde HP1 ve NUP153'ün yerleşimini ve ifadesini gösteren immunfloresan boyama	62

TABLÖLAR DİZİNİ

2.1	Desminle etkileşimde olduğu bilinen proteinler	15
3.1	Desmin Geni PZR Primer Dizileri	23
3.2.	Desmin Geni Mutasyonu İçeren Bölge için cDNA Primer Dizileri	28

1. GİRİŞ

Otozomal resesif limb-girdle müsküler distrofi (LGMD2) ve desminopati nöromüsküler hastalıklar altında değerlendirilen farklı proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonların sebep olduğu kas hastalıklarıdır. Klinik olarak heterojen olan desminopati hastalığı sıklığı bilinmeyen, nadir gözlenen hastalıklardandır. Temel klinik bulguları gelişen kas güçsüzlüğü, solunum yetmezliği ve kardiyomiyopatidir. Bu iki hastalığı, teşhisinde birbirinden ayıran en önemli bulgu histopatolojik değerlendirmelerde desminopatilerde gözlenen hücreiçi birikimlerdir. Klinik ve histokimyasal bulguları desminopatiye özgü hiçbir özellik taşımayan bir LGMD2 vakasında, ilk kez desmin geninde mutasyon tesbit edilmiştir. Tanımlanan mutasyon desmin geninde bugüne kadar rastlanmayan yeni bir mutasyondur. Hastanın klinik ve histopatolojik bulgularının mutasyonun bulunduğu genin şimdiye kadar bilinen özelliklerinden farklı olması bu aileyi araştırılmaya değer kılmıştır. Nöromüsküler kas hastalıklarının birçoğunun birbirlerinden çok farklı klinik bulgular taşımalarına rağmen aynı genin farklı mutasyonlarından kaynaklanan patogenezi, hastalıkların fizyopatolojilerinin açıklanmasını oldukça güçlendirmektedir. Bu sebeple bu gibi kuraldışı durumların araştırılması hastalıkların patogenezinin aydınlatılmasında büyük öneme sahiptir.

Bu doktora tez çalışmasında LGMD2 fenotipi gösteren hastada yapılan çalışmalar desminopati hastalığına sebep olan desmin proteinini kodlayan desmin geninde c.1289-2A>G *splice site* mutasyon bulunduğunu göstermiştir. Bu mutasyonun sebep olduğu hasar DNA, RNA ve protein düzeyinde incelenmiştir. Ayrıca desmin geninde gözlenen mutasyonun, proteinin diğer proteinlerle olan etkileşimini etkileyip etkilemediğini araştırmak için desminle etkileşime giren bazı proteinler mercek altına alınmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Desmin ve Desmin Geni

Desmin kas hücrelerinin temel ara filament proteini'dir. 53kDa ağırlığındaki bu protein iskelet kası, kalp kası ve düz kasta ifade olur. Olgun iskelet kasında desmin, Z disklerde miyofibril yapılarını birarada tutar ve miyofibrilleri sarkolemmaya bağlar (1). Desmin, bağlantılı olduğu diğer ara filament proteinleri ile ağ yapısı oluşturarak miyofibrillerin çekirdeğe, mitokondriye ve sarkolemmaya bağlantısını sağlayarak, kas hücresinin kasılma ve gevşemesi sırasında hücresel bütünlüğün korunmasını ve güç aktarımını kolaylaştırır (1,2). Kalp kasında desmin proteini *intercalated* disklerde ve *purkinje* fibrillerinde gözlenmektedir (3).

İnsanda desmin proteinini kodlayan *DES* tek kopya olarak kromozom 2q35 bandında yerleşmiştir (4). Uzunluğu 8,4 kb olan bu gen bölgesinde 9 ekson bulunur ve 470 amino asit kodlanır (5). Desmin proteini diğer ara filament proteinlerinde olduğu gibi üç domaine ayrılmıştır. Amino ve karboksil uçlarında bulunan baş ve kuyruk domainleri ve bunların arasında oldukça korunmuş alfa-helikol *rod* domaini yer alır (6). Ara filamentler arasında boyut ve dizi farklılığı gösteren baş domaini desminde 84 amino asit uzunluktadır. Baş domaini ara filamentlerin doğru yapılması için gereklidir (7). Enzimatik reaksiyonlarla ilk 67 amino asiti kesilen desmin baş domaininin tetramer yapısını oluşturamadığı gözlenmiştir. Baş domaini çıkartılmış desminin bir dereceye kadar polimerize olduğu görülmüştür (8). Baş domaininde bulunan Ser59 amino asiti AuroraB proteininin özgül fosforilasyon bölgesidir (9). *Rod* domaini 308 amino asit içerir ve hidrofobik ve hidrofilik amino asitlerin yer aldığı heptat tekrarları (yedili tekrarlar) oluşur (10). Bu heptat tekrarları iki polipeptidin homopolimerik sarmal oluşumuna yardımcı olarak filamentin temel ünitesini yapılandırır. Helikal *rod* domainindeki heptat tekrarları üç kısımda kesintiye uğrar. Bu bölgeler L1, L12, L2 (*linker*), arada kalan dört alfa-helikol segment ise 1A, 1B, 2A, 2B şeklinde adlandırılır. Omurgalılarda sitoplazmik ara filament proteinlerinin tek bir alfa helikal segmentinin uzunluğu tümüyle korunmuştur. 2B segmentinde bulunan sekizinci heptat tekrarının sonunda fazladan dört amino asidin bulunması heptat tekrarlarını kesintiye uğratar. Bu

dört amino asidin bulunması nedeniyle oluşan yapı, *stutter* adı verilen, ara filament proteinlerinde pozisyonu korunmuş, sarmalın açıldığı bir yapıyı ifade eder (11). Bu yapı tüm ara filament proteinlerinde görülür (12). Deneysel çalışmalarda heptat tekrarlarının devamlılığını sağlayan üç amino asitin diziye eklenmesiyle fazladan bir heptat tekrarı içeren molekül oluşur (13). Bu yapıya uyum sağlayabilmek için sarmal, *stutter* yapının çevresinde hafifçe açılır. Açılma proteinin yapılanmasını ve etkileşim özelliklerini etkiler.

2B heliksinin karboksil ucunda incelenmiş başka bir yapı 405-YRKLLEGEESRI-416 motifidir. Bu motifden önce gelen bir dizi amino asitle birlikte YRKLL peptidinden itibaren sarmal yapı kaybolur ve alfa heliksler EGEE seviyesinde bükülerek aşama aşama ayrılırlar (14). *In vitro* bilgiler bu motifin tetramerlerin uygun bir şekilde oluşması için yönlendirici olduğunu göstermiştir.

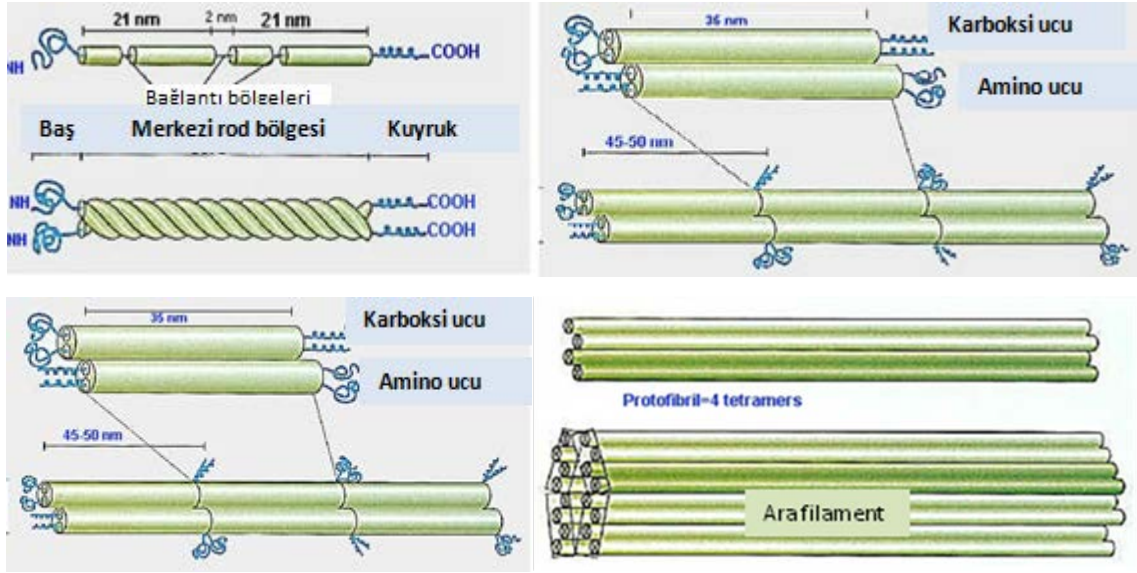
Desmin kuyruk domaini %30'u beta-tabakalı yapıda olan, geriye kalan kısmı heptat tekrarlarından yoksun rastgele yapılanmış bir bölgedir. Desmin kuyruğu antiparalel tetramer yapılanmasında, lateral paketlenmenin stabilizasyonu ve kontrolünde, filament yapısının uzamasında ve korunmasında görevlidir (15,16). Bununla birlikte kuyruğun en önemli fonksiyonu, sitoplazmik ara filament ağını oluşturmak için hücre iskelet proteinleriyle etkileşimi sağlamasıdır (17). Desminin kuyruk domaininde bugüne kadar 11 farklı mutasyon tespit edilmiştir . Bunlardan p.Thr442Ile, p.Arg454Trp, p.Ser460Ile, p.Glu413Lys, p.Lys449Thr, p.Ile451Met, p.Val469Met mutasyonları taşıyan desmin proteini filament oluşturabilme özelliğine göre Bar ve arkadaşları tarafından 2007 yılında araştırılmıştır (18). Çoğunlukla kalp kasını etkileyen bu mutasyonlar sitoplazmik ara filament ağı bulunmayan epitelyel hücre hattı SW13 hücrelerine ve sitoplazmik ara filamentleri desmin olan, fare miyoblast hücre hattı olan C2C12 hücrelere transfekte edilmiştir. p.Arg454Trp ve p.Ser460Ile hariç diğer kuyruk domaini mutasyonları yabancı tip desmin içeren hücrelerdeki benzer filament ağı oluşturdukları gözlenmiştir. “*In vitro* yapılanma” çalışmasıyla 10 sn., 5 dk. ve 60dk.’lık zamanlarda desmin proteininin tek bir üniteden eklenerek filament oluşturma özelliği araştırıldığında yalnızca p.Glu413Lys mutasyonu taşıyan desminde yabancı tip desmine göre ağ oluşumu daha geç başlamıştır (18). Bar ve arkadaşları 2010 yılında

çalışmayı kantitatif ölçümlerle desteklemiştir. Bu mutasyonların yanısıra kuyruk domaini bulunmayan desmini ifade eden vektörü transfekte edip kuyruk domaininin işlevi hakkında araştırmalar yapılmıştır. Kuyruk domaininde mutasyon bulunan ve kuyruk domaini bulunmayan desmin ifade eden hücrelerin ağ oluşumları ölçüldüğünde, filament çapında ya da uzama katsayılarında yabancı tip desmin ifade eden hücreye benzer sonuçlar elde edilmiştir. Mutasyonların filament mimarisini değiştirerek filament elastikiyetini azalttıkları gösterilmiştir (19).

Baş ve kuyruk domainlerinin translasyon sonrası modifikasyon bölgeleri olduğu düşünülmektedir. Bu domainler hücre döngüsü ve farklılaşması aşamalarında ara filamentin organizasyonunu sağlar. Ara filament proteinleri arasında baş ve kuyruk domaini uzunluk ve amino asit dizisi açısından farklılık gösterir. Bu dizi çeşitliliği, translasyon sonrası modifikasyonlar ile ara filamentin dokuya özgül işlev görmesini sağlar (20).

2.2. Desmin Yapılanması

Desmin yapılanması iki desmin monomerinin *rod* domainlerinden halat gibi sarılarak dimer oluşturmasıyla başlar. Dimer oluşturan ara filamentlerin baş ve kuyruk domainleri aynı hizadadır. (Şekil 2.1) Sarmal yapıdaki iki dimer baş ve kuyruk domainleri anti-paralel gelecek şekilde bir araya geldiğinde tetramer yapısı oluşur. 4 tetramer birlikte paketlenerek protofibril adını alır (Şekil 2.1). İki protofibril birlikte paketlenerek ortalama uzunluğu ~58nm ve çapı ~16nm olan yapıyı oluşturur. 16nm'lik bu birimler tekrar paketlenerek 10nm'lik üniteleri; 10nm'lik üniteler de yan yana paketlenerek 120nm'lik desmin ara filamentini oluştururlar. Fizyolojik koşullar filamentin doğal olarak yapılanmasını sağlar ve kofaktöre ihtiyaç duyulmaz (21-23) .



Şekil 2.1 Desmin Yapılanmasının Şematik Görüntüsü

Desmin protein kinaz A, protein kinaz B, Cdc2 kinaz, Rho assosiyе kinaz ve AuroraB kinaz tarafından Thr-16, Ser-11, Ser-59, Thr-75, Thr-76 amino asitlerinden fosforilllenir. Hücre bölünmesi sırasında desmin üzerinde oluşan modifikasyonlar nedeniyle desmin ara filament ağı bozularak sitokineze yardımcı olur.

2.3. Desmin İfadesi ve İşlevi

Desmin, titin, miyozin ağır zincir, nebulin ve aktin gibi kasa özgü proteinler içerisinde embriyonik dönemde ifadesi en erken gözlenen proteindir. Fare embriyosunun gelişimi süresince ilk kez döllenmeden sonraki 8,25. günde ektoderimde vimentin ve keratinle birlikte ifade edilir. Kalp rudimentinde ifadesi 8,5. günde gözlenmektedir. Kardiyogenezden sonra miyokardiyal hücrelerde sentezi artarak devam eder. 9. günden sonra ise miyotomlarda saptanır. Desminin MyoD'den önce kasta Myf 5 ile birlikte ifade edildiği bilinmektedir (24).

İki farklı laboratuvar tarafından eş zamanlı oluşturulan desmin (-/-) fareler üzerindeki araştırmalar desminin işlevini anlamak açısından dönüm noktası olmuştur. (25,26). Bu çalışmalarda, desmin-/- farede somitogenez, kas oluşumu, kas olgunlaşması,

kas dejenerasyonu ve rejenerasyonu detaylı olarak çalışılmıştır. Bu fareler üretken ve normal gelişim göstermişlerdir. Erken dönem kas farklılaşmasının ve hücre füzyonunun normal olduğu gözlenmiştir. Ancak, doğumdan sonra özellikle dil, soleus ve diyafram kaslarında, düzensiz miyofibriller organizasyon göze çarpmaktadır. Kaslarında, subsarkolemmal mitokondri birikimi ve kalp ve iskelet kasında distrofik değişiklikler ve ilerleyici kas zayıflığı gözlenmektedir. Ayrıca fare, postnatal dönemde kardiyomiyosit lizisi, makrofaj infiltrasyonu, farklı seviyelerde kalsifikasyon ve sonunda kardiyomiyopati geliştirmiştir. Kas fibrilleri yerini bağ dokusuna bırakmıştır. Erişkin *knockout* farelerde desminin yokluğunun, ağır iskelet ve kalp kas yapısı bozukluğu sonucu oluşan çoklu organ bozukluklarına sebep olduğu gösterilmiştir. Desmin filamentlerinin yokluğu, primer kas oluşumunu ve rejenerasyonu etkilememiştir. Ancak, rejenere fibrillerde gözlenen anormal miyofibrilogenez, desminin kas fibril tamirinde de rolü olabileceğini göstermiştir.

2.4. Desminopati

Miyofibriller miyopati, olarak adlandırılan hastalık grubunun bir alt grubu olan desminopati iskelet ve kalp miyopatisi olarak tanımlanır. Özellikle hücre içi granüler ve filamentöz materyalleri içeren sitoplazmik birikimler bu miyopatilerde görülen karakteristik özelliştir. Hastalık distal bacak kaslarında başlayarak proximal kaslara ya da proximal kaslardan distal kaslara yayılarak kas zayıflığı sonucunda, hastayı tekerlekli sandalyeye bağımlı hale getirir. Hastalığın başlangıç yaşı ve gelişimi, kalıtım tipine ve mutasyonun protein üzerindeki yerleşimine göre çeşitlilik gösterir. Hastalıkta tipik olarak kol ve bacak kaslarındaki zayıflığın gövdeye, boyun ve yüz kaslarına yayıldığı gözlenir. İskelet miyopatisi sıklıkla iletim bozukluğunun, aritminin ve ani ölümlere sebep olan kronik kalp yetmezliğinin geliştiği kardiyomiyopati ile seyrederek.

Desmin pozitif materyallerin hücrede birikimi, bir çok noktada sitoplazmik inklüzyonlar ve küremsi kitleler, granülofilamentöz materyallerin dağınık birikimleri şeklinde görülebilir. Desmin dışında bu agregatların içinde α B-kristallin, distrofin, aktin, ubikütin, sinkoilin, sinemin, nestin, plektin, gelsolin, sarkoglikanlar, NCAM ve filamin

C bulunur (27). Histolojik olarak desmin agregatlarının dışında miyofibriler düzensizlik ve sarkomer integritesinin kaybı da desminopati için ayırteci özelliklerdir.

2.5. Desminopatinin Kalıtım Şekli

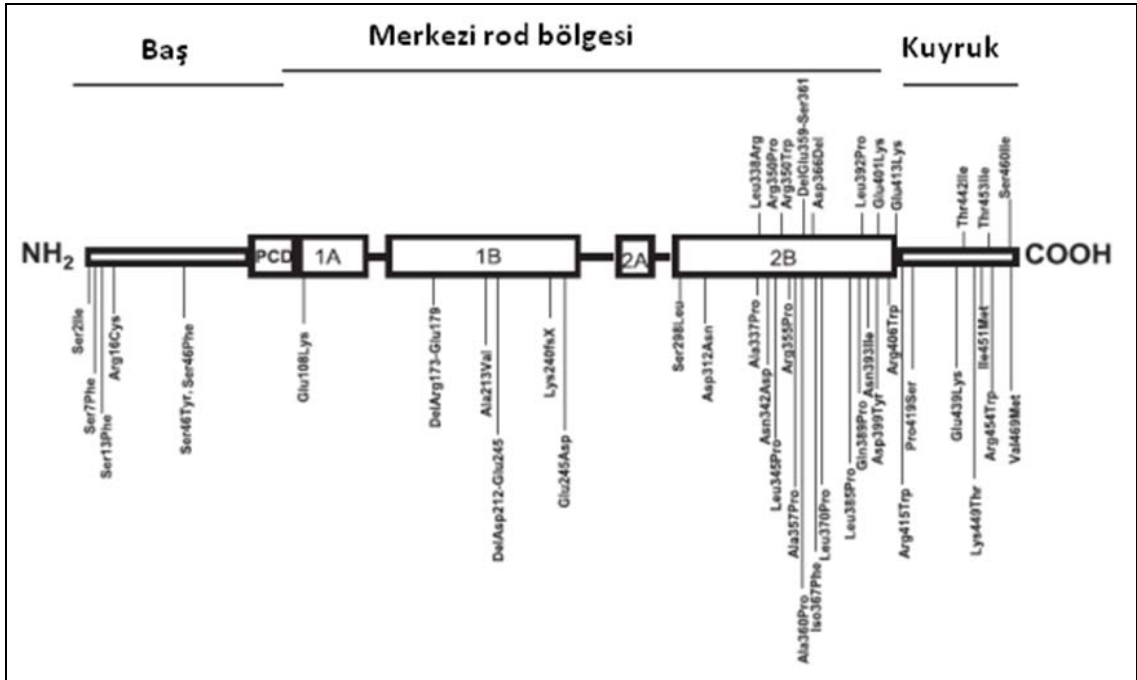
Pekçok olgu, aile hikayesi taşımayan yeni mutasyonlarla ortaya çıkarken, ailesel vakalar genellikle otozomal dominant kalıtım modeli gösterir. Literatürde otozomal resesif kalıtım ile hastalığın aktarıldığı yalnızca iki vaka bildirilmiştir (28). 1B helisinde 7 amino asit için homozigot delesyon (p.Arg173_Glu179del) taşıyan bir hastada özellikle üst ekstremitelerde distal kaslarında zayıflık ve atrofi geliştiği gözlenmiştir. Ekokardiyografi kalbin sağ odacığında genişleme olduğunu göstermiştir. Hastalık ilerledikçe kalp ve solunum bozukluğuna ve intestinal tıkanıklığa sebep olmuş ve 28 yaşında ani ölümle sonuçlanmıştır. İskelet miyofibrillerinde bol miktarda sarkolemma-altı yayımlı yarımay şekilli eosinofilik kütleler ve kardiyomiyositlerde merkeze yerleşmiş eosinofilik desmin ve ubiquitin birikimleri gözlenmiştir. Ultrayapısal çalışmalar Z çizgisi ile devam eden iri granüler ve filamentöz agregatların varlığını göstermiştir.

İkinci ailede, üçüz kardeşler “*compound*” heterozigot olarak p.Ala360Pro ve p.Asn393Ile desmin mutasyonu taşımaktadır (29). Ekokardiyografi, normal ventrikül büyüklüğü olmakla birlikte ağır biatrial genişleme bulgusunu vermiştir. 20-24 yaşları arasında üç kardeşte de gelişen kas zayıflığı ile birlikte gövde ve ekstremitelerde harabiyet gelişmiştir. Üçüzlerde, yüz ve boyun kaslarında zayıflık, yutkunma ve nefes alma zorlukları gözlenmiştir. Üç kardeş de 28, 30 ve 32 yaşlarında kalp yetmezliğinden kaybedilmiştir. Histopatolojik bulgular miyofibril içlerinde karakteristik sarkolemma altı yayılımıyla amorf desmin birikimlerini gösterir. Ailede pekçok ileri yaşta aile ferdi p.Ala360Pro ya da p.Asn393Ile mutasyonlarından birini taşımakla birlikte, kalp ya da kas fenotipi göstermemiştir.

2.6. Desmin Geni Mutasyonları

Bugüne kadar desmin geninde 60 kadar farklı mutasyon tespit edilmiştir. Klinik özellikleri iskelet miyopatisi, kardiyomiyopati, solunum yetmezliği, nöropati, düz kas bozuklukları gibi, bir yada birkaç karakteristik belirti ile çeşitlilik gösterir.

112 amino asit içeren ekson 1 tarafından kodlanan baş domaininde 6 mutasyon tespit edilmiştir. Ekson 1'in kodladığı 1A heliksinde ve ekson 4 ve 5'in kodladığı 2A heliksinde mutasyona rastlanmamıştır.



Şekil 2.2 Bugüne Kadar Tanımlanan Desmin Geni Mutasyonları ve Yerleşimleri (30)

Büyük bir kısmı nokta mutasyonları olmakla birlikte az sayıda delesyon, insersiyon ve *exon-skipping* türü mutasyonlar gözlenmiştir (28). Görülen mutasyonların %50'si proteinin oldukça korunmuş alfa- helikal domaininde 2B segmentinde, az sayıda mutasyon ara filament proteinleri arasında uzunluk ve amino asit dizisi açısından farklılık gösteren kuyruk domaininde bulunur (20).

Desmin 1B heliksinde 21 nükleotitin homozigot delesyonu ile 7 amino asitin (Arg173_Glu179) kaybı, mRNA okuma çerçevesini bozmamakla birlikte hastada birçok semptom gözlenmiştir. Ancak, *in vitro* mutagenез çalışması, hücre kültüründe desminin ara filament olarak yapılandığını göstermiştir (31). Bununla birlikte p.Ala213Val mutasyonu desminin ifade edilmediği SW13 hücrelerinde filamentöz ağ oluşturmuştur. C2C12 fare miyoblast hücre hattında ise varolan filament ağının bozmadır (32). 239. kodonu takiben gözlenen adenin insersiyonu ise, mRNA okuma çerçevesini bozarak, 243. kodonun dur kodonuna dönüşmesine ve 27 kDa ağırlığında erken sonlanmış bir protein oluşumuna neden olmuştur. Transfeksiyon çalışmaları bu mutasyonun hücrede varolan desmin ağının bozulmasına sebep olduğunu göstermiştir. Hatalı kas hücrelerinde mutasyonun mitokondrinin hücreiçi dağılımını ve biyokimyasal özelliklerini etkilediği gözlenmiştir (33).

Desminin 96 baz (32 kodon) içeren 3. eksonunun verici ve alıcı *splice site* bölgelerinde gözlenen baz değışiklikleri bir çok amino asitin kaybına neden olur. p.Asp214_Glu245 mutasyonu, 32 amino asidin eksikliği ile ekson 3'ün ortadan kalkmasına neden olmakla birlikte mRNA'nın okuma çerçevesi bozulmadığından desmin polipeptidi sentezlenmiştir (34). Ancak, heptat tekrarı bozulduğundan sarmal yapısı korunamaz. Delesyonun varlığı RNA seviyesinde de kanıtlanmıştır. İşlev analizleri SW13 hücrelerinde 32 amino asiti eksik olan desminin filamentöz ağ oluşturma yeteneğinde olmadığını göstermiştir (34). Bunun nedeni, birçok proteinin bağlanma bölgesinin bu segmentte bulunmasıdır.

2B heliksinde gözlenen yanlış anlamlı mutasyonların çoğunluğu prolin amino asidinin oluşumuna neden olmuştur. Prolin desmin helikal *rod* domainin normal yapısında bulunmaz, nedeni ise prolinin heliks yapısında bükülme yaratmasıdır (35). Prolinin alfa-heliks üzerindeki stabilize edici etkisinin yanında hidrojen bağı oluşturma yetisi de yoktur. Mutagenез çalışmaları, mutasyon sonucu prolin taşıyan proteinin kısa, zayıf ve kırılmış anormal filament yapılanması olduğunu göstermiştir (36).

Heliks yapısında olmayan ve heptat tekrarlarından yoksun olan desmin kuyruk domaini diğere hücre iskeleti proteinleri ile etkileşimi sağlayarak sitoplazmik ara filament

ağının kurulmasında rol alır. Bu proteinlerle etkileşimin kurulamaması hastalık gelişimini tetikler. Kuyruk domaini mutasyonlarının SW13 hücrelerindeki ifadesi normal filament ağının oluşumuyla sonuçlanır. p.Thr442Ile, p.Lys449Thr, p.Ile451Met, p.Val469Met mutasyonlarını taşıyan vektörler, C2C12 hücre hattına transfeksiyon yapıldığında desminin alfa-helikal domaininde bulunan mutasyonların aksine, varolan ara filament organizasyonu üzerinde dominant negatif etki göstermediği gözlenmiştir. Bununla birlikte kuyruk domaini mutasyonları alfa-helikal domaini mutasyonları gibi, ağır kalp ve iskelet miyopatisine sebep olur (18).

2.7. Miyofibriller Miyopati

Miyofibriller miyopati genetik olarak heterojen bir hastalıktır. Desmin, alfa-B kristallin, Bag 3, Miyotilin, ZASP ve Filamin C proteinlerini kodlayan genlerde görülen mutasyonlar miyofibriller miyopati fenotipini oluşturur. Bu fenotip en temel olarak kas zayıflığı, kardiyomiyopati ve hücre içi agregat oluşumunu içerir (37) Miyofibriller miyopatinin alt grupları mutasyonun bulunduğu proteine göre desminopati, alfa-B kristallinopati, Bag3opati, Miyotilinopati, Zaspopati, Filaminopati olarak adlandırılır. Alfa-B kristallin, desmin proteinini doğru konformasyonda tutarak agregat oluşumunu engelleyen bir şaperon proteindir (38). p.Arg120Gly mutasyonu bulunan alfa-B kristallin SW13 ve BHK21 hücrelerinde ve transgenik fare kardiyomiyositlerinde ifade edildiğinde desmin ve alfa-B kristallin içeren agregatların oluştuğu gözlenir (39).

Miyotilin, Z-disklere bağlanan iskelet kasında yüksek, kalp kasında zayıf ifade edilen bir proteindir. Hidrofobik ve serince zengin amino ucu, Ig benzeri iki domain ve karboksil ucu kuyruk bölgesi içerir. Miyotilin, aktin filamentleri, filamin C ve periferik Z disk proteinleri ile çapraz bağ yapan ve temel Z disk komponenti olan alfa aktinine bağlanır. Miyotilin aktin filamentlerine çapraz bağlanır ve geç dönem miyofibrilogenез sırasında miyofibrillerin uzamasında rol oynar (40). Miyotilin mutasyonu LGMD1A fenotipiyle ilişkilendirilirken, bazı hastaların klinik bulgularında bazı kas fibrillerinde sadece Z disk bozuklukları olması mutasyonun miyofibriller miyopati fenotipine de sebep olduğunu göstermiştir (41).

ZASP (*Z band alternatively spliced PDZ-motif containing protein*) çoğunlukla kalp ve iskelet kasında ifade edilir (42). ZASP, Z filament yapısal bileşeni olan ve bitişik sarkomerin ince filamentlerine çapraz bağlanan alfa aktinine bağlanır. Miyofibriller miyopati fenotipi gösteren 11 hastada ZASP geninde heterozigot yanlış anlamlı mutasyon tespit edilmiştir (43). Hastaların çoğu kas zayıflığı gösterirken bir tanesinde çarpıntı ve yüksek CK (*Creatin Kinase*) seviyesi tespit edilmiştir (43).

Filaminler, aktin filamentlerinin organizasyonu ve zar stabilizasyonu yanında sinyal proteinleri için *scaffold* görevi görür. Filamin C pek çok Z disk proteini ve sarkolemmada γ - ve δ -sarkoglikanlarla ilişkidir (44). Filamin C'nin son eksonunda bulunan p.Trp2710X mutasyonu geniş bir Alman ailesinin 17 ferdinde tespit edilmiştir. Başlangıç yaşı 24 ila 60 arasındadır. Tüm hastalarda gelişen kas zayıflığı, kardiyomiyopati, solunum yetmezliği ve normalden 10 kata kadar değişen CK seviyesi gözlenir (45).

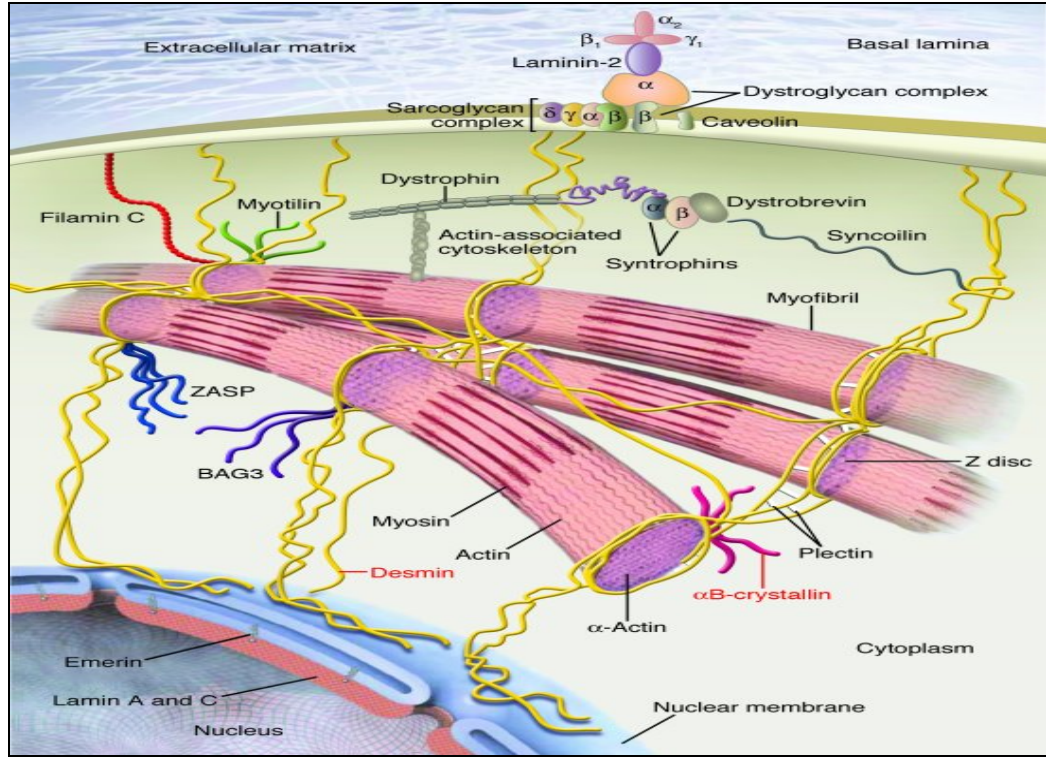
Bag3 (*Bcl-2 associated athanogene 3*) pekçok polipeptitle etkileşimi olan çok domainli bir proteindir. İskelet ve kalp kasında yüksek seviyelerde ifade olurken diğer dokularda ifadesi düşüktür. Bag3 geninde p.Pro209Leu mutasyonu taşıyan üç hastada ağır gelişen kas zayıflığı gözlenmiştir. Kardiyomiyopati ve solunum yetmezliği ileriki safhada ortaya çıkmış, serum CK seviyeleri normal limitin 3 ila 15 kat üstünde gözlenmiştir. Çekirdeklerin %8'inde apoptoz gözlenmesi Bag3'ün antiapoptotik etkisinin ortadan kalktığını göstermektedir (46).

2.8. Desminle Etkileşen Proteinler

Ara filament proteinleri 10 nm çapında homopolimerik ya da heteropolimerik filamentler oluşturabilirler. Desmin pekçok ara filament proteiniyle heterofilament oluşturur. Homotipik ara filamentlerin heterolog alt ünitelerle bütünleşmesi mekanik direnci artırır. Desminin kas hücreesindeki organizasyonunda birlikte bulunduğu tüm proteinler şekil 2.3 ve tablo 2.1'de gösterilmiştir. Bu proteinlerden nestin, sinemin ve sinkoilin desminle heterofilament oluştururlar. Sinemin hücre iskeleti yapılımasında önemli bir protein olup iki izoformu vardır (47). Desmin ve sinemin kas fibrillerindeki

inklüzyon kitlelerinde birlikte bulunurlar. İskelet kası Z çizgilerinde de birlikte dirler. Sinemin alfa-aktinin ve vinculine de bağlanır. Yapılan bir çalışmada desmin proteinini kodlayan gende 14 farklı mutasyonun varlığında sinemin proteininin yerleşimi incelenmiştir. Desmin proteininin *rod* domainindeki korunmuş bir bölge dışındaki mutasyonlarda sinemin proteininin agregat oluşumuna katıldığı gözlenmiştir. Desmin geninde p.Glu401Lys, p.Arg406Trp, p.Glu413Lys mutasyonları sonucunda hücre içinde agregat oluşumu gözlenirken, sinemin antikoruyla yapılan immunfloresan boyamalarda sineminin filament yapısı içinde yer aldığı gösterilmiştir. Bu durum mutasyonların bulunduğu bu bölgenin sinemin ile heterofilament oluştururken tuz köprüleri kurduğu öne sürülerek açıklanmıştır (48).

Sinkoilin distrofin ile ilişkili glikoprotein kompleksinin bir üyesidir. Kas sarkomer yapılarının hücre zarı ile bağlandığı kostamer bölgelerinde distrofin ile ilişkili glikoprotein (DAG) kompleksi bulunur (49). Bu kompleks distroglikanlar ve sarkoglikanlar gibi integral ve periferel pek çok proteini içerir. Bu proteinler hücre iskeleti elemanlarına bağlanarak hücre dışı matrisde bulunan yapısal proteinlerle miyofibrillerin ilişkisini sağlarlar. Desmin bu kompleksle bağlantısını sinkoilin proteini yardımıyla sağlar. Sinkoilin iskelet ve kalp kasında bulunan bir ara filament proteini olup DAG kompleksinde bulunan distrobrevin proteinine bağlanır (50). Sinkoilin alfa-distrobrevin ile sarkolemmada ve nöromusküler bileşke bölgelerinde, desmin ile sarkolemma ve Z disklerde birlikte dir. Tip 4 ara filament proteinlerinin yapısına sahip olsa da sinkoilin, homo- ya da hetero- filament formunda olmadığı için tipik bir ara filament proteini gibi görev yapmaz. Distrofin eksikliği olan kas dokusunda sinkoilin ifadesinin arttığı ve bu artışın rejenere liflerin artışına paralel olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular sinkoilinin müsküler distrofi patogeneziyle ilişkili olduğunu göstermektedir (51).



Şekil 2.3 Desminin Hücre İçindeki Organizasyonu (52)

Paranemin öncelikle ara filament ile ilişkili bir protein olarak tanımlanmış (53) daha sonra tip VI ara filament sınıfına alınmıştır. Paranemin, desmin filament ağının oluşumu için gereklidir (54).

Desmin M çizgisi etrafında sikelemine bağlanır (55). Sikelemin, internal miyosin bağlanma bölgesi veya amino ya da karboksil ucunda iki desmin bağlanma bölgesi içerir. Böylece desmin hem Z çizgisine, hem de M çizgisine bağlanmış olur.

Desmin ve nebulin arasındaki direk bağlantı “*Yeast two hybrid*” analiziyle ortaya konmuştur (56). Nebulin A bandının aktine bağlandığı bölgenin boyutunu kontrol eder.

Kalpain proteazlar ve kaspazlar özellikle apoptoz ve hücre bölünmesi sırasında desmine bağlanır. Kaspaz 6, farklılaşmayı kontrol eden serum miktarının değişimiyle indüklenerek desmini özgül bölgesinden fosforiller (57) . Desminin kasa özgü kalpainler tarafından proteolize uğradığı bilinmektedir (58).

Aurora-B hücre döngüsü boyunca sitokinezin gelişimi ve kromozom segregasyonu için ihtiyaç duyulan bir protein kinazdır. Desmin ve GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) proteinlerinin Aurora-B tarafından fosforillenmesi sonucunda filament oluşturma eğilimi azalır. Thr16 ve Ser59 amino asitlerinden fosforillenen desmin hücre bölünme süreci başlangıcında dağılarak bölünmeye yardımcı olur, yeni hücrelerde tekrar oluşur (9).

Hücre iskeleti elemanları olan mikrotübüller, mikrofilamentler ve ara filamentlerin birbiriyle bağlantısını plektin proteini sağlar. Plektin hücre-bağlayıcı plakin ailesinin bir üyesidir. Tip I çapraz-bağlama proteini olan plektin, Z-disklerde desmin ile birlikte bulunur ve miyofibrillerin ardarda gruplaşmasına aracılık eder (59,60). Desmin plektin aracılığıyla kontraktıl sistem ile bağlantı kurar (61,62). Desminin merkezi *rod* domaininin 1B helikal bölgesinin plektin için bağlanma bölgesi olduğu saptanmıştır (63,64).

Desmin ara filamentleri desmoplakin proteinine bağlanarak desmosomlara tutunur, böylece hücre iskeleti ile hücre bağlantı bölgeleri arasında iletişim kurulmuş olur. (26,27). Desminin farklı amino asitlerinin delesyona uğratılması sonrasında yapılan *yeast two hybrid* ve *in vitro* bağlanma analizi çalışmaları ile desminin kuyruk domaininin desmoplakin için bağlanma bölgesi olduğunu göstermiştir (65) Mayalarda yapılan çalışmalar p.Ile451Met mutasyonunu içeren desminin desmoplakin ile bağlantısının bozulduğunu, *rod* domaini mutant (p.Leu358Pro) desminin ise bu bağlantıyı koruduğunu göstermiştir (65). Yanlış anlamlı desmin mutasyonlarının, kalp kası hücrelerinin özelleşmiş desmozom yapıları olan *intercalated disk* proteinleri üzerindeki etkisini araştıran bir başka çalışmada ise desmin p.Asn342Pro ve p.Arg454Trp mutasyonu taşıyan hastaların desmozoma özgü farklı proteinleri immunfloresan boyamalarla araştırılmıştır. Desmoplakin proteininin kontrol kalp kasına göre belirgin bir şekilde ifadesinin azaldığı gözlenmiştir (66).

Desmin filamentleri ardışık Z bantları üzerinde yerleşmiş olup hücre zarının altından çekirdek zarına kadar uzanır. Aynı zamanda fibriller arası bölgede bulunan mitokondrilerle de bağlantı halindedir. Desminin hücre, çekirdek ve mitokondri zarları ile bağlantısını sağlayan farklı proteinler bulunur. Desmin hücre zarına ankrin (67)

proteini ile bağlanır. Ankrin proteini integral zar proteinlerini hücre iskeleti elemanlarına bağlayan adaptör proteindir (68).

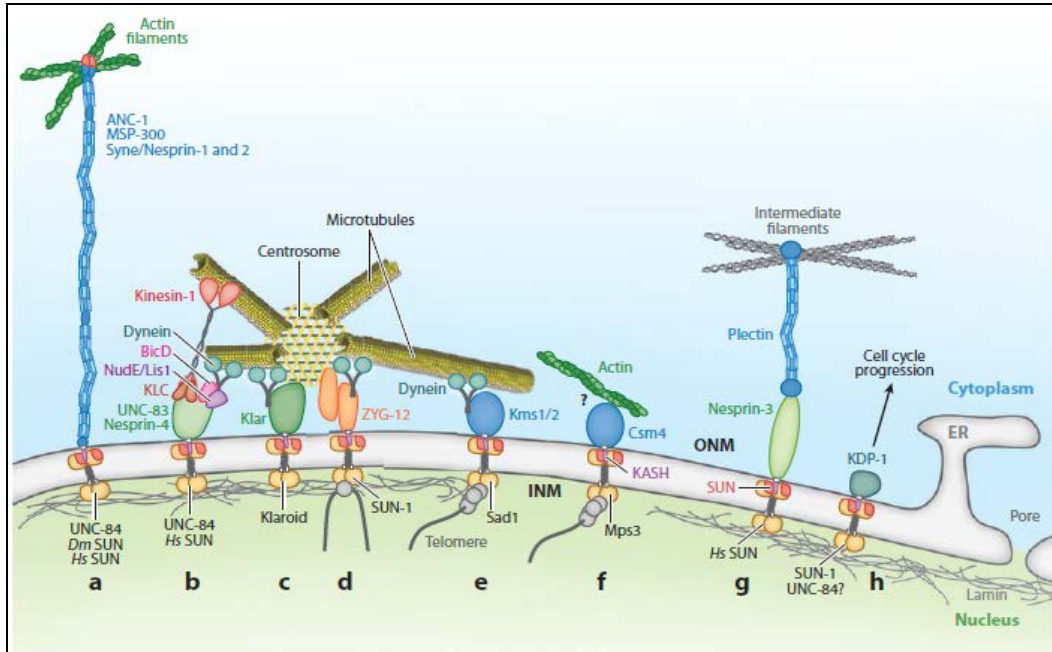
Desmin çekirdek zarı ile bağlantısını lamin B proteini ile sağlar. Bu bağlantı 1987 yılında Georgatos ve arkadaşlarının yaptıkları *in vitro* bağlanma analizi çalışmasıyla kanıtlanmıştır. Bu çalışmada desmin proteinini çeşitli enzimler aracılığıyla baş ve kuyruk domaininden keserek elde edilen türevlerinin lamin B ve ankrin proteinlerine bağlanma affinitesi araştırılmıştır (69). Çalışma desmin proteininin kuyruk domainindeki 413-434. amino asitleri arasındaki bölgeyi lamin B proteinine bağlanma bölgesi olarak tanımlamaktadır. 1992 yılında sıçan kalp kasında yapılan elektron mikroskopu çalışmasında ise desmin-lamin B etkileşiminin çekirdek üzerinde bulunan çekirdek gözenek bölgelerinden olduğunu göstermiştir (70).

Tablo 2.1 Desminle etkileşimde olduğu bilinen proteinler

	Kanıtlanmış bağlanma bölgeleri
Alfa-B Kristallin	-
Plektin	Merkezi <i>rod</i> domaini(64)
Sinemini	Merkezi <i>rod</i> domaini(71)
Sinkoilin	-
Aurora-B	-
Nebulin	Merkezi <i>rod</i> domaini(72)
Lamin B	Kuyruk domaini(69)
Desmoplakin	Kuyruk domaini(65)
Paranemin	-
Nestin	-
CAPN1	-
Miyotübularin	Merkezi <i>rod</i> domaini(73)

Desminin birden fazla protein üzerinden çekirdeğe bağlandığını gösteren çalışmalar, desminin bu bağlantısını plektin üzerinden sağladığını, plektinin ise LINC kompleksi proteinlerinden çekirdeğin iç ve dış zarında yerleşmiş olan proteinlere

bağlandığını göstermiştir (74). LINC (*linkers of the nucleocytoskeleton to the cytoskeleton*) adı verilen protein kompleksi lamina ile hücre iskeleti iletişimini ve çekirdeğin pozisyonunu korumasını sağlar (75) (Şekil 2.4). LINC kompleksinin temel elemanları SUN (S. pombe *Sad1* proteininin ve C. elegans *UNC-84* proteininin ortak SUN domaini) ve Nesprin (*nuclear envelope spectrin repeat*), proteinleri olmakla beraber çekirdek zarı proteinlerinden emerinin de bu kompleksin bir üyesidir. Desminin plectin aracılığıyla nesprin-3'e bağlanmasıyla çekirdek ve hücre iskeleti arasında mekanik bağlantı kurulur. Nesprin 3'ün bağlandığı SUN1 proteini çekirdek zarfının iç zar proteini olup, çekirdek ara filament proteinlerinden lamin A ile bağlanırken lamin B ile etkileşimde değildir (76). LINC kompleksi proteinlerinin çekirdek plazmasında hem mekanik hem de yapısal görev üstlendikleri düşünülmektedir.



Şekil 2.1 LINC Kompleksi (77)

Bu doktora tez çalışması moleküler genetik tanı amacıyla 2006 yılında bölümümüze başvuran ve SBAK-1774 nolu TÜBİTAK araştırma projesi kapsamında çalışılmış olan LGMD2 klinik fenotipine sahip, akraba evliliğinin yapıldığı 6 kişilik bir

aile üzerinedir. Belirtilen proje kapsamında aile bireyleri, LGMD2 için tanımlanan tüm lokuslar için genotipleme çalışmasına alınmış ve bilinen LGMD2 lokuslarına bağlantılı olmadıkları gösterilmiştir. Yeni bir mutant genin hastalığa sebep olduğu düşüncesiyle 50K Xba1 SNP çalışmasına alınan hasta bireyin homozigot haritalama ve haplotip analizi sonucu 2q35-q36.3'de 216-230Mb aralığı için homozigot olduğu gösterilmiştir. Bu aralıkta bulunan 151 gen arasında bulunan desmin geni hasta bireyde tarandığında c.1289-2A>G *splice site* mutasyonu bulunmuştur. Bu tezin amacı mutasyonun desmin proteini üzerindeki etkisinin ve neden olduğu moleküler patogenezin açıklanmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

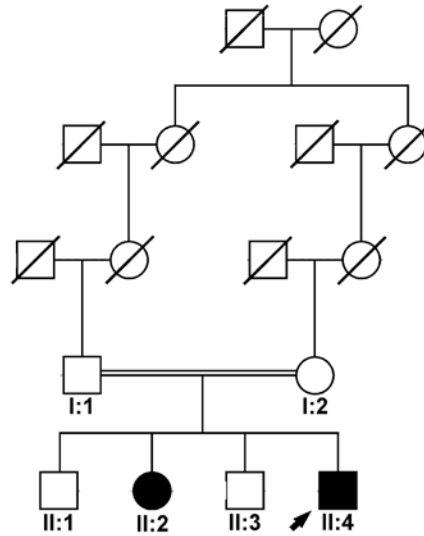
3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışmada Analiz edilen Aile

Doktora tez çalışması kapsamında otozomal resesif kas distrofisi görülen 2'si hasta ve 3'ü sağlıklı/taşıyıcı, akraba evliliği görülen aile ile çalışılmıştır. Bu tez çalışması kapsamındaki tüm çalışmalar II:4 no'lu hastalığın ilk teşhis edildiği bireyin biyolojik materyaliyle yapılmıştır. Tez metninin tamamında çalışmaların yapıldığı bu bireyden "hasta" şeklinde bahsedilmiştir.

Hastaların klinik ve patolojik değerlendirmeleri Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Nöromusküler Hastalıklar Araştırma Laboratuvarı ve Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı Patoloji Ünitesi'nde yapılmış ve hastalara otozomal resesif limb-girdle kas distrofisi tanısı konmuştur.

Tüm çalışmalar aileden "Bilgilendirilmiş Onam Formu" ve Ankara 3 no'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı alınarak (17.12.2009 tarihli LUT09/136, Karar no:40) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1 Analiz Edilen Aile Ağacı. Ok işareti hastalığın teşhis edildiği ilk bireyi göstermektedir.

3.1.5. RNA İzolasyonu

Fast prep RNA Pro-green kit, QBiogene

Trizol Reagent, İnvitrogene

Kloroform, Sigma

DEPC, Sigma

Etanol

RNase Zap (Ambion)

3.1.6. cDNA Sentezi

Çalışmada “*QuantiTect® Reverse Transcription*” kiti (Qiagene) kullanılmıştır.

5X *Quantiscript* RT Tamponu, (Qiagene)

7X g DNA *Wipeout* Tamponu, (Qiagene)

RT Primer Karışımı (Qiagene)

Quantiscript® Reverse Transcriptase (Qiagene)

3.1.7. İmmunfloresan Boyama

PFA, Sigma

1X PBS (pH 7,4), Sigma

Triton X-100, Sigma

Primer Antikor: Anti-Desmin mAB- Mouse monoclonal (Enogene)

Anti-Plectin Rabbit Monoclonal (Cell Signalling)

Anti-Sinemin Rabbit Polyclonal (Onnik Agbulut’un armağanıdır.)

Anti-Sincoilin Rabbit Polyclonal (Kay Davies’in armağanıdır.)

Anti-Lamin B Goat Polyclonal (sc-6261; Santa Cruz)

Anti-HP1 Rabbit Polyclonal (Abcam)

Anti-Lamin A/C Mouse monoclonal (Novacastra)

Anti-Emerin Mouse monoclonal (Novacastra)

Anti-Nup153 Rabbit Polyclonal (ab27400;Abcam)

Sekonder antikor: Alexa Flour 488, Alexa Flour 568

DAPI, (1mg/ml stok)

Prolong Gold Antifade Reagent, Invitrogene

Dakocytomation Pen

Leica DFC 320 floresan mikroskop

3.1.8. Protein İzolasyonu

Koruyucu Tampon (pH 7,4): Trizma baz,	10 mM
NaCl	300 mM
EDTA	2 mM
Triton-X-100	% 0,5
Proteaz inhibitörü tablet 1 adet	

BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., NH, USA)

3.1.9. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

% 12 Poliakrilamid Jel:	Akrilamid bisakrilamid (%30)	: 3.13 µl
	Tris Baz 1M pH:8.8	: 2.5 µl
	dH ₂ O	: 1.91 µl
	SDS (%20) pH:7.2	: 37.5 µl
	APS (%25)	: 20 µl
	TEMED	: 5 µl

3.1.10. Western Blot

Yükleme Tamponu:	NuPAGE® Redüksiyon Ajanı (10X) (Invitrogen)	: 2 µl
	LDS yükleme solusyonu (4X)	: 5 µl

Yürütme Tamponu (pH 8.6):	Tris baz	: 3 g
	Glisin (Sigma)	: 14.4 g
	dH ₂ O' ile 1000ml' ye tamamlanır.	

Transfer Tamponu (pH 8.3):	Tris baz	: 5.82 g
	Glisin	: 2.93 g
	SDS (%10)	:3.75ml
	Metanol (%100)	:200 ml
	dH ₂ O ile 1000 ml'ye tamamlanır.	

Yıkama Tamponu (*Tris-buffered saline*, TBS) (pH 7.4):

Tris baz 20mM	:2.42g
NaCl (Carlo Erba) 137 mM	: 8 g
dH ₂ O ile 1000 ml'ye tamamlanır.	

TBS-T:	TBS	: 1000 ml
	Tween 20 (%0.1, Sigma)	: 1 ml
Bloklama Tamponu:	BSA	: 0.05 g
	Süt Tozu	: 0.5 g
	TBS-T	: 10 ml

Primer Antikor: Anti-Desmin (Mouse monoclonal clone DEU-10-Sigma)

Seconder Antikor: Anti-mouse IgG peroksidaz konjuge

Görüntüleme Solüsyonu: Femto Görüntüleme Kiti (Pierce)

3.2. Yöntemler

3.2.1. *DES* Aday Geni için Yapılan PZR ve DNA Dizi Analizi Çalışmaları

50K XbaI SNP genotipleme çalışması sonucunda bağlantı analizi ve homozigot haritalama ile belirlenmiş hastalıktan sorumlu 2q35-q36.3'de 216-230Mb'lık aralık kasa özgü proteinlerden desmin proteinini kodlayan desmin genini içermektedir. Desmin geni 9 eksondan oluşur. Bu eksonları çoğaltmak için gerekli primerler Tablo 3.1'de verilmiştir. Bu primerler Dr. Duygu Selcen (Mayo Clinic College of Medicine,

Department of Neurology,USA) tarafından laboratuvarımıza gönderilmiştir. Bazı primerler birden fazla ekson için tasarlanmıştır. Reaksiyon koşulları belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Desmin Geni PZR Primer Dizileri

Ekson	Primer Dizileri	PZR Ürünü (bç)
1 F Primer	5' GATACAAATAGTGCCGACGG 3'	725 bç
1 R Primer	5' ACAGGAGGCTAGGCCTGG 3'	
2-5 F Primer	5' TTCCACTGCCAGCTTTATCAC 3'	1117 bç
2-5 R Primer	5' TGGATGCTAAGGAATCAG 3'	
6 F Primer	5' AAGCTTTCTTTGGGCTGCTA 3'	353 bç
6 R Primer	5' GTCCATTTCTGTCCCCAGGA 3'	
7 F Primer	5' CCGATGGGAGGGTTCTTAAC 3'	340 bç
7 R Primer	5' ATTTACCATGTCCCCTGCAC 3'	
8-9 F Primer	5' GTGGCCCCAGATGGACTC 3'	588 bç
8-9 R Primer	5' ACATAGCCCATCCCTGCC 3'	

DES PZR Çalışması

EKSON 1,2-5,6,7,8-9

	Son Konsantrasyon
5X Tampon (Promega)	1X
MgCl ₂ (25mM)	1.5 mM
dNTP (2,5mM)	0,1mM
Primer F (20pmol/μl)	0,8mM
Primer R (20pmol/μl)	0,8mM
DNA (100pmol/ μl)	2pmol/ μl
Taq Poly (5U/ μl)	0,2U
DMSO	%10

Reaksiyon Koşulları

94 ⁰ C	5dk.		
94 ⁰ C	20 sn.		
57-56 ⁰ C	20 sn.	x2*	} x24
55 ⁰ C	20 sn.	x20	
72 ⁰ C	30 sn.		
72 ⁰ C	2 dk.		

*Her iki döngüde bir sıcaklık düşürülerek *touch-down* PZR çalışması yapılmıştır.

PZR Örneklerinin Saflaştırılması

PZR örneklerinin saflaştırılması amacı ile *EZ-10 Spin PZR* Saflaştırma Kiti aşağıda belirtilen protokole göre kullanılmıştır.

1. Tüm PZR örneklerinin üzerine ürün miktarının 3 katı kadar “Bağlama Tamponu” eklenmiştir. PZR ürün miktarı 50 µl olduğu için 150 µl bağlama tamponu kullanılmıştır. Sonrasında her bir örnek için hazırlanan kolona toplam 200 µl’lik karışım eklenmiş ve 2dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
2. Örnekler 10.000 rpm’de 2 dk. süre ile çöktürülmüş ve DNA’nın kolona bağlanması sağlanmıştır.
3. Çöktürme sonrası tüpte kalan üst faz atılmış ve kolonun üzerine 500 µl “Yıkama Çözeltisi” eklenmiştir. Sonrasında örnekler 10.000 rpm’de 2 dk. santrifüj ile çöktürülmüştür.
4. Çöktürme sonrası üst faz atılmış ve örnekler tekrar 500 µl “Yıkama Çözeltisi” ile 10.000 rpm’de 2 dk. santrifüj ile çöktürülerek yıkanmıştır.
5. Kolona bağlanan DNA’dan yıkama çözeltisini ve etanolü uzaklaştırmak için örnekler tekrar 10.000 rpm’de 2 dk. çöktürülmüştür.
6. Çöktürme sonrasında her bir kolon ependorf tüpe aktarılmıştır. Öncelikle her bir örneğin kolonuna 35 µl elüsyon tamponu eklenerek 10.000 rpm’de 2dk. çöktürülmüştür.

7. Saflaştırma sonrası örnekler *Nanodrop ND1000* spektrofotometrede cihazında miktarları ölçülerek 30-40 ng olacak şekilde sulandırılmıştır.

DNA Dizi analizi için reaksiyon koşulları:

		Son Konsantrasyon
3.1 BigDye Terminator (ABI):	2 µl	
5X reaksiyon Tamponu:	4 µl	1X
Primer F ya da R :	1 µl	5pmol/µl
DNA (15ng/µl):	2 µl	
dH ₂ O:	11 µl	
Toplam:	20 µl	

94 °C	5 dk.	
94 °C	15 sn.	} x25
50 °C	15 sn.	
60 °C	4 dk.	
60 °C	1 dk.	

DNA dizi analizi sonuçları Chromas (*versiyon2.33*) programı ile analiz edilmiştir.

3.2.2. Hasta ve Kontrol Kanından Lenfosit İzolasyonu

Mutasyon içeren bölgenin RNA dizisindeki değişiklikleri gözlemlemek için anne ve hastadan alınan periferik kandan lenfosit izole edilmiştir.

Asit sitratlı tüplere alınan 10 ml kan örneği, oda sıcaklığında 5 ml PBS içeren tüpe steril ortamda aktarıldı ve karıştırıldı.

1. Diğer bir 15 ml' lik tüpe, oda sıcaklığında 10 ml *Ficoll-Hypaque* eklendi.
2. PBS ile karıştırılan kan, 10 ml *Ficoll-Hypaque* üzerine pastör pipeti yardımıyla yavaş ve dikkatli bir şekilde yayıldı.

3. 1500 rpm' de 30 dk. yavaş durma ayarında (soft stop) santrifüj ile çöktürüldü. (Kendro Varifuge 30 ORS).
4. Çöktürme sonrası oluşan ara fazdaki lenfositler pastör pipeti yardımıyla toplandı ve yeni tüpe alındı.
5. 1200 rpm de 10 dk. santrifüj ile çöktürüldükten sonra üst faz atıldı.
6. Eritrositlerden arındırmak amacıyla pelet, 5 ml PBS ile 1200 rpm de 5 dk. santrifüj ile çöktürülerek yıkandı.
7. Üst faz kısmı atılarak üzerine 1 ml trizol eklendi ve -20°C 'de saklandı.

3.2.3. Hasta ve Kontrol Lenfosit dokusundan RNA İzolasyonu

İzole edilen lenfosit dokularından RNA izolasyonu yapılmıştır.

1. RNA izolasyonu sırasında kullanılacak pipet uçları ve tüpler % 0,1'lik DEPC (Diethylpyrocarbonate)'den geçirilip tüm gereçler RNase Zap ile silinerek ortam, ribonükleazlardan arındırılmıştır.
2. -20°C 'de saklanmakta olan kandan izole edilmiş lenfosit dokuları buz içerisinde çözüldükten sonra içerisine 1 ml RNApro çözeltisi bulunan ependorf tüplere dağıtılmıştır.
3. Dokular tüplere konulduktan sonra *FastPrep FP120* cihazına yerleştirilerek (Hız:6 Süre: 45 sn.) dokunun parçalanması sağlanmıştır.
4. *Fastprep* sonrası tüpler 12.000 g'de 5 dk. 4°C 'de santrifüj ile çöktürülmüştür.
5. Çöktürme sonrası tüplerdeki üst faz yeni bir tüpe alınmış ve oda sıcaklığında 5 dk. bekletilmiştir.
6. Bekleme sonrası tüplere 300 μl kloroform ilave edilmiş, 10 sn. karıştırılmış ve oda sıcaklığında 5 dk. bekletilmiştir.
7. Takiben 12.000 g'de 5 dk. 4°C ye ayarlanan soğutmalı santrifüjde çöktürülmüştür.
8. Çöktürme sonrası üst faz yeni bir tüpe alınmış ve üzerine 500 μl % 100 etanol eklenmiştir. Tüp 5 defa alt-üst edilerek çalkalandıktan sonra -20°C 'de 2 saat 30 dk. bekletilmiştir.

9. Bekleme sonrasında 12.000 g'de 15 dk. 4°C'de santrifüj ile çöktürme yapılmıştır. Çöktürme sonrası üst faz atılmıştır.
10. Hazırlanan % 75 etanol ile tüpler içindeki çökelti çalkalama yapılarak yıkanmış ve 12.000 g'de 4 dk. 4°C'de çöktürme yapılmıştır.
11. Üst faz çekilerek uzaklaştırılmış ve çökelti içinde kalan etanolün, 60 °C'de uçması sağlanmıştır. Pelet, DEPC ile muamele edilmiş 20 µl distile suda çözülmüştür.
12. Ayrıştırılan RNA'nın miktarı, *Nanodrop ND1000* spektrofotometrede 230, 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülerek RNA miktarı ve saflığı hesaplanmıştır.
13. RNA saklanmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.2.4. cDNA Sentezi

Bu aşamada kullanılan malzemeler *RNase Zap* ve % 0,1 DEPC ile ribonükleazlardan arındırılmıştır ve cDNA sentezi için *Quantitech Reverse Transcription Kit* kullanılmıştır.

Öncelikle karışım A hazırlanmıştır:

Karışım A

<i>RNase free</i> dH ₂ O	: 11 µl
<i>gDNA wipeout buffer</i>	: 2 µl
RNA (Hasta ve kontrol)	: 2 µl
<hr/>	
Toplam	: 14 µl

42°C' de 5 dk. bekletilen örnekler sonrasında buza alınmıştır.

Karışım B

<i>Quantiscript RT</i>	: 1 µl
<i>Quantiscript RT buffer</i>	: 4 µl
RT primer Mix	: 1 µl
<hr/>	
Toplam	: 6 µl

A ve B karışımları (toplam 20 µl) bir araya getirilerek *Gene Amplification PCR System 9700 (Applied Biosystems)* cihazında 42°C’de 30dk. ve 95°C’de 5dk. inkübasyona alınmıştır. Sentezlenen cDNA üzerine nükleaz içermeyen 60 µl dH₂O eklenerek 1/4 oranında sulandırılmış ve -20°C’de saklanmıştır.

3.2.5. cDNA’den Desmin Mutasyon Bölgesinin PZR Çalışması

Mutasyon içeren bölgenin RNA dizisindeki değişiklikleri gözlemlemek için anne (I:2) ve hastadan (II:4) alınan periferik kandan lenfosit izole edilmiştir. Lenfosit dokusundan RNA izole edilmiş ve RNA cDNA’ya dönüştürülmüştür. c.1289-2A>G mutasyonunun bulunduğu bölgeye özgül primerlerle (Tablo 3.2) PZR çalışması yapılmıştır.

Tablo 3.2 Desmin Geni Mutasyon İçeren Bölge İçin cDNA Primer Dizileri

Ekson	Primer Dizileri	PZR Ürünü (bç)
<i>DES</i> 7-8-9 F Primer	5’ ACCTGCTCAACGTGAAGAT 3’	318 bç
<i>DES</i> 7-8-9 R Primer	5’ GGAAGAAGGCTGGCTTCA 3’	

EKSON 7-8-9

10X Tampon (Promega)

MgCl₂ (25mM)

dNTP (2,5mM)

Primer F (20pmol/µl)

Primer R (20pmol/µl)

DNA (100pmol/ µl)

Taq Poly (5U/ µl)

Son Konsantrasyon

1X

1.5 mM

0,1mM

0,8mM

0,8mM

2pmol/ µl

0,2U

Reaksiyon Koşulları

94°C	5dk.	} X 35
94 °C	30 sn.	
59 °C	30 sn.	
72 °C	45 sn.	
72 °C	3 dk.	

3.2.6. İmmunfloresan Boyama

Hasta ve kontrol kas dokularında desmin proteini yerleşimi *mouse monoclonal anti-desmin (Enogene)* antikorunu kullanılarak analiz edilmiştir. İmmunfloresan boyama çalışmasında aşağıda belirtilen protokol izlenmiştir.

Bu çalışmada hasta ve kontrol kas dokularından 7 µm'lik transvers kesitler halinde lam üzerine alınmış ve -80 °C'de muhafaza edilmiş örnekler kullanılmıştır.

Desmin İmmunfloresan boyama protokolü

- -80 °C dolaptan çıkarılan kesitler 30 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Preparattaki doku *Dakopen* ile işaretlenmiştir.
- Dokular 15 dk. oda sıcaklığında % 4'lük PFA çözeltisinde bekletilmiş ve dokunun lam üzerine fiksasyonu sağlanmıştır.
- Fiksasyon işlemi sonrasında PFA ortamdan uzaklaştırılmış ve dokular 2'şer kez 5 dk. 1X PBS ile yıkanmıştır.
- Dokular permeabilizasyon tamponunda (1X PBS içinde hazırlanmış % 0,2 Triton X-100 çözeltisi) ve oda sıcaklığında 10 dk. bekletilmiştir.
- Permeabilizasyon sonrası 3 kez 5 dk. 1X PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Preperatların üzerine bloklama çözeltisi uygulanmış ve 2 saat oda ısısında bekletilmiştir.

Bloklama Çözeltisi:

1X PBS +% 0,1 Tween 20	800 µl
BSA (0.1 gr/ml)	100 µl
Keçi serumu	100 µl
Toplam	1000 µl

- Bloklama işleminden hemen sonra yıkama yapmadan primer antikor ile işaretleme işlemine geçilmiştir.
- Primer antikor 1/100 oranında sulandırıldıktan sonra hazırlanan sulandırım preparatlarına uygulanmış ve +4°C’de gece boyu bekletilmiştir.
- Primer antikor sulandırım solusyonu:

• 1X PBS +%1 Tween 20	450 µl
• Keçi serumu	50 µl
<hr/>	
• Toplam	500 µl
- Bu işlemin sonunda 1X PBS ile 3 defa 5’er dk. yıkanmıştır.
- Yıkama sonrası preparatlar sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat muamele edilmiştir.
- Çalışmada kullanılan sekonder antikor *Alexa Flour 488 Goat anti-mouse IgG* 1/1000 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.
Sekonder antikor sulandırma çözeltisi:

1X PBS +%1 Tween 20	450 µl
Keçi serumu	50 µl
<hr/>	
Toplam	500 µl
- 3 kez 5’er dk. 1XPBS çözeltisi ile yıkama yapılmıştır.
- Çekirdek boyaması yapmak üzere DAPI 1X PBS çözeltisi ile 1/1000 oranında seyreltilerek uygulanmıştır. Oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edilmiştir.
- Preparatlar 1 kere 5 dk. 1X PBS ile yıkanmıştır.
- Kesitlere lamel kapatma çözeltisi *Prolong Antifade* damlatılarak üzerine lamel kapatılmıştır.
- Preparatlar ışık görmeyecek şekilde +4 °C de saklanmıştır.

Preparatlar floresan mikroskopunda görüntülenmiş ve fotoğraflar *Leica application suite* yazılımı kullanılarak çekilmiştir.

Çift immüofloresan boyama için yapılan çalışma protokolü

Desmin-plektin, Desmin-sinkoilin, desmin-sinemin, desmin-lamin A/C ve desmin-emerin için aynı protokol uygulanmıştır.

- -80 °C dolaptan çıkarılan kesitler 30 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Preparattaki doku *Dakopen* ile işaretlenmiştir.
- Dokular 15 dk. oda sıcaklığında % 4'lük PFA çözeltisinde bekletilmiş ve dokunun lam üzerine fiksasyonu sağlanmıştır.
- Fiksasyon işlemi sonrasında PFA ortamdan uzaklaştırılmış ve dokular 2'şer kez 5 dk. 1X PBS ile yıkanmıştır.
- Dokulara permeabilizasyon işlemi uygulanmamıştır.
- Preparatların üzerine bloklama çözeltisi uygulanmış ve 1 saat oda ısısında bekletilmiştir.
- Bloklama işleminden hemen sonra yıkama yapmadan primer antikor ile işaretleme işlemine geçilmiştir.

Hazırlanan sulandırım solusyonunda iki antikor dilüsyon oranlarında karıştırılarak aynı anda gece boyu +4°C'de inkübe edilmiştir. Desmin 1/100, Plektin 1/10, Sinemin 1/300, Sinkoilin, 1/100 lamin A/C 1/100 ve emerin1/20 oranında sulandırılmıştır.

- Bu işlemin sonunda 1X PBS ile 3 defa 5'er dk. yıkanmıştır.
- Yıkama sonrası preparatlar sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat muamele edilmiştir.
- Çalışmada kullanılan sekonder antikor *Alexa Flour 488 Goat anti-mouse IgG 1/1000* ve *Alexa Flour 568 Goat anti-rabbit IgG 1/500* oranında sulandırılarak kullanılmıştır.
- 3 kez 5'er dk. 1XPBS çözeltisi ile yıkama yapılmıştır.
- Çekirdek boyaması yapmak üzere DAPI 1X PBS çözeltisi ile 1/1000 oranında seyreltilerek uygulanmıştır. Oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edilmiştir.
- Preparatlar 1 kere 5 dk. 1X PBS ile yıkanmıştır.

- Kesitlere lamel kapatma çözeltilisi *Prolong Antifade* damlatılarak üzerine lamel kapatılmıştır.
- Preparatlar ışık görmeyecek şekilde +4 °C de saklanmıştır.

Preparatlar floresan mikroskopunda görüntülenmiş ve fotoğraflar *Leica application suite* yazılımı kullanılarak çekilmiştir.

Desmin-Lamin B çift immün boyama protokolü

- -80 °C dolaptan çıkarılan kesitler 30 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Preparattaki doku *Dakopen* ile işaretlenmiştir.
- Dokular 10 dk. oda sıcaklığında % 4'lük PFA çözeltilisinde bekletilmiş ve dokunun lam üzerine fiksasyonu sağlanmıştır.
- Fiksasyon işlemi sonrasında PFA ortamdan uzaklaştırılmış ve dokular 1 kez % 0,1'lik Glisin içeren PBS'de ve 2'şer kez 5 dk. 1X PBS ile yıkanmıştır.
- Dokular permeabilizasyon tamponunda (1X PBS içinde hazırlanmış % 0,5 Triton X-100 çözeltilisi) ve oda sıcaklığında 10 dk. bekletilmiştir.
- Permeabilizasyon sonrası 3 kez 5 dk. 1X PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Preparatların üzerine bloklama çözeltilisi olarak PBS'de çözülmüş %5 BSA (Sigma A7030) uygulanmış ve 1 saat oda ısısında bekletilmiştir.
- Bloklama işleminden hemen sonra yıkama yapmadan primer antikor ile işaretleme işlemine geçilmiştir.
- İlk olarak lamin B primer antikoru kullanılmıştır. Sulandırım solusyonu PBS'de çözülmüş %5 BSA kullanılmıştır. Lamin B 1/50 oranında sulandırılmıştır. 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir.
- Bu işlemin sonunda 1X PBS ile 3 defa 5'er dk. yıkanmıştır.
- Sekonder antikor *Alexa Flour 568 Goat anti-goat IgG* 1/500 oranında %5'lik BSA'da sulandırılarak kullanılmıştır. Oda sıcaklığında 1 saat muamele edilmiştir.
- Bu işlemin sonunda 1X PBS ile 3 defa 5'er dk. yıkanmıştır.

- İkinci olarak desmin antikoru ile muamele edilmiştir. Sulandırım solusyonu PBS'de çözülmüş %5 BSA kullanılmıştır. Desmin 1/100 oranında sulandırılmıştır. 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir.
- Bu işlemin sonunda 1X PBS ile 3 defa 5'er dk. yıkanmıştır.
- Çalışmada kullanılan sekonder antikor *Alexa Flour 488 Goat anti-mouse IgG* 1/1000 %5'lik BSA'da sulandırılarak kullanılmıştır. Oda sıcaklığında 1 saat muamele edilmiştir.
- Bu işlemin sonunda 1X PBS ile 3 defa 5'er dk. yıkanmıştır.
- Çekirdek boyaması yapmak üzere DAPI 1X PBS çözeltisi ile 1/1000 oranında seyreltilerek uygulanmıştır. Oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edilmiştir.
- Preparatlar 1 kere 5 dk. 1X PBS ile yıkanmıştır.
- Kesitlere lamel kapatma çözeltisi *Prolong Antifade* damlatılarak üzerine lamel kapatılmıştır.
- Preparatlar ışık görmeyecek şekilde +4 °C de saklanmıştır.

HP1, Nup153 boyama protokolü

- -80 °C dolaptan çıkarılan kesitler 30 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Preparattaki doku *Dakopen* ile işaretlenmiştir.
- Dokular 10 dk. oda sıcaklığında % 4'lük PFA çözeltisinde bekletilmiş ve dokunun lam üzerine fiksasyonu sağlanmıştır.
- Fiksasyon işlemi sonrasında PFA ortamdan uzaklaştırılmış ve dokular 1 kez % 0,1'lik Glisin içeren PBS'de ve 2'şer kez 5 dk. 1X PBS ile yıkanmıştır.
- Dokular permeabilizasyon tamponunda (1X PBS içinde hazırlanmış % 0,5 Triton X-100 çözeltisi) ve oda sıcaklığında 10 dk. bekletilmiştir.
- Permeabilizasyon sonrası 3 kez 5 dk. 1X PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Preparatların üzerine bloklama çözeltisi olarak PBS'de çözülmüş %5 BSA (Sigma A7030) uygulanmış ve 1 saat oda ısısında bekletilmiştir.

- Bloklama işleminden hemen sonra yıkama yapmadan primer antikor ile işaretleme işlemine geçilmiştir.
- Primer antikor HP1 ve Nup153 için 1/200 oranında %5 BSA'da sulandırıldıktan sonra hazırlanan sulandırım preparatlara uygulanmış +4°C'de gece boyu bekletilmiştir.
- Bu işlemin sonunda 1X PBS ile 3 defa 5'er dk. yıkanmıştır.
- Çalışmada HP1 için sekonder antikor *Alexa Flour 568 Goat anti-rabbit IgG* 1/500, Nup153 için *Alexa Flour 488 Goat anti-mouse IgG* 1/1000 %5'lik BSA'da sulandırılarak kullanılmıştır. Oda sıcaklığında 1 saat muamele edilmiştir.
- Çekirdek boyaması yapmak üzere DAPI 1X PBS çözeltisi ile 1/1000 oranında seyreltilerek uygulanmıştır. Oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edilmiştir.
- Preparatlar 1 kere 5 dk. 1X PBS ile yıkanmıştır.
- Kesitlere lamel kapatma çözeltisi *Prolong Antifade* damlatılarak üzerine lamel kapatılmıştır.

Preparatlar floresan mikroskopunda görüntülenmiş ve fotoğraflar *Leica application suite* yazılımı kullanılarak çekilmiştir.

3.2.7. Protein izolasyonu

Klinik tanının belirlenmesi amacıyla hasta bireyden alınmış 2-3 mm³ büyüklüğündeki kas biyopsi materyalinden protein izolasyonu yapıldı. Belirgin bir kas patolojisi göstermeyen (klinik tanı amaçlı alınmış olan ancak normal histopatolojik bulguları olan) biyopsi materyali kontrol kas olarak kullanılmıştır.

70 µl koruyucu tampon çözelti içerisine alınan doku buz içerisine koyularak sonikatöre yerleştirildi. Hücreler 20 sn süresinde %50 amplitüde, 10 kere sonike edilerek hücre zarları parçalandı. 13200 rpm'de 3 dk. santrifügasyon yapılarak parçalanmış zarların ve organellerin çökmesi sağlandı. Üst faz 1.5 ml'lik temiz tüplere aktarılarak buza alındı ve protein miktarları ölçüldü.

3.2.8. Protein Konsantrasyon Tayini

Hücrelerden izole edilen proteinlerin miktarları *bicinchoninic* asit (BCA, Pierce) yöntemiyle tayin edildi.

1. Standart eğrinin oluşturulması amacıyla, 0.1, 0.4, 0.8, 1.2 mg/ml miktarlarda BSA sulandırılmaları % 10 SDS içerisinde hazırlandı.
2. 45 µl %10 SDS içeren tüplere, izole edilen protein örneklerinden 5 µl koyularak pipetaj yapıldı.
3. A ve B solusyonlarından 50A:1B oranında karıştırılarak çalışma solusyonu hazırlandı. Her tüpe 1ml çalışma solusyonu eklenerek, tüpler aşağı-yukarı karıştırıldı ve 37°C etüvde 30 dk. inkübe edildi.
4. İnkübasyon süresi sonunda 2 µl örnek ile *Nanodrop ND1000* spektrofotometrede (Thermo Scientific) ölçüm yapılarak proteinlerin miktarları tayin edildi.
5. Spektrofotometrede BCA protein assay kit ile yapılan ölçüm sonucunda protein miktarı 300ng/µl olarak belirlendi.

3.2.9. Western Blot

SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

Proteinler iki katmanlı jel (resolving ve stacking) sistemi hazırlanarak SDS poliakrilamid jel elektroforezinde ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldılar.

1. Dikey elektroforez sisteminin camları etanol ile temizlendikten sonra sabitlenerek camlar arasında pipet yardımıyla % 12 akrilamid jel döküldü (Mini Trans-Blot Electroforetic Transfer Cell BIORAD). Jelin üzerinde yaklaşık 3cm boşluk bırakıldı ve bu boşluğa dH₂O eklenerek jel yüzeyinin düzgün olması sağlandı. Jel polimerize olduktan sonra pipet yardımıyla % 3 akrilamid jel döküldü ve camlar arasına tarak yerleştirildi. Üst kısmındaki jel de polimerize olduktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı ve kuyucuklar elektroforez tamponu ile yıkanarak hava kabarcıkları uzaklaştırıldı.
2. Her örnekten 20 µg protein, redüksiyon ajanı ve yükleme tamponu ile karıştırılarak toplam hacim 20 µl olacak şekilde dH₂O eklendi. Tüp içerikleri

vorteks ile karıştırıldıktan sonra 4dk.kaynar su içinde bırakıldı. Kaynama süresi sonunda örnekler çökeltiyerek buza alındı.

3. Örnekler kuyucuklara yüklenmeden önce jel boş bir şekilde 80 voltta yürütüldü. Daha sonra örnekler kuyucuklara yüklendi ve 80V da 20 dk.boyunca % 3'lük akrilamid jelde elektroforeze edildi. Örnekler ayrıştırıcı olan %12 akrilamid jele ulaşınca voltaj artırılarak 100V 3 saat daha elektroforez gerçekleştirildi.

Western Blot

Elektroforez sonrası jeller cam içerisinden çıkartıldı. % 3 jel kesilip atıldıktan sonra proteinlerin bulunduğu % 12'lik jel transfer tamponu içerisine alındı.

1. 1 adet nitroselüloz membran (BioRad) ve 5 adet Whatman Kağıdı 6 cm eninde ve 9 cm boyunda olacak şekilde kesilerek transfer tamponu içerisine alındı.
2. *Semi-dry* blotlama cihazının (BioRad) üst ve alt plakaları transfer tamponu ile ıslatıldıktan sonra alt plaka üzerine 2 adet Whatman kağıdı konuldu. Kağıtların üzerine membran, jel ve tekrar 3 adet Whatman kağıdı yerleştirilerek sandviç hazırlandı. Bu işlemler sırasında plastik pipet ile hava kabarcığı oluşması engellendi. Blotlama aparatının üst plakası kapatılarak 1 saat boyunca 15V, 0.7 mA'de protein örneklerinin jelden membrana transferi gerçekleştirildi.
3. Transfer tamamlandıktan sonra membran Ponceau S (Sigma) solüsyonu ile boyanarak transfer kontrol edildi.
4. Membran bloklama solüsyonu içerisinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde bırakılarak bloklama işlemi gerçekleştirildi. Sürenin sonunda membran anti- Desmin primer antikoru (Sigma clone DE-U-10; 1/400) ile 16 saat +4°C çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Ertesi gün membrana yıkama yıkama tamponu ile 3 kez 10'ar dk. yıkanarak bağlanmayan antikolar uzaklaştırıldı. Yıkamaların ardından membran, *horseradish* peroksidaz (HRP) işaretli sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda membran 4 kez 10'ar dk. yıkanarak bağlanmayan sekonder antikorlar uzaklaştırıldı.

5. ECL kemilüminesans kit solusyonları olan A ve B, 40:1 oranında karıştırılarak görüntüleme karışımı hazırlandı. Membran görüntüleme karışımı ile karanlık ortamda 4 dk. inkübe edildi. Membran kaset içine alınarak üzerine film (KODAK) kapatıldı ve film 5-30 dk. kaset içinde bırakıldı. Film banyo (KODAK Developer ve Fikser) edilerek proteinlere ait bantlar film üzerinde otoradyografik olarak görüntülendi.

Kas proteininin kontrol ve hastada eşit yüklendiğini göstermek amacıyla miyozin proteini kullanıldı.

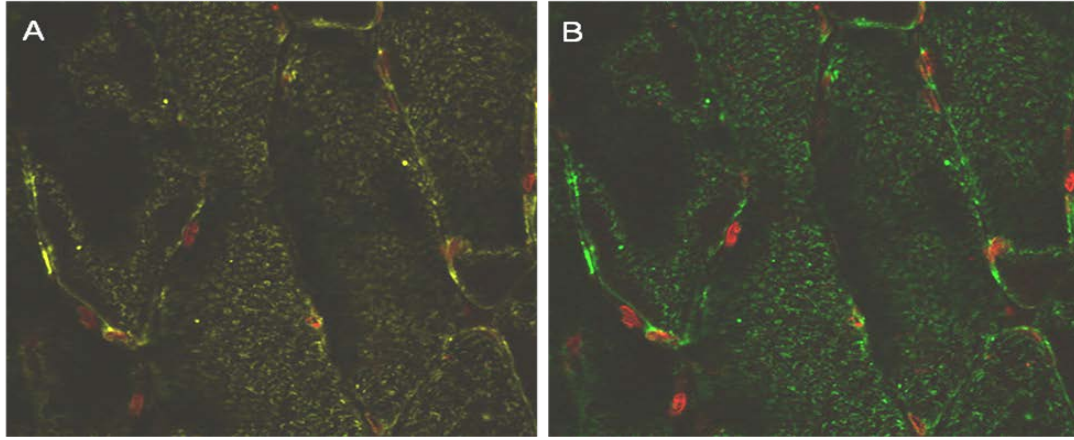
3.2.10. Hasta Biyopsi Materyalinin Elektron Mikroskopunda Değerlendirilmesi

Elde edilen doku örnekleri Sorenson fosfat tamponu içindeki % 2.5'lik gluteraldehit ile bir gece oda ısısında tespit edildikten sonra tampon solüsyonunda yıkandı. Örnekler daha sonra fosfat tamponlu %1'lik ozmiyum tetroksit içinde 4°C'de iki saat süreyle ikinci kez tespit edildi. Sabit çalkalamalı doku takip cihazıyla dereceli etil alkollerden geçirilerek araldite gömüldü. Yarı ince kesitler, metilen mavisi-azur II ile ince kesitler uranil asetat-kurşun sitrat ile boyandıktan sonra Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Bilimler Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında bulunan Jeol JEM-1400 model transmisyon elektron mikroskopuna bağlantılı Orius marka dijital kamera ile çizgili kasın ince yapı düzeyinde bozulma kriterleri açısından değerlendirildi.

3.2.11. Hasta kas biyopsi materyalinin konfokal mikroskopta değerlendirilmesi

Yaptığımız görüntülemelerde her pikselin boyu ~140 nm'dir. Pinhole aralığı 1AU (Airy Unit), numerik açıklık ise 1,4 olarak seçilmiştir. Kırmızı ve yeşil floresan sinyal alabilmek için kesite iki farklı dalga boyunda ışık uygulanmıştır. *Flouresance Bleed Through* denen iki floresan lazerin aynı anda açılarak görüntü alınmasıyla, kırmızı ve yeşil lazerin dalga boyları karıştığı için pek çok alanda sarı rengin oluştuğu görüntüler

yalancı pozitifliktir. *Flourescence Bleed Through* hatasından kaçınmak için *Multitrack* yöntemi ile ardışık görüntüleme yapılmıştır. (Şekil 3.2)



Şekil 3.2 *Flourescence bleed through* görüntüsü A) Yeşil ve kırmızı filtre aynı anda açılarak kırmızı boyanmanın olmadığı sitoplazmik alanlarda kırmızı ve yeşilin çakışması ile oluşan sarı rengin görülmesi yalancı pozitifliğin göstergesidir.B) *Multitrack* yöntemiyle alınan görüntüde aynı alanda kırmızı ve yeşil renk ayrı ayrı sinyaller şeklinde gözlenmektedir.

Çalışmamızda konfokal mikroskobunda yapılan “birlikte –yerleşim” analizinde desmin-lamin B etkileşimi olması durumunda, sarı renkli piksel sayısının çekirdek gözenek sayısı ile doğru orantılı olarak elde edilmesi beklenmektedir. Konfokal mikroskobunda görüntüleme için kullanılan kesit kalınlığı $0.6 \mu\text{m}$ 'dir. Bir çekirdeğin alanı ise konfokal mikroskobunda ölçülmüş ve $33 \mu\text{m}$ bulunmuştur. Hesaplanan çekirdek alanının kesit kalınlığı ile çarpılması kesit içine düşen çekirdek hacmini (yaklaşık $20 \mu\text{m}^3$) ortaya koymuştur. Bir çekirdeğin hacmi ortalama $100 \mu\text{m}^3$ olduğuna göre bir çekirdekte bulunan 2000 'e yakın çekirdek gözeneginin yaklaşık $1/5$ 'i (400 adet) $0.6 \mu\text{m}$ 'lik kesite düşer. Konfokal mikroskopda görüntülenen en küçük alan $141 \times 141 \times 650 \text{ nm}^3$ olup bu alandan bir voksellik bir sinyal alınır.

Kontrol kasa ve hastaya ait kas kesitlerinde desmin/lamin B ve desmin/plektin proteinleri çift immunfloresan boyama yapılarak konfokal mikroskopta incelenmiştir.

Desmin proteini yeşil floresanla ve lamin B ve plektin proteinleri kırmızı floresanla işaretlenmiştir. Kullanılan yağ immersiyon, 63X objektifin NA değeri 1.4, pin hole (PH) açıklığı 1 AU olup bu şartlarda lateral çözünürlük 200-250 nm olarak hesaplanmıştır. Daha iyi görüntüleme amacıyla resimlerin hepsinde *zoom* fonksiyonu kullanılarak çözünürlük iyileştirilmiştir. Dikey çözünürlüğün 650 nm civarında olduğu belirlenmiştir. Ancak bu şartlarda dahi minimum çözünürlük yaklaşık 50 nm kalınlığındaki çekirdek zarının iki tarafına yerleşmiş olan desmin ve lamin B proteinlerini ayrı ayrı görüntüleyecek çözünürlükte değildir. Bu durumda elde edilen resimlerde proteinler görüntü piksellerine stokastik olarak dağılacaktır. Bazı piksellere yeşil floresan emisyon, bazılarına da kırmızı floresan emisyon düşecektir. Ancak daha az sayıda piksele ikisi birlikte katılacağı için sarı floresan emisyon en az sıklıkta gözlenecektir. Bu durumda korelasyon analizi yapmak uygun değildir. Ancak, ışık mikroskopisinin elverdiği sınırlarda çözünür olan mevcut görüntüleme verileri oldukça yol gösterici ve özgül olup, ciddi ölçüde anlamlıdır.

Çift immun boyama yapılan kesitler, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Bilimler Bölümü, Biyofizik Anabilim Dalı'nda bulunan *Carl-Zeiss* LCM-510 model konfokal mikroskop kullanılarak görüntülenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

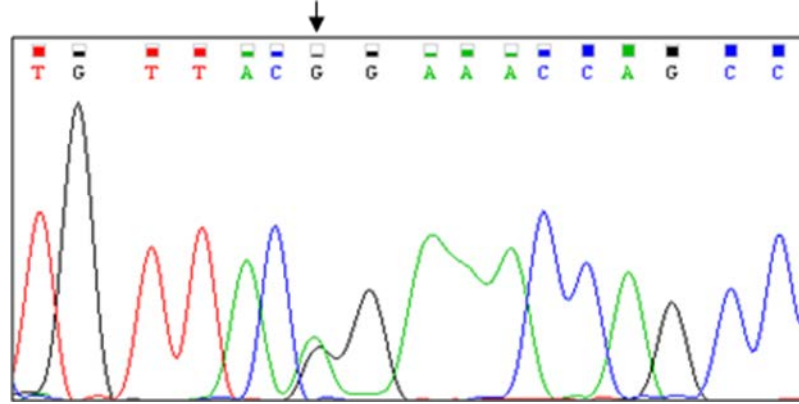
SBAK-1774 nolu TÜBİTAK araştırma projesi kapsamında çalışılmış ve bilinen hiçbir LGMD2 lokusuna bağlantı göstermeyen bu ailedeki hasta birey (II:4) 39 yaşındadır. (Şekil 3.1) Yaklaşık 15 yaşına kadar herhangi bir klinik problemi olmayan hasta, o yaştan itibaren ortaya çıkan kol ve bacak kaslarında güçsüzlük şikayetiyle kliniğe başvurmuştur. 2010 yılında yapılan nörolojik muayenesinde şuuru açık olan ve hafif genizden konuşan hastamızda, hafif derecede fasial güçsüzlüğü, boyun öne ve arkaya hareketlerinde %40 kuvvet kaybı ve alt ve üst proksimal kaslarında ise % 80 kuvvet kaybı mevcuttur. Tek destekle düz zeminde kısa mesafe yürüeyebilen hasta, tekerlekli sandalye kullanır durumdadır. Nefes darlığı ve derin nefes alışımda göğüs sıkışması şikayeti olmakla beraber belirgin bir kalp problemi yoktur. Yapılan ekokardiyografi (EKO) hastanın normal kalp anatomisine ve işlevine sahip olduğunu göstermektedir. Zeka düzeyi normaldir. 2011 yılında CK seviyesi 123 U/1 (n<191) bulunmuştur. Nefes darlığı konuşma ve yutma güçlüğü ve kalp problemi yoktur.

Ailede hastalığın ilk tespit edildiği birey dışındaki diğer hasta birey (II:2) 45 yaşındadır. Hastanın ablası olup benzer kas güçsüzlüğü bulgularına sahiptir. 27 yaşına kadar klinik bir problemi olmayan hastada, 35 yaşından sonra merdiven çıkmada zorluk ve yürümede yavaşlama başlar. 43 yaşında tekerlekli sandalyeye bağımlı hale gelir. 2011 yılında CK 112 U/1, kalp kası CK MB seviyesi ise normalin 5 katı fazladır. EKG sonuçlarına göre kalp kasının tutulumuna dair bir bulgu bulunmamakla birlikte, 2011 muayanesinde ritim düzensizliği vardır.

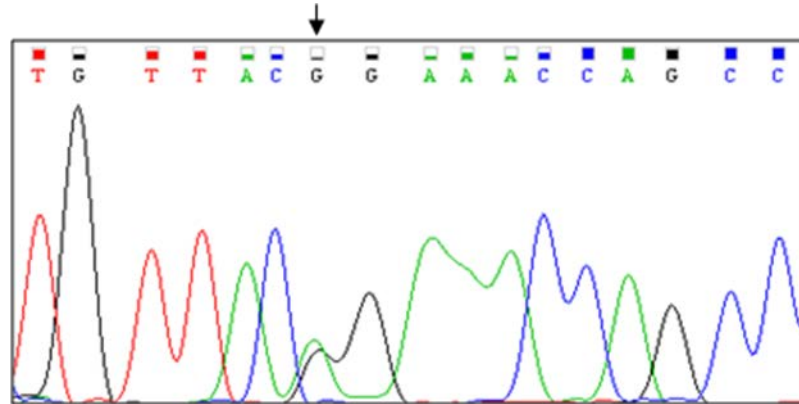
4.2. c.1289-2A>G Mutasyonunun Aile Bireylerinde Analizi

Aile bireylerinden alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. Bu DNA örnekleri kullanılarak desmin geninin tüm eksonları PZR ile çoğaltıldı ve DNA dizi analizi yapıldı. c.1289-2A>G *splice site* mutasyonun sağlıklı fenotip gösteren anne ve

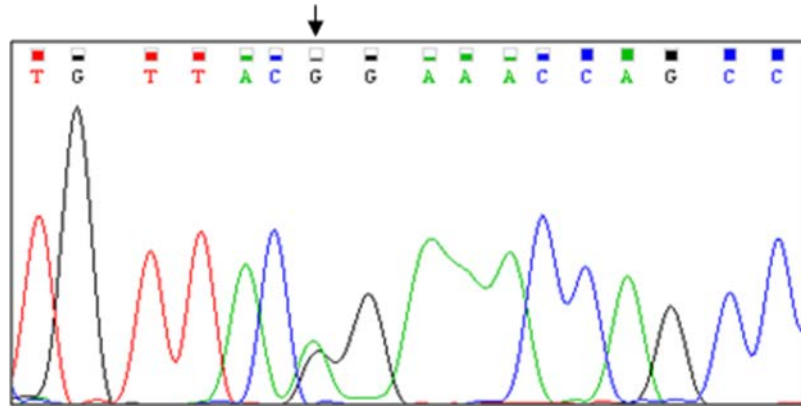
babada heterozigot, hasta olan iki kardeşte homozigot, sağlıklı görünen iki kardeşten birinde heterozigot olarak kalıtıldığı gösterildi (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5)



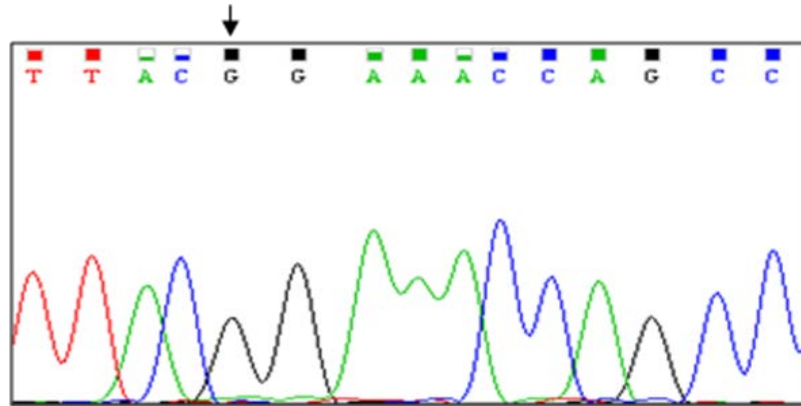
Şekil 4.1 I:1 no'lu bireyin DNA dizi analizi. Ok işareti bireyin c.1289-2A>G mutasyonunu heterozigot olarak taşıdığını göstermektedir.



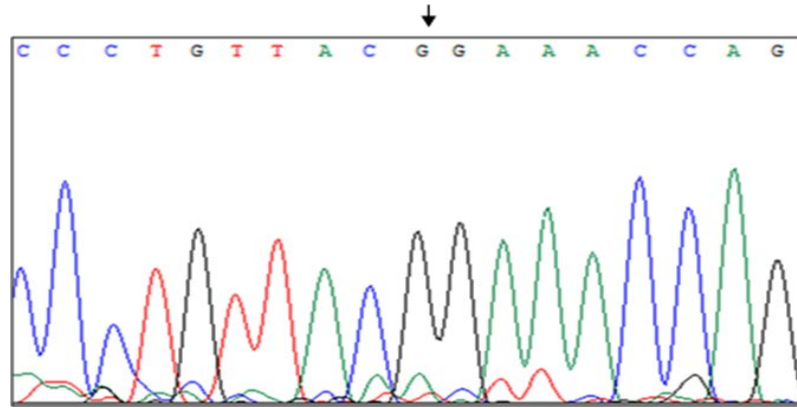
Şekil 4.2 I:2 no'lu bireyin DNA dizi analizi. Ok işareti bireyin c.1289-2A>G mutasyonunu heterozigot olarak taşıdığını göstermektedir.



Şekil 4.3 II:1 no'lu bireyin DNA dizi analizi. Ok işareti bireyin c.1289-2A>G mutasyonunu heterozigot olarak taşıdığını göstermektedir.



Şekil 4.4 II:2 no'lu bireyin DNA dizi analizi. Ok işareti bireyin c.1289-2A>G mutasyonunu homozigot olarak taşıdığını göstermektedir.



Şekil 4.5 II:4 no'lu bireyin DNA dizi analizi. Ok işareti bireyin c.1289-2A>G mutasyonunu homozigot olarak taşıdığını göstermektedir.

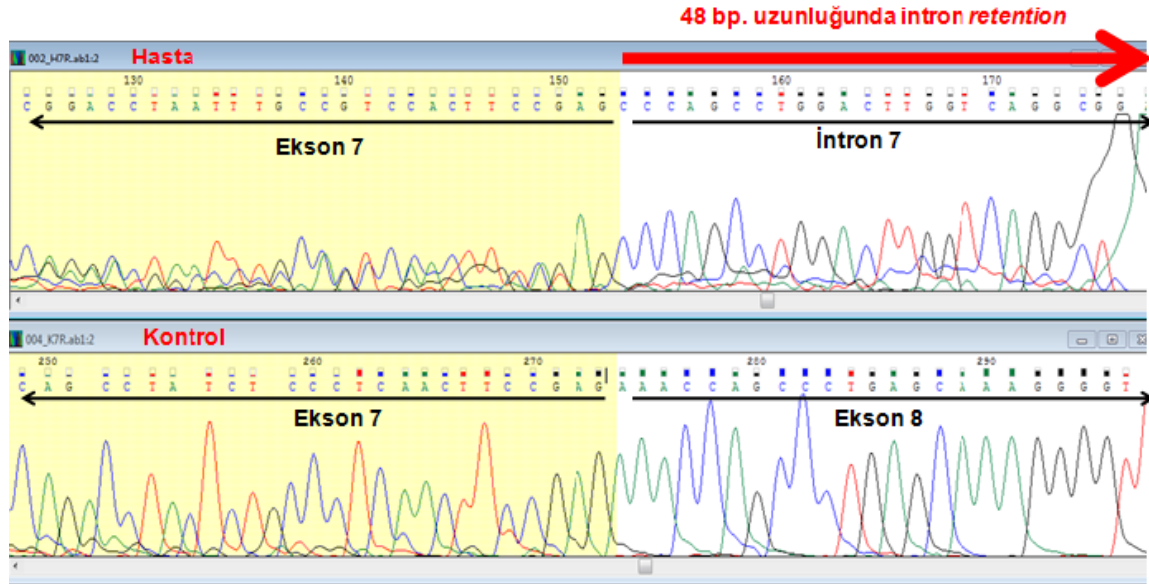
SBAK-1774 no'lu TÜBİTAK araştırma projesi kapsamında çalışılmış olan ancak bilinen hiçbir LGMD2 lokusuna bağlantı göstermeyen ailelerdeki LGMD2 fenotipi gösteren bireyleri DNA dizi analiziyle tarayarak mutasyonu taşıyan başka bireylerin varlığını araştırdık. Yaptığımız çalışmalarda 120 kromozom (60 birey) DNA'sı DNA dizi analizi ile taranmış ve bu bireylerde *DES* c.1289-2A>G mutasyonu bulunmadığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda c.1289-2A>G *splice site* mutasyonu yalnızca kasta ara filament görevi olan desmin proteininde oluşmuş olup 60 hastada mutasyonun gözlenmemiş olması, bu bölgenin türlerde korunmuşluğu ve dbSNP (SNP veri bankası), *1000 Genome* ve *HapMap* (*Haplotype Mapping*) proje verilerine göre bu bölgede A>G varyasyonu saptanmamış olması bu mutasyonun patojenik olduğunu düşündürmüştür.

4.3. RNA Dizisi Bulguları

c.1289-2A>G mutasyonunu homozigot olarak taşıyan hasta (II:4) ve heterozigot olarak taşıyan annenin (I:2) lenfosit cDNA'larından uygun primerlerle mutasyon içeren bölge PZR ile çoğaltılarak, mutasyonun RNA düzeyindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla bireylerden alınan kan örneklerinden lenfosit izolasyonu yapıldı. Elde edilen lenfositlerden RNA izolasyonu yapılarak cDNA'ya dönüştürüldü. Mutasyonu homozigot

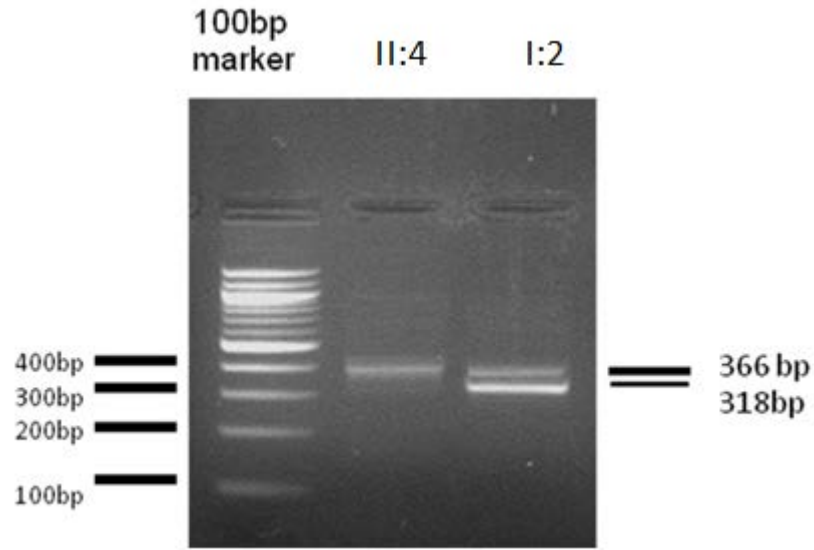
olarak taşıyan hasta DNA dizi analizi yöntemiyle incelendiğinde DNA düzeyinde saptanan c.1289-2A>G mutasyonunun, 7. ekson ile 8. ekson arasındaki introndan 48 bazın RNA dizisine eklenmesine sebep olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.6).



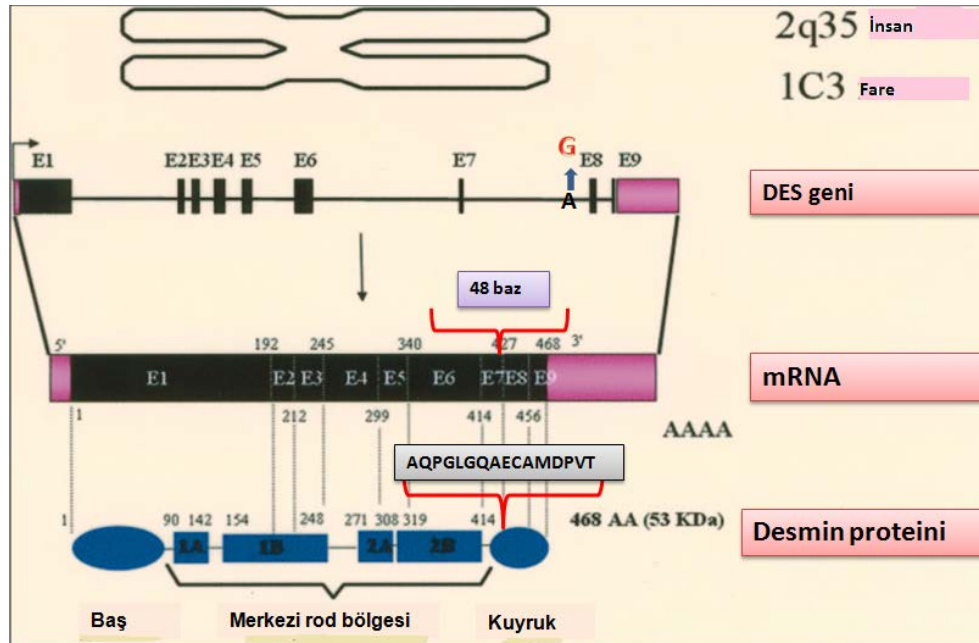
Şekil 4.6 Mutasyon bölgesinin cDNA dizi analizi. Mutasyon ile, hastanın desmin geninin 7. intronundaki 48 baz mRNA'nın okuma çerçevesine dahil olmuştur.

Mutasyonu heterozigot olarak taşıyan annenin (I:2) lenfosit cDNA'sı kalıp olarak kullanılarak mutasyonu içeren bölge çoğaltıldığında bu bölgede 48 bazın eklendiği (366 bç) ve eklenmediği (318 bç) iki farklı amplicon gözlemlendi. Mutasyonu homozigot olarak taşıyan hasta (II:4) ve annenin (I:2) cDNA örneği ile birlikte yürütülmüştür (Şekil 4.7). Bu şekilde ailede hastalığın desminopatide ender rastlanan kalıtım modeli olan otozomal resesif kalıtıldığı gösterilmiştir.

Şekil 4.8'de *DES* c.1289-2A>G mutasyonunun gen, RNA ve protein düzeyinde yaptığı değişiklik şematize edilmiştir.



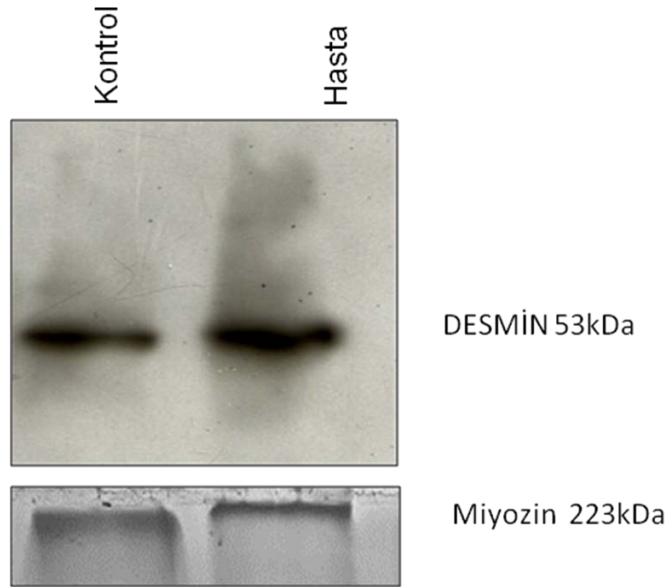
Şekil 4.7 Lenfosit cDNA'den PZR ile mutasyon bölgesinin çoğaltılması. Heterozigot bireyin (I:2) bir alleli 318 bç'lik, diğer alleli ise 48 bç'nin eklendiği 366 bç'lik bir ampikon oluşturmuştur.



Şekil 4.8 c.1289-2A>G mutasyonunun RNA ve protein üzerindeki yerleşimi

4.4. Western Blot Bulguları

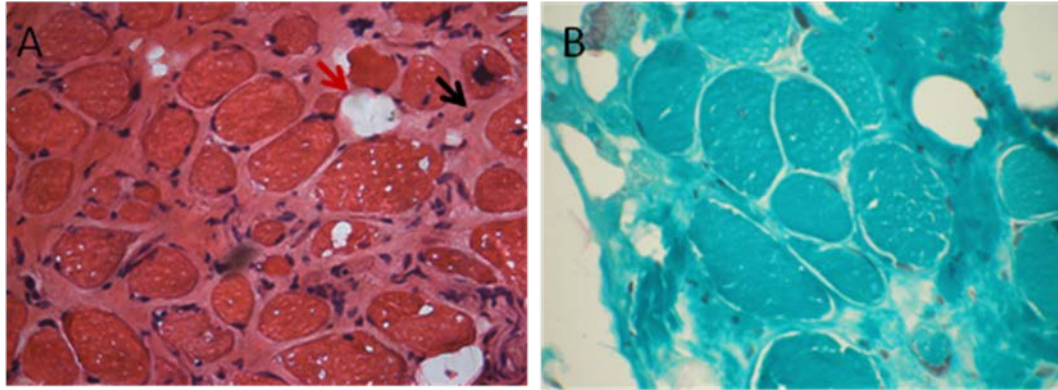
Hastadan alınan biyopsi materyalinden elde edilen protein ile yapılan western blot çalışmasında desmin proteininin hastada bulunduğu gösterildi (Şekil 4.9). Kullanılan desmin antikoru–Monoclonal anti-desmin Clone DEU-10 (Sigma)’dır.



Şekil 4.9 Desmin proteinine özgü antikarla yapılan western blot analizi. Kontrolde ve hastada desmin proteinin ifadesi gözlenmektedir. Miyozin internal kontrol olarak kullanılmıştır.

4.5. Histopatolojik Bulgular

Hasta kas patolojisini değerlendirebilmek için öncelikle *Hematoksilen Eosin* (H&E) boyaması yapılmıştır. Bu boyama sonuçlarına göre hasta kas dokusunda kas fibrilleri arasında doku harabiyeti nedeniyle bağ dokusunun geliştiği ve yağ dokusu infiltrasyonu olduğu gözlenmiştir. Nekrotik ve atrofik hücrelerin varlığı göze çarpmaktadır. *Gomori trichrome* boyamasında ise desminopati karakteristik özellikleri içinde yer alan koyu renkli boyanan, hücre içi birikimlerin bulunmadığı gösterilmiştir. (Şekil 4.10)

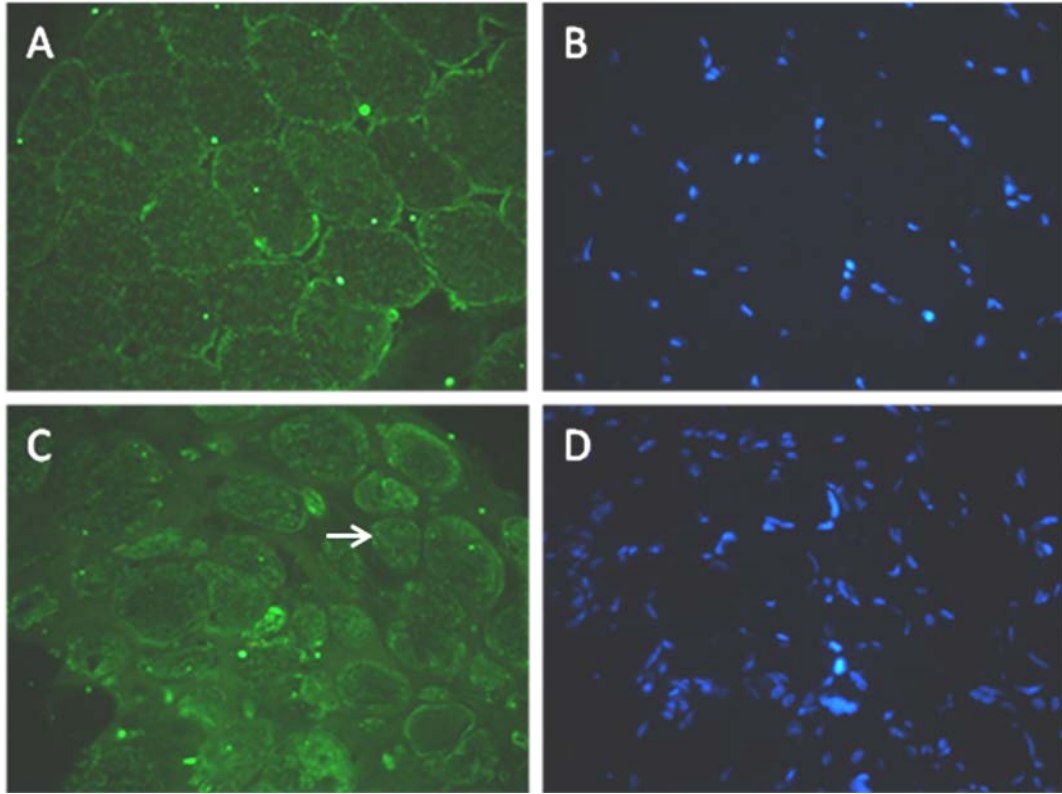


Şekil 4.10 Hasta iskelet kas biyopsi kesitinin histopatolojik boyaması. A) Hastaya ait kas biyopsisi *Hematoksilen Eosin* boyaması farklı büyüklüklerde kas hücrelerini, bağ dokusu artışını (Siyah okla gösterilmiştir.), yağ hücrelerinin varlığını (Kırmızı okla gösterilmiştir.), doku bütünlüğünün bozulduğunu göstermektedir (40X). B) Hastaya ait kas biyopsisinde yapılan *Gomori Trichrome* boyaması hücre içi birikimlerin oluşmadığını göstermektedir (40X).

4.6. İmmü Floresan Boyama Bulguları

Hastadan alınan ve taze-dondurulmuş kas biyopsisinden 7-8µm kalınlığında kesitler alınarak desmin proteinini tanıyan antikor ile immün boyama yapıldı.

İmmü floresan boyama için *Mouse-Monoclonal anti-desmin* antikor kullanıldı. Kontrol kas dokusu ile karşılaştırıldığında western blot sonucunu destekler şekilde desmin proteininin pozitif boyandığı gözlemlendi. (Şekil 4.11)

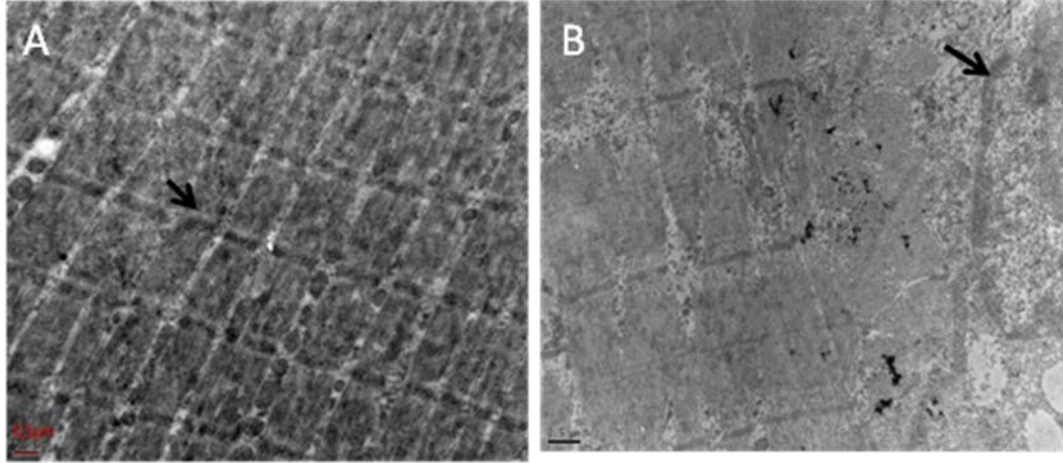


Şekil 4.11 Hasta iskelet kası biyopsi kesitinde desmin antikoruyla yapılan immunfloresan boyama. A) Kontrol kasın desmin antikoru ile yapılan boyaması (40X). B) Kontrol kas kesitinde (DAPI) çekirdek boyaması (40X). C) Hasta kasında desmin proteininin ifade edildiğini gösteren özgül desmin antikoru ile yapılan boyama (40X). Ok işareti kas hücrelerini göstermektedir. D) Hasta kas kesitinde (DAPI) çekirdek boyaması (40X)

4.7. Elektron Mikroskopu Bulguları

Desminle ilişkili miyopati hastalarında elektron mikroskopuyla yapılan çalışmalarda gözlenen karakteristik bozukluk, kaymış Z diskleri ve desmin ve ilişkide olduğu proteinlerin yıkılmaması sonucu oluşan birikimlerdir. Hastaya ait kas biyopsi örneğinden 50nm kalınlığında alınan kesitler elektron mikroskopunda görüntülendiğinde Z disklerin normal morfolojide olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12). Kesitin birçok bölgesi ayrıntılı incelendiğinde sitoplazmik agregat oluşumlarına rastlanmadı. Çekirdek,

mitokondri, sarkolemma bölgelerinde yapılan ayrıntılı görüntülemeler sonucunda patolojiye yol açabilecek bir yapısal bozukluk görülmemektedir.



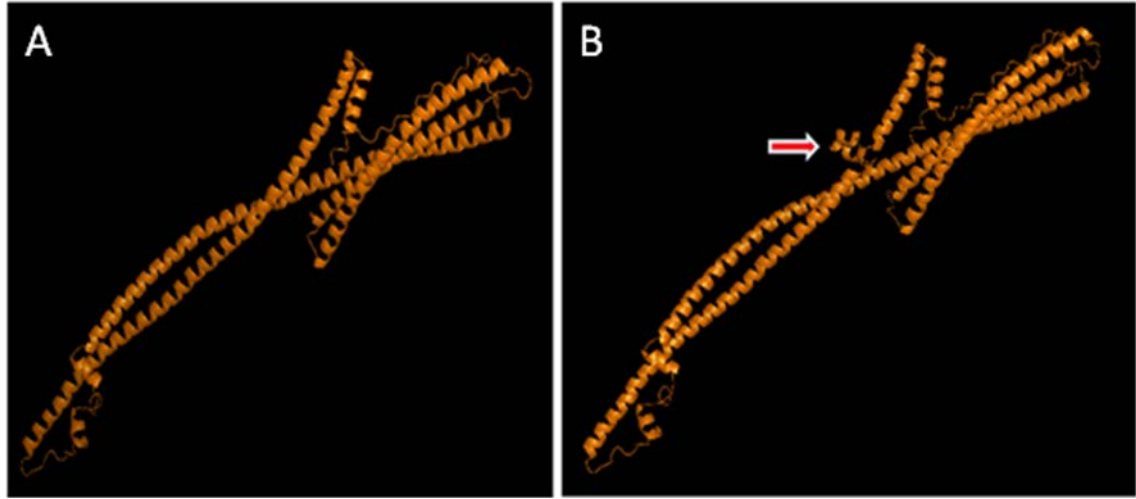
Şekil 4.12 Hasta iskelet kasının boyuna kesitinin elektron mikroskobu görüntüsü. A) Z disklerin organizasyonunun bozulmadığı gözlenmektedir. (Okla Z disk çizgisi gösterilmiştir.) B) Çekirdek morfolojisi bozulmamıştır. (Ok işareti çekirdeği göstermektedir.)

4.8. Protein Veri Tabanları Kullanılarak Aday Proteinlerin Belirlenmesi

Desmin proteinini kodlayan gende oluşan c.1289-2A>G mutasyonunun desmin ifadesini etkilememesi, kas patolojisinin nedeninin desminin ilişkili olduğu proteinlerle etkileşiminin bozulması olabileceğini düşündürmüştür. Desminin hangi proteinle etkileşiminin bozulmuş olabileceği sorusunun cevabını bulmak için ıslak laboratuvar çalışmalarına geçmeden önce gerek normal ve mutant desminin üçboyutlu analizini gerekse de desmin-protein etkileşimini in-siliko olarak gösteren veri bankalarından yararlanılmak istenmiştir. Bu çalışmada hedef, normal desminle etkileşime giren, ancak 16 amino asitin protein yapısına eklenmesine bağlı olarak üç boyutlu yapısı değiştiği için mutant desminle etkileşime giremeyen protein/proteinleri belirlemektir.

Desminin üç boyutlu yapısı bilinmemektedir. Bu durumda yapılması gereken doğada protein dizisi olarak desmine en çok benzerlik gösteren ve kristalografi yapısı deneysel olarak kanıtlanmış bir proteini saptamak ve referans protein olarak kullanmaktır. Vimentin amino asit dizisi %62,61 benzerlikle desmine benzeyen ve referans olarak kullanılabilen tek proteindir. Ancak, vimentin proteininin yalnızca merkezi *rod* domaininin üç boyutlu yapısı bilinmektedir. Desmin geninde saptadığımız mutasyon ise, proteinin kuyruk domainindedir. Bu nedenle vimentin, referans protein olarak kullanılamamıştır.

www.swissmodel.expasy.org adresindeki otomatik modelleme aracı kullanılarak desmin proteininin tahmini bir üç boyutlu yapısı ve bu yapının kodlandığı pdb dosyasını elde edebilmek desmin proteininin üç boyutlu yapısına yakın bir protein bulunamadığı için gerçeğe en yakın modelleme yapmak mümkün olmamıştır. Bunun yerine <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2> adresinden PHYRE sunucusu kullanılarak desminin üç boyutlu yapısı için bir tahmin elde edilmeye çalışılmıştır. PHYRE (Protein homology/Anology Recognition Engine) protein kütüphanesinde Protein Data Bank (www.pdb.org) protein veritabanından başka SCOP (Structural Classification of Protein) veritabanından da faydalanır (78). Desmin ve mutant desminin protein dizi bilgisi PHYRE sunucusuna verildiğinde proteinin üç boyutlu yapısı ve bu bilgiyi içeren pdb dosyası e-posta olarak gönderilmektedir. Bu şekilde elde edilen desmin ve mutant desminin üç boyutlu yapısını içeren pdb dosyalarının *Pymol 3D viewer* programında elde edilen görüntüsü Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Bu yapıda, mutasyon sonucu üç boyutlu yapıya katılan 16 amino asitin oluşturduğu çıkıntı kırmızı okla gösterilmiştir. PHYRE sunucusundan elde edilen pdb dosyalarının sunduğu üç boyutlu yapının normal ve mutant desmin arasındaki farklılığı açık olarak ortaya koymakla birlikte protein-protein etkileşimini analiz edilebilecek duyarlılıkta bir üç boyutlu yapı sunmadığı için bu sonucu protein-protein etkileşim çalışmasına taşımak mümkün olmamıştır.



Şekil 4.13 Desmin ve mutant desmin proteinlerinin üç boyutlu yapısının karşılaştırılması. Farklılık gösteren çıkıntı bölgesi okla gösterilmiştir. A) Desmin proteininin üç boyutlu yapısı B) c.1289-2A>G mutant desmin proteininin üç boyutlu yapısı

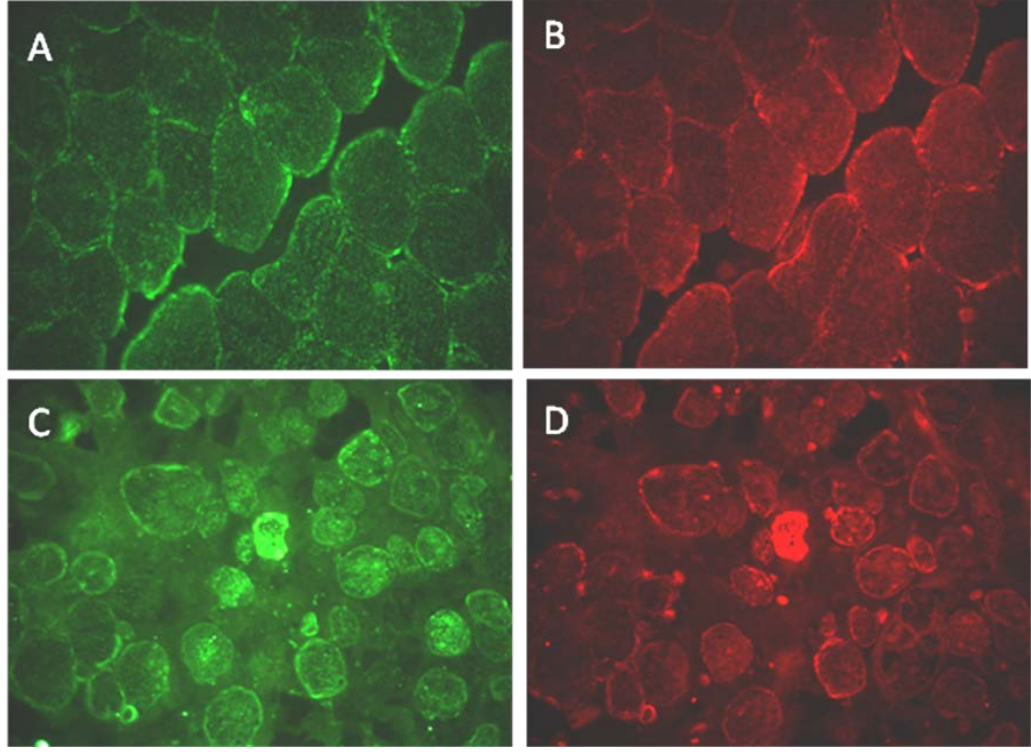
4.9. Aday proteinlerin belirlenmesi ve İmmunfloresan Boyama Bulguları

Hastada saptanan ve desminin normal ifadesini etkilemeyen c.1289-2A>G *splice site* mutasyonunun desmine bağlanan hangi protein ya da proteinlerin bağlanmasını engellediğini belirlemek için bazı proteinleri aday proteinler olarak belirleyip, desmine bağlanamama durumunda ifadelerinin değişip değişmediğine bakılmıştır. Desminle etkileşimi olan proteinlerden bazıları alfa-B kristalin, ankrin, aurora-B, miyotübüların, desmoplakin, spektrin, sinemin, sinkoilin, lamin B, plektin, nebülin, disferlindir (50,56,64,65,67,69,73,79,80).

Hasta kas dokusunda desminopati fenotipi görülmemekle birlikte distrofik değişikliklerin bulunması, patolojinin DAPC proteinlerinin desminle etkileşimlerinin bozulması sonucu olduğu öngörülmüştür. Bu nedenle, desminin mutant olması durumunda desmin ile etkileşime giren proteinlerin bu etkileşimi bozulacaktır. Etkileşimi bozulan bir protein, degradasyon yolağında ortadan kaldırılabilir, hücre içinde farklı yerleşim gösterebilir, ya da aynı yerde ifade edilir. Hatta mutant desmin bugüne

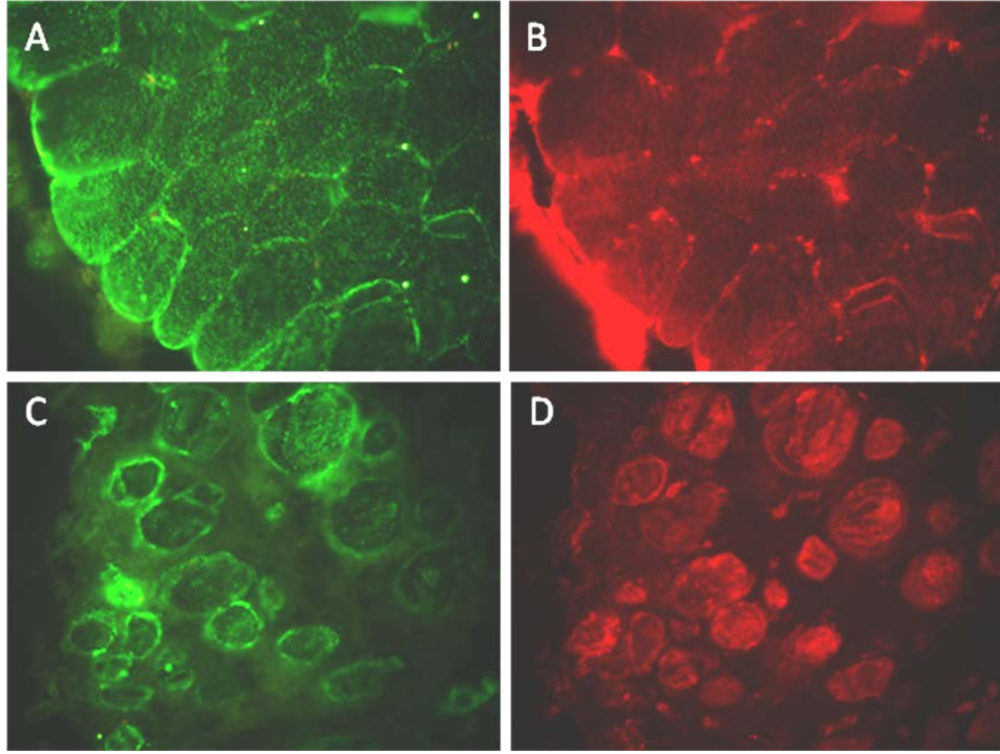
kadar desminle bağlandığı gösterilmemiş bir proteine de bağlanabilir. Bu çalışmada, belirlediğimiz desminle etkileşen aday proteinlerin, desmin mutasyonu sonucu, etkileşimin olamaması nedeniyle yıkılma olasılıkları değerlendirilmiştir.

Sinemin proteini desminle heterofilament oluştururken aynı zamanda distrofin ile ilişkili proteinlerden distrobrevine bağlandığı için aday protein olarak düşünülmüştür. Hasta ve kontrol kas biyopsisinde desmin-sinemin çift immunfloresan boyaması yapılmıştır. Hasta kas biyopsisinde kontrol kasa benzer şekilde iki proteinin aynı yerde bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Desmin ve sinemin proteinlerinin hasta ve kontrol kas dokusunda çift immunfloresan boyaması. A), B) Kontrol kas kesitinde yeşil işaretlenen desmin antikoru (40X) ve kontrol kas kesitinde kırmızı işaretlenen sinemin antikoru (40X) ile yapılan boyama sonucunda proteinlerin aynı yerde yerleşim gösterdiği gözlenmektedir. C), D) Hasta kas kesitinde yeşil işaretlenen desmin antikoru (40X) ve hasta kas kesitinde kırmızı işaretlenen sinemin antikoru (40X) ile yapılan boyama sonucunda proteinlerin aynı yerde yerleşim gösterdiği gözlenmektedir.

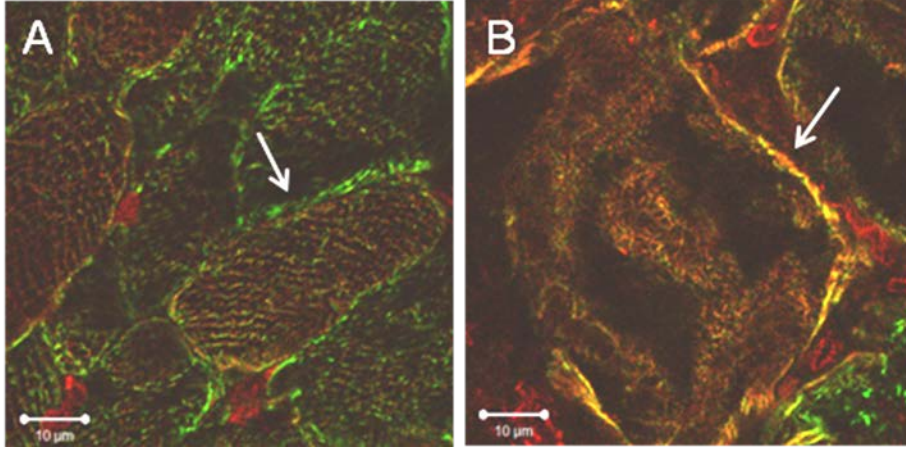
Sinkoilin iskelet kasında desmin ve alfa-distrobrevin ile etkileşimde olan ara filament benzeri bir proteindir. Hasta kas biyopsisinde çift immunfloresan boyama ile sinkoilinin ve desminin hücrede aynı yerde ifade edildikleri gösterilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Desmin ve sinkoilin proteinlerinin hasta ve kontrol kas dokusunda çift immunfloresan boyaması. A), B) Kontrol kas kesitinde yeşil işaretlenen desmin antikoru (40X) ve kontrol kas kesitinde kırmızı işaretlenen sinkoilin antikoru (40X) ile yapılan boyama sonucunda proteinlerin aynı yerde yerleşim gösterdiği gözlenmektedir. C), D) Hasta kas kesitinde yeşil işaretlenen desmin antikoru (40X) ve hasta kas kesitinde kırmızı işaretlenen sinkoilin antikoru (40X) ile yapılan boyama sonucunda proteinlerin aynı yerde yerleşim gösterdiği gözlenmektedir.

Plektin proteininin kasa özgü 1f izoformunun LGMD2'ye neden olduğu gösterilmiştir (81). Aynı zamanda *co-immunprecipitation* ve *in vitro* bağlanma analizi çalışmaları sonucunda plektinin DAPC içinde yer alan distrofin ve beta- sarkoglikan proteinleriyle etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir. Plektin, sarkomer ile hücre zarı ilişkisinin kurulmasına aracılık eden bir protein olduğu için desminle etkileşim bozukluğu distrofik bir fenotipe sebep olabilir. Plektin-desmin etkileşimi çift

immunfloresan boyamayı takiben konfokal mikroskobu ile görüntülediğinde kontrol ve hasta dokusunda sitoplazmik desmin proteininin yeşil ve plektin proteininin kırmızı floresanla işaretlenmesi sonucu sarı rengin oluştuğu gözlenmektedir. Bu bilgiler iki proteinin aynı yerde bulunduğunu ve ifade edildiklerini göstermektedir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 Hasta ve kontrol kas dokusunda desmin ve plektin proteinlerinin çift immunfloresan boyamasının konfokal mikroskobu görüntüsü. (Desmin yeşil, plektin kırmızı işaretlenmiştir.) A) Kontrol kas kesiti (63X) B) Hasta kas kesiti (63X) Oklar kas hücrelerini göstermektedir.

Bu tez kapsamında desmin genindeki c.1289-2A>G *splice site* mutasyonu sonucu bu bölgeye eklenen 16 amino asitin lamin B'nin desmine bağlanmasını etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Mutant desminin amino asit dizisi ve lamin B nin bağlanma bölgesi aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.17) Desmin ve lamin B proteinleri çift immunfloresan boyama yapılarak konfokal mikroskopta incelenmiştir.

MSQAYSSSQRVSSYRRTFGGAPGFPLGSPLSSPVFPRAGFGSKGSSSSVTSRVYQV
 SRTSGGAGGLGSLRASRLGTTTRTPSSYGAGELLDLDFSLADAVNQEFLLTRTNEKVEL
 QELNDRFANYIEKVRFLQQAALAAEVNRLKGREPTRVAELYEELRELRRQVEV
 LTNQRRARVDVERDNLDDLQRLKAKLQEEIQLKEEAENNLAAFRADVDAATLARI
 DLERRIESLNEEIAFLKKVHEEEIRELQAQLQEQVQVEMDMSKPDLTAAALDIRA
 QYETIAAKNISEAEEWYKSKVSDLTQAANKNNDALRQAKQEMMEYRHQIQSYTC
 EIDALKGTNDSLMRQMRELEDRFASEASGYQDNARLEEEIRHLKDEMARHLREY
 QDLLNVKMALDVEIATYRKLEGEESRINLPIQTYSALNFR**AQPGLGQAECAMDP**
VTETSPEQRGSEVHTKKTVMIKTIETRDGEVVSEATQQHEVL

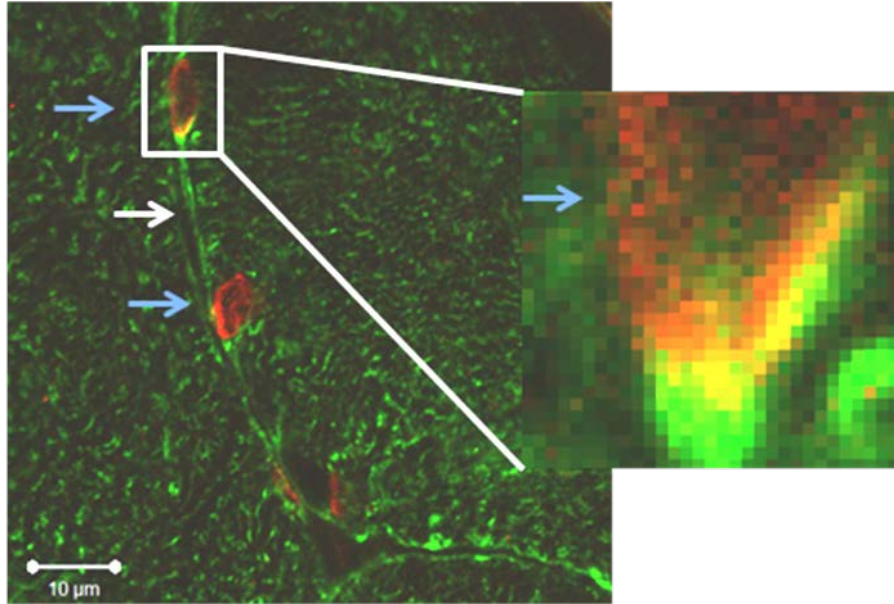
- **Lamin B'nin desmine bağlanma bölgesi**
- **Mutasyon sonucu eklenen 16 aminoasit**

Şekil 4.17 c.1289-2A>G *splice site* mutasyonu sonucu desmin proteinine eklenen 16 amino asitin ve lamin B'nin desmine bağlanma bölgesinin desmin proteini üzerinde gösterilmesi

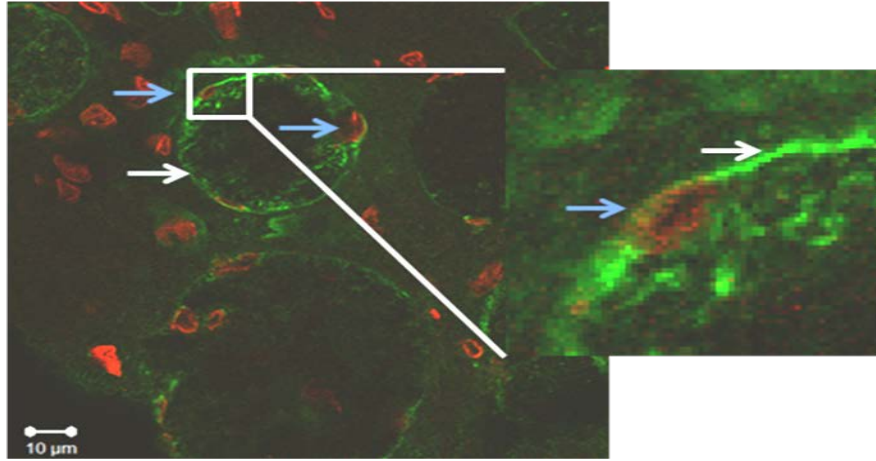
Desmin/lamin B konfokal mikroskopi görüntüleri (Şekil 4.18, 4.19, 4.20, 4.21). incelendiğinde desminin kas hücrelerinin sitoplazmasında, lamin B'nin ise çekirdekte yerleştiği görülmektedir. Farklı yerleşimli bu iki protein yalnızca çekirdekdeki gözenek bölgelerinde etkileşmektedir. Sağlıklı kas hücrelerinde çekirdekler periferde yerleşmiştir. Yeşil floresan, desminin ifade edildiği kas hücrelerini, bu hücrelerin periferinde gözlenen kırmızı renk ise lamin B'nin ifade edildiği çekirdekleri göstermektedir. Tek bir kas çekirdeğine odaklanıldığında, çekirdekte desmin-lamin B etkileştiğinde çekirdek üzerinde sarı renk oluşmaktadır. Kontrol kasta çekirdeklerde kırmızı ve yeşil rengin birlikte ışığa verdiği sarı bölgeler Şekil 4.18'da gösterilmiştir. Sekonder antikor ile boyama yapılarak sarı renk oluşumunun yalnızca pozitiflik olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.22).

Çalışmamızda, desmin-lamin B etkileşiminin konfokal mikroskobunda incelenmesi için kontrol kasın biyopsi kesitlerinde 6 farklı alanda, 13 kas çekirdeği seçilip 63X büyütmede incelenmiş ve 12'sinde sarı renk oluşumu gösterilmiştir. Bununla birlikte hasta kas biyopsisinden elde edilen konfokal görüntülerinde kas hücrelerine ait

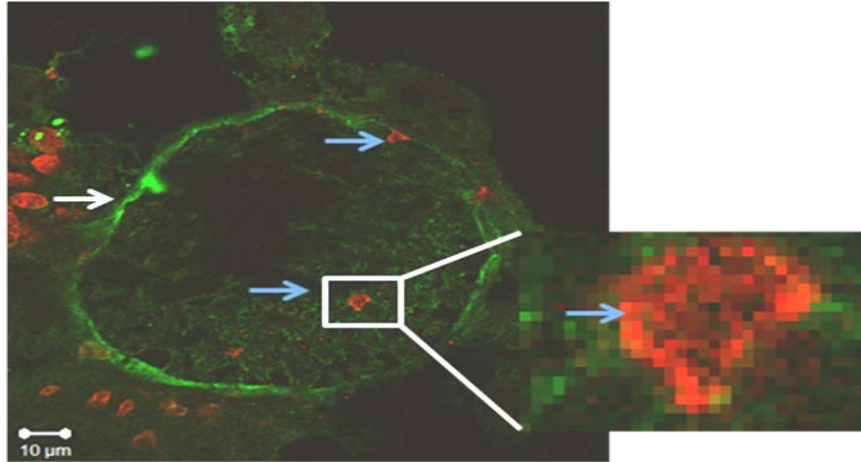
10 çekirdek sayılarak bunların 8'inde desmin ve lamin B'nin etkileşimde olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.19, 4.20, 4.21). Özellikle hastada bir kaç çekirdeğin birlikte olduğu alanda (Şekil 4.21) ve rejenere bir kas hücresinde gözlenen merkezi çekirdeğin görüldüğü şekil 4.20'de desmin-lamin B etkileşiminin olmadığı açık olarak gözlenmektedir. Hastada kas hücresi dışındaki hücrelerde de gözlenen çekirdek boyamasının nedeni hasta kas dokusunda patolojiye bağlı olarak bağ ve kan dokusu hücrelerinin de gözlenmesidir. Bu hücrelerde desmin ifade edilmez. Ancak, lamin B ifade edilir.



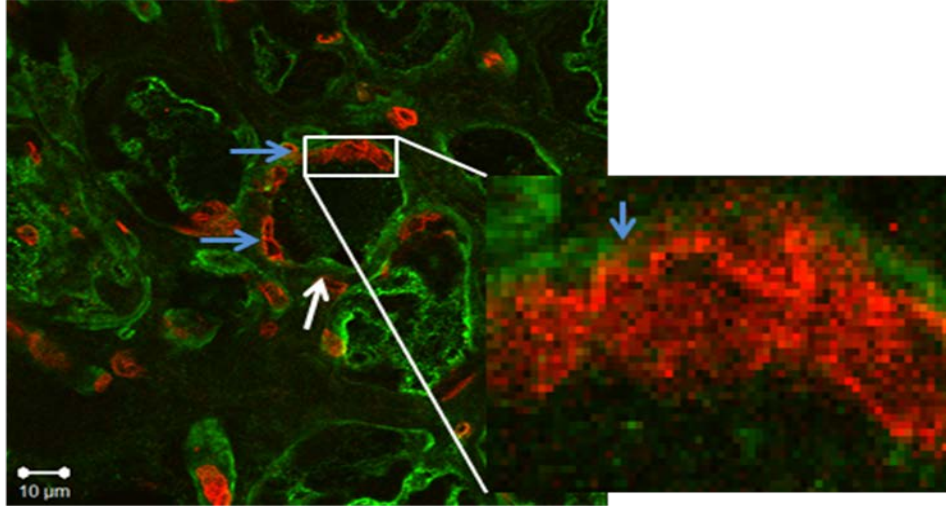
Şekil 4.18 Kontrol kas biyopsi kesitinde desmin (yeşil) ve lamin B (kırmızı) çift immunfloresan boyaması. Yeşil ve kırmızı rengin çakışmasıyla oluşan, iki proteinin etkileşimini gösteren sarı renkli pikseller görülmektedir (63x). Beyaz ok kas hücresi zarını, mavi oklar ise kas çekirdeğini göstermektedir.



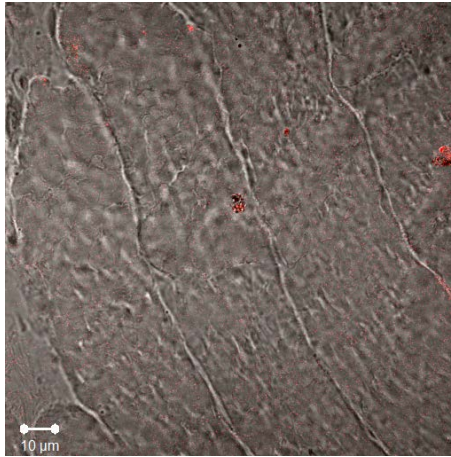
Şekil 4.19 Hasta kas biyopsi kesitinde desmin (yeşil) ve lamin B (kırmızı) çift immunfloresan boyaması (63x). Desmin-lamin B etkileşiminin bozulması nedeniyle sarı piksellerin gözlenmediği çekirdek bölgesi görülmektedir. Beyaz ok kas hücresi zarını, mavi oklar ise kas çekirdeğini göstermektedir.



Şekil 4.20 Hasta kas biyopsi kesitinde rejenere bir kas hücresinde gözlenen merkezi çekirdekte desmin (yeşil) ve lamin B (kırmızı) çift immunfloresan boyaması (63x). Desmin-lamin B etkileşiminin bozulması nedeniyle sarı piksellerin gözlenmediği çekirdek bölgesi görülmektedir. Beyaz ok kas hücresi zarını, mavi oklar ise kas çekirdeğini göstermektedir.

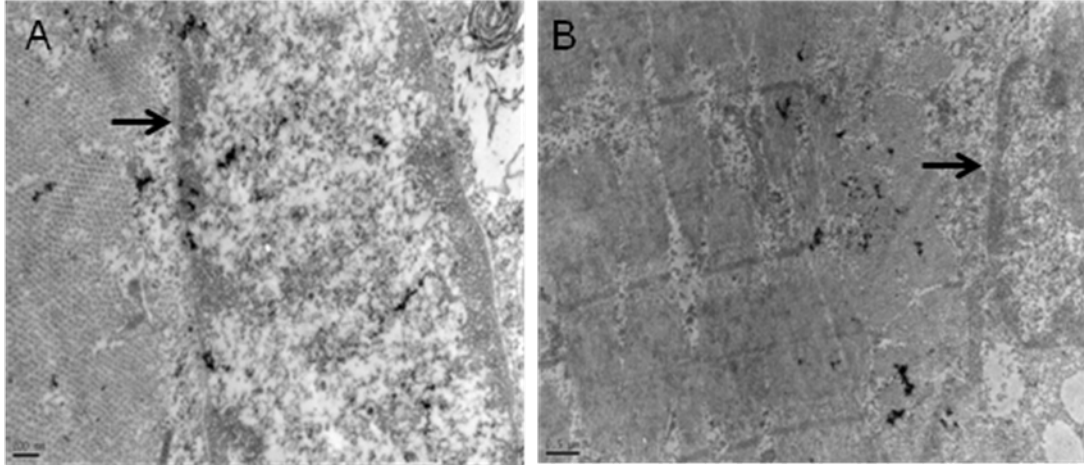


Şekil 4.21 Hasta kas biyopsi kesitinde desmin (yeşil) ve lamin B (kırmızı) çift immunfloresan boyaması. (63x). Desmin-lamin B etkileşiminin bozulması nedeniyle sarı piksellerin gözlenmediği çekirdek bölgesi görülmektedir. Beyaz ok kas hücresi zarını, mavi oklar ise kas çekirdeğini göstermektedir.



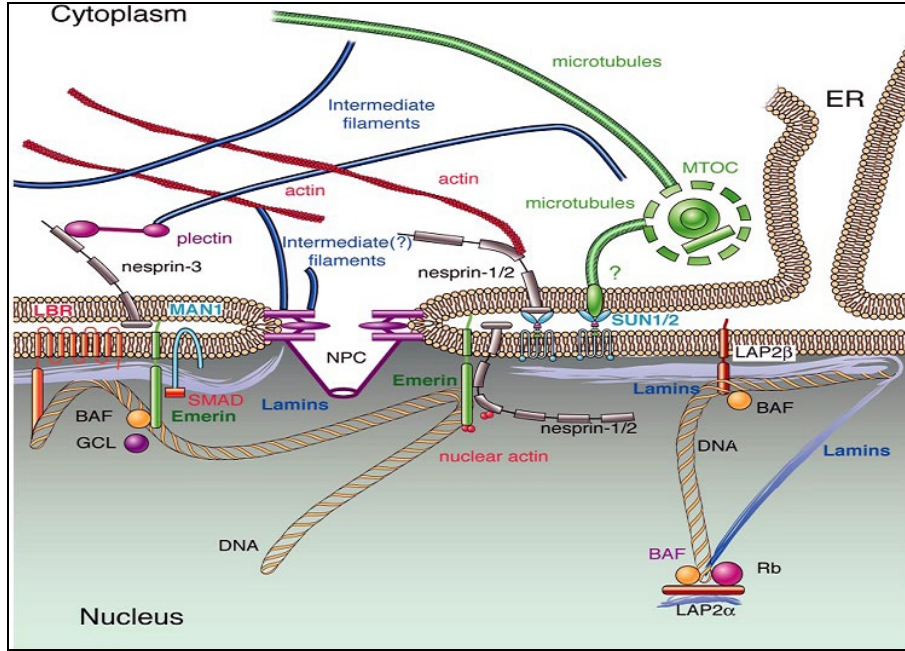
Şekil 4.22 Kontrol kas biyopsi kesitinde sekonder antikor ile boyama özgüllüğünün kontrolü. Işık mikroskobu altında yeşil ve kırmızı lazer görüntüsü alındığında, sekonder antikorların özgül primer antikor olmadan sinyal oluşturmadığı gösterilmiştir (63X).

Hastada desmin-lamin B etkileşiminin bozulmasının çekirdek morfolojisi üzerindeki etkilerini gözlemek için hasta biyopsi materyalinden alınan kesitlerde bir çok alan elektron mikroskobu ile taranmış ve hiçbir alanda çekirdek morfolojisinde ve yerleşiminde bozukluğa rastlanmamıştır (Şekil 4.23).

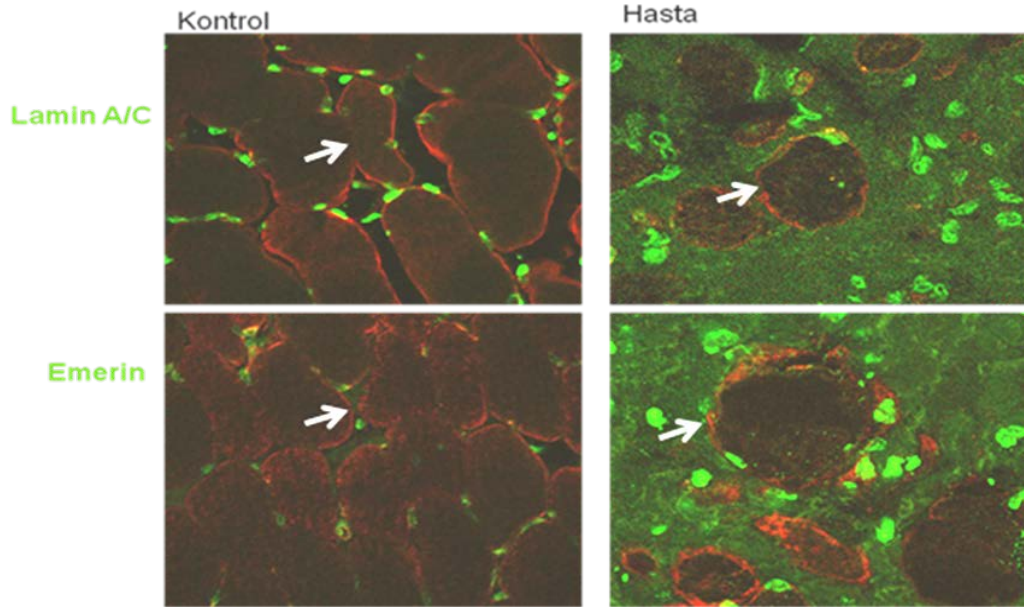


Şekil 4.23 Hasta iskelet kas kesitinde çekirdek yapısını (okla gösterilmiştir) ve yerleşimini gösteren elektron mikroskobu görüntüsü. A) 200nm büyütmede çekirdek morfolojisinin sağlıklı olduğu görülmektedir. B) 0,5µm büyütmede çekirdek yerleşiminin normal olduğu gözlenmektedir.

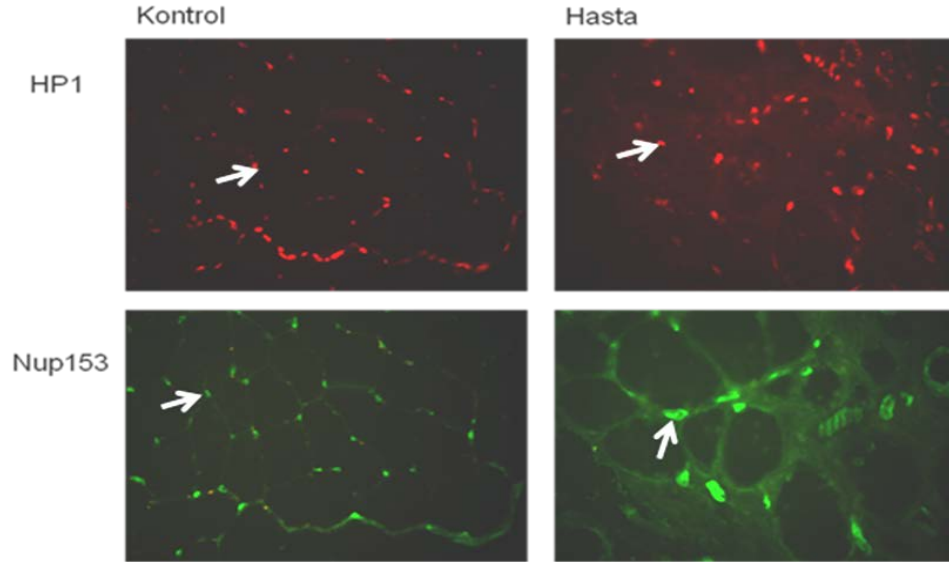
Çekirdekte yerleşmiş olan proteinlerin immunfloresan yöntemiyle varlıklarının araştırılmasıyla çekirdek yapısında bozukluk olmadığı bilgisi desteklenmiştir (Şekil 4.25, 4.26). Bu proteinler çekirdek gözenek bileşiminde Nup153, heterokromatin bölgesinde HP1, çekirdek zarının integral zar proteini olan emerin ve çekirdek laminasının temel elemanı olan Lamin A/C'dir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 Çekirdek proteinlerinin yerleşimi



Şekil 4.25 Kontrol ve hasta kas biyopsi kesitinde Lamin A/C ve Emerin yerleşimini ve ifadesini gösteren immunfloresan boyama. (Lamin A/C ve Emerin yeşil, desmin kırmızı işaretlenmiştir.).Oklar kas hüresini göstermektedir (40X).



Şekil 4.26 Kontrol ve hasta kas biyopsisinde HP1 ve NUP153'ün yerleşimini ve ifadesini gösteren immunfloresan boyama. Oklar kas çekirdeğini göstermektedir (40x).

5. TARTIŞMA

Müsküler distrofi ana başlığı altında dokuz farklı tipte hastalık tanımlanmıştır: *Duchenne* kas distrofisi (DMD); *Becker* kas distrofisi (BMD); *Emery-Dreifuss* kas distrofisi (EDMD); *Limb-Girdle* kas distrofisi (LGMD); *Facioscapulohumeral* kas distrofisi (FSHD); Myotonic distrofi (MMD); Oculopharyngeal kas distrofisi (OPMD); Distal kas distrofisi (DD); and *Congenital* kas distrofisi (CMD) (82) . Müsküler distrofilerden otozomal resesif kalıtılan limb-girdle kas distrofisi tipi olan LGMD2'ye sebep olduğu bilinen 16 lokus belirlenmiştir. Bu tez çalışmasına konu olan aileye klinik ve histopatolojik değerlendirme sonucunda LGMD2 tanısı konmuş olup bugüne kadar LGMD2'ye sebep olduğu bilinen lokuslar için genotipleme yapılmış ve bilinen hiçbir lokusa bağlantı vermediği gösterilmiştir. Bu ailede LGMD2 fenotipinden sorumlu yeni bir lokus tanımlamak için 50K XbaI SNP mikrodizileme çalışması yapılmış, ve homozigotluğun gözlendiği aralıkta bulunan 151 genden biri olan desmin geni aday gen olarak seçilerek DNA dizi analizine alınmıştır. Yapılan DNA dizi analizi sonucunda, nöromüsküler hastalıklardan miyofibriller miyopatinin bir alt grubu olan desminopati hastalığına sebep olan desmin geninde c.1289-2A>G mutasyonu bulunmuştur (Şekil 4.5). Desminopati karakteristik fenotipinde görülen kalp kası tutulumu, hücre içi agregatların oluşumu, filament yapısında bozulma, longitudinal iskelet kası kesitlerinde Z disklerde kayma ve çoğunlukla görülen otozomal dominant kalıtım tipinin hastada gözlenmemesi literatür için ilginç ve yeni bir durumdur. İlk kez bir LGMD2 hastasında desmin geninde mutasyon saptanmıştır. Hastanın fenotipi, klasik desminopati fenotipinden çok farklıdır, klinik tanı LGMD2'dir. Bu durumda gözönünde bulundurulması gereken, LGMD2 tanısı almış hastalarda mutant desmin geninin de aynı fenotipe sebep olabileceğidir. Bu sonuç, LGMD2 tanısı alan hastalarda desmin geninin de hastalıktan sorumlu genler arasına alınması gerekliliğini ortaya koymuştur. Ayrıca, tanımladığımız *DES* c.1289-2A>G mutasyonunun oluşturduğu patolojinin desminopati kliniğinden çok farklı olması nedeniyle aynı genin farklı mutasyonlarından kaynaklanan desminopati ve desmin ilişkili LGMD2'yi allelik hastalıklar olarak sınıflandırmak mümkündür.

Desmin mutasyonları çoğunlukla otozomal dominant kalıtılır. Yeni mutasyonların oluştuğu vakalar da mevcuttur. Literatürde hastalığın otozomal resesif aktarıldığı yalnızca iki vaka bulunmaktadır. Tez çalışmasında tanımladığımız bu vaka üçüncü vakadır. Diğer iki vakada hastalığın otozomal resesif aktarıldığı bildirilmekle beraber (29,31) tez kapsamında tanımladığımız bu vaka, mutasyonun aile içinde taşındığı haplotipin bireyler arasındaki segregasyonu (bu tez kapsamında çalışılmadığı için haplotip analizi sonucu gösterilmemiştir), anne ve babanın ortak haplotipi taşımalarına rağmen klinik muayenelerinde sağlıklı olmaları, DNA ve cDNA dizi analizi ile taşıyıcıların mutasyonu heterozigot taşıdıklarının gösterilmesi (Şekil 4.1, 4.2, 4.6) ile otozomal resesif kalıtım modelinin kesin olarak kanıtlanmış olduğu ilk vakadır. Otozomal resesif aktarılan desminopati vakalarında hastalığın erken yaşta başlaması ve bu hastaların hepsinde ağır kardiyomyopati fenotipi gözlenmesi sonunda hastalar 20'li yaşların sonlarında solunum yetmezliği ya da ani kalp yetmezliği ile kaybedilirler. Bu çalışmada yer alan 39 ve 45 yaşlarındaki iki hastada da kardiyomyopati gözlenmemesi hastalığın daha hafif seyretmesine neden olmaktadır. Bu yönüyle klasik desminopati kliniğinden ayrılmaktadır. Buna ilaveten, fenotipin hafif seyirli olması desmin proteininin ifade edilmesi ve işlev görmesiyle de örtüşmektedir.

Hastada desmin geninde saptanan c.1289-2A>G mutasyonu desminin kuyruk domaininde yer almaktadır. Kuyruk domaini mutasyonlarının hastalık oluşturma mekanizmalarını araştıran çalışmalarda, iki yaklaşımdan bahsedilmiştir. Birinci yaklaşımda, filamentin biyofiziksel özellikleri, diğer yaklaşımda ise, filamentin başka bir proteine bağlanma özellikleri ve bağlanmanın mutasyonlar sonucu değişebileceği düşünülerek protein-protein etkileşimleri incelenir. Bar ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışmalarda kuyruk domaininde bulunan desmin mutasyonlarının desmin filamentinin biyofiziksel özelliklerini ne şekilde etkilediği araştırılmış ve filament mimarisinin değiştiği sonucuna varılarak filament mimarisinin değişmesinin hastalık fenotipini oluşturacağı sonucuna varılmıştır (19). Yaptığımız bu tez çalışması, desminin kuyruk domaininde ilk kez tanımlanan c.1289-2A>G mutasyonunun desminin ifadesini etkilemediğini ve desmin ağının sağlıklı olarak oluştuğunu göstermiştir (Şekil 4.9, 4.11).

Bu durumda patolojinin nedenini ortaya koyabilmek için c.1289-2A>G mutasyonunun protein-protein etkileşimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

DES c.1289-2A>G mutasyonu sonucu desminle etkileşiminin bozulması olasılığı olan en güçlü aday protein lamin B'dir. Bu öngörünün sebebi mutasyon nedeniyle protein dizisine 16 aminositin eklendiği bölgenin, Georgatos ve arkadaşlarının 1987'de yaptığı çalışmaya göre lamin B'nin desmine bağlanma bölgesini bozmasıdır (Şekil 4.17) (69). Bununla birlikte desminin lamin B'ye bağlandığı *in vitro* bağlanma analizi çalışmalarıyla kanıtlanmıştır (69). Ayrıca, immungold işaretli desmin-lamin B proteinleri elektron mikroskobu ile görüntülenerek sitoplazmik bir ara filament elemanı olan desminin, çekirdek iç zarının altında yerleşmiş lamin B proteini ile yalnızca çekirdek gözenek boşluğundan etkileştiği gösterilmiştir (70). Bu öngörüye dayanarak kas biyopsisi kesitlerinde desmin-lamin B etkileşimi çift immunfloresan boyama sonrasında konfokal mikroskobu ile görüntülenmiş ve hastada bu etkileşimin bozulduğu gösterilmiştir (Şekil 4.18-4.21).

Konfokal mikroskobunda hasta kas biyopsi kesitlerinde desmin ve lamin B etkileşiminin bozulduğunun gösterilmiş olması, hücrede çekirdek morfolojisinin bu durumdan etkilenip etkilenmediğinin gösterilmesini gerektirmiştir. Elektron mikroskobunda hasta kas hücreleri incelendiğinde çekirdek morfolojisinde ve yerleşiminde bozulma olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.23). Mutasyon olmasına rağmen desminin normal düzeyde ifade edilmiş olması ve mutasyonun proteinin üç boyutlu yapısını değiştirecek olan 16 amino asitin desmin yapısına katılmasına neden olması; bu mutasyonun desminin bağlandığı bir proteinle olan etkileşimini yüksek olasılıkla bozacağını göstermektedir. Bu etkileşimin bozulduğunun konfokal mikroskobu görüntülerinde gösterilmiş olmasına rağmen kas morfolojisinin bozulmamış olması nedeniyle hastada gözlenen kas patolojisini destekleyecek morfolojik bir bulgu elde edilememiştir.

Hastalığın otozomal resesif aktarıldığı bu ailede iki kardeş hastanın kliniklerinin hafif seyirli olması ve hastanın kas biyopsisinde hafif miyopatik özelliklerin gözlenmesi,

bu ailede saptanmış olan desmin mutasyonunun fenotipe etkisinin de hastaların kliniği ile uyumlu olduğunu göstermiştir. Desmin degradasyonunun veya desmin agregasyonunun olmaması da bu nedenle beklenen bir durumdur. 16 amino asitlik insersiyonun desminin yapısal bütünlüğünü bozmaması çok şaşırtıcı bir sonuç olmamakla birlikte bu insersiyonun desminin diğer proteinlerle etkileşim domainlerini değiştirdiği aşıkardır. Konfokal analizi ile desmin ağı ile çekirdek zarfı arasında çekirdek gözenek boşluğunda gözlenen etkileşim zayıflığının nedeni desmin mutasyonunun lamin B'ye bağlanma domainini değiştirmesidir. Elektron mikroskobu görüntülerinde Z disk yapısının, mitokondrilerin ve çekirdek yapısının korunmuş olması, desmin ile lamin B arasındaki anormal etkileşimin major yapısal bir anormallik oluşturmaksızın gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak, kasın normal morfolojik yapısı, kasın işlevinin ve kas hücrelerinin birbirleri arasındaki mekanik transdüksiyonun normal olacağı anlamına gelmemektedir. Hücre dışı ortandan sitoplazmaya ve sitoplazmadan çekirdeğe olan hücre içi mekanik sinyal cevabının hızı ve doğruluğu, sitoplazmik ara filament proteinleri ile çekirdek ara filament proteinleri arasındaki sinyal iletiminin güçlülüğüne bağlıdır. Kas hücresinde hücre iskeleti ara filament proteini olan desmin ile çekirdek ara filament proteini olan lamin B arasındaki etkileşimin zayıflaması, kasın fiziksel strese dayanıklılığını azaltabilir. Bu durumda mekanik sinyalin kimyasal sinyale çevrilmesi de etkileneceğinden kas hücrelerinde dejenerasyon ve kas yıkımı gözlenmesi olasıdır.

Desmin-lamin B etkileşiminin bozulmasına bağlı olarak beklenen çekirdek morfolojisi bozukluğunun hastada gözlenmemiş olması, desmin-lamin B dışında farklı protein etkileşimlerinin sitoplazma ile çekirdek arasındaki filament ağı oluşumuna katıldıklarını düşündürmektedir. Nitekim, son yıllarda detaylı olarak tanımlanmış ve dört üyeden oluşmuş LINC kompleksinin çekirdek iskelet yapısını hücre iskeleti yapısına bağladığı ve çekirdek ile sitoplazma arasındaki mekanik bağlantının bu şekilde kurulduğu gösterilmiştir (75). LINC kompleksi proteinleri çekirdek iç zarında yerleşmiş olan SUN 1 ve SUN 2 proteinleri, çekirdek dış zarında yerleşmiş olan Nesprin-1 ve Nesprin-2 proteinleri, emerin ve laminlerdir. SUN proteinleri N ucu domainleri

aracılığıyla lamin A/C'ye bağlanır. Nesprin-1 ve 2, amino uçları, aktin bağlama domainleri ile aktin filamentlerine bağlanırken, KASH domainleri ile SUN domain proteinlerine ve direk olarak LaminA/C'ye ve emerine bağlanırlar. Nesprin-3, aktine bağlanma domaini bulunmadığı için plektine bağlanarak hücre iskeleti ara filamentleri ile etkileşime geçer (74). Çalışmamızda hasta kas biyopsi kesitlerinde yapılan konfokal mikroskopu görüntüleri, desmin ile plektinin kasta birlikte yerleşim gösterdiklerini ve etkileştiklerini saptamıştır-Şekil 4.16) Nesprin-3 KASH domaini ile SUN proteinlerine bağlanır. SUN proteinlerinin ise genel olarak lamine bağlandığı belirtilmiştir. Ancak, SUN proteinlerinin lamin B ye bağlandığı gösterilmemiştir. Diğer yandan, çekirdek gözenek proteini olan Nup153'ün Xenopus yumurtasında lamin B3 proteinine doğrudan bağlandığı ve bu bağlanmanın laminanın bütünlüğünün korunmasında önemli olduğu, Smythe ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmada gösterilmiştir (83). Bu durumda sitoplazma ile çekirdek arasındaki mekanik bağlantının oluşturulmasında tek eksik olan lamin B ile hangi proteinin bağlandığının bilinmesidir. Bu tez çalışmasında, lamin B'nin desmin üzerindeki bağlanma domaininde mutasyon olması nedeniyle hastada desmin-lamin B etkileşiminin gerçekleşmediğini saptayarak lamin B'nin desmine doğrudan bağlandığını gösterilmiştir. Bu, Georgatos ve arkadaşlarının (69) desmin ile lamin B'nin doğrudan etkileştiği sonucunu bir kez daha doğrulanmaktadır. Bu durumda lamin B'nin bir yandan NUP-153 proteini ile çekirdek gözenğine bağlandığını, bu tez çalışması ile de diğer yandan doğrudan desmine bağlanarak desmin ara filamentleri ile etkileştiğini ve böylelikle sitoplazmadan çekirdeğe uzanan mekanik iletinin daha kuvvetli kılındığını söylemek mümkündür. Ancak, bu tez çalışması sonucunda patolojinin nedeni olan desmin-lamin B etkileşiminin bozulmasının, kasın mekanik transdüksiyonunu etkileyerek kasın mekanik strese karşı dayanıklılığını azaltacağını ve kas liflerinin bunun sonucunda dejenerasyona giderek yıkılacaklarını öngörmek mümkün olmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doktora tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular aşağıda belirtildiği şekilde özetlenmiştir:

- ♣ *DES* c.1289-2A>G *splice site* mutasyonu RNA dizisinde 48 bazın *intron* tutulumu sonucunda mRNA dizisine eklenmesiyle sonuçlanmaktadır. Bu ek dizi protein okuma çerçevesini kaydırmadan proteinin kuyruk domainine 428. amino asitten sonra eklenmektedir.
- ♣ Protein ifadesinin kantitatif olarak mutasyondan etkilenmediği gösterilmiştir.
- ♣ Desminopati patolojisinde genellikle gözlenen çeşitli proteinlerin birikimiyle oluşan agregatlar ve Z disk seviyesinde kayma, kardiyomiyopati fenotipi gözlenmemektedir.
- ♣ Desminopati hastalığı genellikle otozomal dominant kalıttır. Bugüne kadar desminopatilerde otozomal resesif kalıtım tipinin gözlendiği 2 vaka bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında hastalığın otozomal resesif kalıtıldığı, aile bireylerinde mutant allelin dağılımına bakılarak kanıtlanmıştır.
- ♣ Desminle etkileştiği bilinen sinemin, sinkoilin, plektin proteinleri ile yapılan çift immunfloresan boyamalar sonucunda mutasyonun bu proteinlerin desmine bağlanmasını etkilemediği gösterilmiştir.
- ♣ Elektron mikroskopi bulgularına göre Z disklerde kayma gözlenmemektedir. Çekirdek ve mitokondri morfolojisinde bozukluk gözlenmemektedir.
- ♣ Desminle etkileştiği bilinen lamin B proteininin mutasyon sonucu desmine bağlanma bölgesinin kaybolmasıyla desmin-lamin B etkileşiminin bozulduğu bulunmuştur.
- ♣ Lamin B'nin etkileştiği çekirdek gözenek kompleksinde yer alan NUP153, Heterokromatin belirteci olan HP1, çekirdek laminasının bir diğer elemanı olan LaminA/C ve Emerin proteinlerinin hasta kas biyopsisinde ifade edildiği gösterilmiştir.

- ♣ Bu tez çalışması sonucunda , LGMD2 fenotipi gösteren hastalarda CAPN3 (Calpain 3), SGCA, SGCB, SGCG, SGCD (alfa, beta, gamma, delta-sarkoglikan), FKRP (Fukutin Related protein), FKTN (Fukutin), POMT1 (Protein O-Mannosyltransferase 1), POMGnT1 (Protein O-Mannose Beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase), DYSF (Dysferlin), PLEC1F (Plectin1F), TRIM32 (Tripartite motif-containing protein 32), TCAP (Telethonin), TTN (Titin), POMT2 Protein O-Mannosyltransferase 1, ANO5 (Anoctamin 5), Dag1 (Dystrophin-Associated Glycoprotein 1); ile birlikte desmin proteinini kodlayan desmin geninin de taranması gerekliliği ortaya konmuştur.
- ♣ Yeni bir LGMD2 lokusu tanımlanmıştır.
- ♣ Desmin geninde ilk kez tanımlanan c.1289-2A>G mutasyonu sonucunda desmin-lamin B etkileşimi bozulmuştur.

Öneriler:

1. LGMD2 hastalarında yeni bir LGMD2 lokusu olarak desmin geninin de taranması önerilmektedir.
2. Mutant desmini ifade eden hücre hatlarında *DES* c.1289-2A>G mutasyonunun patolojik etkisinin gösterilmesi:
 - a) Çalışmadan elde edilen sonuçlar LGMD2 fenotipi gösteren desmin mutasyonu taşıyan hastalığın desmin-lamin B proteinlerinin etkileşimindeki bozukluğun sebep olduğu bir patolojiden kaynaklanabileceğini göstermiştir. Ancak etkileşim bozukluğu farklı etkileşim çalışmalarıyla desteklenmelidir. Bu nedenle hastadan alınan fibroblast hücre hattı kasa farklılaştırılarak elde edilen hücrelerden Co-IP (*Co-Immunprecipitation*) yöntemi ile kontrol ve hasta kas dokusunda desmin-lamin B proteinlerinin etkileşimi test edilmelidir.
 - b) Kurulan kas hücre kültüründe mutant desminin oluşturduğu filament ağı biyofiziksel olarak incelenmelidir. Biyofiziksel inceleme,

mekanotransdüksiyonun etkilendiğinin gösterilmesi açısından önemli olacaktır.

- c) Yapılan tez çalışması kapsamında mutasyon içeren desminin proteinlerle ilişkisi incelenmiştir. Bunun yanında ikinci bir yaklaşım da desminin oluşturduğu filament ağının morfolojik olarak araştırılmasıdır.
- d) Desmin proteini yapısal görevini çok sayıda proteine bağlanarak gerçekleştirmektedir. Desmine bağlanan çok sayıda proteinin c.1289-2A>G mutasyonu içeren desmine bağlanma ilgisini araştırmak için *Array Based Yeast Two Hybrid System* kullanılabilir. *Yeast two hybrid* sistemden farklı olarak ikiden fazla proteinin etkileşimini tespit edebildiği için interaktom çalışmalarında kullanılmak üzere geliştirilen bir metoddur.

KAYNAKLAR

1. Lazarides, E. (1980) Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*, 283 (5744), 249-256.
2. Fuchs, E., Weber, K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annual review of biochemistry*, 63, 345-382.
3. Price, M.G. (1984) Molecular analysis of intermediate filament cytoskeleton--a putative load-bearing structure. *The American journal of physiology*, 246 (4 Pt 2), H566-572.
4. Viegas-Pequignot, E., Li, Z.L., Dutrillaux, B., Apiou, F., Paulin, D. (1989) Assignment of human desmin gene to band 2q35 by nonradioactive in situ hybridization. *Human genetics*, 83 (1), 33-36.
5. Li, Z.L., Lilienbaum, A., Butler-Browne, G., Paulin, D. (1989) Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development. *Gene*, 78 (2), 243-254.
6. Weber, K., Geisler, N. (1985) Intermediate filaments: structural conservation and divergence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 455, 126-143.
7. Heins, S., Aebi, U. (1994) Making heads and tails of intermediate filament assembly, dynamics and networks. *Current opinion in cell biology*, 6 (1), 25-33.
8. Kaufmann, E., Weber, K., Geisler, N. (1985) Intermediate filament forming ability of desmin derivatives lacking either the amino-terminal 67 or the carboxy-terminal 27 residues. *Journal of molecular biology*, 185 (4), 733-742.
9. Kawajiri, A., Yasui, Y., Goto, H., Tatsuka, M., Takahashi, M., Nagata, K. ve diğeri. (2003) Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinately with Rho-kinase. *Molecular biology of the cell*, 14 (4), 1489-1500.
10. Geisler, N., Weber, K. (1982) The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins. *The EMBO journal*, 1 (12), 1649-1656.

11. Brown, J.H., Cohen, C., Parry, D.A. (1996) Heptad breaks in alpha-helical coiled coils: stutters and stammers. *Proteins*, 26 (2), 134-145.
12. Strelkov, S.V., Herrmann, H., Geisler, N., Wedig, T., Zimbelmann, R., Aebi, U. ve diğeri. (2002) Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly. *The EMBO journal*, 21 (6), 1255-1266.
13. Strelkov, S.V., Burkhard, P. (2002) Analysis of alpha-helical coiled coils with the program TWISTER reveals a structural mechanism for stutter compensation. *J Struct Biol*, 137 (1-2), 54-64.
14. Herrmann, H., Strelkov, S.V., Feja, B., Rogers, K.R., Brettel, M., Lustig, A. ve diğeri. (2000) The intermediate filament protein consensus motif of helix 2B: its atomic structure and contribution to assembly. *Journal of molecular biology*, 298 (5), 817-832.
15. Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Muller, S.A., Goldie, K.N., Fedtke, B. ve diğeri. (1996) Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *Journal of molecular biology*, 264 (5), 933-953.
16. Heimburg, T., Schuenemann, J., Weber, K., Geisler, N. (1996) Specific recognition of coiled coils by infrared spectroscopy: analysis of the three structural domains of type III intermediate filament proteins. *Biochemistry*, 35 (5), 1375-1382.
17. Rogers, K.R., Eckelt, A., Nimmrich, V., Janssen, K.P., Schliwa, M., Herrmann, H. ve diğeri. (1995) Truncation mutagenesis of the non-alpha-helical carboxyterminal tail domain of vimentin reveals contributions to cellular localization but not to filament assembly. *European journal of cell biology*, 66 (2), 136-150.
18. Bar, H., Goudeau, B., Walde, S., Casteras-Simon, M., Mucke, N., Shatunov, A. ve diğeri. (2007) Conspicuous involvement of desmin tail mutations in diverse cardiac and skeletal myopathies. *Human mutation*, 28 (4), 374-386.

19. Bar, H., Schopferer, M., Sharma, S., Hochstein, B., Mucke, N., Herrmann, H. ve diğerleri. (2010) Mutations in desmin's carboxy-terminal "tail" domain severely modify filament and network mechanics. *Journal of molecular biology*, 397 (5), 1188-1198.
20. Mavroidis, M., Panagopoulou, P., Kostavasili, I., Weisleder, N., Capetanaki, Y. (2008) A missense mutation in desmin tail domain linked to human dilated cardiomyopathy promotes cleavage of the head domain and abolishes its Z-disc localization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22 (9), 3318-3327.
21. Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S.V., Aebi, U. (2007) Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8 (7), 562-573.
22. Parry, D.A., Strelkov, S.V., Burkhard, P., Aebi, U., Herrmann, H. (2007) Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly. *Experimental cell research*, 313 (10), 2204-2216.
23. Sokolova, A.V., Kreplak, L., Wedig, T., Mucke, N., Svergun, D.I., Herrmann, H. ve diğerleri. (2006) Monitoring intermediate filament assembly by small-angle x-ray scattering reveals the molecular architecture of assembly intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (44), 16206-16211.
24. Li, H., Capetanaki, Y. (1993) Regulation of the mouse desmin gene: transactivated by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5. *Nucleic acids research*, 21 (2), 335-343.
25. Milner, D.J., Weitzer, G., Tran, D., Bradley, A., Capetanaki, Y. (1996) Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *The Journal of cell biology*, 134 (5), 1255-1270.
26. Li, Z., Colucci-Guyon, E., Pincon-Raymond, M., Mericskay, M., Pournin, S., Paulin, D. ve diğerleri. (1996) Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin. *Developmental biology*, 175 (2), 362-366.

27. Selcen, D., Ohno, K., Engel, A.G. (2004) Myofibrillar myopathy: clinical, morphological and genetic studies in 63 patients. *Brain : a journal of neurology*, 127 (Pt 2), 439-451.
28. Goldfarb, L.G., Vicart, P., Goebel, H.H., Dalakas, M.C. (2004) Desmin myopathy. *Brain : a journal of neurology*, 127 (Pt 4), 723-734.
29. Goldfarb, L.G., Park, K.Y., Cervenakova, L., Gorokhova, S., Lee, H.S., Vasconcelos, O. ve diğeri. (1998) Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nature genetics*, 19 (4), 402-403.
30. Selcen, D. (2011) Myofibrillar myopathies. *Neuromuscular disorders : NMD*, 21 (3), 161-171.
31. Munoz-Marmol, A.M., Strasser, G., Isamat, M., Coulombe, P.A., Yang, Y., Roca, X. ve diğeri. (1998) A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (19), 11312-11317.
32. Goudeau, B., Rodrigues-Lima, F., Fischer, D., Casteras-Simon, M., Sambuughin, N., de Visser, M. ve diğeri. (2006) Variable pathogenic potentials of mutations located in the desmin alpha-helical domain. *Human mutation*, 27 (9), 906-913.
33. Schroder, R., Goudeau, B., Simon, M.C., Fischer, D., Eggermann, T., Clemen, C.S. ve diğeri. (2003) On noxious desmin: functional effects of a novel heterozygous desmin insertion mutation on the extrasarcomeric desmin cytoskeleton and mitochondria. *Human molecular genetics*, 12 (6), 657-669.
34. Park, K.Y., Dalakas, M.C., Goebel, H.H., Ferrans, V.J., Semino-Mora, C., Litvak, S. ve diğeri. (2000) Desmin splice variants causing cardiac and skeletal myopathy. *Journal of medical genetics*, 37 (11), 851-857.
35. MacArthur, M.W., Thornton, J.M. (1991) Influence of proline residues on protein conformation. *Journal of molecular biology*, 218 (2), 397-412.
36. Raats, J.M., Henderik, J.B., Verdijk, M., van Oort, F.L., Gerards, W.L., Ramaekers, F.C. ve diğeri. (1991) Assembly of carboxy-terminally deleted desmin in vimentin-free cells. *European journal of cell biology*, 56 (1), 84-103.

37. Selcen, D., Engel, A.G. (1993). Myofibrillar Myopathy. R. A. Pagon, T. D. Bird, C. R. Dolan, K. Stephens & M. P. Adam (Ed.). GeneReviews. Seattle (WA)
38. Horwitz, J. (2000) The function of alpha-crystallin in vision. *Seminars in cell & developmental biology*, 11 (1), 53-60.
39. Perng, M.D., Wen, S.F., van den, I.P., Prescott, A.R., Quinlan, R.A. (2004) Desmin aggregate formation by R120G alphaB-crystallin is caused by altered filament interactions and is dependent upon network status in cells. *Molecular biology of the cell*, 15 (5), 2335-2346.
40. Salmikangas, P., van der Ven, P.F., Lalowski, M., Taivainen, A., Zhao, F., Suila, H. ve diğeri. (2003) Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly. *Human molecular genetics*, 12 (2), 189-203.
41. Hauser, M.A., Horrigan, S.K., Salmikangas, P., Torian, U.M., Viles, K.D., Dancel, R. ve diğeri. (2000) Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Human molecular genetics*, 9 (14), 2141-2147.
42. Faulkner, G., Pallavicini, A., Formentin, E., Comelli, A., Ievolella, C., Trevisan, S. ve diğeri. (1999) ZASP: a new Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein. *The Journal of cell biology*, 146 (2), 465-475.
43. Selcen, D., Engel, A.G. (2005) Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Annals of neurology*, 57 (2), 269-276.
44. Thompson, T.G., Chan, Y.M., Hack, A.A., Brosius, M., Rajala, M., Lidov, H.G. ve diğeri. (2000) Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *The Journal of cell biology*, 148 (1), 115-126.
45. Vorgerd, M., van der Ven, P.F., Bruchertseifer, V., Lowe, T., Kley, R.A., Schroder, R. ve diğeri. (2005) A mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy. *American journal of human genetics*, 77 (2), 297-304.
46. Selcen, D., Muntoni, F., Burton, B.K., Pegoraro, E., Sewry, C., Bite, A.V. ve diğeri. (2009) Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Annals of neurology*, 65 (1), 83-89.

47. Titeux, M., Brocheriou, V., Xue, Z., Gao, J., Pellissier, J.F., Guicheney, P. ve diğerleri. (2001) Human synemin gene generates splice variants encoding two distinct intermediate filament proteins. *European journal of biochemistry / FEBS*, 268 (24), 6435-6449.
48. Chourbagi, O., Bruston, F., Carinci, M., Xue, Z., Vicart, P., Paulin, D. ve diğerleri. (2011) Desmin mutations in the terminal consensus motif prevent synemin-desmin heteropolymer filament assembly. *Experimental cell research*, 317 (6), 886-897.
49. Tinsley, J.M., Blake, D.J., Zuellig, R.A., Davies, K.E. (1994) Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (18), 8307-8313.
50. Poon, E., Howman, E.V., Newey, S.E., Davies, K.E. (2002) Association of syncoilin and desmin: linking intermediate filament proteins to the dystrophin-associated protein complex. *The Journal of biological chemistry*, 277 (5), 3433-3439.
51. Newey, S.E., Howman, E.V., Ponting, C.P., Benson, M.A., Nawrotzki, R., Loh, N.Y. ve diğerleri. (2001) Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*, 276 (9), 6645-6655.
52. Goldfarb, L.G., Dalakas, M.C. (2009) Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *The Journal of clinical investigation*, 119 (7), 1806-1813.
53. Hirako, Y., Yamakawa, H., Tsujimura, Y., Nishizawa, Y., Okumura, M., Usukura, J. ve diğerleri. (2003) Characterization of mammalian synemin, an intermediate filament protein present in all four classes of muscle cells and some neuroglial cells: co-localization and interaction with type III intermediate filament proteins and keratins. *Cell and tissue research*, 313 (2), 195-207.
54. Breckler, J., Lazarides, E. (1982) Isolation of a new high molecular weight protein associated with desmin and vimentin filaments from avian embryonic skeletal muscle. *The Journal of cell biology*, 92 (3), 795-806.

55. Price, M.G. (1987) Skelemins: cytoskeletal proteins located at the periphery of M-discs in mammalian striated muscle. *The Journal of cell biology*, 104 (5), 1325-1336.
56. Bang, M.L., Gregorio, C., Labeit, S. (2002) Molecular dissection of the interaction of desmin with the C-terminal region of nebulin. *J Struct Biol*, 137 (1-2), 119-127.
57. Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Capetanaki, Y., Cryns, V.L. (2003) Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 278 (9), 6848-6853.
58. Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., Cong, J. (2003) The calpain system. *Physiological reviews*, 83 (3), 731-801.
59. Schroder, R., Furst, D.O., Klasen, C., Reimann, J., Herrmann, H., van der Ven, P.F. (2000) Association of plectin with Z-discs is a prerequisite for the formation of the intermyofibrillar desmin cytoskeleton. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 80 (4), 455-464.
60. Schroder, R., Warlo, I., Herrmann, H., van der Ven, P.F., Klasen, C., Blumcke, I. ve diğeri. (1999) Immunogold EM reveals a close association of plectin and the desmin cytoskeleton in human skeletal muscle. *European journal of cell biology*, 78 (4), 288-295.
61. Milner, D.J., Mavroidis, M., Weisleder, N., Capetanaki, Y. (2000) Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *The Journal of cell biology*, 150 (6), 1283-1298.
62. Hijikata, T., Murakami, T., Imamura, M., Fujimaki, N., Ishikawa, H. (1999) Plectin is a linker of intermediate filaments to Z-discs in skeletal muscle fibers. *Journal of cell science*, 112 (Pt 6), 867-876.
63. Hofmann, I., Mertens, C., Brettel, M., Nimmrich, V., Schnolzer, M., Herrmann, H. (2000) Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *Journal of cell science*, 113 (Pt 13), 2471-2483.

64. Favre, B., Schneider, Y., Lingasamy, P., Bouameur, J.E., Begre, N., Gontier, Y. ve diğerleri. (2011) Plectin interacts with the rod domain of type III intermediate filament proteins desmin and vimentin. *European journal of cell biology*, 90 (5), 390-400.
65. Lapouge, K., Fontao, L., Champlaud, M.F., Jaunin, F., Frias, M.A., Favre, B. ve diğerleri. (2006) New insights into the molecular basis of desmoplakin- and desmin-related cardiomyopathies. *Journal of cell science*, 119 (Pt 23), 4974-4985.
66. Otten, E., Asimaki, A., Maass, A., van Langen, I.M., van der Wal, A., de Jonge, N. ve diğerleri. (2010) Desmin mutations as a cause of right ventricular heart failure affect the intercalated disks. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*, 7 (8), 1058-1064.
67. Granger, B.L., Lazarides, E. (1980) Synemin: a new high molecular weight protein associated with desmin and vimentin filaments in muscle. *Cell*, 22 (3), 727-738.
68. Bennett, V., Healy, J. (2008) Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin. *Trends in molecular medicine*, 14 (1), 28-36.
69. Georgatos, S.D., Weber, K., Geisler, N., Blobel, G. (1987) Binding of desmin derivatives to plasma membrane and the nuclear envelope of avian erythrocytes: Evidence for conserved site-specificity in intermediate filament-membrane interactions *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 6780-6784.
70. Lockard, V.G., Bloom, S. (1993) Trans-cellular desmin-lamin B intermediate filament network in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 25, 303-309.
71. Bellin, R.M., Huiatt, T.W., Critchley, D.R., Robson, R.M. (2001) Synemin may function to directly link muscle cell intermediate filaments to both myofibrillar Z-lines and costameres. *The Journal of biological chemistry*, 276 (34), 32330-32337.
72. Conover, G.M., Gregorio, C.C. (2011) The desmin coil 1B mutation K190A impairs nebulin Z-disc assembly and destabilizes actin thin filaments. *Journal of cell science*, 124 (Pt 20), 3464-3476.

73. Hnia, K., Tronchere, H., Tomczak, K.K., Amoasii, L., Schultz, P., Beggs, A.H. ve diğeri. (2011) Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation*, 121 (1), 70-85.
74. Wilhelmsen, K., Litjens, S.H., Kuikman, I., Tshimbalanga, N., Janssen, H., van den Bout, I. ve diğeri. (2005) Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *The Journal of cell biology*, 171 (5), 799-810.
75. Mejat, A., Misteli, T. (2010) LINC complexes in health and disease. *Nucleus*, 1 (1), 40-52.
76. Haque, F., Lloyd, D.J., Smallwood, D.T., Dent, C.L., Shanahan, C.M., Fry, A.M. ve diğeri. (2006) SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Molecular and cellular biology*, 26 (10), 3738-3751.
77. Starr, D.A., Fridolfsson, H.N. (2010) Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Annual review of cell and developmental biology*, 26, 421-444.
78. Kelley, L.A., Sternberg, M.J. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*, 4 (3), 363-371.
79. Head, M.W., Hurwitz, L., Kegel, K., Goldman, J.E. (2000) AlphaB-crystallin regulates intermediate filament organization in situ. *Neuroreport*, 11 (2), 361-365.
80. Georgatos, S.D., Blobel, G. (1987) Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes: a basis for a vectorial assembly of intermediate filaments. *The Journal of cell biology*, 105 (1), 105-115.
81. Gundesli, H., Talim, B., Korkusuz, P., Balci-Hayta, B., Cirak, S., Akarsu, N.A. ve diğeri. (2010) Mutation in exon 1f of PLEC, leading to disruption of plectin isoform 1f, causes autosomal-recessive limb-girdle muscular dystrophy. *American journal of human genetics*, 87 (6), 834-841.

82. Health, D.o.H.a.H.S.N.I.o. (2006) Report to Congress on Implementation of the MD CARE-act.
83. Smythe, C., Jenkins, H.E., Hutchison, C.J. (2000) Incorporation of the nuclear pore basket protein nup153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *The EMBO journal*, 19 (15), 3918-3931.