

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SÜPEROKSİT DİSMUTAZ GENLERİNİN  
AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ  
HASTALIĞININ OLUŞUMUNDAKİ ROLÜNÜN  
ANLAŞILMASI**

**Biyolog Melda YILMAZ**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Biyoloji Programı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

**KOCAELİ  
2008**

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SÜPEROKSİT DİSMUTAZ GENLERİNİN  
AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ  
HASTALIĞININ OLUŞUMUNDAKİ ROLÜNÜN  
ANLAŞILMASI**

**Biyolog Melda YILMAZ**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Biyoloji Programı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Ali SAZCI

**KOCAELİ  
2008**

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Prof. Dr. Halil İDRİSOĞLU	İMZA
Üye	Prof. Dr. Ali SAZCI	İMZA
Üye	Prof. Dr. M. Doğan GÜLKAÇ	İMZA
Üye	Doç. Dr. Mustafa ÇEKMEN	İMZA
Üye	Yrd. Doç. Dr. Murat KASAP	İMZA

---

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

02/06/2008

Prof.Dr. Ümit BİÇER

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### **Süperoksit Dismutaz Genlerinin Amyotrofik Lateral Skleroz Hastalığının Oluşumundaki Rolünün Anlaşılması**

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri, hücreleri reaktif oksijen türlerine (ROT) karşı koruyan en önemli antioksidan sistemleri oluşturmaktadır. SOD ailesinin üç üyesi bulunmaktadır: SOD1 (*CuZn-SOD*), SOD2 (*Mn-SOD*) ve SOD3 (*EC-SOD*). Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının zararlı etkilerine karşı korumaktır. Bu görevi üstlenmiş SOD enzimi ailesi pek çok hastalıkla ilişkili bulunmuştur. Şüphesiz bunlardan en önemlisi geç başlangıçlı, motor nöronların ölümü ile karakterize edilmiş nörodejeneratif bir hastalık olan Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve SOD1 ilişkisidir.

Bu tezin amacı, bugüne kadar ALS hastalığıyla ilişkilendirilmiş SOD1 geni mutasyonları arasından seçilen SOD1 Asp90Ala ve Gly93Ala mutasyonlarını ALS hastalarında taramak ve ayrıca daha önce ALS ile ilişkilendirilemeyen SOD2; Ala(-9)Val ve Ile58Thr ile SOD3 Arg202Leu gen değişimlerinin ALS ile arasında nasıl bir ilişki olduğunu belirlemektir.

Bu amaçla klinik olarak onaylanmış ALS hastalarından ve gönüllü olarak çalışmamıza katılan sağlıklı kontrollerden kan toplandı. PCR-RFLP metodu kullanılarak 124 Sporadik ALS hastası ve 124 kontrolün genotipleme yapıldı. İncelenen değişimlerden Asp90Ala mutasyonu 1 hastada homozigot olarak belirlendi. SOD1 Gly93Ala mutasyonu ise 124 hastanın hiçbirinde belirlenemedi. SOD2 Ala(-9)Val polimorfizminde ise yapılan istatistiksel analize göre hastalarla kontroller arasında allelik bir ilişki bulunamadı. Ayrıca SOD2 Ile58Thr mutasyonuna da hasta veya kontrol grubu içerisinde rastlanmadı. SOD3 Arg202Leu polimorfizmi hasta grubu içerisinde 2 kişide heterozigot formda bulundu. Kontrol grubunda ise bu değişime rastlanmadı.

Sonuç olarak daha önceki yıllarda ALS hastalığı ile ilişkisi bilinen bir mutasyon Türk ALS hastalarında da belirlenmiş oldu. Ayrıca ALS hastalığıyla hiç ilişkilendirilmeyen bir değişim olan Arg202Leu değişiminin 2 ALS hastada belirlenmesi bu değişiminde ALS hastalığı oluşumuyla ilişkisi olabileceği düşüncesini oluşturdu.

**Anahtar kelimeler :** Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Motor Nöron Hastalıkları, Süperoksit Dismutaz (SOD) Genleri, SOD1 ve SOD3 mutasyonları.

## ABSTRACT

### **Investigation of the role of the superoxide dismutase gene families in amyotrophic lateral sclerosis**

Superoxide dismutase enzymes (SOD) protecting cells against reactive oxygen species (ROS) forms a most important part of antioxidant systems. SOD family has three members: SOD1 (*CuZn-SOD*), SOD2 (*Mn-SOD*) ve SOD3 (*EC-SOD*). The physiological function of the enzyme is to protect cells metabolizing oxygen against the harmful effects of superoxide radicals. Up to now, there are numerous association studies between SOD family of genes and diseases. Of course, the most important of them is the one which involves Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and SOD1 mutations. ALS is a devastating neurodegenerative disease caused by the death of motor neurons in the late stage of life.

The aim of the thesis was to search for the SOD1 Asp90Ala and Gly93Ala mutations in the sporadic ALS patients and the controls. In addition it was to investigate the relationship between Sporadic ALS and SOD2 or SOD3 gene mutations. It appears that there are not many studies showing any association between SALS and SOD2 Ala(-9)Val polymorphism. Up to now, however no study has been found involving SOD2 Ile58Thr or SOD3 Arg202Leu polymorphism with SALS.

We collected blood from patients confirmed clinically SALS and age-matched voluntary healthy controls. By using a PCR-RFLP method, we genotyped 124 SALS patients and 124 controls. We found one A90A homozygous mutation in only one SALS patient. The Gly93Ala mutation was not found in SOD1 gene in SALS patients and controls. Statistical analysis of the data suggested that there was no allelic association between the cases and healthy controls for Ala(-9)Val polymorphisms. In addition, there was no Ile58Thr mutations in cases and controls. We had two patients with the Arg202Leu heterozygous mutation in SOD3 gene. There was no mutation in controls.

In conclusion, we found an A90A homozygous mutation in SOD1 gene in SALS patients. Moreover Arg202Leu mutation was found in SOD3 gene in SALS patients. Discovered mutations may be involved in the pathogenicity of SALS.

**Key words** : Amyotrophic Lateral Sclerosis, Motor Neuron Diseases, Superoxide Dismutase(SOD) genes, SOD1 Mutations, SOD 3 Mutations.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince kıymetli bilgileri, ilgisi ve desteği ile yanımda olan çok değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Ali SAZCI'ya,

Katkı ve yardımlarından dolayı değerli hocam Prof. Dr. Halil İDRİSOĞLU'na,

Manevi destekleri ve yardımlarından dolayı Arş. Gör. Dr. Emel ERGÜL, Arş. Gör. Dr. Gürler AKPINAR, Yrd. Doç. Dr. Murat KASAP ve Arş. Gör. Dr. Aylin KANLI'ya,

Uzun çalışma saatlerinde yardımlarıyla yanımda olan çalışma arkadaşım Arş. Gör. Mavi Deniz SÖZÜGÜZEL'e,

Tez çalışmam boyunca gösterdikleri sevgi ve hoşgöründen dolayı aileme ve yanımda olmasa da desteğini her zaman hissettiğim Ecz. M. İlker BÜYÜKÖZ'e teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	IV
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	1
1.1. AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ	1
1.1.1. Hastalığın Teşhisi	2
1.1.2. ALS Hastalığı Oluşumunda Etkili Olan Temel Nedenler	3
1.1.2.1. Genetik Nedenler	3
1.1.2.1.1. Familiyal ALS'de Genetiğin Rolü	4
1.1.2.1.2. Sporadik ALS'de Genetiğin Rolü	9
1.1.2.2. Çevresel Nedenler	16
1.1.2.2.1. Epidemiyolojik Özellikler	16
1.1.2.2.2. Ağır Metallerle Maruz Kalma	16
1.1.2.2.3. Viral enfeksiyonlar	16
1.1.2.2.4. Alternatif Teoriler	17
1.1.3. Hastalığın Histopatolojik Özellikleri	17
1.1.4. Hastalık Oluşumu	18
1.1.4.1. SOD1'in Neden Olduğu Toksikite	19
1.1.4.1.1. Peroksinitrit ve Çinko	20
1.1.4.1.2. Bakır ve SOD1 Agregatları	21
1.1.4.2. ALS'de Mitokondrinin Rolü	21
1.1.4.3. Aracı Filamentlerin Düzensizliği	23
1.1.4.3.1. Nörofilamentler	23
1.1.4.3.2. Periferin	24
1.1.4.4. Kalsiyum Homeostazisi ve Eksitotoksikite	25
1.1.4.4.1. Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler	25

1.1.4.4.2. Glutamat Reseptörleri ve Taşıyıcıları	25
1.1.4.5. Apoptoz: Planlanmış Hücre Ölümü	26
1.2. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ(ROT)	27
1.2.1. Süperoksit Dismutaz(SOD) Gen Ailesi	28
1.2.1.1. SOD Genlerinin Yapıları	29
1.2.1.1.1. SOD1( <i>CuZn</i> -SOD) Geni ve Proteini	30
1.2.1.1.2. SOD2( <i>Mn</i> -SOD) Geni ve Proteini	32
1.2.1.1.3. SOD3( <i>EC</i> -SOD) Geni ve Proteini	33
1.2.1.2. SOD Genleri Değişimleri ve ALS Hastalığı ile İlişkileri	36
1.2.1.2.1. SOD1 Değişimleri ve ALS Hastalığı ile İlişkileri	36
1.2.1.2.2. SOD2 Değişimleri ve ALS Hastalığı ile İlişkileri	38
1.2.1.2.3. SOD3 Değişimleri ve ALS Hastalığı ile İlişkileri	39
1.3. DNA VARYASYONLARI	41
1.3.1. DNA Polimorfizm Tipleri	42
1.3.1.1. Tek Nükleotit Polimorfizmleri(SNPs)	42
1.3.1.2. Değişen Sayıda Ardarda Tekrarlar Polimorfizmi	43
2. AMAÇ VE KAPSAM	44
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	46
3.1. GEREÇLER	46
3.1.1. Enzimler	46
3.1.2. Primerler	46
3.1.3. Kimyasallar	47
3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	48
3.1.4.1. DNA İzolasyon ve Çözeltileri	48
3.1.4.2. Elektroforez Solüsyonları	49
3.1.4.3. Gümüş Boyama Solüsyonları	49
3.1.5. Kullanılan Cihazlar	49
3.1.6. Etik Kurul Onayı	50
3.1.7. Hasta Grubu	50
3.1.8. Kontrol Grubu	50
3.2. YÖNTEMLER	50
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	50



3.2.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü	51
3.2.3. Genotipleme	51
3.2.3.1. PCR	51
3.2.3.2. RFLP	52
3.2.3.2.1. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektforezi	53
3.2.3.2.2. Gümüş Boyama	54
3.2.4. İstatistiksel Analiz	54
4. BULGULAR	55
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	
ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALS:	Amyotrofik Lateral Skleroz
AMN:	Aşağı Motor Nöron
<i>CuZn</i> -SOD	Bakır Çinko Süperoksit Dismutaz veya SOD1
EAATT:	Eksitator Amino Asit Taşıyıcıları
EC-SOD:	Ekstraselüler Süperoksit Dismutaz veya SOD3
FALS:	Familiyal Amyotrofik Lateral Skleroz
FTD-ALS:	Fronto Temporal Dementiya-ALS
MND:	Motor Neuron Disease (Motor Nöron Hastalığı)
Mn-SOD	Manganez Süperoksit Dismutaz veya SOD2
NF:	Nörofilament
OD:	Odds Ratio
PCR:	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PLS:	Primer Lateral Skleroz
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi)
ROT:	Reaktif Oksijen Türleri
SALS:	Sporadik Amyotrofik Lateral Skleroz
SMA:	Spinal Muscular Atrofi
SNP:	Single Nukleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
SOD:	Süperoksit Dismutaz
YMN:	Yukarı Motor Nöron

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1</b> ALS' de özgün olarak etkilenen motor nöronlar	2
<b>Şekil 1.2</b> ALS' de motor nöronların dejenerasyonunda etkili olabileceği düşünülen mekanizmalar	18
<b>Şekil 1.3</b> SOD1'in bakır aracılı olarak katalizlediği reaksiyonlar	20
<b>Şekil 1.4</b> Nörofilement yapısı	24
<b>Şekil 1.5</b> Süperoksit Dismutaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar	28
<b>Şekil 1.6</b> 21. kromozom ve SOD1 geninin kromozom üzerindeki yerleşimi	29
<b>Şekil 1.7</b> SOD1 geninin ekson ve intronları	30
<b>Şekil 1.8</b> Homodimerik insan CuZn-SOD'un kristal yapısı	31
<b>Şekil 1.9</b> 6. kromozom ve SOD1 geninin kromozom üzerindeki yerleşimi	32
<b>Şekil 1.10</b> SOD2 geninin ekson ve intronları	32
<b>Şekil 1.11</b> 4. kromozom ve SOD3 geninin kromozom üzerindeki yerleşimi	33
<b>Şekil 1.12</b> SOD3 geninin ekson ve intronları	34
<b>Şekil 4.1</b> <i>SatI</i> enzimi ile kesilen SOD1 D90A mutasyonunu içeren gen bölgesinin poliakrilamid jel görüntüsü	55
<b>Şekil 4.2</b> <i>BccI</i> enzimi ile kesilen SOD1 G93A mutasyonunu içeren gen bölgesinin poliakrilamid jel görüntüsü	56
<b>Şekil 4.3</b> <i>BswaI</i> enzimi ile kesilen SOD2 A(-9)V polimorfizmini içeren gen bölgesinin poliakrilamid jel görüntüsü	57
<b>Şekil 4.4</b> <i>EcoRV</i> enzimi ile kesilen SOD2 I(58)T polimorfizmini içeren gen bölgesinin poliakrilamid jel görüntüsü	60
<b>Şekil 4.5</b> <i>SacI</i> enzimi ile kesilen SOD3 R(202)L polimorfizmini içeren gen bölgesinin poliakrilamid jel görüntüsü	61

## ÇİZELGELER DİZİNİ

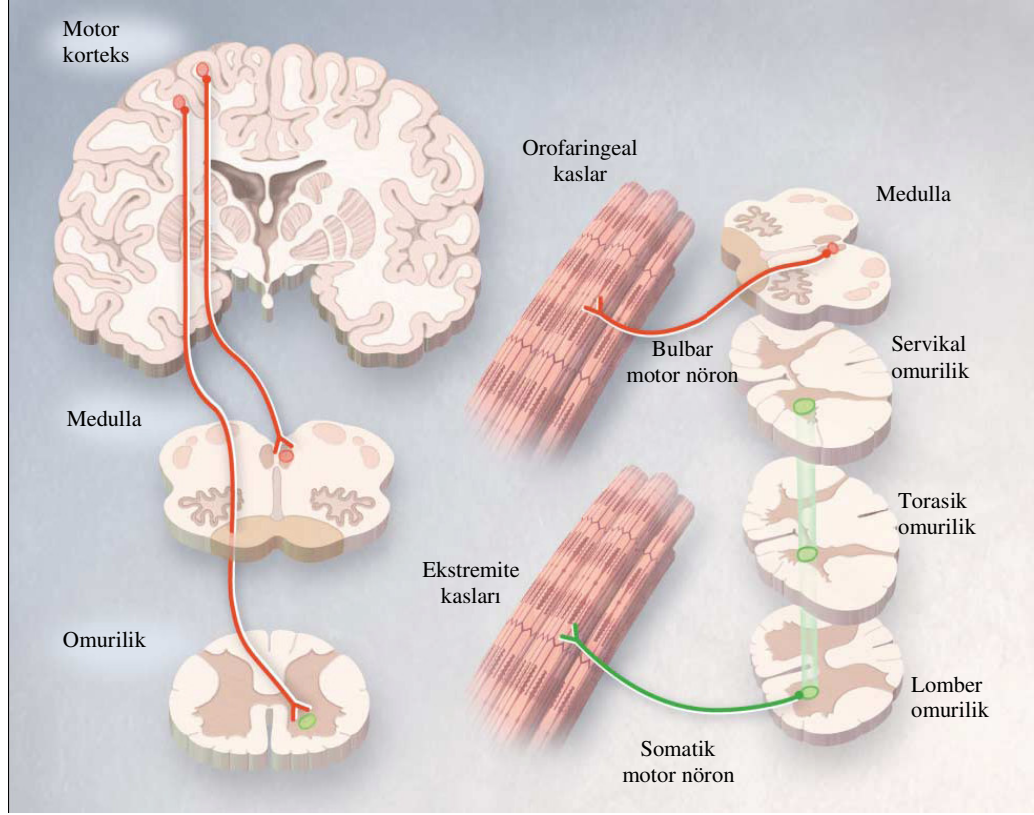
<b>Çizelge 1.1</b> Yenilenmiş El Escorial kriterleri	3
<b>Çizelge 1.2</b> FALS ile ilişkili olan genler ve kromozomlar	5
<b>Çizelge 1.3</b> ALS hastalığı ile ilişkili olabilecek diğer diğer aday genler	15
<b>Çizelge 1.4</b> SOD ailesi üyelerinin birbirinden farklı olan özellikleri	35
<b>Çizelge 1.5</b> SOD1 geni eksonlarında belirlenen mutasyonlar	37
<b>Çizelge 1.6</b> Dünya genelinde dominant kalıtmı olarak belirlenen D90A mutasyonları	38
<b>Çizelge 3.1</b> Herbir gen değişimi için kullanılan primer dizileri	46
<b>Çizelge 3.2</b> Herbir değişim için PCR reaksiyonunda seçilen annealing dereceleri	52
<b>Çizelge 3.3</b> Restriksiyon enzim kesimi için kullanılan kimyasal miktarları	52
<b>Çizelge 3.4</b> <i>CuZn</i> -SOD; D90A, G93A, <i>Mn</i> -SOD; A(-9)V, I58T, EC-SOD; R202L değişimleri için poliakrilamid jel elektroforezi koşulları	53
<b>Çizelge 4.1</b> PCR ile çoğaltılan SOD1 D90A mutasyonunu içeren gen dizisi	55
<b>Çizelge 4.2</b> Enzim kesimi sonrası oluşan bant dizileri ve uzunlukları	55
<b>Çizelge 4.3</b> PCR ile çoğaltılan SOD1 G93A mutasyonunu içeren gen dizisi	56
<b>Çizelge 4.4</b> Enzim kesimi sonrası oluşan bant dizileri ve uzunlukları	56
<b>Çizelge 4.5</b> PCR ile çoğaltılan SOD2 A(-9)V polimorfizmini içeren gen dizisi	57
<b>Çizelge 4.6</b> Enzim kesimi sonrası oluşan bant dizileri ve uzunlukları	58
<b>Çizelge 4.7</b> ALS hasta ve kontrol gruplarına göre SOD2 Ala(-9)Val polimorfizminin genotip ve allel dağılımları, $\chi^2$ , df, p ve %95 güven aralığı içinde Odds Ratio değerleri	59
<b>Çizelge 4.8</b> PCR ile çoğaltılan SOD2 I(58)T mutasyonunu içeren gen dizisi	60
<b>Çizelge 4.9</b> Enzim kesimi sonrası oluşan bant dizileri ve uzunlukları	60

<b>Çizelge 4.10</b> PCR ile çoğaltılan SOD3 R(202)L mutasyonunu içeren gen dizisi	61
<b>Çizelge 4.11</b> Enzim kesimi sonrası oluşan bant dizileri ve uzunlukları	62

## 1.GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

### 1.1. AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ

Amyotrofik lateral skleroz (ALS) geç dönemde ortaya çıkan, istemli kaslarımızın hareketinden sorumlu olan motor nöronların ölümü sonucu oluşan nörodejeneratif bir hastalıktır. İlk kez 1874 yılında Charcot tarafından tanımlanmıştır. Hastalık bu ismin dışında Lou Gehrig's Disease adıyla da bilinmektedir. *Amyotrofik*; kasların atrofisi, zayıflığı, fasikülasyonu (kas seyirmesi) anlamına gelir. Amyotrofi sonucu hastalığın alt motor nöron işaretleri oluşur. Beyin sapı ve omurilikteki alt motor nöronların dejenerasyonu kas atrofisi, kas güçsüzlüğü, fasikülasyonu ve tendon reflekslerin kaybına yol açar. *Lateral skleroz*; ise otopsi incelemeleri esnasında omuriliğin yan (lateral) kolunda hissedilen sertlik anlamına gelmektedir. Motor korteksteki motor nöronların dejenerasyonu belirgin yukarı motor nöron bozukluğuna neden olur. Yukarı motor nöron belirtilerin klinik sonuçları aşırı aktif tendon refleksleri, Hoffmann ve Balbinski belirtileri ve ardarda kas kasılması ve gevşemesi spazmları olan klonustur. ALS'nin bir varyantı olarak düşünülen Primer lateral sklerozizde (PLS) ise yalnızca yukarı motor nöron işaretleri görülür. Bu varyantla birlikte sendromlar yetişkin başlangıçlı motor nöron hastalıklarının tüm vakalarının yalnızca %10'undan sorumludur. Tipik bir ALS hastasındaki belirtiler ilk olarak ellerde veya ayaklarda güçsüzlük ya da konuşma esnasında zorlanma ve yutkunma zorluğu şeklinde olur. ALS' de ilk semptomlar vücutta hangi motor nöronların önce etkilendiğine bağlı olarak limb başlangıçlı (%75); kollarda, ellerde veya bacaklarda güçsüzlük veya bulbar başlangıçlı (%25); konuşma zorluğu, genizden konuşma ve ses volümünün kaybedilmesi, dil hareketinin kaybı şeklinde olur. Hastalık ilerleyici bir hastalıktır ve ortalama hayatta kalma süresi 1-3 yıldır (Rowland and Shneider, 2001).



**Şekil 1.1 ALS’de özgün olarak etkilenen motor nöronlar**

### **1.1.1. Hastalığın Teşhisi**

ALS hastalığını tanılayıcı özel bir test bulunmadığı için hastalığın teşhisi klinik olarak yapılır ve elektromiyografik (EMG) bulgularla da doğrulanır. Klinik teşhiste El Escorial Kriterleri önemli bir parametredir ve şu şekilde özetlenebilir.

**Çizelge1.1 Yenilenmiş El Escorial Kriterleri (YMN; yukarı motor nöron, AMN; alt motor nöron)**

<b>Klinik olarak kesin ALS</b>	<b>En az 3 farklı bölgede klinik YMN ve AMN belirtileri</b>
<b>Klinik olarak muhtemel ALS</b>	En az 2 farklı bölgede klinik YMN ve AMN belirtileri (Bazı YMN belirtilerinin AMN belirtilerine göre daha rostral olması şartıyla)
<b>Laboratuvar destekli muhtemel ALS</b>	-Bir bölgede klinik YMN ve AMN belirtilerine ek olarak, iki veya daha fazla bölgede AMN belirtilerinin elektrofizyolojik tespiti -Bir bölgede klinik YMN belirtilerine ek olarak, iki veya daha fazla bölgede AMN belirtilerinin elektrofizyolojik tespiti
<b>Olası ALS</b>	-Sadece bir bölgede klinik YMN ve AMN belirtileri -En az iki farklı bölgede klinik YMN belirtileri -YMN belirtilerine göre rostral AMN belirtileri (Başka bölgelerde elektrofizyolojik AMN bulguları olmaması şartıyla)

ALS'de alt motor nöronlardaki anomaliler elektromiyografik demonstrasyonlarla doğrulanır. Elektromiyografi yöntemi canlı olan motor nöronların miktarını gösteren bir yöntemdir (Rowland and Shneider, 2001).

### **1.1.2. ALS Hastalığı Oluşumunda Etkili Olabilecek Temel Nedenler**

#### **1.1.2.1. Genetik Nedenler**

ALS olgularının %90-95'i sporadiktir (Sporadik ALS-SALS). Hastalığın geri kalan %5-10'luk bölümü ise genetik geçişli ya da aileseldir (Familiyal ALS-FALS). Bu ailesel geçiş otozomal dominant veya otozomal resesif ya da X'e bağlı olabilir. SALS ile FALS'ın klinikteki görüntüsü birbirine çok benzemektedir. Bununla beraber ikisi arasında bir takım farklılıklar vardır. Örneğin; FALS'da hastalık başlangıç yaşı SALS'a göre yaklaşık 10 yıl daha erkendir. FALS'da kadın:erkek oranı 1:1, SALS'da ise 1:1.7'dir. Ama SALS'daki bu oran yaşla beraber değişir ve 70 yaşından sonra 1:1 olur (Hand and Rooleau, 2002).



1993 yılında Rosen et al. familiyal vakaların %20'sinde Superoksit Dismutaz1 (SOD1) enzimini kodlayan gende pekçok mutasyon belirlemiştir. Kalan %80'lik familiyal kısma da diğer genlerdeki mutasyonların neden olduğu düşünülmektedir. Yapılan araştırmalar sonucu SALS hastaların %5'nin SOD1 geninde mutasyonlara sahip olduğu bulunmuştur. Günümüzde ALS hastalığıyla ilişkilendirilmiş yaklaşık 124 farklı SOD1 mutasyonu tespit edilmiştir ([http://alsod.iop.kcl.ac.uk/Als/reports/allMutations.aspx?gene\\_id=SOD1](http://alsod.iop.kcl.ac.uk/Als/reports/allMutations.aspx?gene_id=SOD1)). Bulunan tüm bu SOD1 mutasyonları dominanttır. Ancak pozisyon 90'da bulunan aspartat (Asp) amino asitinin alanine (Ala) dönüşümü mutasyonu (D90A) dominant veya resesif olabilir (Jonsson et al. 2002). Pozisyon 4'deki alanin (Ala) amino asitinin valin (Val) amino asitine dönüştüğü SOD1 mutasyonu (A4V) bugüne kadar belirlenen SOD1 mutasyonları içinde en yaygın olarak rastlanılanıdır. ALS hastalarında farklı SOD1 mutasyonları farklı sendromlara neden olmaktadır. Örneğin hastalık penetransı; genellikle %100'dür ancak bazen azalır, eritrositlerdeki SOD1 aktivitesi; genelde normaldir ancak bazen azalır, hastalığın ortaya çıkma yaşı; genelde 40 yaşından sonradır. Ancak bazen daha genç yaşlarda da görülebilir, hayatta kalma süresi; bu süre 1-20 yıl arasında değişir, klinik belirtiler; spinal veya bulbar olarak değişebilir (Rowland and Shneider, 2001).

Familiyal ve sporadik olarak gözlenen ALS hastalığı günümüzde SOD1 geni dışında birçok yeni gen ve kromozom bölgesiyle ilişkilendirilmiştir.

#### **1.1.2.1.1. Familiyal ALS'de Genetiğin Rolü**

Bugüne kadar sekiz farklı FALS lokusu ve altı ALS ilişkili gen, ilişkilendirme çalışmaları ve pozisyonel klonlama gibi genetik analiz yöntemleriyle belirlenmiştir. Bu çalışmalarda bulunan sonuçlar Çizelge 1.2'de özetlenmiştir.

**Çizelge 1.2 FALS ile ilişkili olan genler ve kromozomal yerleşimleri**

<b>FALS/MND</b>	<b>Gen</b>	<b>Kromozomal yerleşim</b>
<i>Yetişkin başlangıçlı dominant tipik ALS</i>		
<b>ALS1</b>	SOD1	21q22.1
<b>ALS3</b>		18q21
<b>ALS6</b>		16q12
<b>ALS7</b>		20ptel-p13
<i>Yetişkin başlangıçlı dominant atipik ALS</i>		
<b>ALS ve FTD</b>		9q21-22
<b>ALS-dementia-PH</b>	MAPT	17q21.1
<b>Progresif AMN</b>	DCTN1	2p13
<b>ALS8</b>	VAPB	20q13.3
<i>Erken başlangıçlı Resesif ALS</i>		
<b>ALS4</b>	SETX	9q34
<i>Erken başlangıçlı Resesif ALS</i>		
<b>ALS2</b>	ALS2	2q33
<b>ALS5</b>		15q15.1-q21.1

Çizelgede 1.2’de de görüldüğü üzere FALS’nin dominant ve resesif formları bulunmaktadır. Bugüne kadar bulunan genlerden yalnızca biri (SOD1) tipik yetişkin başlangıçlı ALS’ye neden olur. Yapılan yoğun çalışmalara rağmen ALS ile ilgili sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bu çalışmaların sonuçları hastalığın tedavisi bakımından henüz yeterli başarıya ulaşacak şekilde sonuçlanmamıştır. Bunun nedeni olarak ilişkilendirme analizlerinde yeterli istatistiksel güce ulaşmak için geniş ailelere olan ihtiyacı sayabiliriz. Ancak geç yaşlarda başlayan, yaşa bağlı penetransı olan ve hayatta kalma süresi kısa olan bu hastalıkta böyle bir ortam oluşturmak güçtür.

## ⇒ALS1

1991 yılında Siddique et al.'un ailesel olguların bir kısmını **21.** kromozomla ilişkilendirmesinden sonra 1993 yılında yine aynı grup bu bölgedeki genin SOD1 geni olduğunu bulmuş ve bu gende hastalıkla ilişkili olabilecek 11 missense mutasyon belirlemişlerdir. Günümüzde SOD1 geninin eksonik ve intronik bölgelerinin incelenmesi sonucu SOD1 genindeki mutasyonların FALS vakalarının yaklaşık olarak %15-20'sinden ve tüm ALS vakalarının da %1-2'sinden sorumlu olduğu bulunmuştur. ALS'nin Charcot tarafından tarif edilmesinden 124 yıl sonra elde edilen bu bulgu hastalık mekanizmasının anlaşılması ve uygun tedavi şeklinin geliştirilmesi açısından önemli bir dönüm noktasıdır. SOD1 ilişkili ALS vakalarının klinik özellikleri ile SOD1 mutasyonu taşımayan ALS vakaları arasında hiçbir fark yoktur (Camu et al. 1999).

## ⇒ALS2

Otozomal resesif bir kalıtım gösteren ALS2 juvenil dönemde başlayan bir ALS tipidir. Ortaya çıkış sebebinin 2. kromozomda bulunan ve aslin adlı proteini kodlayan ALS2 genindeki mutasyonlar olduğu gösterilmiştir. Bu genin ürünü olan aslin, bir GTPaz regülatörüdür. ALS2 olgularında hastalık çoğunlukla on yaşından erken başlar ve çok yavaş bir seyir izler (Hanado et al. 2001).

Erken başlangıçlı resesif ALS2 lokusunun **2.** kromozomdaki tarifi ilk kez 1994 yılında Hentati et al. tarafından yapılmıştır. ALS2 geni pozisyonel klonlama yöntemiyle Arap kökenli ailelerde üzerinde identifiye edilmiştir. Bu aileler kol, yüz ve yutak kaslarında ilerleyici sürekli kasılma (spastisite) durumu sergilemişlerdir. Bu ailede belirlenen mutasyon yeni bir gende tek bir baz çifti delesyonudur. Böyle bir dizinin ekspresyonu sonucu yapısı bozulmuş bir protein (alsin) sentezlenir. ALS2 genindeki mutasyonlar farklı fakat motor nöronlardaki nörodejeneratif hastalıklara benzer belirtilerden sorumludur (Gros-Louis, 2006).

### ⇒ ALS3

En az 20 etkilenmiş üyesi bulunan büyük bir Avrupalı ailede SOD1 geni taraması sonucu hiçbir mutasyona rastlanmamış ancak otozomal baskın bir pedigrigösteren bu ailede tüm genom taraması sonucu **18q21** kromozom ile ilişkilendirilmiştir. Etkilenmiş aile üyelerinin her biri tipik ALS belirtileri göstermiştir. Bu vakalarda yukarı motor nöron ve alt motor nöron işaretleri dört eksremitede de zayıflık şeklindedir. Hastalık başlangıç yaşı 45 ve hayatta kalma süreleri de ortalama 5 yıldır. Aday gen çalışmaları devam etmekle beraber sorumlu gen tam olarak belirlenememiştir (Gros-Louis, 2006).

### ⇒ ALS4

Başka bir otozomal baskın geçiş gösteren FALS tipi ise ender görülen ALS-4'tür. Genç yaşlarda başlayan bu hastalığın ilerlemesi yavaş bir seyir gösterir. ALS hastalarının çoğunun aksine bu tip hastalar daha normal bir yaşam sürerler. Nefes alıp verme yeteneklerini kaybetmezler. Hastalığın bu formundan sorumlu olan bölgenin **9.** kromozomdaki SETX geni ve üzerindeki üç missense mutasyon olduğu gösterilmiştir. SETX geni senataksin adı verilen bir protein kodlamaktadır. Bu proteinin görevi tam olarak bilinmemekle beraber DNA/RNA helikaz aktivitesine sahip bir bölgesi olduğu gösterilmiştir. Mutasyonlar sonucu proteinde meydana gelen değişimlerin helikaz aktivitesini ya da RNA editing deki değişim aşamalarını bozarak nöronal dejenerasyona yol açtığı düşünülmektedir (Chen et al. 2004).

### ⇒ ALS5

Otozomal çekinik ALS5'in özellikleri genç başlangıçlı (8-18yaş) olması ve yavaş bir seyir göstermesidir. ALS5 ilişkili aileler tipik ALS özellikleri gösterirler. Bu hastalık Kuzey Afrika ve Avrupa popülasyonunda gözlenmiştir. ALS2 hastalığıyla karşılaştırıldığında kol, yüz ve dil kaslarında sürekli kasılma gözlenmez. Kuzey Afrika, Tunus ve Almanya'dan farklı ailelerle yapılan tüm genom taraması sonucu ALS5 **15.** kromozomla ilişkilendirilmiştir (Hentati et al. 1998).

## ⇒ ALS6

FALS'nin bu tipi geç başlangıçlı ve otozomal baskın bir kalıtım gösterir. ALS tanısı konup SOD1 geni mutasyonu taşımayan vakalar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu **16.** kromozomda yeni bir ALS lokusu bulunmuştur. Bugüne kadar ALS6 ile ilişkilendirilen tüm aileler farklı orjinlerdendir ve tek tip bir hastalık haplotipi göstermezler. Bu nedenle aday gen bölgesinde birden fazla gen veya mutasyonun ALS6'dan sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

## ⇒ ALS7

Amerika'da SOD1 geni üzerinde herhangi bir mutasyon taşımayan 16 FALS pedigrisi üzerinde yapılan çalışmalar sonucu **20.** kromozom ile ilişkilendirilmiş yeni bir ALS lokusu bulunmuştur. FALS'nin bu tipi ile ilgili bulgular farklıdır ve aydınlatılması için daha geniş ailesel vakaların taranması gerekmektedir (Gros-Louis et al. 2006).

## ⇒ ALS8

Bu ALS tipi aynı zamanda "Atipik ALS" olarak da bilinir. Brezilya'lı büyük bir ailede tüm genom tarama testi sonucu **20q13.33** bölgesi ile ilişkilendirilmiştir. Geç başlangıçlı otozomal baskın bir geçiş gösterir. Bu tip ALS ile ilgili olarak daha sonra yapılan aday gen çalışmaları sonucu VAPB (Vesiküle bağlı-membran proteini/ sinaptobrevine-bağlı membran proteini B) geni üzerinde P56S missense mutasyonu belirlenmiştir. Hastalık fenotipi; yavaş seyir göstermesi, tüm hastalarda alt motor nöron işaretleri, kramplar ve sinir veya kas liflerinin bir araya gelip oluşturdukları demetler olan fasikülasyonların olmasıdır. Ayrıca atipik belirtiler olarak essential tremore (titreme) ve sadece alt motor nöron belirtilerin bulunması ile tipik ALS'den ayrılır (Nishimura et al. 2004).

## ⇒ Frontotemporal Dementialı ALS (FTD-ALS)

İlk kez 1975 yılında FTD-ALS birlikteliği rapor edilmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar sonucu bu durum **9q21-q22** bölgesi ile ilişkilendirilmiştir. Böyle aileler ya FTD-ALS birlikte veya sadece ALS ya da FTD'lı bireyler bulundurur. Hastalığı taşıyan bireylerde klinik özelliklerdeki geniş dağılım diğer genetik veya çevresel faktörlerin fenotipi değiştirebileceğini düşündürür. Hastalık yetişkin dönemde başlar, otozomal baskın ailesel geçiş gösterir. Ayrıca sporadik olarak ortaya çıktığı vakalar da vardır (Hosler et al. 2000).

## ⇒ Frontotemporal Dementia-Parkinson-ALS

Motor nöron dejenerasyonu bazen Parkinson hastaları veya demanslı olan hastalarda da gözlenebilir. Bu türün patolojik özellikleri Guam adasında görülen ALS-Parkinson-dementia kompleksinden veya 9. kromozomla ilişkilendirilen ALS-FTD'dan ayrıdır. Mikrotübül ilişkili tau (MAPT) geninde meydana gelen mutasyonlar frontotemporal dementia ve Parkinson hastalığı ile ilişkilidir. Bu mutasyonlar intronik bölgede olabileceği gibi splizing alanlarında veya missense mutasyonlar şeklinde de olabilir. MAPT mutasyonu taşıyan hastalar klinik ve patolojik farklılıklar olabilir. Ayrıca MAPT geninde mutasyona sahip olan tüm hastalar ALS semptomları göstermez (Gros-Louis et al. 2006).

Bu duruma karşıt olarak epidemiyolojik bulgular ALS hastalarının yakınlarında ailesel demans ve parkinsonizm birlikteliğinin sık olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak bazı vakalarda üç kompleksin birlikte görülmesi ALS, demans ve parkinsonizmde ortak genetik faktörlerin etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu da yaygın bir nörodejenerasyona olan ailesel yatkınlığın bir göstergesi olabilir.

### 1.1.2.1.2. Sporadik ALS'de Genetiğin Rolü

Familiyal ve sporadik ALS klinik olarak birbirinden ayırt edilemez. Ancak iki grup arasında küçük ve ilginç bazı farklılıklar vardır. Örneğin; familiyal vakalarda hastalık başlangıç yaşı ortalaması sporadik vakalara oranla 10 yaş daha erken olup

yaklaşık 46 iken, familial vakalarda hastalık başlangıç yaşı ortalaması yaklaşık 56'dır. FALS'da kadın:erkek oranı 1:1 iken SALS'da bu oran 1:1.5'dir. Bu oran 70 yaşından sonraki hastalar arasında 1:1'e yaklaşır.

- **SOD1**

SOD1 mutasyonu FALS vakalarının %10-15 ile ilişkilendirilmiştir. SALS hastalarında SOD1 mutasyonu taramaları sonucu bu vakaların %1-7'sinde SOD1 mutasyonlarına rastlanmıştır. Bugüne kadar tarif edilen bütün SOD1 ilişkili SALS vakaları ile SOD1 mutasyonu taşımayan SALS hastalarını birbirinden ayıracak fenotipik karakteristik bir farklılık bulunmamaktadır. Ancak SOD1 ilişkili SALS hastalarında hastalığın ortalama başlangıç yaşı 41.4'dir. Yani bu değer SOD1 mutasyonu taşımayan SALS hastalarının ortalamasından 10 yaş daha düşüktür. Sporadik ALS'de en sık rastlanan SOD1 mutasyonu I113T mutasyonudur. SALS ile ilişkilendirilen bazı mutasyonlara FALS vakalarında da rastlanması SALS vakalarının gerçekten sporadik mi olduğu konusunda bazı şüpheler de doğurmaktadır.

- **Dinaktin (DCTN1)**

Dinaktin farklı alt birimlerden oluşan büyük bir protein kompleksidir. Bu kompleks en az 7 farklı polipeptiden oluşur. Polipeptitler vesiküllerin nöronlar boyunca taşınımı esnasında hem mikrotübüllere hem de sitoplazmik dineinlere bağlanırlar. DCTN1 dinaktin proteinin en büyük alt birimini oluşturur. En az 32 eksonu vardır. DCTN1 genindeki tek bir baz değişimi pozisyon 59'da serin amino asitini glisin amino asitine dönüştürür. Bu değişim dinaktinin mikrotübüllere direk bağlanma bölgesi olan p150 alt biriminde meydana gelir. DCTN1 geninin p150 alt biriminde meydana gelen mutasyonların atipik ALS özellikleriyle ilerleyici alt motor hastalıklara neden olduğu gözlenmiştir (Munch et al. 2004). Daha sonraki yıllarda DCTN1 geninde 3 tanede daha missense mutasyonu belirlenmiştir. Ancak DCTN1 mutasyonlarının ALS hastalığıyla ilişkisi SOD1'deki gibi kesin değil, tartışmaya açık bir konudur (Gros-Louis et al. 2006).

## • Nörofilamentler

Nörofilamentler, aksonal taşımada, sinir hücreleri şeklinin ve çapının belirlenmesinde rol oynayan ağır, orta ve hafif alt ünitelerden oluşan proteinlerdir. Nörofilamentlerin anormal birikimi ALS, Alzheimer, Parkinson hastalığı gibi pek çok nörodejeneratif hastalıkta gözlenen patolojik bir özelliktir (Gros-Louis et al. 2006). SOD1 ile uyarılan toksisitenin muhtemel hedefleri arasında nörofilament proteinleri de vardır. Geniş çaplı ve nörofilamentlerce zengin olan motor aksonlar insan ALS'inde özellikle etkilenmektedir.

Hem sporadik ALS'de hem de familial vakalarda SOD1 geni susturulmuş farelerde olduğu gibi motor nöronların proksimal aksonlarında ve hücrelerde nörofilamentler birikir. Nörofilamentlerdeki anomaliler nörodejenerasyonun yan ürünleri olabileceği gibi nörodejenerasyona da neden olabilirler. Nörofilamentlerin hastalık oluşumunda rol alabileceği düşüncesi ile mutant veya yabancı tip altbirimlerin artmış ekspresyonu gözlemlenmiş, sonuç olarak motor nöronların fonksiyon kaybı ve aksonlarda dejenerasyon belirlenmiştir. Ayrıca ALS hastalarında gözlenene benzer şekilde nörofilamentlerin şişkinliği de gözlenmiştir (Rowland and Shneider, 2001).

Nörofilamentlerin normal dışı ekspresyonlarının neden motor nöronlarda dejenerasyona neden olduğu henüz netleşmemiştir. Organizasyonu bozulan nörofilamentler, aksonların bakımı için gerekli olan moleküllerin aksonal taşınımına engel olabilir. Nörofilamentlerdeki böyle anomaliler mutant SOD1'in toksik etkisi sonucu oluşuyor olabilir. SOD1'de bir mutasyon taşıyan farede nörofilamentlerin hafif alt biriminin ekspresyonunun elimine edilmesi veya nörofilamentlerin ağır alt biriminin overekspresyonunun hastalığı iyileştirdiği gözlenmiştir. Aksonal nörofilamentler mutant SOD1'in toksik etkilerinin hedefleri olabilir. Bu durum azalmış aksonal filament sayısının neden koruyucu olduğunu da açıklar. Ayrıca motor nöron hücrelerinde nörofilamentlerin birikimi tamponlayıcı kalsiyum yoluyla SOD1 aracılı hasara karşı koruyucu veya çinkonun bağlanabilirliğini azaltıcı olabilir (Gros-Louis et al. 2006).



## • Periferin

Periferin ilk olarak 1984 yılında Portier et al. tarafından tanımlanmış tipIII aracı (intermediate) filamenttir. Memelilerin çevresel sinir sistemi hücrelerinde hücre iskelet proteini olarak bulunur (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sporadik ALS hastalarında ve SOD1 mutasyonu taşıyan farelerde nöronal inklüzyonlarda nörofilamentlerle beraber bulunur.

Periferin normalde motor nöronlarda eksprese edilir. Fakat periferin seviyesi hücrel bir incinme veya iltihaba bağlı olacak şekilde uyarılan sitokinlere bir cevap olarak artar. Farelerde periferin proteininin ekspresyonundaki artış seçici olarak motor aksonların dejenerasyonunu arttır. Nörofilamentlerin hafif alt ünitelerinin mRNA seviyesi SALS hastalarının nöronlarında anormal derecede düşüktür. Bu alt birimi bulunmayan farelerde ve aynı zamanda periferinin aşırı ekspresyonu olduğunda seçici motor nöronların ölümü belirgin bir özellik olarak bulunmuştur. Bu nedenle bir inflamasyondan veya nöronlarda oluşan bir hasardan sonra periferin ekspresyonunun artması hafif altbirimin yokluğunda nörofilamentlerin ağır ve orta ağırlıktaki alt birimlerinin etkileşimi yoluyla motor nöron hastalığa neden olabilir. Bu da toksik agregatların oluşumuna yol gösterebilir. Gözlemler periferin proteininin normalden fazla miktardaki ekspresyonunun niçin yalnızca nörofilamentlerce zengin motor nöronları öldürüp, nörofilamentleri eksprese etmeyen duyu nöronlarının etkilenmeyişinin bir nedeni olabilir (Rowland and Shneider, 2001).

## • Vasküler Endotel Hücresi Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF ilk kez tümör dokudan salgılanan bir protein olarak keşfedilmiştir. Bu protein yeni kan damarları ve damarsal geçirgenliği attırır ve önemli bir damarlanma (anjyogenez) faktörüdür. VEGF ile ALS'nin ilk kez ilişkilendirilmesi 2001 yılında hayvan modellerinde Vegf'in promotor bölgesinde bulunan hipoksiden sorumlu elementte(hipoxia response element) bir delesyonun olması sonucu kaslarda güçsüzlük, atrofi ve alt motor nöronların dejenerasyondan kaynaklanan ölümüne neden olduğunun gözlenmesiyle olmuştur (Gros-Louis et al. 2006). Azalmış VEGF seviyesinin farelerde ALS'ye benzer motor nöron dejenerasyonunu ortaya çıktığı

gösterilmiştir. İnsanda yapılan araştırmalarda da VEGF geninin promotör bölgesinde bazı genotiplere sahip homozigot olan bireylerin 1.8 kat daha fazla ALS riski taşıdıkları bulunmuştur. Ayrıca ALS hastalarında ve söz konusu riskli genotipe (AAG/AAG veya AGG/AGG) sahip hastalıklı bireylerde, VEGF plazma düzeylerinin önemli ölçüde düştüğü görülmüştür (Lambrechts et al. 2003). Bu mekanizma ile ilgili öneriler arasında sürekli nöronal iskemi ve VEGF'in motor nöronlardaki direk besleyici etkisinin kaybı gibi teoriler sonucu VEGF'in sadece anjiyogenik bir faktör değil insanda ve farede motor nöron dejenerasyonunda rol oynayan önemli bir faktör (modifier gen) olduğu düşünölmektedir.

#### • **Glutamat Eksitotoksitesisi**

Eksitotoksik mekanizmalar ALS patogenezinde rol oynadığı düşünölen faktörlerdendir. Bunu kanıtlayan gözlemler mevcuttur. 1990 yılında Rothstein et al. ALS hastalarında anormal bir eksitator amino asit metabolizması belirlemişlerdir. Daha sonra yapılan araştırmalar sonucu ALS hastalarında, motor nöron sistemindeki temel eksitator nörotransmitter olan glutamat miktarı serebrospinal sıvılarda artmış, buna karşın beyin ve omurilikteki glutamat taşınımı azalmış olduğu belirlenmiştir. Glutamat taşıyıcılarından eksitator aminoasit taşıyıcısı 2 (EAAT2) ve glutamat reseptörlerinden  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionik asit (AMPA), bu durumdan sorumlu olduğu düşünölen moleküllerdir (Kawahara et al. 2004).

#### • **Silinar Nörotrofik Faktör (CNTF)**

Spinal motor nöronlarda önemli bir nörotrofik faktör olan CNTF'nin azalmasının ALS oluşumuna katkısı olabileceği düşünölmektedir. ALS hastalarının kortikospinal nöronlarında CNTF düzeyinde azalma tespit edilmiştir. Ayrıca CNTF geni susturulmuş farelerde CNTF geni ekspresyonunun ortadan kaldırılmasının ilerleyici motor nöron dejenerasyonuna yol açtığı görülmüştür.

- **SMN Proteini (Survival Motor Nöron)**

Survival motor nöron geni ürünün de ALS'deki motor nöron dejenerasyonunda rol aldığı düşünülmektedir. Bazı araştırmacılar hızla ilerleyen alt motor nöron belirtilerine sahip bazı hastalarda SMN genin sentromerik tipinin (SMN2) delesyonlarının çok yüksek oranda olduğunu tespit etmişlerdir. SALS hastalarında da SMN2 delesyonlarının sık olduğu gösterilmiştir. Bu delesyonların yatkınlık nedeni olabileceği düşünülmektedir (Türk Nöroloji Dergisi, 2005).

- **Diğer Aday Genler**

⇒ **Apolipoprotein E (APOE)**

APOE geninin Alzheimer, Parkinson ve multipıl skleroz gibi diğer nörodejeneratif hastalıklarda risk faktörü olduğu belirlendikten sonra ALS hastalığı ile de ilişkisi olabileceği düşüncesiyle araştırmalar yapılmış ve APOE ε4 genotipinin ALS için bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir (Dory et al. 2001; Lacomblez et al. 2002; Li et al. 2004).

⇒ **DNA tamir enzimi apürinik/apirimidinik endonükleaz (APEX)**

DNA hasarının ALS etiyolojisinde önemli bir rolü olabileceği konusunda görüşler olması dolayısıyla bir DNA tamir enzimi olan apürinik/apirimidinik endonükleaz geni incelenmiştir. Ancak APEX geninde meydana gelen mutasyonlar ALS hastalarının büyük bir kısmı için geçerli olmadığı belirlenmiştir (Gros-Louis et al. 2006).

⇒ **Anjiyogenin (ANG)**

ANG geni, APEX genine 237 kilo baz yakınlıkta bulunmaktadır ve yeni kan damarları oluşumunda potansiyel bir araçtır. Bu yanıyla da ALS hastalığı gelişiminde risk faktörleri içinde sayabileceğimiz VEGF'e benzemektedir. Yapılan

arařtırmalar sonucu ALS ile arasında allelik bir iliřki olabileceđi dūřınılmektedir (Greenway et al. 2004).

#### ⇒Hematokromatoziz (HFE)

ALS' den etkilenmiř dokularda demir iyonunda bir artıř belirlenmesinden sonra ALS gibi nōrodejeneratif bir hastalıkta demir birikimi prosesinin etkili olabileceđi dūřuncesi oluřmuřtur. Bugūne kadar bilinen HFE geni mutasyonları hemotokromatoz hastalarıyla iliřkilendirilmiřtir. Ayrıca yapılan çalıřmalar sonucu bu gendeki ender bir polimorfizm SALS ile iliřkilendirilmiřtir (Gros-Louis et al. 2006).

#### Çizelge 1.3 ALS hastalığı ile ilişkili olabilecek diğer aday genler.

Genler	alışmalar	Sonuçlar
APOE	Dory et al. 2001	APOEε4 allelinin ALS hastalarının hayatta kalma sūresiyle iliřkili olduđu bulunmuřtur.
	Lacomblez et al. 2002	APOE'nin hastalıđın ilerleyiřinde bir marker olabileceđini ileri sūrūlmūřtur.
	Li et al. 2004	APOE ALS hastalığının başlangıç yaşıyla ilişkili bulunmuştur.
APEX	Kisby et al. 1997	SALS hastalarının frontal korteksinde APEX enziminin miktarında azalma olduğu belirlenmiştir.
ANG	Greenway et al. 2004	ALS hastalarında ANG geni ile alelik bir ilişki saptanmıştır.
HFE	Goodall et al. 2005	HFE geninde meydana gelen ender bir polimorfizmin SALS ile ilişkisi olduğu rapor edilmiştir.

## **1.1.2.2. Çevresel Nedenler**

### **1.1.2.2.1. Epidemiyolojik Özellikler**

ALS hastalığı sporadik ve familiyal olmak üzere iki şekilde görülebilir. Hastalığının görülme sıklığı 100.000'de 0.4-1.8 olarak belirlenmiştir. Bu oran dünya genelinde pek değişmez. Ancak özellikle Guam pasifik adasında ve Japonya'nın Kii yarımadasında hastalık yüksek bir dağılıma sahiptir (Gros-Louis et al. 2006). Nöropatolog Harry Zimmerman II. Dünya Savaşı boyunca Guam adasında ALS, Parkinson ve demans hastalıklarında doğal olmayan bir sıklık olduğunu belirtmiştir. Araştırmalar Guam adasında ALS hastalığı sıklığının dünya üzerindeki diğer yerlere benzemeyen şekilde 50 kat daha fazla olduğunu göstermiştir (Rowland and Shneider, 2001).

### **1.1.2.2.2. Ağır Metaller Maruz Kalma**

Pek çok nörolog ALS hastalarında kanda ve idrarda civa, kurşun ve arsenik miktarının ölçümü için testler düzenlemiştir. Buna rağmen ALS' ye arsenik veya civanın neden olduğu yönünde bir bulgu yoktur.

### **1.1.2.2.3. Viral Enfeksiyonlar**

Sürekli viral enfeksiyonlara maruz kalmak SALS'nin nedenleri arasında olabilir düşüncesiyle Berger et al. ALS hastalarının omuriliklerini incelemiş ve hastaların omuriliklerinde enterovirüs RNA'sına rastlanmıştır. Fakat bu bulgular daha sonra doğrulanmamıştır. Poliovirüslerde dahil olmak üzere viral enfeksiyonların hastalık oluşumundaki rolüyle ilgili bir ilişki henüz kurulamamıştır (Rowland and Shneider, 2001).

#### **1.1.2.2.4. Alternatif Teoriler**

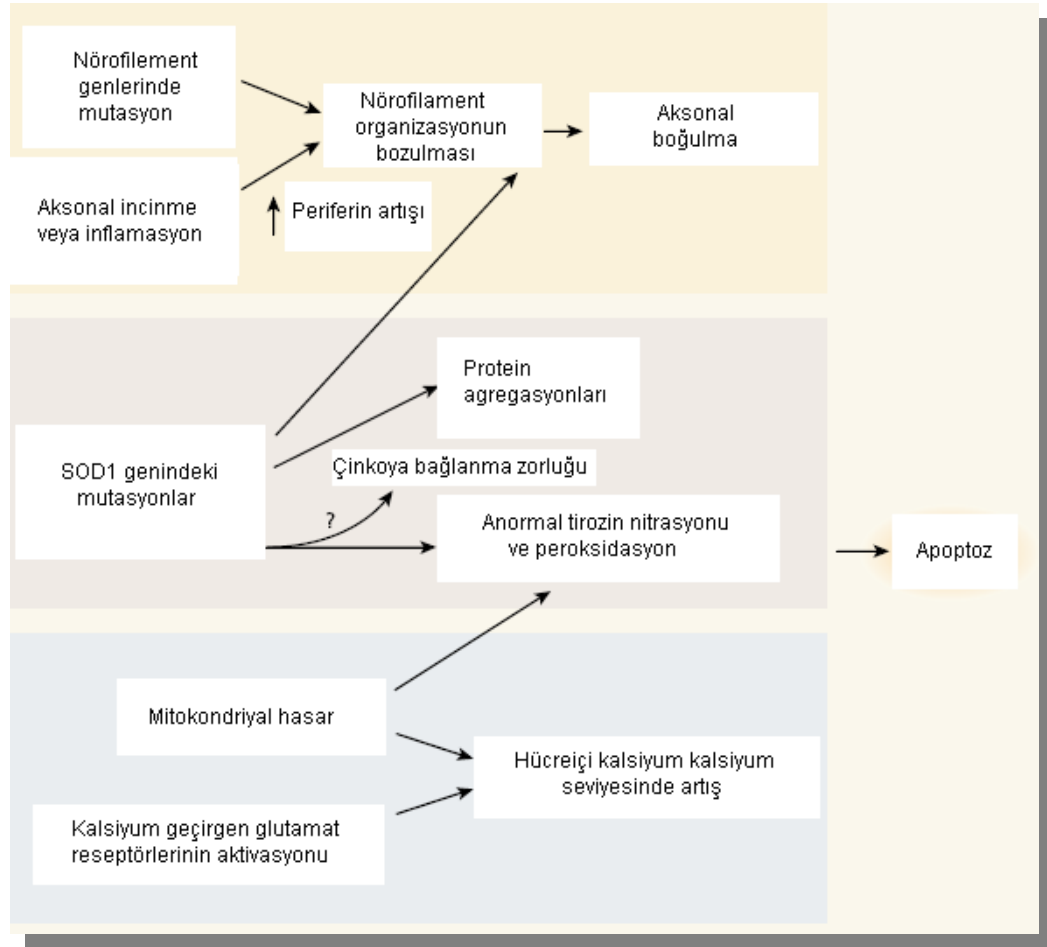
Otoimmüitenin ALS patogenezinde rol alabileceği teorisi üzerine yapılan incelemeler sonucu ALS hastalarının omuriliklerinde motor nöronlara karşı IgG antiadilerine sahip olan aktive edilmiş mikroglia ve T hücreleri bulunmuştur (Appel, 1999). Appel'e göre SALS hastalarında voltajla açılan kalsiyum kanallarına karşı olan antiadiler hücrenin kalsiyum regülasyonuna engel olarak motor nöronların dejenerasyonuna neden olabilirler. Tüm bu bulgulara rağmen ALS hastalarında immünoterapinin etkili bir tedavi şekli olmadığı gözlenmiştir (Hand and Rooleau. 2002). Bu nedenle bir otoimmünite olay ALS' nin nedenidir teorisi tartışmaya açık bir teoridir (Rowland and Shneider, 2001).

#### **1.1.3. Hastalığın Histopatolojik Özellikleri**

ALS hastalığının histopatolojik özellikleri beyinde astrosit hücrelerinin fazla üretimi (astrositik gliyoz) ile birlikte motor nöronların kaybı ve dejenerasyonudur. Dejenere olan sinir hücrelerinde ve sinir sistemi destek dokusu hücreleri olan gliyalarda nöronlar içi kalıntılar görülür. ALS'de gözlenen nöronlar içi kalıntılar Bubina cisimciği, ubikutinlenmiş kalıntılar, Lewy cisimciğine benzer kalıntılar, kümeleşmiş hiyalin kalıntıları ve ileri derecede glikozillenmiş son ürünlerdir. Benzer kalıntı bulguları ALS hastalarında ve ALS-demanslı vakalarda da görülmüştür (Rowland and Shneider, 2001). Ayrıca ALS hastalarında ve mutant SOD1 geni taşıyan transgenik farelerde mitokondri morfolojisinde de anomaliler bulunmuştur. Mitokondri morfolojisindeki bu anomaliler, genişlemiş ve organizasyonu bozulmuş mitokondri kristalleri, mitokondri dış membranının sızdırmaya başlaması ve zamanla yapısının tamamen bozulması ile birlikte mitokondri kalıntıları taşıyan erken vakuollerin oluşumu şeklindedir. Bazı hastalarda golgi cisimciğinde parçalanmalar da bulunmuştur.

### 1.1.4. Hastalık Oluşumu

ALS hastalığında motor nöronların ölüm nedeni olarak tek bir etken sayılamaz. Çünkü yapılan araştırmalar sonucu araştırmacılar, ALS hastalığının multifatöriyel bir hastalık olduğu görüşünde birleşmiştir. Aşağıda açıklanacak moleküler yol izlerinin her biri hastalığın oluşumuna katkısı olabileceği düşünülen etkenlerdir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 ALS'de motor nöronların dejenerasyonunda etkili olabileceği düşünülen mekanizmalar (Rowland and Shneider, 2001).

#### 1.1.4.1. SOD1' in Neden Olduğu Toksikite

Sporadik ve familiyal ALS'nin klinik ve patolojik olarak benzer olması hastalığın genel bir oluşum sebebi olduğunu düşündürür. ALS hastalarının yalnızca %2'si süperoksit dismutaz 1 (SOD1) geninde mutasyona sahip olsalar da bu mutasyonların bulunması hastalığı oluşum sebebini anlamada ilk moleküler işaretleri sağladığı için ALS hastalığı ile ilgili olan araştırmalarda bir dönüm noktası olmuştur.

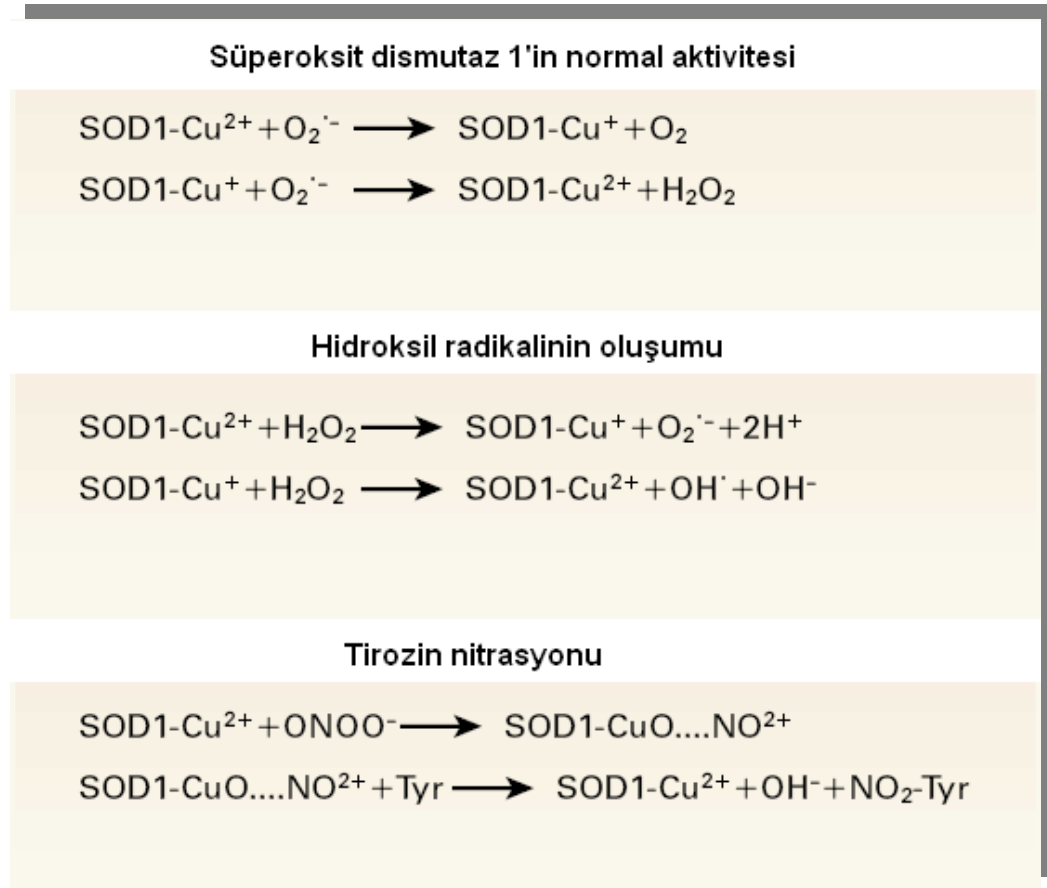
SOD1 enzimi toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyen ve bunun içinde bakır metaline gereksinim duyan bir enzimdir. Enzimin aktif bölgesinde bulunan bakır atomu katalizde ara buluculuk görevi yapar. SOD1 aynı zamanda pro-oksidant aktivitesine de sahiptir. Bu aktiviteleri arasında hidroksil radikallerinin oluşumu reaksiyonu olan peroksidasyon ve tirozinin nitrasyonu vardır. SOD1 enzimi normalde toksik süperoksit radikalini hidrojen peroksite dönüştürür. SOD1 genindeki mutasyonlar bu reaksiyonu tersi yönde değiştirip toksik hidroksi radikali oluşumuna neden olabilir veya peroksinitrit gibi anormal substratların kullanımını arttırabilir sonucunda da proteinlerdeki tirozin aminoasitinin anormal olarak nitrasyonuna neden olur (Şekil 1.3).

SOD1 genindeki mutasyonlar enzimin antioksidant fonksiyonunu bozarak süperoksitin toksik birikimine neden olabilir. Bu düşünce loss-of-function yani fonksiyon kaybı hipotezi olarak isimlendirilmiş ve yapılan çalışmalar sonucu bu hipotez çürütülmüştür (Reaume et al. 1996). Konuyla ilgili olarak, SOD1'in artmış ekspresyonunu gerçekleştiren ve G93A mutasyonunu taşıyan farelerde mutant SOD1'in artmış aktivitesine rağmen motor nöron hastalığı gelişimine neden olduğu gösterilmiştir. Dahası SOD1'in tümüyle eliminasyonu farelerde herhangi bir motor nöron hastalık oluşturmamıştır. Bu nedenle SOD1 mutasyonları hastalığa enzim aktivitesinin kaybı (loss-of-function) yoluyla değil toxic gain-of-function yani toksik fonksiyon kazanımı yoluyla neden olmalıdır (Rowland and Shneider, 2001).



#### 1.1.4.1.1. Peroksinitrit ve Çinko

Gain-of-function yani toksik fonksiyon kazanımı teorisine göre SOD1'deki mutasyon enzimin aktivitesini, anormal substratlara olan ilgisini arttırarak değiştirir. Örneğin SOD1 substrat olarak peroksinitrit radikali kullanılırsa anormal tirozin nitrasyonu proteinlere hasar verebilir. SOD1 geni susturulmuş farelerde olduğu gibi sporadik ve familial ALS hastalarında omuriliklerinde serbest nitrozin seviyeleri artmıştır. Fakat nitrasyonun spesifik hedefleri şu zamana kadar belirlenememiştir (Rowland and Shneider, 2001).



Şekil 1.3 SOD 1'in bakır aracılı olarak katalizlediği reaksiyonlar.

SOD1'deki mutasyonlar enzimin çinkoya (Zn) bağlanma yeteneğini bozarak da oksidatif hasara neden olabilirler. Çinkodan mahrum kalma sonucu hem mutant hemde yabani tip SOD1'de süperoksit radikale karşı aktivitede azalmış bir verim oluşur. SOD1' deki mutasyonlar enzimin çinkoya olan meyilini azaltır (Crow et al, 1997). Bu nedenle mutant proteinler çinko eksik durumda genelde toksik olarak farz edilir.

#### **1.1.4.1.2. Bakır ve SOD1 Agregatları**

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki çinko eksik SOD1 aktivitesinin anormal olduğu düşünülse de enzim yinede aktif bölgesinde bakır metaline ihtiyaç duyar. İki şelatör çinko hasarlı SOD1'den bakır metalini uzaklaştırır. Aynı şelatörler normal aktiviteye sahip SOD1'de yani Cu ve Zn eksikliği olmayan SOD1'de bunu yapmaz. Bu iki şelatörün kültüre edilmiş motor nöron hücrelerini çinko hasarlı SOD1' den koruduğu gözlenmiş ve sonucunda insan ALS'sinin tedavisinde yararlı olabilecekleri düşünülmüştür. Bu bulguya rağmen SOD1 ile başlatılan toksisitenin herhangi bir enzimatik aktiviteye gereksinim duyup duymadığı net değildir (Rowland and Shneider, 2001).

SOD1 ilişkili oksidatif anomaliler toksisitenin birincil sebebi olamaz. Bunun yerine önerilen diğer yaş ilişkili nörodejeneratif hastalıklarda olduğu gibi toksik fonksiyon kazanma mekanizmasıyla anormal protein agregatlarının oluşmasına neden olan yanlış katlanmış mutant SOD1 toksisitesi görüşüdür (Cleveland and Liu, 2000).

#### **1.1.4.2. ALS'de Mitokondrinin Rolü**

ALS hastalığındaki mitokondriyal fonksiyon bozuklukları Alzheimer ve Parkinson gibi diğer nörodejeneratif hastalıklarda gözlenene benzemektedir. ALS hastalarının mitokondrilerinde gözlenen anomaliler; bozulmuş elektron taşınımı, serbest radikal oluşumundaki artış ve sitoplazmik kalsiyum tamponlama aktivitesinin bozulmasıdır.

- **Yapısal anomaliler:** Mutant SOD1'in farelerdeki ekspresyonu motor nöronlarda dejenerasyona neden olur. Bu motor nöronların elektron mikroskopundaki görüntülerinde mitokondride vakuolar dejenerasyon olduğu gözlenir.
- **Mitokondrinin değişen fizyolojisi:** Yapısal anomalilere ek olarak ALS hastaları ve hayvan modellerinde mitokondri fizyolojisinin değişmiş olduğu saptanmıştır. Hücrede mitokondri sitoplazmik kalsiyumun tamponlanmasına katkıda bulunur. Mitokondriyal seviyedeki kalsiyum iyonu dengesi ALS'li hastaların pek çok dokusunda değişime uğramıştır. Mitokondrinin bu azalmış tamponlama kapasitesi hücrede apoptozizi başlatarak nörodejenerasyona neden olabilir.
- **Serbest radikal oluşumundaki artış:** Mitokondri serbest radikal oluşumuna katkısı olan bir organeldir. ALS'de oksidatif stres meydana gelir. Bu stresin sebebi ROT'lerinin üretimindeki artış ve yok edilmesindeki aksamalar olabilir (Russell et al. 2000).

Mitokondriyal elektron tamponlama ve ROT'leri üretimindeki değişimler çoğunlukla elektron taşıma sistemi (ETS)'nin işlevini kaybetmesiyle ilişkilendirilir. ALS hastalarında ETS fonksiyonundaki bozukluk ilk kez Bowling et al. tarafından belirlenmiştir. Bu ekip aynı zamanda SOD1 mutasyonu taşıyan ALS hastalarının beyin dokusu örneklerinde NADP:ubiquinone oksidoredüktaz (kompleksI) enzim aktivitesinde artış olduğunu da belirlemiştir. 1996 yılında Fujita et al. ALS hastalarının omuriliklerinde sitokrom C oksidaz (kompleksIV) enzim eksikliğini belirlemişlerdir. SOD1 mutant familial ALS'de artmış kompleksI aktivitesi raporunun aksine Wiedermann et al. sporadik ALS hastalarının kaslarında azalmış kompleksI aktivitesi belirlemişlerdir.

Motor nöronların metabolik yollarında ki yoğunluk ve hücrelerin buna bağlı olarak oksidatif fosforilasyonla olan ilişkileri, onları özellikle mitokondriyal fonksiyon kayıplarına karşı hassas hale getirir.

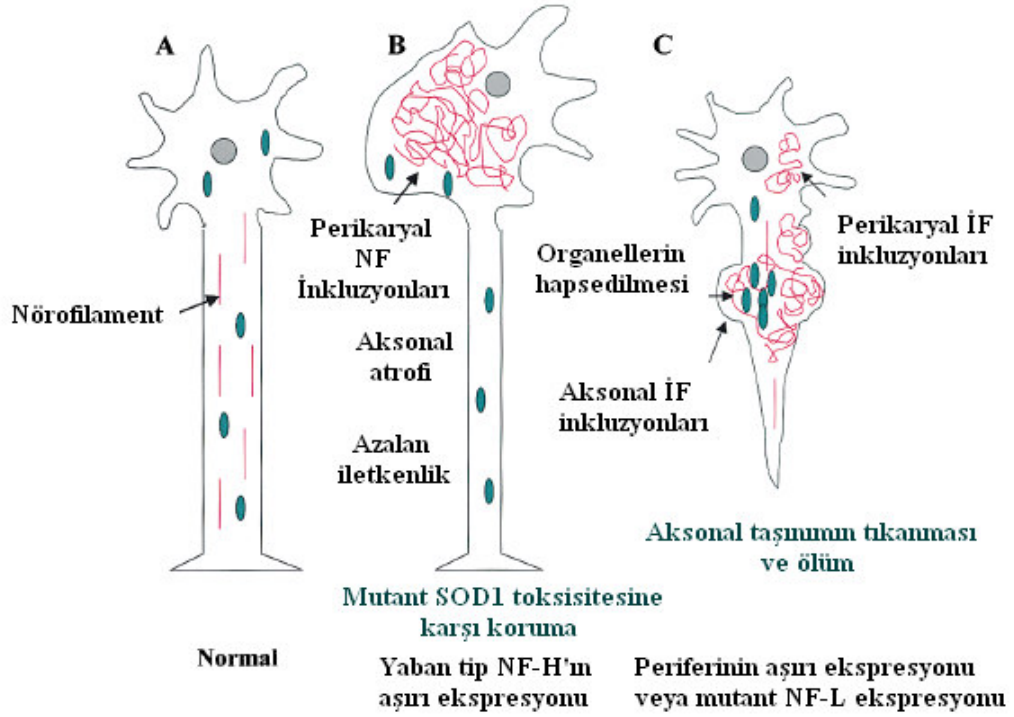
ALS hastalarının mitokondrilerinde meydana gelen değişimler ve bunların hastalık oluşumuna olan katkıları henüz tam olarak belirlenemese de bu tarz bozukluklar apoptoziz ve ALS'deki nörodejenerasyonla ilişkili olabilir.

### 1.1.4.3. Aracı Filamentlerin Düzensizliği

#### 1.1.4.3.1. Nörofilamentler

Anormal nörofilament birikimi hem SALS hem de FALS vakalarında gözlenen patolojik bir bulgudur. Nörofilamentler nöron iskeletinin yapısını oluştururlar. NF-H, NF-M ve NF-L olarak üç ana gruba ayrılırlar. In situ hibridizasyon çalışmalarında ALS hastalarının NF-L mRNA seviyelerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir. Bu durumda, NF-M ve NF-H alt birimleri normal nörofilament yapısı oluşturamaz, organizasyonu bozulmuş filamentler hücre gövdesi ve proksimal aksonlarda birikir (Şekil 1.4). Saç yumağını andıran bu oluşum, gerek hücredeki organelleri hapsedmek gerekse aksonal transportu engellemek suretiyle motor nöronların ölümüne neden olur (Julien, 2001).

NF-H, NF-M ve NF-L susturulmuş fareler klinik fenotip ve gelişim açısından normal olmakla birlikte, herhangi bir nörofilamentin aşırı ekspresyonu olan farelerde perikaryal nörofilament inkluzyonları, aksonal atrofi ve azalan iletkenlik gözlenir. Ayrıca NF-L knock-out farelerde, NF-H'nin aşırı ekspresyonunun yaşam süresini %65 oranında arttırdığı görülmüştür; perikaryal inkluzyonlar halen mevcuttur fakat hücre tarafından kolaylıkla tolere edilebilirler, hatta koruyucu etki yaratırlar. Bu durum iki şekilde açıklanabilir: birinci hipoteze göre nörofilamentler  $Ca^{2+}$  kompleksleyici olarak görev yaparlar; nörofilamentlerde birçok  $Ca^{2+}$  bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Örneğin glutamat eksitotoksitesisi sonucu hücre içinde biriken aşırı miktardaki  $Ca^{2+}$ 'yı bağlayarak motor nöronları korurlar (Cluskey and Ramsden, 2001). İkinci hipotez ise, nörofilamentlerin reaktif oksijen türevleri için bir gider oluşturarak, bu toksik maddelerin yıkıcı etkilerini ortadan kaldırmak suretiyle motor nöronları koruduğunu kabul ederler (Couillard-Després et al. 1998).



**Şekil 1.4 Nörofilament yapısının A. Normal motor protein, B. NF-H' nin aşırı ekspresyonu ve C. Mutant NF-L varlığında oluşumu ve etkileri (Julien, 2001).**

#### 1.1.4.3.2. Periferin

Periferin çoğunlukla çevresel sinir sisteminde eksprese edilen tipIII aracı nörofilament bir proteindir. Spinal motor nöronlarda da düşük seviyelerde ölçülebilir. Periferin mRNA'sının regülasyonu FALS vakalarında incelenmiş bazı koşullar altında örneğin SOD1'in mutant formunu eksprese eden transgenik farelerde fare Prph geni farklı farklı splizing çeşitleri oluşturmuştur. Oluşan bu yeni ürünlerin doğal mRNA ürününe kıyasla tam aktif değil ve kültüre edilmiş sinir hücrelerinde de toksik oldukları gözlenmiştir. SALS'li bir hastada son olarak belirlenen bir frameshift mutasyonu ALS hastalığı oluşumuna nörofilamentlerin etkisi üzerine kurulan şüpheleri arttırmıştır. Bu çalışmada PRPH frameshift delesyonu taşıyan kültüre edilmiş hücrelerde böyle bir genin ekspresyonu sonucu nörofilamentlerin bir arada toplanmış olarak buldukları belirlenmiştir (Gros-Louis, 2006).

#### **1.1.4.4. Kalsiyum Homeostazisi ve Eksitotoksisite**

##### **1.1.4.4.1. Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler**

Hücre içi kalsiyum düzeyindeki bir bozulmanın ALS ile olan ilişkisini gösteren pek çok kanıt vardır. Hücre içi kalsiyum dengesinin bozulması hücre ölümünü uyaran bir dizi olayı da tetikler. ALS hastalarında ve mutant SOD1'i taşıyan farelerde okulomotor nöronlar gibi bazı motor nöronların direnci, hücre içi yüksek kalsiyum seviyesinin toksik etkilerini gideren kalsiyum bağlayıcı proteinlerin varlığıyla ilişkili olabilir.

##### **1.1.4.4.2. Glutamat Reseptörleri ve Taşıyıcıları**

Glutamat merkezi sinir sistemindeki en önemli eksitator nörotransmitterlerden biridir. ALS hastalarında glutamat eksitotoksitesinin rolü ile ilgili düşünceler sporadik ALS hastalarının omurilik sıvılarındaki glutamat seviyesindeki artışın saptanmasıyla başlamıştır. Yüksek seviyelerdeki glutamat eksitotoksik olabilir. Çünkü kalsiyum geçirgen reseptörlerin veya voltajla açılan kalsiyum kanallarının direk aktivasyonu hücrede serbest kalsiyum seviyesi yükselir.

Omurilik sıvısında glutamat seviyesindeki artış merkezi sinir sistemindeki glutamat taşıyıcılarındaki bozukluktan kaynaklanıyor olabilir. Normalde glutamatın sinapslardaki aktivitesi eksitator amino asit taşıyıcıları (EAATs) vasıtasıyla nörotransmitterlerin yeniden alınımıyla sonlanır. Bu EAAT'ler perisinaptik astrositlerde özellikle EAAT1 ve EAAT2'dir. Rothstein yaptığı çalışmalarda sporadik ALS'li hastalarda EAAT2'nin seçici olarak kaybının glutamat taşınımını bozacağını düşünmüştür. Merkezi sinir sisteminin etkilenmiş bölgesinde EAAT2'nin bu kaybı EAAT2 mRNA'sının anormal olarak splize edilmesine bağlanmıştır. Ancak EAAT2 mRNA prosesinin hastalık özel ve bölge özel hataları henüz doğrulanmamıştır.

Familiyal ALS hastalarında mutant SOD1 hidrojen peroksidin varlığında yaptığı gibi EAAT2'nin inaktivasyonunu katalizleyerek eksitotoksik nöronal incinmeye neden olabilir. Ve bu proses FALS ile SALS arasındaki ilişkinin diğer bir

örneği olabilir. Mutant SOD1 aynı zamanda mitokondrinin direk toksik etkisi vasıtasıyla hücre içi kalsiyum seviyesi için temel oluşturan hücre içi kalsiyum seviyesini de etkileyebilir (Rowland and Shneider, 2001).

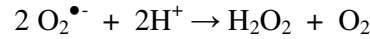
#### **1.1.4.5. Apoptoz: Planlanmış Hücre Ölümü**

ALS' nin pek çok olası tetikleyicisi motor nöron hücrelerin hayatta kalması için esas olan hücresel fonksiyonları bozabilir. SOD1 ile oluşan ALS de motor nöronların ölümü büyük olasılıkla bu programlanmış hücre ölümü vasıtasıyla olur. Bu konuda hala tartışmalar vardır. Hücrede apoptoz Bcl-2 proteinlerinin oluşturduğu sinyallere cevap olarak kaspaz proteinlerinin aktivasyonu ile başlar. SOD1 de G93A mutasyonu taşıyan farelerde antiapoptotik Bcl-2'nin ekspresyonu motor nöron hastalığının ortaya çıkışını geciktirmiş ve hayatta kalma süresini arttırmıştır. Bir kaspaz inhibitörü olan interleükin-1 $\beta$ -dönüştürücü enzim de hastalık ilerleyişi ve hayatta kalma süresini uzatmıştır. Apoptoz motor nöronların dejenerasyonunda geç bir olay olmasına rağmen programlanmış hücre ölümünün inhibisyonu ALS de iyileşme sağlayabilir (Rowland and Shneider, 2001).

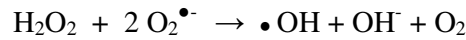
## 1.2. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROT)

Serbest radikaller, son orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan molekül veya molekül fragmanları olarak tanımlanabilir. Bir molekülde eşleşmemiş elektron bulunması o molekülü yüksek derecede reaktif hale getirmektedir (Akkuş, 1995).

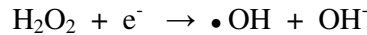
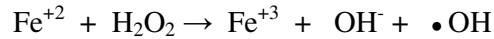
Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması sonucu peroksit oluşur. Ancak biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin üretimi superoksidin dismutasyonu ile olur. İki superoksid molekülü iki proton alarak hidrojen peroksid ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.



Bu dismutasyon ya spontandır ya da superoksid dismutaz tarafından katalizlenir. Hidrojen peroksid bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü superoksid ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



Bu reaksiyon katalizörsüz oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyona Fenton reaksiyonu adı verilir.



Görüldüğü gibi superoksid, hem hidrojen peroksid kaynağı hem de geçiş metalleri indirgeyicisidir. İndirgenmiş geçiş metalleri (demir ve bakır gibi) okside şekillerine göre hidrojen peroksitle daha reaktiftirler.

Hidroksil radikali hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesi ile (Fenton reaksiyonu ile) meydana gelir. Suyun yüksek enerjili

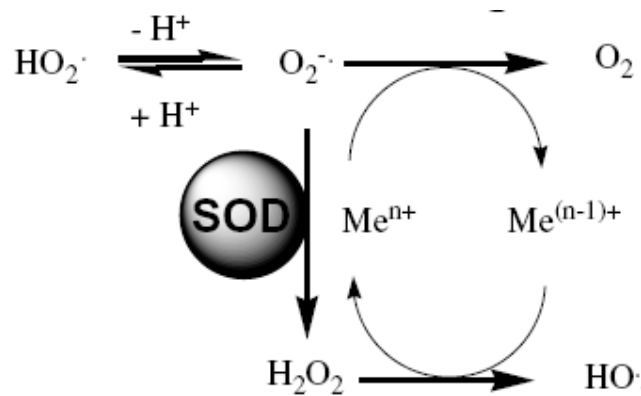


iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur ve son derece reaktif bir oksidanttır (Akkuş, 1995).

Oksijence zengin çevrelerde hayatta kalabilen aerobik organizmalar ROT karşı etkili bir savunma sistemi geliştirmişlerdir. Aerobik organizmalarda ROT'lerinin fizyolojik konsantrasyonu hücre sinyal yol izlerinde ve patojen atağa karşı görev alması bakımından yararlıdır. Ancak ROT'lerinin artmış miktarı çeşitli hastalıkların gelişmesine katkıda bulunabilir. Örneğin; kanser, hipertansiyon, diabet, ateroskleroz, inflamasyon ve erken yaşlanma vb. Süperoksit dismutazlar (SOD'lar) ROT'lerine karşı hücrede bulunan ilk ve en önemli antioksidan enzimlerdir. Günümüzde memelilerde üç farklı SOD izoformu belirlenmiştir. Her birinin genetik yapıları, cDNA'ları ve proteinleri belirlenmiştir (Zelko et al. 2002).

### 1.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Gen Ailesi

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri, hücreleri reaktif oksijen türlerine (ROT) karşı koruyan en önemli antioksidan sistemleri oluşturmaktadır. Bu enzimler katalitik bölgelerinin merkezlerinde redoks metalleri içerirler ve süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürürler (Şekil 1.5). Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının zararlı etkilerine karşı korumaktır (Akkuş, 1995).

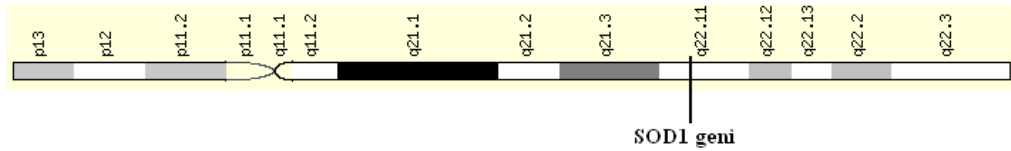


Şekil 1.5 Süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar (Me; SOD ailesi yapısında bulunan metaller).

Bugüne kadar memelilerde biyokimyasal ve moleküler olarak karakterize edilmiş 3 farklı süperoksit dismutaz enzimi bulunmaktadır. SOD1 veya CuZn-SOD (EC 1.15.1.1) bunlar içerisinde ilk olarak karakterize edilen enzimdir. Yapısında bakır (Cu) ve çinko (Zn) metalleri içeren homodimer bir enzimdir ve çoğunlukla sadece hücre içi sitoplazmik boşlukta bulunur. SOD2 veya Mn-SOD2 (EC 1.15.1.1) bir tetramerdir. Başlangıçta bir lider peptit içerecek şekilde sentezlenir. Bu lider peptit, yapısında manganez metali içeren enzimin sadece mitokondri boşluklarına yönlennesini sağlar. SOD3 veya EC-SOD (EC 1.15.1.1), en son karakterize edilen SOD enzimidir. Yapısında bakır ve çinko metali içeren bu enzim tetramer olarak bulunur. SOD2'ye benzer şekilde ilk olarak bir sinyal peptit içerecek şekilde sentezlenir. Bu da SOD3'ü sadece hücreler arası (ekstraselüler) boşluklara yönlendirir.

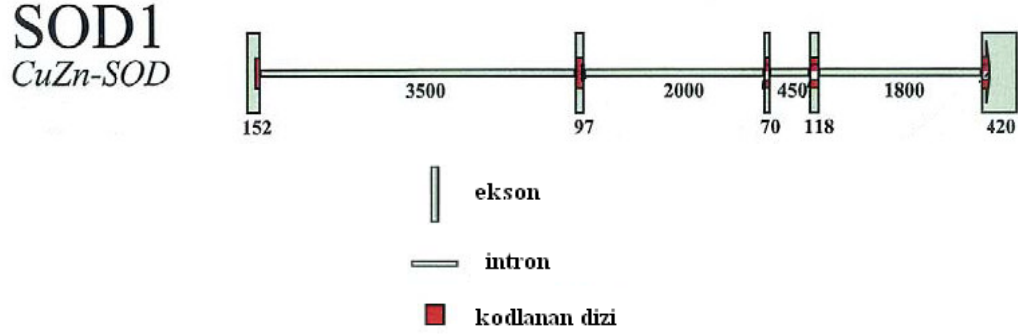
### 1.2.1.1. Süperoksit Dismutaz Genlerinin Yapıları

#### 1.2.1.1.1. SOD1 (CuZn-SOD) Geni ve Proteini



**Şekil 1.6 21. kromozom ve SOD1 geninin kromozom üzerindeki yerleşimi.**

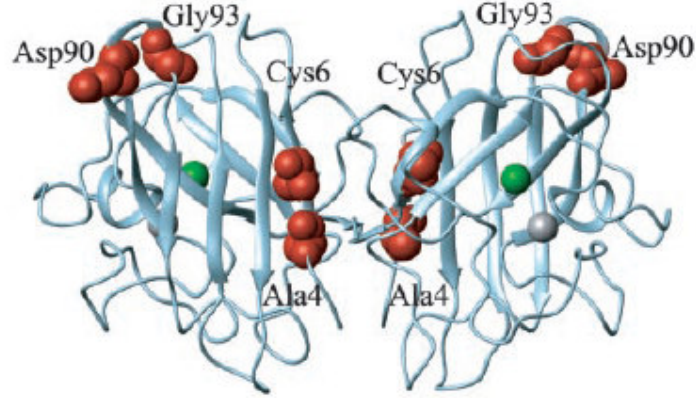
SOD1 geni insanda kromozom 21q22 bölgesinde, sığır türlerinde kromozom 1q12-14, farelerde kromozom 16B4-ter bölgelerinde lokalize olmuştur. Bugüne kadar 21. kromozom Trizomi 21 ve Down sendromu ilişkisi dolayısıyla oldukça yoğun olarak çalışılmıştır. Down sendromlu hastalarda SOD1 enzim aktivitesinin %50 oranında artmış olması sebebiyle SOD1 proteininin normalden daha yüksek oranda bulunmasının hastalığın patolojisi ile ilişkisi hala tartışılan bir konudur. Yapılan araştırmalarda Down sendromundaki bazı belirtilerle SOD1 geni dozundaki artış arasındaki bazı ilişkiler kurulmuştur. Örneğin hastaların dillerindeki sinir kas bağlantı noktalarındaki patolojik anomaliler (Zelko et al. 2002).



**Şekil 1.7 SOD1 geninin ekson ve intronları.**

SOD1 geninin genomik organizasyonu türler arasında şaşırtıcı oranda benzerlik gösterir. SOD1 geni 5 ekson ve 4 introndan oluşur. TATA ve CCAAT kutuları ve iyi korunmuş GC-zengin bölgeler promotor bölgeye yakın bir şekilde konumlanmıştır (5' homolojisi). 5' ucuna yakın bölgedeki böyle bir homoloji bu gen için düzenleyici görevi olan bu bölgenin evrimsel olarak korunduğunun göstergesidir. SOD1 geninin 3' ucu pek çok Poli A sinyal dizisine sahiptir. Bu özellik sayesinde SOD1 mRNA'sı farklı uzunluklarda sonlandırılabilir. Yapılan çalışmalar sonucu insan SOD1 geninin promotor bölgesinin NF1, Sp1, AP1, AP2, GRE, HSF ve NF- $\kappa$ B gibi pek çok transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerine sahip olduğu bulunmuştur (Kim et al. 1994). Sp1 ve Erg-1 transkripsiyon faktörlerinin rolleri temeldir ve insan SOD1 genin uyarılabilir ekspresyonunun sağladıkları doğrulanmıştır (Zelko et al. 2002).

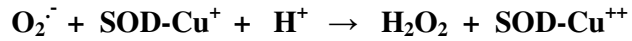
SOD1, beş eksonun kodladığı 153 aminoasitten oluşan 32,000 Da ağırlığında küçük bir enzimdir. SOD1 iki eş alt birimden oluşan bir homodimerdir; dimerler arası hidrofobik bağlar bu yapıyı sağlamlaştırır. Enzimin katalitik merkezini olan ekson 3 ve 5 bölgesine  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  metalleri yerleşmiştir. Ve bu bölgeler oldukça korunmuş aminoasit dizileri içerirler.  $\text{Cu}^{2+}$ 'nin enzimatik,  $\text{Zn}^{2+}$ 'nin yapısal işlevi vardır.



**Şekil 1.8 Homodimerik insan CuZn-SOD'ın kristal yapısı (Cu; yeşil, Zn; gri olarak gösterilmiştir).**

Süperoksit radikali hipotetik bir kanal vasıtasıyla enzimin aktif bölgesine yönlendirilir (Pramatarova, 1999). Yapıdaki dört histidin aminoasidi bakır iyonu için ligand yapısı oluşturur. Disülfid köprüleri ve hidrofobik etkileşimler protein yapısını stabilize eder. Enzimin dimer yapısında olması molekülün yapısal stabilitelerini artırır ve SOD1 aktivitesini ikiye katlar. SOD1 türleri arasında oldukça korunmuştur ve insandan bakteriye kadar hemen hemen tüm aerobik organizmalarda bulunur. Diğer memelilerle karşılaştırıldığında ortalama %82 homoloji gösterir (Getzoff et al. 1989).

SOD1 enziminin en belirgin işlevi hücre için ölümcül olan süperoksit molekülünü,  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$ 'ye katalizlemektir. Daha sonra  $H_2O_2$  glutatyon peroksidaz ya da katalaz enzimi ile  $H_2O$  ve moleküler oksijene indirgenir.

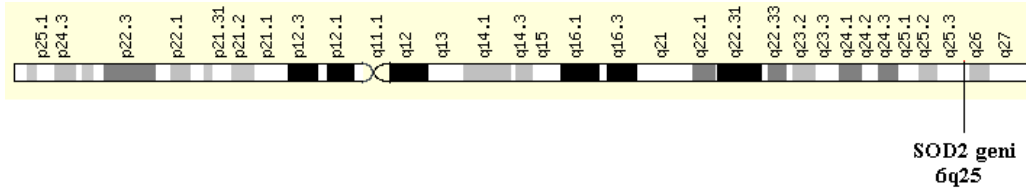


Süperoksit, Lys122, Lys136 ve Arg143 tarafından oluşturulan pozitif yüklü hipotetik kanal vasıtasıyla  $Cu^{2+}$ 'nin bulunduğu aktif bölgeye yönlendirilir. Ekson 3 ve ekson 5 tarafından kodlanan 21 aminoasit de bu kanal yapısına katkıda bulunur.

Kanal kademeli olarak 24A°dan 10 A° a doğru daralır; bu şekilde aktif bölgenin bulunduğu dar alana optimal bir ulaşım sağlanır.

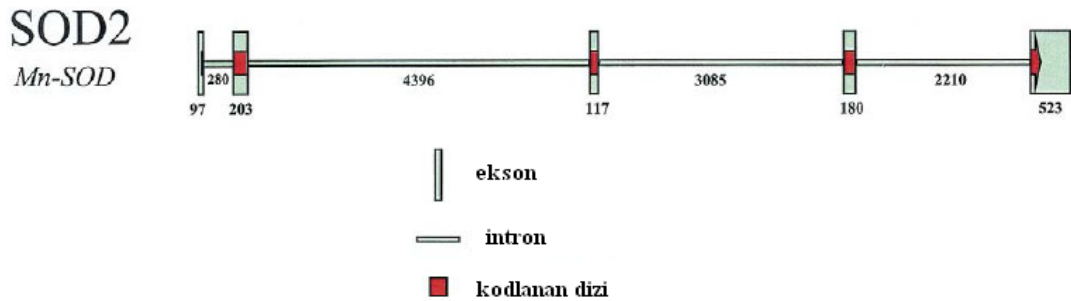
Memeli hücrelerinde sitoplazmada, nüklear bölmelerde ve lizozomda bulunur (Zelko et al. 2002). Yapısal olarak küçük olan bu protein hücredeki total proteinin büyük bir kısmını oluşturur. Yapılan in vivo çalışmalar sonucu miktarı yaklaşık 10µl olarak belirlenmiştir (Jonsson, 2005).

### 1.2.1.1.2. SOD2(Mn-SOD) Geni ve Proteini



Şekil 1.9 6. kromozom ve SOD2 geninin kromozom üzerindeki yerleşimi.

1973 yılında Creagan et al. fare insan hibritlerinde enzimatik analiz yöntemiyle SOD2 geninin 6. kromozom üzerinde olduğunu belirledikten sonra 1992 yılında Church et al. floresan in situ hibridizasyon ve somatik hücre hibrit haritalama yöntemiyle genin 6q25 bölgesinde konumlandığını bulmuşlardır (Zelko et al. 2002).



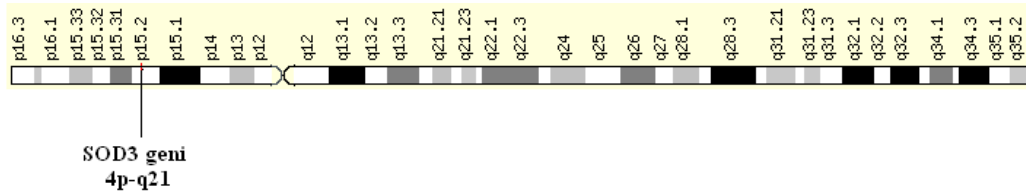
Şekil 1.10 SOD2 geninin ekson ve intronları.

İnsan, fare ve sıçanda SOD2 geninin tüm genomik yapısı belirlenmiştir. İncelenen tüm bu canlılarda gen yapısı ve dizilerinde korunma vardır. SOD2 geni 5

ekson ve 4 introndan oluşur. Yapılan genomik Souther Blotting çalışmaları sonucu insan, fare ve sığırdada yalnızca bir tane SOD2 geni bulunurken sıçanda 2 tane SOD2 geni tanımlanmıştır. Bu dört türde de SOD2 promotor bölgesi aynı özelliktedir. Genin upstreaminde TATA veya CAAT kutusu elementleri bulunmazken GC'ce zengin bölge bulunur. Bu özellik housekeeping genlerin genel özelliğidir. Ayrıca insan ve faredeki SOD2 genlerinin her biri NF-KB transkripsiyon regülatör element içerir. Bu bölge insanda genin 3' flanking bölgesinde bulunurken farede 5' flanking bölgesinde 2 tane potansiyel element içerir. Dört türün de promotor bölgeleri Sp-1 ve AP-2 korunmuş dizilerinin çoklu kopyalarını içerir (Zelko et al. 2002).

Bu gen olgun formda bir homotetramer oluşturan ve her bir alt biriminde bir manganez iyonu bulunduran bir proteini kodlar. Bu protein oksidatif fosforilasyonun bir yan ürünü olan süperoksite bağlanır ve onu hidrojen peroksit ve diatomik oksijene dönüştürür. Bu gende meydana gelen mutasyonlar idiopatik kardiyomyopati (IDC), erken yaşlanma, sporadik motor nöron hastalıklar ve kanser ile ilişkilendirilmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

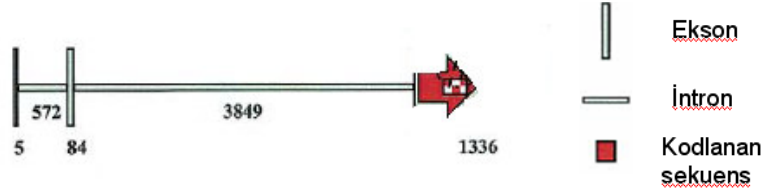
### 1.2.1.1.3. SOD3(EC-SOD) Geni ve Proteini



Şekil 1.11 4. kromozom ve SOD3 geninin kromozom üzerindeki yerleşimi.

SOD3 geninin hangi kromozom üzerinde bulunduğu dair yapılan çalışmalar sonucu 1990 yılında Hendrickson et al. bu genin insanda 4p-q21 bölgesinde yerleşmiş olduğunu saptamıştır.

## SOD3 EC-SOD



**Şekil 1.12 SOD 3 geninin ekson ve intronları**

İnsanda SOD3 geninin yapısı 1994 yılında Folz and Crapo tarafından saptanmıştır. SOD3 geni SOD1 geni ile ekson seviyesinde %40-60 benzerlik gösterir. SOD1'den aminoasit dizisindeki farklılıklar, antijenik özellikleri ve dokulara dağılımındaki farklılık ile ayrılır. Ancak SOD2 ile arasında böyle bir benzerlik yoktur. SOD3 geni farelerde 4 kilobazlık bir intronla ayrılan 2 eksondan oluşur. İnsan SOD3 geni ise 3 eksondan oluşmaktadır. İnsan ve farede SOD3 geninin promotor bölgesi TATA veya CCAAT kutusu bulundurmaz. İnsan SOD3 geni dizisinde pek çok transkripsiyonel respons element bulunmuştur. Bunlar arasında bir metal regülatör element, bir AP-1 bölgesi ve 2 potansiyel antioksidan respons element vardır (Zelko et al. 2002).

SOD3 geni ürününün beyin, akciğer ve diğer dokuları oksidatif strese karşı kuruduğu düşünülmektedir. Protein sentezlendikten sonra hücreler arası alana iletilir. Ancak proteinin C terminaline yakın bir kısmı protein hücre dışına salgılanmadan önce kesime uğrar. Burada heparan sülfat proteoglikan ve kollojen ile etkileşerek hücre yüzeyine ve hücreler arası boşluğa glikozillenmiş bir homotetramer olarak yerleşir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Yapı olarak farklı olup fonksiyonel olarak aynı görevi yapan bu üç SOD üyesinin birbirinden farklı olan diğer özellikleri Çizelge 1.4'deki gibidir.

**Çizelge 1.4 SOD ailesi üyelerinin birbirlerinden farklı olan özellikleri.**

	SOD1	SOD2	SOD3
<b>Görev yeri</b>	Sitoplazmik boşluklar	Mitokonriyal boşluklar	Hücreler arası alan
<b>Eksprese edildiği yer</b>	Çeşitli hücreler	Pek çok hücre tipi ve doku	TipII alveolar hücreler, proksimal renal tubular hücreler, damar düz kas hücreleri, akciğer makrofajları.
<b>Ekspresyon miktarını arttıran etkenler</b>	Mekanik, kimyasal, biyolojik mesajcılar; heat shock, UVB ve X radyasyonu, ağır metaller, hidrojen peroksit, ozon, nitrik oksit, araşidonik oksit, ksenokimyasallar.	Sitokinler; IL-1, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ , Lipopolisakkarit, IFN- $\gamma$ , manganez iyonu (meme kanserinde), platelet kaynaklı büyüme faktörü.	Sadece IFN- $\gamma$ ve IL-1 $\alpha$ sitokinleri, vazodilatatif faktörler (kültüre edilmiş arterial düz kas hücrelerinde); histamin, vasopresin, oksitosin, endotelin-1, serotonin, heparin.
<b>Ekspresyon miktarını baskılayan etkenler</b>	TipII alveolar epitel hücrelerinde ve akciğer fibroblastlarında hipoksiyaya maruz kalmak, antikanser ilaçlar.	Pek çok kanser hücresinde intronik bölgede dizilerin metilasyonu sebebiyle SOD2 ekspresyonu azalmıştır.	Çeşitli büyüme faktörleri; fibroblastlarda transforming büyüme faktörü- $\beta$ ve damar düz kas hücrelerinde platelet kaynaklı büyüme faktörleri, fibroblast büyüme faktörleri
<b>Gelişim basamaklarında ekspresyon miktarı değişiklikleri</b>	Elde olan bilgiler sınırlı ve çeşitlidir. Yetişkinlik döneminde akciğer ve karaciğerde artar ancak aktivitesi her zaman mRNA seviyesiyle paralellik göstermez.		Çocuklarda SOD3'ün plazma seviyesi yetişkinlerle karşılaştırıldığında daha yüksektir. 20 yaşına ulaşana kadar her yıl %2 oranında azalarak sonra sabitlenir.



## 1.2.1.2. SOD Genleri Değişimleri ve ALS Hastalığı ile İlişkileri

### 1.2.1.2.1. SOD1 Değişimleri ve ALS Hastalığı ile İlişkileri

Bugüne kadar SOD1 geni ile ilişkilendirilmiş hastalıklara bakıldığında hiç şüphesiz ilk sırayı geç başlangıçlı nörodejeneratif bir hastalık olan Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastalığı alır. Hastalığın 1874 yılında Charcot tarafından tanımlanmasından sonra hastalıkla ilgili atılan en büyük adım, 1993 yılında Rosen et al.'ın SOD1 genindeki mutasyonlarla bazı familial ALS vakaları arasındaki ilişkiyi kurması olmuştur. ALS hastalarının %90'ı sporadik ve %10'u familiyaldir. SOD1 mutasyonlarının tüm ALS hastaları arasındaki oranı %1-2'dir. Familial ALS hastaları arasında SOD1 mutasyonu taşıyan kişilerin oranı ise %25'dir.

1993 yılında Rosen et al. SOD1 geninde 11 farklı heterojen mutasyonu FALS hastalığıyla ilişkili bulmuşlardır. ALS ile SOD1 geni mutasyonlarının ilişkilendirilmesi hastalığın nedenini anlamada bugüne kadar atılan en büyük adımdır. Aynı yayında hastalık olumundan sorumlu olabilecek iki mekanizmadan bahsettilmiştir. Bunlar; azalmış SOD1 aktivitesinin toksik süperoksit radikali birikimine neden olabileceği ya da artmış SOD1 aktivitesinin hidrojen peroksit ve toksisitesi oldukça yüksek olan hidroksi radikali seviyesinde artışa neden olabileceğidir.

Daha sonra 1993 yılında Deng et al.'un 25 ALS'li ailede SOD1'in tüm kodlanan bölgesini taradığı büyük çaplı bir çalışmada ekson 1'de yer alan Ala4Val mutasyonunu diğerlerine oranla daha yüksek bir sıklıkta bulmuştur. 25 ailenin 8'inde bu mutasyona rastlanmıştır. Bu çalışma kapsamında ekson 2, 4 ve 5'de de mutasyonlar belirlenmiştir. Ancak enzimin aktif bölgesi olan ekson 3'de bir değişim belirlenememiştir.

Günümüzde bu hastalıkla ilişkilendirilmiş ve çoğu 4 ve 5. eksonlarda bulunan yaklaşık 124 tane SOD1 geni değişimi belirlenmiştir. Bunlardan 117'si aminoasit yapısında değişime sebep olurken, 3 tanesi insersiyon tip, 4 tanesi delesyon tip değişimlerdir (Çizelge 1.5).

ALS hastalığı ile ilişkilendirilmiş pek çok SOD1 mutasyonu dominant özelliğe sahiptir. Buna rağmen D90A mutasyonu resesif olarak da kalıtılabilir. Bu

**Çizelge 1.5 SOD1 geni eksonlarında belirlenen mutasyonlar.**

<b>Ekson1</b>	<b>Ekson2</b>	<b>Ekson3</b>	<b>Ekson4</b>		<b>Ekson5</b>
Ala4Ser	Gly37Arg	Cys57Arg	His80Arg	Asp101Asn	Asp124Val
Ala4Thr	Leu38Val	Ser59Ile	Leu84Val	Asp101His	Asp124Gly
Ala4Val	Leu38Arg	Ser59Ser	Leu84Phe	Asp101Gly	Asp125His
Cys6Gly	Glu40Gly	Asn65Ser	Gly85Arg	Asp101Tyr	Leu126Ser
Cys6Phe	Gly41Ser	Leu67Arg	Asp86Asp	Ile104Phe	Ser134Asn
Val7Glu	Gly41Asp	Gly72Cys	Asn86Ser	Ser105Leu	Asn139His
Leu8Val	His43Arg	Gly72Ser	Val87Met	Leu106Val	Asn139Lys
Leu8Gln	Phe45Cys	Asp76Tyr	Val87Ala	Gly108Val	Asn139Asn
Gly10Val	His46Arg	Asp76Val	Ala89Thr	Cys111Tyr	Ala140Gly
Gly10Gly	Val47Phe		Ala89Val	Ile112Thr	Ala140Ala
Gly12Arg	His48Arg		Asp90Ala	Ile112Met	Gly141Glu
Val14Met	His48Gln		Asp90Val	Ile113Phe	Leu144ser
Val14Gly	Glu49Lys		Gly93Cys	Ile113Thr	Ala145Thr
Gly16Ser	Thr54Arg		Gly93Arg	Gly114Ala	Ala145Gly
Gly16Ala			Gly93Ser	Arg115Gly	Cys146Arg
Asn19Ser			Ala94Thr	Thr116Arg	Gly147Arg
Phe20Cys			Asp96Asn		Val148Ile
Glu21Lys			Val97Met		Val148Gly
Glu21Gly			Glu100Lys		Ile149Thr
Gln22Leu			Glu100Gly		Ile151Thr
					Ile151Ser
					Gln153Gln

mutasyonla DNA dizisindeki adenin (A) bazı sitozin (C) bazına dönüşür ve sonucunda kodonun 90. amino asiti olan aspartik asit alanine dönüşür. D90A mutasyonunun resesif kalıtımı İskandinav ailelerde rapor edilmiştir. Dünyanın diğer kalan kısımlarında D90A mutasyonu ender rastlanan bir durumdur. Genelde D90A mutasyonu heterozigot olarak belirlenmiştir. Kuzey İskandinav populasyonlarında bu mutasyonu homozigot olarak taşıyan bireylerde tek tip hastalık fenotipi gözlenmiştir. Hastalığın ortalama başlangıç yaşı 44 olarak belirlenmiş, ilk olarak alt ekstremitelerde başlayıp sonra yukarı yayılan ve yavaş ilerleyen bir fenotip sunmuştur. Hastaların ortalama hayatta kalma süreleri hastalık başlangıç yaşından itibaren ortalama 14 yıldır. Kuzey İskandinavya ve Finlaniya’da bu şekilde oluşan ALS1 toplam ALS’lilerin %9,6’sını oluşturur ve bu populasyonda D90A mutasyonunun 10 kat artmış bir allel sıklığı bulunmaktadır (%1-2). 1998 yılında Al-Chalabi et al. bu mutasyonu resesif olarak taşıyan bireylerin SOD1’in toksik etkisini değiştirici koruyucu bir faktöre sahip olabileceklerini söylemiştir. Mutasyonu dominant olarak taşıyan bireylerde hastalık daha ağır bir seyir göstermesi ve hayatta kalma süreleri de daha kısa olması Al-Chalabi et al. nin bu görüşünü doğrular

niteliktedir. Dünya genelinde dominant kalıtmı olarak belirlenen D90A mutasyonu Çizelge 1.6’da özetlenmiştir.

**Çizelge 1.6 Dünya genelinde dominant kalıtmı olarak belirlenen D90A mutasyonları.**

D90A	Yer	Vaka sayısı	Referans
Sporadik	Finlandiya	2 kişi	Anderson et al.(1997)
	Kuzey Amerika	2 kişi (İskandinav değil)	Kaplan et al. (1996) ve Al-Chalabi et al.
	Belçika	1 kişi	Robberecht et al. (1996)
	İngiltere	1 kişi	Jackson et al. (1996)
Familiyal	Fransa	1 homozigot ve 1 heterozigot birey	Camu et al. (1999)

Bazı SOD1 mutasyonları tekrarlayan mutasyonlar olarak belirlenmiştir ve dünya genelinde bir dağılıma sahiptirler. Ala4Val mutasyonu en sık rastlanan SOD1 mutasyonu almasına rağmen sadece Kuzey Amerika’lı hastalarda belirlenmiştir.

G37R ve L38V gibi bazı SOD1 mutasyonları genelde hastalığın erken başlangıçlı olan tipi ile ilişkilendirilmiştir. A4V mutasyonu taşıyan hastalarda daha kısa hayatta kalma süresi görülürken G37R, G42D, G93C, H46R mutasyonlarını taşıyan kişilerde ise hastalığın daha hafif seyir gösterdiği gözlenmiştir (Majoor-Krakauer, 2005).

#### 1.2.1.2.2. SOD2 Değişimleri ve ALS ile İlişkileri

Memeli organizmalarda SOD2’nin işlevinin önemi farelerde nörodejenerasyona ve kalp hasarlarına neden olup ölümcül olabilmesi dolayısıyla anlaşılmıştır (Lebovitz et al. 1996). Günümüzde SOD2 geninde hastalıklarla ilişkili olabileceği düşünülen pek çok değişim belirlenmiştir. Örneğin genin mitokondri hedefleyici dizisinde meydana gelen Ala-9Val değişiminin erken yaşlanma ve progeriyaya ve özellikle bayanlarda sporadik motor nöron hastalıklara yakalanma riskini arttırdığı bilinir. Ancak bu değişimin Parkinson ve ALS hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara yakalanmada etkisiz olduğu bulunmuştur (Zelko et al.

2002). Yakın zamanda Mitrunen et al. yaptıkları çalışmada Ala-9Val polimorfizminin Finlandiya populasyonunda meme kanserine yakalanma riskini 1,5 kat arttırdığını bulmuşlardır.

SOD2’de belirlenen diğer bir değişimde Ile58Thr değişimidir ve bu değişimin SOD2 enziminin aktivitesini 3 kat düşürüp enzimin tümör baskılayıcı etkisini azalttığı bulunmuştur (Tomblyn et al. 1998). Ayrıca SOD2 geninin promotor bölgesi civarında en az 3 farklı heterozigot mutasyon daha belirlenmiş ve SOD2’nin azalmış transkripsiyonal aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (Xu et al. 1999).

SOD1 geninde meydana gelen mutasyonların ALS ile ilişkili bulunması ve SOD2 geni susturulmuş farelerde diğer belirtilerin yanında kaslarda güçsüzlüğün de belirlenmesinden sonra SOD2’nin de ALS hastalığı ile ilişkili olabileceği düşünülmüş ancak bugüne kadar böyle bir ilişki kurulamamıştır.

Bu bilgiler ışığında biz de bu çalışmamızda SOD2’deki Ala-9Val polimorfizmi ile Ile58Thr değişiminin Türk ALS hastalarındaki dağılımını ve ALS hastalığıyla ilişkili olup olmadığını inceledik.

### **1.2.1.2.3. SOD3 Arg202Leu Değişimi ve ALS Hastalığıyla İlişkisi**

Bugüne kadar insan SOD3 geninde belirlenmiş bir mutasyon vardır. Bu mutasyon dizinin karboksi terminalinin merkezine yerleşmiş pozitif yüklü bir aminoasit olan arjininde meydana gelir. Pozisyon 213’deki arginin amino asiti glisine dönüşür ve bu da plazma SOD3 enzim konsantrasyonunu 8-15 kat artmasına neden olur (Sandstrom et al. 1994). Daha sonraki yıllarda çeşitli ülkelerde bu değişimin populasyondaki dağılımı incelenmiş ve İsveç’te %4, Avustralya’da %3, Japonya’da da %6’lık bir dağılım saptanmıştır. Bu değişimin gen ve enzim üzerinde ne gibi bir etkiye sahip olduğu tam olarak aydınlatılamamış olsa da bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucu şu sonuçlar bulunmuştur; bu mutasyon enzimin heparine ve endotel hücre yüzeyine olan affinitesini bozar ve tripsin benzeri proteazlara olan hassasiyeti azaltabilir (Zelko et al. 2002).

Daha sonra SOD3 geninde iki yeni değişim daha belirlenmiştir. İlki dizi üzerinde adeninin bazının guanine değiştiği pozisyon 241’de meydana gelen Thr40Ala (T40A) değişimi ve ikincisi pozisyon 280’de meydana gelen ve sessiz bir

mutasyon olan C/T değişimi. Pozisyon 241'de meydana gelen A/G değişimi *BssHII* restriksiyon enzimi için yeni bir kesim alanı oluştur ancak bu değişimin EC-SOD'un spesifik aktivitesi veya heparine bağlanma affinitesini etkilemediği düşünölmektedir (Yamada et al. 1997).

SOD3 geninin heparin bağlanma bölgesinde belirlenmiş bir diğer değişimde Arg202Leu varyasyonudur. Campo et al. 2005 yılında Akdeniz popülasyonunda 2400 örnek üzerinde SOD3 değişimlerinin oranını incelerken Arg202Leu değişimi oranını %0,84 olarak belirlemişlerdir. Bazı araştırmalara göre SOD3 proteininin heparin bağlanma bölgesinde az sayıda lisin veya arginin aminoasiti bulunursa heparan sülfat bağlanırlığı azalır (Adachi and Marklund, 1989). Buradan yola çıkarak Campo et al. Arg202Leu varyasyonunun enzimin bu fonksiyonunu etkileyebileceğini öne sürmüştür. Ayrıca yaptıkları çalışma sonucunda Arg202Leu varyasyonunun düşük sıklığı, bu değişimi taşıyan homozigot bireylere rastlanmaması ve Güney İtalya popülasyonunda hiç Arg202Gly mutasyonuna rastlanmayışı evrim sürecinde etnik gruplar arasında EC-SOD'un heparin bağlanma bölgesinin endojen ve çevresel kuvvetler sonucu farklı şekilde seçilime uğradığı görüşünü öne sürmelerini sağlamıştır.

Bugüne kadar SOD3 genleri değişimleri ile hastalıklar arasındaki ilişki daha çok Arg213Gly değişimi ile yapılmıştır. Bu değişim miyokardiyal şoklar, homosisteinüria ve tümörlerle ilişkilendirilmiş ancak herhangi bir nörodejeneratif hastalıkla böyle bir ilişki hiç araştırılmamıştır.

## 2. DNA VARYASYONLARI

Diğer canlıların genomları gibi insan genomu da durağan bir yapıya sahip değildir. Genom üzerinde meydana gelen değişimler büyük boyutlarda olduğunda, kromozom anomalileri; kromozom kaybı veya kazanımı şeklinde olabileceği gibi kromatit kırıkları ya da farklı kombinasyonlarda bir araya gelme şeklinde de olabilir. Daha küçük boyuttaki değişimler mutasyon sınıfları içinde sınıflandırılabilir. Bu mutasyonlar baz süstitüsyonları, delesyonları ve insersiyonlarını içermektedir. Baz süstitüsyonlarından kasıt genellikle tek baz değişimidir fakat nadir de olsa bazen birkaç baz da aynı anda değişebilmektedir. Bir veya birkaç bazın diziden elimine olmasına delesyon kazanımına da insersiyon adı verilir. Bu tür mutasyonlar ayrıca basit mutasyonlar olarak da adlandırılır.

Bir bireyde ortaya çıkan yeni bir mutasyon vücut hücrelerinde veya üreme hücrelerinde meydana gelebilir. Eğer üreme hücrelerinde meydana gelen bir mutasyon kişinin üreme yeteneğini bozmasa kişi bu mutasyonu gelecek kuşaklara iletacaktır. Mutasyon bu şekilde popülasyonun diğer üyelerine de yayılacaktır.

Evrim sürecinde mutasyonlar ham bir yakıta benzetilebilir. Fakat aynı zamanda patojenik de olabilirler. Bazı mutasyonlar fenotipik bir anomalinin direk nedeni olabilirler veya kişinin hastalığa yakalanma riskini arttırabilirler. Mutasyonların düşük oranda olması bir hastalığa neden oluşturması veya bir türün üyeleri arasında ölüm oranlarının belirlenmesi açısından rastgele evrimsel yeniliğe fırsat verici bir denge olarak düşünülebilirler. Normalde pek çok mutasyon DNA replikasyonu esnasında DNA polimerazın kopyalama hatalarından kaynaklanır. Aynı zamanda DNA hücre içinde kendiliğinden kimyasal saldırılara da maruz kalır. Depirüstasyonla çekirdekli insan hücrelerinden her gün yaklaşık 5000 adet adenin veya guanin nükleotiti kaybolur. DNA ayrıca doğal iyonize radyasyonlara ve reaktif metabolitlere maruz kalarak da zarar görülebilir.

DNA'da meydana gelen değişimler tek baz değişimi olabileceği gibi iki allelik veya allelik olmayan dizilerin değişimi şeklinde de olabilir. Allelik dizi varyasyonu bir lokusta bir varyanttan fazla olacak şekilde bulunuyor ve popülasyondaki sıklığı 0,01'den daha büyükse DNA polimorfizmi olarak adlandırılır.

Genom incelemeler esnasında DNA polimorfizmleri uygulamada genetik markır olarak yer bulurlar. Birçok organizmanın DNA'sında bireysel çeşitlilik görüldüğünden DNA polimorfizmleri genetik analizlerde oldukça kullanışlıdır. Özellikle karmaşık genomların haritalanmasına, manipule edilmesine ve ilginç biyolojik özelliklere sahip olan genlerin klonlanmasında genetik markır olarak kullanılırlar.

Genetik markır olarak en çok kullanılan DNA polimorfizmleri, SNP'ler (ör. tek baz substitusyonlar, delesyonlar ve insersiyonlar), RFLP'ler (restriksiyon bölgelerini değiştiren tek nükleotid değişimleri) ve tandem tekrar sayılarında farklılıktan dolayı oluşan polimorfizmlerdir.

### **1.3.1. DNA Polimorfizm Tipleri**

DNA polimorfizmleri basitçe iki sınıfa ayrılabilir.

1. Tek nükleotit polimorfizmi (SNP)
2. Değişen sayıda ardarda tekrarlar polimorfizmi (VNTR)

#### **1.3.1.1. Tek Nükleotit Polimorfizmleri (SNPs)**

Adından da anlaşılacağı gibi tek bir nükleotitte meydana gelen değişimlerdir. SNP terimi aslında bir nükleotit yerine farklı bir nükleotitin geçişi anlamına gelir. Fakat bu terim aynı zamanda nükleotit kazanımı (insersiyon) ve kaybını (delesyon) da kapsar. Tipik olarak SNP'ler iki allele sahiptir. Bazı SNP'ler restriksiyon bölgelerinde değişime sebep olurlar. Böyle polimorfizmlere restriksiyon bölge polimorfizmleri denir. DNA'nın kodlanan bölgesi insan genomunun yalnızca yaklaşık %1,5'ini oluşturur. Pek çok SNP kodlanmayan DNA bölgeleri olan intronlarda veya genler arası dizlerde bulunur. Ayrıca SNP'lerin kromozomal dağılımı uniform değildir: çok az SNP bulunan bölgelerin hemen yanında çok fazla SNP içeren bölgeler bulunabilmektedir.

### 1.3.1.2. Değişen Sayıda Ardarda Tekrarlar Polimorfizmi (VNTR)

VNTR polimorfizmi basit bir dizinin ard arda tekrarlarını içeren lokuslardaki alleller olarak tarif edilebilir. İki sınıfa ayrılır: mikrosatellit polimorfizmi (basit dizi tekrar polimorfizmi); bu polimorfizmde dizi uzunluğu genelde 100 baz çiftinden daha azdır ve tekrar birimleri genelde 1-4 nükleotit uzunlukta, yani küçüktür. Minisatellit DNA polimorfizmi; dizinin boyutu uzun ve tekrar ünitesi genelde 9-65 baz çifti uzunlukta. Bu tekrarların sayısı oluşacak fragmanların büyüklüğünü belirler. Böylece çeşitli büyüklüklerde birçok DNA fragmanı oluşur. Örneğin 2.0, 2.5, 3.0 ve 3.5 kb'lık dört farklı fragman halinde bulunabilen bir DNA segmenti toplam 10 farklı allelik kombinasyonda görülebilir. Her birey bu kombinasyonlardan birine sahiptir ve birbiri ile ilişkisi olmayan iki bireyin belli bir DNA segmenti için farklılık göstermesi olasılığı yüksektir. Genetik analizlerde bundan yararlanılabilir. Kesin bireysellik gösteren bazı DNA markır sistemleri adli tıp amaçlarıyla kullanılabilir.

Bunlara ilave olarak insan genomunda transpozon tekrarı polimorfizmleri, geniş-alan VNTR polimorfizmleri, inversiyon polimorfizmleri ve kromozomal polimorfizmler mevcuttur (Strachan and Read, 2004).



### 3. AMAÇ VE KAPSAM

ALS yetişkinlerde en sık görülen motor nöron hastalığıdır. Hastalığın sporadik ve familiyal olmak üzere iki şekli vardır. Bu güne kadar ALS'ye neden olan etmenler tam olarak belirlenememesine rağmen bu alanda atılmış en büyük adım şüphesiz Süperoksit Dismutaz (SOD)1 geninde meydana gelen mutasyonlarla ALS hastalığı arasındaki ilişkinin kurulmasıdır. Yapılan araştırmalar sonucu SOD1 geninde meydana gelen mutasyonlar ile tüm ALS hastaları arasında %1-2'lik bir ilişki bulunmuştur. Familiyal vakalarda bu oran %15'u bulurken sporadik vakalarla SOD1 geni ilişkisi oranı %1-7 civarındadır.

SOD gen ailesi hücreleri reaktif oksijen türlerine (ROT) karşı koruyan en önemli antioksidan sistemlerden biridir. Bu enzim sisteminin ilk üyesi hücrede sitoplazma da konumlanmış olan SOD1'dir. Bugüne kadar ALS hastalığıyla ilişkilendirilmiş yaklaşık 120 tane SOD1 geni değişimi bulunmuştur. SOD1 mutasyonlarının kalıtımı genelde otozomal dominanttır. Ancak Asp90Ala mutasyonunun hem otozomal dominant hem de otozomal resesif kalıtım gösterdiği belirlenmiştir. SOD1 geninde meydana gelen mutasyonların enzimin doğal substratlara bağlanma eğilimini değiştirdiği, çinko metale bağlanma yeteneğini bozduğu veya enzimin nöronlardaki agregasyonunu arttırmış olabileceği düşünülmektedir.

SOD gen ailesinin diğer üyeleri SOD2 ve SOD3'dür. SOD2 hücrede sadece mitokondriyal boşluklarda görev yapar ve mitokondride superoksidleri yok eden tek enzim olduğu için enzimin antioksidant etkisi oldukça önemlidir. SOD2 enzimini kodlayan gende meydana gelen bir transisyon (C-T) mutasyonu 9. Kodonda alanin aminoasidinin valin amino asidine dönüşmesini sağlamaktadır, bu da enzimin yapısında değişikliğe neden olmaktadır. Bu değişim enzimin mitokondriye taşınmasında sorun yaratmaktadır. SOD2 geninde meydana gelen bir diğer değişimde Ile58Thr polimorfizmidir. Bu değişim enzimin ısıya karşı olan stabilitesini değiştirmektedir.

SOD3, süperoksit dismutaz gen ailesinin en son bulunan üyesidir. Hücre içinde sentezlenir ve hücreler arası boşluklara taşınır. Burada diğer SOD üyeleri gibi superoksid radikallerini yok edici olarak görev yapar. SOD3'de meydana gelen

değişimlerden biri olan Arg202Leu değişimi, SOD3 geninin heparin bağlanma bölgesinde oluşur ve enzimin heparan sülfata bağlanma özelliğini azaltır.

Bu çalışmanın amacı vücudumuzun en önemli antioksidant sistemlerden biri olan ve her biri evrim sürecinde iyi korunmuş SOD gen ailesinde meydana gelen değişimlerin ALS hastalığıyla ilişkisini araştırmaktır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Enzimler

*Taq* DNA Polimeraz (Fermentas)

Proteinaz *K*

*Bcc* I (New England Biolabs)

*Sat* I (Fermentas)

*Bsa*W I (New England Biolabs)

*Eco*RV (Fermentas)

*Sac* I (Fermentas)

##### 3.1.2. Primerler

İstenilen gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primerler Çizelge 3.1 de verilmiştir.

**Çizelge 3.1 Herbir gen değişimi için kullanılan primer dizileri.**

Gen adı	Değişim adı	Primerler
<b>SOD1</b>	Asp90Ala ve Gly93Ala Mutasyonu	F:5'-TAGGCATGTTGGAGACTTGGG-3' R:5'-GGTCTCCTGAGAGTGAGATCAC-3'
<b>SOD2</b>	Ala(-9)Val Polimorfizmi	F:5'-CAGCCCAGCCTGCGTAGACG-3' R:5'-GCGTTGATGTGAGGTTCCAG-3'
	İle58Thr Polimorfizmi	F:5'-CGGATGTTATAGATAAGCTGG-3' R:5'-CAGTGCAGGCTGAAGAGAT-3'
<b>SOD3</b>	Arg202Leu Mutasyonu	F:5'-GCTGCGTGGTGGGCGTGTGCG-3' R:5'-GCAGAGGCGAAGGTGAGACC-3'

### 3.1.3. Kimyasallar

Agaroz	Sigma	
Akrilamid	Merck	8.00830.0500
Amonyum asetat	Riedel-de Haen	25006
Amonyum persülfat	Sigma	A 1433
Asetik asit	Riedel-de Haen	27225
Bisakrilamid	Sigma	M 7256
Borik asit	Fluka	71999
Brom fenol mavisi	Sigma	B 5525
Etanol	Merck	1.00986.2500
Etidium bromid	Sigma	E 8751
EDTA	Sigma	ED2SS
Formaldehit	Riedel-de Haen	15512
Gümüş nitrat	Fluka	85228
Ksilen siyanol	Sigma	X4126
Sodyum hidroksit	Riedel-de Haen	06203
Sodyum klorid	Riedel-de Haen	13423
Sodyum karbonat	Sigma	S 7277
TEMED	Merck	8.08742.0250
Tris baz	Sigma	T 1503
Sodyum Dodesil Sülfat	Fluka	71725

### **3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler**

#### **3.1.4.1. DNA İzolasyon Çözeltileri**

##### **RCBL( eritrosit parçalama solüsyonu) pH 7,4**

0.15 M NH<sub>4</sub>Cl

001 M KHCO<sub>4</sub>

0.01 M EDTA (pH 8,0)

##### **WBL(beyaz hücre parçalama solüsyonu)**

0.1 M NaCl

0.025 M EDTA (pH 8,0)

##### **Amonyum asetat solüsyonu**

9.5 M NH<sub>4</sub>Asetat (sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtreden geçirilir.)

##### **TE tamponu (pH 8,0)**

10 mM Tris HCl

1 mM EDTA pH 8,0 (+20<sup>0</sup>C)

##### **SDS stok solüsyonu**

%10(w/v) SDS

0.2-0.45 µm membran ile filtre edilmiş

### 3.1.4.2. Elektroforez Solüsyonları

*Yükleme tamponları*

#### **5X TBE**

0.45 M Tris Borat

0.01 M EDTA (pH 8,0)

#### **%10'luk non-denature poliakrilamid jel solüsyonu (29:1 akrilamid:bisakrilamid)**

%10 Akrilamid-Bisakrilamid

1X TBE

Polimerizasyon için;

0.001 M amonyum persülfat (APS)

%0,1 TEMED ilave edildi.

### 3.1.4.3. Gümüş Boyama Solüsyonları

**10 X A solüsyonu:** %5 asetik asit %95 absolüt etil alkol

**10 X B solüsyonu:** %1 gümüş nitrat

**C solüsyonu:** 3 g NaOH, 0.02 g Boraks, %0,2 formaldehit

**10 X D solüsyonu:** 22,5 g Sodyum bikarbonat/ 1lt

### 3.1.5. Kullanılan Cihazlar

Thermocycler (Eppendorf Mastercycler)

Bilgisayar

Dikey elektroforez (BIORAD)

Yatay elektroforez (BIORAD)

Güç kaynağı (BIORAD Power Pac 3000)

UV transilimünatör (BIORAD)

Spektrofotometre (SHIMADZU)

CanoScan N670U (Canon)

### **3.1.6. Etik Kurul Onayı**

Bu çalışma için Kocaeli Üniversitesi İnsan Araştırmalar Etik Kurulundan İAEK7/9 sayılı etik kurul ön onayı alındı. Hasta ve kontrol grupları için onam formları hazırlandı.

### **3.1.7. Hasta Grubu**

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran ve aynı anabilim dalında tedavi gören hastalardan EDTA'lı tüplere 10'ar cc kan alındı. Hastalara ayrıntılı bilgi verdikten sonra onam formları imzalatıldı.

### **3.1.8. Kontrol Grubu**

Ailesinde ALS hastası bulunmayan gönüllü kişilerden EDTA'lı tüplere 10'ar cc kan alındı. Kişilere ayrıntılı bilgi verilerek onam formları imzalatıldı.

## **3.2. YÖNTEMLER**

### **3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu**

1. 10 ml periferik kan 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılarak üzerine 1:3 oranında eritrosit lizis tamponu eklendi. +4°C'de 20 dakika bekletilip, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
2. Örnek santrifüjden alınarak üzerindeki süpernatant atıldı. Pellet süspanse edildi ve üzerine 20 ml eritrosit lizis tamponu eklendi. Tekrar 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
3. Pelet tamamen süspanse edilip üzerine 500 µl SDS (%10'luk), 50µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9,4 ml WBL (White Blood-Cell Lysis) tamponu eklenerek 56°C'de gece boyu bekletildi.
4. İnkübasyon sonrası üzerine 4 ml Amonyum asetat (9.5M) eklenip iyice karıştırıldı. 20 dakika 4500 rpm'de santrifüj edildi.
5. Üstteki temiz kısım alınarak yeni bir falkon tüpe aktarıldı, pellet atıldı. Supernatantın üzerine 20 ml etanol eklendi ve DNA'nın toplanması beklendi.

DNA alınarak bir eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 1ml % 70 etanol koyuldu. Maksimum hızda (13.200 rpm) 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Kurutma işlemi ile kalan alkol uçuruldu

6. Elde edilen DNA'nın miktarına göre 100–300µl kadar TE (Tris-EDTA, pH=8.0) tamponu eklenerek 56°C'de 1 saat bekletilerek +4°C'de muhafaza edildi.

### **3.2.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü**

1. Stok DNA tüpünden 1µl örnek alındı ve 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı.
2. Üzerine 99µl TE eklenerek 1/100 oranında sulandırıldı.
3. Örneğin spektrofotometrede 260 ve 280 nm ultraviyole dalgaboyunda absorpsiyon değerleri okundu
4. DNA miktarı formüle göre hesaplandı:  
Konsantrasyon= 100 (sulandırma) x 50 (sabit) x OD 260= ng/µl DNA
5. OD 260/280 > 1,8 RNA, < 1,8 protein kontaminasyonu olarak değerlendirildi.

### **3.2.3. GENOTİPLEME**

Genotipleme alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lardan Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (Polymerase Chain Reaktion-Restriction Length Polymorphism(PCR-RFLP)) metodu ile yapıldı.

#### **3.2.3.1. PCR**

PCR koşulları ve primerler incelenen her bir değişim için uygun olacak şekilde düzenlendi. SOD1, SOD2 ve SOD3 geni değişimlerini incelemek için uygun olan primerin dizaynı yapıldı ve buna uygun PCR koşullarında istenen bölgelerin çoğaltması sağlandı. Sadece SOD2 geni Ala(-9)Val polimorfizmi çalışılırken Shimoda-Matsubayashi ve ark. (1996) yayınladığı metod kullanıldı. PCR şartları annealing dereceleri farklı(Çizelge 3.2) olmakla beraber: 94°C de 3 dk. denaturasyonu takiben 94°C 1dk, annealing derecesinde 1dk. ve 72 °C'de 1dk. 35 döngü ve son olarak 72 °C'de 7dk. şeklinde yapılmıştır. Total miktarı 25µl olan



PCR mix'i 10mM Tris-Cl (pH 8,8), 50 mM KCl, %0.08 Nonidet P40 ve 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP ve 1,0 U *Taq* DNA polimeraz (MBI Fermentas) içerecek şekilde hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.2 Herbir değişim için PCR reaksiyonunda seçilen annealing dereceleri.**

Gen adı	Annealing derecesi( °C)	
<b>SOD1</b>	Asp90Ala	56
	Gly93Ala	56
<b>SOD2</b>	Ala(-9)Val	66
	Ile58Thr	54
<b>SOD3</b>	Arg202Leu	63

### 3.2.3.2. RFLP

Restriksiyon enzimi kesimleri total olarak 15µl de gerçekleştirildi. Kesim için gerekli olan enzim, tampon, steril distile su ve PCR ürünü miktarları çizelge 3.3.'de verildi.

**Çizelge 3.3 Restriksiyon enzimi kesimleri için kullanılan kimyasal miktarları.**

Gen adı	Değişim adı	Enzim adı	Tampon	Enzim (U/tüp)	PCR ürünü (µl/tüp)	ddH <sub>2</sub> O (µl/tüp)	İnkübasyon (°C)
<b>SOD1</b>	<b>D90A</b>	<i>SatI</i>	10X G Buffer	2	2	11,3	37
	<b>G93A</b>	<i>BccI</i>	1X BccI tamponu(NE Buffer)	2	2	9,8	37
<b>SOD2</b>	<b>A(-9)V</b>	<i>BsaWI</i>	1X BsaWI tamponu(NE Buffer)	2,5	5	9,8	60
	<b>I58T</b>	<i>EcoRV</i>	10X R Buffer	2,5	5	8,26	37
<b>SOD3</b>	<b>R202L</b>	<i>SacI</i>	10X SacI Buffer	2	5	8,3	37

Kesim ürünleri %8'lik poliakrilamid jelde (29:1) yürütülüp, gümüş nitrat metodu ile boyanarak görüntülendi. Tarayıcı yardımı ile tüm görüntüler bilgisayara kaydedildi.

### 3.2.3.2.1. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektrofözezi

35 cm x 10 cm ebatlarında hazırlanan jelin elektrofözezi için dikey elektrofözez cihazı kullanıldı. Jelin kalınlığı 0,5 mm olarak ayarlandı. Yüzde sekizlik PAGE stok solüsyonuna sırası ile % 10'luk APS stoğundan % 1 hacim ve TEMED'den % 0,1 hacim ilave edilip 0,5 mm'lik cam aralığına döküldü. Polimerizasyonun tamamlanması için en az ½ saat beklendi.

Polimerizasyon sonrası camlar elektrofözez cihazına yerleştirildi, 1X TBE içeren yürütme tamponu ilave edildi. Örnekler jel kuyucuklarına yüklendi. Yükleme tamponu içinde bulunan ve elektrik alanda hareket eden brom fenol mavisi ve ksilen siyanol boyaalarının yürüdükleri mesafe takip edilerek akım aşağıdaki çizelgelerde verildiği gibi ayarlandı. Çizelge 3.4'de verilen süreler sonunda jel çıkartılarak gümüş boyama işlemine geçildi.

**Çizelge 3.4 CuZn-SOD; D90A, G93A, Mn-SOD; A(-9)V, I58T, EC-SOD; R202L değışimleri için poliakrilamid jel elektrofözezi koşulları.**

		Yürüme zamanı(dk)	PAGE(%)	Akım		
				mA	V	W
SOD1	D90A	15	8	~50	~150	20
	G93A					
SOD2	A(-9)V	25				
	I58T	20				
SOD3	R202L	35				

### 3.2.3.2.2. Gümüş Boyama

Solüsyonlarda ve yıkamada kullanılan suyun kalitesi önemli olduğundan test edilmiş distile su kullanıldı. Elde hafif çalkalama ile aşağıdaki solüsyonlarda sıra ile bekletildi. C solüsyonu kullanımdan hemen önce hazırlandı. Sonraki solüsyonlara geçerken aralarda distile su ile birkaç saniyelik kısa süreler ile yıkandı.

**A solüsyonu** (Asetik asit-etanol): 200 ml distile suya stok solüsyondan 10 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 5 dakika muamele edildi.

**B solüsyonu** (Gümüş nitrat): 200 ml distile suya stok solüsyondan 10 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 10 dakika muamele edildi.

**C solüsyonu** (NaOH-Boraks-Formaldehit): 200 ml distile suya 2.5 gr NaOH ve 0.02 gr boraks ilave edildi ve jel bu solüsyona alındıktan sonra solüsyonun içerisine 1ml formaldehit ilave edilerek bantlar görülünceye kadar jel solüsyon içerisinde tutuldu.

**D solüsyonunu** (NaHCO<sub>3</sub>): 200 ml distile suya stok solüsyondan 20 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 5 dakika muamele edildi.

Distile suda yıkanan jel nemli olarak asetat arasına alındı ve naylon dosya poşeti içine alınarak hava alması engellenecek şekilde saklandı.

### 3.2.4. İstatiksel Analiz

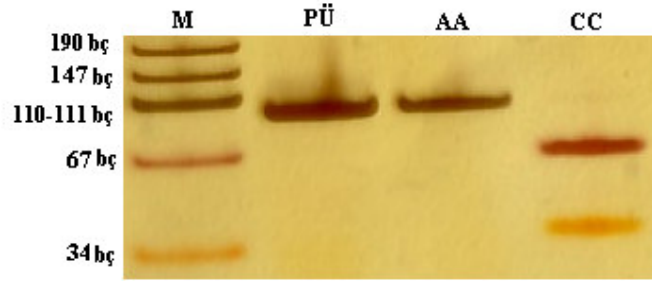
Odds ratio, %95 güven aralığı ve  $\chi^2$  analizi, conditional logistic regression analizi kullanarak yapıldı. Hücre frekansları 5'ten az olduğunda gerçek metodlar kullanılarak risk oranları hesaplandı. Tüm analizler PC için SPSS 12,0 versiyonu kullanılarak yapıldı.

#### 4. BULGULAR

SOD gen ailesi ile ALS hastaları arasındaki ilişkiyi inceleyen bu çalışmamızda PCR-RFLP yöntemi ile belirlenen SOD1, SOD2 ve SOD3 genleri değişimleri bakımından 124 ALS vakası ile 124 kontrolün genotiplemesi yapıldı. İstatistiksel analize göre hastalarla kontroller arasındaki allelik ilişkiler tablolar halinde verildi.

Çizelge 4.1 PCR ile çoğaltılan SOD1 D90A mutasyonunu içeren gen dizisi.

Uzunluk(bç)	Dizi
95	5'-TAGGCATGTTGGAGACTTGGGCAATGTGACTGCTGACCAAAGATGGTGTGGCCGATGTGTCTATTGAAGATTCTGTGATCTCACTCTCAGGAGACC-3'



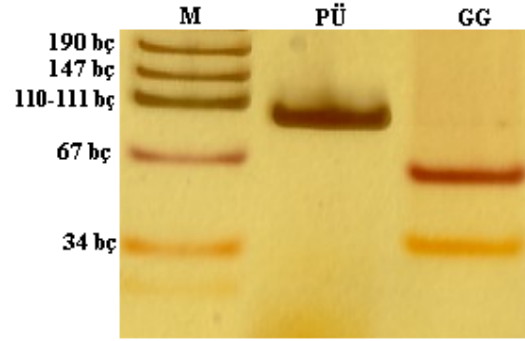
Şekil 4.1 *SatI* enzimi ile kesilen SOD1 D90A mutasyonunu içeren gen bölgesinin poliakrilamid jel görüntüsü (M: pUC mix 8 M, PÜ: kesilmemiş PCR ürünü, AA; wild type, CC: Mutant, bç;baz çifti).

Çizelge 4.2 Enzim kesimi sonrası oluşan bant dizileri ve uzunlukları.

Uzunluk (bp)	5' Base	3' Base	Dizi
33	1	33	TAGGCATGTTGGAGACTTGGGCAATGTGACTGC
62	34	95	TGACCAAAGATGGTGTGGCCGATGTGTCTATTGAAGATTCTGTGATCTCACTCTCAGGAGACC

Çizelge 4.3 PCR ile çoğaltılan SOD1 G93A mutasyonunu içeren gen dizisi.

Uzunluk(bç)	Dizi
95	5'-TAGGCATGTTGGAGACTTGGGCAATGTGACTGCTGACAAAGAT GGTGTGGCCGATGTGTCTATTGAAGATTCTGTGATCTCACTCTCAG GAGACC-3'



Şekil 4.2 *BccI* enzimi ile kesilen SOD1 G93A mutasyonunu içeren gen bölgesinin poliakrilamid jel görüntüsü (M: pUC mix 8 M, PÜ: kesilmemiş PCR ürünü, GG; wild type, bç; baz çifti).

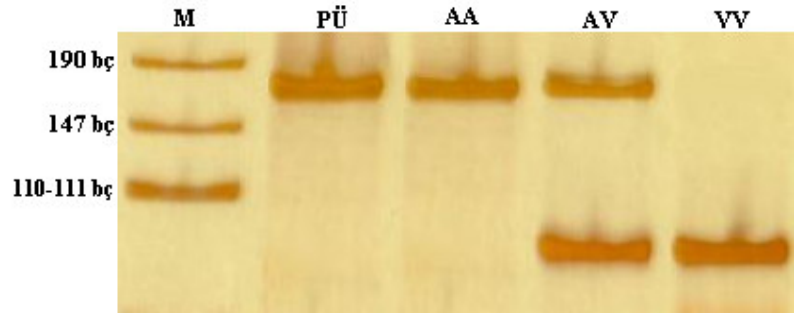
Çizelge 4.4 Enzim kesimi sonrası oluşan bant dizileri ve uzunlukları.

Uzunluk (bp)	5' Base	3' Base	Dizi
35	1	35	TAGGCATGTTGGAGACTTGGGCAATGTGACTGCTG
60	36	95	ACAAAGATGGTGTGGCCGATGTGTCTATTGAAGAT TCTGTGATCTCACTCTCAGGAGACC

Çalışmamızın bu kısmında SOD2 geni ile ALS hastalığı arasındaki ilişkiyi inceledik ve şu sonuçları elde ettik. Mn-SOD ala-9val polimorfizmi bakımından 124 SALS vakasının ve 124 kontrolün genotiplemesi yapıldı. İstatistiksel analize göre hastalarla kontroller arasında allelik ilişki bulunamadı ( $\chi^2 = 1.238$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.538$ ). Hastalarda genotip dağılımı %26,2 VV, %50,8 AV, %23 AA ve kontrollerde ise %31,4 VV, %50,4 AV, %18,2 AA olarak bulundu (A= ala, V= val). Allelik frekanslar val alleli için, hastalarda %51,6 kontrollerde %56,6, ala alleli için de hastalarda %48,4 kontrollerde %45,9 olarak hesaplandı. Bunların beklenen oranları da val alleli için hastalarda %54 kontrollerde %54,1; ala alleli hastalarda %46 kontrollerde %45,9 olarak hesaplandı. Buna göre Mn-SOD ala-9val polimorfizminin ALS hastalığı oluşumunda bağımsız olarak risk oluşturmadığı bulundu (Çizelge 4.8).

**Çizelge 4.5 PCR ile çoğaltılan SOD2 A(-9)V polimorfizmini içeren gen dizisi.**

Uzunluk (bç)	Dizi
172	5'-CAGCCCAGCCTGCGTAGACGGTCCCGCGGGCGCTGACT GACCGGGCTGTGCTTTCTCGTCTTCAGCACCAGCAGG CAGCTGGCTCCG <u>GTT</u> TTGGGGTATCTGGGCTCCAGGC AGAAGCACAGCCTCCCCGACCTGCCCTACGACTACG GCGCCCTGGAACCTCACATCAACGC-3'



**Şekil 4.3 BswaI enzimi ile kesilen SOD2 A(-9)V polimorfizmini içeren gen bölgesinin poliakrilamid jel görüntüsü (M: pUC mix 8 M, PÜ: kesilmemiş PCR ürünü, AA: wild type, AV: heterozigot, VV: mutant).**

**Çizelge 4.6 Enzim kesimi sonrası oluşan bant dizileri ve uzunlukları.**

<b>Uzunluk (bp)</b>	<b>5' Base</b>	<b>3' Base</b>	<b>Dizi</b>
86	1	86	CAGCCCAGCC TGCGTAGACG GTCCCGCGGC GCTGACTGAC CGGGCTGTGC TTTCTCGTCT TCAGCACCCAG CAGGCAGCTG GCTCCG
86	86	172	GTTTTGG GGTATCTGGG CTCCAGGCAG AAGCACAGCC TCCCCGACCT GCCCTACGAC TACGGCGCCC TGGAACCTCA CATCAACGC

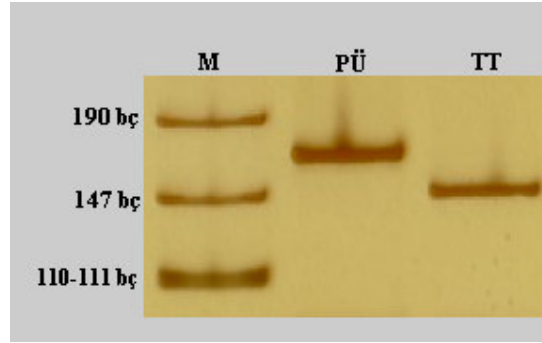
**Çizelge 4.7 ALS hasta ve kontrol gruplarına göre SOD2 Ala(-9)Val polimorfizminin genotip ve allel dağılımları,  $\chi^2$ , df, p ve %95 güven aralığı içinde Odds Ratio değerleri**

Gen	SNP No	Gruplar	Dağılım	VV	AA	AV	Toplam	$\chi^2$	df	p	Allel(%)	
											V	A
S O D 2	A(-9)V	Kontrol	Gözlenen	38	22	61	121	1,238	2	0,538	56,6	43,4
			Beklenen	34,9	24,9	61,2	121				54,1	45,9
			Oran(%)	31,4	18,2	50,4	100					
		Hasta	Gözlenen	32	28	62	122				51,6	48,4
			Beklenen	35,1	25,1	61,8	122				54	46
			Oran(%)	26,2	23,0	50,8	100					
			OR (%95 güven aralığı)	0,777 (0,445-1,355)	1,340 (0,717-2,506)	1,016 (0,615-1,681)						
			P	0,373	0,358	0,949						



**Çizelge 4.8 PCR ile çoğaltılan SOD2 I(58)T mutasyonunu içeren gen dizisi.**

Uzunluk (bç)	Dizi
158	5'-CGGATGTTATAGATAAGCTGGTCCCATTATCTAATACGTTACA AAGAAAAAATATAATGTATACAGTGGTTGAAAAAGTAGGA GTTACAAAAAATGTGTTTGCATTTTAACTTTTCAGGAGATG TTACAGCCCAGATATCTCTTCAGCCTGCACTG-3'



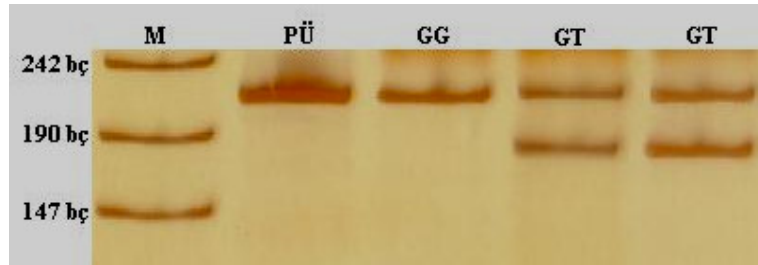
**Şekil 4.4 EcoRVenzimi ile kesilen SOD2 I(58)T polimorfizmini içeren gen bölgesinin poliakrilamid jel görüntüsü (M: pUC mix 8 M, PÜ: kesilmemiş PCR ürünü, TT: wild type, 19 bç'lik fragment gösterilmemiştir).**

**Çizelge 4.9 Enzim kesimi sonrası oluşan bant dizileri ve uzunlukları.**

Uzunluk (bç)	5' Base	3' Base	Dizi
139	1	139	CGGATGTTATAGATAAGCTGGTCCCATTATCTAATAC GTTACAAAGAAAAAATATAATGTATACAGTGGTTGA AAAAGTAGGAGTTACAAAAAATGTGTTTGCATTTTAA ACTTTTCAGGAGATGTTACAGCCCAGAT
19	139	19	ATCTCTTCAGCCTGCACTG

Çizelge 4.10 PCR ile çoğaltılan SOD3 R(202)L mutasyonunu içeren gen dizisi.

Uzunluk (bç)	Dizi
217	5'-GCTGCGTGGTGGGCGTGTGCGGGCCCCGGGCTCTGGGAG CGCCAGGCGCGGGAGCACTCAGAGCGCAAGAAGCGGCGG CGCGAGAGCGAGTGCAAGGCCGCCTGAGCGCGGCCCCAC CCGGCGGCGGCCAGGGACCCCCGAGGCCCCCTCTGCCTTT GAGCTTCTCCTCTGCTCCAACAGACACCTTCCACTCTGAGG TCTACCTTCGCCTCTGC-3'



Şekil 4.5 *SacI* enzimi ile kesilen SOD3 R(202)L polimorfizmini içeren gen bölgesinin poliakrilamid jel görüntüsü (M: pUC mix 8 M, PÜ: kesilmemiş PCR ürünü, GG: wild type, GT: heterozigot, 40 bç'lik fragment gösterilmemiştir).

Çizelge 4.11 Enzim kesimi sonrası oluşan bant dizileri ve uzunlukları.

Uzunluk (bp)	5' Base	3' Base	Dizi
40	1	40	GCTGCGTGGTGGGCGTGTGCGGGCCCCGGGC TCTGGGAGCG
177	40	217	CCAGGCGCGGGAGCACTCAGAGCGCAAGAA GCGGCGGCGGAGAGCGAGTGCAAGGCCGC CTGAGCGCGGCCCCACCCGGCGGCGGCCA GGGACCCCCGAGGCCCCCTCTGCCTTTGAG CTTCTCCTCTGCTCCAACAGACACCTTCCACT CTGAGGTCTACCTTCGCCTCTGC

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmamızda SALS hastalarında Süperoksit Dismutaz gen ailesi değişimleri RFLP yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu değişimler SOD1 geninde; Asp90Ala (D90A) ve Gly93Ala (G93A) mutasyonları, SOD2 geninde; Ala(-9)Val(A-9V) ve Ile58Thr (I58T) polimorfizmleri ile SOD3 geninde Arg202Leu (R202L) mutasyonudur. Elde edilen veriler ve dünya literatürü ile karşılaştırılmaları şöyledir.

SOD1 geninde bugüne kadar ALS ile ilişkilendirilen yaklaşık 120 mutasyon arasından D90A ve G93A seçilmiş ve bu mutasyonlar hasta ve kontrol gruplarında taranmıştır. 124 kişilik hasta grubu içinde bir hastada D90A mutasyonuna homozigot olarak rastlanmıştır. D90A mutasyonu farklı etnik gruplarda farklı şekillerde kalıtım gösteren tek CuZn-SOD mutasyonudur (Jonsson et al. 2002). D90A mutasyonu ile ALS ilişkisi ilk kez 1995 yılında Anderson et al. tarafından rapor edilmiştir. Bir yıl sonra aynı grup tarafından yapılan daha büyük bir araştırmada 36 İskandinav ALS hastasında D90A mutasyonu homozigot olarak belirlenmiş ve bu mutasyonu taşıyan hastalarda tek tip fenotip gözlenmiştir. Bu bireylerde hastalığın ortalama başlangıç yaşı 42-44 ve hayatta kalma süreleri 11-13 yıl olarak belirlenmiştir. Belirtiler kollarda katılaşma ve kramplar ile bitkinlik hissi, alt ekstremitelerde felç (parezi) ve genelde yavaş bir hastalık seyridir. Hayatta kalma süreleri ortalamaya uyar fakat bazı hastalar 20 yıldan daha fazla süren hayatta kalma süresine sahiptir (Jonsson et al. 2005). Bu mutasyonu heterozigot olarak taşıyan bireylerde genelde hastalık başlangıç yaşı daha geç (55 yaş) fakat hayatta kalma süresi daha kısadır. Ve hastalık daha ağır bir seyir izler.

İskandinav halkı dışındaki bireylerde belirlenen D90A mutasyonu (Çizelde 1.6) sonuçları tüm hastalarda farklı fenotiplerin oluşumuna neden olmuştur. Belirtilerdeki farklılığa ilk belirtilerin lomber olması ve hastalık seyrinin hızlılığında dahildir. Bu bilgiler ışığında Anderson et al. 1998 yılında, D90A mutasyonunu resesif olarak taşıyan İskandinav hastalarla dünyanın farklı bölgelerindeki D90A mutasyonu taşıyan hastaları ve diğer SOD1 mutasyonlarını taşıyan hastaları karşılaştırdıklarında farklı bir fenotip görmüş ve bu mutasyonu resesif olarak taşıyan bireylerin SOD1'in toksik etkisini değiştirici koruyucu bir faktöre sahip

olabileceklerini fikrini ileri sürmüştür. Mutasyonu dominant olarak taşıyan bireylerde hastalığın daha ağır bir seyir göstermesi ve hayatta kalma sürelerinin daha kısa olması Al-Chalabi et al. nin bu görüşünü doğrular niteliktedir.

**Çizelge 1.6 Dünya genelinde dominant kalıtmı olarak belirlenen D90A mutasyonları (Skvortsova et al. 2000)**

D90A	Yer	Vaka sayısı	Referans
Sporadik	Finlandiya	2 kişi	Anderson et al.(1997)
	Kuzey Amerika	2 kişi (İskandinav değil)	Kaplan et al. (1996) ve Al-Chalabi et al.
	Belçika	1 kişi	Robberecht et al. (1996)
	İngiltere	1 kişi	Jackson et al. (1996)
Familiyal	Fransa	1 homozigot ve 1 heterozigot birey	Camu et al. (1999)

Bizim belirlediğimiz SOD1 D90A mutasyonunu vaka homozigot olarak taşımakta ve hastalık 40 yaş civarı başlayıp yavaş bir seyir izlemektedir. Bu yönüyle İskandinav kökenli hastalık fenotipi sergilemektedir.

SOD1 geninde incelediğimiz diğer bir değişim G93A değişimidir. Bu değişim 1993 yılında Rosen et al. tarafından FALS ile ilişkilendirilmiştir. G93A'nın SOD1 geninde oluşturduğu etkileri ve hastalık oluşumu ile ilişkisini belirlemek amacıyla yapılan incelemelerde şu sonuçlar elde edilmiştir. G93A transgenik farelerde gözlenen hastalık semptonlarının nedeni, mutant enzimde CuZn-SOD aktivitesinin azalmasından kaynaklanmaz. Mutant enzim serbest radikal oluşumunu hızlandıracak yeni bir fonksiyon kazanır (gain of function). Bu durum X ray kristallografik çalışmalarla da doğrulanmıştır. FALS mutant proteinin aktif kanalı wild-type enziminkinden belirgin şekilde daha geniştir. Bu durum mutant SOD1'in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' ye daha kolay ulaşımı sağlar. Böylelikle daha fazla serbest radikal oluşur (Yim et al. 1996).

İncelediğimiz 124 kişilik hasta grubu içerisinde G93A değişime hiçbir bireyde rastlanmamıştır. SALS'de SOD1 mutasyonlarına rastlanma oranı %1-7 olarak belirlenmiştir. Tüm ALS'li hastalar içerisinde SOD1 mutasyonu taşıyan

ALS'li hastaların oranında %1-2 olduğuna göre 124 kişilik bir hasta potansiyelinde bu mutasyona rastlanmaması şaşırtıcı değildir.

SOD1 genindeki mutasyonların motor nöron hücre ölümüne hangi mekanizmayla neden olduğu bilinmemekle birlikte, mutant SOD1'in aksonal transportta gözlenen hatalarda uyarıcı bir etken olduğu gösterilmiştir. Bu aksaklıkla ilgili mekanizma şu şekilde açıklanmıştır: Mutant SOD1'i eksprese eden sinir hücrelerinde mitokondriler mutant proteinden etkilenir ve aksonlardan hücre nukleusuna doğru hareket ederek sinir hücresinin gövde kısmında nukleus etrafında toplanır. Aksonlarda mitokondrilerin yok olmasıyla bu bölgede ATP oluşumu sekteye uğrar ve bu durum da aksonal ölümlere neden olur.

Hastalık patolojisiyle ilgili diğer bir yaklaşım da otofajideki bir defektin ALS oluşumunda genel bir yolak olduğu görüşüdür. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalarda hücrede lityumun bir otofaji uyarıcısı olarak görev yaptığı bulunmuştur. ALS'deki patolojik bulgulardan olan bozulmuş mitokondri yapılarını otofajiyi uyararak ortadan kaldırdığı gözlenmiştir. Ayrıca lityumun hücrede nörogenezi ve nöronal farklılaşmayı da uyardığı düşünülmektedir. Son zamanlarda ALS hastalığının tedavisinde lityum uygulaması başlatılmıştır. Sonuçta bazı hastaların lityumla tedaviye olumlu cevap verdiği gözlenmiştir. Ancak bu madde için en uygun dozun ne olduğu ve lityumla tedaviye neden sadece bazı hastaların cevap verdiği ileriye yönelik olarak cevap bekleyen sorulardır.

SOD2 geni ile ALS hastalığı arasındaki ilişki ilk kez Parboosing et al. tarafından 1995 yılında SSCP yöntemiyle SOD2 geninin özel olarak 3' ucunu araştırmaları ile olmuş ve bu bölgede meydana gelen değişimle ALS hastalığı arasında bir ilişki bulamamışlardır. 1998 yılında Tomblyn et al. SOD2 geninin kodlanan bölgesinin dizilemesinde 20 SALS hastasının 11'inde ve 10 kontrolün 3'ünde mitokondriyal hedefleyici dizide Ala(-9)Val polimorfizmi için homozigotluk belirlemişlerdir. Bu çalışma çok küçük çapta olsa da bu durum Ala(-9)Val polimorfizmi ile ALS arasında bir ilişki kurulması fikrini düşündürmüştür. Bu konuyla ilgili daha fazla bulgu 1999 yılında Van Landeghem et al. tarafından bulunmuştur. Bu araştırma diğer araştırmalara göre sayı olarak daha fazla kişi üzerinde yapılmıştır. İsveçli sporadik motor nöron hastalığı olan 72 hasta ve 136 kontrol kullanılarak yapılan çalışmanın sonucunda Ala allelinin motor nöron

hastalığa yakalanma riskini arttırdığını bulmuşlardır (p= 0,025). Tomkins et al. 2001 yılında SSCP yöntemiyle 77 ALS hastasında SOD2 geni değişimlerini araştırmıştır. SOD2 geninin tüm kodlanan dizisini olası değişimler açısından taranmış ancak hiçbir mutasyona rastlanmamıştır. Ayrıca bu hasta grubu Ala(-9)Val polimorfizmi açısından da incelenmiş ancak hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ancak ALS hastalarında Ala'nin allelinin daha düşük bir sıklıkta olma eğilimi gösterdikleri belirlenmiştir (p= 0,08).

Ala(-9)Val polimorfizminin ALS hastalığı açısından önemi tam olarak anlaşılmış değildir. *İn vitro* olarak Val allelinin mitokondriyal matrikse daha az bir etkinlikle getirildiği ve bu durumda daha düşük SOD2 aktivitesine neden olduğu gösterilmiştir. Fakat bu durum *in vivo* olarak henüz gösterilmemiştir (Anderson Jonsson, 2005).

124 SALS hastası ve 124 kişilik bir kontrol grubu ile yaptığımız bu araştırmamızda Ala(-9)Val polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı (p= 0,538). SOD2 A(-9)V polimorfizminde A allelinin dağılımı kontrol grubunda 43,4, hasta grubunda ise 48,4 olarak bulunmuştur. Hasta grubunda %5'lik artış olmasına rağmen allelik dağılım istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 0,538, Çizelge 4.8) Bu sonuç dünya genelinde elde edilen sonuçla da tutarlılık göstermektedir. Tomkins et al. 2001 yılında 77 ALS hastasında yaptığı incelemede hasta grubu içinde A alleli dağılımını 49,4, kontrol grubunda ise 58,3 olarak belirlemiştir.

SOD2 geninde meydana gelen bir diğer değişimde Ile58Thr nokta mutasyonudur. Bu mutasyon enzimin tetramer yapısını bozar ve ısıya karşı stabilitesini ve enzimatik aktivitesini azaltır. Doğal olarak meydana gelen bu mutasyon helikal hairpin mutasyonudur. Protein yapısına iki katlanma hatasına neden olur. Bunlardan her biri tetramerik yüzeyin dörtlü heliks kıvrımlarındadır. SOD1'de benzer paketlenme hatalarına neden oldukları düşünülen mutasyonlar (Ala4Val, Ile113Thr, Val148Gly ve Ile149Thr) nörodejeneratif bir hastalık olan ALS ile ilişkilendirilmiştir (Borgstahl et al. 1996). Bu nedenle ALS hastaları Ile58Thr değişimi açısından incelenmiş ve 124 ALS hastasının hiç birinde bu mutasyona rastlanmamıştır. Ayrıca hasta grubuyla yaş ve cinsiyet olarak birebir eşleştirilen kontrol grubunda da bu mutasyona rastlanmamıştır.

Dünya literatürüne bakıldığında Ile58Thr mutasyonunun ALS hastalığıyla ilişkisinin incelendiği bir yayın yoktur. Ancak bu konuyla ilgili olarak yapılmış en yakın çalışma Grasbon-Frodl et al. 1998 yılında ALS gibi nörodejeneratif bir hastalık olan Parkinson hastalarında SOD2 Ile58Thr mutasyonu dağılımının araştırmasıdır. Bu çalışmada 63 Parkinson hastası bu değişim açısından taranmış ve hiç birinde bu değişime rastlanmamıştır. Sonuç olarak SOD2'nin stabilitesinde meydana gelen bu değişimin nörodejenerasyonda ve nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda bir rolü olmadığı düşünülebilir.

Arg202Leu polimorfizmi SOD3 geninin heparin bağlanma bölgesinde belirlenmiş bir değişimdir. Campo et al. 2005 yılında Akdeniz populasyonunda 2400 örnek üzerinde SOD3 değişimlerinin oranını incelerken Arg202Leu değişimi oranını %0,84 olarak belirlemişlerdir. Bazı araştırmalara göre SOD3 proteininin heparin bağlanma bölgesinde az sayıda lisin veya arginin aminoasiti bulunursa heparan sülfat bağlanırlığı azalır (Adachi and Marklund, 1989). Buradan yola çıkarak Campo et al. Arg202Leu varyasyonunun enzimin bu fonksiyonunu etkileyebileceğini öne sürmüştür. Ayrıca yaptıkları çalışma sonucunda Arg202Leu varyasyonunun düşük sıklığı, bu değişimi taşıyan homozigot bireylere rastlanmaması ve Güney İtalya populasyonunda hiç Arg202Gly mutasyonuna rastlanmayışı evrim sürecinde etnik gruplar arasında EC-SOD'un heparin bağlanma bölgesinin endojen ve çevresel kuvvetler sonucu farklı şekilde seçilime uğradığı görüşünü öne sürmelerini sağlamıştır.

Folz and Crapo 1994 yılında RNA jel blot analiziyle SOD3 geni mRNA'sı ekspresyon seviyelerini belirlemiş ve şu sonuçları elde etmişlerdir. SOD3 mRNA ekspresyonu yetişkin kalp, plasenta, pankreas ve akciğerlerde en yüksek olarak belirlenmiştir. Böbrek, iskelet kasları ve akciğerde ekspresyonun orta düzeyde ve beyin veya karaciğerde ise mRNA ekspresyonunun oldukça az olduğu belirlenmiştir. Dünya literatüre bakıldığında SOD3'de meydana gelen değişimler üzerine yapılan araştırmalar daha çok Arg213Gly değişimi ile ve mRNA ekspresyonunun fazla olduğu dokularda oluşan hastalıklarla olmuştur. Örneğin; miyokardiyal şoklar, homosisteinura ve tümörler. Nörodejeneratif hastalıkla ilgili olarak böyle bir ilişki bugüne kadar araştırılmamıştır. Bizim çalışmamızda incelediğimiz 124 kişilik hasta grubu içerisinde 2 kişide Arg202Leu değişimine heterozigot olarak rastlanmıştır. Bu

yönüyle bu sonuç nörodejeneratif hastalıklarla SOD3 değişimleri arasında da bir bağlantı olabileceğini düşündürür.



## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

124 SALS hastası ve bu hastalarla yaş ve cinsiyet olarak eşleştirilmiş 124 kişilik kontrol grubunda SOD gen değişimlerini incelediğimiz bu çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekildedir.

Daha önce ALS hastalığı ile ilişkilendirilmiş bir SOD1 mutasyonu olan D90A mutasyonu 1 hastada homozigot olarak belirlenmiştir. SOD1 geninde diğer bir ALS ilişkili mutasyon olan G93A mutasyonuna ise hasta veya kontrol grubu içerisinde rastlanmamıştır. Bu durum Türkiye'deki SOD1 mutasyonu sıklığının dünya geneline oranla daha düşük olduğunu göstermektedir.

SOD2 Ala(-9)Val polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $p= 0,538$ ). Bu sonuç dünya genelinde elde edilen sonuçla tutarlılık göstermektedir. SOD2'deki diğer bir değişim olan Ile58Thr mutasyonuna da 124 SALS hastası ve 124 kişilik kontrol grubu içerisinde rastlanmamıştır. Sonuç olarak bugünkü kanıtlar ALS patogenezinde SOD2 geninde meydana gelen değişimlerin katkısının olmadığı yönündedir.

SOD3 geninde araştırdığımız Arg202Leu değişimine çalışma grubumuzda 2 hastada heterozigot formda rastlanması ve kontrol grubu içerisinde hiç rastlanmaması daha önce ALS patogenezi ile ilişkilendirilmeyen bu değişimin de ALS patogenezine neden olabileceği düşüncesini oluşturmuştur. Daha geniş hasta ve kontrol gruplarının taranması ve bir sonraki basamakta da knock out insan geni içeren model organizmaların oluşturulması ile bu mutasyonun hastalıkla ilgili etkileri belirlenebilir. Ayrıca doku kültürü yöntemiyle mutant SOD3'ün ekspresyon ve gen ürünü dağılımına bakılarak mutant ürünün hücre toksisitesine etkisi incelenebilir.

Yapılan yoğun çalışmalara rağmen ALS hastalığı patogenezi ile ilgili sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bugün sporadik ve familial ALS ile ilişkili olduğu belirlenmiş değişimlerin bazıları sadece kromozomal lokalizasyonlarla sınırlı kalmış bu bölgelerdeki hedef genler henüz belirlenmemiştir. Bu genlerin tam olarak belirlenmesi hastalığın nedenin anlaşılması açısından aydınlatıcı olabilir. ALS hastalığında motor nöronların ölüm nedeni olarak tek bir etken sayılamaz. Hastalık multifaktöriyel olarak oluşan ancak tüm hastalarda benzer fenotiple sonuçlanan nörodejeneratif bir hastalıktır. Geç yaşlarda başlayan, yaşa bağlı penetransı olan ve hayatta kalma süresi kısa olan bir hastalık olması da yapılan araştırmaları kısıtlamaktadır.

## KAYNAKLAR

- Adachi, T., Marklund, S.L., (1989). Interactions between human extracellular superoxide dismutase C and sulphated polysaccharides. *J. Biol. Chem.* 264:8537-8541.
- Akkuş, İ., (1995). Serbest Radikaller. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri Konya: Mimoza Yayınları* s.1-10.
- Al-Chalabi, A., Andersen, P.M., Chioza, B., Shaw, C., Sham, P.C., Robberecht, W., Matthijs, G., Camu, W., Marklund, S.L., Forsgren, L., Rouleau, G., Laing, N.G., Hulse, P.V., Siddique, T., Leigh, P.N., Powell, J.F., (1998). Recessive amyotrophic lateral sclerosis families with the D90A SOD1 mutation share a common founder: evidence for a linked protective factor. *Hum Mol Genet.* Dec;7(13): 2045-50.
- Borgstahl, G.E.O., Parge H.E., Hickey, M.J., Johnson M.J., Boissinot, M., Hallewell R.A., Lepock J.R., Cabelli, D.E., Tainer, J.A., (1996). Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduce activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry.* 35:4287-4297.
- Bowling, A.C., Schulz, J.B., Brown, R.H., Beal, M.F., (1993). Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 61:2322-2325.
- Cambo, S., Sardo, A.M., Campo, G.M., D'Ascola, A., Avenoso, A., Castaldo, M., Saitta, C., Lania, A., Saitta A., Calatroni, A., (2005). *Mutation Research.* 78:143-148.
- Camu, W., Khoris, J., Moulard, B., Salachas, F., Briolotti, V., Rouleau, G.A., Meininger, V. (1999). Genetics of familial ALS and consequences for diagnosis. *J. Neurol. Sci.* 1. S21-S26.
- Chen, Y.Z., Bennett, C.L., Huynh, H.M., Blair, I.P., Puls, I., Irobi, J., Dierick, I., Abel, A., Kennerson, M.L., Rabin, B.A., Nicholson, G.A., Auer-Grumbach, M., Wagner, K., De Jonghe, P., Griffin, J.W., Fischbeck, K.H., Timmerman, V., Cornblath, D.R., Chance, P.F., (2004). DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet.* Jun;74(6): 1128-35.
- Cluskey, S., Ramsden, D.B., (2001). Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Pathol.* Dec;54(6): 386-92
- Couillard-Després, S., Zhu, Q., Wong, P.C., Price, D.L., Cleveland, D.W., Julien, J.P., (1998). Protective effect of neurofilament heavy gene overexpression in motor neuron disease induced by mutant superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 4;95(16): 9626-30.
- Deng, H.X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R.P., et al., (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science.* Aug 20;261(5124): 1047-51.

- Drory, V.E., Birnbaum, M., Korczyn, A.D., Chapman, J., (2001). Association of APOE epsilon4 allele with survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2001 Sep 15;190(1-2) :17-20.
- Fornai F., Longone P., Ferrucci M., Lenzi P., Isidoro C., Ruggieri S., Paparelli A., (2008). Autophagy and amyotrophic lateral sclerosis: The multiple roles of lithium. *Autophagy.* Jul-Aug;4(4): 527-30. Epub 2008 Mar 17.
- Fujita, K., Yamauchi, M., Shibayama K., et al. (1996). Decreased cytochrome c oxidase activity but unchanged superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res.* 45:276-281.
- Getzoff, E.D., Tainer, J.A., Stempien, M.M., Bell, G.I., Hallewell, R.A.,(1989). Evolution of CuZn superoxide dismutase and the Greek key beta-barrel structural motif. *Proteins.*;5(4): 322-36.
- Grasbon-Frodl, E.M., Kösel, S., Riess, O., Müller, U., Mehraein P., Graeber., (1999). Analysis of mitochondrial targeting sequence and coding region polymorphisms of the manganese superoxide dismutase gene in German Parkinson disease patients. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 24;255(3):749-52.
- Greenway MJ, Alexander MD, Ennis S, Traynor BJ, Corr B, Frost E, Green A, Hardiman O., (2004). A novel candidate region for ALS on chromosome 14q11.2. *Neurology.* Nov 23;63(10):1936-8.
- Gros-Louis, F., Gaspar, C., Rouleau, G.A., (2006). Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* Nov-Dec;1762(11-12):956-72.
- Hadano, S., Hand, C.K., Osga, H., Yanagisawa, Y., Otomo, A., Devon, R.S., Miyamoto, N., Showguchi-Miyata, J., Okada, Y., Singaraja, R., Figlewicz, D.A., Kwiatkowski, T., Hosler, B.A., Sagie, T., Skaug, J., Nasir, J., Brown, R.H. Jr, Scherer, S.W., Rouleau, G.A., Hayden, M.R., Ikeda, J.E., (2001). A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet.* Oct;29(2): 166-73.
- Hand, C.K., Rooleau, G.A. (2002). Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *John Wiley & Sons, Inc. Muscle Nerve* 25: 135–159.
- Hendrickson, D. J., Fisher, J. H., Jones, C., Ho, Y.-S., (1990). Regional localization of human extracellular superoxide dismutase gene to 4pter-q21. *Genomics* 8:736–738.
- Hentati, A., Ouahchi, K., Pericak-Vance, M.A., Nijhawan, D., Ahmad, A., Yang, Y., Rimmler, J., Hung, W., Schlotter, B., Ahmed, A., Ben Hamida, M., Hentati, F., Siddique T., (1998). Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers. *Neurogenetics.* Dec;2(1): 55-60

Hosler, B.A., Siddique, T., Sapp, P.C., Sailor, W., Huang, M.C., Hossain, A., Daube, J.R., Nance, M., Fan, C., Kaplan, J., Hung, W.Y., McKenna-Yasek, D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Horvitz, H.R., Brown, R.H. Jr. (2000). Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22. *JAMA*. Oct 4;284(13): 1664-9.

[http://alsod.iop.kcl.ac.uk/Als/reports/allMutations.aspx?gene\\_id=SOD1](http://alsod.iop.kcl.ac.uk/Als/reports/allMutations.aspx?gene_id=SOD1)

Jonsson, P.A., (2005). Superoxide Dismutase 1 and Amyotrophic Lateral Sclerosis. Umea: Print&Media.p 8-37.

Jonsson, P.A., Backstrand, A., Anderson, P.M., Jacobsson, J., Parton, M., Shaw, C., Swingler, R., Shaw, P.J., Robberecht, W., Ludolph, A.C., Siddique, T., Skvortsova, V.I., Marklund, S.L., (2002). CuZn-Superoxide Dismutase in D90A Heterozygotes from Recessive and Dominant ALS Pedigrees. *Neurobiology of Disease*.10:327-333.

Julien, J.P., (2001). Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell*. Feb 23;104(4): 581-91

Kawahara, Y., Ito, K., Sun, H., Aizawa, H., Kanazawa, I., Kwak, S., (2004). Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature*. Feb 26;427(6977):801

Kim, H.T., Kim, Y.H., Nam, J.W., Lee, H.J., Rho, H.M., Jung, G., (1994). Study of 5'-flanking region of human Cu/Zn superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 30;201(3): 1526-33

Lacomblez, L., Doppler, V., Beucler, I., Costes, G., Salachas, F., Raisonnier, A., Le Forestier, N., Pradat, P.F., Bruckert, E., Meininger, V., (2002). APOE: a potential marker of disease progression in ALS. *Neurology*. Apr 9;58(7): 1112-4

Lambrechts, D., Storkebaum, E., Morimoto, M., Del-Favero, J., Desmet, F., Marklund, S.L., Wyns, S., Thijs, V., Andersson, J., Marion, I., Al-Chalabi, A., Bornes, S., Musson, R., Hansen, V., Beckman, L., Adolfsson, R., Pall, H.S., Prats, H., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Katayama, S., Awata, T., Leigh, N., Lang-Lazdunski, L., Dewerchin, M., Shaw, C., Moons, L., Vlietinck, R., Karen E Morrison, K.E., Robberecht, W., Broeckhoven, C.V., Collen, D., Andersen, P.M., Carmeliet, P., (2003). VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *NATURE GENETICS*. VOLUME 34 .NUMBER 4 . AUGUST 20.

Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM., (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 3;93(18): 9782-7.

Li, Y.J., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Siddique, N., McKenna-Yasek, D., Hung, W.Y., Sapp, P., Allen, C.I., Chen, W., Hosler, B., Saunders, A.M., Dellefave, L.M., Brown, R.H., Siddique, T., (2004). Apolipoprotein E is associated with age at onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics*. Dec;5(4): 209-13.

- Majoor-Krakauer, D.,(2005). Genetic Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis. P.35-37.
- Mitrunen K, Sillanpää P, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, Uusitupa M, Hirvonen A.,(2001). Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis*. May;22(5): 827-9.
- Münch, C., Sedlmeier, R., Meyer, T., Homberg, V., Sperfeld, A.D., Kurt, A., Prudlo, J., Peraus, G., Hanemann, C.O., Stumm, G., Ludolph, A.C., (2004). Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology*. Aug 24;63(4): 724-6
- Nishimura, A.L., Mitne-Neto, M., Silva, H.C., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J.R., Gillingwater, T., Webb, J., Skehel, P., Zatz, M., (2004). A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet*. Nov;75(5): 822-31.
- Parboosingh, J. S., Rouleau, G. A., Meninger, V., McKenna-Yasek, D., Brown, R. H. Jr., Figlewicz, D. A., (1995). Absence of mutations in the Mn superoxide dismutase or catalase genes in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul. Disord*.5:7–10.
- Pramatorova A., (1999). Role of Cu/Zn superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Umea university medical dissertation*.p.20-30.
- Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.R., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., Scott, R.W., Snider, W.D., (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Genetics*. 13, 43-47.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*.362 :59–62.
- Rothstein, J.D., Tsai, G., Kuncl, R.W., Clawson, L., Cornblath, D.R., Drachman, D.B., Pestronk, A., Stauch, B.L., Coyle, J.T., (1990). Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. Jul;28(1): 18-25.
- Rowland, L.P., Shneider, N.A., (2001). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*, Vol. 344, No.22.
- Russell, H.S., Parks, J.K., Patte, G., Parker, W.D., (2000). Role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *ALS and other motor neuron disorders*.1, 185-190
- Sandstrom, J., Nilsson, P., Karlsson, K., Marklund, S. L., (1994).10-Fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J. Biol. Chem*. **269**:19163–19166

- Shimoda-Matsubayashi, S., Matsumine, H., Kobayashi, T., Nakagawa-Hattori, Y., Shimizu, Y., Mizuno, Y., (1996). Structural Dimorphism in the Mitochondrial Targeting Sequence in the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226(2): 561-5.
- Skvortsova V.I., Limborska, S.A., Slominsky, P.A., Levitskaya N.I., Levitsky, G.N., Shadrina M.I., Kondratyeva E.A., (2000). Sporadic ALS associated with the D90A Cu,Zn superoxide dismutase mutation in Russia. *European Journal of Neurology* 8: 167-172.
- Strachan, T. And Read, A.P., (2004). *Human Molecular Genetics* 3. Garland Science, Taylor and Francis Group, London and New York.
- Tomblyn M, Kasarskis EJ, Xu Y, St Clair DK.,(1998). Distribution of MnSOD polymorphisms in sporadic ALS patients. *J Mol Neurosci.* Feb;10(1): 65-6.
- Tomkins, J., Banner S.J., McDermott, C.J., Shaw, P.J., (2001). Mutation screening of manganese superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport.* Aug 8;12(11): 2319-22.
- Traynor, B.J., Codd, M.B., Corr, B., Forde, C., Frost, E., Hardiman, O.M., (2000). Clinical Features of Amyotrophic Lateral Sclerosis According to the El Escorial and Airlie House Diagnostic Criteria. *Arch Neurol.* 57:1171-1176.
- Van Landeghem,G.F., Tabatabaie, P., Beckman, G., Beckman, L., Andersen, P.M., (1999). Manganese-containing superoxide dismutase signal sequence polymorphism associated with sporadic motor neuron disease. *Eur J Neurol.* Nov;6(6):639-44.
- [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- Wiedemann, F.R., Winkler, K., Kuznetsov, A.V., et al. (1998). Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 156:65-72.
- Xu Y, Krishnan A, Wan XS, Majima H, Yeh CC, Ludewig G, Kasarskis EJ, St Clair DK., (1999). Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. *Oncogene.* Jan 7;18(1): 93-102.
- Yamada, H., Yamada, Y., Adachi, T., Goto, H., Ogasawara, N., Futenma, A., Kitano, M., Miyai, H., Fukatsu, A., Hirano, K., Kakumu, S., (1997). Polymorphism of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) gene: relation to the mutation responsible for high EC-SOD level in serum. *Jpn. J. Hum. Genet.* 42:353-356.
- Yim, M.B., Kang, J.H., Yim, H.S., Kwak, H.S., Chock, P.B., Stadtman, E.R.,(1996). A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in Km for hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 11;93(12):5709-14.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J., (2002). Superoxide dismutase multigene family: a

comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33(3): 337-49

Zhang HJ, Yan T, Oberley TD, Oberley LW.,(1999). Comparison of effects of two polymorphic variants of manganese superoxide dismutase on human breast MCF-7 cancer cell phenotype. *Cancer Res.* Dec 15;59(24):6276-83.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1982 İzmit doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi İzmit'te tamamladım. 1999 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım ve 2004 yılında bu bölümden mezun oldum. 2005 yılında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün Tıbbi Biyoloji A.B.D yüksek lisans programına kayıt oldum. Halen Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.