

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ HASTALIĞINDA GÖRÜLEN FENOTİPİK
ÇEŞİTLİLİĞİN İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRLERİ VE BAĞLAYICI
PROTEİN DÜZEYLERİ İLE İLİŞKİSİ

Uzm. Ayşe YEŞBEK KAYMAZ

Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2017

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ HASTALIĞINDA GÖRÜLEN FENOTİPİK
ÇEŞİTLİLİĞİN İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRLERİ VE BAĞLAYICI
PROTEİN DÜZEYLERİ İLE İLİŞKİSİ

Uzm. Ayşe YEŞBEK KAYMAZ

Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Hayat Erdem YURTER

ANKARA
2017

**Spinal Musküler Atrofi Hastalığında Görülen Fenotipik Çeşitliliğin İnsülin Benzeri
Büyüme Faktörleri ve Bağlayıcı Protein Düzeyleri ile İlişkisi**
Uzm. Ayşe Yeşbek Kaymaz

Bu çalışma 15.02.2017 tarihinde jürimiz tarafından “Tıbbi Biyoloji” programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof.Dr. Meral Özgüç



Hacettepe Üniversitesi

Tez danışmanı:

Prof.Dr. Hayat Erdem Yurter



Hacettepe Üniversitesi

Üye :

Prof. Dr. Hilal Özdağ



Ankara Üniversitesi

Üye :

Prof. Dr. Fatma Belgin Ataç



Başkent Üniversitesi

Üye :

Yrd. Doç. Dr. Beril Talim



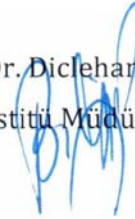
Hacettepe Üniversitesi

ONAY

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

Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü



YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI


Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

15 /02/2017



Uzm. Ayşe YEŞBEK KAYMAZ

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Hayat ERDEM YURTER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Uzm. Ayşe YEŞBEK KAYMAZ

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım sırasında değerli bilgisi, zamanı ve tecrübeleriyle gelişimime katkı sağlayan tez danışmanım Prof. Dr. Hayat Erdem Yurter'e, çalışmalarımın her aşamasına değerli katkılarda bulunan tez izleme komitesi hocalarım Prof. Dr. Meral Özgüç ve Prof. Dr. Hilal Özdağ'a, değerli zamanı ve deneyimlerini hiç bir zaman esirgemeyip çalışmalarına destek olan sevgili Hocam Yrd. Doç. Dr. Beril Talim'e, Çocuk Endokrinoloji Ünitesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Alev Özön ve Prof. Dr. Ayfer Alikashifoğlu'na, Pediatrik Endokrin ve Araştırma Laboratuvarı sorumlusu Yük. Kim. Müh. Havva Oğuz'a, başta Yrd. Doç. Dr. Burcu Balcı Hayta olmak üzere Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sınırsız destek ve sevgileriyle her zaman arkamda olup eğitimime en büyük katkıyı sağlayan canım aileme, arkadaşlarıma ve sabırla her zaman beni destekleyip motivasyon kaynağım olan sevgili eşime sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 014 D01 101 001-466).

ÖZET

Yeşbek Kaymaz A. Spinal Müsküler Atrofi Hastalığında Görülen Fenotipik Çeşitliliğin İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri ve Bağlayıcı Protein Düzeyleri ile İlişkisi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi, Ankara, 2017. Spinal müsküler atrofi (SMA) motor nöron kaybı ve kas atrofisi ile karakterize, ağır formunda bebeklik ve erken çocukluk döneminde ölümlere neden olan bir nöromüsküler hastalıktır. Hastalığa *survival of motor neuron 1 (SMN1)* genindeki mutasyonların neden olduğu bilinmesine rağmen fenotipik çeşitlilik ve hastalık patogenezinde rolü olan faktörler net olarak anlaşılamamıştır. İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), kas ve motor nöron hücrelerinin sağ kalımı, homeostasisi ve tamiri için kritik öneme sahip pleiotropik büyüme faktörleridir. Bu faktörlerin fonksiyonları göz önüne alındığında SMA'nın fenotipik çeşitliliğini etkileyebilecekleri hipotezi kurulmuş, tez çalışması kapsamında kan dolaşımında bulunan ve lokal olarak hasta kasında sentezlenen IGF ailesi üyelerinin düzeyleri araştırılmıştır. 15 SMA hastası ve 18 kontrol bireyde, serumda bulunan temel IGF ailesi üyeleri olan IGF1, IGF bağlayıcı protein (IGFBP) 3, IGFBP5 ve asit labil subunit (ALS) proteinlerinin düzeyi immünoradyometrik ve enzim bağlı immünosorbent *assay* teknikleriyle analiz edilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde hastalarda düşük bulunan IGF1 ve yüksek bulunan IGFBP5 düzeylerinin anlamlı olduğu gösterilmiştir. IGF1 standart sapma skorunun hastaların %27'sinde IGF tedavisi gerektiren -2 değerinden daha düşük olduğu dikkat çekmiştir. Hasta grubunda görülen IGFBP3 ve ALS düzey düşüklüğü ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. IGF ailesi üyelerinin SMA'da görülen fenotipik çeşitlilikle ilişkisi araştırıldığında tip I hastaların serum IGF1, IGFBP3 ve ALS düzeylerinin daha hafif seyirli tip II hastalara oranla düşük olduğu saptanmış, biyolojik anlamı olabileceği düşünülen bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 9 SMA, 4 sağlıklı ve 6 SMA dışında nöromüsküler hastalığı olan bireyin kas biyopsi örneğinde ise IGF1, IGF2, IGFBP5 ve IGF1 reseptörü proteinleri immünfloresan boyama tekniği ile araştırılmıştır. Hastalar arasında ve aynı hastaya ait kesitin farklı alanlarında değişkenlik göstermekle birlikte atrofik liflerin hipertrofiklere oranla daha yoğun boyandığı tespit edilmiştir. SMA dışında nöromüsküler hastalığı olan diğer bireylere ait kesitlerde de benzer bulguların gözlenmesi, IGF sistemi üyelerinin sentezinin hastalık patogenezi ve atrofik lif tipinden bağımsız olarak arttığı, IGF regülasyonundaki bozukluğun hastalığa özgül olmadığı ve kas atrofisi durumunda görüldüğü şeklinde değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Spinal müsküler atrofi, IGF, IGFBP, IGF1R, asit labil subunit

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 014 D01 101 001-46).

ABSTRACT

Yeşbek Kaymaz, A. Spinal Muscular Atrophy Phenotype Variations and Insulin Like Growth Factors/Binding Proteins. Hacettepe University Institute of Health Sciences Medical Biology Programme, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2017. Spinal muscular atrophy is a neuromuscular disease, which characterized by motor neuron degeneration and skeletal muscle atrophy, causing infant or early childhood death. Although it has been known that mutations in *survival of motor neuron 1 (SMN1)* gene cause the disease, the factors that have role in disease pathogenesis and phenotype variation are still not understood evidently. Insulin like growth factors (IGFs) are pleiotropic factors that have critical role in survival, homeostasis and maintenance of skeletal muscle and motor neuron cells. Considering their functions, it was hypothesized that IGFs might be involved in phenotype variation in SMA; therefore, liver-derived IGF system elements in circulation and their local synthesis in skeletal muscle biopsies of SMA patients were investigated in this study. The levels of main IGF system elements in serum, including IGF1, IGF binding protein (IGFBP) 3, IGFBP5 and acid labile subunit (ALS) proteins, were investigated by immunoradiometric and enzyme linked immunosorbent assay in 15 SMA patients and 18 healthy controls. The statistical evaluation of the results showed that decrease of IGF1 and increases of IGFBP5 levels in patients were significant. It was remarkable that 27 % of SMA patients had IGF1 standard deviation score under -2, as an indicator of IGF1 therapy. Decrease of IGFBP3 and ALS levels in SMA patients were not found statistically significant. The analysis of the effects of IGF system elements on phenotype variation in SMA showed that type I patients had lower serum IGF1, IGFBP3 and ALS levels when compared to type II patients, who had milder phenotype. Although the difference was not statistically significant, it might considered to have biological implications. The expression of main IGF system elements including IGF1, IGF2, IGFBP5 and IGF1 receptor in archived skeletal muscle biopsies of 9 SMA patients, 4 healthy controls and 6 patients having non-SMA neuromuscular diseases were also investigated by immunofluorescent staining. More intense immunostaining was detected in atrophic fibers comparing to hypertrophic ones in the skeletal muscle of SMA patients with a variation among patients and the different sections of the same biopsy sample. Obtaining the same results in other neuromuscular diseases indicated that increases in IGF system elements were independent of disease pathogenesis or the atrophic fiber type and IGF system dysregulation was not disease specific and considered as a condition occurring in skeletal muscle atrophy.

Key words: Spinal muscular atrophy, IGFs, IGFBPs, IGF1R, acid labile subunit.

This thesis project was supported by the Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project ID: 014 D01 101 001-466).

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI | iv |
| ETİK BEYAN SAYFASI | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xiii |
| TABLOLAR DİZİNİ | xv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Spinal Müsküler Atrofi Hastalığı | 4 |
| 2.1.1. SMA Genetiği | 6 |
| 2.1.2. SMN Proteininin Fonksiyonları | 8 |
| 2.1.3. SMA Hastalığında Kas Patolojisi | 9 |
| 2.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Ailesi | 11 |
| 2.2.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF1 ve IGF2) | 12 |
| 2.2.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörleri | 14 |
| 2.2.3. IGF Bağlayıcı Proteinler | 15 |
| 2.2.4. IGF Sinyal Yolağı | 17 |
| 2.2.5. IGF Ailesinin SMA ve Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkisi | 19 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 22 |
| 3.1. Çalışmada İncelenen Bireyler | 22 |
| 3.2. Gereçler | 26 |
| 3.2.1. Serum Analizleri | 26 |
| 3.2.2. İmmü Floresan Boyama Analizleri | 26 |
| 3.3. Yöntemler | 28 |
| 3.3.1. Antropometrik Verilerin Değerlendirilmesi | 28 |

| | |
|--|----|
| 3.3.2. Serumda Bulunan IGF1, IGFBP3, IGFBP5 ve ALS Protein Düzeylerinin Analizi | 28 |
| 3.3.3. İstatistiksel Değerlendirme | 34 |
| 3.3.4. SMA Hastalarının İskelet Kas Hücrelerinde Lokal Olarak Sentezlenen IGF1, IGF2, IGFBP5 ve IGF1R Protein Düzeylerinin Araştırılması | 34 |
| 3.3.5. IF Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi | 39 |
| 4. BULGULAR | 40 |
| 4.1. Serumda Bulunan IGF1, IGFBP3, IGFBP5 ve ALS Protein Düzey Analizleri | 40 |
| 4.2. İskelet Kas Hücrelerinde Lokal Olarak Sentezlenen IGF1, IGF2, IGFBP5 ve IGF1R Protein Analizleri | 47 |
| 5. TARTIŞMA | 63 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 69 |
| 6.1. Sonuçlar | 69 |
| 6.2. Öneriler | 70 |
| 7. KAYNAKLAR | 71 |
| 8. EKLER | |
| EK-1: Tez Çalışmasıyla İlgili Etik Kurul İzinleri | |
| EK-2-4: Tez Çalışmasıyla İlgili Bildiriler Yayınlar | |
| 9. ÖZGEÇMİŞ | |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-------------------|--|
| °C | Derece santigrat |
| µg/ml | Mikrogram/ml |
| µl | Mikrolitre |
| µm | Mikrometre |
| ALS | Asit labil subünit |
| BSA | Sığır serum albümin |
| CDC | Amerikan Hastalıktan Koruma ve Önleme Merkezi |
| CFTD | Konjenital lif tipi oransızlığı |
| cm | Santimetre |
| DAPI | <i>4', 6-diaminodino-2-fenilindol</i> |
| dH ₂ O | Distile su |
| dk | Dakika |
| DMD | <i>Duchenne</i> kas distrofisi |
| ECM | Ekstraselüler matriks |
| ELISA | Enzim bağlı immünosorbent <i>assay</i> |
| ERK 1/2 | Ekstraselüler regüle edici kinaz 1/2 |
| ESS | <i>Exonic splicing enhancer</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FoxO | <i>Forkhead</i> ailesi transkripsiyon faktörleri |
| gr/ml | gram/mililitre |
| GSK3β | Glikojen sentez kinaz 3 beta |
| h/h | hacim/ hacim |
| HRP | <i>Horse radish peroxidase</i> |
| IF | İmmünfloresan |
| IGF | İnsülin benzeri büyüme faktörleri |
| IGF1 | İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 |
| IGF2 | İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 |
| IGFBP | İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein |
| IGFBP1 | İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 1 |
| IGFBP2 | İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 2 |

| | |
|-----------------|--|
| IGFBP3 | İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 3 |
| IGFBP4 | İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 4 |
| IGFBP5 | İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 5 |
| IGFBP6 | İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 6 |
| IGF1R | İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü |
| IGF2R | İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 reseptörü |
| IgG | İmmünglobülin G |
| IRMA | İmmünoradyometrik assay |
| IRS 1/2 | İnsulin reseptör substratı 1/2 |
| kg | Kilogram |
| LGMD | <i>Limb-girdle</i> kas distrofisi |
| mg/ml | miligram/mililitre |
| mRNA | Mesajcı ribonükleik asit |
| mTOR | <i>Mammalian target of rapamycin</i> |
| ng/ml | nanogram/mililitre |
| PBS | Tuzlu fosfat tamponu |
| PI3K/Akt | Fosfatidil inozitol 3 kinaz/protein kinaz B |
| rpm | <i>Revolutions per minute</i> |
| RPS6K1B | Ribozomal protein S6 kinaz 1B |
| SBMA | Spinal bulbar müsküler atrofi |
| SHC | <i>Src 2 domain-containing</i> |
| SMA | Spinal müsküler atrofi |
| Smad2/3 | <i>Contraction of Sma and Mad</i> |
| SMARD1 | Diyafagma paralizli distal infantil spinal müsküler atrofi |
| SMN1 | <i>Survival of motor neuron 1</i> |
| SMN2 | <i>Survival of motor neuron 2</i> |
| snRNP | Küçük nükleer ribonükleer protein |
| SSS | Standart sapma skoru |

ŞEKİLLER

| Şekil | Sayfa |
|---|-------|
| 2.1. <i>SMN1</i> ve <i>SMN2</i> genlerinin yapı ve ifadesinin şematik gösterimi | 7 |
| 2.2. SMN proteini eksikliğinin motor üniteadaki etkileri | 9 |
| 2.3. Sağlıklı birey ve SMA hastasına ait kas biyopsilerinde atrofik, hipertrofik ve normotrofik liflerin hematoksil-eozin boyamasıyla gösterimi | 10 |
| 2.4. IGF ailesi üyeleri | 12 |
| 2.5. IGF1, IGF2 ve insülin reseptörlerinin yapısı | 14 |
| 2.6. Dolaşımda bulunan IGF'lerin taşınması | 16 |
| 2.7. İskelet kas kitlesini kontrol eden IGF sinyal yolağı | 18 |
| 4.1. SMA hastaları ve kontrol grubunda IGF ailesi üyelerinin serum analizi | 43 |
| A. IGF1 | |
| B. IGFBP5 | |
| C. IGFBP3 | |
| D. ALS | |
| 4.2. Serum IGF1, IGFBP3 ve ALS düzeylerinin tip I ve tip II SMA hastaları arasında karşılaştırılması | 45 |
| A. IGF1 | |
| B. IGFBP3 | |
| C. ALS | |
| 4.3. IGF1 düzeyinin malnütrisyonla karşılaştırılması | 46 |
| 4.4. Sağlıklı birey (K1) ve SMA hastalarına (H1-H5) ait kas biyopsi kesitlerinde IGF1 IF boyama görüntüleri | 48 |
| 4.5. Sağlıklı birey (K1) ve SMA hastalarına (H1, H2, H5-H7) ait kas biyopsi kesitlerinde IGF1R IF boyama görüntüleri | 49 |
| 4.6. Sağlıklı birey (K2) ve SMA hastalarına (H2, H3, H5-H7) ait kas biyopsi kesitlerinde IGF2 IF boyama görüntüleri | 50 |
| 4.7. Sağlıklı birey (K3) ve SMA hastalarına (H1-H3, H6, H7) ait kas biyopsi kesitlerinde IGFBP5 IF boyama görüntüleri | 51 |
| 4.8. Hasta-kontrol grubuna ait kas biyopsi kesitlerinde IGF1 IF boyama görüntüleri | 53 |

- A. LGMD
 B. DMD
 C. Tip 2 atrofisi görülen kas distrofisi
 D. CFTD
- 4.9.** Hasta-kontrol grubuna ait kas biyopsi kesitlerinde IGF1R IF boyama görüntüleri 54
 A. LGMD
 B. DMD
 C. Tip 2 atrofisi görülen kas distrofisi
 D. CFTD
- 4. 10.** Hasta-kontrol grubuna ait kas biyopsi kesitlerinde IGF2 IF boyama görüntüleri 55
 A. LGMD
 B. DMD
 C. Tip 2 atrofisi görülen kas distrofisi
 D. CFTD
- 4.11.** Hasta-kontrol grubuna ait kas biyopsi kesitlerinde IGFBP5 IF boyama görüntüleri 56
 A. LGMD
 B. DMD
 C. Tip 2 atrofisi görülen kas distrofisi
 D. CFTD
- 4.12.** Sağlıklı bireye ait kas biyopsi kesitinde yapılan IGF1-IGF1R eş IF boyama görüntüleri 58
- 4.13.** SMA hastasına ait kas biyopsi kesitinde yapılan IGF1-IGF1R eş IF boyama görüntüleri 59
- 4.14.** LGMD hastasına ait kas biyopsi kesitinde yapılan IGF1-IGF1R eş IF boyama görüntüleri 60
- 4.15.** DMD hastasına ait kas biyopsi kesitinde yapılan IGF1-IGF1R eş IF boyama görüntüleri 61
- 4.16.** CFTD hastasına ait kas biyopsi kesitinde yapılan IGF1-IGF1R eş IF boyama görüntüleri 62

TABLULAR

| Tablo | Sayfa |
|--|--------------|
| 2.1. SMA hastalarının klinik sınıflandırılması | 4 |
| 3.1. Serum analizleri yapılan SMA hastaları ve kontrol grubuna ait klinik ve antropometrik bilgiler | 23 |
| 3.2. IF analiz yapılan kas biyopsi örneklerine ait bilgiler | 24 |
| 4.1. SMA hastaları ve kontrol grubuna ait klinik, antropometrik veriler ve serum analiz sonuçları | 41 |



1. GİRİŞ

Omurilikte alfa motor nöron kaybı ve ilerleyici kas atrofisi nedeniyle ortaya çıkan ve çocuk ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biri olan Spinal müsküler atrofi (SMA), otozomal resesif kalıtım gösteren bir nöromüsküler hastalıktır. Hastalığa 5. kromozomda yer alan *survival of motor neuron 1 (SMN1)* genindeki homozigot delesyon ya da diğer mutasyonların neden olduğu survival motor nöron (SMN) proteini eksikliği sebep olmaktadır (1). SMN proteini sentezinin hiç olmaması yaşamla bağdaşmazken, SMA hastalarında *SMN1'in* homolog kopyası olan *SMN2* geni tarafından protein sentezi devam etmektedir (1, 2). Ancak *SMN2* geninin 7. ekzonunda bulunan tek nükleotitik fark nedeniyle SMN transkriptlerinin büyük çoğunluğu ekzon 7 içermemekte ve yalnızca %10 oranında stabil ve fonksiyonel SMN proteini sentezlenebilmektedir (3). Bu durum hastalığın ortaya çıkmasını önlemek için yeterli olmazken *SMN2* gen kopya sayısı ile doğru orantılı olarak SMN proteini sentezinin artışı hastalık ciddiyetinin hafiflemesini sağlamaktadır (4-6).

SMA hastalığının nedeni uzun yıllardır bilinmesine rağmen hastalığın moleküler patolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Hastaların %95'inde aynı tip mutasyon bulunmasına rağmen fenotipik çeşitliliğin yüksek olması ve *SMN2* kopya sayısının bu durumu açıklamak için yetersiz kalması hastalık patogenezinde başka faktörlerin rolü olabileceğini düşündürmektedir (7-9). *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar SMA'da görülen ilerleyici kas zayıflığının motor nöron dejenerasyonundan bağımsız olarak ortaya çıkabileceğini göstermektedir (10-13). Bu nedenle SMA patogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi için kas dokuyu hedefleyen çalışmalar önem kazanmış ve tedavide motor nöron hedefli moleküllerin yanı sıra kas hedefli moleküller araştırılmaya başlanmıştır (14, 15).

Farklı kliniğe sahip SMA hastalarına ait plazma örneklerinde yapılmış olan biyobelirteç çalışmaları ve Anabilim Dalı'mızda tip I ve tip III SMA hastalarına ait fibroblast hücrelerinde yapılmış olan transkriptom çalışmaları (yayınlanmamış data) incelendiğinde ortak bulgu olarak insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı

proteinlerin (IGFBP) ifadesinde tiplere göre farklılık olduğu dikkat çekmiştir (16). Altı farklı proteinden oluşan IGFBP'ler (IGFBP1-6) insülin benzeri büyüme faktörlerine (IGF1 ve IGF2) yüksek afiniteyle bağlanarak ikili kompleks yapılar oluşturmakta ve IGF'leri taşınmalarının yanı sıra, yarı ömürleri ve biyolojik aktivitelerinin kontrolünde rol almaktadır (17, 18). Karaciğerden sentezlenerek dolaşıma katılan IGF'lerin IGFBP3 ya da IGFBP5 ile oluşturdukları komplekse, asit labil subünit (ALS) proteininin katılması hem IGF hem de IGFBP'lerin stabilitesini daha uzun süre korumalarını sağlamaktadır (19).

IGF'ler kas ve motor nöron hücrelerinin sağ kalımı, homeostasisi ve tamiri için kritik öneme sahip olan pleiotropik büyüme faktörleridir (20-25). Karaciğerde sentezlenip kan dolaşımına katılarak endokrin yolla fonksiyon görmelerinin yanı sıra lokal olarak kas dokusu ve motor nöronlar gibi periferel dokularda da sentezlenerek otokrin/parakrin etki gösterebilmektedirler (18, 26, 27). IGF'ler IGF1 reseptörüne (IGF1R) bağlanıp, fosfatidil inozitol 3 kinaz/protein kinaz B (PI3K/Akt) ve ekstraselüler regüle edici kinaz (ERK) 1/2 gibi sinyal yollarını uyararak hücre proliferasyonu, göç, farklılaşma ve olgunlaşma gibi farklı süreçlerde rol almaktadır (28, 29). IGF eksikliği ya da IGF1R sinyal yolağının regülasyonundaki bozuklukların büyüme geriliği ve organ sistemlerinde gelişimsel bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir (30). Güçlü nörotrofik ve miyotrofik etkileri nedeniyle uzun yıllardır nörodejeneratif hastalıklar için dikkat çekmiş ve amiyotropik lateral skleroz ve Duchenne kas distrofisi (DMD) gibi nöromusküler hastalıklarda IGF1 sinyal yolağının regülasyonunun bozulduğu bildirilmiştir (31-38). SMA'da ise fare modellerinde yapılmış olan kısıtlı sayıdaki çalışma serum IGF1 düzeyinin düşük olduğunu göstermiştir (39, 40). Ayrıca IGF1 eksikliği olan fare modellerinin SMA'lı fare modellerine benzer şekilde düşük doğum ağırlığına sahip oldukları, ciddi kas zayıflığı gösterdikleri ve doğumdan kısa süre sonra öldükleri bilinmektedir (39).

Bu veriler ışığında SMA hastalarında görülen fenotipik çeşitliliğin IGF etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Tez çalışması kapsamında karaciğerden sentezlenerek dolaşıma katılan ve lokal olarak SMA hasta kasında

sentezlenen IGF ailesi üyeleri araştırılarak hastalık fenotipindeki çeşitlilikle ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Serum örnekleriyle yapılan çalışmalarda, 15 SMA hastası ve 18 kontrol bireyde serumda bulunan temel IGF ailesi üyeleri olan IGF1, IGFBP3, IGFBP5 ve ALS proteinlerinin düzeyi immünoradyometrik *assay* (IGF1 ve IGFBP3 IRMA) ve enzim bağlı immünosorbent *assay* (IGFBP5 ve ALS ELISA) teknikleriyle analiz edilmiştir. Kas biyopsi örneklerinde ise kasta sentezlenen temel IGF ailesi üyeleri olan IGF1, IGF2, IGFBP5 ve IGF1R proteinleri immünfloresan (IF) boyama tekniği ile araştırılmıştır. Bu amaçla 9 SMA hastası, 4 sağlıklı birey ve SMA dışında farklı nöromusküler hastalığı olan 6 bireye ait arşivlenmiş kas biyopsi örnekleri ile çalışılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Müsküler Atrofi Hastalığı

İlk kez Werdnig ve Hoffmann tarafından 1890'lı yılların başında tanımlanmış olan SMA otozomal resesif kalıtım gösteren nöromüsküler bir hastalıktır. Çocuk ölümlerinin önde gelen sebeplerinden biri olan SMA hastalığına neden olan *SMN1* geni Lefebvre ve ark. (1) tarafından 1995 yılında 5. kromozom üzerinde tanımlanmıştır. *SMN1* genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan SMN proteini eksikliği, omurilik ve beyin sapında α -motor nöron kaybı ile proksimal kaslarda ilerleyici zayıflığa neden olmaktadır (41). İnsidansı 1/6000-10000 olan SMA hastalığının taşıyıcı frekansı etnik gruplar arasında değişkenlik göstermekle birlikte Avrupa'da 1:35 olarak belirlenmiştir (42, 43). Ülkemizde akraba evliliği oranının yüksek (% 21) olması, SMA hastalığına sık rastlanmasına neden olmaktadır (44).

SMA hastalık ciddiyeti, başlama yaşı ve başarılabilen motor fonksiyonlara göre Uluslararası SMA Konsorsiyumu tarafından 4 farklı klinik tipe ayrılmaktadır (Tablo 2.1). Ayrıca, prenatal gelişim sırasında ortaya çıkan ve ciddiyeti ağır olan hastalar sınıflandırmada tip 0 olarak yer almaktadır (45, 46).

Tablo 2.1. SMA hastalarının klinik sınıflandırılması (46).

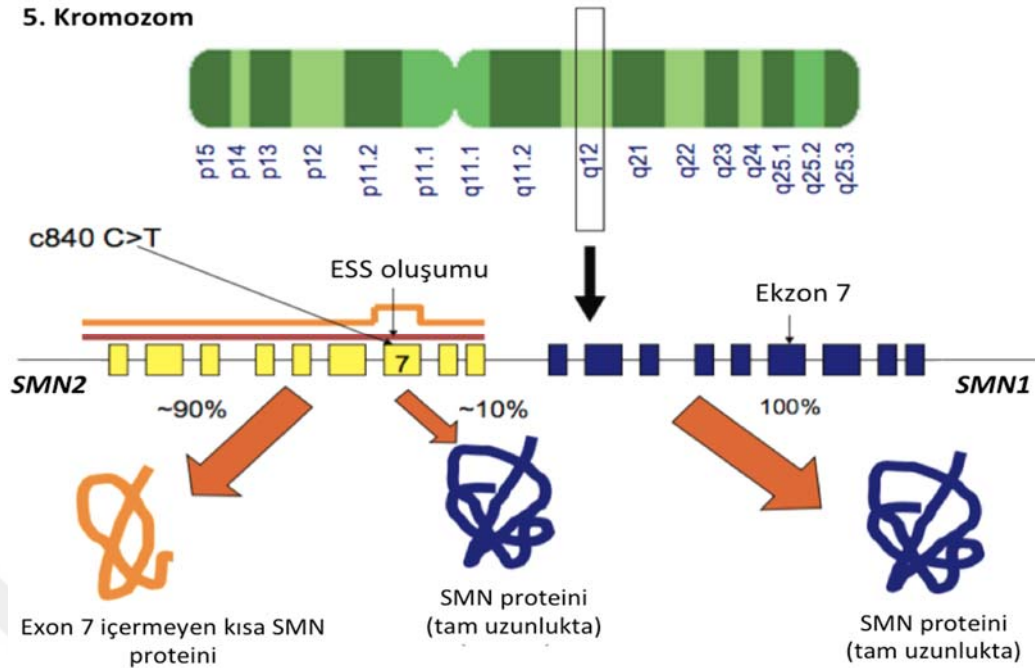
| SMA Tipi | Hastalığın başlama yaşı | Başarılabilen motor fonksiyon | Beklenen yaşam uzunluğu | Beklenen <i>SMN2</i> kopya sayısı |
|----------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| 0 | Prenatal | Uterusta azalmış fetal hareket | Doğumla birlikte ölüm | 1 |
| I | < 6 ay | Desteksiz oturamama | < 2 yaş | 2 |
| II | 6-18 ay | Desteksiz oturabilme | 10-40 yaş | 3 |
| III | > 18 ay | Bağımsız yürüyebilme | Normal | 3-4 |
| IV | > 5 yaş | Normal yürüyebilme | Normal | > 4 |

Tip I ya da Werdnig-Hoffman hastalığı (MIM#253300), SMA hastalarının % 50-60'ını oluşturan ağır SMA tiplerinden biridir (47, 48). Hastalar doğumdan sonra ilk 6 ay içerisinde motor nöronların %90'ından fazlasını kaybetmekte ve yalnızca %32'si 2 yaşına kadar yaşayabilmektedir (49). Tip II SMA (MIM#253500) hastaları ortopedik ve solunumla ilgili destek gerektiren orta derecede ağır, tip III (MIM#253400) hastalar ise daha hafif bir fenotip göstermektedir. Tip II ve tip III SMA'da hastalık yavaş ilerlemekte ve hastalar nöromusküler fonksiyonlarının her yıl %1'ini kaybetmektedir (50). Tip IV SMA (MIM#271150) ise erişkin dönemde proksimal bacak kaslarında zayıflık görülen, daha hafif ve nadir rastlanan SMA tipini oluşturmaktadır (51).

Günümüzde SMA tedavisinde etkin ve yaygın olarak kullanılan bir ilaç bulunmadığı için hastalar ortopedik, beslenme ve solunum müdahaleleri gibi hastalık etiolojisinden bağımsız, palyatif (hafifletici) ve destekleyici multidisipliner yaklaşımlarla tedavi edilmeye çalışılmaktadır (52). SMA hastaları için standart bakım protokolleri geliştirilmesi hastaların yaşam sürelerinin uzamasına yardımcı olmaktadır (53). Uzun süre takip edilen hastalarda karaciğer ve pankreas gibi farklı organ sistemlerinde de patolojilerin ortaya çıkabildiği gösterilmiş ve SMA multisistem hastalığı olarak değerlendirilmeye başlanmıştır (54). Bu nedenle SMA tedavi stratejileri arasında hatalı genin düzeltilmesi ve SMN proteininin arttırılmasına yönelik çalışmaların yanı sıra, motor nöron dejenerasyonunu önlemeye ve kas gücünün arttırılmasına yönelik tedavilerin sistemik olarak uygulanmasıyla periferik dokulardaki patolojilerin de düzeltilmesi hedeflenmektedir (39, 55, 56). 2016 yılı sonunda klinik araştırma çalışmaları tamamlanan ve SMA tedavisinde etkili bulunan ilk molekül olan Spinraza (Nusinersen), SMA hastaları için yakın gelecekte umut vaatmektedir (FDA referans numarası: 4033305).

2.1.1. SMA Genetiği

SMA hastalarının % 95'inde fenotipik özelliklerden bağımsız olarak *SMN1* geninde homozigot ekzon 7 ve 8 delesyonu, % 5'inde ise çeşitli intragenik mutasyonlar görülmektedir (1, 57). SMA lokusu 5. kromozomun uzun kolu üzerinde (5q11.2-13.3) 500 kb'lık *inverted* segmental duplikasyon bölgesinde yer almaktadır. Yalnızca primatlarda meydana gelen duplikasyon sonucunda insanlarda *SMN1* geninin *SMN2* adı verilen homolog kopyası ortaya çıkmıştır (58). Aralarında 5 nükleotitik fark bulunan her iki gen de SMN proteini kodlamaktadır. *SMN1* ile *SMN2* arasındaki en önemli yapısal farklılık 7. ekzonun 6. pozisyonunda yer alan C840T transisyonudur (Şekil 2.1) (3). Transisyon sonucunda bu bölgede yer alan ekzonik splay enhansır (ESE) dizisi ortadan kalkmakta ve sonuçta *SMN2* geni tarafından kodlanan transkriptlerin büyük çoğunluğu ekzon 7 içermeyen ve stabil olmayan SMN proteini sentezine neden olmaktadır (59). Genin alternatif işlenmesi sonucunda, ekzon 7 içeren *SMN2* transkriptleri tarafından düşük oranda (% 10) da olsa fonksiyonel SMN proteini sentezlenebilmektedir. Bu durum hastalığı önlemek için yeterli olmamakla birlikte artan *SMN2* kopya sayısı hastalık fenotipinin daha hafif olmasını sağlamaktadır (4-6).



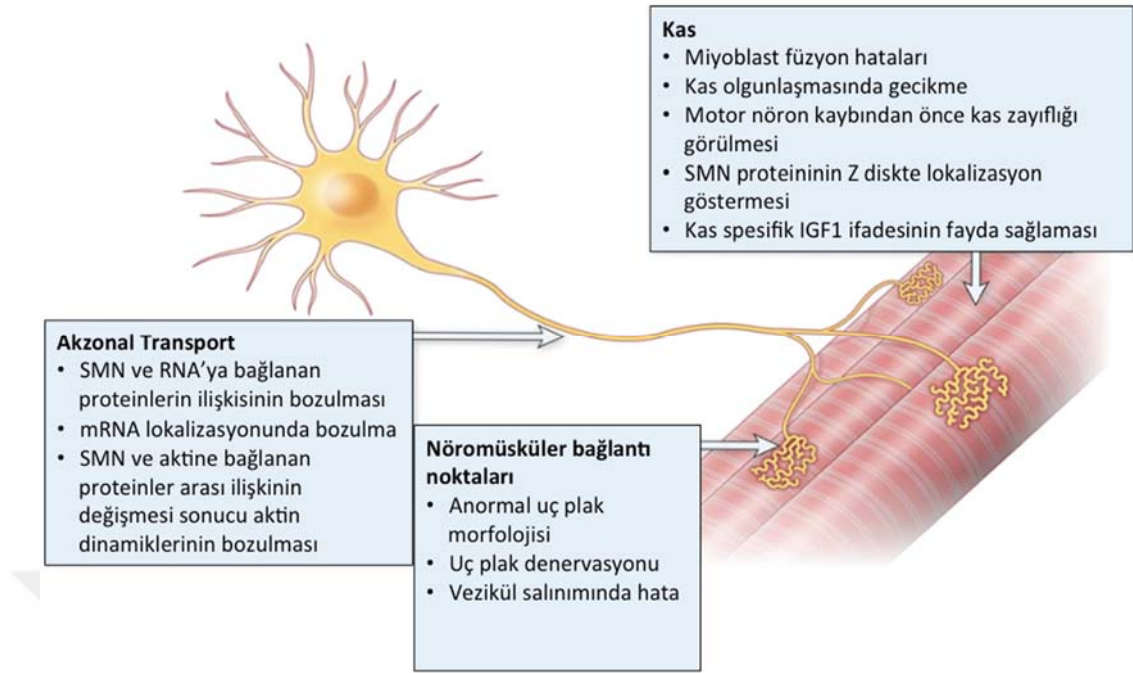
Şekil 2.1. *SMN1* ve *SMN2* genlerinin yapı ve ifadesinin şematik gösterimi (60).

Hastalığın tipinden bağımsız olarak SMA lokusunda meydana gelen yeniden düzenlemeler bireyler arasında *SMN1* ve *SMN2* kopya sayısının farklılık göstermesine neden olmaktadır (61). *SMN2* kopya sayısı hastalığın prognozuyla ilgili önemli bir biyobelirteç olarak kullanılmakta ve klinik ilaç araştırmalarında hastaların sınıflandırılması amacıyla değerlendirilmekte; ancak SMA'da görülen fenotipik çeşitliliği açıklamak için tek başına yeterli olamamaktadır (46). Aynı mutasyon ve aynı sayıda *SMN2* kopya sayısına sahip olmalarına rağmen hastalık ciddiyeti birbirinden farklı olan SMA hastası kardeşler olduğu bilinmektedir (7, 62, 63). Bu durum *SMN2* dışında hastalığın ciddiyetini etkileyen başka faktörler olabileceğini düşündürmektedir. Bu faktörlerden en iyi tanımlanmış olanı aktin filamentlerinin düzenlenmesinde rolü olan plastin 3 proteindir. Plastin 3 kodlayan gen ifadesinin nöronlar üzerinde koruyucu etki göstererek SMA fenotipini hafifletici etkisi olduğunu bildiren çalışmalar yayınlanmıştır (9, 64, 65). 2017 yılında nöronal kalsiyum sensörü olan nörokalsin delta SMA patogenezini etkileyen yeni bir düzenleyici olarak tanımlanmıştır (66). Hastalık fenotipi üzerinde etkili olan diğer faktörlerin araştırılması yeni tedavi hedefleri belirlenmesi açısından önem taşımaktadır (46, 65).

2.1.2.SMN Proteininin Fonksiyonları

38-kDa ağırlığındaki SMN proteini, evrimsel olarak ökaryotlar arasında korunmuş, gelişim aşaması ve doku tipine özgü ifade edilen ve organizma için hayati öneme sahip bir proteindir (67). SMN proteini eksikliğinin farelerde yaşamla bağdaşmadığı gösterilmiştir (2).

SMN proteini gemin (gemin 2-8) ve unrip proteinleriyle birlikte büyük, multiprotein yapıdaki SMN kompleksini oluşturarak çekirdekdeki gem bölgelerinde ve sitoplazmada bulunmaktadır (68-70). SMN proteininin *housekeeping* fonksiyonları küçük nükleer ribonükleer proteinlerin (snRNP) biyogenezi, mRNA işlenmesi ve nöron hücreleri gibi polarize hücrelerde RNA taşınması olarak bilinmektedir (71-74). SMN kompleksi, Sm proteinleri ve küçük nükleer RNA moleküllerinin (snRNA) biraraya gelerek oluşturdukları *spliceosome* kompleksi RNA splayında önemli rol oynamaktadır (75). Ancak SMN'in bu proteinler dışında çok sayıda proteinle ilişki kuruyor olması, bilinenden daha farklı fonksiyonlarının da olabileceğini düşündürmektedir (76). SMN proteini motor üniteyi oluşturan iskelet kası, motor nöron ve nöromusküler kavşakta farklı fonksiyonlar görmektedir (Şekil 2.2). Motor nöronlarda nörit uzaması, nöronal farklılaşma, aksonal yönelme ve aktin dinamiklerinin düzenlenmesinde rol alırken, eksikliği nöromusküler kavşakta anormal uç plak morfolojisi, uç plak denervasyonu ve nörofilament birikimine neden olarak nöromusküler kavşakta fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır (76-78). SMN proteininin yukarıda bahsedilen yapılarda bulunmasının yanı sıra kas hücrelerindeki Z disklerde de yer alması snRNP biyogenezi dışında başka fonksiyonlar görüyor olabileceğini düşündürmektedir (79).

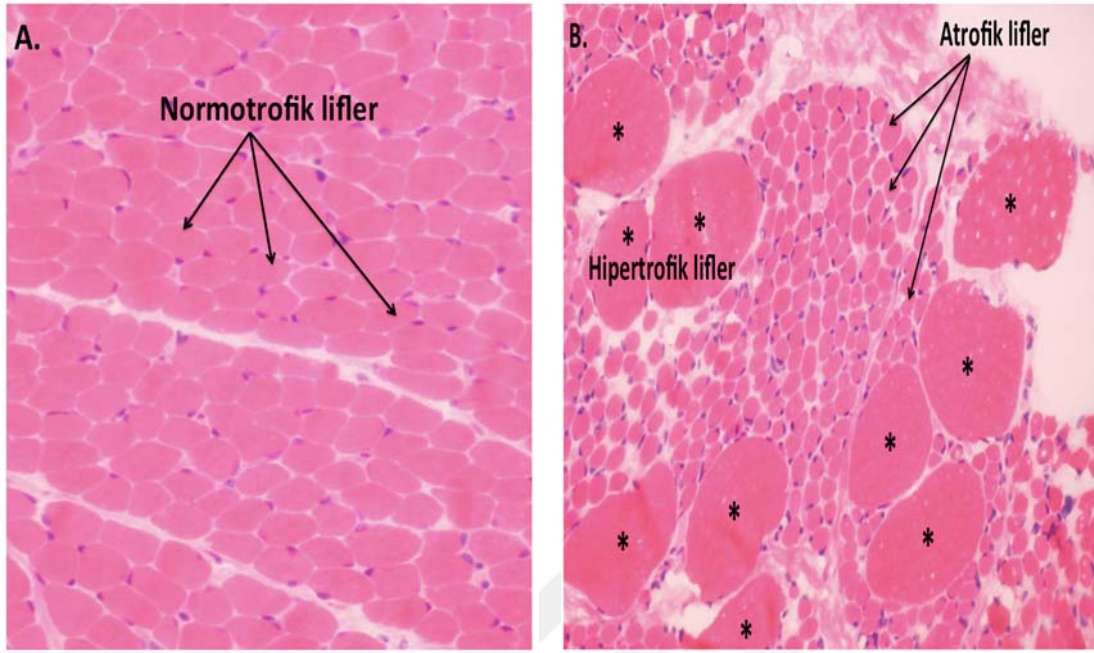


Şekil 2.2. SMN proteini eksikliğinin motor ünitedeki etkileri (80).

SMN proteininin dokuya özgü ifade profili çok iyi anlaşılacakla birlikte beyin, böbrek, karaciğer ve omurilikte yüksek seviyede, iskelet ve kalp kasında orta, fibroblast ve lenfositlerde ise düşük seviyede ifade edildiği bilinmektedir (69). SMN proteininin *housekeeping* ya da hücre spesifik fonksiyonlarını kaybetmesinin SMA'ya neden olabileceği hala aydınlatılmamış olan tartışmalı bir konudur (76).

2.1.3. SMA Hastalığında Kas Patolojisi

Nöromusküler hastalıkların tanısında kas patolojisi önemli bir kriterdir. Sağlıklı bireylere ait kas biyopsi örnekleri histolojik olarak değerlendirildiğinde birbirine benzer boyutlarda *normotrofik* kas liflerinden oluştukları, SMA hastalarına ait kas biyopsilerinin ise grup şeklinde atrofik ve hipertrofik kas liflerinden oluştuğu görülmektedir (Şekil 2.3). SMA hastalığının patogenezi uzun zamandır araştırılmakta ancak SMN eksikliği tüm dokularda meydana gelmesine rağmen neden motor nöron dejenerasyonu ve kas atrofisi ile sonuçlandığı halen açıklanamamaktadır. SMA'da görülen kas zayıflığının motor nöron dejenerasyonunun sekonder bir sonucu olduğu düşünülmüş ve araştırmalar motor nöron patolojisinin anlaşılması üzerine yoğunlaşmıştır (81-83).



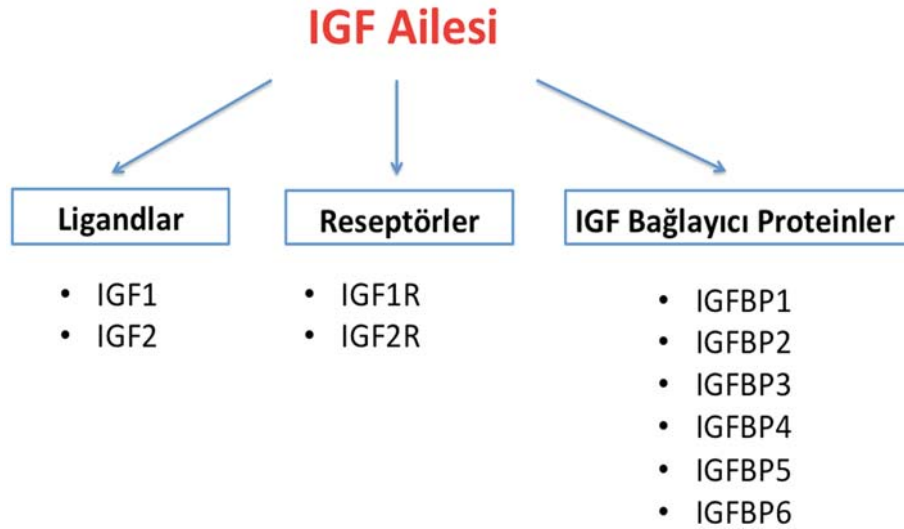
Şekil 2.3. Sağlıklı birey ve SMA hastasına ait kas biyopsilerinde atrofik, hipertrofik ve normotrofik liflerin hematoxilen-eozin boyamasıyla gösterimi. **A.** Sağlıklı birey **B.** SMA hastası. Mor: Hematoxilen, çekirdek boyanması, Pembe: Eozin, sitoplazma boyanması.

Bu araştırmalar sonucunda, SMN proteini eksikliği nedeniyle snRNP biyogenezindeki aksamaların motor nöronlar için önemli olabilecek bir grup genin işlenmesinde hataya neden olduğu ya da SMN proteininin akzon spesifik fonksiyonlarını yerine getirememesi sonucunda motor nöronlarda dejenerasyona neden olabileceği hipotezleri öne sürülmüştür (83). Ancak son yıllarda kas zayıflığının motor nöron dejenerasyonundan bağımsız olarak ortaya çıkabildiğini ve kas hasarının hastalık patolojisine etki edebileceğini gösteren çalışmalardaki artış, SMA hastalığında motor nöron dejenerasyonunun yanı sıra iskelet kas patolojisinin anlaşılmasının da önemli olduğunu göstermiştir (10, 12, 14, 78, 84-86). SMA fare modellerinde SMN proteininin iskelet kasında Z disklerde bulunduğu ve eksikliğinde Z diskler arası mesafenin bozulduğu bildirilmiştir (79). Ayrıca, hücre kültürü modellerinde SMN proteininin miyogenez sırasında farklı proteinlerle ilişki kurması ve eksikliğinde kas büyümesi/farklılaşmasında hatalar oluşması SMN'in yapısal bir kas proteini olabileceği gibi, kas gelişimi ve farklılaşmasında önemli rol oynayabileceğini de göstermektedir (12, 13, 79, 86-88).

Ayrıca, denerve edilmiş kas dokusunda yapılan proteomik analiz sonuçlarıyla, denervasyonu olan SMA'lı fare kas dokusundan elde edilen proteomik verilerin birbirinden farklı olduğu gösterilmiştir (87). Bu durum SMA'da motor nöron dejenerasyonundan bağımsız bir kas patolojisinin ortaya çıktığını göstermektedir. SMA'lı kas hücreleri sağlıklı motor nöron hücreleriyle birlikte kültüre edildiklerinde de motor nöronların bir süre sonra dejenerasyona uğraması SMA'da kas dokusunun patolojiye etkisi olabileceğini göstermektedir (10). Bu çalışmalar SMA patolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi için motor nöron dejenerasyonunun yanı sıra karşılıklı etkileşimde olduğu kas dokusunun anlaşılmasının ve tedavi için birlikte hedeflenmesinin önemini vurgulamaktadır.

2.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Ailesi

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ailesi normal büyüme ve gelişme için temel olan IGF1 ve IGF2 büyüme faktörleri ile bu faktörlere yüksek afiniteyle bağlanan 6 farklı IGF bağlayıcı protein (IGFBP1-6) ve 2 reseptör proteinden (IGF1 ve IGF2 reseptörü) oluşmaktadır (Şekil 2.4). Hücre tipi ve canlılığın gelişim aşamasına göre etkileri değişiklik göstermekle birlikte IGF'ler hücre proliferasyonu, sağ kalımı, göçü ve metabolizması gibi farklı fonksiyonları uyarmaktadır (89). Karaciğerden sentezlenip kan dolaşımı yoluyla hedef dokulara ulaşarak endokrin yolla etki göstermelerinin yanı sıra, iskelet kası ve motor nöronlar gibi non-hepatik periferel dokularda lokal ifade olarak otokrin/parakrin etki göstermektedir (26, 27). IGF'lerin bu fonksiyonları IGF bağlayıcı proteinler tarafından düzenlenmekte, aktiviteleri ise IGF reseptörleri tarafından sağlanmaktadır (18).



Şekil 2.4. IGF ailesi üyeleri.

2.2.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF1 ve IGF2)

İnsülin ailesi üyeleri olan IGF1 ve IGF2 yaklaşık 7.6 kDa ağırlığında küçük polipeptit hormonlardır. Normal büyüme ve gelişme için kritik rol oynayan IGF'ler fetal dönemde uterustaki besin durumuna ve endokrin koşullara göre dokuya özgül olarak, postnatal dönemde ise büyüme hormonu (GH) stimülasyonuna cevap olarak sentezlenmektedir (90). İnsülin ve diğer peptit hormonların aksine depolanmaksızın tüm doku/hücre tiplerinde sürekli olarak ifade edilmektedirler. IGF1 ya da IGF2 *knockout* farelerde doğum ağırlığının sırasıyla % 40 ve % 60 oranında azaldığı ve doğumdan sonra kısa süre içinde farelerin öldüğü gösterilmiştir (91, 92). Uzun yıllar karaciğer tarafından sentezlenen IGF1'in postnatal büyüme için mutlaka gerekli olduğu düşünülmekteydi. Ancak, karaciğerdeki IGF1 ifadesinin baskılandığı durumda dolaşımda bulunan IGF1 düzeyinde % 80 azalma olmasına rağmen farelerde büyüme geriliği görülmemesi memelilerde postnatal büyümenin lokal olarak sentezlenen IGF'lerin otokrin/parakrin kontrolü ile gerçekleştiğini göstermiştir (26, 93).

IGF1 ve IGF2 birbiriyle % 62, insülinle ise % 47 oranında dizi homolojisine sahiptir. IGF'lerin yapısal olarak 4 farklı domaini bulunup; A, B ve C pro-insülinle benzerlik gösterirken D domaini insülinde yer almamaktadır (94). İnsülin ve IGF'ler yapısal benzerlikleri nedeniyle ortak bazı sinyal yollarını uyarabildikleri gibi,

insülinin hücre metabolizması, IGF'lerin ise hücre bölünmesi ve farklılaşması gibi farklı fonksiyonlar gösterebildikleri kabul edilmektedir (95-99).

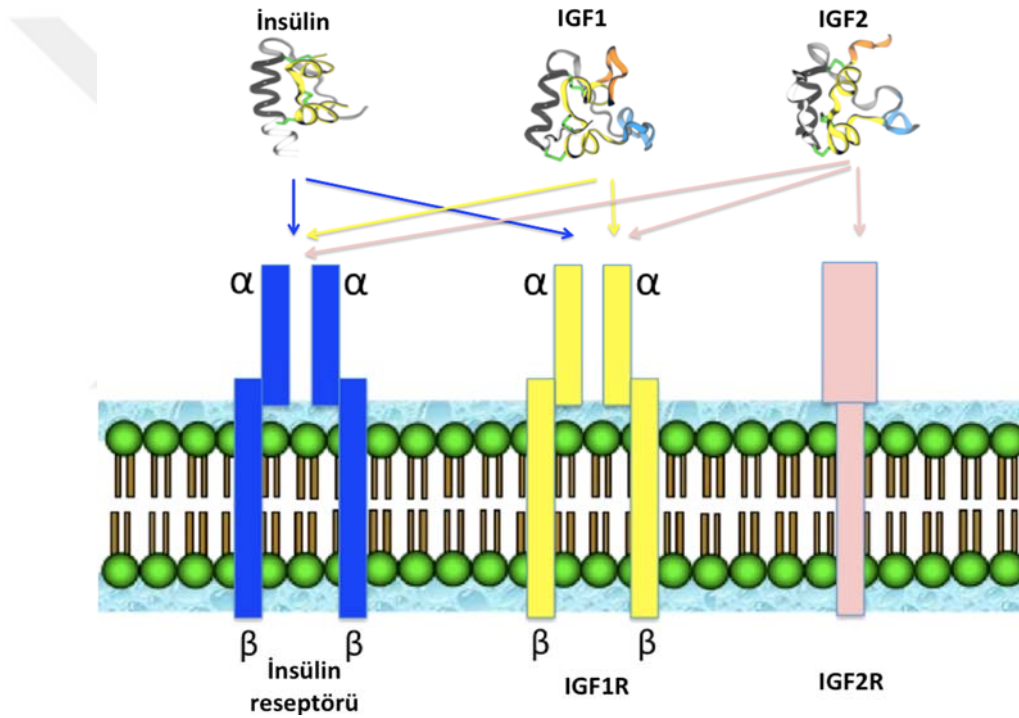
12q22-24.1 kromozom bölgesinde yer alan IGF1 geni altı ekzondan oluşmakta ve memelilerde gen ifadesi 2 ayrı promotor tarafından kontrol edilmektedir. Birinci promotor kullanılarak sentezlenen tip I, ikinci promotor kullanılarak sentezlenen ise tip II IGF1 olarak adlandırılmaktadır (100). Tip I IGF1 periferel dokular tarafından; tip II ise karaciğer tarafından büyüme hormonu kontrolü altında sentezlenmektedir. IGF1 geninin alternatif işlenmesi sonucu farklı mRNA ve öncül proteinler meydana gelmektedir (101). Olgun IGF1 proteini 70 amino asitlik korunmuş dizi ve karboksil ucunda mRNA işlenmesine bağlı olarak değişen E peptid dizisi bulundurmaktadır (102). IGF2'nin biyolojik fonksiyonları IGF1'e göre daha az çalışılmakla birlikte *imprinted* özellikte bir gen olduğu, 4 farklı promotor tarafından kontrol edildiği, fetal dönemde IGF1'e göre daha yüksek oranda ve dokuya özgül olarak ifade edildiği, çocukluk dönemi hastalıkları ve kanserle ilişkilendirildiği bilinmektedir (103-106). Kemirgenlerde IGF2 fetal büyüme faktörü olup doğumdan sonra ifadesi görülmezken, insanlarda bulunan karaciğer spesifik P₁ promotorunun kullanılması nedeniyle hepatik IGF2 sentezi doğumdan sonra da devam etmektedir (106).

IGF sentezi puberteye kadar artış gösterirken, puberte sonrası IGF1 düzeyi yaş ve cinsiyete göre anlamlı fark göstermeye başlamakta, IGF2 ise önemli bir fark göstermemektedir (107, 108). Karaciğerden salgılanan IGF'ler endokrin havuzu oluştururken, tüm doku ve hücre tipleri tarafından sentezlenen IGF'ler otokrin/parakrin rol oynamaktadır (102). Kas ve motor nöron hücrelerinde IGF'lerin lokal sentezleri güçlü nörotrofik ve miyotrofik etki göstermektedir. IGF1'in kasta satellit hücre proliferasyonunu arttırdığı, miyoblast farklılaşması ve miyotüp oluşumunu etkileyerek kas gelişimi üzerinde önemli rol oynadığı ve kas hasarı/denervasyonu sonrasında rejenerasyonu uyardığı bildirilmiştir (20, 21, 24, 109, 110). IGF2 düzeyinin ise miyogenez sırasında arttığı ve kas farklılaşmasında rol aldığı gösterilmiştir (111-113). Ayrıca IGF'lerin merkezi ve periferel sinir sisteminde

gelişim ve olgunlaşmada fonksiyon gördüğü ve motor nöron sağ kalımı, nörit uzaması, dallanması, sinaps oluşumu, rejenerasyonu gibi önemli fonksiyonları olduğu bilinmektedir (22, 23, 25, 114-116).

2.2.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörleri

IGF1 ve IGF2 etkilerini tirozin kinaz aktivitesine sahip olan IGF1 reseptörü (IGF1R) aracılığıyla gerçekleştirmektedir. İnsülin reseptörü ile yapısal benzerlik gösteren IGF1R, birbirine disülfid bağları ile bağlı 2 alfa ve 2 beta zincirinden oluşan tetramer yapıdadır (Şekil 2.5) (117).



Şekil 2.5. IGF1, IGF2 ve insülin reseptörlerinin yapısı.

Sistein bakımından zengin olan alfa zincirleri ekstraselüler ligand bağlanma bölgesini, beta zincirleri ise intraselüler kinaz domainini taşımaktadır (118). Tersiyer yapılarının benzerliği nedeniyle IGF1R'ü IGF1, IGF2 ve insülin ligandlarının üçüne de bağlanabilmektedir. Ancak, IGF2'den 10 kat, insülinde ise 100 kat daha yüksek afiniteyle IGF1'e bağlanmaktadır (95, 119). Ligand bağlandığında konformasyon değiştiren IGF1R, intraselüler beta alt birimi üzerindeki tirozin otofosforilasyonunu

tetikleyerek insulin reseptör substratı (IRS) 1/2 ile SHC (*Src 2 domain-containing*) adaptör proteinlerini fosforilasyonla aktive ederek hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü ve sağ kalımıyla ilgili sinyal yollarını uyarmaktadır (99, 120).

IGF2 reseptörü yapısal olarak insülin ve IGF1 reseptörlerinden farklılık göstermektedir. Ekstraselüler domaini sistein tekrarları içeren 280 kDa ağırlığında monomerik bir transmembran proteinidir. IGF2'ye IGF1'den 100 kat daha fazla afinite göstermektedir (24). IGF2R intraselüler tirozin bağlanma bölgesi içermediği için IGF2 bağlandıktan sonra hücre içi sinyal yollarını uyaramamakta ve IGF2'nin hücre yüzeyinden alınarak lizozomal yıkıma yönlendirilmesini sağlamaktadır (121).

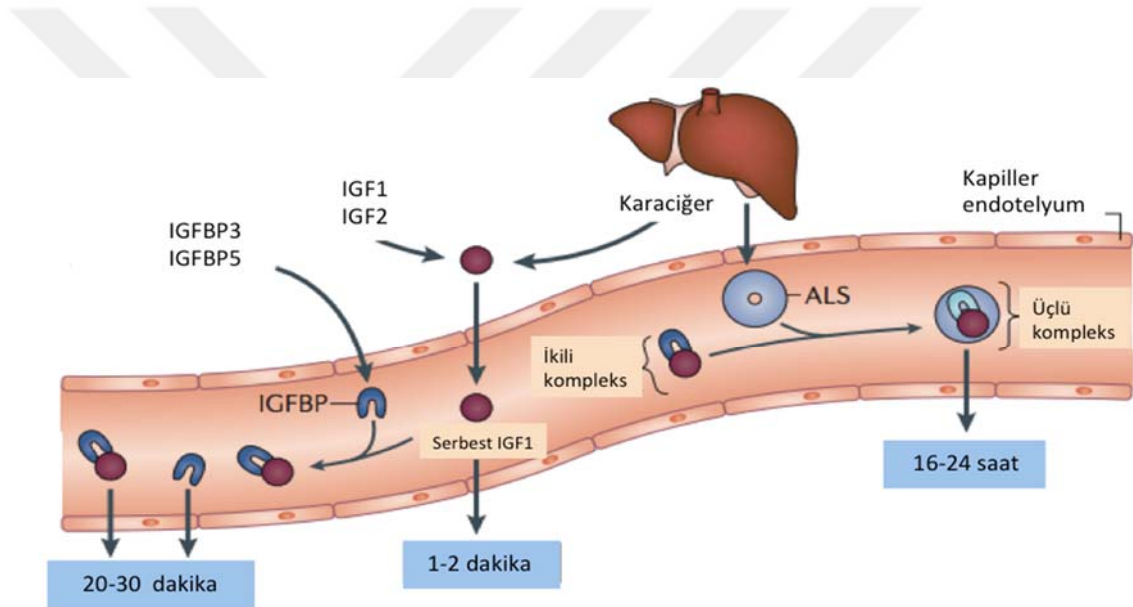
2.2.3. IGF Bağlayıcı Proteinler

IGFBP'ler IGF ailesinin önemli üyelerini oluşturmaktadır. IGF1 ve IGF2 proteinlerine yüksek afiniteyle bağlanan 6 farklı IGFBP (IGFBP1-6) tipi tanımlanmıştır. IGF'lerin yarı ömrünün uzamasını sağlayıp, hedef dokulara taşınmasını ve kontrollü şekilde serbest kalarak fonksiyon görmelerini sağlamaktadır (17).

IGFBP'ler, yüksek afiniteyle bağlandıkları IGF'lerin reseptörle etkileşimlerini engellemektedir. Özgül proteazlar tarafından kesildiklerinde IGF'lere olan ilgileri azalmakta ve serbest kalan IGF'ler reseptörle etkileşime girip biyolojik aktivitelerini gösterebilmektedir (18). IGFBP'ler reseptörle bağlanacak serbest IGF konsantrasyonu belirlemeleri nedeniyle IGF'lerin biyolojik aktivitesinin kontrolünde önemli rol almaktadır (17).

Serumda bulunan IGF'ler büyüme hormonu uyarısıyla sentezlenen IGFBP3 ya da IGFBP5 proteinlerinden biri ile bağlanıp ikili kompleks şeklinde taşınmaktadır (Şekil 2.6)(122). Oluşan ikili kompleks, serbest haldeyken dakikalarla sınırlı olan IGF yarı ömrünü uzatıp (20-30 dakika), kontrollü olarak salınarak fonksiyon görmesini sağlarken bu yapıya, IGFBP'lerin karboksil ucundan bağlanan ALS proteininin eklenmesi ile oluşan 150 kDa büyüklüğündeki üçlü yapı, kompleksin stabilitesinin

daha uzun süreli (16-20 saat) korunmasını sağlamaktadır (123, 124). Bu nedenle üçlü yapının oluşmasını engelleyecek ALS kodlayan gen mutasyonları ikili kompleksin stabilitesinin bozularak hem IGF hem de taşıyıcı proteinlerin serum konsantrasyonlarının azalmasına neden olmaktadır (19, 125). ALS ifadesinin olmadığı *in vivo* modeller IGF1 düzeyinin % 65 oranında azaldığını göstermiştir (126). IGF1'in % 80'i serumda üçlü kompleks yapı şeklinde bulunmaktadır. Hedef dokulara taşınırken bu kompleks dağılmakta ve ALS proteini molekül ağırlığının yüksek olması nedeniyle vasküler alanda kalırken, ikili kompleks damar endotelinden hedef dokulara geçmektedir (127).



Şekil 2.6. Dolaşımda bulunan IGF'lerin taşınması (124).

IGF bağlayıcı protein ailesini kodlayan genlerin evrimsel süreçte duplikasyonlar sonucu ortaya çıkarak farklılaştığı düşünülmektedir (128). 24-45 kDa ağırlığında olan IGFBP'ler benzer protein yapısına sahip olup, amino ve karboksil bölgelerinde korunmuş sistein dizileri içermektedir. Amino ucu IGF'lerle bağlanmayı, karboksil ucu ise diğer proteinlerle ilişki kurmayı sağlamaktadır. Aralarında yer alan L (*linker*) bölgesi ise evrimsel olarak daha az korunmuştur ve IGFBP'lerin aktivitesi için önemli post translasyonel modifikasyon bölgelerini içermektedir (129). IGFBP'lerin aktivitelerini fosforilasyonları ve ekstraselüler matriksle (ECM) ilişkileri

etkileyebilmektedir (130, 131). IGFBP4 ve IGFBP6 IGF aktivitesini inhibe edici etki gösterirken IGFBP1, 2, 3 ve 5 inhibe ya da uyarıcı olabilmektedir (18).

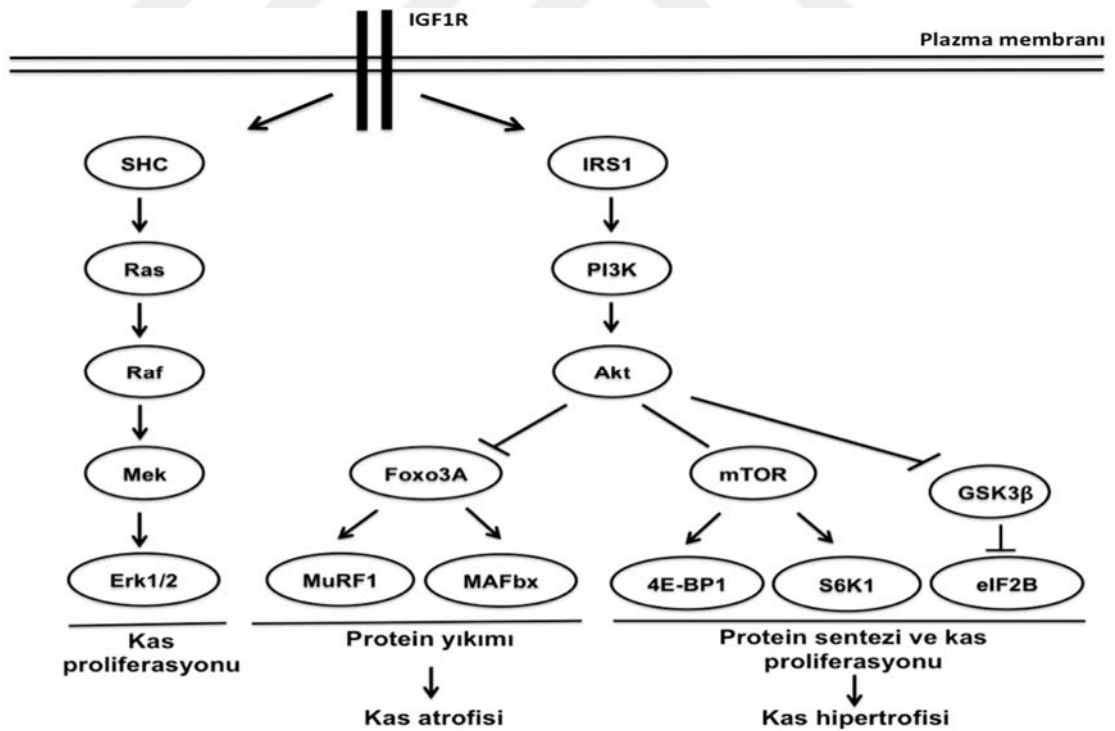
IGFBP'ler dokuya özgül fonksiyon göstermektedir. IGFBP'lerden birinin ifadesinin baskılanması tek başına fenotipik bir etki yaratmayıp, diğer IGFBP'lerin ifadesindeki artışla kompanse edilmektedir (132). IGFBP3 serumda, IGFBP5 ise kasta bulunan temel bağlayıcı proteinler olmaları nedeniyle önem taşımaktadır (133, 134). IGFBP5'in kasta yüksek ifade edildiği ve farklılaşma sırasında IGF2'nin etki gösterebilmesi için önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (134). Bu etkileri ECM'ye bağlanıp hücre yüzeyi yakınında IGF havuzu oluşturmasını sağlayarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (135). Fonksiyonları tartışılmaya devam eden IGFBP3 ve IGFBP5'in nükleer lokalizasyon sinyali taşıdığı, bu nedenle nükleer fonksiyonları olabileceği ve IGF etkisini kontrol etmenin yanı sıra IGF'lerden bağımsız olarak büyüme faktörü gibi rol oynayabilecekleri öne sürülmektedir (136).

2.2.4. IGF Sinyal Yolağı

IGF'ler iskelet kas dokusu ve motor nöron hücreleri üzerindeki anabolik fonksiyonlarını IGF1R sinyal yolağını uyararak göstermektedir. IGF1 ya da IGF2 bağlanması sonucu aktive olan IGF1R'ü konformasyon değiştirerek intraselüler beta subünite üzerindeki tirozin otofosforilasyonunu tetiklemekte ve IRS 1/2 ve SHC adaptör proteinlerini fosforile etmektedir (99, 120). Bunun sonucunda hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü ve sağ kalımıyla ilgili PI3K/Akt ve ERK 1/2 sinyal yolları uyarılmaktadır. PI3K/Akt yolağı metabolik olayları kontrol edip sağ kalımı sağlarken, ERK 1/2 yolağı ise hücre büyümesi ve mitojenik aktiviteleri uyarmaktadır (28, 29, 137).

IGF1 reseptör aktivasyonu baskılandığında farelerde kas kitlesinin % 10-30 oranında azaldığı ve hasar sonrası rejenerasyonda gecikme olduğu gösterilmiştir (138). Kas hücrelerine büyüme ya da hasar sinyali geldiğinde kas kök hücreleri olan satellit hücreler proliferasyon olarak miyoblast hücrelerini, miyoblastlar farklılaşarak miyositleri ve miyositler göç edip birbirleriyle füzyona girerek olgun miyotüpleri

oluşturmaktadır. IGF'lerin bu süreçte satellit hücrelerinin uyarılması ve kas farklılaşmasında rol aldığı bilinmektedir (109). Olgun kas dokusunda ise IGF'ler IGF1R'ünü aktive ederek protein senteziyle ilgili sinyal yollarını indükleyip, protein yıkımı ve apoptozla ilgili yolları baskılayarak kas kitlesinin farklı mekanizmalarla kontrol edilmesini sağlamaktadır (Şekil 2.7)(24, 139, 140). IGF1R sinyal yolağının en önemli efektörü Akt proteindir (29). Akt'nin fosforilasyonla aktivasyonu, otofaji ve apoptotik yolları baskılamanın yanı sıra, protein yıkımına neden olan atrojenlerin ifadesini kontrol eden *forkhead* ailesi transkripsiyon faktörlerinin (FoxO) inaktivasyonunu sağlamaktadır (141). Ayrıca, *mammalian target of rapamycin* (mTOR) yolağı üzerinden ribozomal protein S6 kinaz 1B (RPS6K1B)'yi aktive ederek hücre proliferasyonu ve protein sentezinin artırılıp hipertrofinin uyarılmasını sağlamaktadır. Glikojen sentez kinaz 3 beta (GSK3 β) proteininin Akt fosforilasyonu ile baskılanması hipertrofinin uyarılmasını sağlayan ikinci bir mekanizma olarak bilinmektedir (29, 139-145).



Şekil 2.7. İskelet kas kitlesini kontrol eden IGF sinyal yolağı.

Kas gelişimi ve farklılaşmasında olduğu gibi merkezi ve periferik sinir sistemi gelişiminde de IGF'lerin ve IGF sinyal yolağının önemli rolü olduğu bilinmektedir. IGF'ler destek hücrelerinin ve farklı nöron tiplerinin gelişimi ve sağ kalımında, nörit uzaması, dallanması, sinaps oluşumu ve rejenerasyonunda rol almaktadır (22, 23, 25, 116). Hücre büyümesi, mitojenik aktiviteler ve nöronal farklılaşma Erk1/2 yolağının aktivasyonu ile gerçekleşirken, apoptotik yollar baskılanarak nöron sağ kalımının uyarımı ve hücre göçü gibi süreçler PI3K/akt yolağı ile gerçekleşmektedir (28, 116, 146).

2.2.5. IGF Ailesinin SMA ve Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkisi

Çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda, hastalık etiolojisinden bağımsız olarak IGF1 ve IGFBP düzeylerinin normalden farklılık gösterdiği bilinmektedir. Hastalığa özgü olarak IGF1 düzeyi azalmakta ya da hücrelerin IGF1'e karşı duyarlılığını kaybetmesi nedeniyle artmaktadır (147). Her iki durumda da IGF mekanizmasında oluşan hata kas ve motor nöron üzerindeki güçlü trofik desteğin azalmasına neden olarak hastalık patolojisini etkileyebilmektedir. Bu nedenle nörodejeneratif hastalıklarda IGF1 uygulaması önemli bir tedavi yaklaşımı olarak dikkat çekmiş ve amyotrofik lateral skleroz, spinal bulbar müsküler atrofi (SBMA), diyafragma paralizili distal infantil spinal müsküler atrofi (SMARD1), DMD ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda IGF1 uygulamasına yönelik prelinik araştırmalar yürütülmüştür (148-158). Amyotrofik lateral skleroz ve DMD gibi hastalıklarda IGF1 uygulandığında motor nöron dejenerasyonu, kas atrofisi ve yaşam süresinde iyileşme sağlanması, bu hastalıklarda klinik çalışmaların önünü açmıştır (38, 159). SBMA hastalarında geçtiğimiz yıllarda patent almış olan bir IGF1 varyantının uygulamasıyla ilgili klinik araştırmalar başarılı şekilde devam etmektedir (Kenneth Fischbeck, kişisel görüşme)¹. 2016 yılında Allodi ve ark. (160) amyotrofik lateral skleroz hastalarında IGF2'yi nöron dejenerasyonuna direnç sağlayan bir faktör

¹Kenneth Fischbeck, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Bethesda, MD, USA.

olarak tanımlamış, IGF2 uygulamasının ALS'de olduğu gibi SMA hasta fibroblastından geliştirilen motor nöron hücrelerinde de nöron dejenerasyonunu önlediğini göstermişlerdir.

SMA hastaları ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar SMA'da IGF sistemi regülasyonun bozulduğuna işaret etmektedir. Farklı klinik tiplerde SMA hastalarında yapılmış olan biyobelirteç analizleri ve transkriptom verileri (yayınlanmamış data) bir grup IGFBP'nin hastalık ciddiyeli ilişkili olarak değiştiğini göstermiştir (16). Benzer şekilde, SMA hastalarının kas biyopsi örneklerinde yapılan transkriptom analizleri, IGF sinyal yolağında yer alan moleküllerin ifadesinin tip I hastalarda tip II'lere göre daha düşük olduğunu, IGF1R ifadesinin ise hastalık ciddiyetiyle korelasyon göstererek arttığını göstermiştir (161). Bu artışın IGF1 düşüklüğünü kompanse etmek amacıyla değil, patolojik bir durum nedeniyle olduğu ve sonuçta kas/motor nöron hücrelerinde anabolik etkileri olan Akt yolağının ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (110, 162-164). Ayrıca SMA fare modellerinde karaciğerden sentezlenen serum *Igf1* ifadesinin düşük olduğunun saptanması ve SMA tedavisinde kullanılan alel spesifik oligonükleotitlerin SMN proteininin yanı sıra *Igf1* sentezinde de artış sağlaması SMN ve IGF düzeyi arasında açıklanamamış bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (39, 40).

Ağır SMA fare modellerinde IGF1 uygulandığında kas atrofisinde azalma, hipertrofinin uyarılması, sağ kalım süresinde artış, vücut ağırlığı ve motor koordinasyon artışı gibi başarılı sonuçlar sağlanmıştır (40, 54, 110, 165). Literatürde bildirilen tüm bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde SMA hastalarında IGF sinyalizasyonunun bozulmuş olabileceğine, prelinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar ise IGF1 eksikliği olan hastalarda IGF1 verilmesinin potansiyel bir destekleyici tedavi yaklaşımı olarak değerlendirilebileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle daha önce SMA hastalarında detaylı olarak çalışılmamış olan IGF ailesi üyelerinin araştırılması ve hastalık patolojisiyle ilişkisinin kurulması önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında SMA'lı hasta serumlarında ve arşivlenmiş olan SMA hastalarına ait kas biyopsisi örneklerinde IGF ve IGFBP seviyelerinin araştırılarak, SMA hastalarındaki fenotipik çeşitlilikle ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Serum araştırmalarında; 15 SMA hastası ve 18 kontrol bireye ait serum örneğinde IGF1 ve IGFBP3 protein miktarları IRMA, IGFBP5 ve ALS protein miktarları ise ELISA tekniği ile belirlenmiştir. Kas biyopsi örneklerinde yapılan analizlerde ise 9 SMA hastası, 4 sağlıklı birey ve SMA dışında kas atrofisi görölen 6 hastaya ait arşivlenmiş kas biyopsi örneğinde IGF1, IGF2, IGFBP5 ve IGF1R protein düzeyleri immünfloresan boyama tekniği ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol bireyler ve farklı kliniğe sahip SMA hastaları arasında karşılaştırılarak yorumlanmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada İncelenen Bireyler

Bu tez çalışmasında karaciğerden sentezlenerek seruma verilen ve lokal olarak kasta sentezlenen IGF sistemi elemanlarının düzeyleri araştırılmıştır. Serum çalışmalarına 2012-2015 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi'ne başvurmuş olan 15 SMA hastası ve 18 sağlıklı çocuk dahil edilmiştir. IGF1 düzeyini etkilediği bilinen büyüme hormonu tedavisi almıyor olmak, diyabet, karaciğer, tiroid ya da kanser hastası olmamak çalışmaya dahil edilme kriterleri olarak değerlendirilmiştir. Hasta grubu 9 tip I ve 6 tip II SMA hastasından oluşmaktadır. Hastalarda *SMN1* exon 7/8 delesyonu bulunduğu HÜ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Rutin Laboratuvarı'nda doğrulanmıştır. Çalışma grubunda yer alan bireylerin hepsi pre-pubertal dönemde olup hastaların ortalama yaşı 36.3 (1-89 ay), kontrol grubunun ise 32.3 aydır (5-77 ay). Periferik kan örnekleri alındığı sırada 4 numaralı hasta dışındaki tüm tip I hastalar mekanik ventilasyon desteği almaktaydı. Çalışma grubuna ait klinik ve antropometrik veriler tablo 3.1'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Serum analizleri yapılan SMA hastaları ve kontrol grubuna ait klinik ve antropometrik bilgiler.

| No | SMA Tipi | Mekanik ventilasyon desteği | Cinsiyet | Yaş (ay) | Boy (cm) | Kilo (kg) |
|----------------|----------|-----------------------------|----------|----------|----------|-----------|
| HASTA | | | | | | |
| 1 | I | + | Kız | 11 | 70 | 10 |
| 2 | I | + | Erkek | 72 | 105 | 23,8 |
| 3 | I | + | Kız | 10 | 72 | 6,67 |
| 4 | I | - | Erkek | 1 | 58 | 3,5 |
| 5 | I | + | Kız | 3 | 57 | 3,5 |
| 6 | I | + | Kız | 12 | 74 | 8 |
| 7 | I | + | Erkek | 7 | 60 | 5,9 |
| 8 | I | + | Kız | 6 | 63 | 5 |
| 9 | I | + | Erkek | 5 | 67 | 6,6 |
| 10 | II | - | Erkek | 60 | 100 | 16 |
| 11 | II | - | Kız | 66 | 106 | 15 |
| 12 | II | - | Erkek | 65 | 104 | 13.6 |
| 13 | II | - | Erkek | 89 | 92 | 12 |
| 14 | II | - | Erkek | 57 | 91 | 16 |
| 15 | II | - | Erkek | 81 | 103 | 30 |
| KONTROL | | | | | | |
| 1 | | | Erkek | 60 | 110 | 23 |
| 2 | | | Kız | 68 | 120 | 23 |
| 3 | | | Kız | 63 | 118 | 26 |
| 4 | | | Kız | 3 | 59 | 5,6 |
| 5 | | | Erkek | 66 | 113 | 21 |
| 6 | | | Kız | 67 | 117 | 23 |
| 7 | | | Erkek | 57 | 110 | 20 |
| 8 | | | Kız | 12 | 73 | 8,2 |
| 9 | | | Erkek | 7 | 72,5 | 8,4 |
| 10 | | | Erkek | 18 | 85 | 12,5 |
| 11 | | | Erkek | 21 | 84 | 11,8 |
| 12 | | | Erkek | 5 | 69 | 9,3 |
| 13 | | | Erkek | 6 | 67 | 9,4 |
| 14 | | | Kız | 12 | 69 | 8,7 |
| 15 | | | Erkek | 17 | 86 | 12,5 |
| 16 | | | Kız | 13 | 76 | 9,4 |
| 17 | | | Erkek | 77 | 116 | 19 |
| 18 | | | Kız | 9 | 77 | 8,9 |

Kastaki lokal sentezin araştırılmasında ise HÜ, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik ve Perinatal Patoloji Ünitesi tarafından tanı zamanında alınmış ve arşivlenmiş olan kas biyopsi örnekleri kullanılmıştır. Analizlerde 9 SMA hastası, kas biyopsisinde patolojik bulgu saptanmayan 4 sağlıklı birey ve histopatolojik bulguları farklı nöromusküler hastalıklarla ilişkili olan 6 bireye (hasta-kontrol) ait kas biyopsi örnekleri değerlendirilmiştir (Tablo 3. 2). Sağlıklı bireylerde yavaş (tip 1) ve hızlı kasılan (tip 2) kas lifleri homojen dağılım gösterirken, SMA hastalarında atrofik liflerin çoğunlukla tip 2 liflerden oluştuğu bilinmektedir. Hasta-kontrol grubu hem tip 1 hem de tip 2 lif atrofisi görülen hastalıklar seçilerek oluşturulmuştur.

Tablo 3.2. IF analiz yapılan kas biyopsi örneklerine ait bilgiler.

| Örnek No | Tanı | Atrofik Lif Tipi |
|----------------------------|--|------------------|
| SMA Hastaları | | |
| 1 | Tip III SMA | Tip 2 |
| 2 | Tip III SMA | Tip 2 |
| 3 | Tip III SMA | Tip 2 |
| 4 | Tip III SMA | Tip 2 |
| 5 | Tip III SMA | Tip 2 |
| 6 | Tip I SMA | Tip 2 |
| 7 | Tip II/III SMA | Tip 2 |
| 8 | Tip II/III SMA | Tip 2 |
| 9 | Tip II/III SMA | Tip 2 |
| Hasta-Kontrol Grubu | | |
| 10 | Konjenital lif tipi oransızlığı (CFTD) | Tip 1 |
| 11 | Konjenital lif tipi oransızlığı (CFTD) | Tip 1 |
| 12 | Konjenital lif tipi oransızlığı (CFTD) | Tip 1 |
| 13 | Limb-girdle kas distrofisi (LGMD) | Tip 2 |
| 14 | Duchenne kas distrofisi (DMD) | Tip 2 |
| 15 | Kas distrofisi/tip 2 lif atrofisi | Tip 2 |

Serum ve kasta yapılan analizler için farklı hastalar analiz edilmiş, aynı hastaya ait kas ve serum örneklerinde çalışma yapılması mümkün olmamıştır. SMA hastalarında tanı amaçlı kas biyopsi örneği rutin olarak alınmadığı için serum örneği alınan hastaların kas biyopsileri bulunmamaktadır. Kasta yapılan çalışmalarda ise yaşa bağlı olarak serum IGF düzeylerinin değişiklik göstermesi nedeniyle biyopsi

zamanında alınmış olan serum örneklerinin kullanılması gerekmiş; ancak hastaların serum örnekleri rutin olarak alınmadığı için mümkün olmamıştır.

Bu çalışmalar HÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 20.11.2013 tarih ve GO13/518-05 karar numaralı izniyle ailelerden bilgilendirilmiş onam formu alınarak gerçekleştirilmiştir (Bkz. EK 1).



3.2. Gereçler

3.2.1. Serum Analizleri

- IGF1 IRMA kiti (A15729, Beckman Coulter)
- IGFBP3 IRMA kiti (IGFBP3 Active® IRMA, DSL6600, Beckman Coulter)
- IGFBP5 ELISA kiti, (CSB-E13263h, Cusabio)
- ALS ELISA kiti (E35, Mediagnost)
- ELISA mikropłaka okuyucu (Sunrise, Tecan) ve analiz programı (Magellan)
- ELISA mikropłaka yıkayıcı (ELx50, Biotek)
- Gama okuyucu (Berthold, LB2111)
- Çalkalayıcı (FALC, F350SL)
- Vorteks (BioSan V-1 plus)

3.2.2. İmmünfloresan Boyama Analizleri

- Paraformaldehit (Sigma): % 4, pH: 7.2
- 1X Tuzlu fosfat tamponu (PBS):
 - 10 adet PBS tablet (Invitrogen) 800 ml dH₂O içinde çözülür.
 - Son hacim 1lt'ye tamamlanır, pH: 7.3'e ayarlanır.
- Triton X-100; 0.2% /PBS (h/h):
 - 50 ml 1X PBS tamponu içine 100 µl Triton X 100 (Sigma) eklenir.
 - Manyetik karıştırıcıda, köpürmeden çözünene kadar karıştırılır.
- Tween 20; 0.1% /PBS (h/h):
 - 100 ml 1X PBS tamponu içine 100 µl Triton X 100 (Sigma) eklenir.
 - Manyetik karıştırıcıda, köpürmeden çözünene kadar karıştırılır.
- Sığır Serum Albumin (BSA); 0,1 gr/ml :
 - 5 gr BSA (Sigma) üzerine 30 ml 1X PBS tamponu eklenir.
 - Manyetik karıştırıcıda çözünene kadar karıştırılır.
 - Son hacim 50 ml'ye tamamlanır.
 - 500 µl'lik alikotlar hazırlanıp, -20 °C'de saklanır.
- Keçi serumu (Sigma)
- 4', 6-diaminodino-2-fenilindol (DAPI), 5 mg/ml stok
- Preparat kapatma solüsyonu (ProLong Gold Antifade Reagent, Invitrogen)
- Doku kesitlerinin etrafına hidrofobik bariyer çizmek için kalem (PAP pen, Sigma, Z672548- 1EA)

- Primer antikorlar:
 - Poliklonal keçi anti-insan IGF1 (R&D Systems, AF-291-NA)
 - Poliklonal keçi anti-insan IGF2 (R&D Systems, AF-292-NA)
 - Monoklonal fare-anti insan IGF1R (R&D Systems, MAB875)
 - Monoklonal tavşan anti-insan IGF1R (Abcam, ab131476)
- Sekonder antikorlar:
 - Tavşan-anti-keçi IgG Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen)
 - Keçi-anti-fare IgG Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen)
 - Keçi-anti-tavşan IgG Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen)
 - Keçi-anti-tavşan IgG Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Invitrogen)
- Lam (*Poly Prep Slides*, Sigma, P0425- 72EA)
- Lamel (40x50 cm)
- Floresan mikroskop (AxioPlan 2, Zeiss ve Nikon Eclipse E400)
- Çalkalayıcı (FALC, F350SL)
- Manyetik karıştırıcı (Quick Mag, İnterMed)
- pH metre (Hanna, HI 2211)
- Elektronik tartı (AND, GX-2000)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Antropometrik Verilerin Değerlendirilmesi

Serum analizleri yapılan çalışma grubunu oluşturan bireylerin antropometrik verileri Amerikan Hastalıklardan Koruma ve Önleme Merkezi (CDC 2000) büyüme eğrileri kullanılarak malnütrisyon ve boy kısalığı bakımından değerlendirilmiştir (166). Malnütrisyon düzeyinin belirlenmesi için ideal ağırlık yüzdesi;

$$[(\text{çocuğun ağırlığı/aynı yaştaki sağlıklı çocuğun ağırlığı}) \times 100]$$

formülüyle hesaplanmıştır. Gomez sınıflandırmasına göre ideal ağırlık yüzdesinin % 60'ın altında olması ağır, % 60-74 orta ve % 75-89 hafif malnütrisyon olarak değerlendirilmiştir (167). Boy kısalığı ise yaşa göre boyu ortalamasının 3 persentil altında olan bireyler için pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, boy standart sapma skorları (SSS);

$$[(\text{ölçülen boy uzunluğu} - 50 \text{ persentildeki değer}) / \text{standart sapma}]$$

formülüyle hesaplanmış ve boyların normalden ne kadar saptığı belirlenmiştir.

3.3.2. Serumda Bulunan IGF1, IGFBP3, IGFBP5 ve ALS Protein Düzeylerinin Analizi

Çalışmada yer alan tüm katılımcılardan 5 ml periferik kan alınarak serum izolasyonu yapılmış, IGF1 ve IGFBP3 düzeyleri antikor kaplı (*coated tube*) IRMA, IGFBP5 ve ALS düzeyleri ise ELISA tekniği ile analiz edilmiştir. Analizler için serum ve solüsyonlar oda sıcaklığına getirilmiştir. 4 tip II SMA hastasının çalışmaya geç dahil olması nedeniyle bu hastalarda IGFBP5 analizleri yapılamamıştır.

Periferik Kandan Serum İzolasyonu

1. Serum toplama tüpüne (Becton Dickinson) 5 ml kan alınmıştır.
2. Kan oda sıcaklığında 45 dk bekletilmiştir.
3. 1300 G ve + 4°C sıcaklıkta tüpler 10 dk santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonunda şeffaf sarı renkli olarak üst fazda toplanan serum, miktarına göre 4 ayrı tüpe 100-150 µl hacimde bölünmüştür. Tüpler araştırılacak her parametre için hasta bilgisi ve tarih belirtilerek etiketlenmiş, kalan serum yeni bir tüpe aktarılarak yedek olarak saklanmıştır.

Serum örnekleri analiz tarihine kadar -80°C dondurucuda saklanmış ve tekrarlayan dondurup çözme işlemlerinden kaçınılmıştır.

IGF1 Düzeyinin Analizi

1. Liyofilize kalibratörler ve kontrol serumu kitte belirtilen oranda dH₂O eklenerek sulandırılmıştır. 30 dk bekledikten sonra nazikçe pipetleme yapılarak aşağıda verilen kontrol ve kalibratör konsantrasyonları elde edilmiştir.

Kontrol serum: 308-508 ng/ml

Kalibratör 0: 0 ng/ml

Kalibratör 1: 25 ng/ml

Kalibratör 2: 81 ng/ml

Kalibratör 3: 280 ng/ml

Kalibratör 4: 543 ng/ml

Kalibratör 5: 1219 ng/ml

2. Yıkama solüsyonu 1:20 sulandırılmıştır.
3. Serbest IGF1 elde etmek amacıyla 25 µl kontrol ve analiz edilecek olan serum örneklerinin üzerine 500 µl ayırma solüsyonu eklenmiştir.
4. Vorteksle karıştırılarak 1 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.
5. Kalibratör, kontrol ve analiz edilecek serum örneklerinden 50 µl alınarak monoklonal fare antikoru ile kaplı tüplere koyulmuştur.
6. 300 µl iyot 125 işaretli monoklonal anti-fare antikoru eklenmiştir.

7. 350 rpm çalkalayıcıda 1 saat inkübe edilmiştir.
8. 2 ml yıkama solüsyonu ile 2 kez yıkanmıştır.
9. Gama okuyucuda analiz yapılarak konsantrasyon belirlenmiştir.

IGFBP3 Düzeyinin Analizi

1. Liyofilize kalibratörler ve kontrol serumu kitte belirtilen oranda dH₂O ile sulandırılmış, 10 dk bekledikten sonra nazikçe pipetlenerek aşağıdaki kontrol ve kalibratör konsantrasyonları elde edilmiştir:

Kontrol serum: 3.57-5.95 ng/ml

Kalibratör 0: 0 ng/ml

Kalibratör 1: 2.10 ng/ml

Kalibratör 2: 5.40 ng/ml

Kalibratör 3: 21.70 ng/ml

Kalibratör 4: 54 ng/ml

Kalibratör 5: 110 ng/ml

2. Analiz edilecek serum örneklerinden 10 µl alınarak, 1:50 oranında sulandırılmıştır. Kontrol ve kalibratörler sulandırılmamıştır.
3. 50 µl serum örneği, kalibratör ve kontrol serumu keçi-poliklonal antikoruna ile kaplı tüplere koyulmuştur.
4. 200 µl iyot 125 işaretli poliklonal antikor eklenmiştir.
5. 180 rpm çalkalayıcıda 18-24 saat inkübe edilmiştir.
6. 3 ml yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır.
7. Gama okuyucuda analiz yapılarak konsantrasyon belirlenmiştir.

IGFBP5 Düzeyinin Analizi

1. Yıkama tamponu dH₂O ile 1:25 oranında sulandırılmıştır.
2. Standart tüpüne 100 µl örnek sulandırma solüsyonu eklenerek 10 ng/ml konsantrasyonda ana stok elde edilmiştir.
3. 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüp nazikçe alt üst edilerek karıştırılmıştır.

4. 1:2 seri dilüsyon yapılarak aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda standartlar elde edilmiştir:

Standart 0: 0 ng/ml

Standart 1: 0.156 ng/ml

Standart 2: 0.312 ng/ml

Standart 3: 0.625 ng/ml

Standart 4: 1.25 ng/ml

Standart 5: 2.5 ng/ml

Standart 6: 5 ng/ml

5. Serum örnekleri sulandırma solüsyonu kullanılarak 1:200 oranında sulandırılmıştır:

- 5 µl serum ve 45 µl sulandırma solüsyonu karıştırılarak 1:10 dilüsyon yapılmıştır.

- 15 µl bu serum örneğinden ve 285 µl sulandırma solüsyonu karıştırılarak 1:20 dilüsyon yapılmıştır.

6. Sulandırılmış serum örnekleri ve standartlar (100 µl) deney planına göre 96 kuyucuklu mikropalakada ilgili kuyucuklara eklenmiştir.

7. 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir.

8. İnkübasyon süresi dolduğunda mikropalaka ters çevrilerek kuyucuklardaki sıvı boşaltılmıştır. *Whatman* kağıdına birkaç kez sertçe vurularak sıvı kalmadığından emin olunmuştur.

9. Biotin antikoru biotin sulandırma solüsyonu ile 1:100 oranında sulandırılmış, 100 µl eklenmiştir.

10. 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

11. İnkübasyonun son 15 dakikasında HRP-avidin, HRP-avidin sulandırma solüsyonu kullanılarak 1:100 oranında sulandırılmıştır.

12. İnkübasyon süresi dolduğunda 200 µl yıkama tamponuyla 3 kez yıkama yapılmıştır.

13. Yıkama sonrası kalan sıvının uzaklaştırılabilmesi için mikropalaka ters çevrilerek *whatman* kağıdına bir kaç kez vurulmuştur.

14. 100 µl HRP-avidin eklenmiştir.

15. 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
16. 200 µl yıkama tamponuyla 5 kez yıkama yapılmıştır.
17. 90 µl tetrametil benzidin eklenmiştir.
18. 37 °C'de karanlık ortamda 15-30 dk inkübe edilmiştir.
19. 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiştir.
20. 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda absorbans okunarak konsantrasyon belirlenmiştir.

ALS Düzeyinin Analizi

1. Yıkama tamponu dH₂O ile 1:20 oranında sulandırılarak hazırlanmıştır.
2. Standart tüplerinin (Standart A-F) her birine 1000 µl sulandırma tamponu eklenerek standartlar hazırlanmıştır. 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra hafifçe vorteksle karıştırılarak aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda standartlar elde edilmiştir:
 - Standart A: 0 ng/ml
 - Standart B: 1.5 ng/ml
 - Standart C: 6.25 ng/ml
 - Standart D: 12.5 ng/ml
 - Standart E: 25 ng/ml
 - Standart F: 40 ng/ml
3. Serum örnekleri serum sulandırma tamponu ile 1:150 oranında sulandırılmıştır. Hafifçe karıştırılmıştır.
4. Liyofilize haldeki kontrol 1 ve kontrol 2 etiketli serumlar 250 µl serum sulandırma tamponu ile sulandırılarak hazırlanmıştır. 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra köpürtmeden vorteksle karıştırılmıştır. Serum sulandırma tamponu ile 1:150 oranında sulandırılmıştır.
5. ALS antikor antikor sulandırma tamponu ile 1:50 oranında sulandırılmıştır.
6. 50 µl antikor deney planına göre 96 kuyucuklu mikropolanın ilgili kuyucuklarına koyulmuştur.

7. Mikroplakanın A sırasına sırasıyla 50 µl standartlar, kontrol 1 ve kontrol 2 serumları eklenmiştir.
8. Analiz edilecek olan serum örneklerinden 50 µl alınarak ilgili kuyucuklara koyulmuştur.
9. Mikroplakanın üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 350 rpm çalkalayıcıda 2 saat inkübe edilmiştir.
10. 350 µl yıkama tamponuyla 5 kez yıkama yapılmıştır.
11. İnkübasyon süresi dolduğunda mikroplaka ters çevrilerek yıkama tamponu dökülmüştür. *Whatman* kağıdına birkaç kez sertçe vurularak sıvı kalmadığından emin olunmuştur.
12. 100 µl enzim konjugatı eklenmiştir.
13. Oda sıcaklığında 350 rpm çalkalayıcıda 30 dk inkübe edilmiştir.
14. 350 µl yıkama tamponuyla 5 kez yıkama yapılmıştır.
15. 100 µl substrat solüsyonu eklenmiştir.
16. Oda sıcaklığında, karanlık ortamda 30 dk inkübe edilmiştir.
17. 100 µl durdurma solüsyonu eklenmiştir.
18. 30 dk içinde 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda absorbans okunarak konsantrasyon belirlenmiştir.

Testler arası (inter-assay) varyasyonu önlemek amacıyla örnekler aynı çalışmada analiz edilmiştir. Testlerin güvenilir olması için kontrol serum, standart ve kalibratör değerlerin beklenen aralıkta sonuç vermesi ve kabul edilebilir bir standart eğri çizmesi gerekmektedir. Analizler sonucu elde edilen *coefficient variation* (167) değerinin kitlerin kabul edilen sınırları içerisinde olması beklenmektedir.

IGF1 ve IGFBP3 düzeylerinin yaş ve cinsiyete göre değişik dağılım gösterdiği, bilinmektedir. Bu nedenle nomogramlar kullanılarak IGF1 ve IGFBP3 sonuçları yaş ve cinsiyete göre normalize edilmiş, standart sapma değerleri hesaplanmış ve istatistiksel analizler bu değerler üzerinden yapılmıştır. Standart sapma değerlerinin

-2'nin altında olması konsantrasyonun ciddi derecede düşük olduğunu göstermektedir. IGFBP5 ve ALS düzeyleri bireyler arasında normal dağılım gösterdiği için bu hesaplamalara gerek duyulmamıştır.

3.3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Serumda yapılan analiz sonuçları *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, v10) programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Spearman, Ki-kare ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak veriler analiz edilmiş ve $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.3.4. SMA Hastalarının İskelet Kas Hücrelerinde Lokal Olarak Sentezlenen IGF1, IGF2, IGFBP5 ve IGF1R Protein Düzeylerinin Araştırılması

Lokal olarak sentezlenen IGF1, IGF2, IGF1R ve IGFBP5 proteinleri sıvı nitrojende dondurulmuş ve -80°C 'de saklanan arşivlenmiş *vastus lateralis* kas biyopsilerinden alınan 7 μm kalınlığındaki kesitlerde IF boyama tekniği ile analiz edilmiştir. Boyamalar kesitler alındıktan sonra aynı gün içinde bekletilmeden gerçekleştirilmiş ve kullanılan antikora bağlı olarak değişen bloklama, primer ve sekonder antikor uygulamaları aşağıda belirtilmiştir.

1. Fiksasyon basamağı:

- Oda sıcaklığında 30 dk bekletilen kesitlerin etrafı hidrofobik bariyer oluşturmak için kalemle (*Pap pen*) çizilmiştir. Oda sıcaklığına getirilmiş olan % 4 paraformaldehit (pH: 7.2) dokunun üzerini kaplayacak şekilde uygulanmıştır.
- 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 2 kez 10 dk 1X PBS tamponu (pH: 7.3) ile yıkama yapılmıştır.

2. Permeabilizasyon basamağı:

- Dokunun üzerini kaplayacak şekilde % 0.2 Triton X 100 içeren 1X PBS tamponu eklenmiştir.

- 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 3 kez 5 dk 1X PBS tamponu ile yıkama yapılmıştır.

3. Bloklama basamağı:

- **IGF1, IGF2 ve IGFBP5 analizleri için;** % 0.1 Tween 20 içeren 1X PBS tamponu ve % 10 hacim oranında BSA (0.1 gr/ml) karıştırılarak hazırlanan bloklama solüsyonu dokunun üzerine uygulanmıştır.

- **IGF1R analizi için;** % 0.1 Tween 20 içeren 1X PBS tamponu, % 10 hacim oranında BSA (0.1 gr/ml) ve % 10 hacim oranında keçi serumu karıştırılarak hazırlanan bloklama solüsyonu dokunun üzerine uygulanmıştır.

- 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Lam bir peçetenin üzerine dik tutulup nazikçe bir kaç kez vurularak bloklama solüsyonu uzaklaştırılmıştır.

4. Primer antikor uygulaması:

- **IGF1 analizleri için;** % 0.1 Tween 20 içeren 1X PBS tamponu içerisine % 10 hacim oranında BSA (0.1 gr/ml) ve 7 µg/ml konsantrasyonda primer antikor (keçi) eklenmiştir.

- **IGF2 analizleri için;** % 0.1 Tween 20 içeren 1X PBS tamponu içerisine % 10 hacim oranında BSA (0.1 gr/ml) ve 5 µg/ml konsantrasyonda primer antikor (keçi) eklenmiştir.

- **IGFBP5 analizleri için;** % 0.1 Tween 20 içeren 1X PBS tamponu içerisine % 10 hacim oranında keçi serumu ve 16 µg/ml konsantrasyonda primer antikor (fare) ekle eklenmiştir.

- **IGF1R analizleri için;** % 0.1 Tween 20 içeren 1X PBS tamponu içerisine % 10 hacim oranında keçi serumu ve 1/50 dilüsyon oranında primer antikor (tavşan) eklenmiştir.

- Negatif kontrol olarak değerlendirilecek olan dokunun üzerine primer antikor yerine 1X PBS tamponu eklenmiştir.

- +4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir (16.5 saat).

- 3 kez 10 dk 1X PBS tamponu ile, düşük hızda çalkalayıcı kullanılarak yıkama yapılmıştır.

5. Sekonder antikor uygulaması:

- **IGF1 ve IGF2 analizi için;** % 0.1 Tween 20 içeren 1X PBS tamponu içerisine % 10 hacim oranında BSA (0.1 gr/ml) ve 1/1000 dilüsyon oranında tavşan-anti-keçi AF488 sekonder antikor eklenmiştir.

- **IGFBP5 analizi için;** % 0.1 Tween 20 içeren 1X PBS tamponu içerisine % 10 hacim oranında BSA (0.1gr/ml) ve 1/1000 dilüsyon oranında keçi-anti-fare AF488 sekonder antikor eklenmiştir.

- **IGF1R analizi için;** % 0.1 Tween 20 içeren 1X PBS tamponu içerisine % 10 hacim oranında goat serumu ve 1/1000 dilüsyon oranında keçi-anti-tavşan AF488 sekonder antikor eklenmiştir.

- 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 3 kez 5 dk 1X PBS tamponu ile yıkama yapılmıştır.

6. DAPI uygulaması:

- 5 mg/ml konsantrasyonundaki DAPI ara stoğundan 1 µl alınmış ve 2000 µl dH₂O içerisinde dilüsyon yapılmıştır (1/2000).
- 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 1 kez 5 dk dH₂O ile yıkama yapılmıştır.

7. Kesitlerin üzerinin kapatılması:

- Kesitler tamamen kuruduktan sonra üzerine oda sıcaklığına gelmiş olan kapatma solüsyonu eklenmiştir.
- Lamel 45° açıyla tutularak, hava kabarcığı oluşturmadan lamın üzerine kapatılmıştır.
- Hava almaması için lamelin etrafı şeffaf oje ile kapatılmıştır.
- 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra kesitler ışık almayacak şekilde +4°C'de saklanmıştır.

IGF1 ve IGF1R Antikorlarıyla Eş IF Boyama Protokolü

1. Fiksasyon basamağı:

• Oda sıcaklığında 30 dk bekletilen kesitlerin etrafı hidrofobik bariyer oluşturmak için kalemlerle (*Pap pen*) çizilmiştir. Oda sıcaklığına getirilmiş olan % 4 paraformaldehit (pH: 7.2) dokunun üzerini kaplayacak şekilde uygulanmıştır.

- 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 2 kez 10 dk 1X PBS tamponu (pH: 7.3) ile yıkama yapılmıştır.

2. Permeabilizasyon basamağı:

• Dokunun üzerini kaplayacak şekilde % 0.2 Triton X 100 içeren 1X PBS tamponu solüsyonu eklenmiştir.

- 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 3 kez 5 dk 1X PBS tamponu ile yıkama yapılmıştır.

3. Bloklama basamağı:

• % 0.1 Tween 20 içeren 1X PBS tamponu % 10 hacim oranında BSA (0.1 gr/ml) karıştırılarak hazırlanan bloklama solüsyonu dokunun üzerine uygulanmıştır.

- 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Lam bir peçetenin üzerine dik tutulup nazikçe bir kaç kez vurularak bloklama solüsyonu uzaklaştırılmıştır.

4. IGF1 ve IGF1R primer antikor uygulaması:

• % 0.1 Tween 20 içeren 1X PBS tamponu içerisine % 10 hacim oranında BSA (0.1 gr/ml), 7µg/ml konsantrasyonda IGF1 primer antikor (keçi) ve 1:50 oranında IGF-1R primer antikor (tavşan) eklenmiştir.

- Negatif kontrol olarak değerlendirilecek olan dokunun üzerine primer antikor yerine 1X PBS tamponu eklenmiştir.
- +4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir (16.5 saat).

- 3 kez 10 dk 1X PBS tamponu ile, düşük hızda çalkalayıcı kullanılarak yıkama yapılmıştır.

5. IGF1 ve IGF1R sekonder antikor uygulaması:

- **IGF1 analizi için;** % 0.1 Tween 20 içeren 1X PBS tamponu içerisine % 10 hacim oranında BSA (0.1 gr/ml) ve 1/1000 dilüsyon oranında tavşan-anti-keçi (AF 488) sekonder antikor eklenmiştir.

- 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

- 3 kez 5 dk 1X PBS tamponu ile yıkama yapılmıştır.

- **IGF1R analizi için;** % 0.1 Tween 20 içeren 1X PBS tamponu içerisine % 10 hacim oranında keçi serumu ve 1/1000 dilüsyon oranında keçi-anti-tavşan (AF 568) sekonder antikor eklenmiştir.

- 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

- 3 kez 5 dk 1X PBS tamponu ile yıkama yapılmıştır.

6. DAPI uygulaması:

- 5 mg/ml konsantrasyonundaki DAPI stoğundan 1 µl alınmış ve 2000 µl dH₂O içerisinde dilüsyon yapılmıştır (1/2000).

- 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

- 1 kez 5 dk dH₂O ile yıkama yapılmıştır.

7. Kesitlerin üzerinin kapatılması:

- Kesitler tamamen kuruduktan sonra üzerine oda sıcaklığına gelmiş olan kapatma solüsyonu eklenmiştir.

- Lamel 45° açıyla tutularak, hava kabarcığı oluşturmadan lamın üzerine kapatılmıştır.

- Hava almaması için lamelin etrafı şeffaf oje ile kapatılmıştır.

- 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra kesitler ışık almayacak şekilde +4°C'de saklanmıştır.

3.3.5. IF Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi

IF boyama yapılan kesitler boyama yapıldıktan bir gün sonra *upright* floresan mikroskobu (Zeiss Axioplan 2 ve Nikon Eclipse E400) ile görüntülenmiştir. Boyama sonuçları proteinin dokudaki yerleşimi, yaygınlığı ve boyanma yoğunluğu açısından değerlendirilmiş, SMA hastaları, sağlıklı bireyler ve farklı nöromusküler hastalığa sahip bireylere ait kas dokuları arasında karşılaştırılmıştır. Ayrıca her bireye ait kas kesitleri kendi içerisinde de değerlendirilerek yorumlanmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Serumda Bulunan IGF1, IGFBP3, IGFBP5 ve ALS Protein Düzey Analizleri

15 SMA hastası ve 18 kontrol bireyin serumlarında bulunan IGF1, IGFBP3, IGFBP5 ve ALS proteinlerinin düzeyi araştırılmış, sonuçlar hastalara ait klinik bilgilerle ve antropometrik verilerin değerlendirme sonuçlarıyla birlikte Tablo 4.1’de verilmiştir.



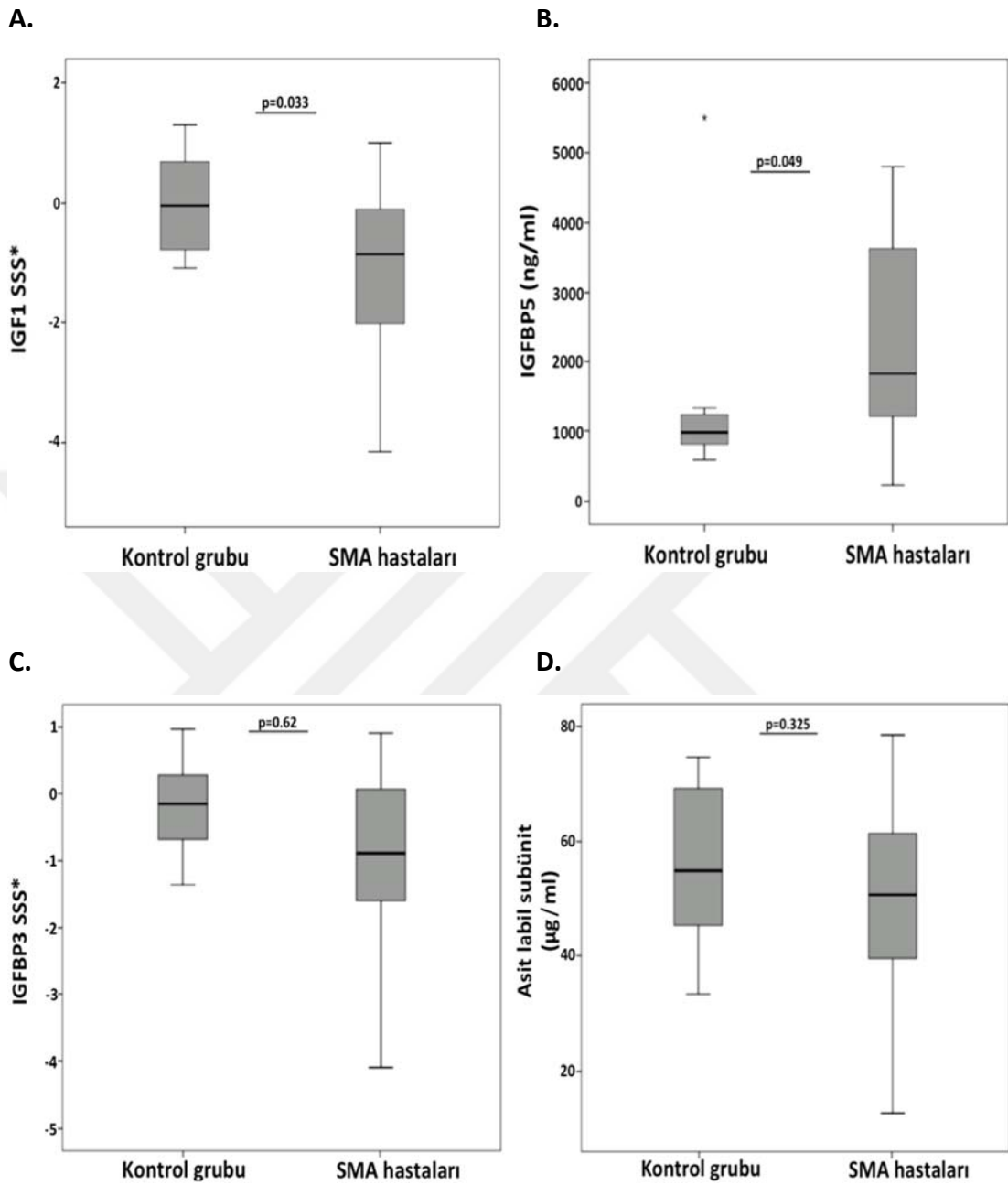
Tablo 4.1. SMA hastaları ve kontrol grubuna ait klinik, antropometrik veriler ve serum analiz sonuçları.

| No | Cinsiyet | Yaş (ay) | Boy SSS | İdeal ağırlık % | Malnütrisyon düzeyi | SMA Tipi | SMN2 kopya sayısı | | IGF1 (ng/ml) | IGF1 SSS | IGFBP3 (ng/ml) | IGFBP3 SSS | IGFBP5 (ng/ml) | Asit-labil subünit (µg/ml) |
|----------------|----------|----------|---------|-----------------|---------------------|----------|-------------------|---------|--------------|----------|----------------|------------|----------------|----------------------------|
| | | | | | | | Ekzon 7 | Ekzon 8 | | | | | | |
| HASTA | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | Kız | 11 | -1,56 | 117 | - | I | 2 | 2 | 45,48 | -0,2 | 3228,2 | 0,91 | 1520 | 78,21 |
| 2 | Erkek | 72 | -1,87 | 144 | - | I | 2 | 2 | 86,36 | -0,97 | 2362,1 | -0,97 | 2680 | 55,45 |
| 3 | Kız | 10 | 0,71 | 74 | orta | I | 2 | 2 | 30,05 | -1 | 2480,5 | 0,14 | 4640 | 50,77 |
| 4 | Erkek | 1 | -1,25 | 70 | orta | I | SA | SA | 39,38 | -0,7 | 1368,5 | -1,96 | 900 | 38,17 |
| 5 | Kız | 3 | -0,93 | 70 | orta | I | 2 | 2 | 8,29 | -3,13 | 1614,1 | -1,21 | 3860 | 29,92 |
| 6 | Kız | 12 | -0,1 | 83 | hafif | I | 2 | 2 | 33,79 | -0,72 | 1605,8 | -1,32 | 4800 | 40,87 |
| 7 | Erkek | 7 | -3,5 | 102 | - | I | 2 | 2 | 13,9 | -2,5 | 883,6 | -4 | 1826 | 12,76 |
| 8 | Kız | 6 | -1,07 | 75 | hafif | I | 2 | 2 | 66,2 | 0,53 | 2581 | 0,32 | 232 | 50,91 |
| 9 | Erkek | 5 | -0,51 | 82 | hafif | I | 2 | 2 | 6,17 | -4,14 | 872,94 | -4,09 | 566 | 13,28 |
| 10 | Erkek | 60 | -1,75 | 103 | - | II | 4 | 4 | 26,94 | -2,46 | 2464,2 | -0,36 | 1520 | 43,89 |
| 11 | Kız | 66 | -0,91 | 88 | hafif | II | 2 | 2 | 121,44 | 0 | 3026,8 | 0 | 3400 | 78,51 |
| 12 | Erkek | 65 | -1,51 | 80 | hafif | II | 2 | 3 | 49 | -1,57 | 1793,4 | -1,62 | Yapılamadı | 41,56 |
| 13 | Erkek | 89 | -5,5 | 86 | hafif | II | 2 | 2 | 131,9 | 0,36 | 2709,9 | -0,42 | Yapılamadı | 67,39 |
| 14 | Erkek | 57 | -3,7 | 118 | - | II | 3 | 3 | 105,76 | 1 | 3082,9 | 0,64 | Yapılamadı | 68,25 |
| 15 | Erkek | 81 | -2,7 | 200 | - | II | 2 | 3 | 85,5 | -0,85 | 1981 | -1,57 | Yapılamadı | 52,05 |
| KONTROL | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | Erkek | 60 | 0,36 | 121 | - | | | | 98,91 | -0,08 | 3464,1 | 0,98 | 5500 | 74,34 |
| 2 | Kız | 68 | 1,28 | 104 | - | | | | 67,44 | -1,07 | 3311,2 | 0,31 | 1233,82 | 69,22 |
| 3 | Kız | 63 | 1,34 | 120 | - | | | | 173,97 | 0,69 | 3067,8 | 0,19 | 1330,93 | 74,67 |
| 4 | Kız | 3 | 0 | 100 | - | | | | 30,05 | -0,91 | 1935,7 | -0,64 | 682,29 | 38,28 |
| 5 | Erkek | 66 | 0,3 | 105 | - | | | | 162,51 | 0,83 | 2691,8 | -0,09 | 1210,99 | 67,94 |
| 6 | Kız | 67 | 1,4 | 110 | - | | | | 220,59 | 0,94 | 2683,3 | -0,21 | 1287,22 | 72,21 |
| 7 | Erkek | 57 | 0,36 | 105 | - | | | | 56,77 | -1,08 | 2004,2 | -1,17 | 810,01 | 45,44 |
| 8 | Kız | 12 | -0,45 | 89 | hafif | | | | 75,21 | 0,69 | 3317,1 | 1 | 1108,49 | 62,19 |
| 9 | Erkek | 7 | 1,84 | 84 | hafif | | | | 35,52 | -1 | 2433 | 0,31 | 847,39 | 48,54 |
| 10 | Erkek | 18 | 0,96 | 114 | - | | | | 64,52 | 0,08 | 1930,9 | -0,7 | 820,33 | 46,02 |
| 11 | Erkek | 21 | -0,2 | 98 | - | | | | 112,89 | 1,3 | 2211,6 | -0,02 | 919,04 | 51,56 |
| 12 | Erkek | 5 | 0,34 | 109 | - | | | | 47,09 | -0,36 | 1754,1 | -1,11 | 634,62 | 35,6 |
| 13 | Erkek | 6 | -0,5 | 151 | - | | | | 58,14 | 0 | 2875,8 | 0,93 | 1040,21 | 58,36 |
| 14 | Kız | 12 | -2 | 106 | - | | | | 32,71 | -0,77 | 1916,6 | -0,65 | 594,51 | 33,35 |
| 15 | Erkek | 17 | 1,3 | 110 | - | | | | 48,65 | -0,37 | 2167,3 | -0,15 | 909,74 | 51,04 |
| 16 | Kız | 13 | 0,67 | 94 | - | | | | 37,15 | -0,55 | 1660,6 | -1,33 | 701,81 | 39,37 |
| 17 | Erkek | 77 | -0,3 | 94 | - | | | | 122,92 | 0,5 | 2529,2 | -0,58 | 1090,57 | 61,18 |
| 18 | Kız | 9 | 2,7 | 87 | hafif | | | | 104,6 | 1,23 | 3293,3 | 1 | 1281,51 | 71,89 |

SSS: Standart sapma skoru, SA: Sonuç alınamayan örnek.

Analizler sonucunda IGF1 standart sapma skorunun hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük (medyan -0,85 ve -0,4; $p= 0,033$), IGFBP5 düzeyinin ise anlamlı derecede yüksek (medyan 1826 ve 979,6; $p= 0,049$) olduğu belirlenmiştir. Özellikle 5, 7, 9 ve 10 numaralı 4 hastada IGF1 standart sapma skorunun -2'den daha düşük değerlerde olması önemli bulunmuştur (Şekil 4.1. A ve C). IGFBP3 standart sapma skoru ve ALS düzeyinin ise hastalarda kontrole göre daha düşük olduğu (IGFBP3 medyan -0,97 ve -0,12; IGFBP5 medyan 50,77 ng/ml ve 54,96 ng/ml) belirlenmiş, ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.1. C, D).

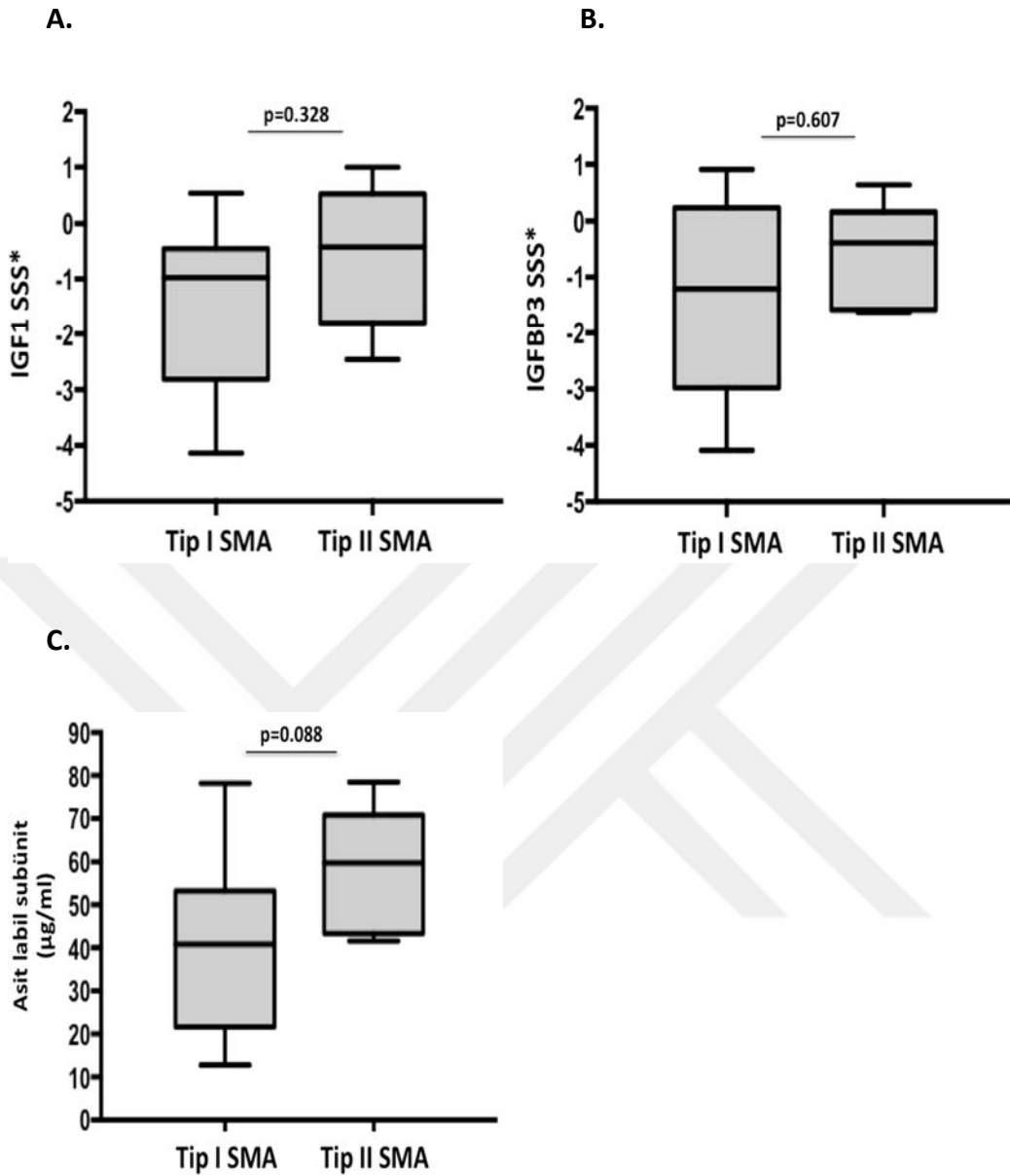




Şekil. 4.1. SMA hastaları ve kontrol grubunda IGF ailesi üyelerinin serum analizi. **A.** IGF1 **B.** IGFBP5 **C.** IGFBP3 **D.** ALS. Mann-Whitney U, $p \leq 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. *aykırı değeri, SSS* standart sapma skorunu göstermektedir.

SMA hastalığının ciddiyetiyle IGF sistemi elemanlarının düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması amacıyla analiz sonuçları tip I ve tip II SMA hastaları arasında karşılaştırılmıştır (Şekil 4.2). Tip I SMA hastalarının serum IGF1, IGFBP3 ve ALS düzeylerinin tip II hastalara göre daha düşük olduğu belirlenebilmiş olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca, tip I hastalara ait değerlerdeki varyasyonun tip II hastalara göre daha yüksek olduğu, IGF1 düzeyi düşük olan hastaların IGFBP3 ve/veya ALS düzeylerinin de düşük olduğu dikkat çekmiştir. Dört tip II SMA hastasının çalışmaya geç dahil olması nedeniyle IGFBP5 düzeyi yalnızca 2 tip II SMA hastasında (# 10 and 11) belirlenebilmiş, bu nedenle IGFBP5 düzeyini tipler arasında karşılaştırmak mümkün olmamıştır.

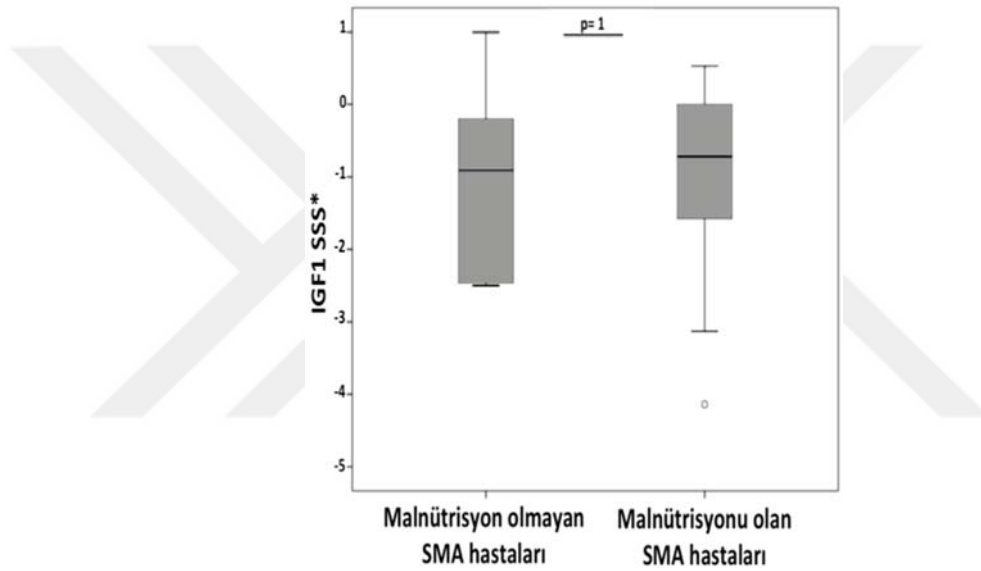




Şekil 4.2. Serum IGF1, IGFBP3 ve ALS düzeylerinin tip I ve tip II SMA hastaları arasında karşılaştırılması. **A.** IGF1 **B.** IGFBP3 **C.** ALS. Mann-Whitney U, $p \leq 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. SSS*: Standart sapma skoru.

SMA hastalarında görülen serum IGF1 düzeyi düşüklüğünün büyüme geriliği veya malnütrisyonla ilgili olabileceği düşünülerek çalışma grubunda yer alan çocuklar bu açıdan değerlendirilmiştir. Boy standart sapma skorları hesaplandığında kontrol bireylerde boy kısalığına rastlanmazken, hastalarda yaygın olduğu (% 47) görülmüştür. Beklendiği şekilde malnütrisyon oranı SMA hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek (sırasıyla % 60 ve % 17, ki-

kare, $p= 0,010$) bulunmuştur. Ayrıca malnütrisyon hesaplamalarında kullanılan ideal ağırlık yüzdelerinin hastalarda kontrole göre anlamlı derecede düşük ($p= 0,031$) olduğu belirlenmiş, 9 SMA hastasının altısında hafif, üçünde orta şiddette malnütrisyon görülürken, 3 kontrol bireyde yalnızca hafif malnütrisyon olduğu saptanmıştır. Bu değerlendirmeler sonucunda istatistiksel analizler hastalarda IGF1 düşüklüğünün malnütrisyon ya da büyüme geriliğiyle ilişkili olmadığını göstermiştir (Şekil 4.3).

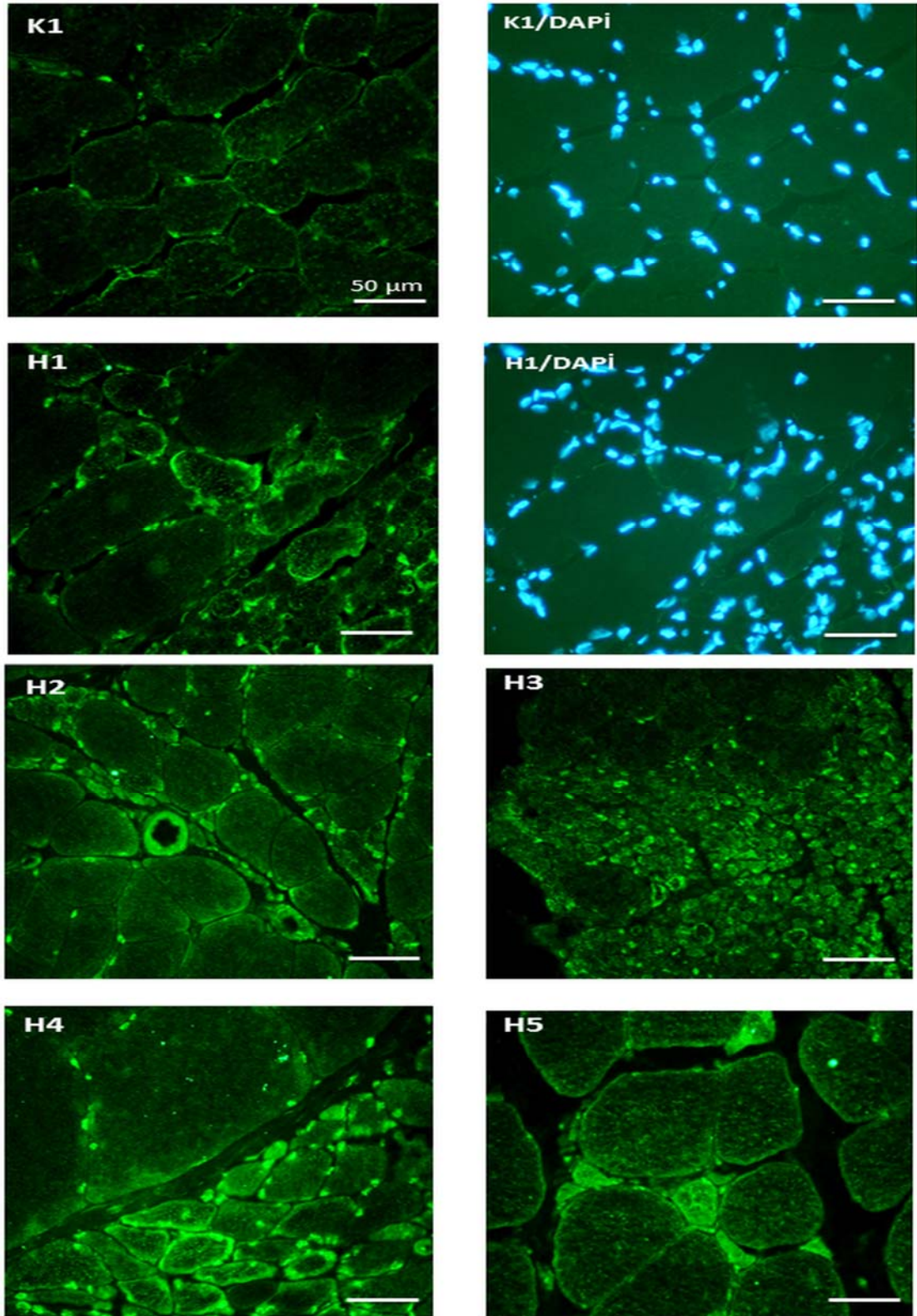


Şekil 4.3. IGF1 düzeyinin malnütrisyonla karşılaştırılması (Mann-Whitney U, $p \leq 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir). ° işareti aykırı değeri, SSS* standart sapma skorunu göstermektedir.

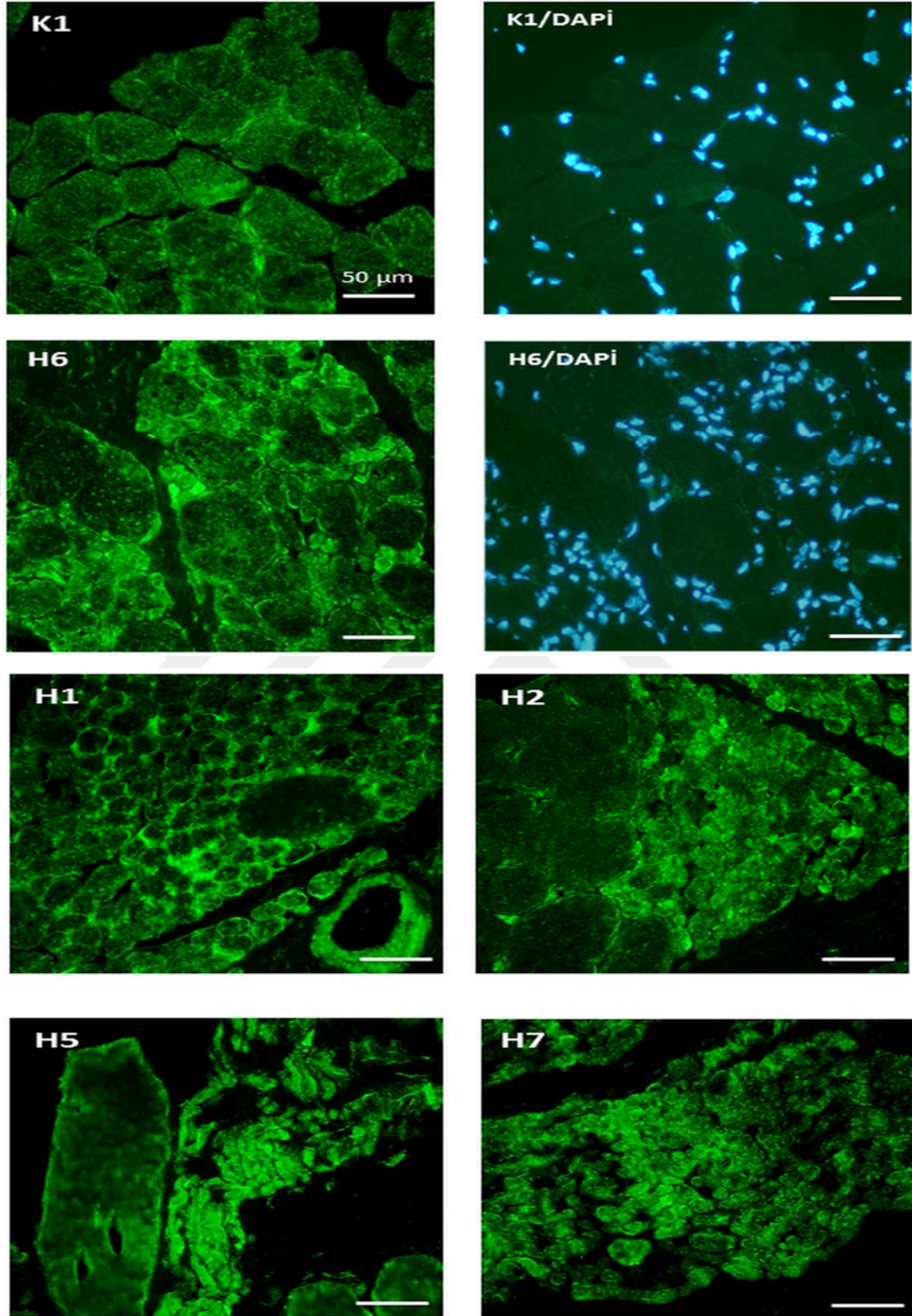
4.2. İskelet Kas Hücrelerinde Lokal Olarak Sentezlenen IGF1, IGF2, IGFBP5 ve IGF1R Protein Analizleri

SMA hastaları ve kas biyopsisinde patolojik bulgu saptanmayan sağlıklı bireylere ait arşivlenmiş iskelet kas biyopsilerinde IGF1, IGF2, IGFBP5 ve IGF1R proteinlerinin IF boyama sonuçlarınının 40X objektifle çekilen mikroskopik görüntüleri şekil 4.4-4.7 arasında verilmiştir.

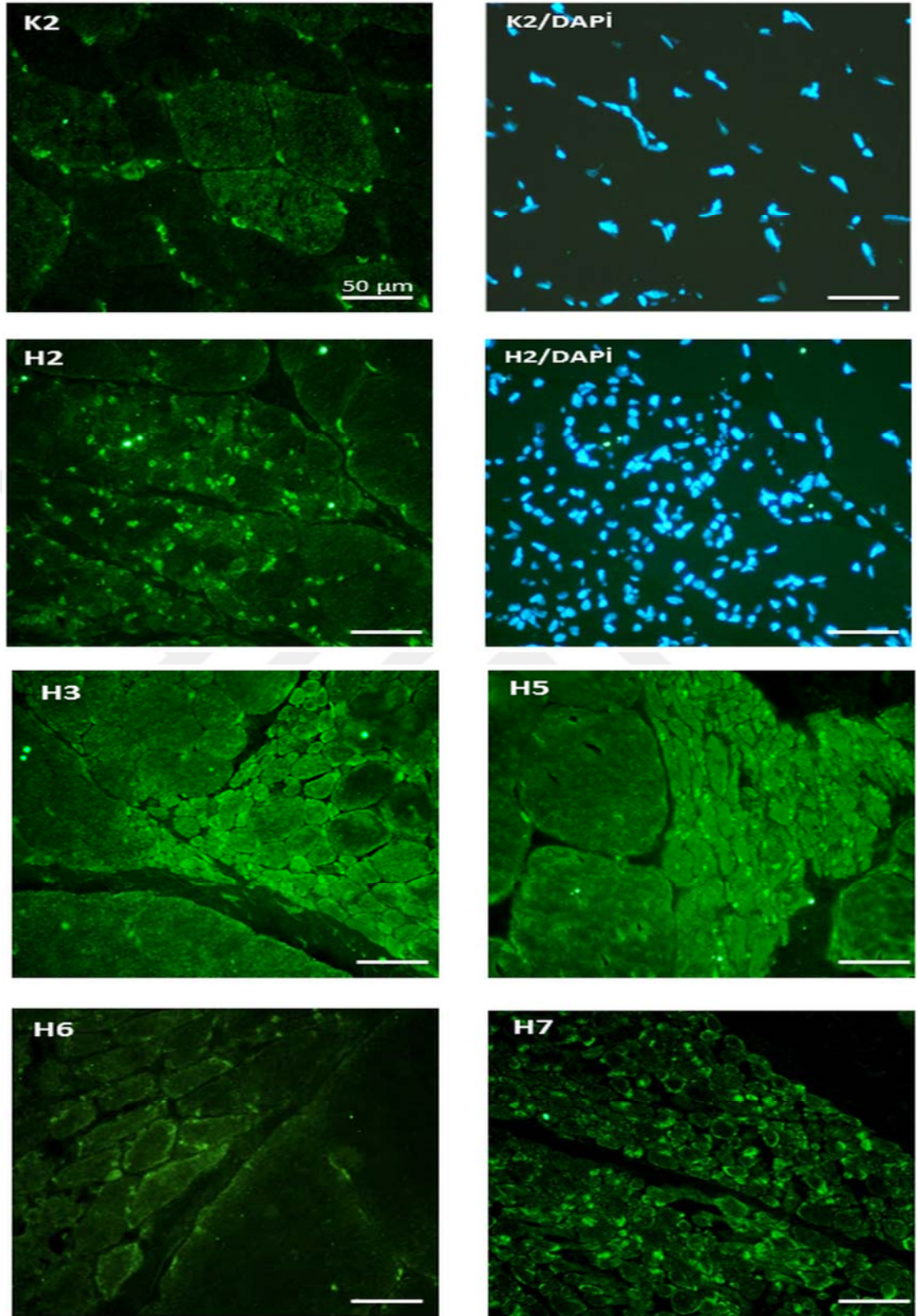
Araştırılan kas kesitlerinin arşiv materyali olması nedeniyle bütünlüğün iyi korunduğu, atrofik/hipertrofik liflerin bir arada olduğu ve aralarındaki boyanma farkının gösterilebildiği örnek fotoğraflar seçilmiştir. Bu nedenle aşağıda verilmiş olan şekillerde farklı SMA hastalarına ait örnek görüntüler bulunmaktadır.



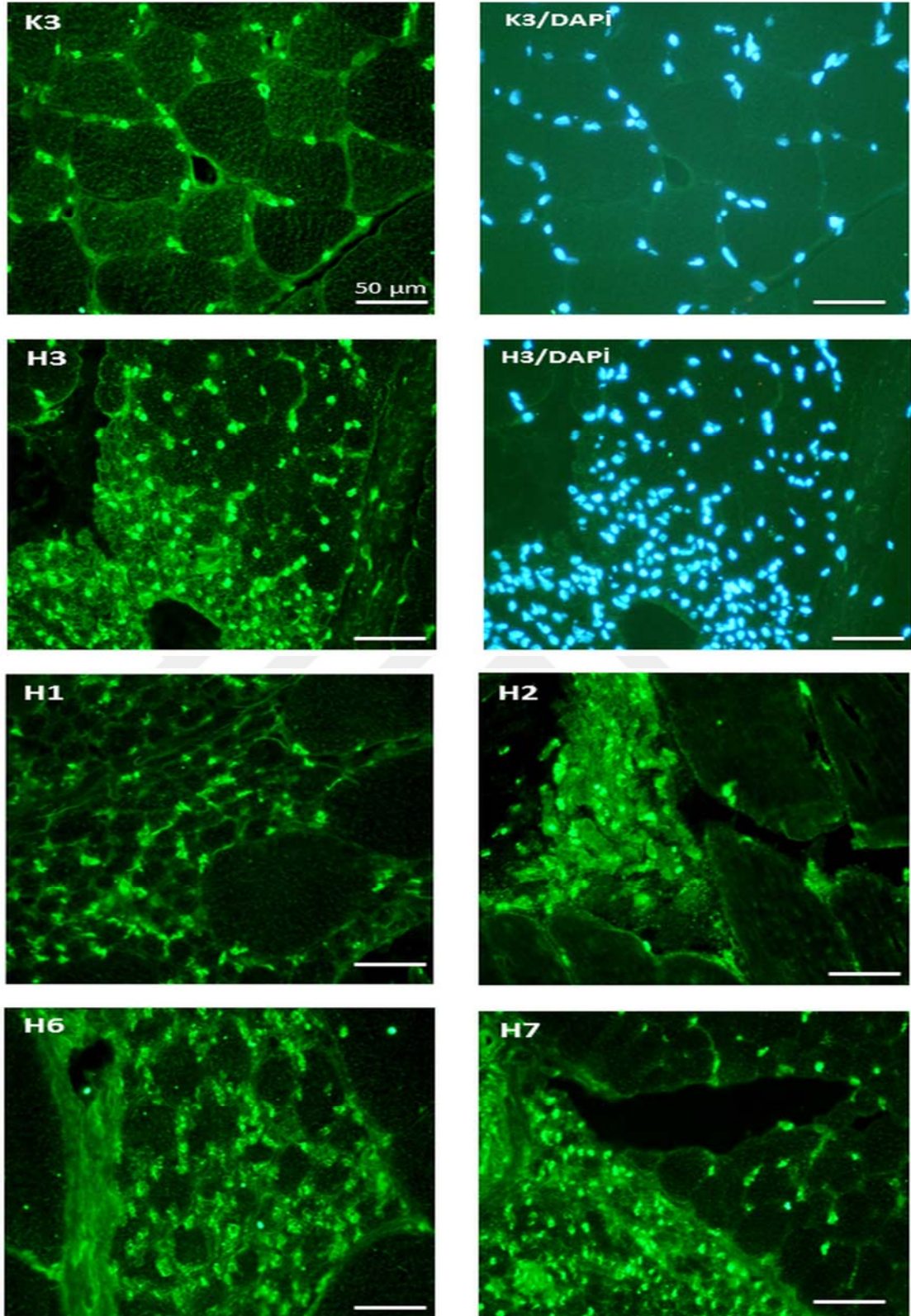
Şekil 4.4. Sağlıklı birey (K1) ve SMA hastalarına (H1-H5) ait kas biyopsi kesitlerinde IGF1 IF boyama görüntüleri. Yeşil: IGF1, Mavi: DAPI, çekirdek boyaması, hasta ve kontrol bireyde örnek olarak verilmiştir.



Şekil 4.5. Sağlıklı birey (K1) ve SMA hastalarına (H1, H2, H5-H7) ait kas biyopsi kesitlerinde IGF1R IF boyama görüntüleri. Yeşil: IGF1R, Mavi: DAPI, çekirdek boyaması, hasta ve kontrol bireyde örnek olarak verilmiştir.



Şekil 4.6. Sağlıklı birey (K2) ve SMA hastalarına (H2, H3, H5-H7) ait kas biyopsi kesitlerinde IGF2 IF boyama görüntüleri. Yeşil: IGF2, Mavi: DAPI, çekirdek boyaması, hasta ve kontrol bireyde örnek olarak verilmiştir.

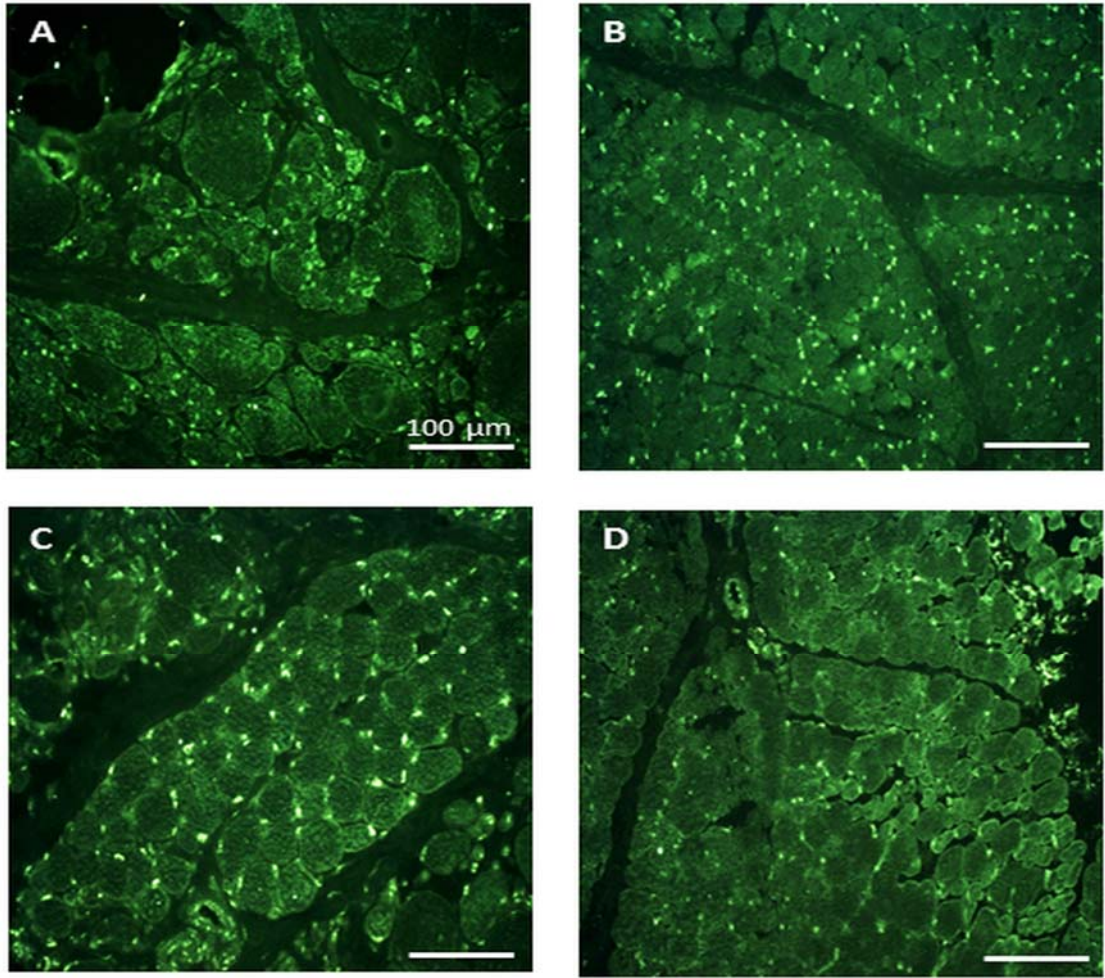


Şekil 4.7. Sağlıklı birey (K3) ve SMA hastalarına (H1-H3, H6, H7) ait kas biyopsi kesitlerinde IGFBP5 IF boyama görüntüleri. Yeşil: IGFBP5, Mavi: DAPI, çekirdek boyaması, hasta ve kontrol bireyde örnek olarak verilmiştir.

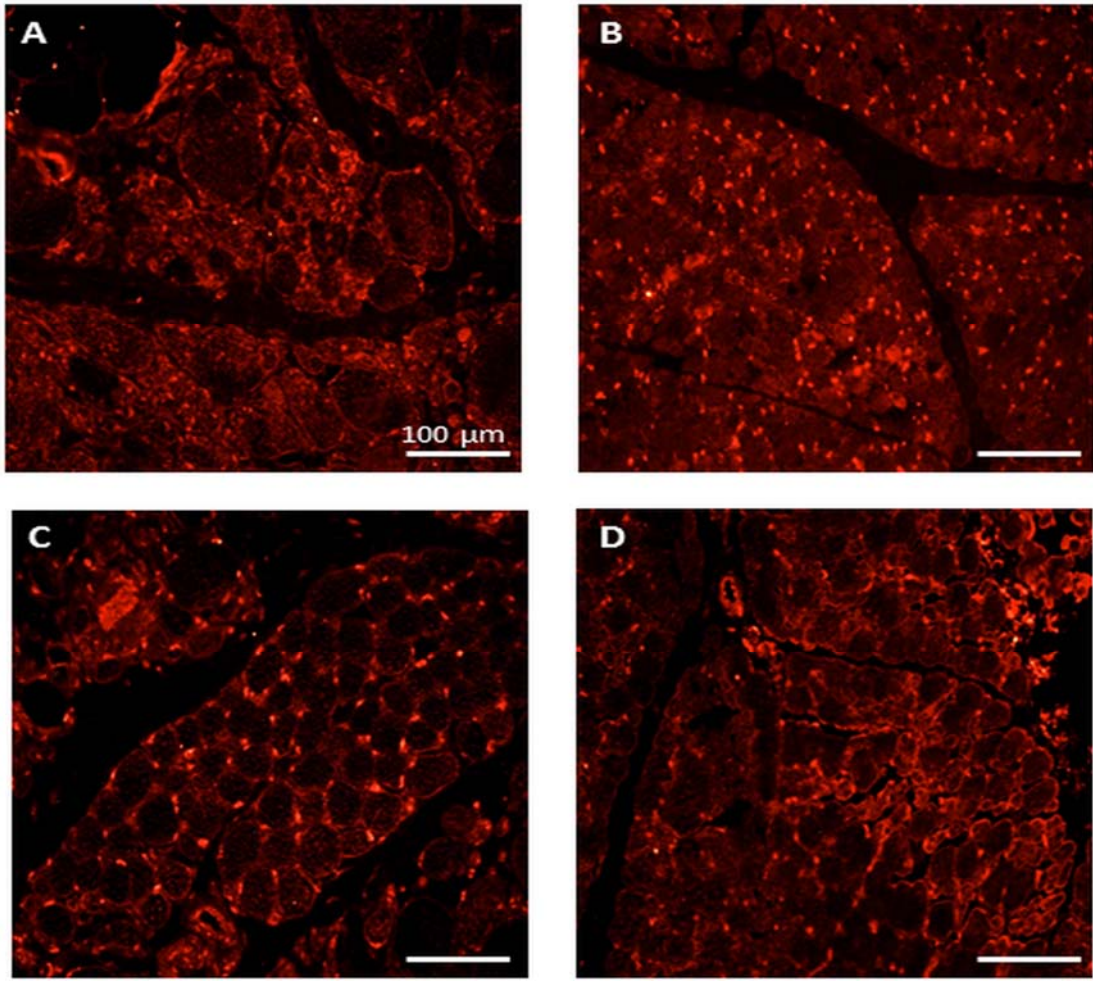
IF boyama yapılan kas kesitlerinin beklendiği gibi sağlıklı bireylerde normotrofik liflerden, SMA hastalarında ise atrofik, hipertrofik ve normotrofik liflerden oluştuğu görülmüştür. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde:

- IGF1, IGF2, IGFBP5 ve IGF1R proteinlerinin kas liflerinde sarkoplazma, sarkolemma ve çekirdek çevresinde noktasal ya da çizgisel olarak buldukları, IGFBP5'in ek olarak ECM'de yerleşim gösterdiği belirlenmiştir. SMA hastaları ve sağlıklı bireyler arasında yerleşim farkı olmadığı gösterilmiştir.
- Sağlıklı bireylere ait kas kesitlerindeki boyama yoğunluğu SMA hastalarıyla karşılaştırıldığında iki grup arasında belirgin bir fark dikkat çekmemiştir.
- Ancak, SMA hastalarına ait kas biyopsi örneklerinde atrofik liflerin hipertrofiklere oranla daha yoğun boyandığı tespit edilmiştir. Bu durumun hastalar arasında ve aynı hastaya ait kesitin farklı alanlarında değişkenlik gösterdiği dikkat çekmiştir.

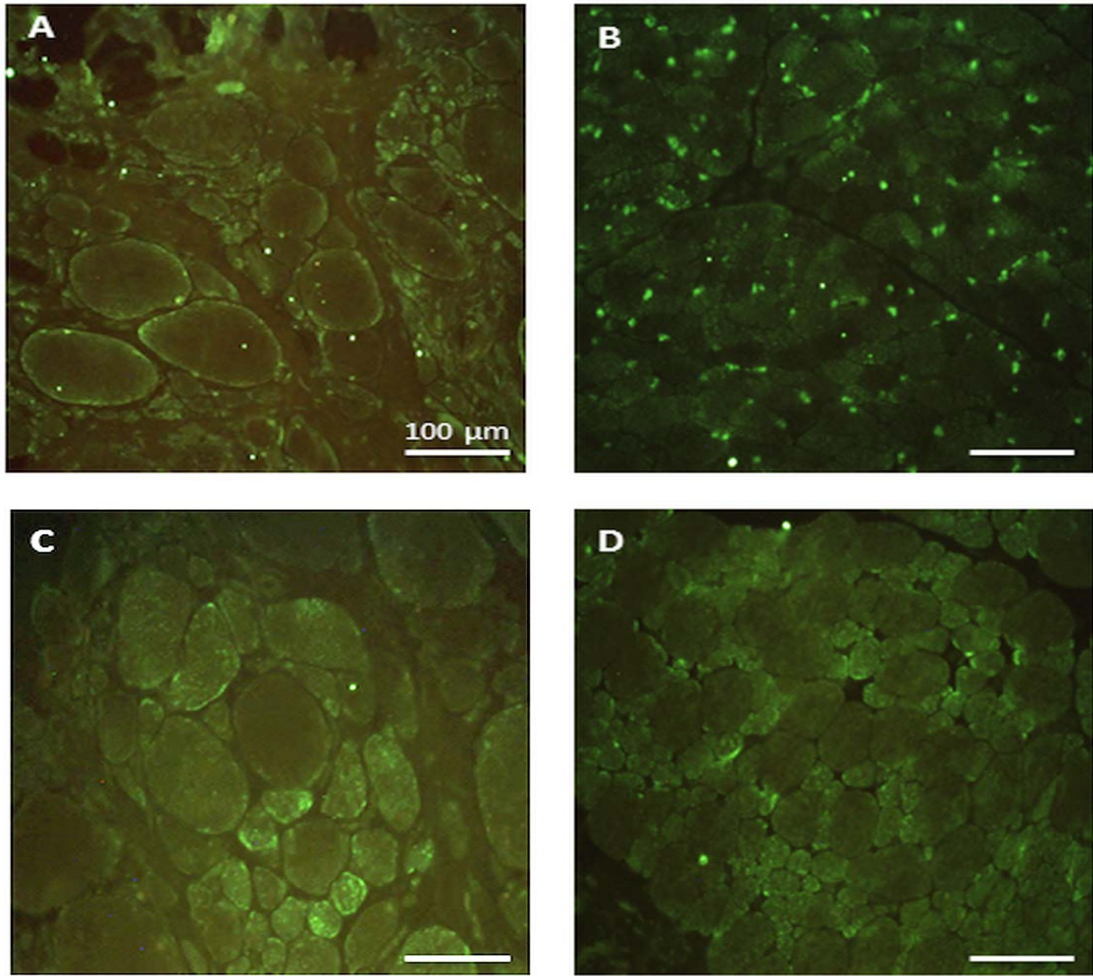
Elde ettiğimiz sonuçların SMA hastalığına özgüllüğünün araştırılması amacıyla, LGMD, DMD, tip 2 lif atrofisi görülen kas distrofisi ve CFTD hastalarına ait 6 kas biyopsi örneği hasta-kontrol grubu olarak araştırmaya dahil edilmiştir (Bkz. tablo 3.2). SMA hastalarının kas dokusunda tip 2 lif atrofisi olduğu bilinmektedir. Kas distrofisinde SMA'ya benzer olarak tip 2, konjenital lif tipi oransızlığı hastalığında ise tip 1 lif atrofisi görülür. Hasta-kontrol grubunun çalışmaya dahil edilmesiyle SMA hastalarının atrofik liflerinde görülen IF boyanma özelliğinin SMA hastalığına özgüllüğünün araştırılmasının yanı sıra, tip 2 liflere özgü bir durum olup olmadığının araştırılması mümkün olmuştur. IGF1, IGF2, IGFBP5 ve IGF1R proteinlerinin IF boyama sonuçlarınının 20X objektifle çekilen mikroskopik görüntüleri şekil 4.8-4.11'de verilmiştir.



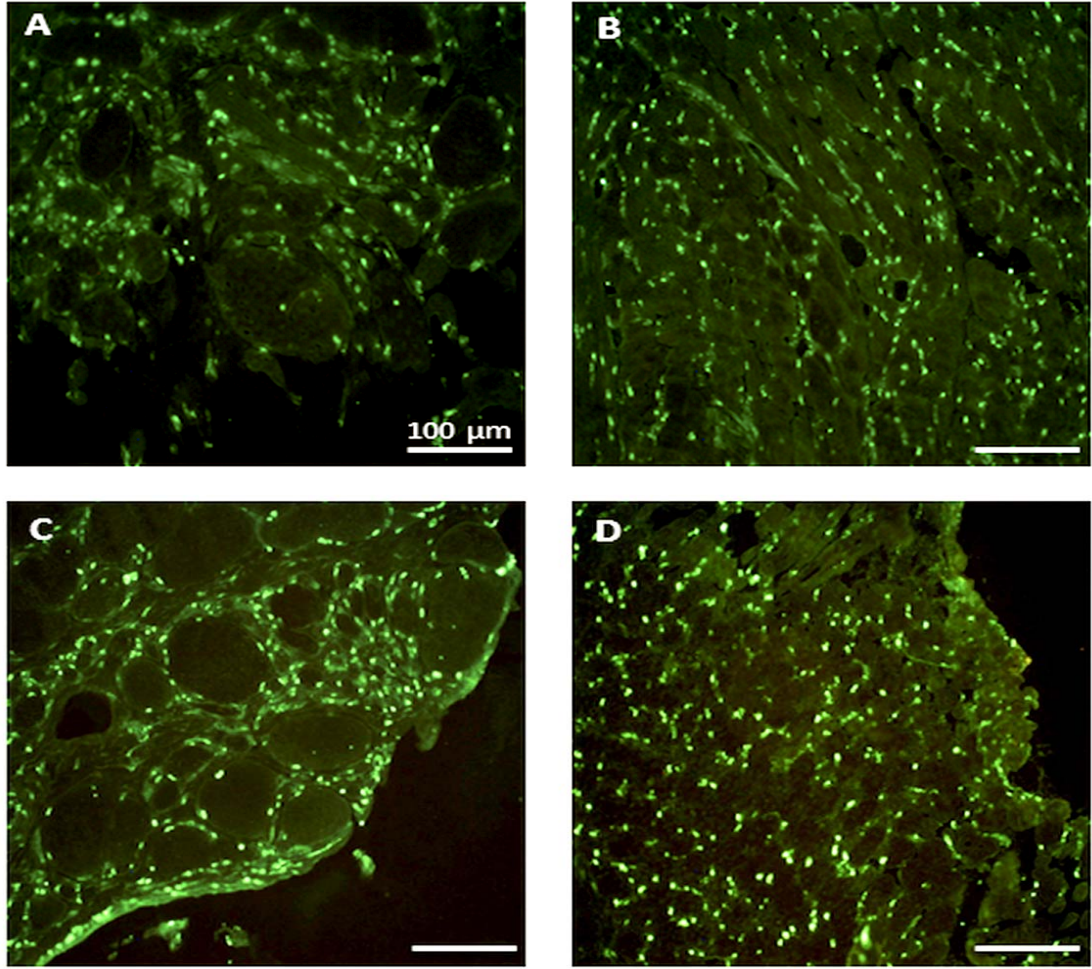
Şekil 4.8. Hasta-kontrol grubuna ait kas biyopsi kesitlerinde IGF1 IF boyama görüntüleri. **A.** LGMD **B.** DMD **C.** Tip 2 lif atrofisi görülen kas distrofisi **D.** CFTD.



Şekil 4.9. Hasta-kontrol grubuna ait kas biyopsi kesitlerinde IGF1R IF boyama görüntüleri. **A.** LGMD **B.** DMD **C.** Tip 2 lif atrofisi görülen kas distrofisi **D.** CFTD.



Şekil 4.10. Hasta-kontrol grubuna ait kas biyopsi kesitlerinde IGF2 IF boyama görüntüleri. **A.** LGMD **B.** DMD **C.** Tip 2 lif atrofisi görülen kas distrofisi **D.** CFTD.

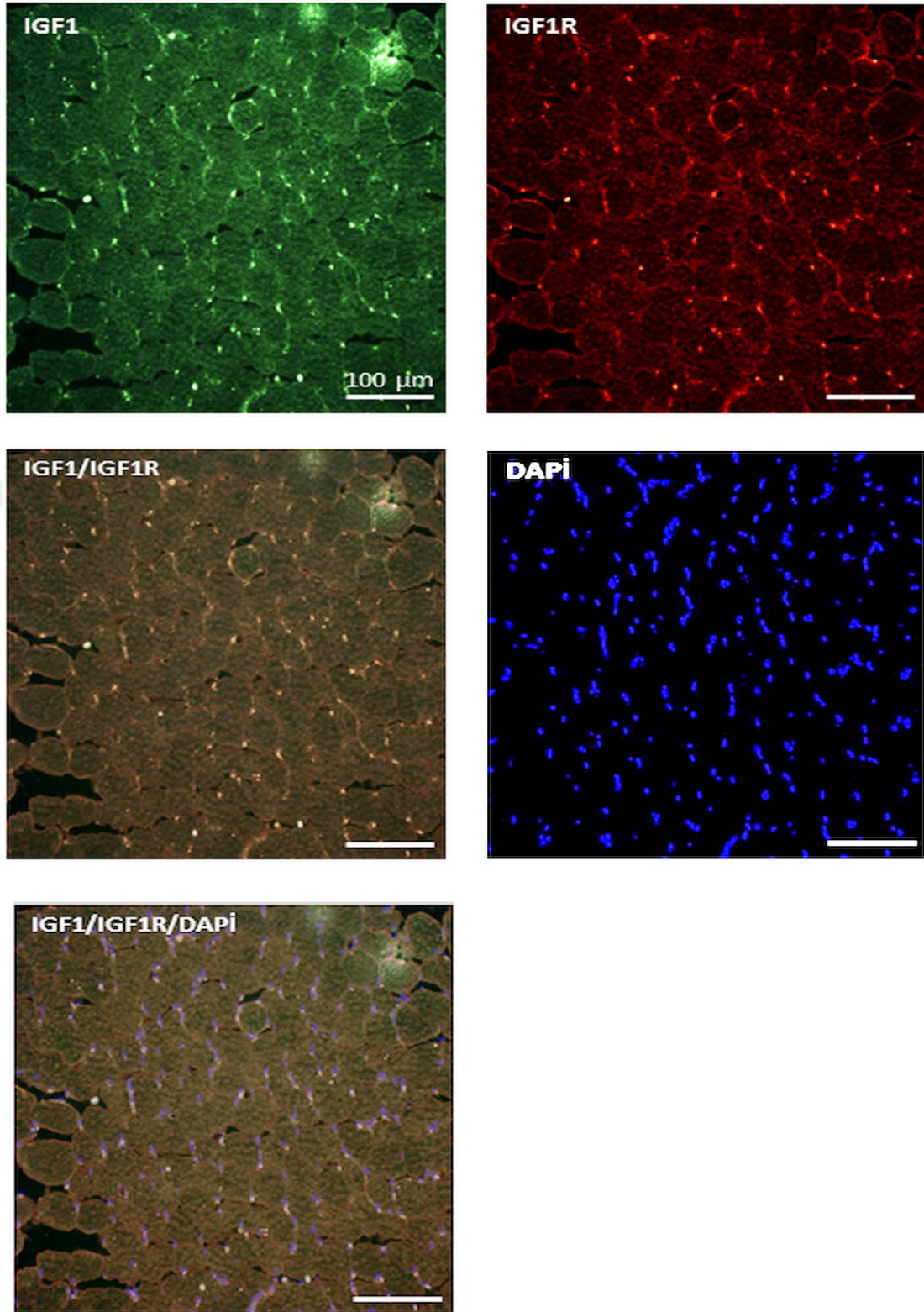


Şekil 4. 11. Hasta-kontrol grubuna ait kas biyopsi kesitlerinde IGFBP5 IF boyama görüntüleri. **A.** LGMD **B.** DMD **C.** Tip 2 lif atrofisi görülen kas distrofisi **D.** CFTD.

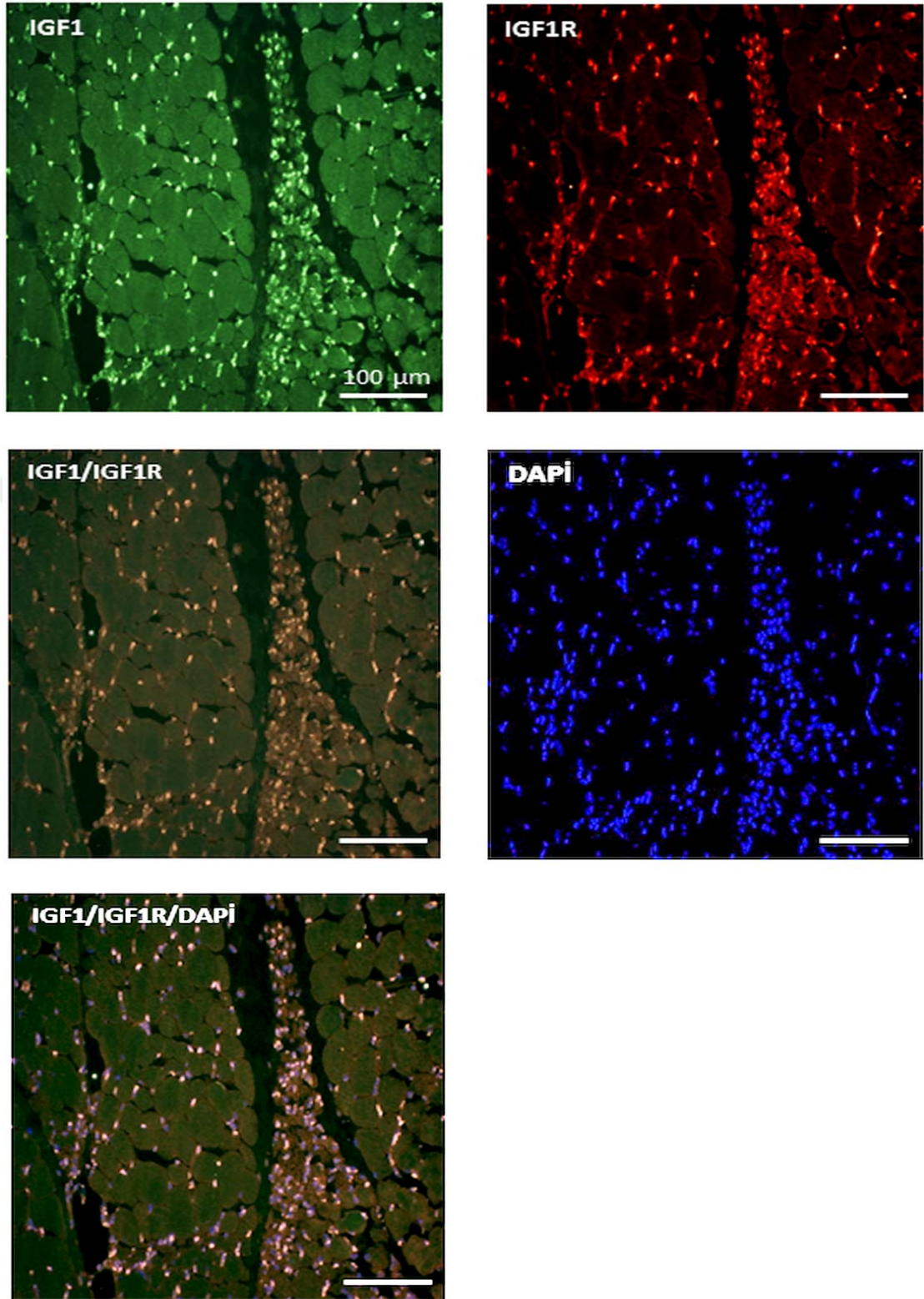
LGMD, DMD, tip 2 atrofisi görülen kas distrofisi ve CFTD hastalarına ait IF boyama sonuçları değerlendirildiğinde IGF sistemi elemanlarının SMA hastaları ile benzer yerleşim gösterdiği ve bu hastaların atrofik liflerinin de hipertrofiklere göre daha koyu boyandığı gözlenmiştir. Bu durum atrofik liflerde hastalık patogenezinin ve atrofiye uğrayan lif tipinden bağımsız olarak IGF sistemi elemanlarının sentezinin arttığını göstermiştir.

IGF1 proteini etkisini IGF1 reseptörüne bağlanarak çeşitli hücre içi sinyal yollarının uyarılmasıyla göstermektedir. Bu nedenle hücrelerde IGF1 ve IGF1 reseptörünün eş yerleşim göstermeleri beklenmektedir. İki proteinin birlikteliğini göstermek amacıyla SMA hastaları, sağlıklı bireyler ve hasta-kontrol grubuna ait kas biyopsi örneklerinde IGF1-IGF1R eş boyamaları yapılmış (Şekil 4.12- 4.16), IGF1 ve IGF1R proteininin eş yerleşim gösterdiği belirlenmiştir.

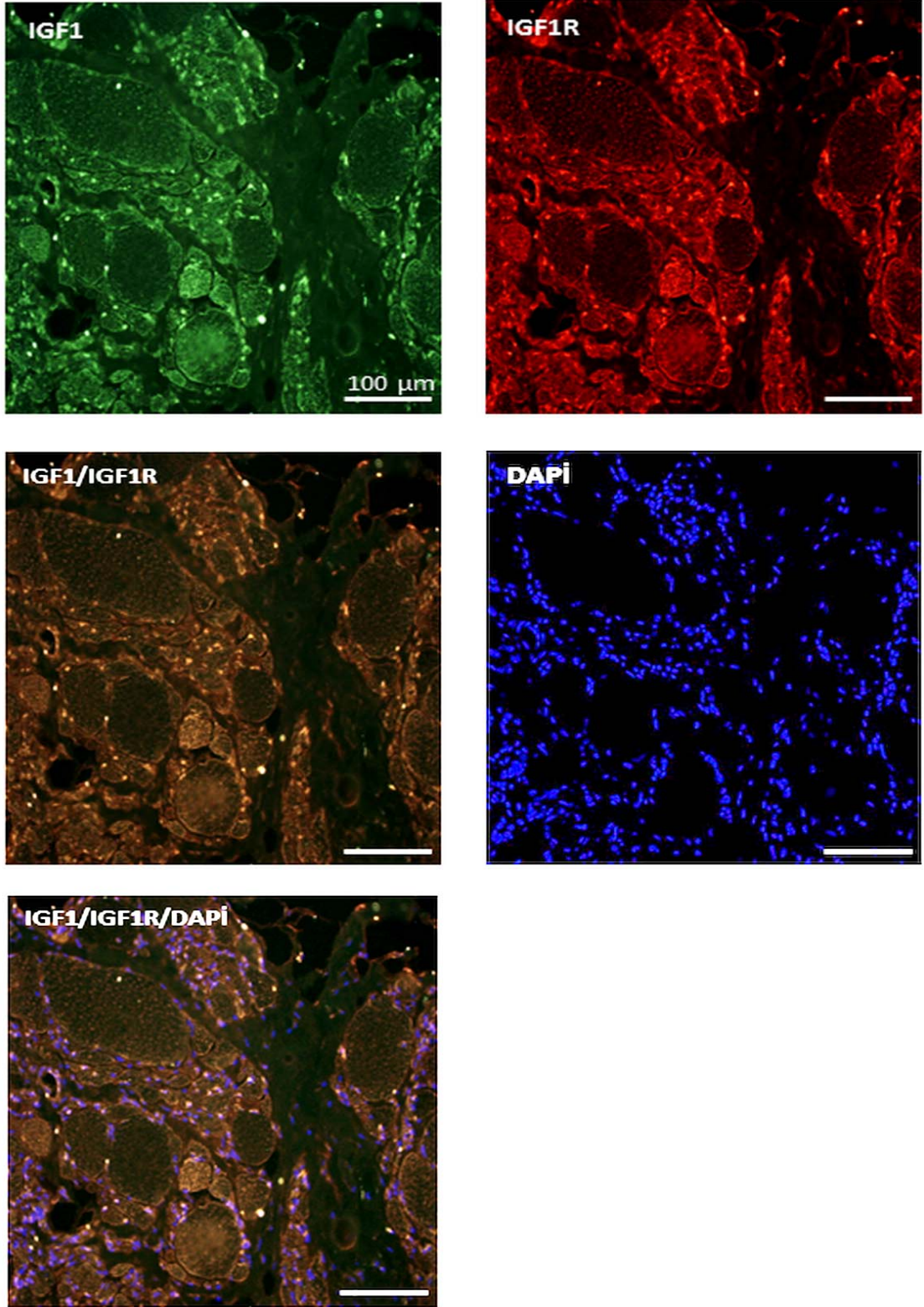




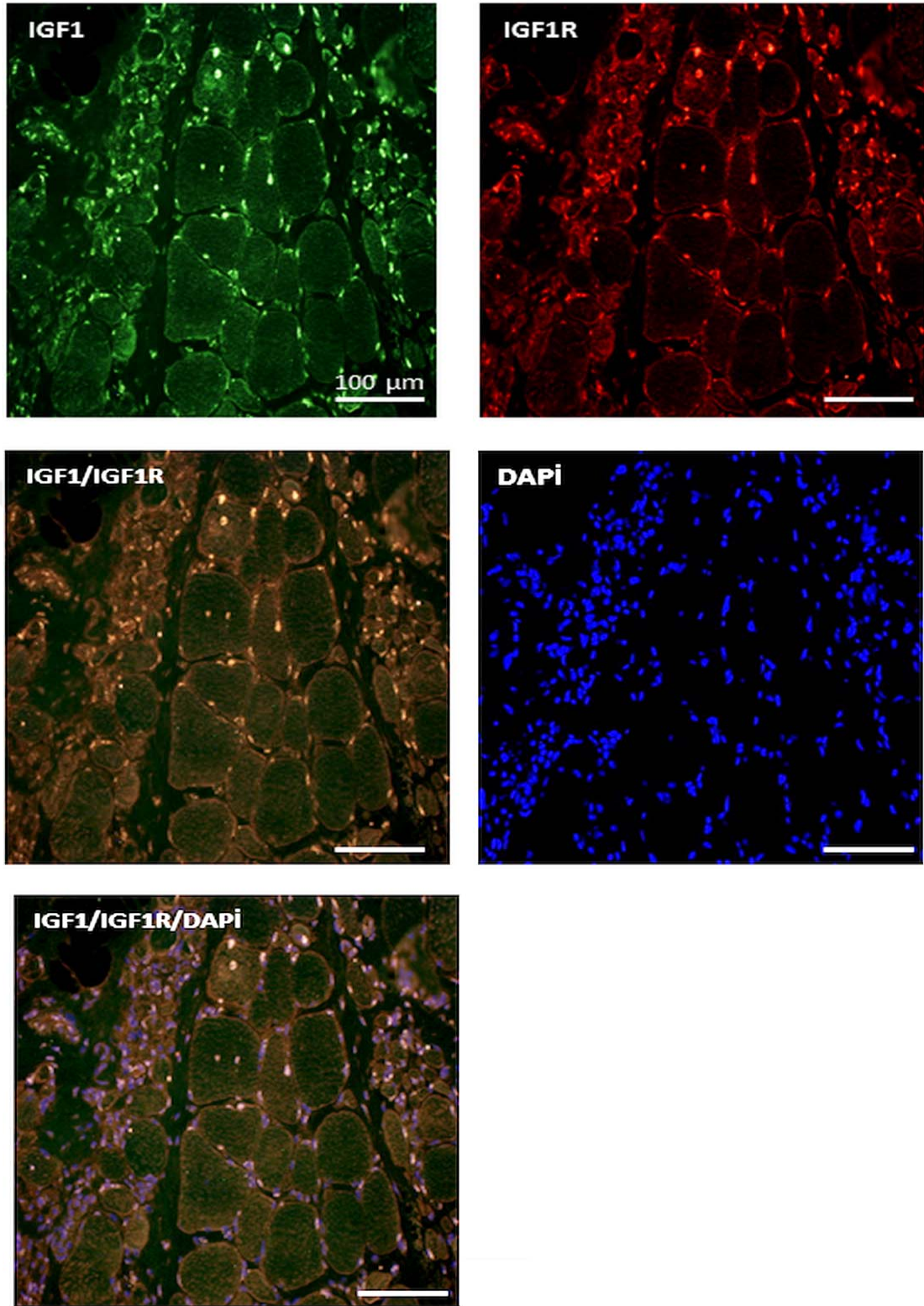
Şekil 4.12. Sağlıklı bireye ait kas biyopsi kesitinde yapılan IGF1-IGF1R eş IF boyama görüntüleri. Görüntülemeye 20 X objektif kullanılmıştır.



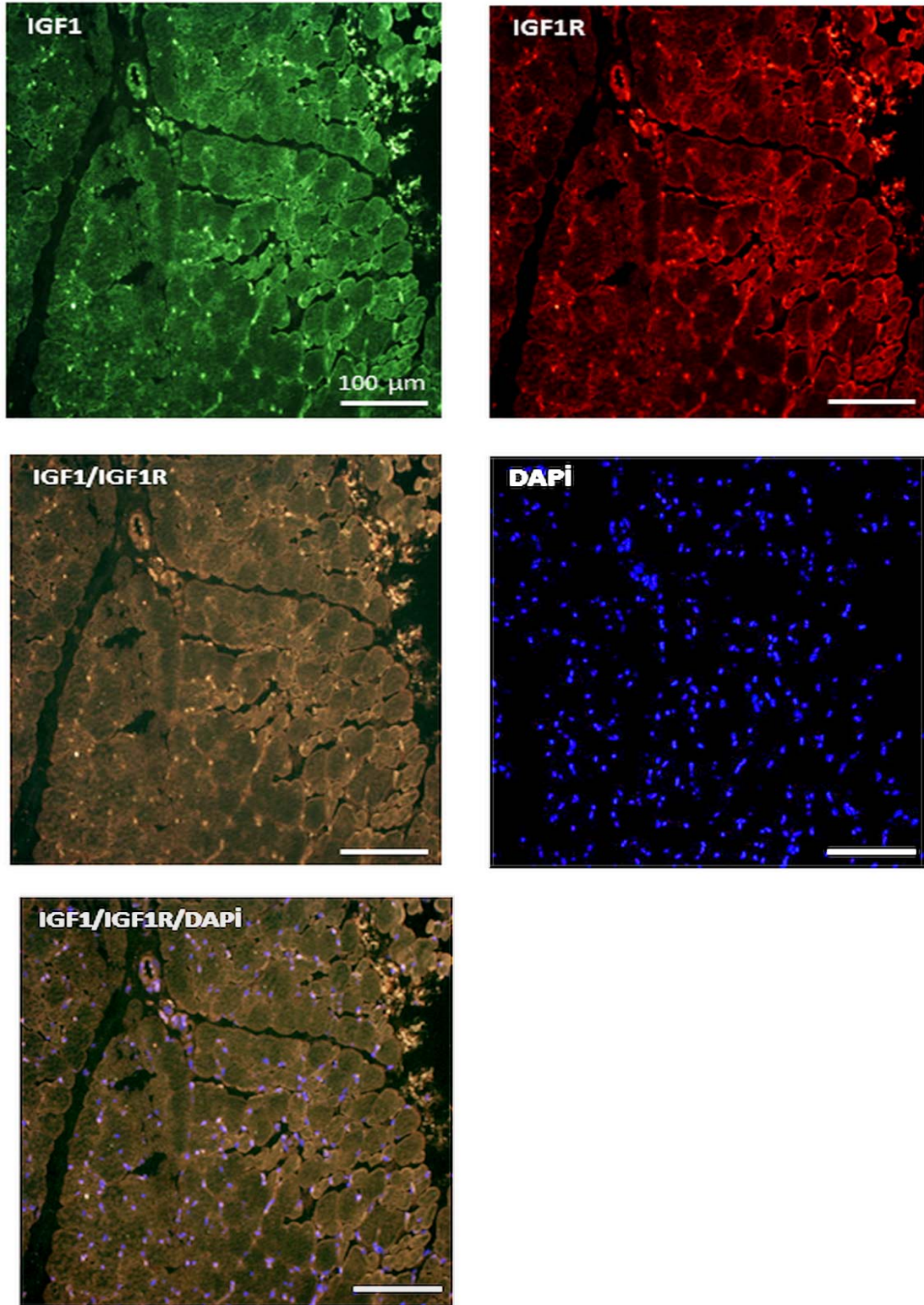
Şekil 4.13. SMA hastasına ait kas biyopsi kesitinde yapılan IGF1-IGF1R eş IF boyama görüntüleri. Görüntülemeye 20 X objektif kullanılmıştır.



Şekil 4.14. LGMD hastasına ait kas biyopsi kesitinde yapılan IGF1-IGF1R eş IF boyama görüntüleri. Görüntülemde 20 X objektif kullanılmıştır.



Şekil 4.15. DMD hastasına ait kas biyopsi kesitinde yapılan IGF1-IGF1R eş IF boyama görüntüleri. Görüntülemeye 20 X objektif kullanılmıştır.



Şekil 4.16. CFTD hastasına ait kas biyopsi kesitinde yapılan IGF1-IGF1R eş IF boyama görüntüleri. Görüntülemeye 20 X objektif kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA

Büyüme ve gelişme için önemli olan IGF'ler normal fizyolojik süreçleri kontrol etmenin yanı sıra patolojilerle de ilişkilendirilmiş olan pleiotropik büyüme faktörleridir. Çeşitli nöromusküler hastalıklarda IGF sistemi regülasyonundaki bozukluk motor nöron ve kas hücreleri üzerindeki güçlü trofik desteğin azalmasına neden olarak hastalıkların patolojisiyle ilişkilendirilmektedir (116, 147). Bu bakımdan, motor nöron dejenerasyonu ve kas atrofisi görülen SMA hastalarında daha önce detaylı olarak çalışılmamış olan IGF sisteminin araştırılması önem taşımaktadır.

Farklı kliniğe sahip SMA hastalarına ait plazma örneklerinde yapılmış olan biyobelirteç çalışmaları ve Anabilim Dalı'mızda tip I ve tip III SMA hastalarına ait fibroblast hücrelerinde yapılmış olan transkriptom çalışmaları incelendiğinde ortak bulgu olarak IGFBP'lerin ifadesinde tiplere göre farklılık olduğu dikkat çekmiştir (16). Ayrıca SMA'lı hayvan modellerinde; **1.** serum IGF1 ve IGFBP3 düzeylerinin düşük olması (39, 40), **2.** kasa özgül IGF1 ifade artışının SMA'da görülen kas patolojisini düzeltebilmesi (110), **3.** SMN proteini ve IGF1 düzeyleri arasında korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar SMA hastalığının patogenezinde IGF sisteminin etkisi olabileceğini düşündürmüştür (39, 54, 169, 170). Kas ve motor nöron hücrelerindeki anabolik etkileri ve literatürde bulunan çalışmalar doğrultusunda SMA hastalarında görülen fenotipik çeşitlikle IGF ailesi üyelerinin düzeyi arasında ilişki olabileceği hipotezi kurulmuştur. Bu tez çalışması kapsamında SMA hastalarında IGF ve IGF bağlayıcı proteinlerin karaciğerden sentezlenerek seruma verilen sistemik düzeyleri ve lokal olarak iskelet kasındaki sentezleri ilk kez detaylı olarak araştırılmış ve hastalık fenotipindeki çeşitlilikle ilişkisi incelenmiştir.

Sistemik düzeyin belirlenmesi için serum örnekleri kullanılarak yapılan analizlerde 15 SMA hastası (9 tip I ve 6 tip II) ve 18 kontrol bireyde serumda bulunan temel IGF ailesi üyeleri olan IGF1, IGFBP3, IGFBP5 ve ALS proteinlerinin düzeyi IRMA

ve ELISA teknikleriyle araştırılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, SMA hastalarında kontrol grubuna göre IGF1 standart sapma skorunda istatistiksel olarak anlamlı düşme, IGFBP5 düzeyinde ise anlamlı yükselme olduğu görülmüştür. IGFBP3 ve ALS protein düzeylerinin ise hastalarda daha düşük olduğu saptanmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlar SMA hastalarında IGF sistemi regülasyonunun bozuk olduğuna işaret etmiştir.

SMA hastalarında IGF1 düşüklüğü görülmekle birlikte özellikle 5, 7 ve 9 numaralı tip I ve 10 numaralı tip II SMA hastasında IGF1 standart sapma skorunun -2' nin altında olması, bu hastalarda IGF1 takviyesi gerektirecek kadar ciddi düzeyde IGF1 düşüşü olduğunu göstermektedir. SMA hastalarında IGF1 düşüklüğünün primer ya da sekonder nedenleri olabilir (171). Beslenme IGF1 regülasyonunda rol alan en önemli faktörlerden birisi olarak kabul edilmektedir (172). SMA hastalarında iskelet kas atrofisi ve beslenme problemlerine bağlı olarak malnütrisyonla sık rastlanmaktadır. Bu nedenle çalışmaya yalnızca malnütrisyonu olmayan hastaların dahil edilmesi mümkün olamamıştır. Çalışma grubunda yer alan bireylerin beslenme düzeyleri analiz edildiğinde hastaların % 40'ında hafif ve % 20'sinde orta düzeyde malnütrisyon olduğu görülürken kontrol bireylerin % 17'sinde hafif malnütrisyon olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel analizler IGF1 düşüklüğünün malnütrisyonla ilişkili olmadığını göstermiştir.

IGF1 düzeyinin diğer regülatörleri, dolaşımda IGF1'e bağlanarak ikili kompleks oluşturan IGFBP3 ve IGFBP5 proteinleri ile bu kompleksin stabilitesini sağlayan ALS proteindir (19, 127, 173). Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar IGFBP5 düzeyinin hastalarda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı arttığını, IGFBP3 ve ALS düzeyindeki düşüşün ise anlamlı olmadığını göstermiştir. Amyotrofik lateral skleroz hastalıklarında IGFBP5 düzeylerinin yüksek olduğu literatürde bildirilmiştir (34, 38). Bu çalışmalarda da belirtildiği gibi, SMA hastalarında saptamış olduğumuz artan IGFBP5'in serbest IGF1'lere bağlanarak onların IGF1R'üne bağlanmasını engelleyip kas ve motor nöron patolojisine etki edebileceği

düşünülmüştür. SMA hastalarının ALS düzeyindeki azalma anlamlı olmamasına rağmen bireysel olarak değerlendirildiğinde 7 ve 9 numaralı tip I SMA hastalarındaki düşüklük dikkat çekici bulunmuştur. Bu hastalarda ALS proteininin yanı sıra IGF1 ve IGFBP3 düzeylerinin de ciddi derecede düşük olduğu, doğumdan sonraki ilk 2 ay içerisinde hastalık belirtilerini gösterdikleri ve mekanik solunum desteği alan diğer hastalara göre daha erken dönemde (5 aylık) bu desteğe ihtiyaç duydukları görülmüştür. Hastalarda saptadığımız ALS eksikliğinin ikili kompleks stabilitesini bozarak IGF1 ve IGFBP3 konsantrasyonunda azalmaya neden olduğu düşünülmektedir (19, 173). Benzer bulgular SMA fare modellerinde yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir (39, 40).

IGF sistemi elemanlarının düzeyi ile SMA hastalarında görülen fenotipik çeşitlilik arasındaki ilişki, klinik olarak birbirinden farklı olan tip I ve tip II hastalar birbiriyle karşılaştırılarak araştırılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da hastalık ciddiyetiyle paralel olarak IGF1, IGFBP3 ve ALS düzeylerinin tip I hastalarda tip II'lere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde Millino ve ark. (161) SMA hasta kasında yaptıkları transkriptom çalışmasında IGF/PI3K/Akt yolu elemanlarının ifadesinin hastalık ciddiyetine göre değişiklik gösterdiğini bildirmiştir. Bu nedenle tip I ve tip II SMA hastaları arasında saptamış olduğumuz farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile biyolojik olarak anlamlı olabileceği ve IGF sistemi ile klinik ciddiyet arasındaki ilişkinin kesinleşebilmesi için daha fazla sayıda hastada araştırma yapılmasının faydalı olacağı düşünülmüştür.

Sistemik IGF1 tedavisinin SMA fare modelinde motor nöron dejenerasyonunu azaltarak motor fonksiyonlarda iyileşme, kas atrofisinde azalma, vücut ağırlığı ve ömür uzunluğunda artış sağladığı gösterilmiştir. Kas ya da motor nöronlara uygulanan tedavilere göre sistemik IGF1 uygulamasının SMA'da periferik dokularda görülen patolojilerin de iyileşmesini sağlayarak yüksek fayda gösterdiği bildirilmiştir (55). SMA hastalığında IGF sisteminin kapsamlı olarak anlaşılabilmesi için serumda bulunan IGF sistem elemanlarının yanı sıra lokal sentezin de

araştırılması önemlidir. Lokal sentez, hastaların motor nöron hücrelerine ulaşmak mümkün olmadığı için arşivlenmiş kas biyopsi örneklerinde IF boyama tekniği ile araştırılmıştır. Çalışma kapsamında IGF1 ve IGF2 kas gelişimi, farklılaşması ve hasar sonrası rejenerasyonda rol almaları, IGFBP5 kasta ifade olan temel IGF bağlayıcı protein olması ve IGF1R'ü IGF sinyalizasyonundaki rolü nedeniyle analiz edilmiştir.

IF boyama çalışmaları sonucunda, araştırılan proteinlerin çekirdek periferi, sarkoplazma ve sarkolemmada noktasal ya da çizgisel olarak yerleşim gösterdikleri belirlenmiş, kontrol bireyler ve SMA hastaları arasında hücre içi yerleşim bakımından farklılık saptanmamıştır. Atrofi düzeyinin hastalar arasında ve aynı hastaya ait doku kesitlerinde değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir. Boyanma yoğunluğu bakımından histolojik olarak birbirinden farklı olan sağlıklı ve SMA hasta kası arasında belirgin bir farklılık dikkat çekmezken, SMA hastalarında atrofik liflerin hipertrofiklere göre daha koyu boyandığı belirlenmiştir. Bu durumun SMA'ya özgüllüğünün araştırılması için SMA hastalığı dışında tip I ve tip II lif atrofisi görülen nöromüsküler hastalık (DMD, LGMD, CFTD ve tip II lif atrofisi) grupları çalışmaya dahil edilmiştir. SMA ile benzer şekilde IGF sistemi elemanlarının sentezinin atrofik liflerde hipertrofiklere göre artış göstermesi, bu durumun hastalık patogenezinin ve atrofiye uğrayan lif tipinden bağımsız olarak kas atrofisi durumunda görülen ortak bir cevap olduğunu göstermiştir.

Kas kitlesi anabolik ve katabolik sinyaller arasındaki dengeyle korunmaktadır. Anabolik sinyallerin azalması ya da denervasyon nedeniyle uzun süreli katabolik sinyaller kas atrofisine neden olmaktadır (174-176). IGF1'in iskelet kas büyümesinin pozitif regülatörü olduğu, kasa özgül olarak ifadesi arttırıldığında protein sentezi ve hipertrofiyle ilgili sinyal yollarını indüklerken, protein yıkımı ve apoptozla ilgili yolları baskılayarak atrofiyi önleyebildiği bilinmektedir (24, 177-179). IGF2 ise miyoblast proliferasyon ve sağ kalımında rol almasının yanı sıra kas farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır (111, 112, 180). Bu bilgiler ışığında atrofik kas liflerinde saptamış olduğumuz IGF1 ve IGF2 artışının sağ kalım, rejenerasyonu uyarmak,

hipertrofi sağlamak ya da kası innerve eden motor nöronların korunması amacıyla gerçekleştirildiği düşünülmektedir.

İnsan primer kas kültüründe IGF1 uygulamasının IGFBP5 sentezini arttırdığı bildirilmiştir (181). Kasın sentezlenen IGFBP5 farklılaşma sırasında hem kendi ifadesi hem de IGF2 ifadesini arttırarak kas farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır (180). Bu tez çalışmasında atrofik liflerde yoğun olarak görülen IGFBP5'in diğer IGF sistemi elemanlarından farklı olarak ekstraselüler alanda da yerleşimi olduğu saptanmıştır. IGFBP5'in ECM proteinleri ile bağlanması sonucu IGF'lere olan ilgisinin azaldığı, IGF'lerin serbest kalarak IGF1R'ünü uyardığı ve böylece IGFBP5'in hücre yüzeyinde IGF1R'üne yakın bir IGF havuzu oluşturduğu bilinmektedir (136). Bu bilgiler ışığında, nöromüsküler hastalıklardan oluşan çalışma grubunda gözlediğimiz IGFBP5 artışının kas hücrelerinin sağ kalımını sağladığı, IGF2 sentezini uyardığı ya da IGF etkisini arttırdığı şeklinde yorumlanmıştır.

Kas biyopsi örneklerinde araştırılan diğer bir IGF ailesi üyesi ise IGF1R'üdür. Atrofik liflerde IGF1'in yanı sıra IGF1R'ünün de artış gösterdiği saptanmıştır. Tez çalışmasında yapmış olduğumuz eş boyamalar sonucunda IGF1 ve IGF1R'ünün birlikte yerleşim gösterdiği belirlenmiştir. SMA hayvan modelleri, amiyotrofik lateral skleroz ve Alzheimer gibi hastalıklarda iskelet kası ve merkezi sinir sisteminde IGF1R artışı daha önce yapılmış çalışmalarda gösterilmiştir (34, 36, 110, 157, 161, 164, 182). IGF1R sentezindeki artışın nörodejeneratif hastalıklar için ortak patolojik bir bulgu olabileceği ve IGF1R'ünün kısmi inaktivasyonunun SMA'lı farelerde hastalık fenotipini iyileştirip yaşam sürelerini uzattığı bildirilmiştir (164). İlginç olarak Biondi ve ark. (164) SMA'lı fare omurilik dokusunda yaptıkları çalışmalarda IGF1R artışının hangi sinyal yolağının uyarılacağına belirleyicisi olduğunu ve nöronların korunmasını sağlayan PI3K/Akt yolağı yerine ERK yolağını aktive ettiğini göstermiştir. Bu durum *SMN2* transkripsiyonunun baskılanmasına neden olan Elk-1'in transkripsiyon faktörünü aktive ederek hastalık fenotipini negatif olarak etkilemektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda atrofik kas liflerinde saptadığımız

IGF1R artışının nöromusküler hastalıklarda ortak görülen ve hastalık patolojisine etki eden bir faktör olabileceği düşünülmüştür. 2016 yılında yapılan bir başka çalışmada IGF1 ve IGF1R düzeyi kadar reseptörün sinyal iletimini gerçekleştirmesinin de önemli olduğu gösterilmiştir (183). Denervasyon nedeniyle ortaya çıkan kas atrofisinde, kas kitlesinin negatif regülatörü olan myostatin yolağı elemanlarının biriktiği ve böylece IGF1 düzeyi normal olsa bile sinyal iletimini engellediği görülmüştür (183).

Serumda ve kasta bulunan IGF düzeylerinin analizleri birlikte değerlendirildiğinde SMA hastalarında sistemik ve lokal IGF regülasyonun bozulduğu belirlenmiştir. Sistemik IGF1 düzeyindeki ciddi azalma pleiotropik etkileri nedeniyle IGF1'in hedeflediği bir çok periferel doku ve organı etkileyebileceği için önemli bir bulgudur. Bu nedenlerle bu tez çalışması IGF1 ve regülatörlerinin hastalardaki sistemik düzeyinin analiz edilmesinin önemini ortaya koymuştur. Ayrıca, atrofik kas liflerinde IGF sistem elemanlarının artışının çalıştığımız farklı nöromusküler hastalıklar arasında ortak bir bulgu olması bu durumun hastalığa özgül olmayan, atrofi durumunda görülen bir cevap olduğunu göstermiştir. Bu nedenle artışın moleküler etki mekanizmasının araştırılması kas atrofisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesine yardımcı olacaktır. Nöromusküler hastalıklarda kaybedilen motor nöronların yerine koyulması mümkün olmadığı için kasın rejeneratif kapasitesinin hedeflenmesinin tedaviyi destekleyici bir faktör olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- Serumda yapılan analizler sonucunda:
 - IGF1 düzeyinin SMA hastalarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük, IGFBP5 düzeyinin ise anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir.
 - ALS ve IGFBP3 düzeylerinin hastalarda daha düşük olduğu saptanmış ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
 - IGF1 düzeyi 3/15 tip I ve 1/15 tip II SMA hastasında -2 SSS'nun altında kalarak IGF1 takviyesi gerektirecek kadar düşük bulunmuştur.
 - İstatistiksel analizlerle IGF1 düşüklüğünün malnütrisyonla ilişkili olmadığı gösterilmiştir.
 - Tip I ve tip II SMA hastaları karşılaştırıldığında IGF1, IGFBP3 ve ALS düzeylerinin ağır seyreden tip I hastalarda diğerlerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu düşüklük, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hastalık ciddiyetiyle uyumlu bulunmuştur.
- Arşivlenmiş kas biyopsilerinde yapılan analizler sonucunda:
 - IGF1, IGF2, IGFBP5 ve IGF1R proteinlerinin SMA hastaları ve kontrol bireylerde sarkoplazma, sarkolemma ve çekirdek çevresinde yerleşim gösterdiği belirlenmiştir.
 - IGFBP5'in ECM'de de yerleşim gösterdiği saptanmıştır.
 - Boyanma düzeyinin hastalar arasında ve aynı hastaya ait kesitin farklı alanlarında değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir.
 - Analiz edilen tüm proteinlerin SMA hastalarının atrofik kas liflerinde hipertrofiklere göre daha yoğun boyandığı saptanmıştır.
 - DMD, LGMD, CFTD ve tip 2 lif atrofisi görülen hastalarda SMA'ya benzer şekilde atrofik liflerdeki boyanmada artış olduğu görülmüştür.
 - IGF1 ve IGF1R eş boyaması sonucunda iki proteinin birlikte yerleşim gösterdiği belirlenmiştir.

– Atrofik liflerde IGF1, IGF2, IGFBP5 ve IGF1R proteinlerindeki artışın hastalığa ya da atrofiye uğrayan lif tipine özgül olmadığı ve atrofi durumunda görülen bir cevap olduğu saptanmıştır.

6.2. Öneriler

- Serumda bulunan IGF ailesi üyelerinin düzeyi ve SMA'nın fenotipik çeşitliliği arasındaki ilişkinin güçlendirilmesi için SMA hastalarının farklı klinik tiplerinden oluşan daha büyük bir grupta çalışılması önerilmektedir.
- Atrofik kas liflerinde IGF ve IGF1R sentezindeki artışın moleküler etki mekanizmasının aydınlatılması için IGF sinyal yolağında yer alan efektör moleküllerden Akt, ERK ve Foxo3a proteinlerinin aktivasyonunun SMA hastalarında araştırılması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;80(1):155-65.
2. Schrank B, Götz R, Gunnensen J, Ure J, Toyka K, Smith A, et al. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(18):9920–5.
3. Lorson C, Hahnen E, Androphy E, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(11):6307-11.
4. Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, et al. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 1997;16 (3):265-69.
5. Mailman M, Heinz J, Papp A, Snyder P, Sedra M, Wirth B, et al. Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. *Genet Med*. 2002;4(1):20-6.
6. Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker T, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time light cyclers PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*. 2002;70(2):358e68.
7. Cobben JM, Van der Steege G, Grootsholten P, De Visser M, Scheffer H, Buys CH. Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*. 1995;57(4):805-8.
8. Czech C, Tang W, Bugawan T, Mano C, Horn C, Iglesias VA, et al. Biomarker for spinal muscular atrophy: expression of SMN in peripheral blood of SMA patients and healthy controls. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139950.
9. Hosseinibarkooie S, Peters M, Torres-Benito L, Rastetter RH, Hupperich K, Hoffmann A, et al. The power of human protective modifiers: PLS3 and CORO1C unravel impaired endocytosis in spinal muscular atrophy and rescue SMA phenotype. *Am J Hum Genet*. 2016;99(3):647-65.
10. Braun S, Croizat B, Lagrange M, Warter J, Poindron P. Constitutive muscular abnormalities in culture in spinal muscular atrophy. *Lancet*. 1995;345(8951):694-5.
11. Mutsaers CA, Wishart TM, Lamont DJ, Riessland M, Schreml J, Comley LH, et al. Reversible molecular pathology of skeletal muscle in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2011;20(22):4334-44.
12. Boyer J, Murray L, Scott K, De Repentigny Y, Renaud J, Kothary R. Early onset muscle weakness and disruption of muscle proteins in mouse models of spinal muscular atrophy. *Skelet Muscle*. 2013;3(1):1–13.

13. Boyer JG, Deguise MO, Murray LM, Yazdani A, De Repentigny Y, Boudreau-Lariviere C, et al. Myogenic program dysregulation is contributory to disease pathogenesis in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2014;23(16):4249-59.
14. Guettier-Sigrist S, Coupin G, Braun S, Warter J, Poindron P. Muscle could be the therapeutic target in SMA treatment. *J Neurosci Res.* 1998;53(6):663-9.
15. Calder A, Androphy E, Hodgetts K. Small molecules in development for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Med Chem.* 2016;59(22):10067-83.
16. Kobayashi DT, Shi J, Stephen L, Ballard KL, Dewey R, Mapes J, et al. SMA-MAP: a plasma protein panel for spinal muscular atrophy. *PLoS One.* 2013;8(4):e60113.
17. Jones J, Clemmons D. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995;16(1):3-34.
18. Duan C, Xu Q. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen Comp Endocrinol.* 2005;142(1-2):44-52.
19. Domene HM, Hwa V, Argente J, Wit JM, Camacho-Hubner C, Jasper HG, et al. Human acid-labile subunit deficiency: clinical, endocrine and metabolic consequences. *Horm Res.* 2009;72(3):129-41.
20. Neff NT, Prevet D, Houenou LJ, Lewis ME, Glicksman MA, Yin QW, et al. Insulin-like growth factors: putative muscle-derived trophic agents that promote motoneuron survival. *J Neurobiol.* 1993;24(12):1578-88.
21. Musaro A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, et al. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet.* 2001;27(2):195-200.
22. Ozdinler PH, Macklis JD. IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat Neurosci.* 2006;9(11):1371-81.
23. Torres-Aleman I. Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. *Dev Neurobiol.* 2010;70(5):384-96.
24. Duan C, Ren H, Gao S. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. *Gen Comp Endocrinol.* 2010;167(3):344-51.
25. Nieto-Estevez V, Defterali C, Vicario-Abejon C. IGF-I: A key growth factor that regulates neurogenesis and synaptogenesis from embryonic to adult stages of the brain. *Front Neurosci.* 2016;10(52):52.
26. Ohlsson C, Sjögren K, Jansson JO, Isaksson OG. The relative importance of endocrine versus autocrine/paracrine insulin-like growth factor-I in the regulation of body growth. *Pediatr Nephrol.* 2000;14(7):541-3.
27. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis-2001. *Endocr Rev.* 2001;22(1):53-74.
28. Feldman E, Sullivan K, Kim B, Russell J. Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival. *Neurobiol Dis.* 1997;4(3-4):201-14.

29. Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle*. 2011;1(1):4.
30. Liu J, Baker J, Perkins A, Robertson E, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*. 1993;75(1):59–72.
31. Torres-Aleman I, Barrios V, Berciano J. The peripheral insulin-like growth factor system in amyotrophic lateral sclerosis and in multiple sclerosis. *Neurology*. 1998;50(3):772-6.
32. De Luca A, Pierno S, Camerino C, Cocchi D, Camerino D. Higher content of insulin-like growth factor-I in dystrophic mdx mouse: potential role in the spontaneous regeneration through an electrophysiological investigation of muscle function. *Neuromuscul Disord*. 1999;9(1):11-8.
33. Cittadini A, Ines Comi L, Longobardi S, Rocco Petretta V, Casaburi C, Passamano L, et al. A preliminary randomized study of growth hormone administration in Becker and Duchenne muscular dystrophies. *Eur Heart J*. 2003;24(7):664-72.
34. Wilczak N, de Vos RAI, De Keyser J. Free insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins 2, 5, and 6 in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*. 2003;361(9362):1007-11.
35. Hosback S, Hardiman O, Nolan CM, Doyle MA, Gorman G, Lynch C, et al. Circulating insulin-like growth factors and related binding proteins are selectively altered in amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis. *Growth Horm IGF Res*. 2007;17(6):472-9.
36. Lunetta C, Serafini M, Prella A, Magni P, Dozio E, Ruscica M, et al. Impaired expression of insulin-like growth factor-1 system in skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Muscle Nerve*. 2012;45(2):200-8.
37. Steyn F, Ngo S, Lee J, Leong J, Buckley A, Veldhuis J, et al. Impairments to the GH-IGF-I axis in hSOD1G93A mice give insight into possible mechanisms of GH dysregulation in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Endocrinology*. 2012;153(8):3735-46.
38. Rauskolb S, Dombert B, Sendtner M. Insulin-like growth factor 1 in diabetic neuropathy and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2016;pii: S0969-9961(16)30089-4.
39. Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF, et al. Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature*. 2011;478(7367):123-6.
40. Murdocca M, Malgieri A, Luchetti A, Saieva L, Dobrowolny G, de Leonibus E, et al. IPLEX administration improves motor neuron survival and ameliorates motor functions in a severe mouse model of spinal muscular atrophy. *Mol Med*. 2012;18:1076-85.
41. d'Ydewalle C, Sumner CJ. Spinal muscular atrophy therapeutics: where do we stand? *Neurotherapeutics*. 2015;12(2):303-16.

42. Pearn J. Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet.* 1978;15(6):409-13.
43. Gitlin JM, Fischbeck K, Crawford TO, Cwik V, Fleischman A, Gonye K, et al. Carrier testing for spinal muscular atrophy. *Genet Med.* 2010;12(10):621-2.
44. Tuncbilek E. Clinical outcomes of consanguineous marriages in Turkey. *Turk J Pediatr.* 2001;43(4):277-9.
45. Munsat TL, Davies KE. Meeting report: International SMA consortium meeting; 26–28 June 1992; Bonn, Germany. *Neuromuscul Disord* 1992;2(5-6):423–8.
46. Butchbach M. Copy number variations in the survival motor neuron genes: implications for spinal muscular atrophy and other neurodegenerative diseases. *Front Mol Biosci.* 2016;3:7.
47. Meldrum C, Scott C, Swoboda K. Spinal muscular atrophy genetic counseling. *J Child Neurol.* 2007;22(8):1019-26.
48. Faravelli I. Spinal muscular atrophy—recent therapeutic advances for an old challenge. *Nat Rev Neurol.* 2015;11(6):351-9.
49. Zerres K, Rudnik-Schoneborn S. Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Arch Neurol.* 1995;52(5):518–23
50. Vuillerot C, Payan C, Girardot F, Fermanian J, Iwaz J, Berard C, et al. Responsiveness of the motor function measure in neuromuscular diseases. *Arch Phys Med Rehabil.* 2012;93(12):2251-6 e1.
51. Piepers S, van den Berg LH, Brugman F, Scheffer H, Ruitkamp-Versteeg M, van Engelen BG, et al. A natural history study of late onset spinal muscular atrophy types 3b and 4. *J Neurol.* 2008;255(9):1400-4.
52. Wertz M, Sahin M. Developing therapies for spinal muscular atrophy. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1366(1):5-19.
53. Crawford TO. Standard of care for spinal muscular atrophy. Sumner CJ, Sergey P, Ko CP, editors. *Spinal muscular atrophy disease mechanisms and therapy.* London: Academic Press, 2017.
54. Shababi M, Lorson C, Rudnik-Schoneborn S. Spinal muscular atrophy: a motor neuron disorder or a multi-organ disease? *J Anat.* 2014;224(1):15-28.
55. Tsai LK, Chen CL, Ting CH, Lin-Chao S, Hwu WL, Dodge JC, et al. Systemic administration of a recombinant AAV1 vector encoding IGF-1 improves disease manifestations in SMA mice. *Mol Ther.* 2014;22(8):1450-9.
56. Simone C, Ramirez A, Bucchia M, Rinchetti P, Rideout H, Papadimitriou D, et al. Is spinal muscular atrophy a disease of the motor neurons only: pathogenesis and therapeutic implications? *Cell Mol Life Sci.* 2015;73 (5):1003-20.
57. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene. *Hum Mutat.* 2000;15(3):228-37.

58. Rochette CF, Gilbert N, Simard LR. SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Hum Genet.* 2001;108(3):255–66.
59. Cho S, Dreyfuss G. A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. *Genes Dev.* 2010;24(5):438–42.
60. Darras BT MJ, Monani UR, De Vivo DC. Spinal muscular atrophies. Darras BT, Jones HR, Ryan MM and De Vivo DC, editors. *Neuromuscular disorders of infancy, childhood and adolescence. Second edition.* London:Academic Press; 2015.
61. Burghes A. When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am J Hum Genet.* 1997;61(1):9-15.
62. Hahnen E, Forkert R, Marke C, Rudnik-Schöneborn S, Schönling J, Zerres K, et al. Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum Mol Genet.* 1995;4(10):1927-33.
63. Prior TW, Swoboda KJ, Scott HD, Hejmanowski AQ. Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2. *Am J Med Genet A.* 2004;130A(3):307-10.
64. Oprea G, Kröber S, McWhorter M, Rossoll W, Müller S, Krawczak M, et al. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* 2008;320(5875): 524–7.
65. Wirth B, Garbes L, Riessland M. How genetic modifiers influence the phenotype of spinal muscular atrophy and suggest future therapeutic approaches. *Curr Opin Genet Dev.* 2013;23(3):330-8.
66. Riessland M, Kaczmarek A, Schneider S, Swoboda KJ, Löhr H, Bradler C, et al. Neurocalcin delta suppression protects against spinal muscular atrophy in humans and across species by restoring impaired endocytosis. *Am J Hum Genet.* 2017;100(2):1-19.
67. Liu H, Shafey D, Moores J, Kothary R. Neurodevelopmental consequences of Smn depletion in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Neurosci Res.* 2010;88(1):111-22.
68. Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* 1996;15(14):3555-65.
69. Coovert D, Le T, McAndrew P, Strasswimmer J, Crawford T, Mendell J, et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 1997;6(8):1205-14.
70. Gubitza A, Feng W, Dreyfuss G. The SMN complex. *Exp Cell Res.* 2004;296(1):51-6.
71. Will C, Luhrmann R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(3):290–301.

72. Pellizzoni L, Yong J, Dreyfuss G. Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science*. 2002;298(5599):1775–9.
73. Meister G, Eggert C, Fischer U. SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol*. 2002;12(10):472–8.
74. Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning A, Karle K, Monani U, et al. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motorneurons. *J Cell Biol*. 2003;163(4): 801–12.
75. Otter S, Grimmler M, Neuenkirchen N, Chari A, Sickmann A, Fischer U. A comprehensive interaction map of the human survival of motor neuron (SMN) complex. *J Biol Chem*. 2007;282(8):5825–33.
76. Boyer J, Bowerman M, Kothary R. The many faces of SMN: deciphering the function critical to spinal muscular atrophy pathogenesis. *Future Neurol*. 2010;5(6):873–90.
77. Bowerman M, Shafey D, Kothary R. Smn Depletion Alters Profilin II Expression and Leads to Upregulation of the RhoA/ROCK Pathway and Defects in Neuronal Integrity. *J Mol Neurosci*. 2007;32(2):120–31.
78. Boyer JG, Ferrier A, Kothary R. More than a bystander: the contributions of intrinsic skeletal muscle defects in motor neuron diseases. *Front Physiol*. 2013;4:356.
79. Walker MP, Rajendra TK, Saieva L, Fuentes JL, Pellizzoni L, Matera AG. SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain. *Hum Mol Genet*. 2008;17(21):3399–410.
80. Bricceno KV, Fischbeck KH, Burnett BG. Neurogenic and myogenic contributions to hereditary motor neuron disease. *Neurodegener Dis*. 2012;9(4):199–209.
81. Cifuentes-Diaz C, Nicole S, Velasco M, Borra-Cebrian C, Panozzo C, Frugier T, et al. Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum Mol Genet*. 2002;11(12):1439–47.
82. Giavazzi A, Setola V, Simonati A, Battaglia G. Neuronal-specific roles of the survival motor neuron protein: evidence from survival motor neuron expression patterns in the developing human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(3):267–277.
83. Burghes AH, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(8):597–609.
84. Guettier-Sigrist S, Hugel B, Coupin G, Freyssinet J, Poindron P, Warter J. Possible pathogenic role of muscle cell dysfunction in motor neuron death in spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve*. 2002;25(5):700–8.

85. Shafey D, Cote PD, Kothary R. Hypomorphic Smn knockdown C2C12 myoblasts reveal intrinsic defects in myoblast fusion and myotube morphology. *Exp Cell Res.* 2005;311(1):49-61.
86. Deguise MO, Boyer JG, McFall ER, Yazdani A, De Repentigny Y, Kothary R. Differential induction of muscle atrophy pathways in two mouse models of spinal muscular atrophy. *Sci Rep.* 2016;6:28846.
87. Shafey D, Boyer J, Bhanot K, Kothary R. Identification of novel interacting protein partners of SMN using tandem affinity purification. *J Proteome Res.* 2010;9(4):1659–69.
88. Yesbek-Kaymaz A, Bora-Tatar G, Erdem-Yurter H. Contribution of skeletal muscle defects in spinal muscular atrophy. *Acta Medica.* 2015;4:51–8.
89. Vardatsikos G, Sahu A, Srivastava A. The insulin-like growth factor family: molecular mechanisms, redox regulation, and clinical implications. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(5):1165–90.
90. Fowden AL. The insulin-like growth factors and fetoplacental growth. *Placenta.* 2003;24(8-9):803-12.
91. DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature.* 1990;345(6270):78-80.
92. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell.* 1993;75(1):73-82.
93. Butler A, LeRoith D. Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology.* 2001;142(5):1685-88.
94. LeRoith D, Roberts C. Insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;692:1-9.
95. Schumacher R, Mosthaf L, Schlessinger J, Brandenburg D, Ulrich A. Insulin and insulin-like growth factor-1 binding specificity is determined by distinct regions of their cognate receptors. *J Biol Chem.* 1991;266(29):19288-95.
96. Dupont J, Khan J, Qu B, Metzler P, Helman L, LeRoith D. Insulin and IGF-1 induce different patterns of gene expression in mouse fibroblast NIH-3T3 cells: identification by cDNA microarray analysis. *Endocrinology.* 2001;142(11):4969–75.
97. Werner H, Weinstein D, Bentov I. Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways. *Arch Physiol Biochem.* 2008;114(1):17-22.
98. Boucher J, Tseng Y, Kahn C. Insulin and insulin-like growth factor-1 receptors act as ligand-specific amplitude modulators of a common pathway regulating gene transcription. *J Biol Chem.* 2010;285(22):17235-45.
99. Versteyhe S, Klaproth B, Borup R, Palsgaard J, Jensen M, Gray S, et al. IGF-I, IGF-II, and insulin stimulate different gene expression responses through binding to the IGF-I Receptor. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:98.

100. Temmerman L, Slonimsky E, Rosenthal N. Class 2 IGF-1 isoforms are dispensable for viability, growth and maintenance of IGF-1 serum levels. *Growth Horm IGF Res.* 2010;20(3):255–63.
101. Philippou A, Maridaki M, Pneumaticos S, Koutsilieris M. The complexity of the IGF1 gene splicing, posttranslational modification and bioactivity. *Mol Med.* 2014;20(1):202–14.
102. Bikle D, Tahimic C, Chang W, Wang Y, Philippou A, Barton E. Role of IGF-I signaling in muscle bone interactions. *Bone.* 2015;80:79-88.
103. Bennet A, Wilson D, Liu F, Nagashima R, Rosenfeld R, Hintz R. Levels of insulin-like growth factors I and II in human cord blood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983;57(3):609–12.
104. Rosenfeld R, Wilson D, Lee P, Hintz R. Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation. *J Pediatr.* 1986;109(3):428–33.
105. Bergman D, Halje M, Nordin M, Engström W. Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review. *Gerontology.* 2013;59(3):240–9.
106. Lui J, Baron J, . Evidence that IGF2 down-regulation in postnatal tissues and up-regulation in malignancies is driven by transcription factor E2f3. *PNAS.* 2013;110(15):6181–6.
107. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2000;92(18):1472-89.
108. Ketha H, Singh R. Clinical assays for quantitation of insulin-like-growth-factor-1 (IGF1). *Methods.* 2015;81:93-8.
109. Adams G. Autocrine and/or paracrine insulin-like growth factor-I activity in skeletal muscle. *Clin Orthop Relat R* 2002;403:188-96.
110. Bosch-Marce M, Wee CD, Martinez TL, Lipkes CE, Choe DW, Kong L, et al. Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice. *Hum Mol Genet.* 2011;20(9):1844-53.
111. Florini J, Ewton D, Magri K, Mangiacapra F. Igfs and muscle differentiation. *Adv Exp Med Biol.* 1993;343:319–26.
112. Florini J, Ewton D, Coolican S. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev.* 1996;17(5):481–517.
113. Clark DL, Clark DI, Hogan EK, Kroscher KA, Dilger AC. Elevated insulin-like growth factor 2 expression may contribute to the hypermuscular phenotype of myostatin null mice. *Growth Hormone & IGF Research.* 2015;25(5):207-18.
114. Caroni P, Grandes P. Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by exposure to elevated levels of insulin-like growth factors. *J Cell Biol.* 1990;110(4):1307-17.
115. Fernandez A, Torres-Alemán I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(4):225-39.
116. Homolak J, Janeš I, Filipović M. The role of IGF-1 in neurodegenerative diseases. *Gyrus.* 2015;3(3):162-7.

117. Adams T, Epa V, Garret T, Ward C. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(7):1050–93.
118. Girnita L, Worrall C, Takahashi S, Seregard S, Girnita A. Something old, something new and something borrowed: emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) signaling regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(13):2403-27.
119. Rubin R, Baserga R. Insulin-like growth factor-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis, and tumorigenicity. *Lab Invest.* 1995;73(3):311-31.
120. Laviola L, Natalicchio A, Giorgino F. The IGF-I Signaling Pathway. *Curr Pharm Des.* 2007;13(7):663–9.
121. Kornfeld S. Structure and function of the mannose 6-phosphate insulin-like growth factor-II receptors. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:307–30.
122. Boisclair Y, Rhoads R, Ueki I, Wang J, Ooi G. The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *J Endocrinol.* 2001;170(1):63-70.
123. Silha J, Gui Y, Modric T, Suwanichkul A, Durham S, Powell D, et al. Overexpression of the acid-labile subunit of the IGF ternary complex in transgenic mice. *Endocrinology.* 2001;142(10):4305– 13.
124. Baxter R. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nat Rev Cancer.* 2014;14:329–41.
125. Domené H, Bengolea S, Martínez A, Ropelato M, Pennisi P, Scaglia P, et al. Deficiency of the circulating insulin-like growth factor system associated with inactivation of the acid-labile subunit gene. *N Engl J Med.* 2004;350:570–7.
126. Yakar S, Rosen C, Beamer W, Ackert-Bicknell C, Wu Y, Liu J, et al. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest.* 2002;110(6):771-81.
127. Yakar S, Rosen CJ, Boussein ML, Sun H, Mejia W, Kawashima Y, et al. Serum complexes of insulin-like growth factor-1 modulate skeletal integrity and carbohydrate metabolism. *FASEB J.* 2009;23(3):709-19.
128. Gordon P, Marcinkiewicz M. An analysis of IGFBP evolution. *Growth Horm IGF Res.* 2008;18(4):284-90.
129. Bach A, Headey S, Norton R. IGF-binding proteins – the pieces are falling into place. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(5):228-34.
130. Parker A, Rees C, Clarke J, Busby W, Clemmons D. Binding of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-5 to smooth-muscle cell extracellular matrix is a major determinant of the cellular response to IGF-I. *Mol Biol Cell.* 1998;9(9):2383-92.
131. Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev.* 2002;23(6):824-54.

132. Wood T, Rogler L, Czick M, Schuller A, Pintar J. Selective alterations in organ sizes in mice with a targeted disruption of the insulin-like growth factor binding protein-2 gene. *Mol Endocrinol.* 2000;14(9):1472–82.
133. Baxter RC. Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. *Horm Res.* 1994;42(4-5):140-4.
134. Ren H, Ping Y, Duan C. IGFBP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. *J Cell Biol.* 2008;182(5):979–91.
135. Jones J, Gockerman A, Busby W, Camacho-Hubner C, Clemmons D. Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. *J Cell Biol.* 1993;121(3):679-87.
136. Mohan S, Baylink D. IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *J Endocrinol.* 2002;175(1):19-31.
137. Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko B. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans.* 2012;140(1):139-46.
138. Fernandez AM, Dupont J, Farrar RP, Lee S, Stannard B, Le Roith D. Muscle-specific inactivation of the IGF-I receptor induces compensatory hyperplasia in skeletal muscle. *J Clin Invest.* 2002;109(3):347-55.
139. Philoppou A, Halapas A, Maridaki M, Koutsilieris M. The role of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in skeletal muscle physiology. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2007;7(3):208-18.
140. Otto A, Patel K. Signalling and the control of skeletal muscle size. *Exp Cell Res.* 2010;316(18):3059-66.
141. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004;117(3):399-412.
142. Rommel C, Bodine S, Clarke B, Rossman R, Nunez L, Stitt T, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):1009-13.
143. Nader G. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the “AKT” together. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(10):1985–96.
144. Clemmons D. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends in Endocrinol Metab.* 2009;20(7):349-56.
145. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 2013;280(17):4294-314.
146. Onuma T, Ding Y, Abraham E, Zohar Y, Ando H, Duan C. Regulation of temporal and spatial organization of newborn GnRH neurons by IGF signaling in zebrafish. *J Neurosci.* 2011;31(33):11814–24.

147. Trejo JL, Carro E, Garcia-Galloway E, Torres-Aleman I. Role of insulin-like growth factor I signaling in neurodegenerative diseases. *J Mol Med (Berl)*. 2004;82(3):156-62.
148. Barton ER, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol*. 2002;157(1):137-48.
149. Carro E, Trejo J, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med*. 2002;8(12):1390-7.
150. Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science*. 2003;301(5634):839-42.
151. Shavlakadze T, White J, Hoh JF, Rosenthal N, Grounds MD. Targeted expression of insulin-like growth factor-I reduces early myofiber necrosis in dystrophic mdx mice. *Mol Ther*. 2004;10(5):829-43.
152. Dobrowolny G, Giacinti C, Pelosi L, Nicoletti C, Winn N, Barberi L, et al. Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *J Cell Biol*. 2005;168(2):193-9.
153. Dodge JC, Haidet AM, Yang W, Passini MA, Hester M, Clarke J, et al. Delivery of AAV-IGF-1 to the CNS extends survival in ALS mice through modification of aberrant glial cell activity. *Mol Ther*. 2008;16(6):1056-64.
154. Palazzolo I, Stack C, Kong L, Musaro A, Adachi H, Katsuno M, et al. Overexpression of IGF-1 in muscle attenuates disease in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron*. 2009;63(3):316-28.
155. Rinaldi C, Bott LC, Chen KL, Harmison GG, Katsuno M, Sobue G, et al. Insulinlike growth factor (IGF)-1 administration ameliorates disease manifestations in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Mol Med*. 2012;18:1261-8.
156. Krieger F, Elflein N, Saenger S, Wirthgen E, Rak K, Frantz S, et al. Polyethylene glycol-coupled IGF1 delays motor function defects in a mouse model of spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Brain*. 2014;137(5):1374-93.
157. Zemva J, Schubert M. The role of neuronal insulin/insulin-like growth factor-1 signaling for the pathogenesis of Alzheimer's disease: possible therapeutic implications. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13(2):322-37.
158. Lin H, Hu H, Duan W, Liu Y, Tan G, Li Z, et al. Intramuscular delivery of scAAV9-hIGF1 prolongs survival in the hSOD1G93A ALS mouse model via upregulation of D-amino acid oxidase. *Mol Neurobiol*. 2016.
159. Scully M, Pandya S, Moxley R. Review of Phase II and Phase III clinical trials for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2013;1(1):33-46.
160. Allodi I, Comley L, Nichterwitz S, Nizzardo M, Simone C, Benitez J, et al. Differential neuronal vulnerability identifies IGF-2 as a protective factor in ALS. *Sci Rep*. 2016;6(25960).

161. Millino C, Fanin M, Vettori A, Laveder P, Mostacciuolo ML, Angelini C, et al. Different atrophy-hypertrophy transcription pathways in muscles affected by severe and mild spinal muscular atrophy. *BMC Med.* 2009;7:14.
162. Biondi O, Branchu J, Sanchez G, Lancelin C, Deforges S, Lopes P, et al. In vivo NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and enhances SMN2 gene expression in severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci.* 2010;30(34):11288-99.
163. Kye M, Niederst E, Wertz M, Goncalves IC, Akten B, Dover K, et al. SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway. *Hum Mol Genet.* 2014;23(23):6318–31.
164. Biondi O, Branchu J, Ben Salah A, Houdebine L, Bertin L, Chali F, et al. IGF-1R reduction triggers neuroprotective signaling pathways in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci.* 2015;35(34):12063-79.
165. Shababi M, Glascock J, Lorson CL. Combination of SMN trans-splicing and a neurotrophic factor increases the life span and body mass in a severe model of spinal muscular atrophy. *Hum Gene Ther.* 2011;22(2):135-44.
166. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, et al. 2000 CDC growth charts for the United States: Methods and development. *National Center for Health Statistics Vital Health Stat* 2002;11(246).
167. Chavez R, Frenk S, Galvan R, Gomez F, Munoz J, Vazquez J. Mortality in second and third degree malnutrition. *J Trop Pediatr.* 1956;2(2):77-83.
168. Lo CA, Kays I, Emran F, Lin TJ, Cvetkovska V, Chen BE. Quantification of protein levels in single living cells. *Cell Rep.* 2015;13(11):2634-44.
169. Locatelli D, Terao M, Fratelli M, Zanetti A, Kurosaki M, Lupi M, et al. Human axonal survival of motor neuron (a-SMN) protein stimulates axon growth, cell motility, C-C motif ligand 2 (CCL2), and insulin-like growth factor-1 (IGF1) production. *J Biol Chem.* 2012;287(31):25782-94.
170. Sahashi K, Ling KK, Hua Y, Wilkinson JE, Nomakuchi T, Rigo F, et al. Pathological impact of SMN2 mis-splicing in adult SMA mice. *EMBO Mol Med.* 2013;5(10):1586-601.
171. Puche J, Cortazar C. Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J Transl Med.* 2012;10:224.
172. Livingstone C. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and clinical nutrition. *Clin Sci.* 2013;125(6): 265–80.
173. Martucci LC, Gutierrez ML, Karabatas LM, Scaglia PA, Rey RA, Domene HM, et al. Assessment of pathogenicity of natural IGFALS gene variants by in silico bioinformatics tools and in vitro functional studies. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;429:19-28.
174. Jackman R, Kandarian S. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(4):C834-43.

175. Sandri C, Sandri, M. (2008) Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology* (Bethesda). 2008;23:160-70.
176. McCarthy JJ, Esser KA. Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13(3):230-5.
177. Coleman M, DeMayo F, Yin K, Lee H, Geske R, Montgomery C, et al. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem*. 1995;270(20):12109–16.
178. Musaro A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, et al. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet*. 2001;27(2):195-200.
179. Zanou N, Gailly P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(21):4117–30.
180. Ren H, Yin P, Duan C. IGFBP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. *J Cell Biol*. 2010;182(5):979–91.
181. Schimke J, Ljungqvist O, Sarkar G, Conover C, Nair K. A quantitative PCR measurement of messenger RNA expression of IGF-I, IGF-II and IGFBP-5 in human skeletal muscle. *Growth Horm IGF Res*. 1999;9(3):179–86.
182. Gontier G, George C, Chaker Z, Holzenberger M, Aid S. Blocking IGF Signaling in Adult Neurons Alleviates Alzheimer's Disease Pathology through Amyloid Clearance. *J Neurosci*. 2015;35(33):11500-13.
183. Tando T, Hirayama A, Furukawa M, Sato Y, Kobayashi T, Funayama A, et al. Smad2/3 are required for immobilization-induced skeletal muscle atrophy. *J Biol Chem*. 2016;291(23):12184-94.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışmasıyla İlgili Etik Kurul İzini



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

22 Kasım 2013

Sayı: 16969557 -1031

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 20.11.2013 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2013/19
Proje No : GO 13/518 (Değerlendirme Tarihi 08.11.2013)
Karar No : GO 13/518-05

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Hayat Erdem YURTER'in sorumlu araştırmacı olduğu Prof.Dr.Haluk TOPALOĞLU, Prof.Dr.Ayfer ALİKAŞİFOĞLU, Prof.Dr.Alev ÖZÖN, Yrd.Doç.Dr.Beril TALİM, Arş Gör. Ayşe Sevgi BAL ve Ayşe Yeşbek KAYMAZ ile birlikte çalışacakları GO 13/518 kayıt numaralı ve "Spinal Müsküler Atrofi Hastalığında Görülen Fenotipik Çeşitliliğin İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü ve Bağlayıcı Protein Düzeyleri ile İlişkisi" başlıklı proje önerisi araştırmannın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | 9 Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) | 10. Prof. Dr. Cansın Saçkesen (Üye) |
| İZİNLİ | 11. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye) | 12. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevdâ F. Müftüoğlu (Üye) | İZİNLİ |
| İZİNLİ | 13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye) | 14. Prof. Dr. Leyla Dinç (Üye) |
| İZİNLİ | 14. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | 15. Av. Meltem Onurlu (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Songül Vaizoğlu (Üye) | |
| İZİNLİ | |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | |

EK-2: “21st International Annual Congress of the World Muscle Society”, 4-8 Ekim 2016, Granada, Spain.

Abstracts 2016/Neuromuscular Disorders 26 (2016) S88–S212

S105

importantly, longitudinal data are not available. The aim of the present study was to investigate the evolution of bone status in children with types II and III SMA, and to find possible correlations with the severity of motor function impairment. In this prospective study twenty-seven children with types II and III SMA underwent a comprehensive evaluation of bone status and metabolism at a mean age of 37 months (range 15–108). Motor function was assessed by the Hammersmith Functional Motor Scale Expanded (HFMSSE) and the Upper Limb Module (ULM). All the children received 25-OH vitamin D plus adjustment of dietary calcium to the recommended dose after the first assessment. They all underwent a follow up evaluation at a mean age of 55 months (range 29–132). We found a significant regression between BMD values and the HFMSSE scores both at baseline and at follow up. Interestingly, only high-functioning children showed an increase of the BMD similar to healthy peers. To our knowledge, this is the first prospective longitudinal study evaluating bone status in children with types II and III SMA, and its evolution over time. This study confirms that children with SMA are at increased risk for bone fragility and osteoporosis. However, 25-OH vitamin D plus adjustment of dietary calcium to the recommended dose can increase BMD, particularly in children with higher motor function capacities. Further studies are needed to investigate the mechanisms underlying the increased bone resorption, and consequent bone fragility, in SMA.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2016.06.072>

P.51

Exploring the microvascular abnormalities in a cohort of paediatric patients with spinal muscular atrophy

M. Scoto¹, H. Zhou¹, D. Thompson², K. Howell³, Y. Hong¹, N. Imbrigiotta¹, S. Parson¹, P. Brogan¹, E. Muntoni¹

¹UCL Institute of Child Health, London, UK; ²Great Ormond Street Hospital, London, UK; ³UCL, London, UK; ⁴University of Aberdeen, Aberdeen, UK

Microvascular abnormalities have been described in transgenic SMN deficient mice models as well as in severe SMA patients. Alterations in specific vascular-related factors have been also recently reported in patients. The aim of this ongoing research is to study markers of endothelial injury (circulating endothelial cells) and endothelial repair by isolation of endothelial progenitor cells (EPC), together with the expression of angiogenic factors in patients. We are also exploring the possibility of detecting microvascular abnormalities in peripheral organs easily accessible in patients such as the retina and nail fold beds to determine if these can provide information on integrity of the vascular system. The retinal imaging for vascular mapping is carried out using an OPTOS scanning laser ophthalmoscope camera able to capture ultra wide field (200 degree) images of the fundus visualising blood vessels from the optic nerve to the peripheral retina. A high resolution Optilia portable capillaroscopy system is used to capture images of the nail fold capillary beds in the fingers of patients. Parameters under evaluation are: capillary appearance, dimension, density and presence of extravasation/micro-haemorrhages. Eight patients have been recruited so far: 4 with SMA II and 4 with SMA III. In 7/8 peripheral blood sampling was also obtained to isolate EPC to perform an angiogenic factors microarray assay and angiogenic and endothelial injury markers. We have so far studied the retina in one patient with SMA 3 and conducted the nail fold capillaroscopy in one patient with SMA 2; in both cases images were obtained for analysis and the techniques were well tolerated. This study will help to address the characterisation of the microvasculature in SMA patients as well as provide information on potentially new non-invasive biomarkers.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2016.06.073>

P.52

Prevention and treatment of scoliosis by Garches brace in type I SMA patients (non sitters) surviving through childhood

R. Sauvagnac-Quera¹, A. Benezit¹, C. Monsaingeon¹, V. Azzi¹, I. Dabaj¹,

I. Vaugier¹, S. Tirolien¹, J. Neut², R. Carlier¹, L. Mhladi¹, C. Glorion¹, D. Leclair¹, B. Estournet¹, S. Quijano-Roy¹

¹APHP, Hôpital Raymond Poincaré, Hôpitaux Universitaires Paris Ile-de-France Ouest, Garches, France; ²Société NEUT, Paris, France; ³APHP, Necker Enfants Malades Hospital, Paris, France

Respiratory insufficiency and scoliosis are very frequent complications in children affected with spinal muscular atrophy (SMA). They may have life-threatening consequences, especially in the most severe infants not able to acquire sitting position (Type I SMA). A subset of these patients, who have most often acquired head support, present a less progressive and severe course in the first year of life and may survive through childhood. We use for more than 30 years a brace in plexidur that does not interfere with pulmonary function (Garches brace) in patients with early onset neuromuscular disorders. The aim of the study is to evaluate the use and efficacy of GB in the prevention and the treatment of scoliosis in SMA type I patients surviving through childhood. We reviewed the charts of 102 patients with type I SMA followed in our center between 1975 and 2009. 25 patients were treated by GB at least for three years. We collected and analyzed clinical, radiological (Cobb angle in supine position) and spirometric data. The GB was introduced at a mean age of 2 years (range 0.7–5.7) and was used for a mean of 10.6 years (SD 2.5). 18 patients (72%) had surgical spinal fusion at a mean age of 12.3 years (SD 2.2), all with pelvic screw fixation. The mean preoperative supine Cobb angle was 46.7° (range 0–85°), with one patient having 0°. The linear regression showed an increment of Cobb angle of 2.4° per year in the series. 48% of the children were able to attend school and 64% drove their own wheelchair. Brace did not impair respiratory function. Garchois brace is well tolerated in type I SMA patients and seems an effective tool to prevent and manage spinal deformities in the first decade of life in those who survive, before surgical treatment is performed.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2016.06.074>

P.53

Serum IGF1 and IGFBP3 levels in SMA patients

A. Yesbek Kaymaz, A. Bal, G. Bora-Tatar, A. Ozon, A. Alikasifoglu, H. Topaloglu, H. Erdem-Yurtur
Hacettepe University, Ankara, Turkey

Spinal muscular atrophy is a neuromuscular disease caused by survival motor neuron protein deficiency. Resulting from homozygous deletions or mutations in survival of motor neuron 1 (SMN1) gene, SMA is characterized by alpha motor neuron degeneration in the spinal cord and progressive skeletal muscle atrophy. Insulin-like growth factor 1 (IGF1) is a peptide hormone expressed mainly in liver and required for normal growth and development. It is known that IGF1 is a neurotrophic factor and also has role in muscle development, size maintenance and repair after degeneration. IGF1 is carried and regulated by insulin like growth factor binding protein 3 (IGFBP3). IGF1 dysregulation was reported in several neurodegenerative diseases and IGF1 reconstitution in amyotrophic lateral sclerosis and spinal and bulbar muscular atrophy resulted in reduction of motor neuron cell death and muscle degeneration, as well as increase in survival. In this study we aimed to investigate the serum levels of IGF1 and IGFBP3 in 15 SMA patients and 18 sex-age matched healthy controls by immunoradiometric assay. The IGF1 and IGFBP3 data expressed as standard deviation (SD) scores. Our data revealed that mean IGF1 level was significantly decreased in SMA patients compared to control group (Mann-Whitney test, $p=0.03$). The mean SD scores of IGF1 were -1.09 and 0.004 for patients and control group, respectively. Interestingly, 4 patients in our cohort had less IGF1 levels than 2 SD. Although IGFBP3 levels were lower in SMA patients than control group, it was not statistically significant. Our results revealed that SMA patients had significantly low IGF1 level and bring on possibility of IGF1 screening and replacement in SMA.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2016.06.075>

EK-3: “20th Annual Spinal Muscular Atrophy Researcher Meeting”, 16-19 Haziran 2016, Anaheim CA, USA.

20th Annual Spinal Muscular Atrophy Researcher Meeting 2016

POSTER 51A - Clinical

IGF system elements in SMA patients

Ayşe Yesbek Kaymaz 1, Ayşe Sevgi Bal 2, Gamze Bota-Tatar 1, Alev Ozon 3, Ayfer Alikasifoğlu 3, Haluk Topaloğlu 2, Hayat Erdem-Yürter 1

1 Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Ankara, Turkey,

2 Department of Pediatrics, Neurology Unit, Faculty of Medicine, Hacettepe University Ankara, Turkey,

3 Department of Pediatrics, Division of Pediatric Endocrinology, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Ankara, Turkey

Background: Insulin like growth factor 1 (IGF1) is a peptide hormone that is essential for motor neuron survival, skeletal muscle growth and development. Serum IGF1 is carried and regulated by IGF binding proteins (IGFBP) 3/5 and acid labile subunit (ALS) protein. IGF system dysregulation was reported in several neurodegenerative diseases including Amyotrophic lateral sclerosis, Spinal bulbar muscular atrophy and Alzheimer's disease. The aim of the study was to investigate the serum levels of IGF1, IGFBP3, IGFBP5 and ALS proteins in 15 SMA patients (9 Type I and 6 Type II) and 18 age/sex matched healthy controls. Immunoradiometric assay was performed to detect IGF1-IGFBP3 and enzyme linked immunosorbent assay to detect IGFBP5-ALS protein levels.

Results: Serum IGF1 levels were found significantly low and IGFBP5 levels were significantly high in SMA patients compared to control group (Mann-Whitney test, $p=0.033$ and $p=0.049$, respectively). Type I patients had slightly lower IGF1 than type II. Increased IGFBP5 levels in patients might be explained as compensation to low IGF1. In order to investigate the underlying cause of the low IGF1 levels in patients, the study group was evaluated by the means of malnutrition by CDC 2000 growth charts. The correlation analysis revealed no association between malnutrition and low IGF-1 levels in patients ($p=1.00$). IGFBP3 and ALS levels revealed no significant difference between patients and control group.

Conclusions: In this study we investigated IGF system elements and found strikingly low IGF1 levels in SMA patients. Further studies in different SMA types might be valuable to investigate the IGF1 role in SMA pathology.

EK-4: "5th International Congress of Myology", 14-18 Mart 2016, Lyon, Fransa.

In order to further investigate the role of SMN in muscle stem cell function, we characterized post-natal myogenesis of a severe mouse model of SMA (hSMN2). We observed that reduced levels of SMN lead to an increased number of proliferating SCs (Pax7+MyoD+) associated with a decreased number of self-renewing SCs (Pax7+MyoD-) in SMA mice as compared to littermate controls. Conversely, overexpression of SMN by intramuscular scAAV9-SMN1 injection in newborn wild-type mice, induced a strong increase of the quiescent SC pool and decreased fusion.

These data suggest for the first time that SMN may be involved in the transition between proliferative and quiescent states of muscle SCs. Therefore, SMN levels may have to be tightly regulated for proper post-natal growth and SC pool constitution, which could have major implications for the development of SMA gene therapy strategies.

SMA, Muscle, Muscle stem cells

Spinal muscular atrophy (including variants)- #4468

P24- 376- Skeletal muscle expression of insulin like-growth factor system elements in spinal muscular atrophy patients

Ayşe Yeşbek Kaymaz (1), Beril Talim (2), Gamze Bora Tatar (1), Hayat Erdem Yurter (1)

1. Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Hacettepe University, ANKARA, Turkiye

2. Department of Paediatrics, Pathology Unit, Faculty of Medicine, Hacettepe University, ANKARA, Turkiye

Spinal muscular atrophy (SMA) is a childhood neuromuscular disease characterized by motor neuron degeneration in the spinal cord and progressive skeletal muscle atrophy. Survival of Motor Neuron 1 (SMN1) gene mutations and resulting SMN protein deficiency cause the disease. Although ~94% of the patients have homozygous SMN1 exon 7/8 deletion type of mutations, substantial variation is observed among patients in the degree of skeletal muscle atrophy. It is known that insulin-like growth factor (IGF) system elements have role in skeletal muscle development, differentiation, regeneration after denervation and IGF system dysregulation has been reported in mouse models of SMA. It was hypothesized that IGF system elements might affect the degree of muscle weakness displayed in SMA patients. The aim of the study was to investigate the expression of IGF system elements in SMA patients. For this purpose, immunofluorescence analyses were performed for IGF1, IGF2, IGFBP5 (insulin-like growth factor binding protein 5) and IGF1R (IGF1 receptor) proteins in the frozen skeletal muscle biopsy specimens of 9 SMA patients, 4 healthy controls and 6 disease controls. The results revealed that immunostaining pattern was not different between SMA patients, healthy or disease controls. More intense immunostaining was detected in atrophic fibers in the skeletal muscle of SMA and other disease controls (including muscular dystrophy and fiber type disproportion) when compared to hypertrophic fibers. The results should be further investigated for the underlying cause of the increased IGF system proteins in the atrophic fibers in SMA and other muscle diseases.

Muscle atrophy, insulin-like growth factors, insulin-like growth factor binding proteins

9. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Ayşe Yeşbek Kaymaz

Doğum Yeri ve Tarihi: Ceyhan, 17.06.1982

Uyruğu: T.C.

İletişim Adresi ve Telefonu: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. Tel. 0312.305 2541

II- Eğitimi

2012-2017: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora

2010-2012: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Doktora, Ders Dönemi

2004-2007: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans

2000-2004: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji, Lisans

III- Mesleki Deneyimi

2011-2012: ABA Ankara Biyoteknoloji, Ankara Üniversitesi Teknoloji Geliştirme Bölgesi, Ar-ge sorumlusu.

2008-2009: GENAR Toplum Sağlığı ve Genombilim Araştırmaları Enstitüsü, Hacettepe Üniv. Teknokenti, Laboratuvar şefi.

2006-2009: GENAR Biyoteknoloji ve Moleküler Genetik Araştırma ve Tanı Laboratuvarları Hacettepe Üniversitesi Teknokenti, Laboratuvar asistanı.

IV- Bilimsel Faaliyetleri

Projeler

2016- : NSC34 Hücre Hattında SMN Proteini Eksikliğine Bağlı Mikrotübül Polimerizasyonunun Araştırılması BAP Hızlı Destek Projesi (Proje ID: 12939), yardımcı araştırmacı.

2015- : Mikrotübül Asosiy Protein 1B Gen İfadesinin Spinal Müsküler Atrofi Hastalığının Ciddiyeti Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, BAP Kapsamlı Araştırma Projesi (Proje No: TSA-2015-6920), yardımcı araştırmacı.

2014-2016: Spinal Müsküler Atrofi Hastalığında Görülen Fenotipik Çeşitliliğin İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri ve Bağlayıcı Protein Düzeyleri ile İlişkisi. Hacettepe Üniversitesi BAP Hızlı Destek Projesi (Proje No: 1162), yardımcı araştırmacı.

2013-2016: PC12 Hücre Hattında Kurkumin ile İndüklenen Nörit Uzamasının Moleküler Mekanizmasının Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi BAP Hızlı Destek Projesi (Proje no: 607), yardımcı araştırmacı.

2015: İn vitro Miyoblast Hücre Farklılaşmasında Protein Kantitasyonunda Kullanılabilir Uygun Housekeeping Gen Adaylarının Belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi, BAP Hızlı Destek Projesi (Proje No: THD-2015-7414), yardımcı araştırmacı.

2006- 2009: OBESİS - Gen ve Bilişim Teknolojileri Destekli Obezite Tedavi ve Kontrol Yönetim Sistemi (OBESİS) Geliştirme Projesi (Proje no: 3060480), TEYDEB, yardımcı araştırmacı.

Yayınlar

Yesbek-Kaymaz A, Bora-Tatar G, Erdem-Yurter, H. Contribution of skeletal muscle defects in spinal muscular atrophy. Acta Medica 2015; 4: 51–58.

Bora-Tatar G, **Yesbek-Kaymaz A**, Bekircan-Kurt CE, Erdem-Ozdamar S, Erdem-Yurter H. Spinal muscular atrophy type III: Molecular genetic characterization of Turkish patients. Eur J Med Genet. 2015; 58: 654-658.

Kaymaz A, and Izbirak A. (2010) Molecular Characterization of genetic diversity among *T. dicoccoides* and *T. dicoccon* populations by RAPD-PCR technique. Hacettepe J Biol Chem. 2010; 38 (4): 333-344.

Sözlü Bildiri ve Posterler

Yesbek Kaymaz A, Kostel Bal S, Bora Tatar G, Ozon A, Alikasifoglu A, Topaloglu H, Erdem Yurter H. Serum IGF1 and IGFBP3 levels in SMA patients. Neuromuscular Disorders 2016; 26: 105. 21st International Annual Congress of the World Muscle Society, 4-8 Ekim 2016, Granada, Spain, Poster Sunumu.

Yesbek Kaymaz A, Kostel Bal S, Bora Tatar G, Ozon A, Alikasifoglu A, Topaloglu H, Erdem Yurter H. IGF System Elements in SMA Patients. 20th Annual Spinal Muscular

Atrophy Researcher Meeting, 16-19 Haziran 2016, Anaheim CA, USA, Poster Sunumu.

Yesbek Kaymaz A, Talim B, Bora Tatar G, Erdem Yurter H. Skeletal muscle expression of insulin like-growth factor system elements in spinal muscular atrophy patients. 5th International Congress of Myology 2016, 14-18 March Lyon, France, Poster Sunumu.

Yeşbek Kaymaz A, Talim B, Bora Tatar G, Erdem Yurter H. Spinal müsküler atrofi hastalarının iskelet kasında insülin benzeri büyüme faktörleri ve bağlayıcı protein düzeylerinin araştırılması. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2015 Ölüdeniz/Fethiye, Sözlü Bildiri.

Bora-Tatar G., Subasi S., **Yesbek-Kaymaz A.**, Tunca-Yılmaz O., Topaloglu H., Karaduman A., Erdem-Yurter H. Effects of exercise training in spinal muscular atrophy type II patients. 19th Annual Spinal Muscular Atrophy Researcher Meeting, 18-20 Haziran 2015, Kansas City, MO, USA, Poster Sunumu.

Karaca S, Karaca M and **Kaymaz A.** A Study of Cancer-Related Genes: Prevalence of Polymorphic GSTT1 and GSTM1 Deletions in Turkey. Journal of Applied Biological Sciences 2013; 7 (2): 01-03. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 15-18 Kasım 2012, Antalya, Poster Sunumu.

Kaymaz A, Karaca S, Cesuroglu T, Kankilic T, De Langen M. Hipertansiyonla ilişkili Genetik Varyantların Türk Populasyonunda Allelik Frekansı. Turkish Journal of Biochemistry, Special issue, Vol. 37 Issue S1, p157. 24. Ulusal Biyokimya Kongresi 25-28 Eylül 2012, Konya, Poster Sunumu.

Karaca S, Cesuroglu T, **Kaymaz A.** Allelic Frequencies of Genetic Variants Associated with Bone Marrow Density in Turkish population. Clinical Genetics, 2010; 78: S1. p57. 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 1-5 Aralık 2010, İstanbul, Poster Sunumu.

Katıldığı Kurs ve Organizasyonlar

- “Kök Hücre Günü 2016 Toplantısı”, H. Ü., Ankara (22 Kasım 2016)
- “21st International Annual Congress of the World Muscle Society”, Granada, Spain, (4-8 Ekim 2016)
- “20th Annual Spinal Muscular Atrophy Researcher Meeting”, Anaheim CA, USA, (16-19 Haziran 2016)
- “IX. Bilim Günleri Kongresi” kapsamında “PCR Temelli Mutasyon Analizi Kursu”, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Düzenleyici (6 Mayıs 2016).
- “5th International Congress of Myology”, Lyon, Fransa (14-18 Mart 2016)
- “Laboratuvar Güvenliği Eğitimi”, H. Ü. Personel Daire Başkanlığı (22-23 Haziran 2015)

- “Nörobilim-Nöroteknoloji Çalıştayı”, Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü - ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü (9 Haziran 2015)
- “Uygulamalı Genomik Tıp Sempozyumu”, Tıbbi Genetik Derneği, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Hacettepe Üniversitesi (30 Mayıs 2015)
- “Eğiticilerin Eğitimi”, H. Ü. Yaşam Boyu Öğrenme Merkezi (9-10 Mayıs 2015)
- “Asistan Etik Eğitimi”, H. Ü. Tıp Tarihi ve Etik AD (7-8 Mayıs 2015)
- “Temel İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi”, H. Ü -HİSAM, (12 Aralık 2014)
- “Kök Hücre Günü 2014”, H. Ü. Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (19 Kasım 2014)
- "Metabolomics for Biomarker Discovery and Personalized Therapies in Sepsis" Workshop, H. Ü. (11 Kasım 2014)
- Suna Kırac Conferences on Neurodegeneration, Istanbul. The Motor System: From Development to Neurodegeneration (12-14 Haziran 2014)
- VII. Bilim Günleri Kongresi, H. Ü. Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Topluluğu (HÜTBAT), Eğitimci (11-12 Nisan 2014)
- Kök Hücre Günü 2013, H. Ü. Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (8 Kasım 2013)
- “Translating Epigenomes into Function: a Next-Generation Challenge for Human Disease” FEBS Workshop (Capri, Italy), YTF burslu (13-16 Ekim 2013)
- VI. Bilim Günleri Kongresi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Topluluğu (HÜTBAT), Eğitimci (3-5 Mayıs 2013)
- “Predictive and Personalized Medicine/Healthcare in Daily Modern Medicine and Pharmacy” konulu sertifika programı, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi-McGill Université Faculté de Médecine (13-16 Eylül 2012)
- 8. Ankara Biyoteknoloji Günleri, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (8-10 Kasım 2011)
- “Temiz oda ve Çeker Ocak Sistemleri” eğitim programı, Metis Biyoteknoloji (21-22 Haziran 2011).
- Moleküler Yaşlanma Çalıştayı, Gülhane Tıp Akademisi (21-22 Kasım 2005)
- Biyokimyada Yeni Uygulamalar, Proteom Analizleri ve Uygulama Alanları Eğitim Programı, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (23-24 Haziran 2005)