

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALS HASTALARINDAKİ NÖROFİLAMENT VE MAKROFAJ MİGRASYON
İNHİBİTÖR FAKTÖRÜ PROTEİN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

GÜNERİYE ÖZEN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ŞENAY VURAL KORKUT**

**EŞ DANIŞMAN
DOÇ. DR. ASLIHAN GÜNEL**

İSTANBUL, 2018

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALS HASTALARINDAKİ NÖROFİLAMENT VE MAKROFAJ MİGRASYON
İNHİBİTÖR FAKTÖRÜ PROTEİN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Güneriye ÖZEN tarafından hazırlanan tez çalışması 26/04/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Şenay Vural KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL
Ahi Evran Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Şenay Vural KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Semiha ERİŞEN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Halil Atilla İDRİSOĞLU
İstanbul Üniversitesi



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2016-01-07-YL03 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca engin bilgileri, ilgileri ile bu yolda yanımda olan öncelikle değerli danışman hocam Dr. Şenay Vural KORKUT'a, daha sonrada eş danışmanım Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL'e saygı ve şükranlarımı sunarım.

ALS hastalığı ile ilgili yaptığımız araştırmalar sırasında gerekli bilgi ve kaynakları bizimle paylaştığı için çok değerli hocamız Prof. Dr. Halil Atilla İDRİSOĞLU'na ve tez çalışmam esnasında sorularımı büyük bir sabırla cevaplayan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Reşit ÇELİK hocama teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımız esnasında engin tecrübelerini benimle paylaşan sevgili hocam Ar. Gör. Munise YURTSEVER'e ve başımız her sıkıştığında yardımımıza koşan Sayın Şeyda BEKAR'a ve Nurkan POLAT'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans yolculuğum sırasında yanımda olan Büşra YİRMİBEŞ'e, sorduğum sorulara büyük bir sabırla cevap verdiği ve için Tuğçe Nur ERALP'e, desteklerini her zaman hissettiğim Buse BAHAR'A ve Cem CANLI'ya çok teşekkür ederim. Sürekli destekçim, sevgili dostum Serhat ÖZKAN'a, Hüseyin SANLI'ya, Deniz IRMAK'a, Fatma KALAÇAY'a teşekkür ederim. Bilginin önemini sevgili ablam Habibe Güler GÜNŞEN'e ve bana lise hayatımdan itibaren yol gösteren sevgili ablam Özlem SERTESER TURAN'a ve sevgili abim Erhan SERTESER'e sevgilerimi sunarım. Eğitim hayatım sırasında desteklerini esirgemeyen sevgili akrabalarım Nuriye CESUR'a, Minever CESUR'a, Beysim CESUR'a, ayrıca sevgili ablam Adeviye KARAGÖZ'e teşekkürü borç bilirim.

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, sevgisini, ilgisini asla esirgemeyen, bana her zaman moral olan, benimle mutlu olup benimle üzülen her başarımda benim kadar heyecanlanan ve ufkumu genişletmemi, bilimi, doğayı sevmemi sağlayan sevgili annem İkime ÖZEN'e çok teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca desteklerini asla esirgemeyen babam Ali ÖZEN'e ve kardeşim Ayla ÖZEN'e sevgi ve ilgileri için teşekkür ederim.

Nisan, 2018

Güneriye ÖZEN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Hipotez	6
BÖLÜM 2	8
GENEL BİLGİLER.....	8
2.1 Nörodejeneratif Hastalıklar	8
2.2 Alt-Üst Motor Nöron Hastalığı: ALS	12
2.2.1 Hastalığın Etyopatogenezi	16
2.2.1.1 Genetik Nedenler	16
2.2.1.2 Glutamat Eksitotoksitesi	24
2.2.1.3 Oksidatif Stres	28
2.2.1.4 Protein Çökelmeleri	31
2.2.1.5 Mitokodriyal Fonksiyon Bozukluğu	33
2.2.1.6 Aksonal Transport Bozukluğu	35
2.2.1.7 RNA İşleme Bozuklukları	37
2.2.1.8 Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptoz	38
2.2.1.9 Nöroinflamasyon	41
2.3 Nörofilamentler: Hücre İskeletinin Yapıtaşı.....	41

2.3.1	Nörofilamentlerin Hücrelerde İfadesi	43
2.3.2	Nörofilamentlerin Yapısal Özellikleri	43
2.3.3	Nörofilamentlerin Hücrelerde Taşınımı	45
2.3.4	Nörofilamentlerin Fosforilasyonu	47
2.3.5	Nörofilamentlerin Yıkımı	49
2.3.6	Nörofilamentlerin Fonksiyonu	50
2.3.7	Nörofilament ve ALS Hastalığı İlişkisi	52
2.4	Makrofaj Migrasyon İnhibe Edici Faktör (MİF)	54
2.4.1	MİF'in Hücrelerde İfadesi	55
2.4.2	MİF'in Yapısal Özellikleri	56
2.4.3	MİF'in İmmünolojik ve Enzimatik Aktivitesi	57
2.4.3.1	MİF: Glukokortikoid Antagonisti	57
2.4.3.2	MİF'in Enzim Aktiviteleri	60
2.4.3.3	MİF'in Sinyal Yolakları	62
2.4.4	MİF ve ALS Hastalığı İlişkisi	65
BÖLÜM 3		67
MATERYAL VE METOD		67
3.1	Materyal	67
3.1.1	Genel Labortuvar Malzemeleri	67
3.1.2	Kullanılan Cihazlar	68
3.1.3	pNF-H ELISA Kiti	69
3.1.4	MİF ELISA Kiti	69
3.1.5	Kullanılan Bilgisayar Programları	70
3.1.6	Etik Kurul	70
3.1.7	Hasta Grubu	71
3.1.8	Nörolojik Hasta Grubu	73
3.1.9	Kontrol Grubu	74
3.2	Metod	75
3.2.1	Kanlardan Plazma Eldesi	75
3.2.2	pNF-H ELISA Kitinin Uygulanması	76
3.2.3	MİF ELISA Kitinin Uygulanması	78
3.2.4	İstatistiksel Hesaplamalar	80
BÖLÜM 4		82
DENEYSEL BULGULAR		82
4.1	pNF-H ELISA Sonuçları	82
4.2	MİF ELISA Sonuçları	87
4.3	MİF ve pNF-H Korelasyonu	92
SONUÇ VE ÖNERİLER		96
KAYNAKLAR		105
EK-A		130
MİF HASTA VERİLERİ		130

EK-B	135
PNF-H HASTA VERİLERİ	135
EK-C	140
MİF VE PNF-H KORELASYON HASTA VERİLERİ	140
EK-D	144
MİF İSTATİSTİKSEL VERİLER.....	144
EK-E	147
PNF-H İSTATİSTİKSEL VERİLER.....	147
ÖZGEÇMİŞ.....	150

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
bp	Baz çifti
kDa	Kilo Dalton
kb	Kilobaz
μ L	Mikrolitre
mL	Mililitre
mm/gün	Milimetre/gün
mm/s	Milimetre/saniye
nm	Nanometre
ng/mL	Nanogram/Mililitre
RCF	Rölatif santrifügal güç
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece
cc	Santimetre Küp
p	Kromozomun kısa kolu
q	Kromozomun uzun kolu

KISALTMA LİSTESİ

ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
Akt	Protein Kinaz B
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropiyonik asit
ANG	Anjiogenin
AP-1	Aktivatör protein 1
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktivatör faktör 1
ATXN2	Ataksin 2
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BAX	Bcl-2-bağlantılı X
Bcl-2	B-hücre lenfoma 2
Bcl-XL	B-hücre lenfoma-ekstra büyük
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding proteins
C9ORF72	Kromozom 9 açık okuma çerçevesi 72
Camp	Siklik adenzin monofosfat
CAMPK	Ca(2+)/kalmodulin bağımlı protein kinaz
CD	Cell differentiation
Cdk5	Siklin bağımlı kinaz 5
ChAT	Kolin asetiltransferaz
CHCHD10	Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 10
CHMP2B	Charged Multivesicular Body Protein 2b
CHOP	CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
COX2	Siklooksijenaz 2
CRH	Kortikotropin salgılayıcı hormon
CXCR	C-X-C motif kemokin reseptör
DENN	Differentially expressed in normal and neoplastic cells
DPR	Dipeptit tekrarları
E	Glutamat
EATT	Eksitatör amino asit taşıyıcı
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMG	Elektromiyografi
ERAD	Endoplasmik-retikulum-bağlantılı protein degradasyon
ERBB4	Erb-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 4

ERK	Ekstraselüler Sinyal-düzenleyici Kinaz
FIG4	Fosfoinositid 5-fosfataz
FUS	Fused In Sarcoma
GABA	Gamma Amino Bütirik Asit
GLuR2	İyonotropik AMPA glutamat reseptör 2
GSK3	Glikojen sentaz kinaz 3
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HnRNP	Heterojen nükleer ribonükleoprotein
HNRNPA1	Heterojen Nükleer Ribonükleoprotein A1
HRE	Hexanucleotide repeat expansion
HRP	Yabanturbu peroksidazı
HSP	Heat shock protein
HSR	Heat shock response
IκBα	Nuclear factor of kappa B inhibitor alpha
JAB1	Jun activation domain-binding protein 1
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
K	Lizin
KA	Kainat
KAP3	Kinezin-bağlantılı protein 3
KIP-1	Kinezin-benzeri protein-1
LMN	Alt motor nöron
LPS	Lipopolisakkarid
MAPK	Mitojen-aktif edilmiş protein kinaz
MATR3	Matrin 3
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MHC	Major histocompatibility complex
MKP-1	Mitojen-aktif edilmiş protein kinaz fosfataz 1
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartat
NOX	NADPH oksidaz
NSC-34	Spinal kord × Neuroblastoma hibrid hücre hattı
O ₂ ⁻	Süperoksit
OD	Optik yoğunluk
OH ⁻	Hidroksil grubu
ONOO ⁻	Peroksinitrit
OPTN	Optinörin
P	Prolin
p38	Mitojen-aktif edilmiş protein kinaz
p53	Tümör protein 53
p62	Nükleer por glikoprotein p62
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PFN1	Profilin 1
pH	Power of Hydrogen
PH	Parkinson Hastalığı
PLA2	Fosfolipaz A2

Rab-GTPaz	Rab proteini için guanozin trifosfotaz
Rac1	Ras-bağılantılı C3 botulinum toksin substrat 1
RhoGEF	Rho için Guanin Nükleotit Değişim Faktörü
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RRM	RNA tanıma motifi
rRNA	Ribozomal RNA
S	Serin
SAPK	Stressle aktive edilmiş protein kinaz
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sulfat-poliakrilamid jel elektroforez
SETX	Senataksin
SIGMAR1	Sigma Non-Opioid İntracellular Receptor 1
SMA	Spinal Muskular Atrofi
SMN1	Survival of Motor Neuron 1
snRNP	Küçük nükleer Ribonükleoprotein
SOD1	Süper Oksit Dizmutaz 1
SPG11	Spastik Paraplejiya-11
SPG4	Spastis Paraplejiya-4
Src	Sarcoma
TARDBP	Transactive response DNA binding protein
TDP-43	Transactive response DNA binding protein 43
TIM	Translokaz kompleks iç membran
TMS	Transcranial Magnetic Stimulation
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TOM	Tanslokaz kompleks dış membran
TUBA4A	Tubulin Alfa 4a
UBQLN2	Ubiquilin 2
UMN	Üst motor nöron
UPS	Ubiquitin Proteasome System
V	Valin
VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C
VCP	Valosin-Containing Protein
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel 1

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	Sinir sistemini etkileyen bazı nörodejeneratif hastalıklar ve beyinde etkilediği bölgeler [23].....9
Şekil 2. 2	Alt ve üst motor nöronların beyindeki yerleşimi ve bu motor nöronların hasar görmesi sonucu ortaya çıkan semptomlar [38].....13
Şekil 2. 3	Dying-back, dying-forward ve bağımsız dejenerasyon hipotezlerinin mekanizması [41].....15
Şekil 2. 4	SOD1 enziminin hücre içerisindeki tepkimeleri a) Normal SOD1 kimyası: SOD1 aracılı süperoksit değişimi b) Peroksinitrit hipotezi 1 c) Peroksinitrit hipotezi 2 d) Peroksidaz hipotezi. (Tyr: Tirozin) [46].....18
Şekil 2. 5	Mutant SOD1 proteininin hücrel mekanizmalar üzerindeki etkisi (EAAT2: eksitatör amino asit taşıyıcı) [48].....19
Şekil 2. 6	FUS'un çeşitli fizyolojik fonksiyonları [50].....21
Şekil 2. 7	TDP-43'ün fizyolojik ve patofizyolojik durumları [51].....22
Şekil 2. 8	C9orf72 geni, üç transkript varyantı ve iki protein izoformu [54].....23
Şekil 2. 9	Nöronal eksitotoksitenin hücre üzerindeki etkisi [46].....25
Şekil 2. 10	Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu [127].....33
Şekil 2. 11	Mutant SOD1'in hedefi olarak mitokondri [48].....34
Şekil 2. 12	Motor nöron hücresi ölümlerinde protein yanlış katlanmasının rolü [147].....39
Şekil 2. 13	Nörofilament altbirimlerinin yapısı. E ve KEP segmentleri sırasıyla glutamik asit kalıntıları ve lizin, glutamik asit ve prolin kalıntıları bakımından zengindir. KSP dizileri homolog çiftleri heksapeptid tekrarlarında yer almaktadırlar. (E: glutamat, K: lizin, S: serin, P: prolin) [178].....44
Şekil 2. 14	10 nm'lik filamentlerin yapısal olarak bir araya gelişi [182].....45
Şekil 2. 15	Nörofilamentlerin hücrede taşınması [189].....46
Şekil 2. 16	Nörofilament alt birimlerinin fosforilasyonu ve proteolizisi [189].....49
Şekil 2. 17	İnsan MİF geninin yapısı. Oklar, insan MİF geninin iki polimorfizm bölgesidir. (yeşil: ekzon, Pembe: intron, AP1: aktivatör protein 1, NF-κB: nükleer faktör-κB, CREB: cAMP cevap elementi bağlanma proteini) [234].....55
Şekil 2. 18	MİF'in monomer ve homotrimer yapısı [233].....56
Şekil 2. 19	Glukokortikoidlerin immün baskılayıcı etkilerinin düzenlenmesi (GR: Glukokortikoid reseptörü) [241].....58
Şekil 2. 20	MİF'in tautomerizasyon aktivitesi için önerilen mekanizma. Katalitik baz, Pro1, bir proton atomunu soyutlarken, Lys32 aktif alanın hidrofobik cebinde L-dopachrome metil esterini protonlamaktadır. Protonun su ile karıştırılmasından sonra Pro1 olabilen ikinci bir baz, ürünü oluşturmak için ara maddeden bir ikinci protonu uzaklaştırır (Lys:Lizin) [245].....61
Şekil 2. 21	MİF subsratlarına örnek [245].....62
Şekil 2. 22	MİF'in sinyal iletim yolları [233].....63

Şekil 4. 1	pNF-H verilerinin dağılım grafiği.....	83
Şekil 4. 2	ALS, sağlıklı kontrol ve Nörolojik Kontrol gruplarının ortalama pNF-H (ng/mL) protein değerleri.....	84
Şekil 4. 3	ALS hastalığının başlangıç yerine göre ortalama pNF-H (ng/mL) protein değerleri. (pNF-H: Fosfonörofilament Ağır Zinciri, UMN: Üst Motor Nöron, LMN: Alt Motor Nöron).....	85
Şekil 4. 4	ALS hastalığının seyrine göre ortalama pNF-H (ng/mL) protein değerleri.....	86
Şekil 4. 5	Hastalık tipine göre pNF-H proteininin ortalaması.....	87
Şekil 4. 6	MİF protein verilerinin karekök dönüşümü sonucu dağılım grafiği.....	88
Şekil 4. 7	MİF protein verilerinin dağılım grafiği.....	88
Şekil 4. 8	MİF proteininin karekök dönüşüm verilerinin yaş gruplarına göre ortalaması.....	89
Şekil 4. 9	MİF proteininin karekök dönüşümü sonucu hastalık tipine göre ortalaması.....	90
Şekil 4. 10	MİF proteininin karekök dönüşümü sonucu hastalık başlangıç yerine göre ortalaması.....	91
Şekil 4. 11	MİF proteininin hastalık tipine göre ortalaması.....	92
Şekil 4. 12	MİF ve pNF-H proteininin hastalık tipine göre korelasyon grafiği.....	93
Şekil 4. 13	MİF ve pNF-H proteininin yaş gruplarına göre korelasyon grafiği.....	93
Şekil 4. 14	MİF ve pNF-H proteininin cinsiyete göre korelasyon grafiği.....	94
Şekil 4. 15	Sadece ALS hastalarının MİF ve pNF-H proteininin cinsiyete göre korelasyon grafiği.....	95
Şekil 4. 16	Sadece ALS hastalarının MİF ve pNF-H proteininin yaş gruplarına göre korelasyon grafiği.....	95

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3. 1	Laboratuvar genel malzemeleri.....	67
Çizelge 3. 2	Laboratuvarda kullanılan cihazlar.....	68
Çizelge 3. 3	pNF-H ELISA kiti içerisinde bulunan malzemeler.....	68
Çizelge 3. 4	MİF ELISA kiti içerisinde bulunan malzemeler.....	69
Çizelge 3. 5	Ölçüm ve hesaplamalarda kullanılan yazılımsal gereçler.....	70
Çizelge 3. 6	pNF-H ALS Grubu Demografik Bilgileri.....	71
Çizelge 3. 7	MİF Deney Grubu Demografik Bilgileri.....	72
Çizelge 3. 8	pNF-H Nörolojik Kontrol Grubu Demografik Bilgileri.....	73
Çizelge 3. 9	MİF Nörolojik Kontrol Grubu Demografik Bilgileri.....	74
Çizelge 3. 10	pNF-H Kontrol Grubu Demografik Bilgileri.....	74
Çizelge 3. 11	MİF Kontrol Grubu Demografik Bilgileri.....	75
Çizelge 3. 12	pNF-H standart çözeltilerin hazırlanması.....	76
Çizelge 3. 13	pNF-H 96 kuyucuklu plak.....	77
Çizelge 3. 14	MİF standart çözeltilerin hazırlanması.....	78
Çizelge 3. 15	MİF 96 kuyucuklu plak.....	79

ALS HASTALARINDAKİ NÖROFİLAMENT VE MAKROFAJ MİGRASYON İNHİBİTÖR FAKTÖRÜ PROTEİN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Güneriye ÖZEN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Eş Danışman: Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL

Amyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalığı yetişkin başlangıçlı, ilerleyici ve ölümcül bir nörodejeneratif hastalıktır. Motor kortekste yer alan üst motor nöronların ve omurilik ve beyin sapında bulunan alt motor nöronların ölmesi sonucu istemli kas atrofisi meydana gelmektedir. Hastalığın insidansı 4-8/100.000/yıl olmakla beraber prevalansı ise 3-8/100.000 olduğu varsayılmaktadır. ALS hastalığı ekstremiteler, bulbar ya da gövde başlangıçlı olabilmektedir. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde ise solunum kaslarında tutulum sonucu ölüm meydana gelmektedir. ALS'nin etyolojisi tam olarak bilinmese de genetik faktörler, oksidatif stres, RNA metabolizması bozuklukları, endoplazmik retikulum stresi, nöroinflamasyon ve protein çökelmeleri gibi mekanizmaların hastalığın oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir.

ALS, özgün diyagnostik bir test bulunmamasından dolayı tanısı güç olan bir hastalıktır. Biyobelirteçler, hastalık süresince biyokimyasal yollardaki değişimlerin göstergesi olan moleküllerdir. Belirteçler hastalığın teşhisi ve prognozunu takip için kullanılmaktadır. Ayrıca ilaç geliştirilmesi ve yeni ilaç hedefleri tanımlama süreçlerinde önemlidirler. ALS için çalışılan aday biyobelirteçlerden biri nörofilamentlerdir. Nörofilamentler, nöronlara özgün sitoskeletin önemli elemanlarıdır ve akson yapısının oluşturulmasında görev alırlar. ALS hastalığının oluşumunda nöroinflamasyonun ve immün sistem ile ilgili moleküllerin seviyesinde değişimlerin ortaya çıktığı

bilinmektedir. Bu moleküllerden biri MİF olarak kısaca adlandırılan makrofaj migrasyon inhibisyon faktörüdür. MİF, immün cevabın oluşturulmasını sağlayan sitokin benzeri bir moleküldür. Ayrıca enzim gibi davranarak bazı hücrel olaylara müdahale edebilmektedir.

Bu çalışmada biyobelirteç adayı olarak fosfonörofilament ağır zincirinin ve MİF proteinlerinin ALS hastaları, sağlıklı kontrol ve nörolojik kontrol grupları arasındaki farkların incelenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda, hasta ve kontrollerden alınan kanlardan plazma kısmı elde edildi. Plazmalardaki protein seviyelerinin ölçümü için ELISA sandviç yöntemi kullanıldı. Elde edilen veriler SPSS 23.0 programı ile analiz edildi. Fosfonörofilament ağır zincir proteininin seviyesinin sağlıklı kontrol grubuna göre ALS hasta grubunda istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p<0.05$). Bu proteinin seviyesinin ALS hasta grubunda daha yüksek olduğu tespit edildi. Ayrıca MİF proteini seviyesi de ALS hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı bulundu ($p<0.05$). MİF proteininin seviyesinin ALS hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede olduğu görüldü. Korelasyon analizi sonucunda ise fosfonörofilament proteini ile MİF proteini seviyeleri arasında güçlü bir pozitif korelasyon olduğu bulundu ($p<0.01$).

Sonuç olarak; bu proteinlerin seviyesi sağlıklı kontrol gruplarına göre ALS hasta grubunda daha yüksek seviyede seyretmektedir. Yapılan çalışmada nörolojik kontrol grubu heterojen bir hasta grubundan oluşmaktadır. Bu hasta grubu ile ALS hasta grubu arasında MİF ve fosfonörofilament protein seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilememiştir.

Anahtar Kelimeler: Fosfonörofilament, pNFH, MİF, Makrofaj Migrasyon İnhibe Edici Faktör, ELISA, ALS

ABSTRACT

INVESTIGATIONS OF NEUROFILAMENT AND MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR PROTEIN LEVELS IN ALS PATIENTS

Güneriye ÖZEN

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Co-Adviser: Assoc. Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive and fatal neurodegenerative disease with adult onset. Progressive degeneration of upper motor neurons in the motor cortex and lower motor neurons in the spinal cord and brain stem cause voluntary muscle atrophy. It is suggested that the incidence of the disease is 4-8 / 100,000 / year and the prevalence is 3-8 / 100,000. Onset of ALS can be in extremities, bulbar region or trunk. In the later stages of ALS disease, death occurs because of the failure of respiratory muscles. The etiology of ALS is not fully understood, but mechanisms such as genetic factors, oxidative stress, abnormalities of RNA mechanisms, endoplasmic reticulum stress, neuroinflammation and protein aggregations are thought to play roles in the development of the disease.

Diagnosis of ALS disease is difficult, because of absence of specific diagnostic test. Biomarkers are molecules that are indicative of changes in biochemical pathways during disease. Biomarkers are used to monitor the diagnosis and prognosis of the disease. They are also important in the process of drug development and identification of new drug targets. One group of the candidate biomarkers for ALS are neurofilaments. Neurofilaments are important components of neurons-specific cytoskeleton and are involved in the formation of the axon structure.

Neuroinflammation is also a mechanism that plays a role in the development of ALS. It is known that changes in the level of neuroinflammation and molecules related to the immune system have occurred during ALS disease. One of these molecules is the macrophage migration inhibitory factor, which is briefly referred to as MIF. The MIF is a cytokine-like molecule that allows the formation of an immunologic response. It also acts as an enzyme to intervene in some cellular events.

In this study, it was aimed to investigate the differences between the phosphoneurofilament heavy chain and MIF proteins as biomarker candidates among ALS patients, healthy control and neurological control groups. For this purpose, the plasma fraction was obtained from blood taken from patients and controls. ELISA sandwich method was used to measure protein levels in the plasma. The obtained data were analyzed by SPSS 23.0 program. The level of phosphoneurofilament heavy chain protein was found to be statistically different in ALS patient group compared to healthy control group ($p < 0.05$). The level of this protein was found to be higher in the ALS patient group. In addition, the level of MIF protein was statistically different in the ALS group compared to the healthy control group ($p < 0.05$). It was observed that the level of MIF protein was higher in the ALS patient group than in the control group. As a result of the correlation analysis, it was found that there was a strong positive correlation between phosphoneurofilament protein and MIF protein levels ($p < 0.01$).

As a result; the levels of these proteins are higher in the ALS patient group than in the healthy control group. In the study, the neurological control group consisted of a heterogeneous group of patients. There was no statistically significant difference between levels of MIF and phosphoneurofilament protein among this patient group and ALS patient group.

Keywords: Phosphoneurofilament, pNFH, MIF, Macrophage Migration Inhibitor Factor, ELISA, ALS

1.1 Literatür Özeti

Beyinde ve omurilikteki nöronların dejenerasyonu sonucu meydana gelen hastalıklara nörodejeneratif hastalıklar denilmektedir. Nörodejeneratif hastalıklar bilişsel rahatsızlık, hareketsetel rahatsızlık ya da hem bilişsel hem de hareketsetel rahatsızlığa neden olan hastalıklar olarak üçe ayrılmaktadır. Alzheimer hastalığı bilişsel rahatsızlık, motor nöron hastalıkları hareketsetel rahatsızlık ve demans hem bilişsel hem de hareketsetel rahatsızlık olarak tanımlanabilir. Nörodejeneratif hastalıkların içinde motor nöron hastalıkları önemli bir alt grubu oluşturmaktadır. Motor nöronlar insanlarda istemli hareketin oluşmasını sağlarlar ve alt ve üst motor nöronlar olarak ikiye ayrılırlar [1]. Bir motor nöron hastalığı olan ALS (amyotrofik lateral skleroz), Lou Gehrig (Amerikalı beyzbol oyuncusu) hastalığı olarak da bilinir, motor nöron hastalıkları içinde sık görülen ve motor korteks, omurilik ve beyin sapında, alt ve üst motor nöronların etkilendiği ilerleyici, genelde erişkin başlangıçlı ölümcül bir hastalıktır. Hastaların ortalama yaşam süresi 3-5 yıldır. ALS ilk kez 1869 yılında Fransız nörolog Jean-Martin Charcot tarafından merkezi sinir sisteminde gri ve beyaz cevheri etkileyen bir hastalık olarak tanımlanmıştır [2]. Hastalığın insidansı 4-8/100.000/yıl olmakla beraber prevalansı ise 3-8/100.000 olduğu düşünülmektedir. Erken kadın oranı 1.6/1 olarak bildirilmektedir. Hastalık 50-60 yaşlarında ortaya çıkmaktadır. 70'li yaşlarda hastalığın görülme oranı en yüksek seviyesine ulaşmaktadır. 80'li yaşlardan sonra ise insidans

azalmaktadır [3]. Türkiye’de tahminen toplamda 8000-10000 kadar hasta bulunduğu düşünülmektedir [4].

ALS hastalığında omurilik, beyin sapı ve primer motor nöronların ölümü meydana gelmekte ve bu motor nöronların ölümü birçok mekanizma sonucu gerçekleşmektedir. Hastalık sadece alt veya üst motor nöronların tutulumu ile başlayabildiği gibi hem alt hem de üst motor nöronların tutulumu ile de başlayabilir. Üst motor nöronların tutulumu sonucu güçsüzlük, refleks artışı, kas sertliği; alt motor nöronların tutulumu ile ise güçsüzlük, atrofi, fasikülasyon, kuvvetsizlik gibi semptomlar ortaya çıkmaktadır. Hastalığın başlangıcı yaklaşık %70 ekstremitte, yaklaşık %25 bulbar ve yaklaşık %5 gövde veya solunum başlangıçlı olmaktadır. Ekstremitte başlangıçlı hastalarda güçsüzlük, atrofi, fasikülasyon, kuvvetsizlik; bulbar başlangıçlı hastalarda yutma ve konuşma bozukluğu ve gövde başlangıçlı hastalarda ise solunum bozukluğu semptomları görülmektedir [5]. Hastaların %50’si semptomların başlamasından sonra 30 ay içinde, %20’si ise 5-10 yıl içinde ölmektedirler ancak 10 yıldan daha uzun süre yaşayan hastalar da bulunmaktadır [6]. Bunun nedeni ise ALS hastalığının başlangıç yeri ve alt ve/veya üst motor nöronların kaybının şiddeti ile ilgilidir. Sonuçta solunum kaslarının zayıflaması sonucu ortaya çıkan solunum yetmezliği hastaların ölümüne neden olmaktadır [5].

ALS hastalığının etyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Ancak motor nöronların kaybı için bazı potansiyel mekanizmalar önerilmektedir. En önemli nedenlerden biri genetik etkindir. Hastalık ailesel olarak %5-10 oranında kalıtılmaktadır lakin %90-95 oranında ise sporadik olarak ortaya çıkmaktadır. ALS hastalığı otozomal dominant, otozomal resesif ya da X’e bağlı kalıtılabilmektedir. SOD1 (süperoksit dismutaz1), TDP-43 (transactive response DNA binding protein 43), FUS (fused in sarcoma) ya da C9ORF72 (kromozom 9 açık okuma çerçevesi 72) bu genlerin birkaçı olmakla beraber bu genlerde meydana gelen mutasyonlar nöronların hücresel mekanizmalarının bozulmasına neden olmaktadır ve sonuç olarak motor nöronlar ölmektedir. Diğer önemli bir etken ise glutamat eksitotoksitesidir. Bir nörotransmitter madde olan glutamatın post-sinaptik nöronlar üzerinde bulunan glutamat alıcısı reseptörleri uzun

süre uyarması sonucu hücreye sürekli bir Ca^{+2} girişı olmaktadır. Bu durum hücre içindeki Ca^{+2} homeostazisinin bozulmasına neden olarak hücreyi ölüme sürüklemektedir. Diğer bir mekanizma ise nörofilament anormallikleridir. Motor nöronların aksonlarında hücre içi transport ve akson şeklinin oluşturulmasından sorumlu olan nörofilamentlerin polimerizasyonunun bozulması sonucu motor nöron hücrelerinde nörofilament çökelmeleri meydana gelmektedir. Bunun sonucunda motor nöronlar ölmektedir. Motor nöron hücrelerin ölümüne yol açan bir diğer etken ise oksidatif streştir. SOD1 enzimi gibi hücre içerisinde antioksidan aktivite gösteren enzimlerin yapılarının bozulması ya da toksik aktivite kazanmaları sonucu hücre içerisindeki oksidatif streste artış meydana gelmekte ve hücre dejenerasyona uğramaktadır. RNA metabolizmasında meydana gelen anormallikler de motor nöronların ölümüne neden olmaktadır. TDP-43 ve FUS gibi RNA'nın çekirdekten sitoplazmaya taşınmasından sorumlu proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu protein yapısı bozulmakta ve nükleer transport sekteye uğramaktadır. Hücre için gerekli proteinlerin üretilmemesi nedeniyle motor nöron dejenerasyonu meydana gelmektedir. Ayrıca mitokondride oluşan fonksiyon bozuklukları da motor nöron ölümüne yol açmaktadır. ALS hastalarının hücrelerinde mitokondri sayısında artış olduğu bulunmuş, solunum zincirinde hasarların olduğu ve mitokondri içinde Ca^{+2} seviyesinin artmış olduğu bildirilmiştir. Bütün bunlar sonucu motor nöronlarda apoptotik süreçler başlamakta ve hücrede ölüm meydana gelmektedir [7], [8].

ALS tanısı konulması güç olan bir hastalıktır. Alt ve üst motor nöron bulgularının belirgin olduğu hastalarda ALS tanısı koymak kolay olsa da her zaman her iki motor nöron tipinin bulguları beraber gözlenememektedir. ALS tanısı için kan ve idrar testi, MRI (manyetik rezonans görüntüleme), EMG (elektromiyografi), sinir iletkenlik testi, TMS (Transcranial Magnetic Stimulation) ve kas biyopsisi gibi nöroradyolojik ve laboratuvar araştırmaları yapılmaktadır ve bu semptomlarda ilerleyici bir durumun gözlemlenmesi gerekmektedir. Böylece benzer hastalık semptomlarına sahip hastalıklar elenebilmektedir. Hastalığın başlangıcı esnasında aile hikayesi bulunan

kişilerde genetik inceleme yapılabilmekte ve bu sayede tanı koymak kolaylaşmaktadır. ALS hastalığının tanısı için ilk kez 1990'da El Escorial tanı kriterleri belirlenmiştir. Yapılan klinik ve laboratuvar incelemeler sonucu belirlenen El Escorial kriterlerine göre ALS tanısı konulmaktadır. Ancak bu kriterlere rağmen ALS tanısı koymak kolay değildir çünkü ALS hastalığının tanısı için özgün bir biyobelirteç ya da tıbbi teşhiste kullanılabilecek bir test bulunmamaktadır [9], [10], [11], [12].

Günümüzde ALS hastalığının teşhisinde kullanılabilecek bir biyobelirteç bulunmamasına rağmen yapılan klinik araştırmalarda bulunan aday biyobelirteçler hastalığın seyri açısından anlamlı sonuçlar verebilmektedir [11]. Nörofilamentler, motor nöronların aksonlarında bulunan, transport ve hücre şeklinin oluşmasında görev alan moleküllerdir. Li ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda bir nörofilament alt birimi olan nörofilament ağır zincirinin fosforlanmış (pNF-H) yapısının kanda ve beyin omurilik sıvısında (BOS) seviyesinin arttığı bildirilmiştir [13]. Leyton-Jaimes ve ark. ise yaptıkları fare modeli çalışmaları sonucu bir sitokin benzeri molekül olan makrofaj migrasyon inhibitör faktörü'nün (MIF) motor nöronlarda oksidatif stres ürünlerinin seviyesinin düşmesini sağlaması ile hücre ölümlerinin azaldığını bildirmişlerdir [14].

1.2 Tezin Amacı

Biyobelirteçler, insan doku, hücre ve sıvıları gibi biyolojik ortamlarda ölçülebilen hücresel, biyokimyasal ve moleküler değişkenler olarak Hulka ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır [15]. Daha sonra 1998'de National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group tarafından biyobelirteçler, terapötik müdahaleye yanıt, patolojik süreçlerin ya da normal biyolojik süreçlerin bir göstergesi olan objektif olarak ölçülen ve değerlendirilen bir biyolojik özellik olarak tanımlanmıştır [16]. Biyobelirteçler hastalık süresince değişen biyokimyasal yolları yansıtan moleküllerdir. Klinik olarak hastalığın tahmini, nedeni, teşhisi, gelişmesi, gerilemesi ve hastalık tedavisinin çıktılarını anlamada, ilaç geliştirilmesine yardımcı ve yeni ilaç hedefleri tanımlama gibi süreçlerde önemlidirler. Bu moleküller sayesinde hastalıkla ilgili genetik

çerçeve oluşturulabilir, hastanın mutasyona sahip olup olmadığı ya da hastalık fiziksel olarak semptom göstermeden kişinin hasta olup olmadığı tespit edilebilir [17].

Sinir sistemi hastalıklarının biyobelirteç araştırmalarında kan, beyin, BOS, kas, sinir, deri ve idrar veri toplamak için kullanıldığı gibi beyin görüntüleme yöntemleri de kullanılmaktadır [18]. Biyobelirteçler sayesinde ALS hasta popülasyonu içinde belli bir ilaca en iyi cevabı verebilecek olanlar sınıflandırılabilir, geliştirilen ilacın sinir sistemi içinde hedefine ulaşp ulaşmadığı değerlendirilebilir [19]. Klinik olarak kullanılacak biyobelirtecin kandan ölçülebiliyor olması önemlidir, çünkü hastalık semptomları gözlemlenmeden önce kandan yapılacak ölçümler sayesinde daha erken ve hızlı teşhis konulabilir. Ayrıca insandan kan alım protokolü göz önüne alınırsa diğer teşhis yöntemlerine göre daha kolay, hızlı ve acısız olabilmektedir. Örneğin BOS'ndan ölçülebilen bir biyobelirteç için öncelikle hastadan BOS alınması gereklidir ve bunun için uygulanacak protokolü her hasta kabul etmeyebilir. Bu göz önüne alındığında kandan ölçülebilen bir biyobelirtecin bulunmasının önemi artmaktadır.

Günümüzde yapılan araştırmalarda belirlenen aday biyobelirteçlerden biri nörofilamentlerdir. Nörofilamentler, akson şeklinin oluşturulmasında ve aksonda transportta görev alan moleküllerdir. Nörofilamentler birçok post-translasyonel modifikasyona uğramaktadırlar. Bunlardan biri de fosforlanmadır. Fosforlanmış nörofilamentler aksonda yer almaktadırlar. ALS hastalarından alınan BOS ile yapılan araştırmalarda pNF-H seviyesinin Alzheimer hastalarının BOS pNF-H seviyesine kıyasla 10 kat fazla ve kontrol grubuna göre de daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sadece BOS ile değil kan plazması ile yapılan araştırmalarda da pNF-H seviyesinin ALS grubunda kontrol grubuna göre yüksek olduğu bulunmuştur. Bu protein klinik olarak bir biyobelirteç olarak kullanılmasa da günümüzde hastalık hakkında tahmin için kullanılabilen bir biyobelirteçtir [20].

Nöroinflamasyon, ALS hastalığının oluşumunda rol oynayan mekanizmalardan biridir. Yapılan çalışmalarda inflamasyon ve immün sistem ile ilgili moleküllerin seviyesinde değişikliklerin meydana geldiği bildirilmiştir. Bu moleküllerden biri de MİF'dür. MİF, sitokin benzeri bir moleküldür. Ayrıca enzim gibi davranarak çeşitli hücrel olaylarda

görev alabilmektedir. Israelson ve ark. tarafından yapılan hayvan modeli araştırmalarında bu molekülün hasarlı nöronlara müdahale ederek canlının yaşam süresini uzattığı bildirilmiştir [21].

Tezde önceki araştırmalara göre pNF-H ve MİF'in aday kan biyobelirteçleri olarak araştırılması amaçlanmıştır. ALS hastalığının teşhisi için araştırılacak bu kan biyobelirteçlerinin, hastalık semptomları gözlemlenmeden önce erken dönemde ve hızlı bir şekilde teşhis konulması, hastalığı ilerlemiş hastaların tedavisi için daha uygun tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi veya hastalık seyrini yansıtmaması açısından uygunluğu değerlendirilecektir. Ayrıca bu araştırılacak kan biyobelirteçlerinin ALS hastalığının tedavisi için yapılan ilaç geliştirme çalışmalarında hedef protein olarak yer alma ihtimali bulunmaktadır.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada;

- ALS hastalarından, nörolojik kontrol grubu olarak belirlenen hastalardan ve kontrol grubu olarak da sağlıklı kişilerden kan alınması,
- Kanlardan plazma elde edilmesi,
- Kan plazmasından, pNF-H ve MİF ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) kitleri kullanılarak protein tayini yapılması,
- Elde edilen verilere göre istatistiksel analizlerle hasta grupları ve kontrol grubu arasındaki protein miktarlarının değerlendirilmesi yapılacaktır.

Yapılan literatür taraması sonuçlarına göre pNF-H ve MİF protein seviyelerinin ALS grubunda, sağlıklı kontrol ve nörolojik kontrol gruplarına göre farklı olması beklenmektedir. ALS hasta grubunda plazma pNF-H ve MİF protein seviyelerinin sağlıklı kontrol ve nörolojik kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında farklılıklar göstereceği bu çalışmanın temel hipotezi olarak belirlenmiştir. Bu miktar farklılıklarından yola çıkarak pNF-H ve MİF proteinleri ALS hastalığının tanısı ve ilerlemesi için biyobelirteç olarak kullanılabileceklerdir.

Bu çalışmada istatistiksel hesaplamalar SPSS programıyla parametrik ve parametrik olmayan testler kullanılarak yapılmıştır. Metodolojik olarak, pNF-H ve MİF proteinlerinin seviyelerinin ALS, nörolojik kontrol ve sağlıklı kontrol grupları arasında bir fark bulunmadığı yokluk hipotezimiz olarak belirlenmiştir. Sonuçta ALS grubunda pNF-H ve MİF protein seviyelerinin sağlıklı kontrol ve nörolojik kontrol grubuna göre kandaki miktarının fazla olacağı alternatif hipotezimiz olarak belirlenmiştir.

Nörolojik kontrol grubumuz içerisinde demans, Parkinson ve multiple skleroz (MS) hastaları bulunmaktadır. Bu hastalıklarda beyinde etkilenen bölgeler farklıdır. Fakat bu hastalıkların ortak noktası, oksidatif stres, nörofilament proteinlerin hasarlanması ve nöroinflamasyon sonucu aksonal dejenerasyonun meydana gelmesidir. Yapılan bir çalışmaya göre pNF-H proteininin aksonal hasarın bir göstergesi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir [22]. Buna ek olarak nörodejeneratif hastalıklarda nöroinflamasyonun rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle alışmamızda ALS hastalığı, nörolojik kontrol ve sağlıklı kontrol gruplarında pNF-H proteininin ve inflamasyonda rol alan bir protein olan MİF proteininin seviyesi ölçölmüştür. Bu ölçömler sonucunda da pNFH ve MİF proteinlerinin ALS hastalığı için muhtemel kan biyobelirteci olup olmayacağı değerlendirilecektir.

GENEL BİLGİLER

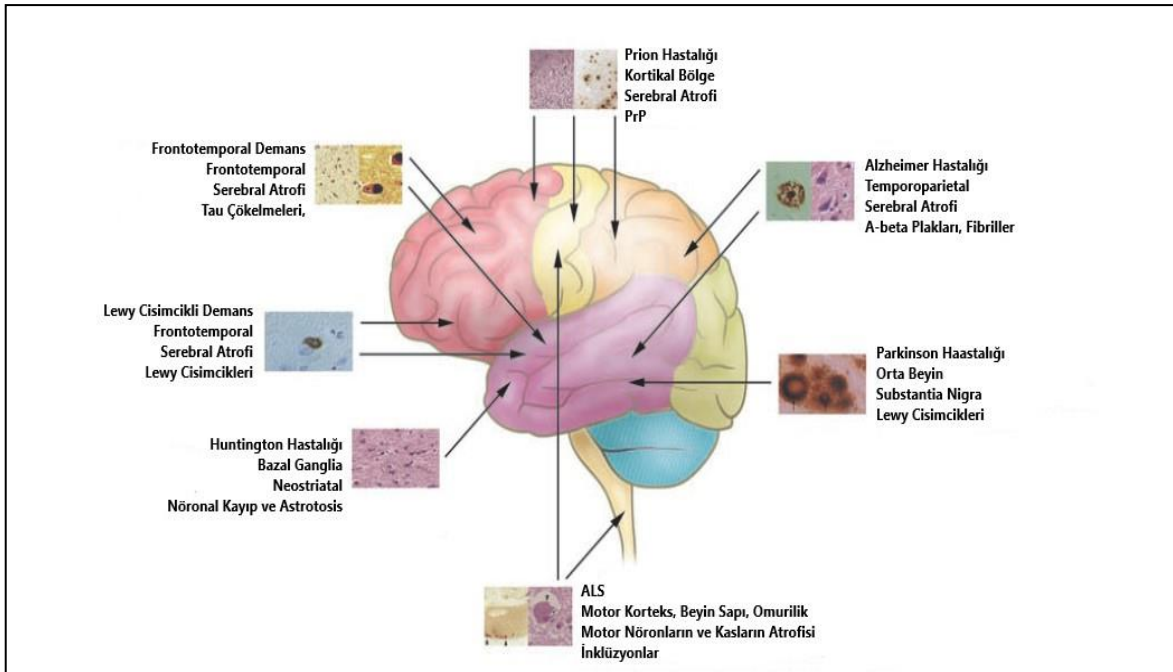
2.1 Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar merkezi ve periferik sinir sisteminde yer alan sinir hücrelerini etkileyen ilerleyici heterojen hastalık grubudur. Sinir sisteminde yer alan nöronların ölmesi sonucu ortaya çıkmaktadırlar [23]. Sporadik veya ailesel olarak kalıtılması, ilerleyici olması, geç yaşta başlaması, genetik ve çevresel etkenlerle ortaya çıkması, sinir sisteminde protein çökelmelerinin oluşması ve belli nöronların dejenerasyonuna neden olması nörodejeneratif hastalıkların ortak özellikleridir [24].

Nörodejeneratif hastalıkların sınıflandırılmasında genetik etyoloji, klinik ve patolojik özellikleri dikkate alınmaktadır. Hastalığın oluşmasında sadece tek bir gen etkili olabileceği gibi birden fazla gen de etkili olabilmektedir. Ayrıca nörodejeneratif hastalıkların oluşmasında çevresel etmenlerin de etkisi bulunmaktadır. Bu hastalıkların oluşmasında rol oynayan patolojik mekanizmalar net olarak bilinmese de endoplazmik retikulum (ER) stresi, oksidatif stres, mitokondriyal işlev bozukluğu, aksonal transport hasarları, nöroinflamasyondaki değişiklikler gibi potansiyel mekanizmaların rol oynadığı düşünülmektedir. Nörodejeneratif hastalıkların en önemli ayırıcı özelliklerinden biri anormal olarak katlanmış protein çökeltilerinin (Alzheimer hastalığında amyloid beta, Parkinson hastalığında alfa synuclein, ALS’de TDP-43) varlığıdır. Bu durum nöronların

hücrel mekanizmalarının bozulmasına neden olmakta ve sonuç olarak nöronların ölümüne yol açmaktadır [8].

Nörodejeneratif hastalıklar, hareketl rahatsızlık (örn. Motor nöron hastalıkları, Parkinson hastalığı), bilişsel rahatsızlık (örn. Alzheimer hastalığı, Fronto Temporal Demans (FTD)) ve hem bilişsel hemde hareketl rahatsızlık (örn. Lewy cisimli demans) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadırlar [1]. Ayrıca nörodejeneratif hastalıkların sınıflandırılması nöronların dejenere olduğı bölgeye göre de yapılmaktadır (Şekil 2. 1) Alzheimer hastalığı serebral korteksi, Parkinson hastalığı substantia nigra'daki dopaminerjik nöronları, Huntington hastalığı GABAergic nöronları, ALS hastalığı motor nöronları etkilemektedir [25].



Şekil 2. 1 Sinir sistemini etkileyen bazı nörodejeneratif hastalıklar ve beyinde etkilediğı bölgeler [23]

2.1.1 Motor Nöron Hastalıkları

Motor nöron hastalıkları yetişkin başlangıçlı nörodejeneratif hastalıkların etiyolojik olarak heterojen olan bir alt grubunu oluşturmaktadır. Motor korteks, beyin sapı ve omurilikte yer alan motor nöronların dejenerasyonu ile bu nöronlarla iletişim içinde olan kaslarda atrofi oluşması sonucu motor nöron hastalıkları oluşmaktadır [26].

Motor nöronlar oldukça uzun aksonları olan farklılaşmış ve polarize sinir hücreleridir. Üst ve alt motor nöronlar olarak gruplandırılmaktadırlar. İstemli hareket oluşturulurken motor korteksten köken alan üst motor nöronlar omurilik boynuzundaki alt motor nöronlarla doğrudan ya da dolaylı olarak sinaps yapar, omurilik ve beyin sapından köken alan alt motor nöronlar da iskelet kaslarını uyarmak için kas lifleri ile sinaps yapmaktadırlar [27]. Üst motor nöronlar, alt motor nöronların uyarılmasını nörotransmitter olarak adlandırılan kimyasal maddeler ile sağlamaktadırlar. Alt motor nöronlarda kasların uyarılmasını nörotransmitterler ile sağlayarak istemli kasların hareketi meydana gelmektedir. Beyin sapından köken alan alt motor nöronlar yüz, ağız, boğaz ve dildeki kasları kontrol ederken, omurilikten köken alan alt motor nöronlar uzuv, gövde, baş, boyundaki kasları, diyafram ve solunum kasları gibi diğer istemli kas grubunu kontrol etmektedirler [28]. Bu motor nöronların biyokimyasal mekanizmalarında yaşanan aksaklıklar sonucu motor nöronlar dejenere olmaktadır. Bu dejenerasyon kaslara giden sinirsel uyarıların aksamasına neden olmaktadır. Sonuçta istemli kas hareketleri yapılamamaktadır ve istemli kasların kullanılamaması sonucu kaslar zayıflamakta ve atrofiye uğramaktadırlar [3].

Alt motor nöronların kaybı sonucu kaslarda güçsüzlük, atrofi ve seyirme gözlenirken, üst motor nöronların kaybı ile kaslarda güçsüzlük, sertleşme, hareketlerin yavaşlaması ve kas tonusunda artış olmaktadır. Ayrıca bulbar kasların etkilenmesi ile de konuşmada ve yutmada güçlük meydana gelmektedir. Bunun yanında akıl, zeka, düşünme, hissetme, sindirim sistemi, kalbin işleyişi, kan basıncı, vücut sıcaklığı motor nöron dejenerasyonundan etkilenmemektedir [28].

Motor nöron hastalıkları üst motor nöron ve/veya alt motor nöron tutulumuna göre sınıflandırılmaktadırlar.

2.1.1.1 Üst motor nöron hastalıkları

Primer lateral skleroz: Kortikospinal motor nöronların dejenerasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Başlangıç yaşı 40-50 civarında fakat daha genç yaşta hastalarda bulunmaktadır. Juvenil primer lateral sklerozun ortaya çıkmasında ALS2 (alsin) geni etkili olmaktadır. Zayıflık, kas sertliği, hareketlerde yavaşlama, denge bozukluğu

semptomları gözlemlenmekte olup yavaş seyreden bir hastalıktır. Önce alt ekstremitelerde zayıflık ortaya çıkmakta fakat zamanla üst ekstremitelere ve bulbar kaslara yayılım göstermektedir [29], [30].

ALS2 geni juvenil primer lateral skleroz ile bağlantılı bir gendir. Alsin proteini küçük GTPaz Rab5 için guanin nükleotid değişim faktörü olarak işlev görmektedir ve hücre içi endozomal trafikte rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda alsin proteini mutant SOD1 proteinine bağlanarak motor nöronu toksisiteden koruduğu bildirilmiştir [31], [32].

Kalıtsal spastik parapleji: Heterojenik bir hastalık olup, otozomal dominant, otozomal resesif ve X-bağılantılı resesif olarak kalıtılan bir hastalıktır. 40'tan fazla genetik bölge hastalığın oluşumuna etki etmektedir [29]. Kortikospinal aksonların ilerleyici kaybı ile alt ekstremitelerde spastisite ve güçsüzlük ortaya çıkmaktadır [33].

SPG4 (spastin) geni bu hastalıkla bağlantılı genlerden biridir. ATPaz aktivitesine sahiptir ve *in vitro* olarak mikrotübülleri ayırmaktadır. Bu gende meydana gelen mutasyon sonucu nöronal mikrotübüllerde hasar meydana gelmekte ve bu da nöronal gelişmeyi engellemektedir [33].

2.1.1.2 Alt motor nöron hastalıkları

Spinobulbar kas atrofisi: Ayrıca Kennedy hastalığı olarak da bilinmektedir. Yetişkin dönemi başlangıçlı bir hastalık olup X-bağılantılı olarak kalıtılmaktadır. Ekstremitte kasların etkilenmesi ile güçsüzlük, yürüme güçlüğü, atrofi ve fasikülasyonlar oluşmaktadır. Bulbar kasların etkilenmesi ile de konuşma ve yutma güçlüğüne oluşması hastalığın belirtileri arasındadır. X kromozomu üzerinde yer alan AR (androjen reseptör) geni üzerinde yer alan CAG (sitozin-adenin-guanin) tekrarları hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır [3]. Bu gen, proteinin N-terminal transaktivasyon alanındaki poliglütamin ve poliglisin kanallarını kodlayan iki polimorfik trinükleotid tekrar segmenti içermektedir. Bu protein, steroid hormon aktive edilmiş transkripsiyon faktörü olarak çalışmaktadır. Poliglütamin CAG tekrar sayısı 38-62 arasında olan kişilerde hastalık ortaya çıkmaktadır. Gen üzerinde bulunan bu tekrar sayısının artması

ile protein katlanma sırasında yanlış katlanmaktadır. Yanlış katlanmış protein motor nöronlar için nörotoksik bir özellik kazanmaktadır [34].

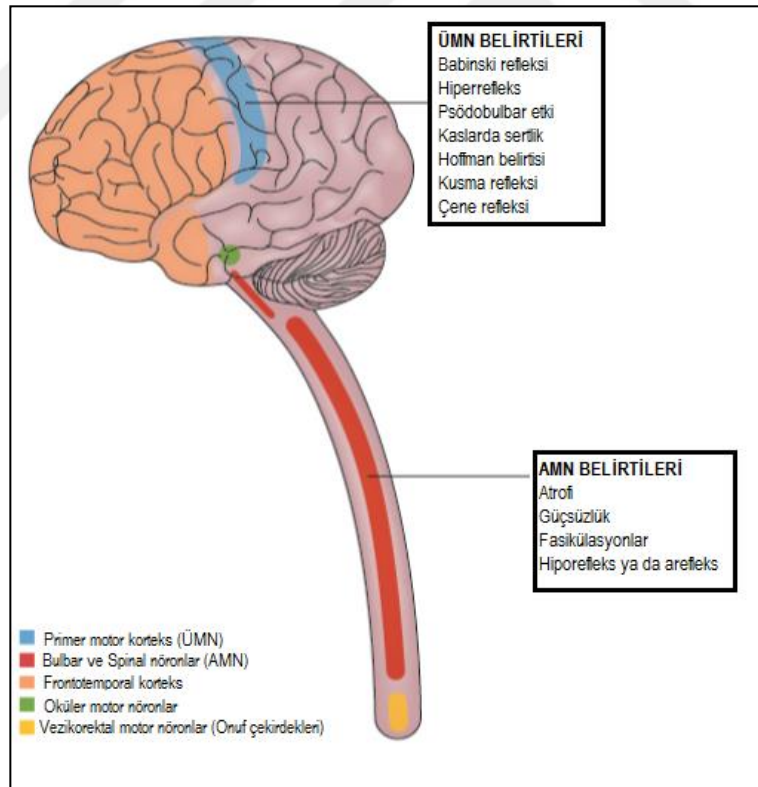
Spinal kas atrofisi: Hastalıkta omurilik ve bulbar alt motor nöronların dejenerasyonu gözlemlenmektedir. Çocukluk dönemi başlangıçlı ölümcül bir hastalıktır ve otozomal resesif, otozomal dominant ya da X-bağılantılı olarak kalıtılmaktadır. Genel belirtiler güçsüzlük, solunum yetmezliği, kas tonusunun ileri derecede azalmasıdır [3]. SMN1 (survival of motor neuron 1) geninde meydana gelen mutasyonlar ya da delesyonlar hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. SMN proteini, splayzomal snRNP (small nuclear ribonucleoproteins) ve mRNA biyogenezinde rol alır ve bu proteinin yapısının bozulması ile hücre içi mekanizmalar bozulmaktadır. Sonuç olarak motor nöron dejenerasyonu meydana gelmektedir [35].

2.2 Alt-Üst Motor Nöron Hastalığı: ALS

ALS, “merkezi sinir sisteminde hem gri hem de beyaz cevheri tutan ilerleyici paralitik sendrom” olarak ilk defa 1869 yılında Fransız nörolog Jean-Martin Charcot tarafından tanımlanmıştır. Bu hastalık Charcot hastalığı ya da Lou Gehrig hastalığı olarak da adlandırılmaktadır [2]. ALS hastalığı genelde yetişkin başlangıçlı, ilerleyici ve ölümcül bir nörodejeneratif hastalıktır. Motor korteksteki üst motor nöronlar ile omurilik ve beyin kökündeki alt motor nöronların tutulumu sonucu istemli kas atrofisinin meydana geldiği tek hastalıktır. Hastalığın insidansı 4-8/100.000/yıl olmakla beraber prevalansı ise 3-8/100.000 olduğu düşünülmektedir. Erken kadın oranı 1.6/1 olarak bildirilmektedir. Hastalık 50-60 yaşlarında ortaya çıkmakta ve 70’li yaşlarda hastalığın oranı en yüksek seviyesine ulaşmaktadır. 80’li yaşlardan sonra insidans azalmaktadır [3]. Tahminen Türkiye’de her sene 1500-4500 civarında kişiye hastalık tanısı konulmakta ve toplamda 8000-10000 kadar hasta bulunduğu düşünülmektedir. Bu konuda herhangi bir epidemiyolojik çalışma yapılmadığından hasta sayısı kesin olarak bilinmemektedir [4].

ALS hastalığı ekstremiteler, bulbar ya da gövde başlangıçlı olabileceği gibi ekstremiteler ve bulbar tutulumun birlikte başladığı durumlarda bulunmaktadır. Hastalığın %70’i

ekstremiteler, %25'i bulbar, %5'i de gövde başlangıçlı olarak ortaya çıkabilmekte ve zamanla diğer bölgelere yayılım göstermektedir [5]. ALS hastalarının %15'inde bilişsel bozukluk da meydana gelebilmektedir. Bu hastalarda FTD gelişme ihtimali bulunmaktadır [36]. Alt ve üst motor nöronların tutulumuna bağlı olarak hastalarda farklı semptomlar gelişmektedir. Genelde hastalarda ilk semptom olarak güçsüzlük meydana gelmektedir. Daha sonra çabuk yorulma, kuvvetsizlik, parmak hareketlerinin bozulması gibi şikayetler görülmektedir [3]. Hastalığın klinik bulguları tutulum bölgelerine göre değişiklik göstermektedir (Şekil 2. 2). ALS hastalığının ilerleyen dönemlerinde solunum kaslarında tutulum sonucu güçsüzlük meydana gelmektedir. Hastaların çoğunda ölüm solunum bozukluğundan meydana gelmektedir. Hastaların % 50'si klinik semptomların başlangıcından sonra 30 ay içinde ölmektedir, hastaların %20'si ise 5-10 yıl arası yaşamaktadır. Hastalığın ilerleyen yaşlarda başlaması ve erken solunum bozukluğu kısa yaşam süresi ile bağlantılıyken, erken yaşlarda görülmesi ve ekstremiteler başlangıçlı olması uzun süreli sağkalım ile sonuçlanmaktadır [5].



Şekil 2. 2 Alt ve üst motor nöronların beyindeki yerleşimi ve bu motor nöronların hasar görmesi sonucu ortaya çıkan semptomlar [37]

ALS hastalığının tanısı için spesifik bir diyagnostik test bulunmaması nedeniyle ALS tanısı güç olan bir hastalıktır. Ayrıca hastalığın ilk görüldüğü zamanlarda sadece alt motor nöron, üst motor nöron ya da bulbar başlangıçlı olması, kilo kaybı gibi semptomlardan dolayı diğer başka hastalıklarla karıştırılabilmektedir. Bu nedenle ALS tanısı için ilk kez 1990 yılında El Escorial kriterleri tanımlanmıştır. Daha sonra 1998 yılında bu kriterler yenilenmiştir. Bu kriterlere göre hastalık kesin ALS, muhtemel ALS, laboratuvar destekli muhtemel ALS, olası ALS olarak dört gruba ayrılmıştır [10].

ALS hastalığının tanısı için bazı tanı metodları bulunmaktadır. Alt motor nöron tutulumu sonucu meydana gelen alt motor nöron kaybı için EMG yöntemi kullanılmaktadır. Üst motor nöronların kaybını belgelemek için de TMS yöntemi kullanılmaktadır. Bunların dışında PET (pozitron emisyon tomografisi), MRI, kas biyopsisi, sinir iletim testleri gibi ölçüm yöntemleri kullanılmaktadır [8], [20].

ALS hastalığının oluşması için alt-üst motor ve bulbar nöronların tutulumunun birlikte olması gerekmektedir. Ancak her zaman tutulumların hepsi birlikte ortaya çıkmamaktadır. Bu nedenle ALS alt gruplara ayrılmıştır. Bunlar;

Progresif muskuler atrofi (PMA): Sadece alt motor nöronların tutulumu ile ortaya çıkmaktadır. Yavaş ya da hızlı seyredebilmektedir. Kollarda ve bacaklarda semptomlar görülmekte ve asimetrik olarak ortaya çıkmaktadır. İlerleyen süreçlerde ALS'ye dönüşme ihtimali bulunmaktadır [38].

Progresif lateral skleroz (PLS): Sadece üst motor nöronların tutulumu ile gözlenen bir hastalıktır. ALS'ye göre daha yavaş ilerlemektedir. Hastaların %77'sinde 3-4 yıl içinde ALS hastalığının bütün semptomları ortaya çıkmaktadır [38].

Progresif bulbar palsy (PBP): Kraniyal sinirlerin alt motor nöron tutulumuna bağlı semptomlar ortaya çıkmaktadır. Bulbar kasların etkilenmesi sonucu dizartri, disfaji, kilo kaybı gözlenmektedir. Hızlı ilerleyen bir hastalık olup 2-3 yıl yaşam süresi bulunmaktadır. Genelde solunum bozukluğu ile ölüm meydana gelmektedir [38].

Fail leg sendromu: Alt ekstremitte distallerinde alt motor nöron tutulumu nedeniyle güçsüzlük meydana gelmektedir. Yavaş ilerleme gösteren bir hastalıktır. İlerleyen süreçte üst motor nöron tutulumu da gözlenebilmektedir [39].

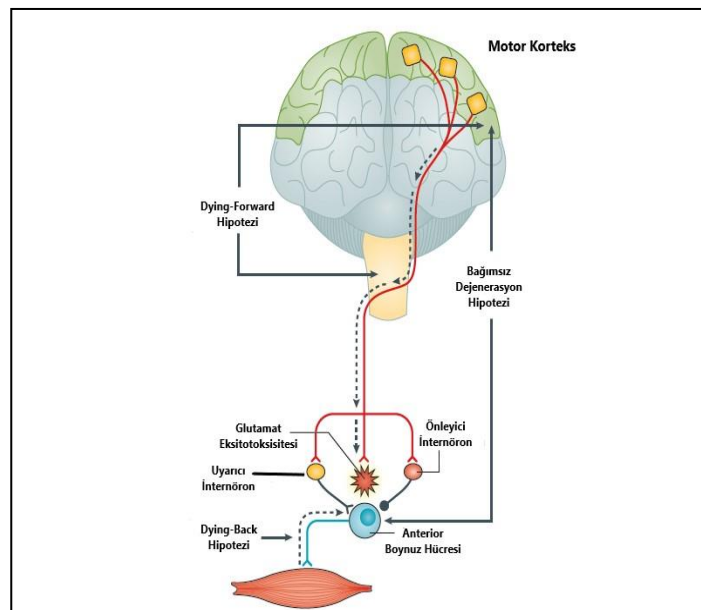
Fail arm sendromu: Üst ekstremitte proksimallerinde alt motor nöronların tutulumu sonucu zayıflık ortaya çıkmaktadır. İlerleyen süreçte hastalık alt ekstremitte ve bulbar bölgelere yayılım gösterebilmektedir [39].

ALS hastalığının etiopatogenezi kesin olarak bilinmemektedir fakat hastalığın ortaya çıkışına dair üç adet model önerilmektedir. Bunlar;

Dying-forward: ALS hastalığı ilk olarak kortikomotor nöronlarda başlamaktadır. Bu nöronlarda ortaya çıkan glutamat aracılı eksitotoksiste anterograd olarak ön boynuz hücrelerine taşınmaktadır. Bunun sonucunda hastalığın ortaya çıktığı önerilmektedir (Şekil 2. 3) [40].

Dying-back: Nöromuskular bağlantılarda ortaya çıkan patojenik etkenler retrograd olarak hücre gövdesine taşınmaktadır. Bu patojenik etmenlerin zararlı etkilerle motor nöronların dejenerasyonuna neden olduğu önerilmektedir (Şekil 2. 3) [40].

Bağımsız dejenerasyon: Üst ve alt motor nöronların bağımsız ve eş zamanlı bir şekilde dejenere olması ile hastalığın meydana geldiği düşünülmektedir (Şekil 2. 3) [40].



Şekil 2. 3 Dying-back, dying-forward ve bağımsız dejenerasyon hipotezlerinin mekanizması [40]

2.2.1 Hastalığın Etyopatogenezi

Motor nöron dejenerasyonunun oluşmasında birçok faktör etkili olmaktadır. Hastalığın etyolojisi tam olarak bilinmemektedir fakat öne sürülen birçok potansiyel mekanizma bulunmaktadır.

- Genetik Nedenler
- Glutamat Eksitotoksitesi
- Oksidatif Stres
- Protein Çökelmeleri
- Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu
- Aksonal Transport Bozukluğu
- RNA Taşınmasında Anormallikler
- Endoplazmik Retikulum Stresi
- Nöroinflamasyon

2.2.1.1 Genetik Nedenler

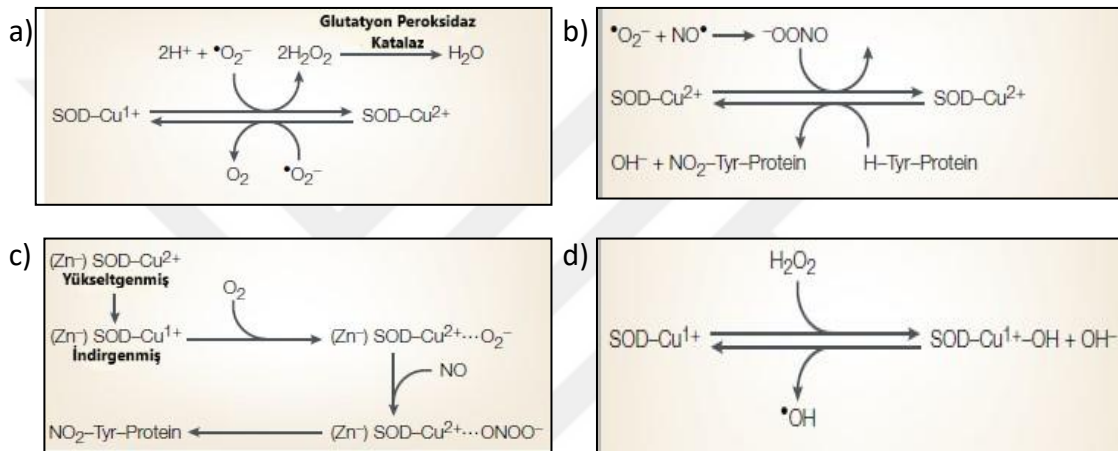
ALS hastalığı genetik olarak incelediğinde, hastaların %10'unun ailesel ALS olduğu görülmektedir. %90'lık kısmını ise sporadik ALS hastaları oluşturmaktadır. Bu hastalarda genetik mutasyonlar (Çizelge 2. 1) hastalığa neden olabilirken çevresel etmenlerde hastalığın ortaya çıkışını etkilemektedir.

ALS'ye neden olan genler otozomal dominant, otozomal resesif ya da X'e bağlı kalıtılabilmektedir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), linkaj analizleri, ekzom dizileme ve aday gen çalışmaları ile ALS'ye neden olan birçok gen tespit edilmiştir. Tespit edilen bu genlerde birçok mutasyonun meydana geldiği görülmüştür. Genlerdeki mutasyonlar motor nöron ölümünü tetiklemekte ve ALS hastalığının oluşmasına neden olmaktadır [41].

Çizelge 2. 1 OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif, XBD: X'e Bağlı Dominant [3], [20], [42].

ALS NO	GEN	LOKASYON	KALITIM ŞEKLİ	HASTALIĞIN BAŞLANGICI	OMIM NO
ALS1	SOD1	21q22.11	OD/OR	YETİŞKİN	105400
ALS2	ALS2	2q33.2	OR	GENÇ	205100
ALS3	-----	18q21	OD	YETİŞKİN	606640
ALS4	SETX	9q34.13	OD	GENÇ	602433
ALS5	SPG11	15q21.1	OR	GENÇ	602099
ALS6	FUS	16p11.2	OD	YETİŞKİN	608030
ALS7	-----	20p13	OD	YETİŞKİN	608031
ALS8	VAPB	20q13.33	OD	YETİŞKİN	608627
ALS9	ANG	14q11.1	OD	YETİŞKİN	611895
ALS10	TDP-43	1p36.22	OD	YETİŞKİN	612069
ALS11	FIG4	6q21	OD	YETİŞKİN	612577
ALS12	OPTN	10p13	OD/OR	YETİŞKİN	613435
ALS13	ATXN2	12q23-q24	OD	YETİŞKİN	601517
ALS14	VCP	9p13.3	OD	YETİŞKİN	613954
ALS15	UBQLN2	Xp11.21	XBD	YETİŞKİN/GENÇ	300857
ALS16	SIGMAR1	9p13.3	OR	GENÇ	614373
ALS17	CHMP2B	3p12.1	OD	YETİŞKİN	614696
ALS18	PFN1	17p13.3	OD	YETİŞKİN	614808
ALS19	ERBB4	2q33.3-q34	OD	YETİŞKİN	615515
ALS20	HNRNPA1	12q13.1	OD	YETİŞKİN	615426
ALS21	MATR3	5q31.2	OD	YETİŞKİN	606070
ALS22	TUBA4A	2q35	OD	YETİŞKİN	616208
FTDALS1	C9ORF72	9p21.2	OD	YETİŞKİN	105550
FTDALS2	CHCHD10	22q11.23	OD	-----	615911

•**ALS1:** 21. kromozomun uzun kolunda (q) 22.11 pozisyonunda yer alan bu gen bakır/çinko SOD1 proteinini kodlamaktadır. SOD1 sitozolik ve mitokondride intermembran boşlukta olan bir enzim olup yüksek miktarda ifade edilmektedir. Bu enzim homodimer yapıda olup 153 amino asitten oluşmaktadır. Ayrıca bakır ve çinko atomları da yapısına katılmaktadır. Bakır, SOD1'in aktivitesini etkilerken, çinkoda yapısal kararlılığı sağlamaktadır. SOD1 enzimi, mitokondride oksidatif fosforilasyon sonucu meydana gelen süperoksit radikallerini H_2O_2 ve O_2 detoksifiye etmektedir. Ancak H_2O_2 ve O_2 olduğu gibi ortama bırakılamadığından dolayı katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri bu ürünleri H_2O ve O_2 dönüştürmektedirler [43], [44].



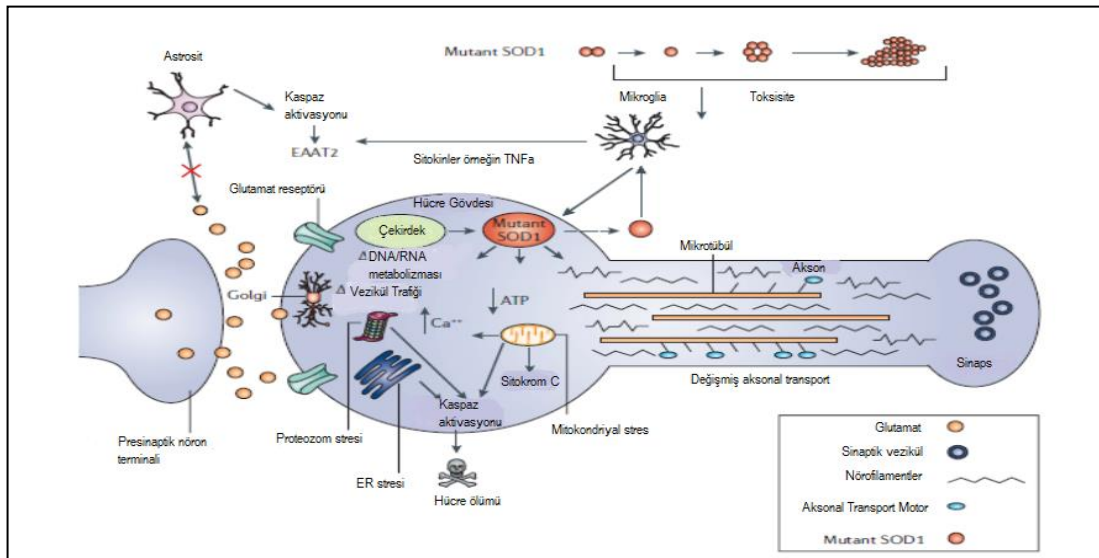
Şekil 2. 4 SOD1 enziminin hücre içerisindeki tepkimeleri a) Normal SOD1 kimyası: SOD1 aracılı süperoksit değişimi b) Peroksinitrit hipotezi 1 c) Peroksinitrit hipotezi 2 d) Peroksidaz hipotezi. (Tyr: Tirozin) [45]

1993 yılında yapılan linkaj analizi çalışmaları ile SOD1 geninin ALS'ye neden olan bir gen olduğu bulunmuştur. SOD1 geni otozomal dominant olarak kalıtılmakta ve ailesel ALS de ana etken olarak tanımlanmıştır. Ailesel ALS'li hastaların %12-20'sin de sorumlu gen iken sporadik ALS'li hastaların %1-2'sinde de etkendir [41]. Günümüzde bu gene ait 170'ten fazla mutasyon bildirilmiştir [44]. Bu mutasyonlar SOD1 polipeptinin uzunluğunda ve yapısında değişikliklere neden olmaktadır.

İlk başlarda araştırmacılar bu mutasyonlar nedeniyle enzimin antioksidant aktivitesini kaybetmesi sonucu hücrede reaktif oksijen türlerinin arttığını ve bunun sonucunda da oksidatif stresin artması ile nöron ölümünün meydana geldiğini düşünmüşlerdir. Fakat SOD1 geni susturulmuş hayvan modeli çalışmalarında, farelerde motor nöron hastalığı

oluşacağı düşünülmüş ancak sonuçta farelerde herhangi bir motor nöron hastalığının gelişmediği gözlemlenmiştir. Ayrıca mutant SOD1 enzimi kodlayan farelerde motor nöron hastalığının geliştiği görülmüştür. Hücre kültürü çalışmalarında ise mutant SOD1 enziminin aşırı derecede ifade edilmesi sonucu hücrelerde apoptozun meydana geldiği bildirilmiştir. Bütün bunlar SOD1 enziminin yanlış katlanması sonucu aktivitesinde azalma olmadığını bunun yerine enzimin toksik bir işlev kazandığını işaret etmektedir (Şekil 2. 4) [26].

Motor nöronlar hızlı metabolizmaya sahip hücreler olması nedeniyle oksidatif strese yatkındırlar. Moleküler oksijende güçlü bir oksidan olup süperoksit oluşumu için birçok biyolojik molekülden elektron çalabilmektedir. Yabancıl tip SOD1, detoksifikasyon sırasında okside olmakta ve bu da enzimin yanlış katlanmasını tetiklemektedir. Sporadik ALS olan ancak SOD1 mutasyonu taşımayan hastalarda, konformasyona özgü antikor kullanarak yapılan bazı çalışmalarda yanlış katlanmış SOD1'in varlığı bildirilmiştir [46]. Yanlış katlanmış olan SOD1, prion benzeri bir yapı kazanmakta ve diğer proteinleri yakalayıp onlarında çökeltmelerine ve yanlış katlanmalarına neden olur. Bu durum aksonal taşımayı aksatmakta, mitokondrinin işleyişini bozmakta ve apoptoza yol açmaktadır (Şekil 2. 5) [26], [44].



Şekil 2. 5 Mutant SOD1 proteininin hücresel mekanizmalar üzerindeki etkisi (EAAT2: eksitatör amino asit taşıyıcı) [47]

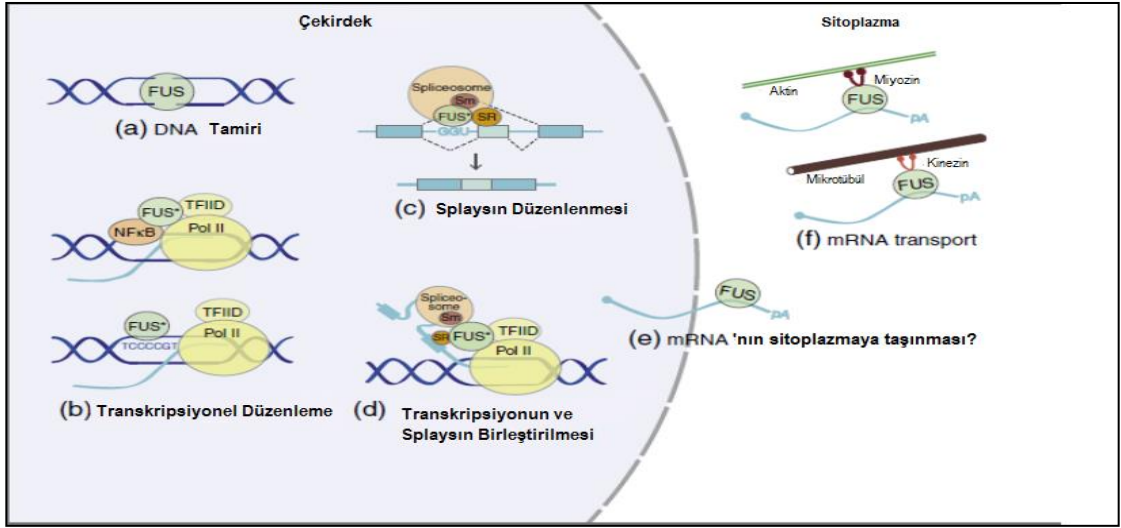
•**ALS2:** Alsin proteinini kodlayan bu gen 2. Kromozomun q kolunda 33.2 pozisyonunda yer almaktadır. Nöronlarda yüksek miktarda ekspres edilen ve endozomal zarın sitozolik kısmında lokalize olmuş bir proteindir. Endozomal trafiği ve Rac1 aktivitesini düzenlediği, *in vitro* Rab5 için değişim faktörü gibi davrandığı ve hücre kültürlerinde akson gelişimini uyardığı bilinmektedir [47].

ALS2 geni nadir juvenil ALS ve PLS'de etken bir gen olup akraba ailelerde linkaj analizi ile tespit edilmiştir. Gende oluşan delesyon ve mutasyonlar çerçeve kayması oluşturarak protein işlev kaybına neden olmaktadır [48].

Alsinin motor nöron hücre soylarında RhoGEF bölgesi yoluyla SOD1'e bağlanarak SOD1'in oluşturduğu toksisiteyi bastırmakta olduğu görülmüştür ve aşırı miktarda ifade edilmesi ile de reaktif oksijen türü üretimini baskılamaktadır. Farelerde alsin proteininin kaybı motor nöron dejenerasyonuna ve hastalığın oluşmasına neden olmaktadır [47].

•**ALS6:** FUS proteinini kodlayan gendir. 16. Kromozomun kısa kolunda (p) 11.2 konumunda lokalize olmuştur. Bu gen DNA/RNA bağlanma proteinini kodlamaktadır. Bu protein hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) ailesine ait bir proteindir. Günümüze kadar 50'den fazla FUS mutasyonu tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar ailesel ALS'nin yaklaşık %4'üne, sporadik ALS'nin ise yaklaşık %1'ine neden olmaktadır [43].

FUS proteini çekirdek ile sitoplazma arasında hareket eden bir protein olup hücrede birçok görev yapmaktadır. DNA tamirinde, RNA taşınımının regüle edilmesinde, translasyonda, RNA'ların kesiminde, miRNA (mikroRNA) biyogenezinde ve stres granüllerinin oluşumunda rol almaktadır (Şekil 2. 6). FUS proteininin C-terminal nükleer lokalizasyon sinyal domaininde meydana gelen mutasyonlar bu proteinin çekirdeğe taşınmasını engellemektedir. Mutant FUS proteininin sitoplazmada kalması sonucu sitoplazmada mutant proteinler birikmeye başlamaktadır. Bu proteinler sonuçta hücrede toksisite meydana getirmekte, ayrıca büyük stres granülleri oluşturmaktadırlar. Mutant proteinlerin sitoplazmada birikerek toksisite oluşturması,



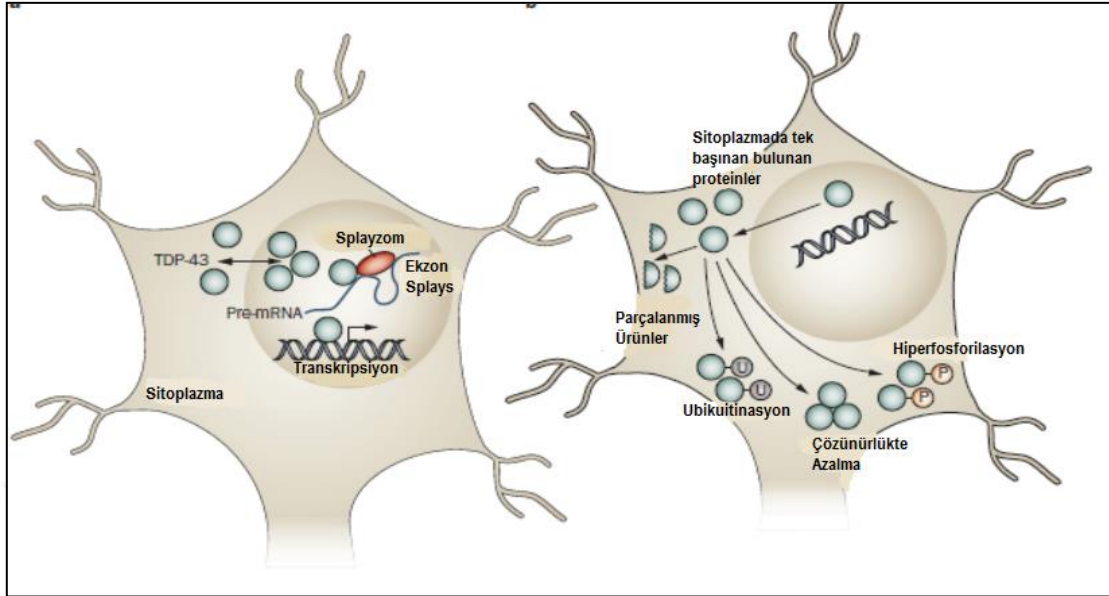
Şekil 2. 6 FUS'un çeşitli fizyolojik fonksiyonları [49]

çekirdeğin fonksiyon kaybı ve büyük stres granülleri oluşumu ile nörodejenerasyon meydana gelmektedir [36].

•**ALS8:** VAPB tip II integral ER membran proteinidir. Hücre içi trafikte, yanlış katlanmış protein yanıtının oluşmasında ve ER-mitokondri interaksiyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır. Mutant protein, yanlış katlanmış protein yanıtının oluşturulmasını başlatamaz, mitokondriye Ca^{+2} alımını değiştirir ve mitokondrinin anterograde aksonal transportunu bozar [48].

•**ALS10:** TARDBP geni TDP-43 proteinini kodlayan bir genidir. 1. kromozomun p36.22 lokasyonunda yer alır. Bu protein hnRNP ailesine ait bir proteindir. Çekirdek ve sitoplazma arasında hareket etmektedir. DNA tamirinde, RNA taşınmasının regüle edilmesinde, translasyonda, RNA'ların kesiminde, miRNA biyogenezinde ve stres granüllerinin oluşumunda rol almaktadır (Şekil 2. 7). Üç domaini bulunmaktadır; bunlar RNA/DNA bağlamada görev alan iki tane tanıma motifi taşıyan domain (RRM1 ve RRM2) ve C ucu glisince zengin domainidir [48]. TDP-43'te mutasyonları C ucu glisince zengin domainde lokalize olmaktadır. Protein-protein interaksiyonunda görev alan bu bölgede 40'tan fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar ailesel ALS'nin yaklaşık %4-5'inin, sporadik ALS'nin ise yaklaşık %2'sinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Mutasyonlar sonucu protein nükleer lokalizasyonunu kaybederek

sitoplazmada inklüzyonların oluşmasına yol açmaktadır. İnküzyonlar sitoplazmada toksik etki yaratarak nörodejenerasyonu tetiklemektedirler [43].

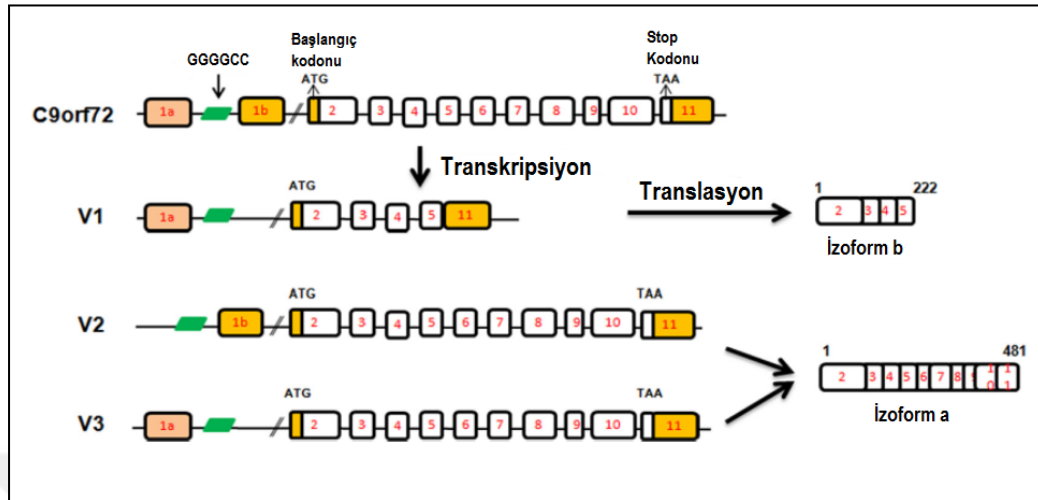


Şekil 2. 7 TDP-43'ün fizyolojik ve patofizyolojik durumları [50]

•**ALS12:** OPTN (optinörin) proteinini kodlayan bir gendir. Bu protein başka proteinlerle interaksiyon kurarak fonksiyon göstermektedir. OPTN, ubiquitin ve UBQLN2 (Ubiquilin 2) proteinleri ile interaksiyon kurar, bir otofaj reseptörüdür, böylece otofagozomlara kargoların alınmasını kolaylaştırmakta, golgi aygıtının organizasyonunda görev almakta ve NF- κ B sinyalizasyonunu düzenlemektedir[48].

•**FTDALS1:** ALS ve FTD'nin en yaygın etkeni olan C9orf72 geni, 9. kromozom p21'de yer almaktadır ve otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır. Bu gen 12 ekzon kodlamaktadır ve üç tane varyantı bulunmaktadır. Varyant 1 (ekzon2-5) 222 aminoasit içermekte ve C9-S (C9-Short); varyant 2-3 (ekzon 2-11) ise 481 aminoasit içermekte ve C9-L (C9-long) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2. 8). Dizileme ve yapısal çalışmalar sonucu bu protein DENN proteini olarak tanımlanmıştır. DENN proteinleri GTP/GDP (guanozin trifosfat/guanozin difosfat) değişim faktörü (GEF) olarak görev yapan proteinlerden meydana gelmektedirler. GTP/GDP değişim faktörleri Rab-GTPazlar ile etkileşime geçerek membran trafiğini regüle etmektedirler. Yapılan çeşitli çalışmalarda

c9orf72 proteininin Rab ile etkileşime girdiği gözlenmiştir. Hücre kültürü modellerinde ise endozomal trafiğin regülasyonunda etkili olduğu bildirilmiştir [51], [52].



Şekil 2. 8 C9orf72 geni, üç transkript varyantı ve iki protein izoformu [53]

Linkaj analizi, GWAS, yeni nesil dizileme yöntemlerinin kullanılmasıyla bu gende meydana gelen GGGGCC tekrar genişlemesi mutasyonu tespit edilmiş olup, ALS ve FTD hastalığının patogenezinde etkisinin olduğu bildirilmiştir [41]. GGGGCC tekrar genişlemesi (HRE) genin 5' kodlanmayan bölgesinde yer alır. HRE'ler sağlıklı kişilerde 10'dan az tekrar bulundururken ALS'li hastalarda bu tekrarlar 400-2000 arasında değişmektedir [48]. HRE'ler varyant 2'nin promotor bölgesinde yer alırken, varyant 1 ve 3'ün ilk intronunda lokalize olmuşlardır. Bu mutasyonun ailesel ALS'nin %40'ına, sporadik ALS'nin %7'sine, ailesel FTD'nin %25'ine neden olurken ALS/FTD hastalığının da %88'ine neden olduğu tespit edilmiştir [51].

Yapılan çalışmalarda HRE mutasyonu taşıyan ALS hastalarında C9-L miktarında düşüş olurken C9-S miktarında artış olduğu tespit edilmiştir [54]. Başka bir çalışmada ise HRE taşıyan hastalarda yüksek miktarda DPR (Dipeptide Repeats) proteinlerinin birikimi tespit edilmiştir. DPR birikimlerinde p62 ve ubikuitin varlığı bildirilmiştir [55]. DPR ile yapılan başka bir çalışmada ise gözlenmiştir ki bu birikimler ER'da yanlış katlanmış protein birikimine yol açarak ER stresini indüklemektedir. Sonuçta hücre apoptoza uğramaktadır [56]. C9orf72 geninde meydana gelen mutasyonların hücreyi nasıl

etkilediğine ve hangi mekanizmalar üzerinde nörodejenerasyonuna yol açtığına dair çalışmalar hala yapılmaktadır.

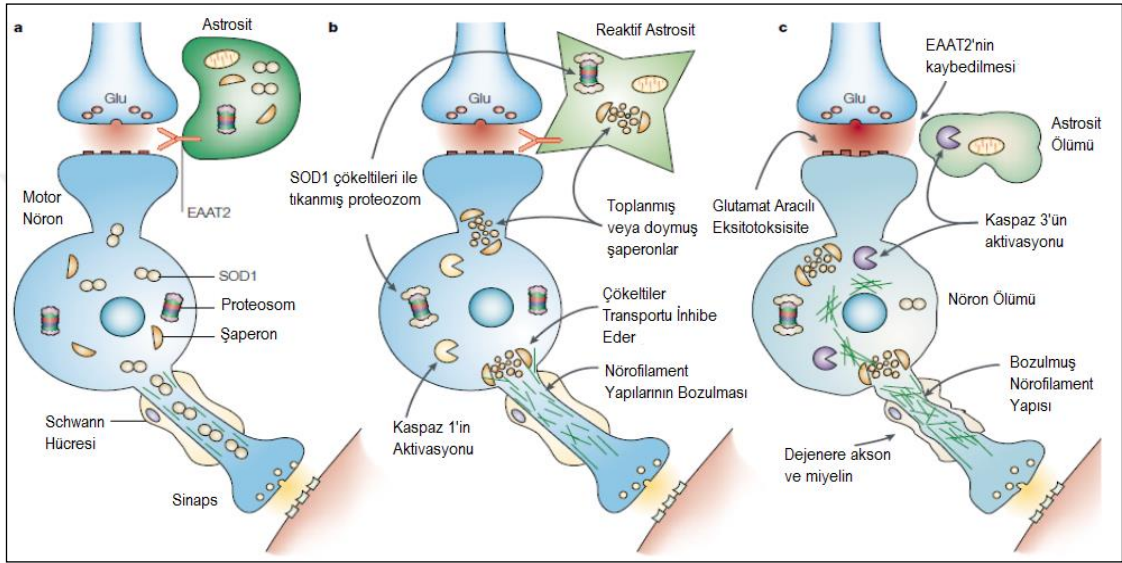
2.2.1.2 Glutamat Eksitotoksitesisi

L-glutamat merkezi sinir sisteminde en çok bulunan uyarıcı nörotransmitter maddedir. Glutamat, nöronlarda glutaminin fosfat aktive glutaminaz enzimi ile deaminasyonu ile oluşturulmaktadır. Glutamat, veziküler glutamat taşıyıcılar tarafından paketlenmektedir ve presinaptik nörona impuls ulaştığı zaman glutamat sinaptik boşluğa salınmaktadır. Glutamat postsinaptik nöronda yer alan reseptörlere bağlanarak diğer nöronu uyardıktan sonra sinaptik boşlukta yer alan glutamat astrositler tarafından hücre içerisine alınmaktadır. Glutamat, astrositlerde glutamin sentetaz enzimi ile glutamine dönüştürülmektedir. Astrositlerde bulunan glutaminin nörotransmitter etkisi bulunmamaktadır. Bu glutamin sinaptik boşluğa salınmakta ve presinaptik nöronlar tarafından hücre içerisine alınmaktadır. Nöron içerisine alınan glutamin glutaminaz enzimi ile tekrar glutamata dönüştürülmektedir. Ayrıca glutamat nöronlarda alfa-ketoglutaratın glutamat dehidrogenaz enzimiyle reaksiyona girmesi ile de elde edilmektedir. Glutamat dehidrogenaz enzimi tersinir bir enzim olmasından dolayı glutamattan alfa-ketoglutarat eldesinde de görev almaktadır. Ek olarak, glutamat transaminaz enzimi aracılığıyla trikarboksilik asit döngüsüne girerek sırasıyla suksinata, fumarata ve malata dönüştürülmektedir [57].

Glutamat etkisini postsinaptik nöronda yer alan iyonotrofik ve metabotrofik reseptörler aracılığıyla göstermektedir. Glutamat iyonotrofik reseptör olan NMDA (N-methyl-D-aspartate), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) ve KA (kainat) reseptörlerini; metabotrofik reseptör olan sınıf I, II ve III reseptörlerini uyarır. Hızlı uyarıcı iletim, nöronların hızlı depolarizasyonunu uyaran Na^+ ve K^+ iyonlarının hücreye girişiyle AMPA/KA reseptörleri yoluyla oluşturulmaktadır. Ca^{+2} a geçirgen olan NMDA reseptörleri ise daha yavaş ve uzun süreli iletimden sorumlu iken, metabotrofik reseptörler ise uzun süreli glutaminerjik iletimden sorumludurlar. Metabotrofik reseptörler G-proteinleri aracılığı ile hücrede uyarım oluşturmaktadırlar.

G-proteinlerin uyarılması ile ikincil mesajcılar ya da Ca^{+2} aracılığıyla nöronu uyarmaktadırlar [58].

Glutamat eksitotoksitesinin meydana gelebilmesi için üç olaydan en az birinin gerçekleşmesi gereklidir; ya glutamatın uyardığı reseptörler normalden daha fazla uyarılmalıdır, ya sinaptik boşlukta bulunan glutamat miktarı fazla olmalıdır ya da sinaptik boşlukta yer alan glutamatın ortamdaki temizlenmesinde aksaklıklar meydana gelmelidir (Şekil 2. 9) [7].



Şekil 2. 9 Nöronal eksitotoksitesinin hücre üzerindeki etkisi [45]

Glutamat eksitotoksitesinin oluşumunda önemli olan reseptörler AMPA reseptörleridir. Memelilerde merkezi sinir sisteminde yer alan AMPA reseptörleri GluR2 (ionotropic AMPA glutamate receptor 2) olarak adlandırılan bir altünite içermektedir. Bu altünitenin varlığında AMPA reseptörü Ca^{+2} a karşı geçirgen değildir. GluR2 altünitesinin yokluğunda AMPA reseptörleri Ca^{+2} iyonuna karşı geçirgen olmaktadır [59]. Ancak ALS hastalarında yapılan çalışmalarda, postsinaptik bölgede GluR2 altünitesinin bulunmadığı AMPA reseptör sayısında artış meydana geldiği bildirilmiştir [60]. Bu reseptörlerin artması motor nöronları glutamat eksitotoksitesine karşı hassas hale getirmektedir. GluR2 altünitesinin oluşturulması mRNA düzeyinde post-transkripsiyonel olarak kontrol edilmektedir [58]. ALS'li bireylerde omurilik motor nöronlarında GluR2 mRNA'sının post-transkripsiyonel olarak

düzenlenmesi aşamasında hasarların oluştuğu bildirilmiştir [61]. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada da ALS hastaların motor nöronlarında GluR2 altünitesinin anlatımının azaldığı ya da mRNA düzeyinde post-transkripsiyonel düzenlenmesinin azaldığı rapor edilmiştir [62]. AMPA reseptörlerinin Ca^{+2} geçirgenliğinin artmasının dışında NMDA reseptörlerinin de yüksek derecede aktive oldukları bildirilmiştir [63].

Presinaptik nörondan sinaptik boşluğa salınan glutamat postsinaptik bölgede yer alan AMPA/KA ve NMDA reseptörlerine bağlanarak onların uyarılmasını sağlamaktadır. Uyarılan reseptörler Ca^{+2} un hücre içerisine girişine ve hücrenin depolarize olmasına neden olmaktadır. GluR2 altünitesini taşımayan AMPA reseptörlerinin varlığında postsinaptik hücreye olması gerekenden daha fazla Ca^{+2} girişi meydana gelmektedir. Glutamat eksitotoksitesi aslında hücre içerisinde artan Ca^{+2} -bağımlı yollarda oluşan hasarlardan kaynaklanmaktadır. Ca^{+2} –bağımlı proteazların, lipazların ve nükleazların aktivasyonu ile hücrede hasarlar oluşmaya başlamaktadır. Normal şartlar altında hücre içerisinde bulunan serbest Ca^{+2} molekülleri, Ca^{+2} bağlama proteinleri ile ER'a taşınmaktadır. Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki ALS'de motor nöronlar zayıflamış sitozolik Ca^{+2} tamponlama kapasitesine sahiptir [36], [60]. Bu durumda motor nöronlar dejenerasyona karşı hassas hale gelmektedirler. Okulomotor motor nöronları ALS hastalığında hasar görmeyen nöronlardır. Bu nöronlar üzerinde yapılan çalışma göstermiştir ki Ca^{+2} tamponlaması hasar gören motor nöronlarda okulomotor nöronlarına göre beş altı kat azalmıştır [64]. *In vitro* ve hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda Ca^{+2} bağlama proteinlerinin yüksek derecede anlatımının olması motor nöronlar için koruyucu olabilmektedir [65], [66]. Buna göre sitozolik Ca^{+2} bağlama proteinlerin anlatımının artırılması motor nöron popülasyonunun dejenerasyona karşı dirençli olmasına neden olabilmektedir. Nöron içerisine yüksek miktarda Ca^{+2} girişinin olması, hücredeki tamponlama mekanizmasının zayıf olması ile mitokondrideki protein dengesi bozulmakta ve apoptoz mekanizmaları aktive olmaktadır. Apoptoz mekanizmalarının aktive olması ile hücrede ROS (Reaktif Oksijen Türleri) miktarında artış meydana gelmektedir [2].

Yapılan alışmalarda ALS hastalarının BOS'larında glutamat konsantrasyonunun sağlıklı kişilere göre üç kat arttığı rapor edilmiştir [67], [68]. Sinaptik boşluktaki glutamat konsantrasyonunun yüksek olması ile reseptörlerin yüksek derecede uyarılmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda hücre içerisine yüksek miktarda Ca^{+2} girişi meydana gelmektedir. Sağlıklı kişilerde sinaptik boşlukta yer alan glutamat postsinaptik hücreyi uyardıktan sonra nöronlara komşu olarak yer alan astrositler tarafından hücre içerisine alınarak ortamın glutamattan temizlenmesi sağlanmaktadır. Ancak glutamatın taşınmasında meydana gelen hasarlar BOS'nda glutamat konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır [59].

Sinaptik boşlukta yer alan glutamatın seviyesinin ayarlanması motor nöronlar ve motor nöron hücrelerine komşu olarak yer alan astrositlerin üzerinde yer alan taşıyıcı proteinler ile sağlanmaktadır. Glutamatın en önemli kısmı sinaptik boşluktan astrositler tarafından hücre içerisine alınmaktadır. Astrositlerin membranında EAAT1 (excitatory amino acid transporter) ve EAAT2 denilen proteinler bulunmaktadır. Motor nöron membranında ise EAAT3 denilen taşıyıcı protein yer almaktadır [7]. Astrositlerde bulunan glutamat taşıyıcı proteinlerin sayısının azalması ya da işlevsiz hale gelmesi sonucu sinaptik boşlukta yer alan glutamat seviyesinin artışına yol açabilmektedir. ALS hastalarının omuriliğinde ve motor korteksinde yer alan motor nöronlarda ve SOD1 mutasyonu taşıyan transgenik farelerde yapılan çalışmalarda glutamat taşıyıcısı proteinlerin aktivitesinde ve anlatımında azalma olduğu bildirilmiştir [69], [70]. Ayrıca yapılan bir başka çalışmada ise mutant SOD1 enzimi taşıyan transgenik farelerin astrositlerinde bulunan EAAT2 seviyesinde azalma olduğu rapor edilmiştir [71]. EAAT2 inhibitörü olan kaspaz-1'in aktivasyonunun SOD1 mutant transgenik fare modellerinde motor nöron dejenerasyonu klinik semptomlar başlamadan önce gözlenmiştir [72]. SOD1^{A4V} (4. Pozisyondaki alaninin valin ile yer değiştirmesi) mutasyonu taşıyan transgenik farelerde SOD1 agregatlarının motor nöron membranına entegre olmuş bir şekilde gözenekler oluşturduğu gözlenmiştir. Bu gözenekler hücre içerisine Ca^{+2} akışına neden olmaktadır ve bunun sonucunda hücre içerisindeki Ca^{+2} homeostazisi değişmektedir [73].

Astrositlerde yer alan glutamat taşıyıcısı proteinler oksidantlara karşı duyarlıdır. Taşıyıcı proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar bu proteinlerin degradasyonuna neden olabilmektedir. Taşıyıcı proteinlerin oksidatif modifikasyonları ALS hastalarında ve mutant transgenik fare modellerinin astrositlerinde rapor edilmiştir [74], [75]. Taşıyıcı proteinlerde meydana gelen bu oksidatif hasarlar motor nöronlarda eksitotoksik hasara yol açabilmektedir. Beyinde meydana gelen inflamatuvar süreçler ROS'un kaynağını oluşturabilmektedirler. Transgenik fare modellerinde ve insanlarda mikrogial aktivasyonunun meydana geldiği gözlenmiştir [76], [77]. Mikroglialar direkt olarak ROS üretimine neden olarak astrositlerde yer alan taşıyıcı proteinlerin hasara uğramasına neden olabilmektedirler. ROS'un bir başka nedeni ise mutant SOD1 proteini olabilmektedir. Mutant SOD1 proteininin toksik işlev kazanması ile hücrede ROS miktarı artabilmektedir. Astrositlerin motor nöronlara komşu olması motor nöronlarda üretilen ROS'un hasar verici veya inhibitör özelliği astrositleri etkileyebilmektedir. Eksitotoksositeye cevap oluşturulurken motor nöronlar yüksek miktarda ROS üretebilmektedirler. Motor nöronlarda üretilen ROS hücre içerisinden çıkabilmekte ve komşu astrositlerde oksidasyona neden olabilmektedir. Bunun sonucunda astrositlerde glutamat alımının bozulmasına yol açabilmektedirler. Ayrıca ROS'un üretilmesi sonucu nörofilament anormallikleri, protein çökelmeleri meydana gelebilmektedir. Oluşan bu modele ileri besleme (feedforward) modeli denmektedir [59].

2.2.1.3 Oksidatif Stres

Moleküler oksijen güçlü bir oksidandır ve ROS'ni oluşturabilmek için birçok biyolojik molekülden elektron alır. Motor nöron hücreleri yüksek metabolik hıza sahip olmalarından dolayı oksidatif strese oldukça yatkındırlar. Oksidatif stres, ROS'nin üretilmesi ile meydana gelen hasarın düzeltilmesi veya ROS'nin ortamdaki kaldırılmasında görevli biyolojik süreçlerin kapasitesi arasındaki dengesizlikten dolayı ortaya çıkmaktadır. H_2O_2 , $ONOO^-$, O_2^- , ve OH^- radikalleri mitokondriyal solunum zincirinin yan ürünü ya da daha az miktarda hücresel oksidatif enzimlerin aktivitesi ile oluşmaktadır. Oksidatif stres eksitotoksosite, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu,

protein birikimi, ER stresi, astrosit ve mikroglialardan gelen sinyal değişiklikleri de dahil olmak üzere motor nöron hasarına yol açan patofizyolojik süreçlerin düzeltilememesine neden olmaktadır. Oksidatif stres protein, DNA, RNA gibi hücresel bileşenlerde de yapısal hasara neden olmaktadır [78]. Ayrıca oksidatif stres NO (nitrik oksit), IL-1, IL-6, IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin artmasına neden olarak motor nöronlarda hasara yol açabilmektedir [40].

Yapılan çalışmalarda ailesel ve sporadik ALS hastalarında oksidatif stres belirteci olan 3-nitrotirozinin seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir [79]. Ayrıca mutant TDP-43 proteininin varlığına bağlı gelişen ALS hastalığının hücresel modellerinde mutant TDP-43 proteininin motor nöron hücre hatlarında oksidatif stresin oluşumunu uyardığı rapor edilmiştir [80].

ALS hastalığının oluşmasında etkisi olduğu düşünülen oksidatif stres mekanizması mutant SOD1 enziminin keşfi ile doğrulanmıştır [81]. Mutant SOD1 enziminin hücrede toksik etki kazanması ile patojenik olduğu düşünülmektedir. Ancak mutant SOD1 enziminin toksik etki kazanması dışında başka mekanizmaları da etkileyerek hücrede oksidatif stresin oluşmasına neden olmaktadır. Mutant SOD1 enzimi antioksidant görevinin dışında çalışarak hücrede süperoksit oluşumuna neden olmaktadır. Bunun dışında, mutant SOD1 enzimi hücrede NOX (NADPH oxidase) enzimlerini etkileyerek O_2^- oluşumunu da artırmaktadır. Mutant SOD1 enzimi Rac1'e bağlanır ve onun GTPaz aktivitesini inhibe eder. Sonuçta NOX bağımlı O_2^- üretimi artmaktadır. Bu durumun sonucunda hücrede ROS miktarı artmaktadır [82]. Mutant SOD1 proteinini ifade eden transgenik fare modellerinde ve ALS hastalarındaki çalışmalarda merkezi sinir sisteminde NOX2 anlatımının arttığı bulunmuştur. SOD^{G93A} (93. pozisyondaki glisinin alanine dönüşümü) mutasyonu taşıyan farelerde NOX1 veya NOX2 anlatımının susturulması ile farelerin yaşam süresinin arttığı bildirilmiştir [83], [84].

Normal SOD1 proteininin yapısında hem bakır hem de çinko iyonları bulunmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda mutant SOD1 proteininin çinkoya karşı affinitesinde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir [85]. Çinkoya karşı affinitesinin azalması sonucu SOD1 enziminin antioksidant özelliğinde değişiklikler meydana gelmektedir. Mutant SOD1

enzimi hücrede bulunan O_2^- 'leri temizlemek yerine çinko eksik SOD1 hücresele antioksidanlardan elektron çalabilmekte ve daha fazla O_2^- oluşumuna neden olabilmektedir. Ayrıca motor nöronlarda NO bulunmaktadır ve bu NO'ler O_2^- ile reaksiyona girerek ONOO⁻ oluşumuna neden olmaktadır. ONOO⁻ 'in hücrede artması motor nöronların ölümüne yol açmaktadır [86].

Yapılan çalışmalar sonucunda bakır ve çinko taşıyan normal ya da mutant SOD1 enziminin varlığının motor nöronları oksidatif strese eşit derecede korumakta olduğu tespit edilmiştir. Ancak çinko eksik SOD1 enziminin ya da çinko eksik normal SOD1 enziminin varlığında motor nöronlarda apoptozun meydana geldiği görülmüştür [87]. Çinko taşımayan SOD1 enzimleri hücre için toksik etki yaratmaktadır. Motor nöron hücreleri apoptoza maruz kalmadan önce hücrede nöronal NO sentazın anlatımının artışı meydana gelmektedir. Sonuçta motor nöronlarda bulunan NO konsantrasyonunda artış olmaktadır. Motor nöronlarda bulunan NO, çinko eksik SOD1 enziminin aktif bölgesinde yer alan O_2^- ile etkileşime geçebilmektedir. Böylece hücrede ONOO⁻ seviyesinde artış meydana gelmektedir. Oluşan ONOO⁻ diğer hücre yapılarındaki tirozin kalıntılarının nitrasyonunu indüklemektedir [86].

Nörofilamentler motor nöron hücrelerinin iskeletinin oluşturulmasında önemlidirler. Mutant SOD1 enziminin çinkoya karşı azalan affinitesi karşısında hücrede serbest çinko atomunun seviyesinde artış meydana gelmektedir. Nörofilamentler ise oldukça yüksek çinko bağlama kapasitesine sahiptirler. Bu durumda nörofilamentler SOD1 enzimi ile çinko bağlamak için yarışabilmektedirler. Hücredeki serbest çinkonun çoğunu bağlayan nörofilamentler, SOD1 enziminin çinko eksik duruma gelmesine neden olabilmektedirler. Çinko eksik SOD1 enziminin seviyesinde artış meydana geldikçe hücrede ONOO⁻ miktarı artmaktadır. ONOO⁻ 'in nörofilamentlerin tirozin kalıntılarını nitrasyonu ile de nörofilamentler hücre içerisinde çökelmektedirler. Bu durum motor nöronlarda apoptoz meydana gelene kadar devam etmektedir [86].

NO'nin üretilmesi hücrede bulunan O_2^- ile reaksiyona girmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu reaksiyondan ONOO⁻ üretilmektedir. ONOO⁻ 'in asıl hedefleri ise çekirdek ve mitokondridir. DNA'ya bağlanan ONOO⁻, DNA'nın tek iplikçliğini kırmaktadır ve hücrede

p53 anlatımının artmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda apoptoz meydana gelmektedir. ONOO⁻ mitokondri zarından kolayca geçebilmektedir. Mitokondriye geçen ONOO⁻ mitokondriyal solunumu geri dönüşümsüz olarak baskılamaktadır. Ayrıca ONOO⁻ mitokondride bulunan Manganez taşıyan (Mn) SOD2'nin inaktive olmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda mitokondriden sitoplazmaya Ca⁺² akışı olmaktadır. Sonuçta hücre apoptoza maruz kalmaktadır [88].

2.2.1.4 Protein Çökelmeleri

Hücrede proteinlerin işlevleri, onların üç boyutlu yapılarına göre belirlenmektedir. Üç boyutlu yapı proteinlerin amino asit dizilimleri tarafından oluşturulmaktadır. Hücrede proteinler her zaman doğru şekilde katlanamamaktadırlar. Eğer hücrede yanlış katlanmış bir protein bulunursa, yanlış katlanmış olan protein hücredeki degradasyon sistemleri tarafından ortamdaki kaldırılmaktadır. Eğer yanlış katlanmış proteinler hücre tarafından tespit edilemez ve ortamdaki kaldırılamazsa sitoplazma içerisinde çökelmeler meydana gelmektedir. Protein kodlayıcı dizilerde bir mutasyon meydana gelirse, mutasyon proteini oluşturan amino asit dizilerinde değişikliğe neden olabilmektedir. Amino asit diziliminde meydana gelen değişiklik de proteinin yanlış katlanmasına neden olmaktadır. Mutasyonlar dışında metal iyonlarındaki değişiklikler, patolojik şaperon proteinler, pH, oksidatif stres gibi çevresel etmenler de proteinin yanlış katlanmasına yol açabilmektedir. Nöronal hücrelerde yanlış katlanmış proteinler hücre ölümünü indükleyebilmektedir. Nöronal hücrelerin ölmesi sonucu nörodejeneratif hastalıklar meydana gelebilmektedir.

Yanlış katlanmış proteinler hücrelere hasar verebilmektedir. Bu durumun oluşumu ile ilgili ortaya atılmış üç tane hipotez bulunmaktadır;

- **İşlev Kaybı Hipotezi:** Bu hipotezde proteinin normal aktivitesinin kaybı sonucu nörodejenerasyon meydana gelmektedir. ALS hastalığının proteinlerin işlev kaybetmesi sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir.

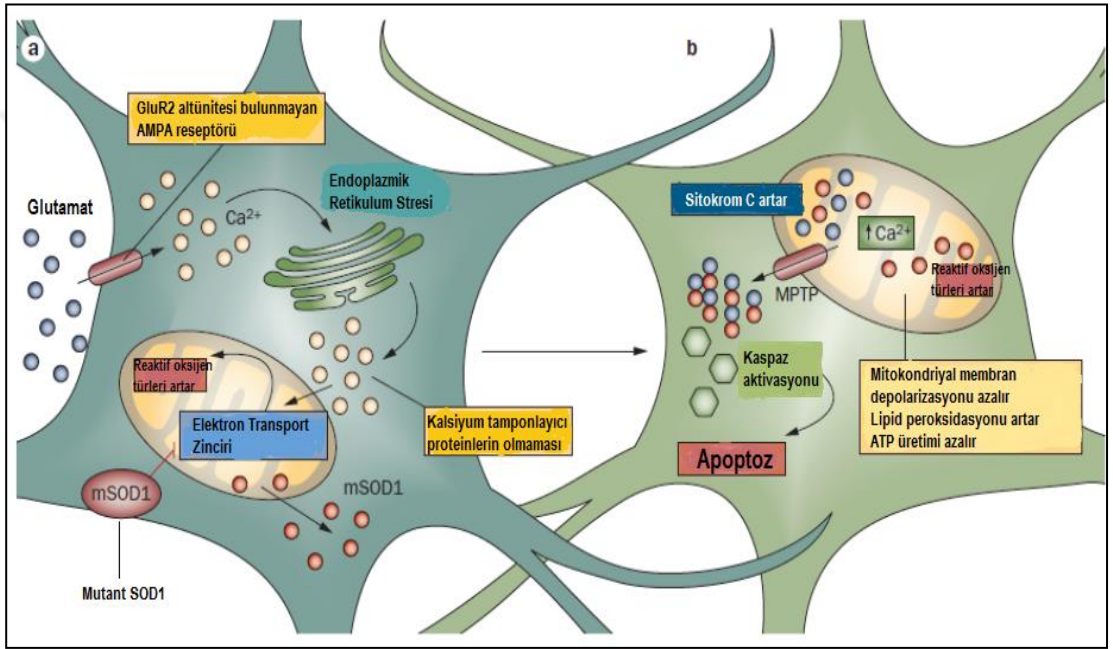
- **Toksik Aktivite Kazanılması Hipotezi:** Yanlış katlanmış proteinlerin hücre içerisinde toksik bir etkiye sahip olması sonucu nörodejenerasyonun ortaya çıktığı düşünülmektedir.

- **Beyinde İnflamasyon Hipotezi:** Nöronlarda artan yanlış katlanmış protein miktarı beyin için zarar verici olmaktadır. Bunun sonucunda beyinde bulunan bağışıklık sistemi elemanı olan astrositlerin ve gliaların aktivitelerinin artması sonucu proinflamatuvar maddelerin salınımında da artış meydana gelmektedir. Bu proinflamatuvar maddeler nöronlar için öldürücü etkiye sahiptirler. Bu maddelerin etkileri sonucu nörodejenerasyon meydana gelebilmektedir [89].

ALS hastalarında yapılan çalışmalarda nöronlarda çeşitli protein birikmelerine rastlanmıştır. Ubikuitinlenmiş inklüzyonlar beyin sapında ve omurilikteki alt motor nöronlarda görülmüştür. Bazı alt motor nöronlarda küçük eozonofilik Bunina cisimcikleri tespit edilmiştir ve bu cisimciklerin hastalığa özgü olabileceği düşünülmektedir [90]. Normal şartlar altında TDP-43 proteini çekirdekte yer almaktadır. Fakat ALS hastalarının motor nöronlarında TDP-43 pozitif sitoplazmik inklüzyonların varlığı tespit edilmiştir ve bu proteinin hem ailesel hem de sporadik ALS'nin oluşmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir [91], [92]. Bunun dışında FUS genindeki mutasyona bağlı gelişen ALS hastalığı vakalarında mutant FUS proteinini içeren sitoplazmik inklüzyonlar bulunmuştur [93], [94]. Mutant SOD1 enzimi bulunan ailesel ve bazı sporadik ALS hastalarının motor nöronlarında yanlış katlanmış SOD1 enziminin epitopları için spesifik monoklonal antikorlarla yapılan çalışmada yanlış katlanmış SOD1 enzimi ile yüksek derecede eşleşen inklüzyonların varlığı tespit edilmiştir [95]. Ayrıca, özellikle SOD1 mutasyonu taşıyan bazı ALS hastalarının omurilik motor nöronlarının proksimal dendritlerinde veya perikaryonlarında nörofilament açısından zengin olan hyalin küme inklüzyonları gözlemlenmiştir [96]. Buna ek olarak motor nöronların hücre gövdesinde fosforlanmış nörofilament epitoplarının anlatımının arttığı bulunmuştur [97].

2.2.1.5 Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu

Motor nöron hücrelerinin metabolizma hızları yüksek olduğundan dolayı enerji ihtiyaçları oldukça fazladır. Mitokondri besin maddelerini ATP'ye dönüştürmesinin yanında hücresel Ca^{+2} homeostazının ve apoptozun düzenlenmesinden de sorumlu bir organeldir. Mitokondriyal işlev bozukluğu, onun yetersiz ATP üretmesine, hücrede ROS miktarının artmasına ve Ca^{+2} aracılı eksitotoksisteye neden olmaktadır. Bunun sonucunda hücrede apoptoz mekanizmaları indüklenmektedir. Mitokondrinin ALS patofizyolojisinde kilit bir rol oynadığı düşünülmektedir.



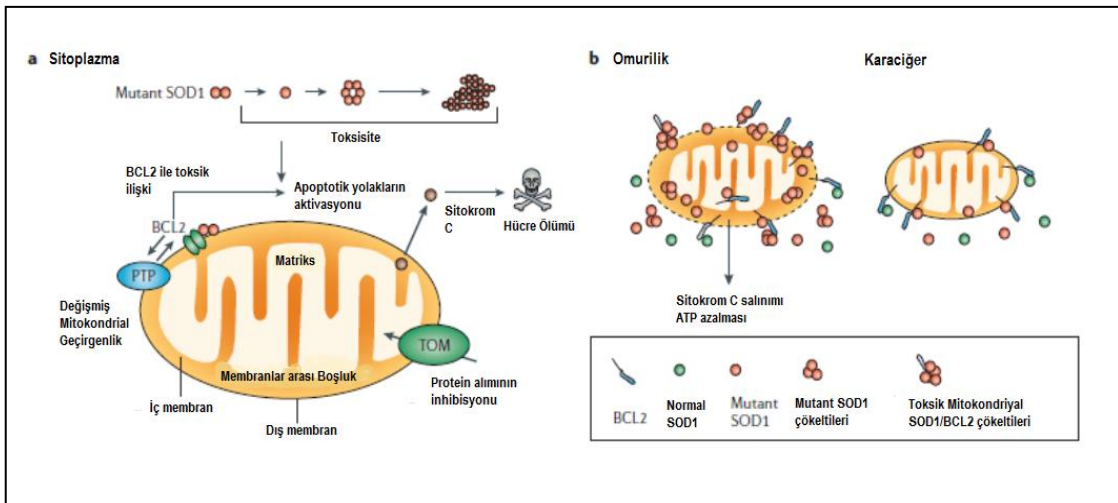
Şekil 2. 10 Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu [98]

Mutant SOD1 proteinini kodlayan *in vitro* hücre çalışmalarında mitokondrinin hem morfolojisinde hem de fonksiyonlarında değışiklik olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2. 10) [99]. Mutant SOD1 proteinini kodlayan transgenik farelerde ise ALS hastalığının semptomları başlamadan önce mitokondride morfolojik anormalliklerin meydana geldiği rapor edilmiştir [100]. Mitokondriyal işlev bozukluğu ALS hastalarının iskelet kaslarındaki hücrelerde de ortaya çıkmaktadır [101]. Sporadik ve ailesel ALS hastalarından ölüm sonrası alınan omurilik dokularında sitrat sentazın ve solunum zincir kompleksleri I, II, III, IV'ün aktivitesinde azalma olduğu tespit edilmiştir [102],

[103], [104]. Bunun dışında mitokondriyal işlev bozukluğu karaciğerde [105] ve lenfositlerde de gözlemlenmiştir [105], [106], [107]

Mitokondriyal proteinlerin büyük bir çoğunluğu nükleer genom tarafından kodlanmaktadır. Sitoplazmada yer alan ribozomlarda oluşturulan bu proteinler daha sonra mitokondriye taşınmaktadır. Mitokondriye gelen proteinler TOM/TIM tarafından taşınmaktadır. Normal şartlarda mitokondride üretilen O_2^- anyonları Mn-SOD tarafından temizlenmektedir. Ancak mitokondrideki SOD1'in de bu konuda koruyucu rolü olduğu bulunmuştur. İntermembran boşlukta (IMS) yer alan CCS (SOD1'in katlanmasına yardımcı olan bakır şaperon) SOD1'in IMS'taki lokasyonunu belirlemektedir. Ancak yapılan çalışmalarda IMS'ta CCS aktivitesinin arttığının belirlenmesi sonucu SOD1'in IMS'ta yüksek miktarda birikimiyle sonuçlandığı düşünülmektedir [108]. Mutant SOD1 proteini IMS'ta birikerek TOM/TIM komplekslerinin protein taşımalarını bloke edebilir ve bunun sonucunda mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olabileceği önerilmektedir [109], [110]. Mutant SOD1 proteini mitokondri de üç farklı yüzey bileşeni ile etkileşime geçerek onların işlevlerini bozmaktadır (Şekil 2. 11). Bunlar;

- VDAC1 [111],
- TOM [112],
- Bcl-2 [113].



Şekil 2. 11 Mutant SOD1'in hedefi olarak mitokondri [47]

Mitokondride ROS üretimi yüksek miktarda olmaktadır. ETC'de eşleşmemiş elektronlar O_2^- oluşturmak için moleküler oksijene bağlanmaktadır. Mitokondride bulunan SOD enzimlerinde bu O_2^- anyonları ortamdaki temizlemektedirler. Ancak ALS hastalarının ETC sistemlerinde hasar olduğu tespit edilmiştir. Bu hasar mitokondride sadece enerji açığına yol açmamaktadır, ek olarak hücre içi oksidatif hasara da neden olmaktadır. Mitokondri oksidatif hasara karşı savunmasız olduğundan dolayı artan ROS miktarı mitokondriyal işlev bozukluğunu daha da arttırmaktadır. Protein karbonil seviyeleri, lipid peroksidasyonu ve protein glikooksidasyonu gibi oksidatif stres belirteçlerinin miktarında artış olduğu çeşitli zamanlarda rapor edilmiştir [114], [115], [116]. Ayrıca oksidatif stres mitokondriyal DNA'da da hasarlara neden olmaktadır [104].

Mitokondri işlevinin düzeni için Ca^{+2} homeostazı oldukça önemlidir. Damiano ve ark. tarafından yapılan bir çalışma da SOD^{G93A} transgenik fare modellerinin omurilik ve beyinlerindeki motor nöronlarda, semptomlar başlamadan önce mitokondriyal Ca^{+2} tamponlanma kapasitesinde değişiklik olduğu bildirilmiştir [117]. Glutamat eksitotoksitesine bağlı değişen Ca^{+2} dengesine ek olarak Ca^{+2} tamponlamasının da bozulması motor nöronların duyarlılıklarının artmasına neden olabilmektedir [118].

Mutant SOD1 çökelmeleri antiapoptotik bir element olan Bcl-2'nin de etkilenmesine neden olmaktadır. Bcl-2'nin aktivitesinin değişmesi sonucu apoptozu kontrol eden bir madde olan sitokrom C'nin mitokondriden salınımı meydana gelmektedir. Sitoplazmada artan sitokrom C, kaspaz aktivisinde artışa yol açarak apoptoza neden olmaktadır [119]. Ek olarak son yapılan çalışmalarda mutant TDP-43 proteininin transgenik farelerde mitokondriyal morfolojiyi ve fonksiyonu bozmakta olduğu tespit edilmiştir [120], [121].

2.2.1.6 Aksonal Transport Bozukluğu

Nöronlar uzun aksonları olan ve oldukça polarize hücrelerdir. Moleküllerin ve organellerin taşınması nöronların gelişimi, işlevi ve hayatta kalması için önemli bir hücresel süreçtir. Nöronlar sinyalleri uzun mesafelerde ilettikleri için proteinlerin ve organellerin diğer hücre türlerine göre daha fazla yolculuk etmesi gerekmektedir.

Aksonal proteinler hücre gövdesinde sentezlenmektedir. Daha sonra hücre gövdesinden anterograd taşıma ile aksonlara ve dendritlere ulaştırılmaktadırlar. Çevresel faktörler, retrograd taşıma ile sinapslardan hücre gövdesine doğru olmaktadır. Anterograd ve retrograd taşıma sırasıyla moleküler motorlar olan kinesin ve dinein-dinaktin kompleksleri ile yapılmaktadır. Proteinlerin hücrede taşınması yavaş ya da hızlı taşıma ile yapılmaktadır. Aksonal patoloji ALS'nin oluşumunda önemli bir role sahiptir.

Aksonal transportun aktivitesinde azalma ALS'li hastalarının [122] ve ALS'li transgenik fare modellerinin [123] motor nöronlarında tespit edilmiştir. Mutant SOD1 proteininin inflamatuvar maddeleri, eksitotoksisteyi arttırarak, mitokondri işlevini bozarak ya da hücre içi taşımada görevli moleküler motorlara hasar vererek aksonal taşımayı dolaylı olarak değiştirebileceği önerilmektedir [124]. Mutant SOD1 proteini anterograd ve retrograd taşımayı olumsuz etkilemektedir. Akson boyunca taşınacak maddelerde oluşan hasarlar sonucu, aksonal taşıma bozukluğunun, bu maddelerin moleküler motorlara bağlanması ya da moleküler motorlardan salınması sırasında meydana gelen düzenleme hatalarından kaynaklanan bir sorun olabileceği düşünülmektedir. Aksonal taşımanın gerçekleşebilmesi için enerji gereklidir. Mitokondriyal işlev bozukluğu, mitokondrinin aksonal taşınımında azalma olmasına neden olmaktadır [125], [126]. Mitokondrinin aksonlarda yeterli enerjiyi sağlayamaması sonucu hücre içinde taşınacak maddelerin transportunda da hatalar meydana gelmektedir [98].

Ayrıca SOD1^{G93A} transgenik fare çalışmalarında mutant SOD1 proteininin anormal olarak KAP3'e (Kinesin-associated protein 3) bağlandığı tespit edilmiştir. KAP3, ChAT (choline acetyltransferase) dahil olmak üzere çeşitli kargoların bağlanmasından sorumlu kinesin-2 altbirimidir. Sonuçta akson terminalindeki ChAT'ın azalması kasta bulunan sinirlerin bloke olmasına neden olduğu rapor edilmiştir [127].

Nörofilamentler aksonal çapın oluşumunda önemli bir yer tutmaktadırlar. Bu özelliklerinden dolayı nörofilamentlerin aksonal taşımada düzenleyici olabilecekleri düşünülmektedirler [128]. ALS'de yapılan birçok çalışmada motor nöronlarda nörofilament çökeltmeleri tespit edilmiştir. Bu durumda aksonal transportun bozulmasına neden olabileceği rapor edilmiştir [129], [130], [131], [132]. Ayrıca hücre

kültürü çalışmalarında glutamatın nörofilamentlerin fosforlanmasında görev alan protein kinazların aktive olmasına neden olduğu bulunmuştur. Bu durum ise nörofilamentlerin aksonal taşınımında azalma olmasına neden olmaktadır [133], [134].

2.2.1.7 RNA İşleme Bozuklukları

RNA işleme bozuklukları ilk olarak SMA hastalığına neden olan SMN1 genindeki mutasyonların tanımlanmasıyla tespit edilmiştir [135]. SMN proteini pre-mRNA ekleme için önem taşıyan küçük nükleer ribonükleoproteinlerin bir araya getirilmesinde görev almaktadır [136]. Ubikuitinlenmiş protein inklüzyonlarının bir bileşeni olan RNA-DNA bağlama proteini TDP-43'ün ALS hastalığında tanımlanması ile RNA işleme mekanizmasının hastalığın patofizyolojisinde önemli olabileceği düşünülmüştür [91]. TDP-43 proteini genellikle çekirdek bulunan ve transkripsiyonel düzenleme, alternatif bağlanma ve miRNA işleme gibi olaylarda yer almaktadır. Sitoplazmik TDP-43 pozitif inklüzyonları ALS hastalarının nöronal ve glial hücrelerinde bulunmaktadır. Ancak bu inklüzyonlar FUS ve mutant SOD1 ile ilişkili ALS hastalarında bulunmamaktadır [137]. Hücre kültürü modellerinde mutant TDP-43 proteininin anlatımı sitoplazmik stres granüllerinde birikimine neden olmaktadır [138].

Bir başka RNA-DNA bağlayıcı protein olan FUS, transkripsiyonel regülasyon, RNA ve miRNA işleme ve mRNA taşınması ile ilgili görevlerde yer almaktadır. FUS geninde meydana gelen mutasyonlar, FUS'un transportin aracılı nükleer yerleşimini bozmaktadır ve FUS içeren sitoplazmik stres granüllerinin oluşumuna neden olmaktadır [139], [140]. TDP-43 ve FUS proteinleri çekirdekte RNA taşıma komplekslerinin bir parçasını oluşturabilmektedirler. Bu genlerde bir mutasyon meydana geldiğinde protein yapısı bozulmakta ve aksonal mRNA taşınımının bozulması ile motor nöron dejenerasyonuna katkıda bulunabilmektedirler. Mutant TDP-43 ve FUS protini pre-mRNA ekleme, nükleer RNA'nın sitoplazmaya taşınması, kodlanmayan RNA'ların işlenmesi gibi olayların sekteye uğramasına neden olarak RNA işlenmesinin bozulmasına neden olabilmektedirler. TDP-43'ün 4000 RNA bağlama hedefi

bulunmaktadır. Bu RNA'lar hücrede çeşitli görevlerde yer almaktadırlar. TDP-43'te meydana gelen mutasyonlar sonucu çekirdekten sitoplazmaya taşınması gerekli olan mRNA'ların anlatımında aksaklıklar meydana gelmektedir [141]. Bu durum ise muhtemelen ALS patofizyolojisinin oluşmasına katkı sunmaktadır.

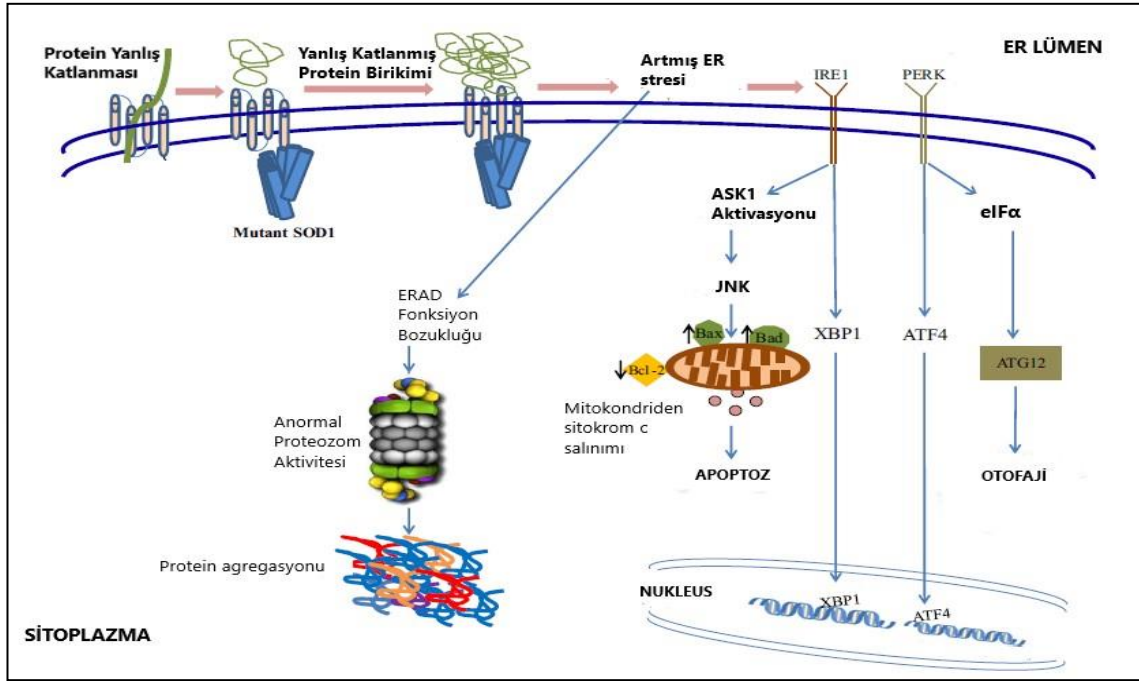
ALS üzerine yapılan çalışmalarda anjiyogenin (ANG) [142] ve DNA-RNA helikaz senataksin (SETX) [143] genlerindeki mutasyonların keşfi ile RNA metabolizmasında oluşan işlev bozukluğuna daha fazla kanıt sağlanmıştır [8]. ANG, RNA'ya özgü bir ribonükleaz transfer işlemi yapmaktadır ve rRNA transkripsiyonunu düzenlemektedir [144]. ANG proteini, apoptoz mekanizmasının aktive olmasını sağlayan faktörün çekirdeğe girişini önleyerek hücre ölümünü engellemektedir [145]. ANG geninde meydana gelen mutasyon proteinin işlev kaybetmesine ve hücre için zararlı bir etkiye sahip olmasına neden olmaktadır. Mutant SOD1 proteini kodlayan transgenik fare çalışmasında normal ANG'nin aşırı anlatımı farelerin yaşam süresini uzatmıştır [144].

Çocukluk dönemi başlangıçlı ailesel ALS ile bağlantılı gen SETX'dir. Bu proteininin oksidatif strese ve RNA işlenmesi sonucunda DNA onarımında rol oynayan büyük ribonükleoproteinlerin bir bileşeni olduğu tahmin edilmektedir [143]. RNA işlenmesinin düzensiz olması sonucu motor nöronlarda dejenerasyon meydana gelebilmektedir.

2.2.1.8 Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptoz

ER, yeni sentezlenen proteinlerin doğru şekilde katlanmasında ve yanlış katlanmış olanların seçici olarak bozunmasında önemli rol oynamaktadır. ER stresi çeşitli patolojik koşullar altında yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi ile indüklenmektedir. ER stresi sürecinde, moleküler şaperonlar proteostazisin hasarlı olduğu durumlarda dahil olmaktadır. ERAD (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation), yanlış katlanmış proteinlerin proteozomal sistem aracılığıyla yerini değiştirmekte ve ortamdaki kaldırmaktadır. Proteozomal sistem yanlış katlanmış ve hasar görmüş proteinler için bir degradasyon sistemidir. Normal koşullar altında ERAD sistemi UPS (Ubiquitin Proteasome System) ile organize edilmektedir. Şiddetli stres koşulları altında hücrede oluşan protein agregatları proteozomal bozunma sistemini inhibe etmektedir.

Yanlış katlanmış proteinlerin hücrede birikmesi ile de ER stresi oluşmaktadır (Şekil 2. 12). Bu durumda yanlış katlanmış protein cevabının (UPR) oluşturulmasına neden olmaktadır [146].



Şekil 2. 12 Motor nöron hücresi ölümlerinde protein yanlış katlanmasının rolü [146]

Bu mekanizmalar her ne kadar hücre için koruyucu etkilere sahip olsalarda uzun süreli UPR aktivasyonu hücre içi apoptotik süreçlerin indüklenmesine neden olabilmektedir [8]. UPR, ER merkezli şaperonların hücrede anlatımının artmasına neden olmaktadır. Bu durum hücreyi ER stresinden korumaktadır. Ancak aşırı ER stresi, C/EBP homolog proteininin (CHOP) aktive olmasına neden olmaktadır ve bunun sonucunda apoptoz meydana gelmektedir [147].

ER stresi ALS patofizyolojisinin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda UPR belirteçlerinin mutant SOD1 enzimini kodlayan kemirgen modellerinde [148], [149] ve sporadik ALS hastalarında [150] arttığı tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise sporadik ALS hastalarından alınan BOS sıvısının NSC-34 hücrelerinin ve primer sıçan spinal motor nöron hücrelerinin bulunduğu ortama eklenmesi sonucu ER stresi indüklenmiştir. Sonuç olarak UPR belirteçlerinde artış

meydana geldiği rapor edilmiştir [151]. Sigma-1 reseptörü motor nöron hücrelerinde ER ve mitokondrinin ara yüzünde bulunan bir şaperon proteindir. Bernard-Marissal ve ark. [152] yaptığı bir çalışmada motor nöronlarda bulunan sigma-1 reseptör fonksiyonunun bozulması sonucu ER ve mitokondri arasındaki iletişimde hasar meydana gelmiştir ve ER stresi uyarılmıştır. Mutant SOD1 proteininin birikiminin hücrenin proteozom aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir [153].

Otofaji, uzun ömürlü proteinlerin ve organellerin strese bağlı bozunma mekanizmasıdır [154]. ERAD tarafından ortamdaki kaldıramayan protein agregatlarının bozunmasında başlıca rol oynamaktadır. Otofaji hücrelerin hayatta kalmasını sağlamaktadır. Eğer otofaji mekanizmasında hasar meydana gelirse hücrede apoptoz mekanizmaları devreye girmektedir. Apoptoz mekanizmalarının uyarılması ALS hastalığının ilerlemesine neden olmaktadır. Antiapoptotik bir protein olan Bcl-2'nin motor nöronlarda anlatımının artması yaşam süresinin uzamasını sağlamıştır [155]. Yapılan bir çalışmada apoptotik yolağın uyarılmasını sağlayan mutant SOD1 proteinlerinin Bcl-2 proteini ile birlikte çökeldiği tespit edilmiştir [119]. Mutant SOD1 enzimini kodlayan transgenik farelerde kaspaz aktivasyonunun arttığı tespit edilmiştir ve kaspaz inhibitörleri ile mekanizmalara müdahale edilmesi sonucu yaşam süresinde artış olduğu rapor edilmiştir [156], [157]. ALS hastalarının omurilik dokusundan alınan örneklerde ise kaspaz-1 ve kaspaz-9 miktarının arttığı bildirilmiştir [156], [158].

HSP (Heat shock protein), HSR (Heat shock response)'nin oluşmasını sağlayarak proteinlerin doğru şekilde, yerde ve zamanda katlanmasına yardımcı olmaktadır. HSP'ler ER stresinde ve proteozomal bozunma süreçlerinde yer aldıklarından ALS patofizyolojisinin oluşmasına katkıda bulunabilmektedirler [159]. ALS hastalığının oluşumunda rol alan yanlış katlanmış proteinlerin varlığında, HSR DNA bağlama bölgelerindeki ısı şok elementlerine bağlanan ısı şok faktörleri vasıtasıyla protein transkripsiyonu ve translasyonu üzerinde rol oynamaktadırlar. Bu mekanizma birçok HSP'nin transkripsiyonunu uyarır ve yanlış katlanmış proteinlerin bir araya gelmelerini inhibe etmektedir [160]. HSP70 proteini Apaf-1'e bağlanmaktadır ve proteinin

aktivitesini ortadan kaldırmaktadır [161]. Ayrıca HSP27 sitoplazmada bulunan sitokrom c'ye bağlanır ve çalışmasını baskılamaktadır [162].

2.2.1.9 Nöroinflamasyon

İnflamatuvar mekanizmaların ALS patofizyolojisinin oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir [78]. ALS'de motor nöron hasarı mikrogliya, astrosit aktivasyonuna yol açmaktadır ve bu durum nörodejenerasyonun oluşmasına katkıda bulunmaktadır [163], [164]. Ailesel ve sporadik ALS hastalarından alınan omurilik dokusunda ve BOS'ta yapılan analizlerde mikrogliya aktivasyonunda, T hücreleri infiltrasyonu, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) ve IL-8 gibi bazı proinflamatuvar maddelerin konsantrasyonlarında artış tespit edilmiştir [165], [166], [167]. Mutant SOD1 enzimini kodlayan transgenik farelerde ise gen dizilişi analizi ile hastalığın ilerleyen evrelerinde inflamasyon ile ilgili olan proteinlerin anlatımının arttığı bulunmuştur [168], [169]. Graber ve ark. yaptığı transgenik farelerdeki çalışmalarda motor nöron dejenerasyonunun erken safhalarında omurilikte ve periferik sinirlerde mikrogliya ve makrofajların aktive olduğunu bildirmiştir [170].

Astrositler birçok inflamasyon sinyali üreterek nöroinflamasyonda önemli rol oynamaktadır. SOD1^{G93A} fare modellerinde astrositler prostaglandin E2, lökotrien B4 ve NO gibi bazal ve aktive edilmiş koşullardaki inflamatuvar maddelerin salgılanmasını sağlamaktadırlar [171]. İnsan embriyonik kök hücrelerinden elde edilen motor nöronlar ve mutant SOD1 ifade eden kemirgen veya insan astrositleri ile birlikte oluşturulan hücre kültürlerinde, prostaglandin D2 reseptörlerini veya NOX2'yi inhibe ederek, nöron toksisitesinin iyileştirilebildiği bildirilmiştir [172], [173]. Mutant SOD1 proteini kodlayan astrositlerin doğal olarak aktif bir proinflamatuvar duruma girme olasılığı yabancıl tiplerine göre daha fazladır [78].

2.3 Nörofilamentler: Hücre İskeletinin Yapıtışı

Nöronlar beyindeki bilgileri işleyen hücrelerdir ve çok sayıda dallanmış akson ve dendritlerden oluşmaktadırlar. Bu akson ve dendritler binlerce nörondan gelen

elektiriksel girdileri alıp işlemektelerler. N6ronların aksonları metrelerce uzunlukta olabilmektedirler ve h6cre g6vdesinden y6zlerce kat daha fazla toplam hacim iēerebilmektedirler. H6cre g6vdesi, proteinlerin sentezlendiēi ana kısmı oluşturmaktadır. N6ronal fonksiyonların oluşturulması ve devam ettirilmesi iēin akson iēine çok fazla madde taşınması gereklidir. Bu madde taşınması iēin n6ronal h6creler benzersiz bir sitoiskelete ihtiyaç duymaktadırlar.

H6cre sitoiskeletinin başlıca elemanları mikrot6b6ller, aktin filamentler ve ara filamentlerdir. Bu yapıların hem n6ronal morfolojinin oluşturulmasında hem n6ronal polaritenin oluşturulmasında hem de akson b6t6nl6ē6n6n saēlanması ve s6rd6r6lmesinde işlevleri bulunmaktadır [174].

N6ronal h6crelerde en çok bulunan sitoiskelet elemanları ara filamentlerdir. Başlangıçta ara filament terimi, civciv embriyosundan k6lt6r yapılan iskelet kası h6crelerinde elektron mikroskopisi ile keşfedilen, aktin ve miyozin filamentleri arasında bulunan bir filament sınıfını belirtmek iēin kullanılmıştır [175]. Ara filamentler boyutları deēiřen ve birincil yapıları farklı olan protein ailesi 6yeleridir. Yaklaşık 10 nm kalınlıktadırlar. Memelilerde ara filament proteinlerini kodlayan yaklaşık 70 gen bulunmaktadır. Bu genler doku ve h6cre tipine ve bazen de h6cre farklılaşmasına g6re farklı zamanda ifade edilmektedirler. Gen yapısı ve aminoasit dizilimi temel alınarak ara filamentler beş tipe ayrılmışlardır. Asidik ve bazik keratinler tip I ve II olarak epitelyum h6crelerinde ifade edilmektedirler. Vimentin, mezenşimal h6crelerde; desmin, kas h6crelerinde; glial fibriler asidik proteinleri (GFAP) ve periferin ise periferik sinir sistemi n6ronalarında tip III proteinleri olarak ifade edilmektedirler. Tip IV ara filament proteinleri ise merkezi sinir sisteminin n6ronalarında ifade edilmektedirler. Lamininler olarak adlandırılan tip V proteinleri ise sadece n6kleusta bulunmaktadır [176].

Tip IV ara filament proteinleri n6rofilament hafif zincir (NF-L), n6rofilament orta zincir (NF-M), n6rofilament aēır zincir (NF-H) ve α -interneksinden oluşmaktadırlar. N6rofilament proteinleri aksonlarda y6ksek miktarda bulunmaktadır. Ana işlevleri akson çapını ve akson iletkenliēini kontrol etmektir. Bu proteinler kararlı polimerlerdir ve sırasıyla 68, 160 ve 200 kDa'dan oluşmaktadırlar. Birlikte bu n6rofilamentler esas

olarak NF-L'nin amino ucundan oluşan ve akson boyunca paralel uzanan bir omurgaya sahip hücre iskeleti çekirdeği oluşturmaktadırlar. NF-M ve NF-H'nin C-terminal yan kolları omurgayı kaplayan bir kabuk şeklinde bulunmaktadır [177].

2.3.1 Nörofilamentlerin Hücrelerde İfadesi

Nörofilament proteinleri hücre gövdesinde sentezlenmektedirler. Üç nörofilament altbiriminin ifadesi nöron farklılaşması ile uyarılmakta ve omurgalı gelişiminin farklı evrelerinde ifade edilmektedirler. İlk olarak NF-L proteini nöronal farklılaşmanın başlangıcında ifade edilmektedir ve α -interneksin ve periferin ile üst üste gelmektedirler. NF-M proteini nörit oluşumundan kısa bir süre sonra ifade edilirken, NF-H sinir sisteminin olgunlaşması için aksonal radyal büyüme gerektiğinde ifade edilmektedir. NF-L ve NF-M genleri koordineli düzenlenirken NF-H geni daha sonra bağımsız olarak ifade edilmektedir [178].

NF-L geni 8p21 lokasyonunda bulunmaktadır ve 543 aminoasitten meydana gelmektedir. Moleküler kütlesi 61 kDa'dur. Ancak, fosforilasyon ve glikolizasyona bağlı olarak SDS-PAGE'de yavaş yürümektedir. Çoğu yazar SDS-PAGE'de 69 kDa'luk bir kütleyle değinmektedir [179].

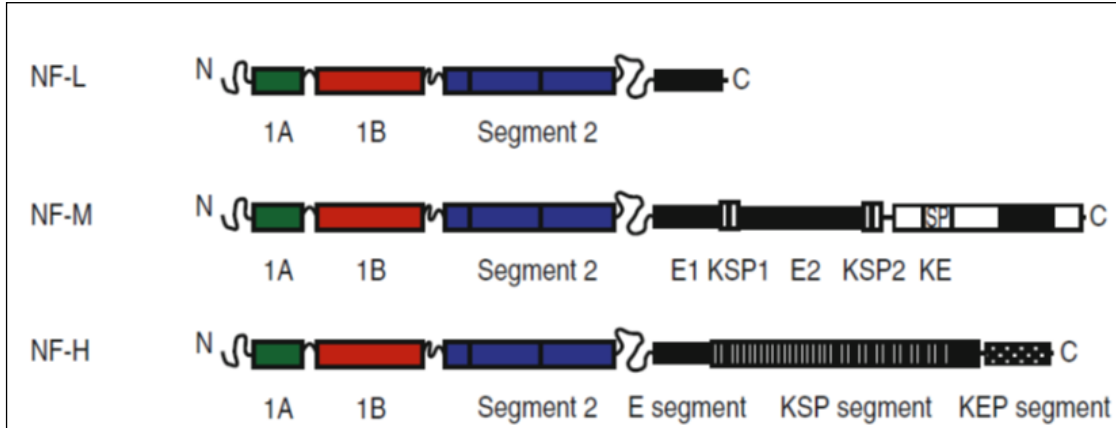
NF-M geni de 8p21 lokasyonunda yer almaktadır ve 916 aminoasitten meydana gelmektedir. Moleküler kütlesi 102.5 kDa'dur ancak SDS-PAGE'de 150 kDa'da yürümektedir [179].

NF-H geni ise 22q12.2 lokasyonunda yer almaktadır ve 1020 aminoasitten meydana gelmektedir. Aminoasitlerin moleküler kütlesi 111 kDa'na denk gelmektedir. Ancak çoğu yazar proteinde bulunan bağlı fosfat yükünden dolayı SDS-PAGE'de 190-210 kDa'luk bir moleküler kütleyle dikkat çekmektedir [179].

2.3.2 Nörofilamentlerin Yapısal Özellikleri

Tüm nörofilament proteinleri ortak bir yapısal organizasyondan meydana gelmektedirler. Yaklaşık 300 amino asitten oluşan merkezi bir α -helikal rod domaini,

globular amino terminal baş domaini ve α -helikal olmayan karboksi terminal yan kol domaini ile çevrelenmiştir (Şekil 2. 13) [180].

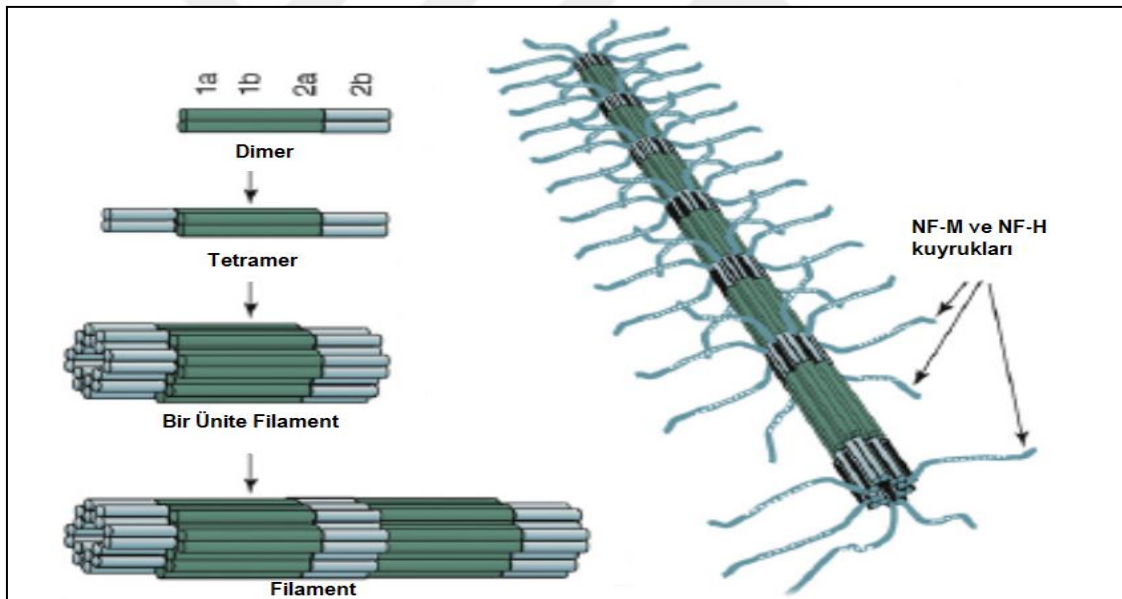


Şekil 2. 13 Nörofilament altbirimlerinin yapısı. E ve KEP segmentleri sırasıyla glutamik asit kalıntıları ve lizin, glutamik asit ve prolin kalıntıları bakımından zengindir. KSP dizileri homolog çiftleri heksapeptid tekrarlarında yer almaktadırlar. (E: glutamat, K: lizin, S: serin, P: prolin) [177]

Rod domaini 1A, 1B, 2A ve 2B kısımlarına ayrılmıştır. Ayrıca helikal olmayan domain L1, L12 ve L2 bağlayıcı kısımlardan meydana gelmektedir [177]. Rod domaini nörofilamentleri karakterize eden ve düzgün bir şekilde birleşmeleri için gerekli olan korunmuş motifleri içermektedirler. Rod domaininin daha merkezi kısmında bulunan 7. rezidüsü hidrofobiktir. 7. rezidü, paralel α -helikal olarak sarmalanmış heterodimerlerin oluşmasını kolaylaştırmaktadır. L12 bağlayıcı bölgesi ise hidrofobik rezidüleri hizalanmasını sağlamaktadır. Dimerlerin antiparalel bir şekilde, rod domainlerinin üst üste binmesi ile tetramer yapısı oluşmaktadır. Tetramer çiftleri birleşerek protofilamentleri oluşturur ve sekiz protofilament son olarak 10 nm'lik nörofilamenti oluşturmaktadır. Protofilamentlerin birleşmesi baş domaini tarafından desteklenmektedir. Nörofilamentlerin oluşumunda iki altbirim bir araya gelmektedir. Ya NF-L/NF-M ya da NF-L/NF-H birleşerek nörofilament polimerizasyonunu meydana getirmektedir (Şekil 2. 14).

Amino terminal baş domaini fosforilasyon ve O-glikolizasyon dahil olmak üzere kapsamlı bir post-translasyonel modifikasyona uğramaktadır. Bu yapı dinamiktir ve birleşmeyi ve taşınmayı düzenlemektedir.

Karboksi terminal yan kol domainleri ise nörofilament altbirimlerine göre değişiklik göstermektedir. NF-L en kısa yan kol domainine sahiptir, daha sonra NF-M ve en uzun yan kol domaini ise NF-H'a aittir. NF-M ve NF-H yan kol domainleri birçok tekrarlayıcı motiflerden meydana gelmektedir. Bunlar X-lizin-serin-prolin- $X_{(1-3)}$ –lizin (XKSPX $_{(1-3)}$ K) tekrar motifidir. X burada tek bir amino asidi işaret etmektedir. İnsanlarda NF-H proteininde 13 benzer tekrar bulunmaktadır. Bu proteinin iki formu vardır, birinde 44 tekrarlı yan kol domaini bulunurken diğer formda 45 tekrarlı yan kol domaini bulunmaktadır. Motif etrafındaki bölgenin geri kalan kısmını oluşturan amino asitler iki protein arasında önemli derecede değişmektedir. Tekrar motifleri NF-M'de çiftler halinde iken, NF-H'de daha eşit aralıklarla bulunmaktadır. İnsanlarda, NF-H'nin KSP tekrarlarının düzenlenmesi yan kol domaininin ilk yarısında XKSPAK, XKSPEK ve XKSPXXXK iken, ikinci yarısında ise XKSPVK ve XKPSEK tekrarlarından oluşmaktadır. İki kısım birbirinden XKSPEK bölgesi ile ayrılmaktadır [180].

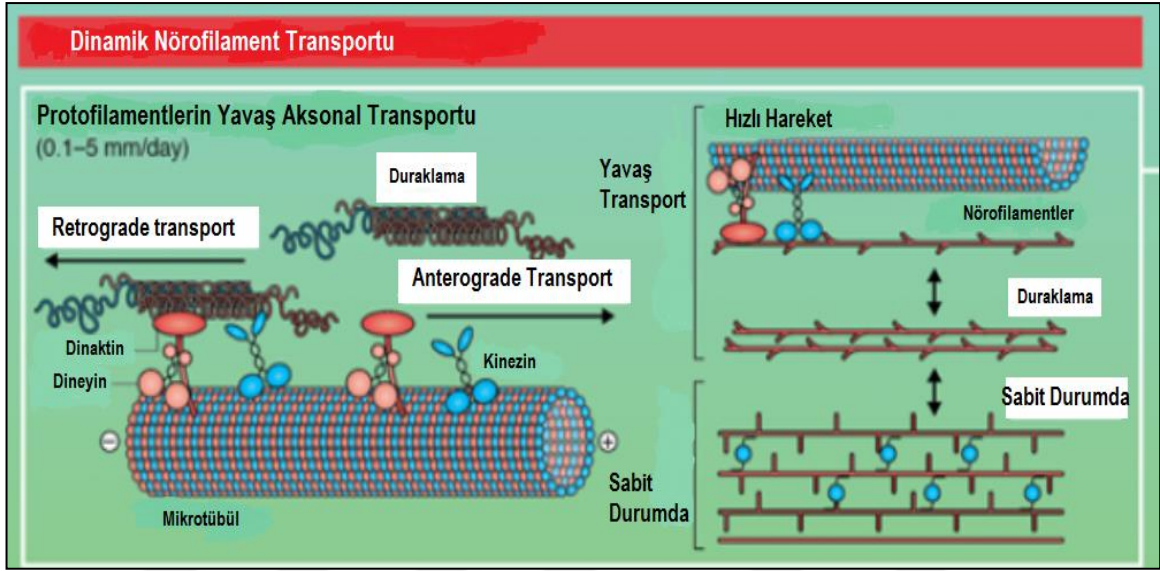


Şekil 2. 14 10 nm'lik filamentlerin yapısal olarak bir araya gelişi [181]

2.3.3 Nörofilamentlerin Hücrelerde Taşınımı

Nöronların metabolizmaları çok hızlıdır, bu nedenle hücre içerisinde hızlı bir madde akışı gerçekleşmektedir. Hücre içerisinde madde taşınması ya aksonlardan sinaptik bölgeye doğru olan anterograd taşıma ile ya da sinaptik bölgeden hücre gövdesine

doğru olan retrograd taşıma ile olmaktadır. Ayrıca hücrede maddeler ya yavaş ya da hızlı aksonal taşıma ile taşınmaktadır. Hücredeki maddelerin taşınmasında moleküler motorlar denilen proteinler görev almaktadırlar. Bu moleküler proteinler anterograd taşımadan sorumlu kinesin ile retrograd taşımadan sorumlu olan dineinden meydana gelmektedir. Bu moleküler motorlar mikrotübüller üzerinde hareket ederek hücre içerisindeki maddelerin taşınmasını sağlamaktadırlar (Şekil 2.15).



Şekil 2. 15 Nörofilamentlerin hücrede taşınması [182]

Hızlı aksonal taşıma, veziküllerin ve mitokondri gibi organellerin moleküler motorlar tarafından taşınımından oluşmaktadır. Günde yaklaşık 1 mm/s ya da 90 mm/gün hızda taşıma yapılmaktadır [180].

Nörofilamentler ise hücre gövdesinde sentezlendikten sonra hızlıca aksonal taşıma için iplikçi yapılar halinde düzenlenmektedirler. Yeşil floresan proteini (GFP) ile yapılan çalışmalarda nörofilamentlerin hücre içinde taşınması eş zamanlı olarak incelenmiştir [183], [184], [185], [186]. Çalışma sonucunda hem GFP-NF-M hem de GFP-NF-H proteini yaklaşık 1 mm/s hızda taşındığı bulunmuştur. Ancak bu taşıma sırasında hareketin %85-99'unun uzun süreli duraksamalar ile kesintiye uğradığı tespit edilmiştir [186]. Bu duraksamalar moleküler motorlar ile nörofilament yapılarının arasındaki geçici etkileşim eksikliğinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir [178]. Bu sonuçlara göre nörofilamentler aksonda "yavaş aksonal taşıma" denilen mekanizma ile

hücre içerisinde yer değiştirmesi sağlanmaktadır. Nörofilamentler hücrede kinesin ve dinein moleküler motorları ile etkileşime geçerek mikrotübül boyunca iki yönlü olarak taşınabilmektedirler [178]. Nörofilamentlerin büyük bir kısmı akson boyunca taşınırken oligomer birimleri olarak taşınmaktadır [186], [187], [188].

2.3.4 Nörofilamentlerin Fosforilasyonu

Nörofilamentler fosforilasyon, glikolizasyon, nitrasyon, oksidasyon ve ubiquitilasyon gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonlara uğramaktadırlar. Burada sadece nörofilamentlerin fosforilasyonuna değinilecektir. Nörofilament altbirimlerinin fosforilasyonu, nörofilamentlerin taşınmasında, oluşumunda ve fonksiyonunun düzenlenmesinde rol almaktadır [178]. Nörofilamentlerin fosforilasyonu ve defosforilasyonu aksonal bölme içinde gerçekleşmektedir ve karmaşık mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir [179].

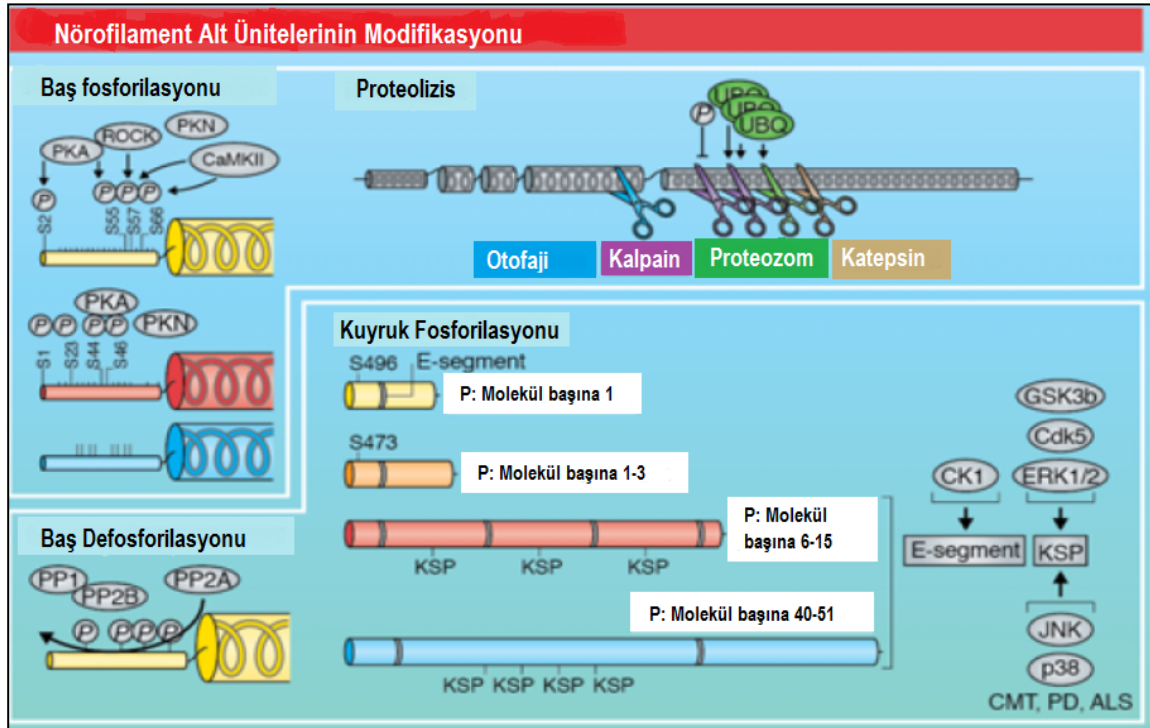
Nörofilament altbirimlerinin sentezinden hemen sonra, hücre gövdesinde NF-L ve NF-M'nin baş domainleri fosforilasyona uğramaktadır. Nörofilament baş domaini fosforilasyonu ikincil mesajcı bağımlı kinazlar olan protein kinaz A (PKA), protein kinaz C (PKC) ve Ca^{+2} /CAMPKII tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu protein kinazlar özellikle serin rezidülerinin fosforilasyonuna neden olmaktadır. Nörofilamentlerin baş domainlerinin fosforilasyonu, onların hücre gövdesinde ayrık durumda muhafaza edilmelerini sağlamaktadır. NF-L'nin baş domaininin fosforilasyonu hücre gövdesinde nörofilamentlerin polimerizasyonunu engellemektedir. Nörofilamentler aksona girmeden hemen önce ise baş domainlerinde bulunan fosfat grupları koparılmaktadır. Baş domaininde bulunan fosfat gruplarının ayrılması protein fosfataz 2A (PP2A) tarafından sağlanmaktadır. Böylece nörofilamentler aksona girip taşınmaya başlamadan hemen önce polimerleşebilmektedirler (Şekil 2. 16) [182].

Aksona girmeden önce polimerleşen nörofilamentler, akson boyunca taşınmaya başladıklarında NF-M ve NF-H'nin kuyruk domainleri yavaş bir şekilde fosforile olmaktadır. Bunun nedeninin ise ortamda bulunan kinazların geç aktive olması veya polimerleşmiş nörofilamentlerde kapalı bir konformasyon nedeniyle fosfat alıcı

bölgelere erişilememesi olduğu düşünülmektedir [178]. Polimerleşen nörofilamentten çıkıntı yapan NF-M ve NF-H'nin kuyruk domainleri fosforilasyona maruz kalmaktadırlar. Nörofilamentlerin kuyruk domainleri hücre gövdesinde fosforile edilmemiş şekilde bulunurken, olgun aksonlarda ise kuyruk domainleri fosforlanmış şekilde bulunmaktadırlar. Kuyruk domainlerinin fosforilasyonunun gelişimsel olarak düzenlendiği düşünülmektedir. Miyelinasyon ve sinaptogenezisin uyarmasıyla fosforilasyonun düzenlendiği görülmektedir. Miyelin bağlantılı glikoprotein (MAG), miyelinizasyon sinyalinin aracısı olarak nörofilament kuyruk domainlerinin fosforilasyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır [182]. NF-M ve NF-H'nin kuyruk domainlerinde fosforilasyona uğrayan asıl bölgeler KSP tekrarlarının olduğu bölgelerdir (Şekil 2. 16), ancak KSP tekrarlarının olmadığı kısımlarda da fosforilasyon meydana gelmektedir. NF-M ve NF-H'nin kuyruk domainlerinin fosforilasyonu ikincil mesajcı bağımlı olmayan protein kinazlar tarafından düzenlenmektedir. Cdk5, kuyruk domaininde KSPXK tekrarlarının fosforilasyonunu düzenlemektedir. KSPXK ve KSPXXXXK tekrarlarının fosforilasyonu ise ERK1/2 tarafından düzenlenmektedir [182]. GSK 3 ise bazı KSP motiflerini fosforile etmektedir [189]. JNK 1/2 ve p38 ise NF-H kuyruk domaininde bazı KSP tekrarlarının fosforilasyonuna neden olmaktadır. Stres koşulları altında NF-H kuyruk domaininde KSPXE tekrarlarının fosforilasyonu SAPK tarafından gerçekleştirilmektedir [190]. Fosfat grupları serin ve treonine yüksek affinite ile bağlanmaktadır [179]. Nörofilament kuyruk domainleri her ne kadar aksonda fosforlanmış olsada hücrede bazı bölgelerde daha az fosforile olduğu yerlerde bulunmaktadır. Hücre gövdelerinde, dendritlerde ve Ranvier boğumlarında kuyruk domainlerindeki KSP tekrarları daha az fosforile edilmektedir [178].

NF-M ve NF-H kuyruk domainlerinin fosforilasyonu sonucu nörofilament aralığında artış meydana gelir. Bu da aksonların radyal büyümesini ve elektriksel iletim hızını arttırmaktadır. Ancak, nörofilamentlerin fosforilasyonunda meydana gelen artışın onların akson içinde taşınmasında yavaşlamaya neden olabileceği düşünülmektedir. Bunun dışında NF-H kuyruk domaininin fosforilasyonu özellikle mikrotübüller ile etkileşmesine aracılık etmektedir. NF-H'nin bu etkileşimi sonucu mikrotübüller ile

çapraz köprülerin oluşumu sağlanmaktadır [178]. Kuyruk domaini fosforilasyonu ayrıca nörofilamentlere olağanüstü proteoliz direnci kazandıran bir post-translasyonel özelliktir [182].



Şekil 2. 16 Nörofilament alt birimlerinin fosforilasyonu ve proteolizisi [182]

2.3.5 Nörofilamentlerin Yıkımı

Nörofilamentler metabolik olarak kararlı proteinlerdir. Ancak her hücre elemanı gibi belli bir süre sonra yıkıma uğramaktadırlar. Bu proteinler akson boyunca taşınırlar ancak sinapslarda polimer halinde bulunmamaktadırlar. Çünkü bu proteinlerin yıkıma uğradıkları yer sadece sinapslardır [191], [192]. Yukarıda da bahsedildiği gibi fosforilasyon nörofilamentlerin proteolizise karşı dirençli olmalarına neden olmaktadır. Bu nedenle yıkıma uğrayacak nörofilamentlerin öncelikle defosforile olması gerekmektedir. Sinapslarda PP2A enzimi öncelikle yıkıma uğrayacak nörofilamentlerin defosforile olmasını sağlamaktadır [193]. Daha sonra ise sinapslarda bulunan proteaz enzimleri nörofilamentlerin yıkımına neden olmaktadır. Sinapslarda bulunan Ca^{+2} aktive edilmiş proteaz olan kalpain 1/2 enzimleri defosforile olmuş olan

nörofilamentlerin yıkımından sorumludurlar. Bunun dışında nörofilamentler spesifik olmayan proteazlar ile de yıkıma uğramaktadırlar. Lizozomal kathepsin D, tripsin ve α -kemotripsin enzimleri bu yıkım işleminden sorumludurlar (Şekil 2. 16) [190].

Yıkım sonucu oluşan parçalar retrograd taşıma ile hücre gövdesine taşınmaktadır. Bu bozunma ürünlerinin hücre gövdesine gidişi bir geri besleme mekanizmasının oluşturulmasında rol almaktadır. Bu mekanizma hücrede yeniden oluşturulacak nörofilament miktarının, yapısının ve ne kadarının taşınacağı ile ilgili bir düzenleme sağlamaktadır [190].

Fosforilasyon her ne kadar proteolizise karşı koruyucu ise, bir diğer post-translasyonel modifikasyon olan ubikuitilasyon ise nörofilamentlerin proteolizise karşı daha hassas olmalarına neden olmaktadır [194]. Ayrıca NF-L altbirimi, NF-M ve NF-H'ine göre proteolizise karşı daha duyarlıdır. Bunun nedeni ise NF-L'inin kendi başına polimerize olma potansiyeli vardır. Bu durum ise protein birikimi, agregat oluşumu ve sonuçta hastalık oluşumuna neden olabileceği için biyolojik olarak düzenlenmiştir [179].

2.3.6 Nörofilamentlerin Fonksiyonu

Nörofilamentler hücre iskeletinin bir üyesi olmalarından dolayı, nöronlarda yapısal bütünlüğün korunmasında, hücre şeklinin oluşturulmasında ve organellerin ve hücre içi diğer maddelerin taşınmasında mikrotübüller ve mikrofilamentler ile birlikte çalışmaktadırlar. Nörofilamentlerin en büyük işlevi aksonal çapın oluşturulmasını sağlamaktır [178]. Aksonal çapın artışı ile nörofilament sayısı ve yoğunluğu arasında bir korelasyon bulunmaktadır [195]. Aksonda impuls iletim hızı, aksonun çapı ile orantılı olarak değişmektedir. Örneğin iskelet kaslarını kontrol eden çevresel motor nöronlarda hızlı impuls iletiminin sağlanması için nörofilamentler bu aksonlarda yüksek miktarlarda bulunmaktadır [178].

NF-L, nörofilamentlerin polimerleşmesinde temel bir altbirimdir. NF-L geninin susturulduğu çalışmalarda, bu altbirimin yokluğunda NF-M ve NF-H 10 nm'lik filamentleri oluşturamamaktadırlar. Sonuçta NF-L olmayan fare nöronlarında nörofilament polimerleşmesi gerçekleşmediğinden ciddi aksonal atrofiler meydana

gelmiştir. Buradan şu anlaşılmaktadır ki, NF-L altbirimi aksonal çapın oluşturulmasında belirleyici bir faktördür [196]. Aksonal çap ve nörofilament ile ilgili ilk çalışma, NF-L geninin hasarlı olduğu doğal mutant bir bıldırcın üzerinedir ve yapılan analizler ile NF-L altbiriminin aksonal çapın oluşturulmasındaki rolünün anlaşılması sağlanmıştır [197], [198], [199]. Daha sonraki araştırmalarda nörofilament bulunmayan transgenik fare çalışmaları ile bu sonuçlar doğrulanmıştır [200].

Aksonal çapın oluşturulmasında diğer önemli altbirimler ise NF-M ve NF-H'dir. Bu altbirimler NF-L ile heteropolimer yapılar meydana getirerek aksona yerleşmektedirler. Uzun kuyruk domainleri sayesinde aksonal çapın oluşturulmasını sağlamaktadırlar. Bu kuyruk domainlerinde bulunan KSP tekrarlarının fosforilasyonu da aksonal çapın oluşturulmasında önemli rol oynamaktadır. Fosforile olan KSP tekrarları negatif yüke sahip olmaktadır. Bu negatif yük ile kuyruk domainlerinin halka yapısının açılması sağlanmaktadır ve bu da kuyrukların daha fazla uzamasına neden olmaktadır. Birbirlerine uyguladıkları itici kuvvetler ile de nörofilamentler arasındaki boşlukta artış meydana gelmektedir. Bu da akson çapının artışı ile sonuçlanmaktadır [179]. Bu itici etkileşimler NF-L homopolimerlerinde ya da enzimatik olarak KSP tekrarlarının defosforile olduğu bölgelerde bulunmamaktadır [201].

Önceden NF-H'nin kuyruk domaininin fosforilasyonunun nörofilament boşluğunun ve aksonal çapın oluşmasında temel bir altbirim olduğu düşünülmekteydi ancak yapılan çalışmalar sonucu aksonal çapın belirlenmesinde NF-M altbirimin daha öncelikli olduğu anlaşılmıştır. NF-M geninin susturulduğu bir çalışmada büyük miyelinlenmiş nöronların aksonal radyal büyümesinde hasarların meydana geldiği gözlemlenmiştir [202], [203]. NF-M'nin yokluğu, NF-L seviyesinde önemli bir düşüşe neden olmaktadır. Bunun sonucunda da aksonal nörofilament bileşiminde düşüş meydana gelmekte ve sonuçta aksonal atrofi oluşmaktadır. Nöronların gelişiminde ilk olarak NF-L ve NF-M altbirimlerinin anlatımı yapılmaktadır. Ortamda NF-M olmadığı takdirde NF-L altbiriminin hücre gövdesinde birikimi gerçekleşmektedir. Sonuçta aksonal çapta düşüş gözlenmektedir [203]. NF-H proteini eksik farelerde yapılan bir çalışmada ise miyelinlenmiş aksonların çapında hafif bir düşüş olduğu bildirilmiştir [204], [205].

Bunun nedeninin ise NF-H proteini eksik nöronlarda NF-L ve NF-M altbirimlerinin fosforilasyonunda meydana gelen değişiklikler sonucu NF-H proteininin eksikliğine karşı dengeleyici bir önlem oluşturulduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak NF-M altbiriminin aksonun radyal büyümesinde NF-H altbiriminden daha önemli olduğu görülmektedir.

NF-H proteininin kuyruk domaininin ise nörofilament-nörofilament etkileşimlerinde görevli olduğu düşünülmektedir [190]. Ayrıca fosforlanmış NF-H altbiriminin kuyruk domaini mikrotübül, mikrofilament ve diğer sitoskeletal elementlerle etkileşim içine girmektedir ve çapraz köprülerin oluşumuna katılmaktadır [206]. Çok az ya da hiç fosforlanmamış NF-H kuyruk domaini anterograd ve retrograd taşımada da rol almaktadır [185].

Nörofilamentlerin dikkate değer özelliklerinden biri son derece uzun yarılanma ömürleri ve nöronların asimetric şeklini muhafaza etmelerini sağlayan esnek elyaf özellikleridir. Nörofilamentler sadece aksonal çapın belirlenmesinde görev almazlar başka görevleride bulunmaktadır. Bütün nörofilamentlerin baş bölgesi mikrotübül polimerizasyon inhibitör bölgesi içermektedir. Aksonda mikrotübül sayısını belirlemektedirler. Ayrıca rod bölgesi miyosin ve motor proteinler için bağlanma bölgesi olarak görev yapmaktadır [182].

2.3.7 Nörofilament ve ALS Hastalığı İlişkisi

ALS hastalarında ve transgenik fare modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda nöronal sitoskelet elemanlarındaki bozuklukların ALS patofizyolojisine yol açan faktörlerden biri olabileceği tespit edilmiştir. Nöronal ölümün meydana gelmesi hücre içeriğinin BOS'na ve kana karışması sonucu nöronal sitoskelet elemanlarının konsantrasyonunda artış meydana geldiği saptanmıştır. Nörofilamentlerin nöronlara özgü bir sitoskelet elemanı olmalarından dolayı bu proteinler üzerine yapılan çalışmalar günden güne artmıştır. Nörofilament polimerleşmesinde önemli bir alt birim olan NF-L ve akson çapının oluşturulmasında önemli bir işlevi olan NF-H altbirimi özellikle çok çalışılan sitoskelet elemanlarıdır. Ayrıca NF-H'nin kuyruk domaininde bulunan KSP tekrarlarının

yüksek derecede fosforile olması sonucu proteaza karşı dirençli hale gelen pNF-H proteini üzerine çalışmalarda artış meydana gelmiştir. pNF-H proteininin bu özelliği onu aday bir biyobelirteç yapmaktadır. pNF-H proteini hem merkezi hem de periferik sinir sisteminde meydana gelen hasarların tespitinde kullanılabilecek bir proteindir [22].

ALS üzerine yapılan çalışmalarda dejenere olmuş motor nöronlarda NF-L mRNA seviyesinin % 70 oranında azaldığı tespit edilmiştir [207], [208], [209], [210]. NF-L protein seviyesinin hücre içerisinde azalması sonucu, hücre gövdesinde bulunan diğer altbirimlerin miktarında artış meydana gelmektedir. Bunun sonucunda ise hücre gövdesinde çökelti oluşmaktadır. Bunun yanında nörofilamentlerin hücrede aşırı anlatımının olması hücre gövdesinde çökeltilere neden olarak dejenerasyona yol açtığı transgenik fare çalışmaları sonucu tespit edilmiştir [207], [211], [212], [213]. Histolojik boyama ile yapılan çalışmalarda ise ALS'de aksonda ve nöronal hücre gövdesinde boyanmış pNF-H miktarında artış olduğu gözlenmiştir [214], [215]. Mutant SOD1 proteini kodlayan transgenik farelerin nöronlarında ise nörofilament çökelmelerinin meydana geldiği bildirilmiştir [216], [217]. Ayrıca nörofilamentlerin aksonal taşınmasının da bozulduğu gözlenmiştir [217]. ALS hastalarında ve SOD1 mutant farelerde, normal hücrelerde fosforillenmemiş olan bölgelerin, NF-M ve NF-H içeren nörofilament çökeltileri içeren bu bölgelerde yüksek derecede fosforillendiği bildirilmiştir [216], [218], [219].

ALS'li hastaların BOS'unu kullanarak yapılan bir çalışmada, aksonal dejenerasyon sonrası veya nöronal ölümden hemen sonra BOS'na hızlı bir şekilde diffüze olan NF-L altbiriminin ölçümü yapılmıştır. Buna göre BOS NF-L seviyesi nörolojik kontrol grubuna göre ALS hastalarında yüksek olduğu tespit edilmiştir [220]. Ayrıca mutant SOD1 transgenik farelerdeki bir çalışmada semptomlar gözlenmeden önce omurilikte NF-L içeren inklüzyonların varlığı bulunmuştur [221].

ALS hastalarından elde edilen kök hücrelerin kullanılması ile nöronal kültür oluşturulmuştur. Bu nöron hücreleri mutant SOD1 proteini kodlayan hücrelerden meydana gelmektedirler. Bunun sonucunda mutant SOD1 proteininin NF-L mRNA'sına bağlanması ile bu mRNA'nın stabilitesinin bozulmasına neden olduğu ve sonuçta NF-L

mRNA seviyesinde düşüş meydana geldiği gözlenmiştir. Sonuçta da hücre gövdesinde nörofilament çökelmelerinde artış meydana geldiği bildirilmiştir [222].

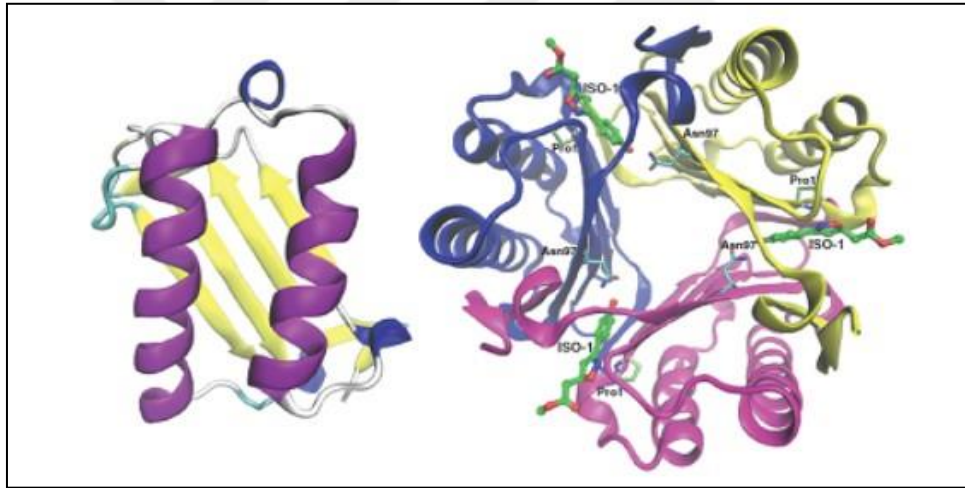
15 merkezin katılımıyla yapılan bir çalışmada ALS hastalarının BOS'ları kullanılmıştır. Bu çalışmada BOS'da pNF-H ve NF-L proteinlerinin seviyesinin ölçümü yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucuna göre pNF-H seviyesi 15 merkezin 10'unda, NF-L ise 12 merkezin 5'inde protein seviyesinin ALS hastalarının BOS'larında yüksek olduğu bildirilmiştir [223].

ALS'li hastalarla yapılan başka bir çalışmada ise pNF-H proteininin hem plazmada hem de BOS'da ölçümü yapılmıştır. ALS grubunun nörolojik kontrol ve sağlıklı kontrol grubuna göre BOS ve plazma pNF-H seviyelerinde ciddi bir artış olduğu bulunmuştur. Ayrıca aynı bireylerin plazma ve BOS pNF-H seviyelerinin pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. BOS ve plazma pNF-H seviyesi arasındaki pozitif korelasyon pNF-H proteininin, hasarlı kan-beyin/kan-omurilik bariyerini kolayca geçebilmesine bağlanmaktadır. Kan-beyin/kan-omurilik bariyerlerinin yapısal ve işlevsel olarak bozulması, erken dönemde ALS hayvan modellerinde hasarlı olduğu ispat edilmiştir. Bu değişiklik kan-beyin/kan-omurilik bariyeri ile BOS'tan pNF-H geçişini hızlandırabilmektedir [224], [225], [226], [227], [228]. pNF-H, kan-beyin/kan-omurilik bariyerini geçemezse ya da çok az bir kısmı geçebilirse plazma ve BOS'taki pNF-H seviyesi sırasıyla üst ve alt motor nöron aksonların dejenerasyonunun bir göstergesi olabilme olasılığı bulunmaktadır [13].

2.4 Makrofaj Migrasyon İnhibe Edici Faktör (MİF)

MİF, 1950'li yıllarda ilk sitokinlerden biri olarak keşfedilmiştir. Bunun yanında MİF'in enzim aktivitesi de bulunmaktadır. T lenfositlerden elde edilen süpernatantlardan izole edilen MİF'in immünolojik aktivitesi olduğu ve makrofajların rastgele migrasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur [229]. MİF monosit, makrofaj, fibroblast, pankreas insülin salgılayan hücreler, hipofiz hücreleri, endotel hücreleri, nöronlar, nöronal olmayan hücreler ve sinir kök hücre öncülleri gibi çeşitli diğer hücreler tarafından da anlatımı yapılan evrimsel olarak korunmuş bir sitokindir [230]. MİF'in işlevleri makrofaj

İlk başlarda MİF'in hücresel kaynağının T hücreleri olduğu düşünülmekteydi. Ancak yapılan çalışmalarda ayrıca monositlerde, makrofajlarda, B hücrelerinde, nötrofillerde, eozonofillerde, mast hücrelerinde ve bazofillerde de ifade edildiği tespit edilmiştir. Çoğu sitokin aksine MİF hücrelerde temel olarak ifade edilmektedir ve hücresel havuzlarda depolanmaktadır. Bu nedenle sekresyon öncesi de novo olarak protein sentezi yapılması gerekmemektedir. MİF proteininin amino-terminal öncü sekansına sahip olmamasından dolayı hücrelerden geleneksel olmayan bir yol ile salındığı düşünülmektedir. Bağışıklık sistemi dışında MİF birçok farklı dokuda da bulunmaktadır. Özellikle, canlıların akciğeri, derinin epitelyum tabakası, gastrointestinal ve genitoüriner yolları gibi doğal çevre ile doğrudan etkileşim içerisinde olan hücrelerde ve dokularda da ifade edilmektedir. Ayrıca stres koşulları altında aktif hale gelen hipotalamus, hipofiz ve böbreküstü bezleri gibi organların ve endokrin sistemin çeşitli dokuları tarafından da yüksek oranda ifade edildiği bulunmuştur [232], [233].



Şekil 2. 18 MİF'in monomer ve homotrimer yapısı [233]

2.4.2 MİF'in Yapısal Özellikleri

MİF'in kristal yapısı ilk olarak 1996 yılında tanımlanmıştır [233]. MİF, bilinen sitokin protein ya da sitokin reseptör sınıflarından hiçbirine uymamaktadır. X-ray kristallografi çalışmaları sonucu MİF'in 114 amino asit içeren 12.5 kDa'luk bir polipeptid olduğu bulunmuştur. MİF aktif formda iken üç monomer bir araya gelerek simetrik bir

homotrimer yapı oluşturmaktadır. Bunun sonucunda 37.5 kDa'luk bir protein meydana gelmektedir (Şekil 2. 18) [234].

Her monomer iki α heliks ve bir β tabakadan meydana gelmiştir. Bu α heliks ve β tabakalar karşılıklı olarak denk gelmektedirler. Ayrıca monomerler arasındaki etkileşimi sağlamak için ilave olarak iki β zincirine daha sahiptir. Bu üç β tabaka ve altı α heliks, homotrimerin merkezinde bir geçit kanalı olan dairesel bir protein oluşturmaktadırlar. Elektrostatik potansiyel haritaları, kanalın negatif yüklü molekülleri bağladığını düşündüren pozitif potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur [230].

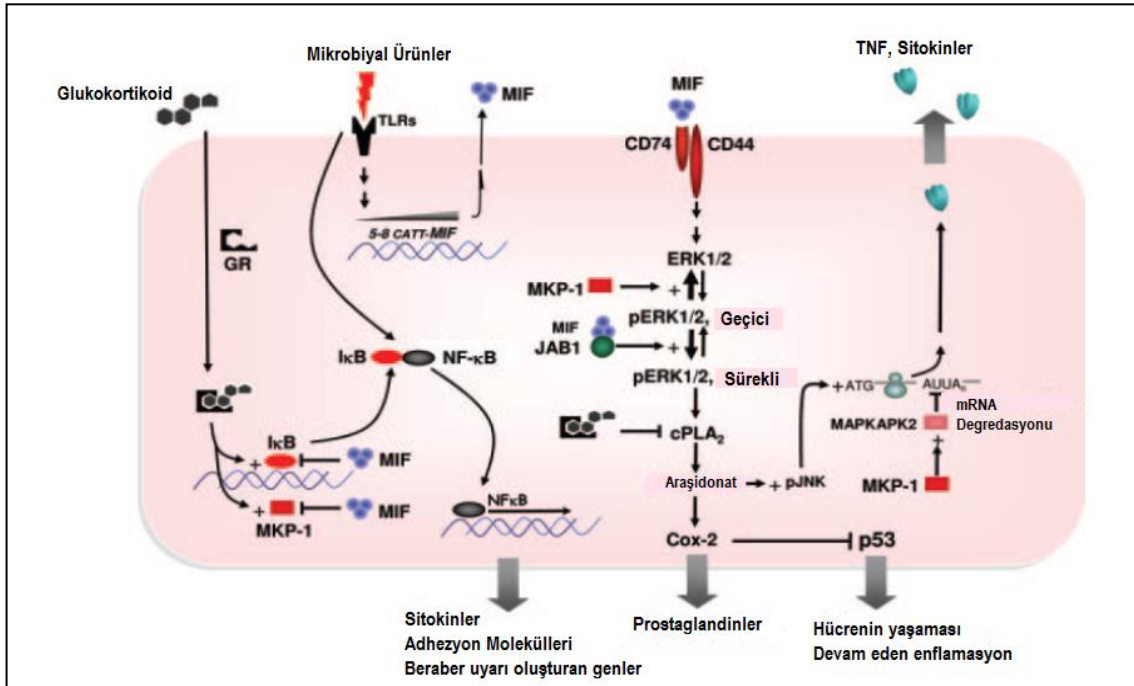
MİF proteininin N-terminal sinyal peptidi olmaması MİF'nün hücrelerden salınmasında esnasında salınım öncülü gerektirmeyen bir mekanizma ile gerçekleştiğinin düşünülmesine neden olmaktadır. N-terminal metiyoninin işlenmesi dışında MİF'in hiç bir post-translasyonel modifikasyonu tanımlanmamıştır. Her MİF monomerinin N-terminalinde bulunan prolin kalıntısı, bu proteinin tautomerizasyon aktivitesi için önemli bir işlev görmektedir. Tautomeraz aktivitesi MİF'in D-dopakrom veya L-dopakromu indol türevlerine katalize etmesini sağlamaktadır [235].

2.4.3 MİF'in İmmünolojik ve Enzimatik Aktivitesi

2.4.3.1 MİF: Glukokortikoid Antagonisti

Glukokortikoidler tüm memelilerde yaygın olarak bulunan streoid yapılı hormonlardır. Tüm dokulara kolayca ulaşabilmektedirler ve streoid yapılı olmalarından dolayı hücre membranını kolayca geçmektedirler. Hücre membranını geçen glukokortikoidler sitoplazmada ya da çekirdekte bulunan reseptörleri ile etkileşime geçerek hücrenin transkripsiyon düzeyinde cevap oluşturmalarını sağlamaktadırlar [236]. Fiziksel ve psikolojik stres koşulları altında, glukokortikoidlerin sentezi ve salınımı hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) eksenini tarafından kontrol edilmektedir. Glukokortikoidler adrenal bezlerin zona fasikülata kısmı tarafından salgılanmaktadır [237]. Fiziksel ve psikolojik stresörler, hipotalamus paraventriküler çekirdeğini (PVN), beyin sapı çekirdeğini ve amigdalayı uyarması ile CRH salınımını indüklemektedirler. CRH hipofiz sistemi boyunca

dolaşarak, ACTH salınımı sağlamaktadır. ACTH hormonu ise adrenal bezlerin zona fasikülatasını uyarak glukokortikoidlerin salınımını tetiklemektedir [238]. Glukokortikoidler, canlının immün sistemi üzerinde baskılayıcı etkileri olan hormonlardır. Glukokortikoidler, sitokinler, prostaglandinler, reaktif O ve N türleri dahil olmak üzere hücre aktivasyonunun inhibisyonunda ve pro-enflamatuvar maddelerin üretiminin azalmasında rol oynamaktadırlar. MİF, glukokortikoidler karşısında karşı düzenleyici bir etkisi olan bir maddedir [233].



Şekil 2. 19 Glukokortikoidlerin immün baskılayıcı etkilerinin düzenlenmesi (GR: Glukokortikoid reseptörü) [239]

Glukokortikoidler, enflamatuvar maddelerin üretimini baskılayarak MİF'in uyarılmasını ve hücrel havuzlardan salınmasını tetiklemektedir. MİF'nün salınması ile glukokortikoidler tarafından oluşturulan immün sistem üzerindeki baskılayıcı etki MİF tarafından tersine çevrililmektedir (Şekil 2. 19). MİF, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası seviyelerde glukokortikoidlerin etkilerine karşı çalışmaktadır [232]. Hipofiz bezinin uyarılması ile artan glukokortikoidlere karşı, hipofiz bezinden ACTH'nin salgılandığı bölgeden MİF salgılanması arttığı bulunmuştur. Hipofiz türevi MİF'nün

sistemik enflamatuvar yanıtları düzenlemek ve artan glukokortikoid salınımı ile baskılanan enflamatuvar maddelerin düzenlenmesini sağlamak amacıyla üretildiği düşünülmektedir. Düşük miktarda glukokortikoid salgılanması karşısında MİF üretimi artarken, glukokortikoid düzeyinin dolaşımda artması ile MİF salınımının gerçekleşmediği tespit edilmiştir [240]. Bunun canlıyı tehdit eden enflamatuvar reaksiyonlara karşı koruyucu bir mekanizma olduğu tahmin edilmektedir.

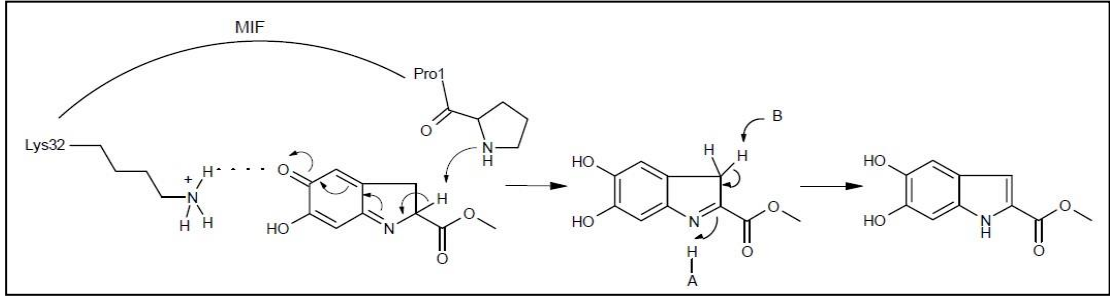
MİF, ERK1/2 MAPK ailesini sürekli bir şekilde uyarabilme özelliğine sahiptir. Uyarılmış ERK1/2, proenflamatuvar mekanizmaların önemli bir bileşeni olan sitozolik PLA2'yi (fosfolipaz A2) de içeren transkripsiyon faktörlerini fosforile etmektedir. Sitozolik PLA2'nin ürünü olan araşidonik asit, prostaglandin ve lökotrienlerin sentezlenmesinde öncüdür. Araşidonik asit, TNF α ve diğer sitokinlerin anlatımında mRNA'nın etkin bir şekilde translasyonunu sağlayan JNK'yi aktive etmektedir. Sitozolik PLA2, glukokortikoidler tarafından indüklenen ve PLA2 ile fiziksel olarak etkileşen anneksin-1 yoluyla ile baskılanmaktadır. MİF, glukokortikoidlerin immünospresif etkileri varlığında sitozolik PLA2'yi aktive etmektedir ve böylece glukokortikoid aracılı baskılanmayı geçersiz kıldığı bir mekanizma oluşmaktadır. Ayrıca glukokortikoidler immunosupresif etkilerini başka bir mekanizma üzerinden de yürütmektedirler. NF κ B'nin inhibisyonunu sağlamaktadırlar. NF κ B normal şartlar altında sitoplazmada I κ B α ile kompleks oluşturarak inaktif formda bulunmaktadır. Enflamasyon durumunda sinyal yolları aracılığı ile I κ B α degradasyona uğrar ve NF κ B kompleksten ayrılarak çekirdeğe gitmektedir. Sitokinler, adezyon molekülleri gibi çok sayıda genin transkribe olmasını sağlamaktadır. Ancak artan glukokortikoid seviyesi sitoplazmada I κ B α miktarının artmasını sağlamaktadır ve böylece NF κ B-I κ B α kompleksinin miktarında artış meydana gelmektedir. Bu durumda NF κ B'nin sitoplazmada inaktif formda kalması sağlanmaktadır. MİF ise ters düzenleyici etkisi ile I κ B α anlatımının artmasını önlemektedir. Böylece glukokortikoid aracılı NF κ B inhibisyonunu önlemiş olmaktadır. Bütün bunlara ek olarak, glukokortikoidler MKP-1'in anlatımını arttırarak ERK1/2, JNK ve p38 yollarını inhibe etmektedir. Bunun sonucunda proenflamatuvar üretimi baskılanmaktadır. MKP-1, p38, JNK ve ERK1/2 üzerinde bulunan serin ve treonin

rezidülerinin defosforilasyonunu sağlayarak, bu yolakların inhibe olmasına neden olmaktadır. MİF ise bu durumda MKP-1 anlatımının inhibisyonunu sağlayarak antagonistik bir etki sağlamaktadır [239]. MİF'in antagonistik etkileri karşısında yapışma molekülleri, TNF ve NO gibi proenflamatuvar sitokinlerin ve maddelerin üretimi artmaktadır. Ayrıca MİF T hücrelerinin aktivasyonunu ve proliferasyonunu uyarmakta ve IL-2 üretimini arttırmaktadır (Şekil 2. 19) [241].

2.4.3.2 MİF'in Enzim Aktiviteleri

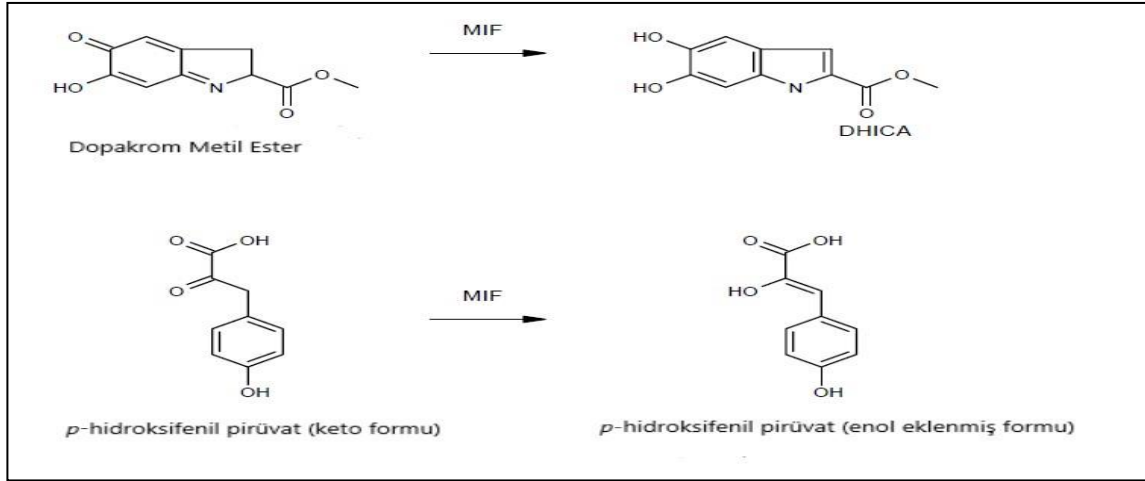
MİF proteini çok çeşitli görevleri olan bir proteindir. Bunlardan birisi de enzim aktivitesi görevidir. Bu proteinin iki farklı enzim aktivitesi bulunmaktadır. Bunlardan birisi tiyol oksidoredüktaz diğer ise tautomeraz aktivitesidir (Şekil 2. 20) [231]. MİF'in biyolojik aktivitesini bu enzim aktiviteleri ile gösterdiği düşünülmektedir.

1993 yılında MİF'in D-dopakromu (2-karboksi-2,3-dihidroindol-5,6-kinon) tautomerize ettiği bulunmuştur. Tautomerizasyon, bileşiğin karbon iskeletinde değişiklik meydana gelmeden sadece bir atomun, genelde hidrojen, konumunda değişimin meydana gelmesidir. Dopakromun tautomerizasyonu sonucu DHICA (5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit) meydana gelmektedir. Ayrıca fenilpirüvat substratlarının tautomerizasyonunu katalize ettiği tespit edilmiştir [242]. MİF proteini tautomeraz aktivitesini N-terminal bölgesinde yer alan prolin ile sağlamaktadır [243]. Bu prolin amino asidi hidrofobik aktif bölge içerisinde yer almaktadır. Bu prolin rezidüsü nükleofilik bir karaktere sahiptir. Ayrıca D-dopakrom dışında L-dopakrom, fenilpirüvat ve *p*-hidroksifenilpirüvat içeren substratların tautomerizasyonunu katalize etmektedir (Şekil 2. 21)[234]. Yapılan bazı çalışmalarda MİF'in dopaminkrom ve nörepinefrinkromu dihidroksiindol ürünlerine dönüştürdüğü tespit edilmiştir. Bu ürünler nöromelanin öncülüdürler ve nöromelaninin nörokoruyucu fonksiyonları bulunmaktadır [242].



Şekil 2. 20 MİF'in tautomerizasyon aktivitesi için önerilen mekanizma. Katalitik baz, Pro1, bir proton atomunu soyutlarken, Lys32 aktif alanın hidrofobik cebinde L-dopachrome metil esterini protonlamaktadır. Protonun su ile karıştırılmasından sonra Pro1 olabilen ikinci bir baz, ürünü oluşturmak için ara maddeden bir ikinci protonu uzaklaştırır (Lys:Lizin) [244]

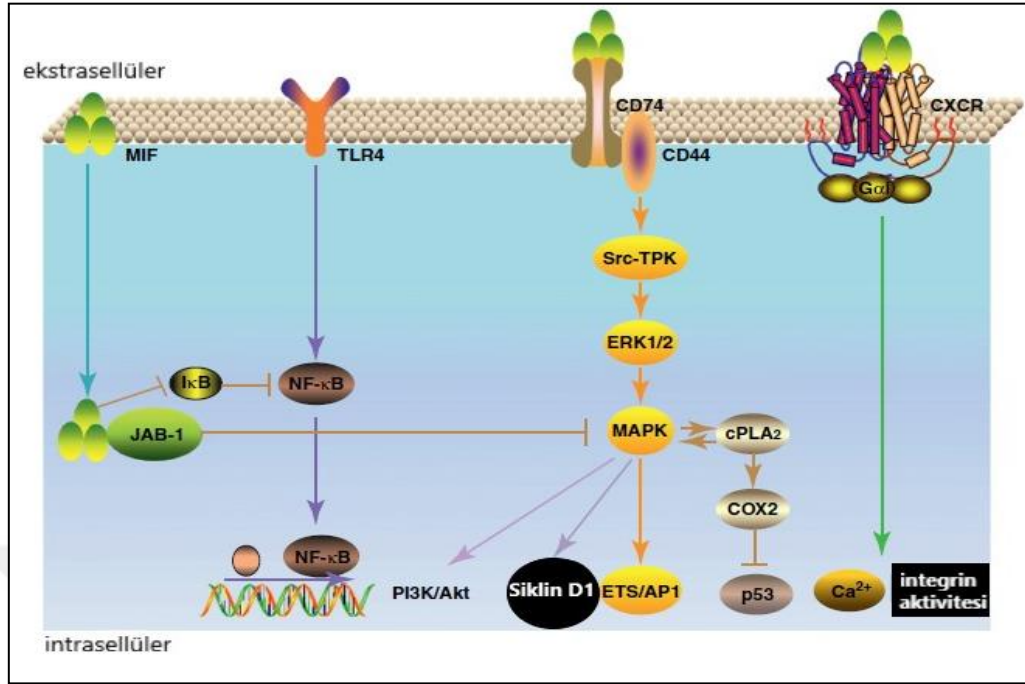
Diğer bir enzim aktivitesi tiyol oksidoredüktaz ise MİF'nün hücrelerde redoks tepkimelerini gerçekleştirmesinde önemli bir role sahiptir. Tiyol oksidoredüktazlar, substratların yükseltgenmesi veya indirgenmesi için katalitik sistein kullanarak, redoks tepkimelerinin kontrolünde kullanılan proteinlerdir. Bu aktivite proteinde bulunan CXXC motifi ile sağlanmaktadır. CXXC (sistein-X-X-sistein) motifi tiyoredoksin, glutaredoksin, tiyoredoksin redüktaz, glutaredoksin redüktaz ve dihidrolipoamid dehidrogenazda da görülmektedir. Bu enzimlerin hücresel redoks süreçlerinde önemli işlevleri bulunmaktadır. MİF de bu özelliği sayesinde insülin ve 2-hidroksietildisülfid bileşiklerinin indirgenmesini katalize etmektedir [243]. Tiyol oksidoredüktaz aktivitesi hücresel redoks dengesinin düzenlenmesinde, redoks stresine karşı savunmada, apoptozun inhibisyonunda, monosit/makrofajın aktivasyonunda ve MİF bağlayıcı proteinlerin aktivitesinin düzenlenmesinde etki etmektedir [233].



Şekil 2. 21 MİF substratlarına örnek [244]

2.4.3.3 MİF'in Sinyal Yolakları

Sitokinler, hedef hücreler tarafından ekspres edilen aynı kökenden gelen membran üzerinde bulunan reseptörlere bağlanarak çalışmaktadırlar. Sitokinler, reseptörler aracılığıyla sinyal yolaklarını ve gen transkripsiyonunu aktif hale getirmektedirler. MİF proteini hücredeki sinyal yolaklarını doğrudan ya da dolaylı yollar üzerinden etkilemektedir. Böylece metabolizmadaki pro-enflamatuvar maddelerin miktarını değiştirmektedir. Glukokortikoidlerin etkilerini tersine çevirir ya da immünolojik yanıtın oluşmasını sağlayarak hücreleri stres koşullarının zararlı etkilerinden korumaktadır.



Şekil 2. 22 MİF'in sinyal iletim yolları [233]

MİF, hücre içerisindeki sinyal yollarını ekstrasellüler ya da intraseellüler olarak aktif hale getirmektedir. MİF'in ekstrasellüler olarak etki edebilmesi için öncelikle hücre membranı üzerinde bulunan reseptörlerine bağlanması gerekmektedir. MHC sınıf II değişmez zincirinin hücre yüzeyinde bulunan kısmı olan CD74 MİF'in reseptörüdür. Daha sonra hücre içerisinde bir sinyalleşme kaskadı oluşturmak için CD74 proteini sitoplazmada bulunan CD44 proteini ile bir kompleks oluşturmaktadır. Ayrıca MİF proteininin CD74 reseptörünün bulunduğu komplekslerde CXCR2/CXCR4 kemokin reseptörleri ile de etkileşime geçtiği gözlenmiştir [245]. CD44 proteini ise sitoplazmada Src tirozin kinazları aktive etmektedir. Daha sonra ERK1/2'nin fosforilasyona uğraması ile MAPK'lar aktif hale gelmektedirler. Aktifleşen ERK1/2 sitoplazmik PLA2'nin fosforlanmasına neden olmaktadır. Sitoplazmik PLA2'nin ürünü olan araşidonik asidin miktarında artış meydana gelmesi ile prostaglandin ve lökotrienlerin miktarında artış meydana gelmektedir. Araşidonik asit prostaglandin ve lökotrienlerin üretimi için öncül bir maddedir. Araşidonik asidin artması ayrıca JNK'nin aktifleşmesini sağlamaktadır.

Aktifleşen JNK ise diğer sitokinlerin ve $TNF\alpha$ 'nın üretimi için mRNA translasyonunu uyarmaktadır. Bütün bunlara ek olarak MİF, NO tarafından uyarılan p53 aracılığıyla gerçekleşen apoptozu engellemek için, p53'ün hücre içi birikimini bastırmaktadır. p53'ü engellemek için MİF ERK1/ERK2, sitoplazmik PLA2, COX2 (Cyclooxygenase 2) ve prostaglandin E2'nin seri olarak aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır [233]. Bununla birlikte MİF doğrudan p53'ün anlatımını da düzenleyebilen bir sitokindir. Bu etkisi ile MİF antiapoptotik bir etki göstermektedir [246]. Bu sinyal yolağının aktifleşmesi sonucunda inflamasyon ve proliferasyonda görevli olan önemli genlerin anlatımının artışı meydana gelmektedir (Şekil 2. 22).

MİF'in CD74/CD44 kompleksine bağlanması hücrenin S fazına girmesine neden olmaktadır ve siklin E seviyelerinin yükselmesini sağlamaktadır. Bu da hücrenin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını etkilemektedir. Ayrıca hayatta kalmayı etkileyen genler olan Bcl-XL ve Bcl-2 anlatımının da artışına yol açan mekanizmaları tetiklemektedir. MİF'in CD74'e bağlanması ile CD74'ün sitozolik hücre içi alanını (CD74-ICD) serbest bırakmaktadır. CD74-ICD ise kromatin ile bağlanarak hücre sağkalımını etkilemektedir [230]. MİF'in Akt yolağını harekete geçirmesi ile de BAD (Bcl-2-associated death promoter) ve BAX (Bcl-2-associated X) proteinlerinin fosforilasyonu meydana gelmektedir. Bunun sonucunda hücreler apoptozise dirençli olmak için mesaj almaktadırlar [235].

Ekstraselüler olarak MİF miktarının artması ile MİF proteini hücre içerisine alınmaktadır. Sitoplazmaya geçen MİF proteini intrasellüler olarak etkisini göstermektedir. Sitoplazmada yer alan MİF, JAB1 proteini ile etkileşime geçmektedir. JAB1 normal koşullar altında JUN proteinlerinin fosforilasyonunu sağlamak için JNK'ları aktive etmektedir. Böylece bir transkripsiyon faktörü olan AP-1 aktifleştiricisi olarak işlev görmektedir. AP-1 proteini hücre büyümesi, transformasyon ve hücre ölümü ile ilgili bir proteindir. MİF/JAB1 kompleksi, JAB1'in JNK ve AP-1 üzerindeki olumlu düzenleyici etkilerinin inhibe olmasına neden olmaktadır. Ek olarak, JAB1 hücre döngüsü inhibitörü KIP1'in (Kinesin-like protein-1) degradesyonunda da görevlidir ve enflamasyon ve hücre büyümesini düzenlemektedir. JAB1 yolağının inhibisyonu ile

immünolojik sistemde görevli hücrelerin aktivasyonu indüklenmektedir (Şekil 2. 22) [232], [241].

2.4.4 MİF ve ALS Hastalığı İlişkisi

Beynimizde sinir hücreleri dışında da hücreler yer almaktadır. Bu hücreler glial kökenli hücreler olan astrositler, mikroglialar, oligodendrositler, ependim hücrelerdir ve bu hücreler sinir sisteminin bakımından ve korunmasından sorumludurlar. Eğer beyinde stres ve enflamasyon gibi durumlar meydana gelirse immün sistem elemanı olan astrositler ve mikroglialar aktif hale gelmektedirler. Stres koşulları altında vücudumuzda glukokortikoid salgılanması artmaktadır. Glukokortikoidler enflamasyon maddelerinin üretimini baskımlarken MİF üretimini ise indüklemektedirler. MİF, merkezi sinir sisteminde bir nöromodülatör göreve sahiptir. Yapısal olarak hipofiz bezinin anterior lobu tarafından stres ve enflamatuvar uyarıların varlığında ifade edilmektedir [230]. Merkezi sinir sisteminde MİF'in kaynağı glial hücrelerdir. Genel olarak beyindeki MİF ifadesi diğer proinflatuvar sitokinlerden çok daha büyük bir etkiye sahip gibi gözükmektedir. Yapılan çalışmalarda intraserebroventriküler LPS (lipopolisakkarit) uygulamasından sonra MİF'in ifadesinin diğer proinflatuvar sitokinler olan IL-1, IL-6 ve TNF- α 'nın artışı ile birlikte artmakta olduğı görölmüştür. MİF ayrıca periferik sinirlerde de ifade edilir ve sinirlerin rejenerasyonunda rol oynayabileceğı düşünölmektedir. Sinir sistemi adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu yoluyla bağışıklık tepkilerini modöle edebilen katekolamin nörotransmitterlerini üretmektedir. MİF, katekolamin ürünleri için detoksifikasyon yolağına dahil olmaktadır. MİF, nörotransmitter katekolaminler, 3,4-hidroksifenilamin ve nörepinefrinin toksik kinon ürünleri olan 3,4-dihidroksifenilaminkrom ve nörepinefrinkromu, nöromelanine öncölük edebilecek indoldihidroksi türevlerine dönüştürebilmektedir. Bu sayede MİF'in sinir sisteminde koruyucu bir role sahip olduğı düşünölmektedir [247].

ALS hastalığında ROS üretimi yüksek miktarda meydana gelmektedir. ROS'nin MİF'in ifadesini düzenlediğı tespit edilmiştir. Ayrıca H₂O₂ miktarının azalması ile de MİF seviyesinde azalma olduğı bildirilmiştir [230].

Israelson ve ark. ALS'li transgenik fareler ile yaptıkları bir çalışmada MİF'in yanlış katlanmış SOD1 varlığındaki etkisini araştırmışlardır. Yanlış katlanmış olan SOD1 mitokondri ve ER zarları üzerinde birikim göstermektedir. Fakat çalışmada MİF'nün, yanlış katlanmış SOD1'in hücre içi membranlarda birikimini engellediği görülmüştür. Motor nöron hücrelerinin gövdesinde MİF düzeyi düşüktür ve artan MİF seviyesi kültüre edilmiş motor nöronların yaşam süresini uzatmış olduğu bildirilmiştir. *İn vivo* olarak endojen MİF ifadesi tamamen ortadan kaldırıldığında, hastalığın hızlandığı ve SOD1 mutant farelerin ömrünün kısaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu farelerde çözünmez SOD1 agregatlarının seviyesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ek olarak, MİF düzeylerinin düşürülmesi de hastalığın hızlı bir şekilde ilerlemesine ve yanlış katlanmış SOD1 seviyesinin artmasına yol açmakta olduğu tespit edilmiştir. Yanlış katlanmış SOD1'in hücreden hücreye yayılması ile hastalığın geliştiği ve MİF'in ise bu yayılmayı sınırladığı düşünülmektedir. Bu etkiyi ise MİF'in şaperon benzeri bir aktivite ile gerçekleştirdiği önerilmektedir [14].

Israelson ve ark. gerçekleştirdiği başka bir çalışmada ise tiyol-oksidoredüktaz aktivitesi bulunmayan mutant MİF proteini kullanılmıştır. Sonuçta mutant SOD1'in yanlış katlanması ve hücre içi membranlarla birleşmesini engellenmesi MİF'in enzim aktivitesi ile değil şaperon benzeri aktivitesi ile olduğu gösterilmiştir [21].

Shvil ve ark. yaptıkları son çalışmada MİF'in yanlış katlanmış SOD1 ile direkt olarak etkileşime girerek düzenli olan agregatları düzensiz bir hale getirerek yanlış katlanmış SOD1'in toksisitesini bastırdığı görülmüştür. Ayrıca çalışmada MİF^{N110C} (110. pozisyondaki asparaginin 80. Konumdaki sistein ile disülfid bağı yapması) mutantı kullanılmıştır. Bu mutant MİF proteini katalitik aktivite ve CD74'e bağlanma bölgesini korumaktadır ancak CD74'e bağlandığında sinyal oluşumuna neden olmamaktadır. Bu mutant MİF proteininin yabanıl tip MİF'e göre yanlış katlanmış SOD1'e karşı affinitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Böylece mutant MİF proteini yanlış katlanmış SOD1 agregatlarının oluşumunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir [248].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Genel Labortuvar Malzemeleri

Çizelge 3. 1 Laboratuvar genel malzemeleri

Sarf Malzeme	Üretici Firma
10, 50, 100, 1000 µl'lik mikropipetler	Ependorf
300 µl'lik çok kanallı pipetler	Ependorf
1000 cc'lik şişe	Simax
1000 µl'lik pipet ucu	İzolab
10-200 µl'lik pipet ucu	İzolab
0,1-10 µl'lik pipet ucu	İzolab
Nitril Eldiven	Broche
Santrifüj Tüpü 1,5 mL	İzolab
Santrifüj Tüpü 2 mL	İzolab

Çizelge 3. 2 Laboratuvar genel malzemeleri (devamı)

50 mL Falkon	İzolab
Tüp standı	İzolab
Kurutma Kağıdı	İzolab
1000 mL'lik Mezür	İzolab

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Çizelge 3. 3 Laboratuvarda kullanılan cihazlar

Ekipman	Üretici Firma
+4 °C Dolap	Arçelik
ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrofotometre)	Biotek
Hassas Terazı	Shimadzu
Mini Masaüstü Santrifüj	Genova
Masaüstü Santrifüj	Hettich
Otoklav	Hirayama
-80 °C Derin Dondurucu Dolap	Thermo
Vorteks	Velp
İnkübatör	Biosan
Bilgisayar	IBM
Distile Su Cihazı	Sartorius

3.1.3 pNF-H ELISA Kiti

Çizelge 3. 4 pNF-H ELISA kiti içerisinde bulunan malzemeler

Malzemeler	Adet	Üretici Firma
Antijen Kaplı ELISA 96 Kuyucuklu Plak	1	SHANGHAI YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Standart Solüsyon (240 ng/mL)	0.5 mLx1	SHANGHAI YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Streptavidin-HRP	6 mLx1	SHANGHAI YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Durdurma Solüsyonu	6 mLx1	SHANGHAI YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Kromojenik Ayıraç A	6 mLx1	SHANGHAI YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Kromojenik Ayıraç B	6 mLx1	SHANGHAI YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Biyotinli Anti pNF-H Antikoru	1 mLx1	SHANGHAI YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Standart Dilüsyon	3 mLx1	SHANGHAI YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Yıkama Solüsyonu (30x)	20 mLx1	SHANGHAI YEHUA Biological Technology Co., Ltd.

3.1.4 MiF ELISA Kiti

Çizelge 3. 5 MiF ELISA kiti içerisinde bulunan malzemeler

Malzemeler	Adet	Üretici Firma
Antijen Kaplı ELISA 96 Kuyucuklu Plak	1	Shanghai YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Standart Solüsyon (48 ng/mL)	0.5 mLx1	Shanghai YEHUA Biological Technology Co., Ltd.

Çizelge 3. 6 MİF ELISA kiti içerisinde bulunan malzemeler (devamı)

Streptavidin-HRP	6 mLx1	Shanghai YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Durdurma Solüsyonu	6 mLx1	Shanghai YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Kromojenik Ayıraç A	6 mLx1	Shanghai YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Kromojenik Ayıraç B	6 mLx1	Shanghai YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Biyotinli Anti MIF Antikoru	1 mLx1	Shanghai YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Standart Dilüsyon	3 mLx1	Shanghai YEHUA Biological Technology Co., Ltd.
Yıkama Solüsyonu (30x)	20 mLx1	Shanghai YEHUA Biological Technology Co., Ltd.

3.1.5 Kullanılan Bilgisayar Programları

Çizelge 3. 7 Ölçüm ve hesaplamalarda kullanılan yazılımsal gereçler

Program	Üretici Firma
Excel Çalışma Sayfası	Microsoft Co.
Gen 5 1.08	Biotek
SPSS 23.0	IBM

3.1.6 Etik Kurul

Bu çalışma için İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 689 sayılı kararına göre etik kurul onayı verildi. Hasta grubu için onam formları hazırlandı.

3.1.7 Hasta Grubu

Bu çalışmadaki bütün hastaların teşhis ve tedavisi El Escorial kriterlerine göre İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Baş Ağrısı Polikliniği'ndeki nörologlar tarafından yapıldı. Bu polikliniğe başvuran hastalardan iki adet EDTA bulunan tüpe 10'ar cc tam kan alındı. Hastalara ayrıntılı bilgi verildikten sonra onam formları imzalatıldı (Çizelge 3. 6), (Çizelge 3. 7).

Çizelge 3. 8 pNF-H ALS Grubu Demografik Bilgileri

	N
ALS	76
KADIN	38
ERKEK	38
<30	7
30-39	8
40-49	11
50-59	19
>60	29
EKSİK	2
UMN	31
LMN	14
BULBAR	3
UMN-BULBAR	8
LMN-BULBAR	2
UMN-LMN	15
UMN-LMN-BULBAR	3

Çizelge 3. 9 pNF-H ALS Grubu Demografik Bilgileri (devamı)

YAVAŞ	46
HIZLI	18
DURAĞAN	12

Çizelge 3. 10 MİF Deney Grubu Demografik Bilgileri

	N
ALS	70
KADIN	34
ERKEK	36
<30	6
30-39	6
40-49	10
50-59	20
>60	28
EKSİK	--
UMN	37
LMN	11
BULBAR	4
UMN-BULBAR	8
LMN-BULBAR	3
UMN-LMN	6
UMN-LMN-BULBAR	1

Çizelge 3. 11 MİF Deney Grubu Demografik Bilgileri (devamı)

YAVAŞ	47
HIZLI	15
DURAĞAN	8

3.1.8 Nörolojik Hasta Grubu

Nörolojik hasta grubu İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Baş Ağrısı Polikliniği'ne başvuran hastalardan seçildi. Nörolojik kontrol grubu içerisinde demans, Parkinson ve MS hastaları bulunmaktadır. Bu hastalardan iki adet EDTA bulunan tüpe 10'ar cc tam kan alındı. Hastalara ayrıntılı bilgi verildikten sonra onam formları imzalatıldı (Çizelge 3. 8), (Çizelge 3. 9).

Çizelge 3. 12 pNF-H Nörolojik Kontrol Grubu Demografik Bilgileri

	PARKİNSON	MULTİPLE SKLEROZ	DEMANS	DİĞER
NÖROLOJİK KONTROL	14	8	2	4
KADIN	5	7	1	3
ERKEK	9	1	1	1
<30	--	2	--	---
30-39	1	3	--	--
40-49	1	2	--	--
50-59	4	--	1	1
>60	6	--	1	3
EKSİK	2	1	--	--

Çizelge 3. 13 MİF Nörolojik Kontrol Grubu Demografik Bilgileri

	PARKINSON	MULTİPLE SKLEROZ	DEMANS	DİĞER
NÖROLOJİK KONTROL	20	12	2	4
KADIN	5	7	1	2
ERKEK	15	5	1	2
<30	--	6	--	1
30-39	--	4	--	--
40-49	6	1	--	1
50-59	6	1	1	1
>60	8	--	1	1

3.1.9 Kontrol Grubu

Ailesinde ALS hastası bulunan ve bulunmayan gönüllü kişilerden iki adet EDTA'lı tüpe 10'ar cc tam kan alındı. Kişilere ayrıntılı bilgi verilerek onam formları imzalatıldı (Çizelge 3. 10), (Çizelge 3. 11).

Çizelge 3. 14 pNF-H Kontrol Grubu Demografik Bilgileri

	N
KONTROL	16
KADIN	4
ERKEK	12
<30	2
30-39	4

Çizelge 3. 15 pNF-H Kontrol Grubu Demografik Bilgileri (devamı)

40-49	5
50-59	3
>60	1
EKSİK	1

Çizelge 3. 16 MİF Kontrol Grubu Demografik Bilgileri

	N
KONTROL	23
KADIN	8
ERKEK	15
<30	6
30-39	5
40-49	8
50-59	3
>60	1

3.2 Metod

3.2.1 Kanlardan Plazma Eldesi

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilimdalı'nda iki adet EDTA'lı tüpe alınan 10'ar cc'lik kanlar öncelikli olarak buz içerisinde Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvar'larına getirildi. Gelen tüpler 1200 xg'de 23 °C'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sırasında plazma için gerekli 1,5 mL'lik tüpler hazırlandı. Gelen her hastanın plazması için bir numara verilerek deftere kayıt edildi. Hastalara verilen numaralara göre 1,5 mL'lik hasta tüplerinede aynı

numaralar yazıldı. Santrifüj bittikten sonra iki ayrı tüpte bulunan plazma 15 mL'lik falkon tüpte birleştirildi. Her hastanın plazması, kendi numarası bulunan santrifüj tüpüne gelecek şekilde 250 µL olarak bölüştürüldü. Bütün hasta plazmaları santrifüj tüplerine bölüştürüldükten sonra -80 °C'lik derin dondurucu dolaba protein analizi yapılana kadar saklanmak üzere yerleştirildi.

3.2.2 pNF-H ELISA Kitinin Uygulanması

Önceden gelen pNF-H ELISA kiti +4 °C'de saklandı. Deneyden yarım saat öncesinde dolaptan çıkarıldı. Protein analizi yapılacak kanlar, deneyin yapılacağı sabah -80 °C derin dondurucu buzdolabından çıkarıldı. Her katılımcı için bir santrifüj tüpü plazma çıkarıldı. İlk olarak kit içerisinde bulunan standart dilüsyon kullanılarak Çizelge 3. 12'de görülen standart çözeltiler oluşturuldu.

Çizelge 3. 17 pNF-H standart çözeltilerin hazırlanması

Tüp Numaraları	Konsantrasyonlar	Hazırlama
Standart no: 5	120 ng/mL	120 µl orijinal standart + 120 µl standart dilüsyon
Standart no: 4	60 ng/mL	120 µl standart no: 5 + 120 µl standart dilüsyon
Standart no: 3	30 ng/mL	120 µl standart no: 4 + 120 µl standart dilüsyon
Standart no: 2	15 ng/mL	120 µl standart no: 3 + 120 µl standart dilüsyon
Standart no: 1	7,5 ng/mL	120 µl standart no: 2 + 120 µl standart dilüsyon

Her standart protein çözeltisi 96'lık plakaya Çizelge 3. 13 de gösterildiği şekilde iki kuyucuk olacak şekilde eklendi. İki adet kuyucuk kör kuyucuk olarak bırakıldı. Kalan 84 kuyucuğa ise her katılımcının plazmasından üç tekrar olacak şekilde örnek eklendi.

Çizelge 3. 18 pNF-H 96 kuyucuklu plak

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST. 5	ST. 5										
B	ST. 4	ST. 4										
C	ST. 3	ST. 3										
D	ST. 2	ST. 2										
E	ST. 1	ST. 1										
F	KÖR	KÖR										
G												
H												

Standart solüsyondan kuyucuklara 50 µl eklendi. Kör kuyucuklara örnek eklenmedi. Katılımcıların plazmalarından her kuyucuğa 40 µl eklendi. Örneklerde eklendikten sonra kör kuyucuklar ve standart solüsyon içeren kuyucuklar dışında örnek içeren kuyucuklara 10 µl biyotinli anti pNF-H antikoru koyuldu. Kör kuyucuklar hariç örnek ve standart solüsyon içeren kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Daha sonra kuyucukların üzeri şeffaf bir membran ile kapatılarak yavaşça çalkalandı ve 37 °C’de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sırasında kit içerisinde bulunan 20 mL’lik 30X konsantrasyonluk yıkama solüsyonundan X konsantrasyonunda yıkama solüsyonu hazırlandı. 20 mL’lik solüsyon üzerine 580 mL distile su eklenerek toplamda 600 mL’lik X konsantrasyonda bir yıkama solüsyonu elde edildi. 60 dakikalık inkübasyon sonucunda 96 kuyucuklu plak üzerinde bulunan şeffaf membran çıkarıldı. Plak ters çevrilerek kuyucuklar içerisinde bulunan sıvılar döküldü. Hazırlanan X konsantrasyonlu yıkama solüsyonu ile her kuyucuğa 300 µL solüsyon koyuldu. Solüsyon kuyucuklarda 30 saniye bekletildi ve bu sırada hafifçe çalkalandı. Daha sonra yıkama solüsyonu

dökülerek tekrar yıkama solüsyonu koyuldu. Bu işlem beş kez tekrarlandı. Yıkama işlem bittikten sonra her kuyucuğa 50 µL kromojen A eklendi. Daha sonrada her kuyucuğa 50 µL kromojen B eklendi. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri şeffaf membran ile kapatıldı. Renk oluşumu için üzeri ışığı geçirmeyen bir membran ile tekrar kapatıldıktan sonra 10 dakika boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolduktan sonra her bir kuyucuğa reaksiyonu durdurmak için durdurma solüsyonu eklendi. Reaksiyon durdurulduktan sonra 10 dakika içerisinde laboratuvarında bulunan ELISA Reader cihazı kullanılarak kuyucukların 450 nm dalgaboyunda OD değerleri elde edildi. Plagın okunması sırasında bilgisayarda bulunan Gen programı kullanıldı. Gen programında elde edilen sonuçlar Microsoft Excel dosyasına aktarıldıktan sonra ng/mL cinsinden sonuçlara ulaşmak için gerekli olan hesaplamalar yapıldı.

3.2.3 MiF ELISA Kitinin Uygulanması

MIF ELISA kiti +4 °C’de saklandı. Deneyden yarım saat önce dolaptan çıkarıldı. Protein analizi yapılacak kanlardan, her katılımcı için bir santrifüj tüpü plazma -80 °C derin dondurucu buzdolabından deneyin yapılacağı günün sabahında çıkarıldı. Kit içerisinde bulunan standart dilüsyon ile Çizelge 3. 14 de görülen standart çözeltiler oluşturuldu.

Çizelge 3. 19 MIF standart çözeltilerin hazırlanması

Tüp Numaraları	Konsantrasyonlar	Hazırlama
Standart no: 5	24 ng/mL	120 µl orijinal standart + 120 µl standart dilüsyon
Standart no: 4	12 ng/mL	120 µl standart no: 5 + 120 µl standart dilüsyon
Standart no: 3	6 ng/mL	120 µl standart no: 4 + 120 µl standart dilüsyon
Standart no: 2	3 ng/mL	120 µl standart no: 3 + 120 µl standart dilüsyon
Standart no: 1	1,5 ng/mL	120 µl standart no: 2 + 120 µl standart dilüsyon

Her standart protein çözeltisi 96'lık plakaya Çizelge 3. 15 de gösterildiği şekilde iki tekrarlı olacak şekilde eklendi. İki adet kuyucuk kör kuyucuk olarak bırakıldı. Kalan 84 kuyucuğa ise her katılımcının plazmasından üç tekrar olacak şekilde örnek eklendi.

Çizelge 3. 20 MİF 96 kuyucuklu plak

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST. 5	ST. 5										
B	ST. 4	ST. 4										
C	ST. 3	ST. 3										
D	ST. 2	ST. 2										
E	ST. 1	ST. 1										
F	KÖR	KÖR										
G												
H												

Standart solüsyondan ise kuyucuklara 50 µl eklendi. Kör kuyucuklara plazma örneği eklenmedi. Katılımcıların plazmalarından her kuyucuğa 40 µl eklendi. Örnekler eklendikten sonra kör ve standart solüsyon kuyucukları dışında örnek bulunan kuyucuklara 10 µl biyotinli anti MIF antikoru eklendi. Kör kuyucuklar hariç örnek ve standart solüsyon bulunan kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Daha sonra kuyucukların üzeri şeffaf bir membran ile kapatılarak yavaşça çalkalandı ve 37 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon esnasında kit içerisinde bulunan 20 mL'lik 30X konsantrasyonluk yıkama solüsyonundan X konsantrasyonunda yıkama solüsyonu hazırlandı. 20 mL'lik solüsyon üzerine 580 mL distile su eklenerek toplamda 600 mL'lik

X konsantrasyonda bir yıkama solüsyonu elde edildi. 60 dakikalık inkübasyon sonucunda 96 kuyucuklu plak üzerinde bulunan şeffaf membran çıkarıldı. Plak ters çevrilerek kuyucuklar içerisinde bulunan sıvılar döküldü. Hazırlanan X konsantrasyonlu yıkama solüsyonu ile her kuyucuğa 300 µL solüsyon eklendi. solüsyon kuyucuklarda 30 saniye bekletildi ve bu sırada hafifçe çalkalandı. Daha sonra yıkama solüsyonu dökülerek tekrar yıkama solüsyonu koyuldu. Bu işlem beş kez tekrarlandı. Yıkama işlem bittikten sonra her kuyucuğa 50 µL kromojen A eklendi. Daha sonrada her kuyucuğa 50 µL kromojen B eklendi. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri şeffaf membran ile kapatıldı. Renk oluşumu için üzeri ışığı geçirmeyen bir membran ile tekrar kapatıldıktan sonra 10 dakika boyunca 37 oC'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolduktan sonra her bir kuyucuğa reaksiyonu durdurmak için durdurma solüsyonu eklendi. Reaksiyon durdurulduktan sonra 10 dakika içerisinde laboratuvarında bulunan ELISA Reader cihazı kullanılarak kuyucukların 450 nm dalgaboyunda OD değerleri elde edildi. Plagın okunması sırasında bilgisayarda bulunan Gen programı kullanıldı. Gen programında elde edilen sonuçlar Microsoft Excel dosyasına aktarıldıktan sonra ng/mL cinsinden sonuçlara ulaşmak için gerekli olan hesaplamalar yapıldı.

3.2.4 İstatistiksel Hesaplamalar

İstatistiksel analizler için SPSS 23.0 programı kullanıldı. pNF-H ve MİF seviyelerinin karşılaştırılması ALS, sağlıklı kontrol ve nörolojik kontrol grupları arasında gerçekleştirildi. ALS hastaları, hastalığın başlangıç yerine göre UMN, LMN, BULBAR, UMN-LMN, UMN-BULBAR, LMN-BULBAR ve UMN-LMN-BULBAR olarak yedi gruba ayrıldı. Ayrıca ALS hastalığının gelişimine göre yavaş, hızlı ve durağan olarak üç alt gruba ayırım yapıldı. pNF-H verilerinin normal dağılım ile uyumlu olmamasından dolayı gruplar arasında fark olup olmadığını değerlendirmek için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Kruskal-Wallis testi sonucu hangi gruplar arasında fark olduğu Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. Karekök dönüşümü yapılan MİF verilerinin normal dağılıma uyum göstermiştir. Verilerin normal dağılımı sonucu ikili karşılaştırmalar için t testi, çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü ANOVA uygulandı. ANOVA sonucunda gruplar arasında anlamlı fark olması halinde farkın kaynağını tespit

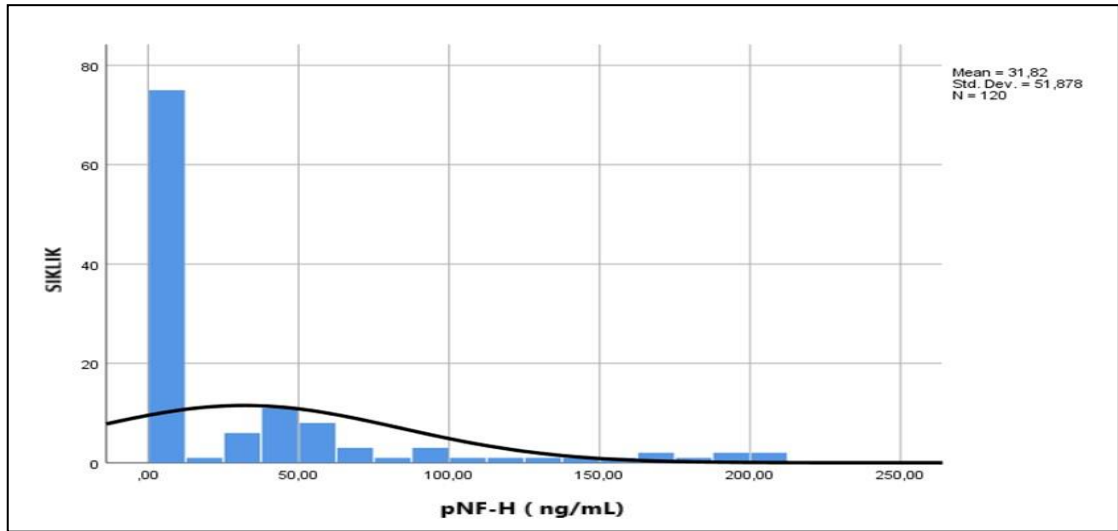
etmek için POST HOC testlerine başvuruldu. Grup varyanslarının homojenliği Levene testi ile değerlendirildi, varyansların homojen olması halinde aralarında farklı grupları tespit etmek için Tukey testi kullanıldı. Ayrıca ALS, Parkinson, MS ve demans hasta gruplarının arasında fark olup olmadığını analiz etmek için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Kruskal-Wallis testi sonucu aralarında hangi grupların farklı olduğunu tespit etmek içinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bütün istatistiksel analizler $p < 0.05$ anlamlılığına göre değerlendirildi. Ayrıca aynı katılımcıların kanlarında pNF-H ve MİF proteininin korelasyonuna bakıldı. Korelasyon analizi için parametrik bir analiz olan Pearson korelasyon testi uygulandı. Korelasyon analizi $p < 0.01$ anlamlılığına göre değerlendirildi.



DENEYSEL BULGULAR

4.1 pNF-H ELISA Sonuçları

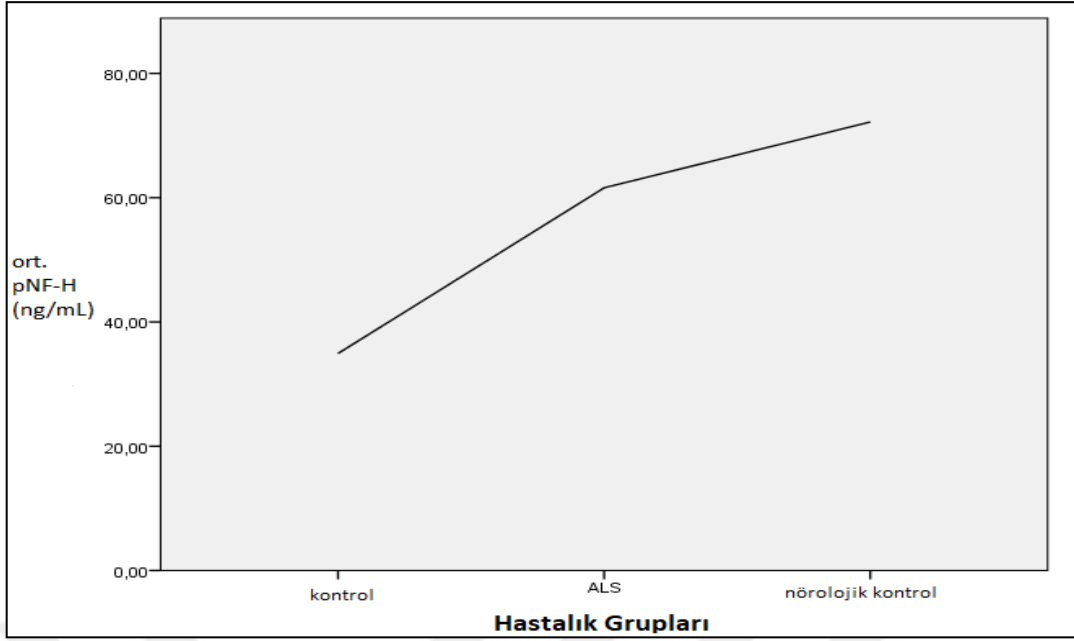
Katılıcılardan alınan kanlardan elde edilen plazmalar ile pNF-H ELISA deneyleri gerçekleştirildi. ELISA deneyi sonucunda spektrofotometrik okumalar yapıldı ve OD değerleri elde edildi. Elde edilen OD değerleri ilk önce Microsoft Excel dosyasında ng/mL cinsinden değerlere dönüştürüldü. Daha sonrasında ise SPSS 23.0 programında istatistiksel analizler gerçekleştirildi. ELISA verilerinin normal dağılıma uymadığı istatistiksel analizler sonucunda tespit edildi (Şekil 4. 1). İstatistikte verileri normalleştirme için normal dönüşüm için kullanılan yöntemler olan logaritmik dönüşüm ve karekök dönüşümleri uygulandı. Ancak bu dönüşümler sonucunda da ELISA verilerinin normal dağılıma uymadığı görüldü. Bu sonuçlardan dolayı ELISA verileri parametrik olmayan analizlere tabi tutuldu.



Şekil 4. 1 pNF-H verilerinin dağılım grafiği

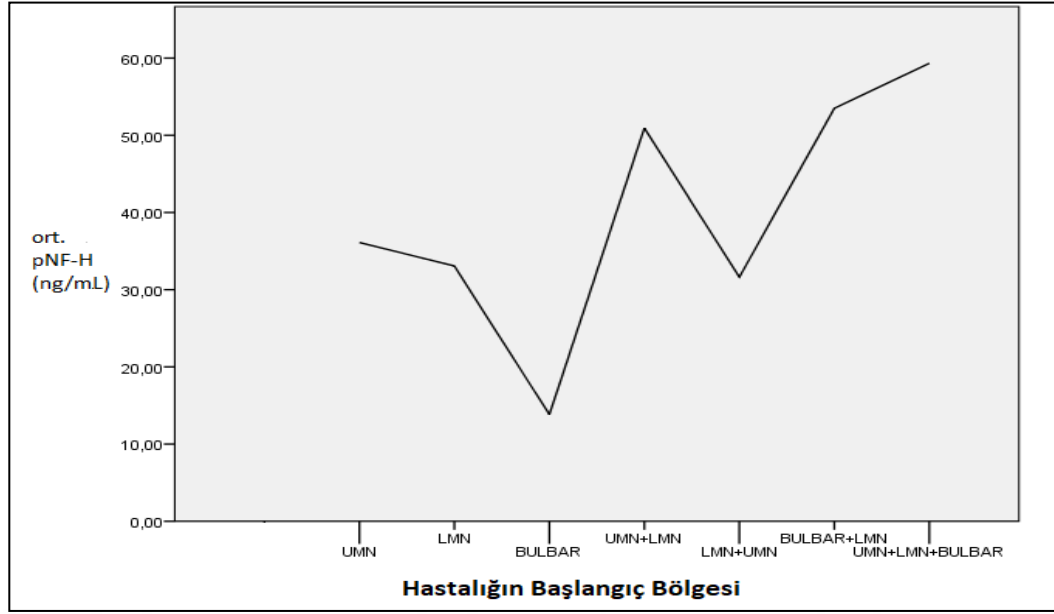
İlk olarak gruplar arasında bir fark olup olmadığını incelemek ve çoklu karşılaştırmalar için parametrik olmayan bir test olan Kruskal-Wallis testi yapıldı. Bu analiz sonucunda $p < 0.05$ anlamlılığına göre gruplardan en az ikisi arasında fark olduğu sonucu elde edildi. Çoklu karşılaştırmalar için uygulanan Kruskal-Wallis testinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar elde edildiğinden, aralarında farklı grupları belirlemek için ikili karşılaştırmalarda kullanılan parametrik olmayan bir test olan Mann-Whitney U testi uygulandı.

Mann Whitney U testi sonucunda, kontrol grubu ile ALS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p < 0.05$). Ayrıca kontrol grubu ile nörolojik kontrol grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç tespit edildi ($p < 0.05$). Ancak yapılan analizlerde ALS grubu ile nörolojik kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmedi ($p > 0.05$) (Şekil 4. 2).



Şekil 4. 2 ALS, sağlıklı kontrol ve Nörolojik Kontrol gruplarının ortalama pNF-H (ng/mL) protein değerleri

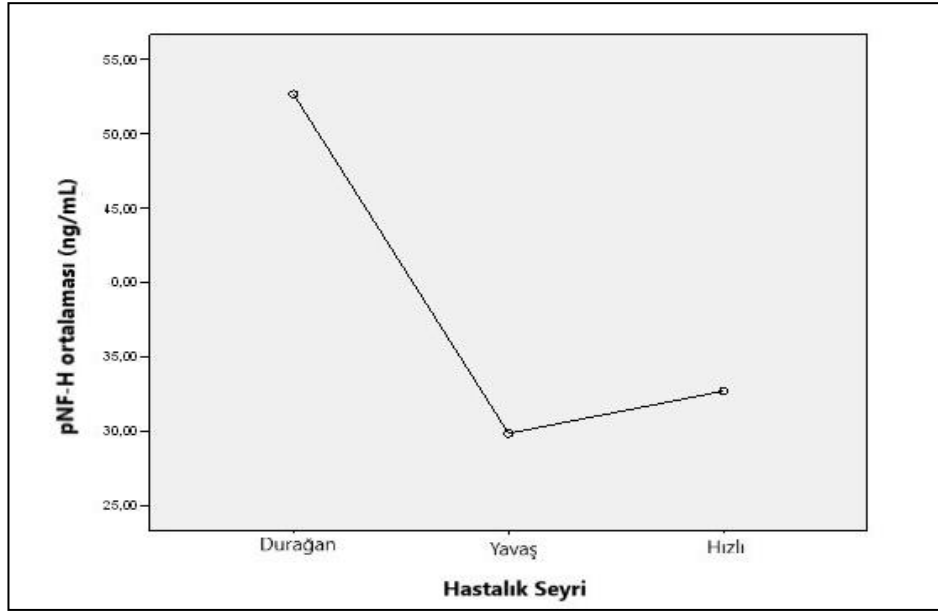
Hastalığın başlangıç yerine göre ALS grubunda bulunan hastalar yedi alt gruba bölündü. Bu gruplar arasında pNF-H proteinin değişim gösterip göstermediği Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. Bu test sonucunda en az iki grup arasında bir fark olduğu tespit edildi. Farkın kaynağını bulmak için ikili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi gerçekleştirildi. Bu test sonucunda ise hastalığın başlangıç yerine göre sadece Bulbar/Bulbar-UMN-LMN grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0.05$). Ayrıca Bulbar/Bulbar-LMN grubu arasında $p<0.10$ anlamlılığına göre bir fark olduğu tespit edildi (Şekil 4. 3).



Şekil 4. 3 ALS hastalığının başlangıç yerine göre ortalama pNF-H (ng/mL) protein değerleri. (pNF-H: Fosfonörofilament Ağır Zinciri, UMN: Üst Motor Nöron, LMN: Alt Motor Nöron)

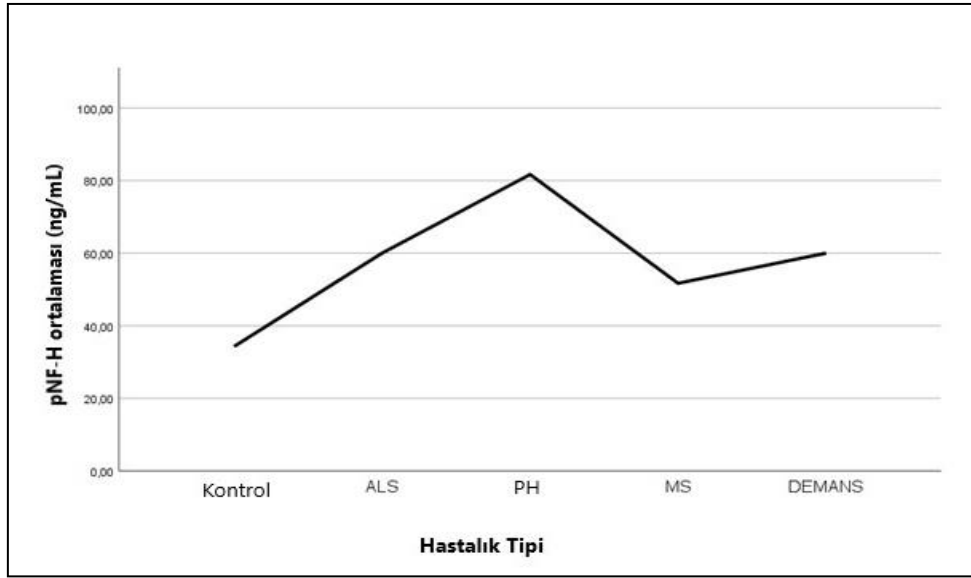
Yaşa bağlı olarak gerçekleştirilen analizler ALS hasta grubu beş alt gruba bölündü ve pNF-H proteinin yaşa bağlı değişim gösterip göstermediğine dair analiz yapıldı. Bu analiz Kruskal-Wallis testi gerçekleştirildi. Bu testin sonucunda pNF-H proteininin yaşa bağlı olarak değişim göstermediği sonucu elde edildi ($p>0.05$). Ayrıca Mann-Whitney U testi ile pNF-H proteinin ALS grubu içerisinde cinsiyete bağlı olarak değişim gösterip göstermediği analiz edildi. Bu test sonucunda da pNF-H proteininin cinsiyete bağlı olarak değişim göstermediği sonucu elde edildi ($p<0.05$).

ALS hasta grubunda hastalığın seyrine göre de pNF-H proteinin değişimi analiz yapıldı. Burada gruplandırma yavaş, hızlı ve durağan olarak gerçekleştirildi. İlk olarak bu üç grup arasında bir fark olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. Bu analiz sonucunda en az iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edildi. Aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunan grupların tespiti için Mann-Whitney U testi uygulandı. Bu test sonucunda ise durağan ile yavaş grubu arasında $p<0.05$ anlamlılığına göre bir fark olduğu tespit edildi. Durağan ile hızlı grubu arasında ise $p<0.10$ anlamlılığına göre bir fark olduğu sonucuna erişildi (Şekil 4. 4).



Şekil 4. 4 ALS hastalığının seyrine göre ortalama pNF-H (ng/mL) protein değerleri.

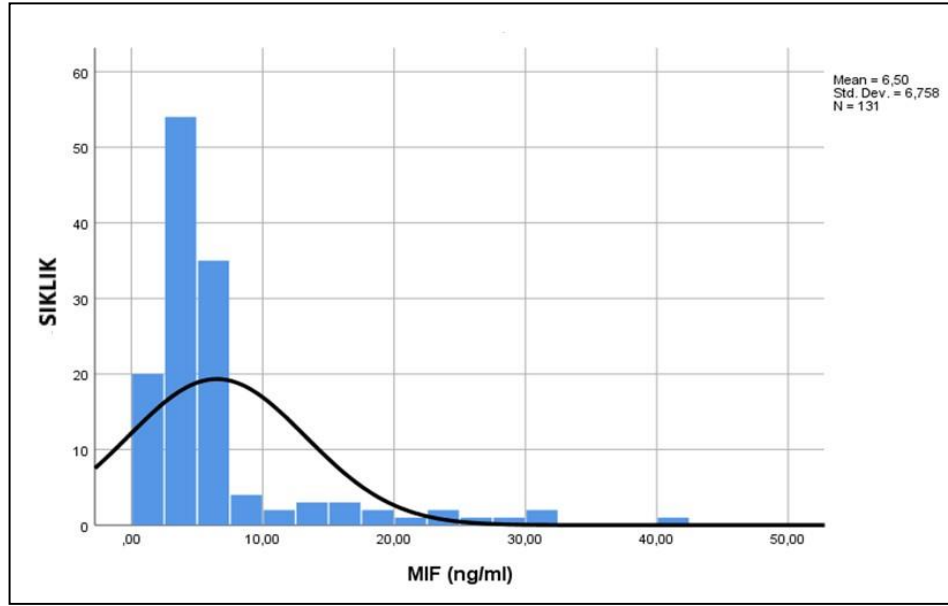
Bu analizlere ek olarak kontrol, ALS, Parkinson, MS ve demans hasta grupları arasında da pNF-H proteininin değişim gösterip göstermediğine dair istatistiksel analiz yapıldı. Gruplar arasında bir fark olup olmadığını tespit etmek amacı ile ilk olarak Kruskal-Wallis testi uygulandı. Bu test sonucunda en az iki grup arasında istatistiksel olarak fark olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Daha sonra ise aralarında fark bulunan grupları tespit etmek amacı ile Mann-Whitney U testi uygulandı. Bu test ile kontrol grubu ile Parkinson hasta grubu arasında istatistiksel olarak pNF-H protein değerleri arasında fark olduğu sonucu elde edildi ($p<0.05$). Ayrıca ALS grubu ile Parkinson hasta grubu arasında da pNF-H proteininin değişiminde anlamlı bir fark olduğu sonucu elde edildi ($p<0.05$). Yukarıda daha önce belirtildiği üzere ALS ve kontrol grubu arasında da anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0.05$) (Şekil 4. 5).



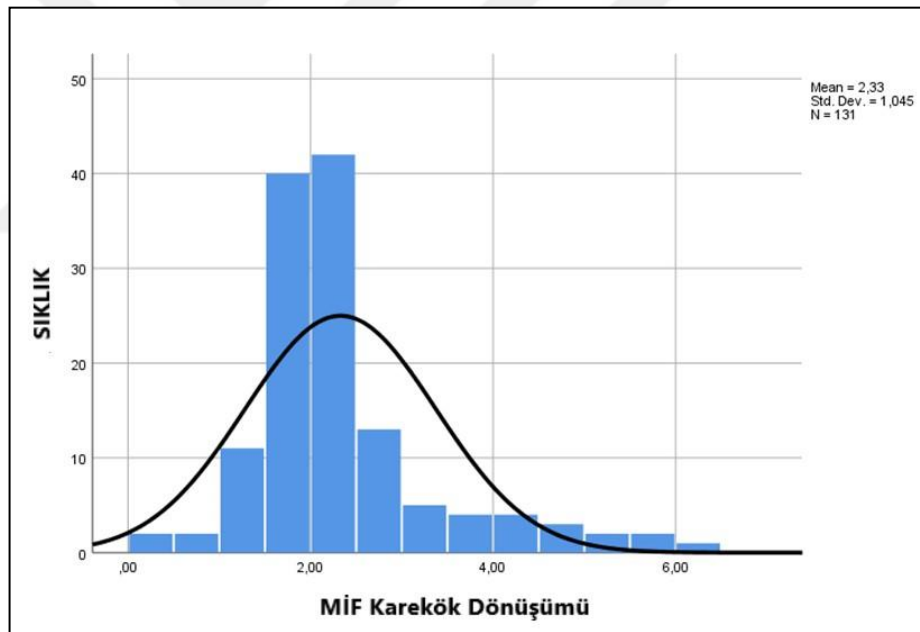
Şekil 4. 5 Hastalık tipine göre pNF-H proteininin ortalaması

4.2 MİF ELISA Sonuçları

Katılıcılardan alınan kanlardan elde edilen plazmalar ile MİF ELISA deneyleri gerçekleştirildi. ELISA deneyi sonucunda spektrofotometrik okumalar yapıldı ve OD değerleri elde edildi. Elde edilen OD değerleri ilk önce Microsoft Excel dosyasında ng/mL cinsinden değerlere dönüştürüldü. Daha sonrasında ise SPSS 23.0 programında istatistiksel analizler gerçekleştirildi. ELISA verilerinin normal dağılıma uymadığından dolayı (Şekil 4. 6) verilerin normalleştirme dönüşümü olan karekök dönüşümü gerçekleştirildi (Şekil 4. 7). Karekök dönüşümü sonucu verilerin normal dağılıma uyduğu gözlemlendi. Bunun sonucunda ELISA verileri parametrik analizlere tabi tutuldu.

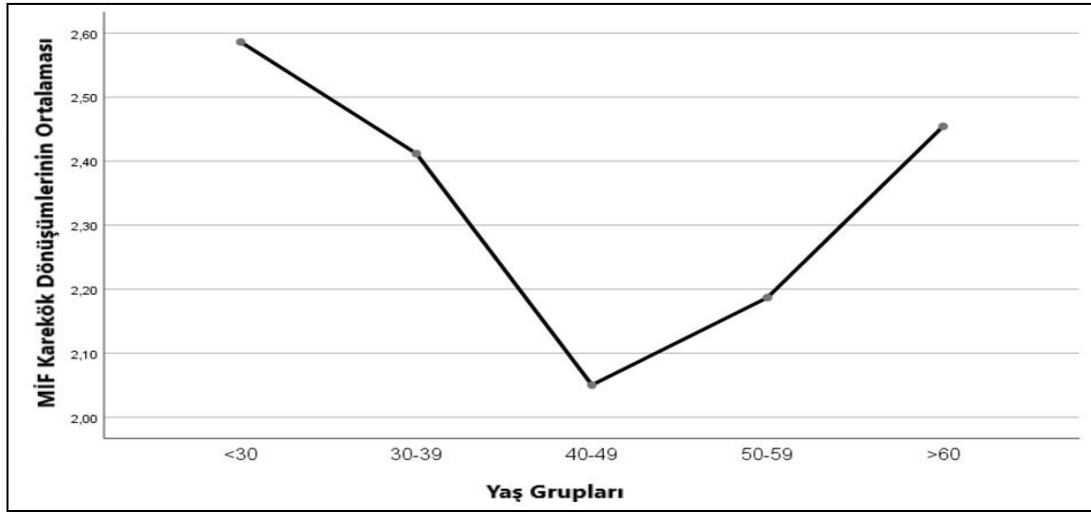


Şekil 4. 7 MİF protein verilerinin dağılım grafiği



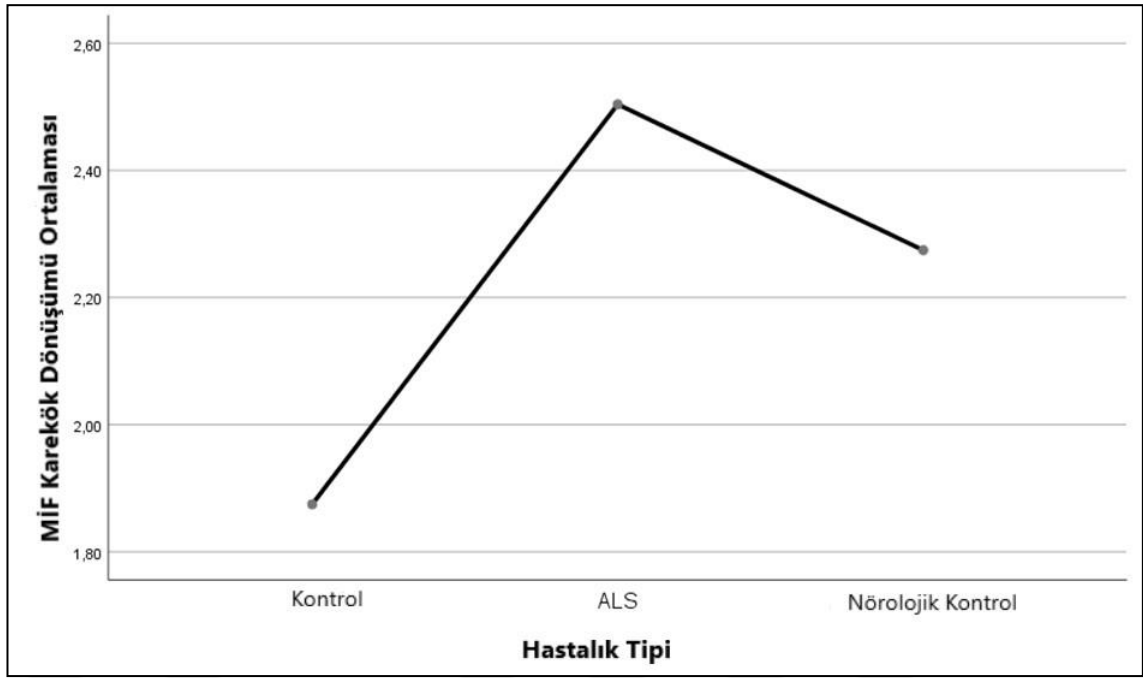
Şekil 4. 6 MİF protein verilerinin karekök dönüşümü sonucu dağılım grafiği

Yaş grupları arasında MİF protein seviyesinde fark olup olmadığını analiz etmek için parametrik bir test olan ANOVA testi uygulandı. Ayrıca Levene testi ile verilerin homojen dağıldı tespit edildi. Bu test sonucunda yaş grupları arasında bir fark olmadığı tespit edildi. Ancak karekök dönüşümü sonucu MİF değerlerinin yaş gruplarına göre ortalaması ile elde edilen grafikte <30 ile 40-49 yaş grubu arasında büyük bir fark olduğu görüldü (Şekil 4. 8). Bu nedenle bu iki grup arasında fark olup olmadığını tespit etmek amacı ile t testi uygulandı. T testi sonucu $p<0.05$ anlamlılığına göre iki grup arasında MİF protein değerleri açısından bir fark olduğu görüldü.



Şekil 4. 8 MİF proteininin karekök dönüşüm verilerinin yaş gruplarına göre ortalaması

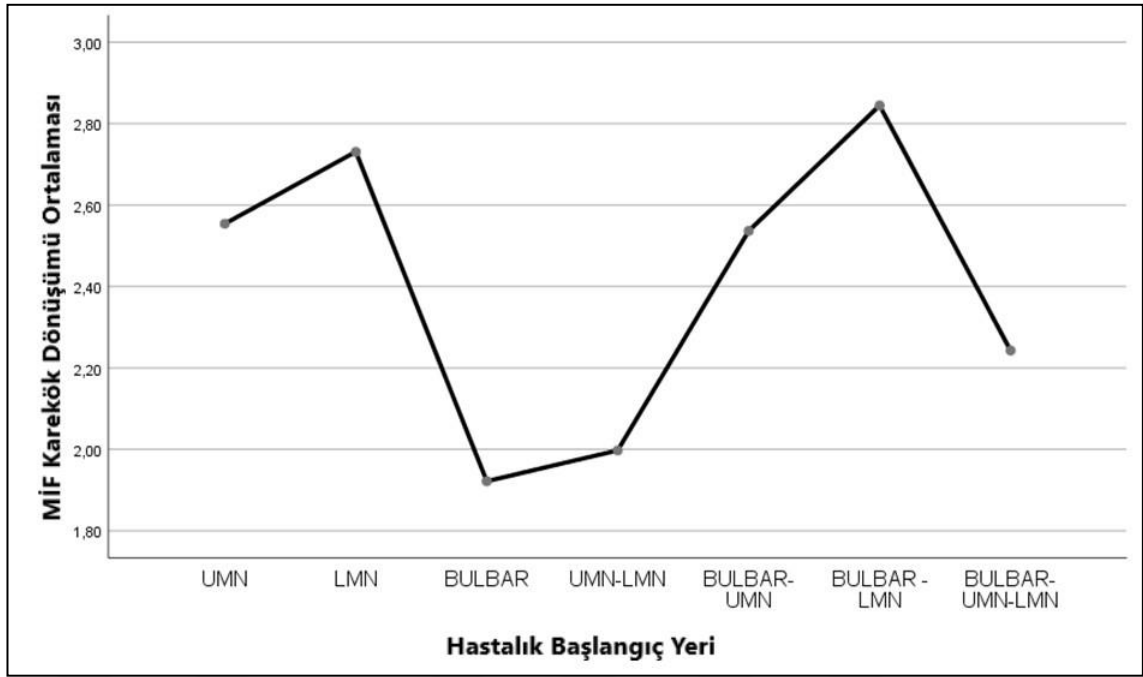
Daha sonra ise kontrol, ALS ve nörolojik kontrol grubu arasında MİF protein seviyesinde fark olup olmadığını analiz etmek için öncelikle ANOVA testi uygulandı. Ayrıca varyansların homojen olduğu görüldü. Analiz sonucu gruplar arasında bir fark olduğu sonucu elde edildi. Buna göre de çoklu karşılaştırma testi olan Tukey HSD testi uygulandı. Bu analiz sonucu ALS ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0.05$) (Şekil 4. 9).



Şekil 4. 9 MİF proteininin karekök dönüşümü sonucu hastalık tipine göre ortalaması

MİF protein seviyesinin cinsiyete göre değişim gösterip göstermediğini analiz etmek amacıyla da t testi uygulandı. Yapılan analiz sonucu protein seviyesinin cinsiyete göre değişim göstermediği sonucu elde edildi.

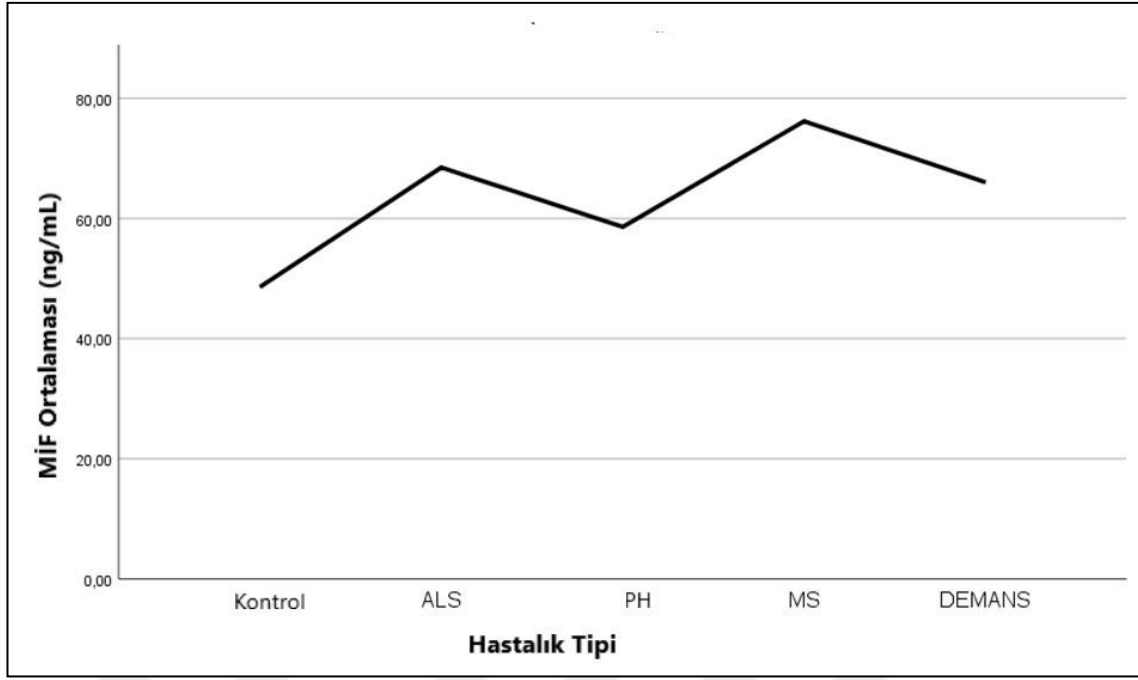
Hastalığın başlangıç yerine göre yapılan ANOVA testi sonucu MİF protein seviyesinin değişiminin hastalık başlangıç yerine göre değişim göstermediği tespit edildi. Ancak elde edilen grafik sonucu Bulbar/Bulbar-LMN grubu arasındaki farkın en büyük olduğu gözlemlendi. Bu nedenle iki grup arasında bir fark olup olmadığını tespit etmek amacı ile t testi uygulandı. Bu test sonucu da iki grup arasında bir fark olmadığı sonucu elde edildi. Ayrıca verilerin varyansları da homojen değildir (Şekil 4. 10).



Şekil 4. 10 MİF proteininin kerekök dönüşümü sonucu hastalık başlangıç yerine göre ortalaması

MİF protein seviyesinin değişiminin hastalığın seyrine göre değişip değişmediği de analiz edildi. Bu analizde MİF verilerinin ham hali kullanıldığından dolayı parametrik olmayan test olan Kruskal-Wallis testi ile gruplar arasında bir fark olup olmadığı analiz edildi. Bu analiz sonucu MİF protein seviyesinin hastalığın yavaş, hızlı ya da durağan olmasından etkilenmediği tespit edildi.

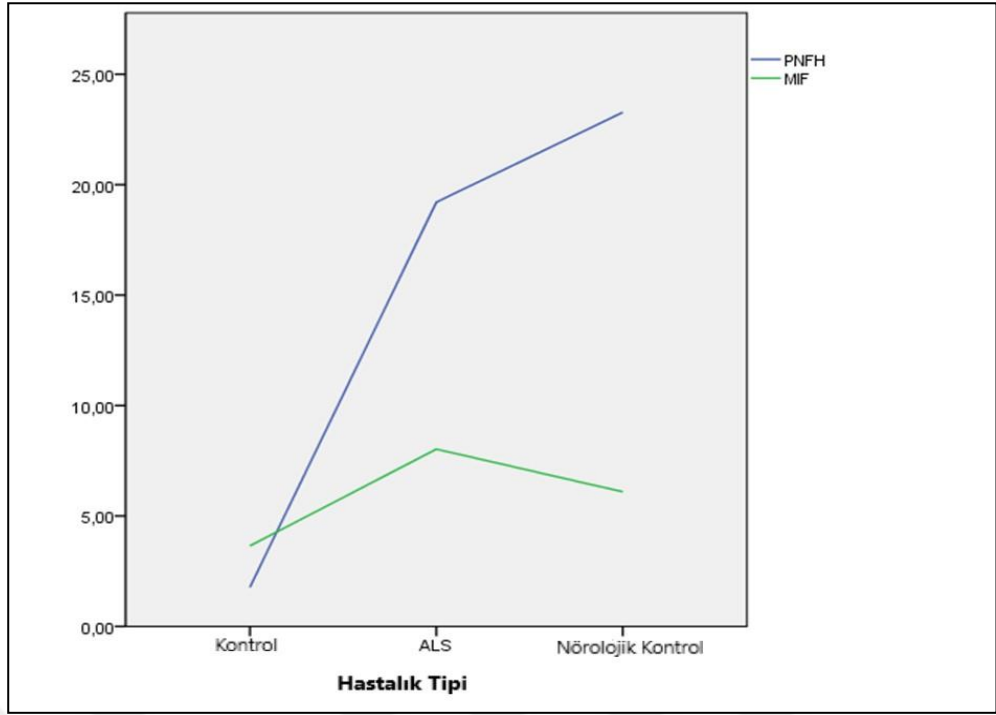
Kontrol, ALS, Parkinson, MS ve demans hasta grupları arasında MİF protein seviyesinde bir fark olup olmadığını analiz etmek için verilerin ham hali kullanıldı. Bundan dolayı analizler parametrik olmayan testler ile gerçekleştirildi. Gruplar arasında bir fark olup olmadığını analiz etmek amacı ile Kruskal-Wallis testi uygulandı. Bu analiz sonucu gruplar arasında bir fark olmadığı tespit edildi. Ancak elde edilen grafik sonucu kontrol grubu ile MS grubu arasında en büyük fark olduğu görüldü. Bundan dolayı iki grup arasında fark olup olmadığını tespit etmek için Mann-Whitney U testi uygulandı. Bu analiz sonucu kontrol grubu ile Multiple Skleroz grubu arasında MİF protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucu elde edildi ($p<0.05$) (Şekil 4. 11).



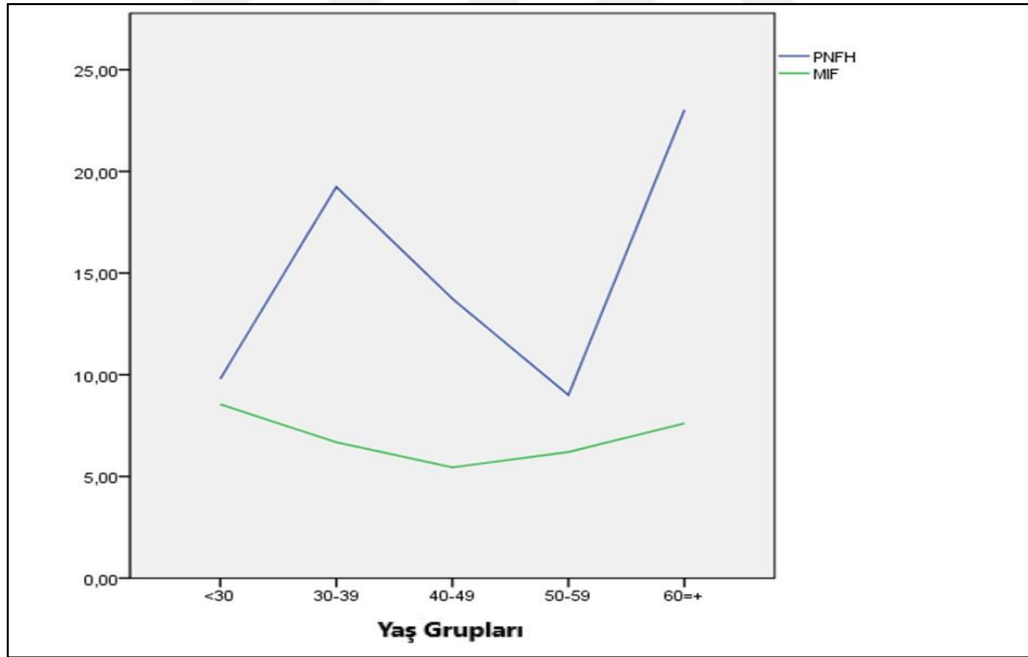
Şekil 4. 11 MİF proteininin hastalık tipine göre ortalaması

4.3 MİF ve pNF-H Korelasyonu

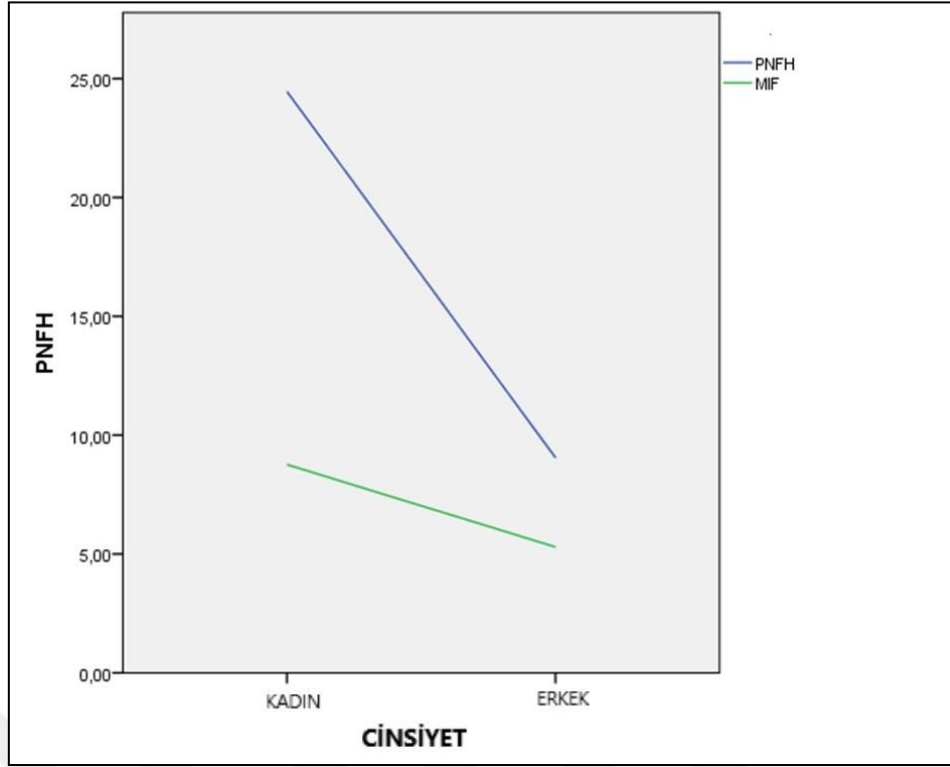
MİF ve pNF-H proteininin aralarındaki ilişkiyi incelemek amacıyla aynı katılımcıların plazmalarında gerçekleştirilen ELISA testinin sonuçlarının korelasyonu da analiz edildi. Korelasyon analizi toplamda 72 katılımcının verileri ile gerçekleştirildi. Korelasyon analizleri parametrik bir test olan Pearson korelasyon analizi ile $p < 0.01$ anlamlılığına göre gerçekleştirildi. Analiz sonucunda pNF-H ve MİF proteini arasında güçlü bir pozitif korelasyon olduğu sonucu elde edildi ($r=0,721$). Proteinlerden biri artış gösterirken diğeri de aynı yönde artış gösterdiği ya da proteinlerden biri azalırken diğeri de aynı azalma gösterdiği tespit edildi. Şekil 4. 12’de ki proteinin kontrol, ALS ve nörolojik kontrol grubu için; Şekil 4. 13’de iki proteinin yaş grupları için; Şekil 4. 14’de ise iki proteinin cinsiyete göre ortalamadaki davranışı bir arada görülmektedir.



Şekil 4. 12 MİF ve pNF-H proteininin hastalık tipine göre korelasyon grafiği

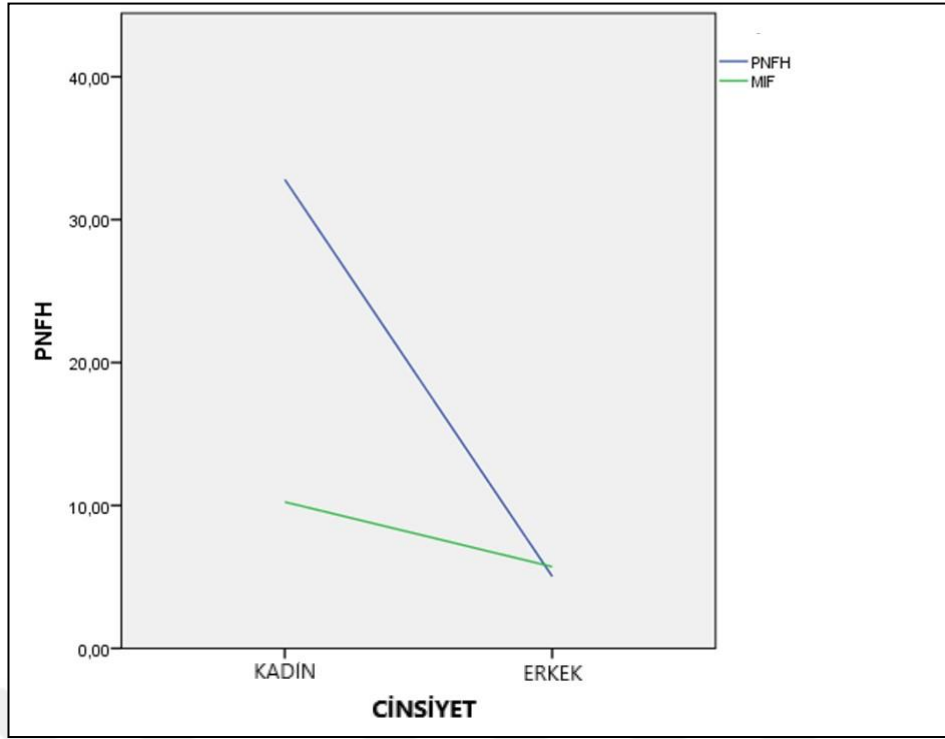


Şekil 4. 13 MİF ve pNF-H proteininin yaş gruplarına göre korelasyon grafiği

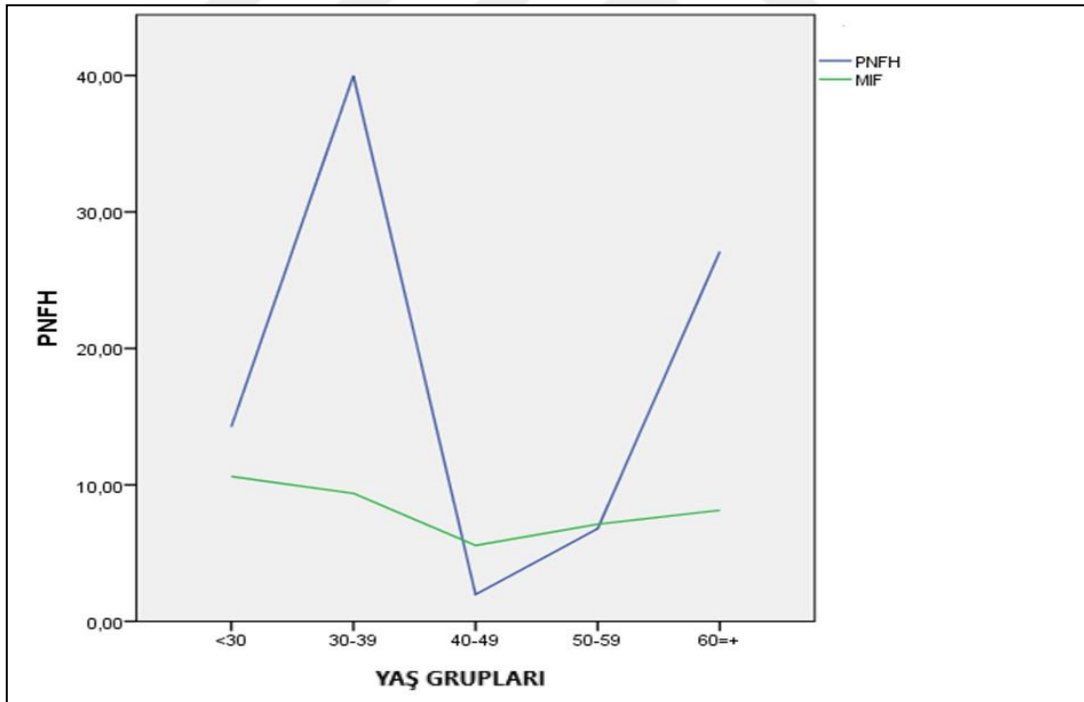


Şekil 4. 14 MİF ve pNF-H proteininin cinsiyete göre korelasyon grafiği

Ayrıca 49 kişiden oluşan ALS grubu içerisinde de MİF ve pNF-H proteinin korelasyonu incelendi. Bu korelasyon da parametrik test olan Pearson korelasyon analizi ile $p < 0.01$ anlamlılığına göre gerçekleştirildi. Bu analiz sonucunda da iki protein arasında güçlü bir pozitif korelasyon olduğu sonucu elde edildi ($r=0,729$). proteinlerden biri artış gösterdiği taktirde diğer proteinde aynı yönde artış gösterdiği ya da proteinlerden biri azalma gösterdiğinde aynı yönde azalma gösterdiği görüldü. Şekil 4. 15’de iki proteinin cinsiyete göre; Şekil 4. 16’da ise iki proteinin yaş gruplarına göre ortalamadaki davranışı görülmektedir.



Şekil 4. 15 Sadece ALS hastalarının MİF ve pNF-H proteininin cinsiyete göre korelasyon grafiği



Şekil 4. 16 Sadece ALS hastalarının MİF ve pNF-H proteininin yaş gruplarına göre korelasyon grafiği

SONUÇ VE ÖNERİLER

ALS teşhisi güç olan bir hastalıktır. Günümüzde hastalığın teşhisinde klinik olarak kullanılan bir biyobelirteç bulunmamaktadır. Biyobelirteç çalışmalarında en çok kullanılan vücut sıvıları BOS ve kandır. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada kan plazmasında MİF ve pNF-H düzeylerinin biyobelirteç olarak değerlendirilebilirliğinin analizi yapıldı. Tez çalışmasında ALS hastalarından, ALS hastalığı dışında nörolojik hastalığa sahip hastalardan ve nörolojik hastalığı bulunmayan kişilerden kan alındı. Alınan kanlardan plazma elde edildi. 76 ALS hastasında, 28 nörolojik kontrol bireyde ve 16 sağlıklı bireyde pNF-H; 70 ALS hastasında, 38 nörolojik kontrol bireyinde ve 23 sağlıklı bireyde MİF protein seviyelerinin analizi yapıldı. Sandviç ELISA yöntemi kullanılarak plazmadaki pNF-H ve MİF protein seviyelerinin ölçümü gerçekleştirildi. Elde edilen veriler SPSS 23.0 programı kullanılarak parametrik ve parametrik olmayan testlere tabi tutuldu ve analizler $p<0,05$ anlamlılığına göre değerlendirildi. Verilerin analizi öncelikle ALS, nörolojik kontrol ve sağlıklı kontrol grupları arasında gerçekleştirildi. Daha sonrasında protein seviyelerinin yaşa ve cinsiyete göre değişim gösterip göstermediği incelendi. Ayrıca ALS hasta grubu kendi içerisinde hastalığın başlangıç yeri ve hastalığın seyrine göre gruplandırıldı. MİF ve pNF-H proteininin bu gruplara göre değişimi de analiz edildi. Sonuçta MİF ve pNF-H proteini sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ALS hasta grubunda yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir.

ALS hastalarında ve transgenik fare modelleri üzerinde yapılan farklı çalışmalarda nöronal sitoskelet elemanlarının hastalığın patogeneğinde rol oynadığı tespit edilmiştir. Nöronal ölüm sonucu hücre içeriğini oluşturan moleküller BOS'na ve kana karışmaktadır. NF-H proteini nöron hücrelerinde sitoskeletin oluşumunda ve devamlılığında önemli rol oynayan nörofilament altbirimlerinden biridir. Bu altbirim uzun bir kuyruk domainine sahiptir. Bu domainde bulunan KSP (lizin-serin-prolin) tekrarları yüksek derecede fosforilasyona maruz kalmaktadır. Bu fosforilasyon sonucu protein yapısal bir değişikliğe uğramakta ve bu yapısal değişiklik proteinin proteaza karşı dirençli hale gelmesini sağlamaktadır [249]. Böylece pNF-H proteini vücut sıvıları içerisinde NF-H proteinine göre daha uzun bir süre bulunabilmektedir. pNF-H proteininin bu özelliği sayesinde bu proteinin aday bir biyobelirteç olabileceği önerilmektedir. pNF-H proteininin nöronlara özgü bulunması ile bu proteinin hem merkezi hem de periferik sinir sisteminde meydana gelen hasarların belirlenmesinde etkili bir biyomolekül olabileceği önerilmektedir. Diğer nörofilament altbirimlerine nazaran kanda daha uzun süre kalabilmesi de oldukça önemli bir özelliktir. Yapılan bir çalışmada aksonal hasarın tespiti için pNF-H proteininin uygun bir belirteç olabileceği önerilmiştir [250]. Liu ve ark. yaptığı bir çalışmada nörofilamentlerin hücre içerisinde anormal değişimler göstermesi sonucu motor nöron hücrelerinin hasara uğradığını tespit etmişlerdir [251].

Kan-beyin ve kan-omurilik bariyerleri kandaki maddelerin BOS'na geçişini kontrol eden fonksiyonel bariyerlerdir. Bu bariyerler kanda bulunan ve beyin için zararlı olabilecek maddelerin pasif difüzyonunu engelleyerek beynin zararlı maddelerden korunmasını sağlamaktadır. Ancak Garbuzova-Davis ve ark. yaptığı ALS modeli fare çalışmasında kan-beyin ve kan-omurilik bariyerlerinin hasar gördüğü tespit edilmiştir [224]. Ayrıca Nicaise ve ark. yaptığı ALS modeli sıçan çalışmalarında da bu bariyerlerde hasar meydana geldiği rapor edilmiştir [227]. Travmatik beyin hasarı üzerine yapılan bir çalışmada BOS ve serum pNF-H seviyesinin korelasyon gösterdiği bulunmuştur. pNF-H proteininin kalpain ve kaspazlara karşı dirençli olması sonucu yapısının bozulmadan kan-beyin bariyerini geçtiği ve dolaşıma karıştığı düşünülmektedir [252]. Omurilik

hasarı ve travmatik beyin hasarı üzerine yapılan bir çalışmada ise bu hastalarda kontrollere göre pNF-H seviyesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Omurilik hasarı bulunan sıçanlarda ise pNF-H seviyesinin travmatik beyin hasarı bulunan sıçanlara göre daha yüksek seviyede seyrettiği tespit edilmiştir [22].

Gonçales ve ark. BOS ile yaptıkları bir çalışmada pNF-H seviyesini incelemişlerdir. Bunun sonucunda ALS hasta grubunda BOS pNF-H seviyesinin diğer gruplara göre önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,0001$) [253]. Ganesalingam ve ark. 150 kişilik ALS hastası ve 140 kişilik bir kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada ALS hastalarında BOS pNF-H seviyesinin kontrol grubuna göre 10 kat fazla olduğunu gözlemlemişlerdir [254]. Çok merkezli yapılan bir çalışmada BOS pNF-H seviyesi ALS seviyesi kontrol grubuna göre 10 merkezde yüksek olduğu bulunmuştur [254]. Bu çalışmada da yapılan analizler sonucu daha önce yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak ALS grubu ve kontrol grubu arasında pNF-H arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). ALS hastalarında motor nöron dejenerasyonunun sağlıklı kişilere göre yüksek seviyede seyretmesi sonucu ALS grubunda plazma pNF-H seviyesi yüksek olabilir. Multiple sistem atrofi (MSA) hasta grubu ve ALS hasta grubu ile yapılan bir çalışmada da aynı bireylerde gerçekleştirilen analizler sonucu BOS ve plazma pNF-H seviyesi arasında güçlü bir korelasyon elde edilmiştir [13]. Plazma ve BOS pNF-H seviyesinin korelasyonuna dair yapılan bir araştırmada, aynı bireylerde bu proteinin plazma ve BOS sıvıları arasında zayıf bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir [256].

Bu çalışmada kontrol grubu ile nörolojik kontrol grubu arasında da pNF-H seviyesi arasında anlamlı bir fark bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak ALS grubu ve nörolojik kontrol grubu arasında pNF-H seviyesinde anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Elde edilen sonuçlara rağmen, yapılan başka bir çalışmada BOS pNF-H seviyesinin motor nöron hastalık grubunda diğer motor nöron hastalığı benzeri hastalıklar ve nörolojik kontrol gruplarına göre yüksek seyrettiği tespit edilmiştir [257]. Başka bir çalışmada ise ALS grubunda BOS pNF-H seviyesinin nörolojik kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede olduğu gözlemlenmiştir [258]. MSA hasta grubu ve ALS hasta grubu ile yapılan

bir çalışmada ise BOS ve plazma pNF-H seviyesi ALS grubunda daha yüksek bulunmuştur [13]. Ganesalingam ve ark. gerçekleştirdiği bir çalışmada ise ALS ve kontrol grubu arasında anlamlı bir sonuç vermiş olsa da, bizim sonuçlarımız ile paralel olarak, nörolojik kontrol grubu ile ALS grubu arasındaki pNF-H seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır [223]. Bunun nedeni plazmada bulunan pNF-H proteininin parçalanması ya da proteinin başka proteinlerle etkileşim kurarak çökmesi olabilir. Ayrıca nörolojik kontrol grubu içerisinde yer alan hastaların ALS benzeri profili tam olarak yansıtip yansıtmaması ile de değişkenlik gösterebilecek bir durumdur. Bu nedenle homojen hasta grubundan oluşacak nörolojik kontrol grubu ile analizler tekrarlanmalıdır. Ayrıca “kanca etkisi”nin kanda meydana gelip gelmemesine bağlı olarak da kan pNF-H seviyesinde değişiklikler meydana gelebilmektedir. SOD1^{G93A} mutasyonu taşıyan farelerin kanı ile gerçekleştirilen nörofilament çalışmasında immunoblotlama yönteminin kullanılması sonucu kanda daha yüksek moleküler ağırlıkta nörofilament çökeltilerinin varlığı tespit edilmiştir [258]. Kanda nörofilament çökeltilerinin oluşması sonucu ELISA’da elde edilen sonuçların protein seviyesinin doğru tespiti konusunda yanıltıcı olma ihtimali vardır. ELISA’da nörofilamentlerin etkileşime geçtiği bölgelerin çökeltilerin iç kısmında sıkışıp kalması sonucu ya da ELISA’da nörofilamentleri yakalayan antikörlerin doyması sonucu kandaki gerçek nörofilament seviyesinin ölçülemeyebileceği düşünülmektedir.

Hastalığın başlangıç yerine göre yapılan analizlerde, Bulbar/Bulbar-UMN-LMN grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Boylan ve ark. yaptığı çalışma sonucu bulbar başlangıçlı hastaların plazma ve serumlarında pNF-H seviyesinin yüksek olduğu bildirilmiştir [259]. Li ve ark. yaptığı çalışmada da BOS pNF-H seviyesinin bulbar başlangıçlı hastalar ile korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir [13]. Yapılan başka bir çalışmada ise UMN tutulumu bulunan hastalarda pNF-H seviyesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [250]. Buna ek olarak, başka bir çalışmada da BOS pNF-H seviyesi UMN tutulumu olan hastalarda yüksek tespit edilmiştir [260]. Bulbar başlangıçlı hasta sayımızın az olmasından dolayı verilerimizin analiz sonucu yukarıda bahsedilen çalışmaların tam tersi çıkmış olabilir. Daha fazla sayıda bulbar başlangıçlı

hasta ile yapılacak analizlere gerek vardır. Ayrıca tutulum bölgelerine göre hasta sayılarının farklılık göstermesi ile analiz sonuçlarının etkilenmiş olma ihtimali vardır. Eşit sayıda hasta ile yapılacak analizlerle farklı bir sonuca ulaşılabilir. Bu kişilerin hastalık seyirlerinin değişmesi ile de sonucun etkilenme ihtimali bulunmaktadır. Hastaların hastalık seyri, hastalık süresi ve düzenli aralıklarla yapılacak ELISA ölçümleri ile pNF-H proteininin hastalık başlangıç bölgesine göre seviyesinin belirlenmesinde daha doğru sonuçlar elde edilebilir. Gerçekleştirilen bir araştırmada C9orf72 mutasyonu taşıyan kişiler ile bu mutasyonu taşımayan kişilerin pNF-H seviyesi karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda ise C9orf72 mutasyonu taşıyan kişilerin BOS pNF-H seviyesinin bu mutasyonu taşımayan kişilere göre daha yüksek olduğu görülmüştür [261]. Buna göre hastaların taşıdıkları mutasyonlara göre de kandaki pNF-H düzeyinin etkilenme ihtimali bulunmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda kan yerine BOS kullanılması ile sonuçların değişkenlik gösterme olasılığı vardır.

Yalnızca ALS hastaları grubu için yapılan istatistiksel analizler sonucunda ise pNF-H proteininin cinsiyet ve yaşa bağlı olarak değişim göstermediği sonucu elde edildi. McCombe ve ark. yaptığı çalışmada yaşın artışı ile beraber serumlarındaki pNF-H seviyesinin arttığı bildirilmiştir [262]. Ancak bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar bu sonuca örtüşmedi. Boylan ve ark. ise yaş ile plazma pNF-H seviyesi arasında zayıf bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir [263]. Boylan ve ark. yaptığı başka bir çalışmada ise bizim sonuçlarımız ile benzerlik gösteren bir sonuç olarak yaş ile serum, plazma ve BOS pNF-H seviyesi ve yaş arasında bir bağlantı tespit etmediklerini rapor etmişlerdir [259]. ALS yaş gruplarındaki hasta sayısının artırılması ile sonuçlar tekrarlanarak analizlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca bu hastaların hastalık sürelerinin, hastalık seyirlerinin ve taşınan gen mutasyonlarının kan pNF-H seviyesini etkileme olasılığı bulunmaktadır. Bu değişkenlere göre yapılacak analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmada durağan ile yavaş grubu arasında $p < 0.05$ anlamlılığına göre bir fark olduğu tespit edildi. Durağan ile hızlı grubu arasında ise $p < 0.10$ anlamlılığına göre bir fark olduğu sonucuna erişildi. Yapılan bir araştırmada hastalığın hızlı ilerlediği hastalarda BOS pNF-H seviyesinin arttığı tespit edilmiştir [250]. Yapılan bir çalışmada hastalığı hızlı

ilerleyen kişilerde yavaş ilerleyenlere göre BOS pNF-H seviyesinin daha yüksek olma eğiliminde olduğu bulunmuştur [260]. Ayrıca Gonçales ve ark. çalışmalarında hızlı bir nöronal yıkımın gerçekleşmesi sonucu pNF-H proteininin yüksek seviyede anlatımının ortaya çıkma olasılığından bahsetmişlerdir [253]. Yapılan bir araştırmada ise erken dönemde yüksek pNF-H seviyesinin hastalığın hızlı ilerlemesi ile korele olduğu rapor edilmiştir [262]. Hastalığın hızlı ilerlediği hasta sayısı bizim çalışmamızda durağan hasta grubuna göre daha azdır. Bu nedenle sonuçların etkilenme ihtimali bulunmaktadır. Ayrıca hastalığın başlangıç yerinin bu sonuçları etkileyip etkilemediği araştırılmalıdır. Yapılan bir çalışmada semptom gösteren ALS hastaları ve semptom taşımayan ancak mutasyon taşıyan kişilerde nörofilament seviyesi analiz edilmiştir. Semptom göstermeyen kişilerde nörofilament seviyesinin normal seyrettiği bulunmuştur. Semptomik ALS hastalarında ise nörofilament seviyesinin kontrollere göre 10 kat arttığı görülmüştür [264]. Ayrıca nörofilament salınımının hastalığın başlangıcından sonra hangi evrede artmaya başladığı önemli bir sorunsaldır. Hastalığın semptomlarının başlangıcından ne kadar süre sonra kan analizi yapılması hastalığın seyri hakkında veri sağlayıp sağlamadığı araştırılmalıdır. Bu nedenle erken dönemden itibaren takip edilecek hastaların vücut sıvıları gereklidir. Böylece hastalığın kaçınıcı ayında pNF-H proteininin kanda hastalığı yansıtacak seviyede gözlenip gözlenmediği tespit edilebilir.

Hastalık gruplarına göre yapılan analizde ALS ile Parkinson hastalığı arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak diğer hastalık grupları ile pNF-H seviyesi arasında anlamlı bir fark elde edilememiştir. Fakat ALS hastalığında görülen motor nöron kaybına benzer şekilde motor nöron hücrelerinin kaybının gerçekleştiği, MS hastaları üzerinde yapılan çalışmalardan birinde pNF-H proteininin MS hastalarında devam eden nörodejeneratif aktivitenin bir ölçüsü olarak kullanılabileceği önerilmektedir [265]. Ayrıca serum pNF-H değerinin de MS hastalarında yüksek olduğu bulunmuştur [266]. Bizim yaptığımız çalışmada sonuçların tam tersi çıkmış olmasının nedeni MS hasta sayısının az olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca MS hastalarının hastalığın hangi evresinde bulunduğu da önemlidir. Buna göre çalışmalar iki hastalık grubu arasında tekrarlanabilir. Ayrıca yapılan literatür taramasında bu iki hastalık grubunu ele alan bir

çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tarz çalışma ile bir kesme değeri (cutoff value) oluşturulabilir. Yapılan bir çalışmada Parkinson hastalığında NF-H mRNA seviyesinde düşüş olduğu tespit edilmiştir [267]. Başka bir Parkinson hastaları ile yapılan çalışmada ise BOS'nda normal seviyede pNF-H olduğu tespit edilmiştir [268]. Yaptığımız çalışmada ise Parkinson hastalığında pNF-H seviyesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak bu çalışmada Parkinson hasta sayısı azdır ve daha fazla hasta ile gerçekleştirilecek çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca Parkinson hastalarının ne kadar süredir hasta oldukları önemli olabilir. Taşınan mutasyona göre pNF-H değerinin etkilenip etkilenmediği de önemli bir sorunsaldır. Demans hastalığı ile yapılan bir çalışmada ise FTD hastalarında ve geç başlangıçlı Alzheimer hastalarında BOS pNF-H seviyesinin yükseldiği tespit edilmiştir [269]. Yaptığımız çalışmada demans hastalarının sayısı oldukça azdır ve farklı demans hastalık türlerine göre yapılacak bir çalışmaya ihtiyaç vardır.

Yapılan bir araştırmaya göre plazmada bulunan MİF değerlerinin kanın saklanma sıcaklığı, saklanma uzunluğu, seyreltme veya tekrarlanan dondurma çözme işlemlerinden etkilenmediği tespit edilmiştir [270]. MİF proteini inflamatuvar süreçlerin indükleyicisi olan bir sitokindir. Bu proteinin dolaşımında artması sonucu hücrelerde inflamatuvar maddelerin üretimi artmaktadır. Ayrıca MİF proteininin enzim görevleri de bulunmaktadır. Ancak Cherepkova ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda MİF'nün şaperon benzeri bir görevi olduğundan da bahsedilmiştir [271]. Israelson ve ark. yaptıkları çalışmalarda endojen MİF'nün şaperon benzeri görevi sayesinde motor nöronlarda bulunan yanlış katlanmış SOD1 enziminin oluşturduğu toksisiteyi önlediği ve sonuçta motor nöronların hayatta kalma sürelerinin uzadığını rapor etmişlerdir [14].

Yapılan bir analizde BOS MİF seviyesinin sağlıklı kontrollere göre bilişsel bozukluk bulunan hastalarda yükseldiği tespit edilmiştir [272]. MİF'nün astrosit ve mikrogliyalarda anlatımının artması sonucu Alzheimer hastalığında meydana patolojik süreçlerde artışın meydana geldiği ileri sürülmüştür. MİF, nöronal fonksiyon üzerinde zararlı etkilere sahip olan TNF- α , IL-1 α , IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini tetiklemektedir. Ayrıca MİF'nün CD74 reseptörü ile hücreyi uyarması sonucu hücre içerisinde ERK1/2 MAP kinazı aktive edilmektedir. Bu ERK1/2 yolağı Alzheimer

hastalığında tau proteininin hiperfosforilasyonuna büyük ölçüde katkıda bulunabilmektedir. MS hastalarında yapılan bir çalışmada ise serum ve BOS'nda MİF seviyesinin artmış olduğu bildirilmiştir [273]. MİF'nün, MS lezyonlarının inflamatuvar içeriğini arttırabileceği düşünülmektedir. MİF-eksikliği bulunan farelerin, miyelin peptidi ile immunizasyonunu takiben patojenik miyelin spesifik hücrelere yol açma ihtimaline rağmen MİF eksikliğinin koruyucu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca MİF-eksik farelerde MSS'de azalmış inflamasyon patolojisinin varlığı bildirilmiştir.

MİF proteini inflamasyon sürecinde NF-κB sinyallemesini aktive etmektedir. Bu aktivasyon sonucu birçok sitokin ve inflamatuvar maddenin anlatımında artış meydana gelmektedir. ALS üzerine yapılan *in vitro* bir çalışmada mikrogliyalarda NF-κB sinyallenmesinin ortadan kaldırılması sonucu motor nöronların ölümü engellenmiş ve *in vivo* olarak da ALS olan farelerde hayatta kalma sürelerinin uzadığı bildirilmiştir [274].

Hücrede ROS artışı MİF'nün sekresyonunu indüklemektedir. Otofajinin inhibe edildiği hücrelerde ise MİF sekresyonunun arttığı tespit edilmiştir [275]. Otofajinin baskılandığı makrofajlarda inflamatuvar maddelerin salgılanmasındaki artışın nedeni ROS'dir. Bu ROS'nin kaynağının ise mitokondri olduğu düşünülmektedir. Hücrelerde ROS miktarının artışı ile oksidatif stres meydana gelmektedir. Nguyen ve ark. yaptığı çalışmada ise MİF'nün oksidatif strese bağlı apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir [276]. Travmatik beyin hasarı [277] ve omurilik zedelenmesi [278] hastalarında yapılan çalışmalar sonucunda ise dolaşımdaki MİF konsantrasyonunun arttığı bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalarda MİF'nün nöronal sistemde hem koruyucu rolü hem de zarar verici etkileri rapor edilmiştir. Yaptığımız çalışmada ALS hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre MİF protein seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu proteinin hücreler üzerindeki etkisinden bahsedilebilmesi için uzun süreli MİF seviyesinin ve hastalık seyrinin takibi ile yapılacak bir çalışma gereklidir. Ayrıca MİF proteininin, MS hastalarında ALS hastalarına göre daha yüksek seviyede seyrettiği tespit edilmiştir.

MİF-pNF-H korelasyonu analiz sonucu bu iki protein arasında güçlü bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Yapılan *in vivo* bir çalışmada 20 Guinea pig'e sıgır omurilik

homojenatı enjekte edilmiştir. 20 Guinea pig ise kontrol grubu olarak izlenmiştir. Kobaylarda oluşturulan immün aracılı hasar sonucu motor nöronlarda anormal fosforilasyon ve nörofilament dağılımı tespit edilmiştir. Nöron perikaryasında ise NF-H ve NF-M fosforilasyonunda artış olduğu bildirilmiştir [251]. Başka bir çalışma sonucunda ise ALS hastalarından elde edilen BOS'na maruz kalan nöron hücrelerinin perikaryasında nörofilament fosforilasyonunda artış meydana gelmiştir [279]. Bu çalışma göstermektedir ki, ALS hastalarında nöroinflamasyon basamaklarının tetiklenmesi ile BOS'nda biriken inflamatuvar maddeler motor nöronlarda nörofilament altbirimlerinin hücre perikaryasında yüksek derecede fosforilasyonuna neden olabilmektedir.

Sonuç olarak, pNF-H proteini ALS hastalarında sağlıklı kişilere göre daha yüksek seviyelerde gözlenmektedir. Ancak bu proteinin ALS benzeri ve diğer nörolojik hasta grupları arasında fark olup olmadığı incelenmelidir. Daha fazla sayıda hastadan oluşan gruplar ile gerçekleştirilecek analizler gereklidir. Ek olarak, ALS hastalığının erken teşhisinde kullanılıp kullanılamayacağı sorusunun cevabı için ise hastanın semptom gösterdiği ilk andan itibaren takip edilmesi ve kan testlerinin yapılması gereklidir. MİF proteininin de aynı şekilde uzun süreli olarak hastalarda zaman içerisinde değişimi takip edilmeli ve bu değişim ile hastalığın seyri arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığı analiz edilmelidir. Ayrıca her ne kadar MİF ve pNF-H proteini arasında pozitif bir korelasyon olduğunu söylüyorsak da, bu iki proteinin birbirini nasıl etkilediği tespit edilmelidir. Uzun süre yapılacak takipler ile proteinlerin zaman içerisindeki davranışı izlenerek ilk önce immün sistemin mi hücre iskeletinde bozulmalara neden olduğu yoksa hücre iskeletinde meydana gelen bozulmalar sonucu mu immün sistemin indüklendiği tespit edilebilir. Nöronal hücre kültürü ya da hayvan çalışmaları ile yapılacak araştırmalar ile de bu proteinlerin birbirini etkileme süreci araştırılabilir. Böylece bu proteinlerin ALS hastalığının erken teşhisi için aday biyobelirteç olup olmayacağına dair ek veriler elde edilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Double, K.L., Reyes, S., Werry, E.L. ve Halliday, G.M., (2010). "Selective cell death in neurodegeneration: Why are some neurons spared in vulnerable regions?", *Progress in Neurobiology*, 92:316–329.
- [2] Özmen, S.Ü. ve Özarda, Y., (2014). "Amyotrofik Lateral Skleroz Hastalığında Biyobelirteçler", *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 12(3):137-146.
- [3] Fırıncioğulları, M., Yavuz, B. ve Koç, F., (2016). "Ön Boynuz Tutulumuyla Giden Hastalıklar", *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 25(4):296-303.
- [4] ALS-MNH Derneği, Türkiye’de ALS MNH Hastalığı, www.als.org.tr/turkiye-de-als-mnh-hastaligi, 31 Ocak 2018.
- [5] Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R. ve Zoing, M.C., (2011). "Amyotrophic lateral sclerosis", *Lancet*, 377: 942-55.
- [6] Talbot, K., (2009). "THE BARE ESSENTIALS Motor neuron disease", *Neurology in Practice*, 9:303–9.
- [7] Uluç, K., İşak, B., Tanrıdağ, T. Ve Us, Ö., (2008). "ALS PATOFİZYOLOJİSİ: NEYİ NE KADAR BİLİYORUZ?", *Marmara Medical Journal*, 21(1):102-111.
- [8] Mancuso, R. ve Navarro, X., (2015). "Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic", *Progress in Neurobiology*, 133:1–26.
- [9] Belsh, J.M., (2000). "ALS diagnostic criteria of El Escorial Revisited: do they meet the needs of clinicians as well as researchers?", *ALS and other motor neuron disorders*, 1(1):57–60.
- [10] Karlıkaya, G. ve Hays, A.P., (2005). "Amiyotrofik Lateral Skleroz Nöropatolojik Bir Çalışma", *Türk Nöroloji Dergisi*, 11(1):54-62.
- [11] İdrisoğlu, H.A., (2011). "Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS)’da Tedavi Algoritması", 6. Uludağ Nöroloji Günleri, 10-13 Mart 2011, Bursa.

- [12] ALS-MNH Derneği, ALS Motor Nöron Hastalığı Nasıl Teşhis Edilir, www.als.org.tr/als-motor-noron-hastaligi-nasil-teshis-edilir, 2 Şubat 2018.
- [13] Li, S., Ren, Y., Zhu, W., Yang, F., Zhang, X. Ve Huang, X., (2016). "Phosphorylated neurofilament heavy chain levels in paired plasma and CSF of amyotrophic lateral sclerosis", *Journal of the Neurological Sciences*, 367:269-274.
- [14] Leyton-Jaimes, M.F., Benaim, C., Abu-Hamad, S., Kahn, J., Guetta, A., Bucala, R. ve Israelson, A., (2016). "Endogenous macrophage migration inhibitory factor reduces the accumulation and toxicity of misfolded SOD1 in a mouse model of ALS", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(36):10198-10203.
- [15] Hulka, B.S. ve Wilcosky, T., (1988). "Biological markers in Epidemiologic Research", *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 43(2):83-89.
- [16] Strimbu, K. ve Tavel, J.A., (2010). "What are Biomarkers?", *Curr. Opin. HIV AIDS*, 5(6):463-466.
- [17] Mendez, E.F. ve Sattler, R., (2014). "Biomarker development for C9orf72 repeat expansion in ALS", *Brain Research*, 1607:26-35.
- [18] Mayeux, R., (2004). "Biomarkers: Potential Uses and Limitations", *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1:182-188.
- [19] Bakkar, N., Boehringer, A. ve Bowser, R., (2015). "Use of biomarkers in ALS drug development and clinical trials", *Brain Research*, 1607:94-107.
- [20] Costa, J. Ve Carvalho, M., (2016). "Emerging molecular biomarker targets for amyotrophic lateral sclerosis", *Clinica Chimica Acta*, 455:7-14.
- [21] Israelson, A., Ditsworth, D., Sun, S., Song, S., Liang, J., Hruska-Plochan, M., McAlonis-Downes, M., Abu-Hamad, S., Zoltsman, G., Shani, T., Maldonado, M., Bui, A., Navarro, M., Zhou, H., Marsala, M., Kaspar, B.K., Da Cruz, S. ve Cleveland, D.W., (2015). "Macrophage Migration Inhibitory Factor as a Chaperone Inhibiting Accumulation of Misfolded SOD1", *Neuron* 86:218-232.
- [22] Shaw, G., Yang, C., Ellis, R., Anderson, K., Mickle, J.P., Scheff, S., Pike, B., Anderson, D.K. ve Howland, D.R., (2005). "Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury", *Biochemical and biophysical Research Communications*, 336:1268-1277.
- [23] Bertram, L. ve Tanzi, R.E., (2005). "The genetic epidemiology of neurodegenerative disease", *The Journal of Clinical Investigation*, 115(6):1449-1457.
- [24] Gandhi, S. ve Wood, N.W., (2010). "Genome-Wide Association Studies: The Key to Unlocking Neurodegeneration?", *Nature Neuroscience*, 13(7):789-794.

- [25] Hirth, F., (2010). “*Drosophila melanogaster* in the Study of Human Neurodegeneration”, CNS & Neurological Disorders-Drug Targets, 9:504-523.
- [26] Çobanoğlu, G., İskender, C. ve Başak, N., (2011). “Motor Nöron Hastalıklarına Örnek Olarak ALS: Charcot ve SOD1’den Post-Genomik Döneme”, Türkiye Klinikleri J. Neurol-Special Topics, 4(2):67-76.
- [27] Blackstone, C., O’Kane, C.J. ve Reid, E., (2010). “Hereditary spastic paraplegia: membrane traffic and the motor pathway”, Nature Reviews Neuroscience, 12:31-42.
- [28] Özoğuz, A., Pirkevi, C., Güzel, M., Hocaoglu, F.S., Gencer, P., Özkan, A.K. ve Başak, N., (2008). Sevdığınız ile ALS’yi Yaşamak: Bakım Veren Bireyler İçin Rehber, Boğaziçi Üniversitesi, Suna ve İnan Kıraç Vakfı Nörodejenerasyon Araştırma Laboratuvarı Yayınları, 1, İstanbul.
- [29] Sau, D., Rusmini, P., Crippa, V., Onesto, E., Bolzoni, E., Ratti, A. ve Poletti, A., (2011). “Dysregulation of axonal transport and motor neuron diseases”, Biol Cell, 103:87-107.
- [30] National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Primary Lateral Sclerosis Information Page, <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Primary-Lateral-Sclerosis-Information-Page>, 10 Şubat 2018.
- [31] OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man, ALSIN, <https://www.omim.org/entry/606352#geneFunction>, 10 Şubat 2018.
- [32] Kanekura, K., Hashimoto, Y., Niikura, T., Aiso, S., Matsuoka, M. ve Nishimoto, I., (2004). “Alsin, the Product of ALS2 Gene, Suppresses SOD1 Mutant Neurotoxicity through RhoGEF Domain by Interacting with SOD1 Mutants”, The Journal of Biological Chemistry, 279(18):19247-56.
- [33] Bandmann, O. ve Burton, E.A., (2010). “Genetic zebrafish models of neurodegenerative diseases”, Neurobiology of Diseases, 40:58-65.
- [34] Katsuno, M., Tanaka, F., Adachi, H., Banno, H., Suzuki, K., Watanabe, H. ve Sobue, G., (2012). “Pathogenesis and therapy of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)”, Progress in Neurobiology, 99:246-256.
- [35] OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man, Survival of motor Neuron 1;SMN1, <https://www.omim.org/entry/600354#geneFunction>, 11 Şubat 2018.
- [36] Vucic, S., Rothstein, J.D. ve Kiernan, M.C., (2014). “Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies”, Trends in Neurosciences, 37(8):433-442.
- [37] Swinnen, B. ve Robberecht, W., (2014). “The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis”, Nature Reviews Neurology Advance Online Publication.

- [38] Hardiman, O., Berg, L.H. ve Kiernan, M.C., (2011). "Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis", *Nature Reviews Neurology*, 7:639-649.
- [39] Wijesekera, L.C., Mathers, S., Talman, P., Galtrey, C., Parkinson, M.H., Ganesalingam, J., Willey, E., Ampong, M.A., Ellis, C.M., Shaw, C.E., Al-Chalabi, A. ve Leigh, P.N., (2009). "Natural history and clinical features of the fail arm and fail leg ALS variants", *Neurology*, 72:1087-1094.
- [40] Geevasinga, N., Menon, P., Özdinler, P.H., Kiernan, M.C. ve Vucic, S., (2016). "Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS", *Nature Reviews Neurology Advance Online Publication*.
- [41] Marangi, G. ve Traynor, B.J., (2015). "Genetic causes of amyotrophic lateral sclerosis: New genetic analysis methodologies entailing new opportunities and challenges", *Brain Research*, 1607:75-93.
- [42] Online Mendelian Inheritance in Man, ALS, https://www.omim.org/search/?index=entry&sort=score+desc%2C+prefix_sort+desc&start=1&limit=10&search=ALS, 16 Şubat 2018.
- [43] Chen, S., Sayana, P., Zhang, X. ve Le, W., (2013). "Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update", *Molecular Neurodegeneration*, 8:28.
- [44] Paez-Colasante, X., Figueroa-Romero, C., Sakowski, S.A., Goutman, S.A. ve Feldman, E.L., (2015). "Amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and therapeutics in the epigenomic era", *Nature Reviews Neurology Advance Online Publication*.
- [45] Cleveland, D.W. ve Rothstein, J.D., (2001). "From charcot to Lou Gehrig: Deciphering Selective Motor Neuron Death in ALS", *Nature Review Neuroscience*, 2(11):806-819.
- [46] Robberecht, W. ve Philips, T., (2013). "The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis", *Nature Reviews*, 14(4):248-264.
- [47] Pasinelli, P. ve Brown, R.H., (2006). "Molecular biology of amyotrophic lateral sclereosis: insights from genetics", *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9):10-23.
- [48] Alsultan, A.A., Waller, R., Heath, P.R. ve Kirby, J., (2016). "The genetics of amyotrophic lateral sclerosis:current insights", *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*, 6:49-64.
- [49] Dormann, D., ve Haass, C., (2013). "Fused in sarcoma (FUS): An oncogene goes awry in neurodegeneration", *Mol. Cell Neuroscience*, 56:475-486.
- [50] Chen-Plotkin, A.S., Lee, V.M. ve Trojanowski, J.Q., (2010). "TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease", *Nature Reviews Neurology*, 6(4):211-220.
- [51] Xiao, S., MacNair, L., McLean, J., McGoldrick, P., McKeever, P., Soleimani, S., Keith, J., Zinman, L., Rogaeva, E. ve Robertson, J., (2016). "C9orf72 isoforms in

- amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration”, *Brain Research*, 1647:43-49.
- [52] Farg, M.A., Sundaramoorthy, V., Sultana, J.M., Yang, S., Atkinson, R.A., Levina, V., Halloran, M.A., Gleeson, P.A., Blair, I.P., Soo, K.Y., King, A.E. ve Atkin, J.D., (2014). “C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking”, *Human Molecular Genetics*, 23(13):3579-3595.
 - [53] Kumar, V., Kashav, T., Islam, A., Ahmad, F. ve Hassan, M.I., (2016) “Structural insights into C9orf72 hexanucleotide repeat expansions: Towards new therapeutic targets in FTD-ALS”, *Neurochem Int.*, 100:11-20.
 - [54] Xiao, S., MacNair, L., McGoldrick, P., McKeever, P.M., McLean, J.R., Zhang, M., Keith, J., Zinman, L., Rogaeva, E. ve Robertson, J., (2015). “Isoform-specific antibodies reveal distinct subcellular localizations of C9orf72 in amyotrophic lateral sclerosis”, *Ann. Neurol.*, 78(4):568-583.
 - [55] Scotter, E.L., Smyth, L., Bailey, J.A.W.T., Wong, C.H., de Majo, M., Vance, C.A., Synek, B.J., Turner, C., Pereira, J., Charleston, A., Waldvogel, H.J., Curtis, M.A., Dragunow, M., Shaw, C.E., Smith, B.N. ve Faull, R.L.M., (2016). “C9ORF72 and UBQLN2 mutations are causes of amyotrophic lateral sclerosis in New Zealand: a genetic and pathologic study using banked human brain tissue”, *Neurobiol. Aging*, 49:214.e1-214.e5.
 - [56] Zhang, Y.J., Jansen-West, K., Xu, Y.F., Gendron, T.F., Bieniek, K.F., Lin, W.L., Sasaguri, H., Caulfield, T., Hubbard, J., Daugherty, L., Chew, J., Belzil, V.V., Prudencio, M., Stankowski, J.N., Castanedes-Casey, M., Whitelaw, E., Ash, P.E., DeTure, M., Rademakers, R., Boylan, K.B., Dickson, D.W. ve Petrucelli, L., (2014). “Aggregation-prone c9FTD/ALS poly(GA) RAN-translated proteins cause neurotoxicity by inducing ER stress”, *Acta Neuropathol.*, 128(4):505-524.
 - [57] Foran, E. ve Trotti, D., (2009). “Glutamate Transporters and the Excitotoxic Path to Motor Neuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis”, *Antioxid Redox Signal.*, 11(7):1587-1602.
 - [58] Le Verche, V., Ikiz, B., Jacquier, A., Przedborski, S. ve Re, D., (2010). “Glutamate pathway implication in amyotrophic lateral sclerosis: what is the signal in the noise?”, *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*, 2011(4):1-22.
 - [59] Rao, S.D. ve Weiss, J.H., (2004). “Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis”, 27(1):17-23.
 - [60] Van Damme, P., Braeken, D., Callewaert, G., Robberecht, W. ve Van Den Bosch, L., (2005). “GluR2 deficiency accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis”, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 64:605–612.

- [61] Kawahara, Y., Ito, K., Sun, H., Aizawa, H., Kanazawa, I., Kwak, S., (2004). "Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons", *Nature*, 427(6977):801.
- [62] Takuma, H., Kwak, S., Yoshizawa, T. ve Kanazawa, I., (1999). "Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis", *Ann Neurol.*, 46(6):806-815.
- [63] Texido, L., Hernandez, S., Martin-Satue, M., Povedano, M., Casanovas, A., Esquerda, J., Marsal, J. ve Solsona, C., (2011). "Sera from amyotrophic lateral sclerosis patients induce the non-canonical activation of NMDA receptors "in vitro"", *Neurochem. Int.*, 59(6):954–964.
- [64] Alexianu, M.E., Ho, B.K., Mohamed, A.H., La Bella, V., Smith, R.G. ve Appel, S.H., (1994). "The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis", *Ann. Neurol.*, 36(6):846–858.
- [65] Beers, D.R., Ho, B.K., Siklós, L., Alexianu, M.E., Mosier, D.R., Mohamed, A.H., Otsuka, Y., Kozovska, M.E., McAlhany, R.E., Smith, R.G. ve Appel, S.H., (2001). "Parvalbumin overexpression alters immunemediated increases in intracellular calcium, and delays disease onset in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis", *J. Neurochem.*, 79(3):499–509.
- [66] Van Den Bosch, L., Schwaller, B., Vlemminckx, V., Meijers, B., Stork, S., Ruehlicke, T., Van Houtte, E., Klaassen, H., Celio, M.R., Missiaen, L., Robberecht, W. ve Berchtold, M.W., (2002). "Protective effect of parvalbumin on excitotoxic motor neuron death", *Exp. Neurol.* 174(2):150–161.
- [67] Perry, T.L., Krieger, C., Hansen, S. ve Eisen, A., (1990). "Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid", *Ann. Neurol.*, 28(1):12–17.
- [68] Shaw, P.J., Forrest, V., Ince, P.G., Richardson, J.P. ve Wastell, H.J., (1995). "CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients", *Neurodegeneration*, 4(2):209–216.
- [69] Lin, C.L., Bristol, L.A., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Crawford, T., Clawson, L. ve Rothstein, J.D., (1998). "Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis", *Neuron*, 20(3):589–602.
- [70] Trotti, D., Rolfs, A., Danbolt, N.C., Brown, R.H.Jr. ve Hediger, M.A., (1999). "SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter", *Nat. Neurosci.*, 2(5):427–433.
- [71] Bruijn, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L. ve Cleveland, D.W., (1997). "ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes

and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions”, *Neuron*, 18(2):327–338.

- [72] Boston-Howes, W., Gibb, S.L., Williams, E.O., Pasinelli, P., Brown, R.H.Jr. ve Trotti, D., (2006). “Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2”, *J. Biol. Chem.*, 281(20):14076–14084.
- [73] Allen, M.J., Lacroix, J.J., Ramachandran, S., Capone, R., Whitlock, J.L., Ghadge, G.D., Arnsdorf, M.F., Roos, R.P. ve Lal, R., (2011). “Mutant SOD1 forms ion channel: implications for ALS pathophysiology”, *Neurobiol. Dis.*, 45(3):831–838.
- [74] Pedersen, W.A., Fu, W., Keller, J.N., Markesbery, W.R., Appel, S., Smith, R.G., Kasarskis, E. ve Mattson, M.P., (1998). “Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients”, *Ann. Neurol.*, 44(5):819–824.
- [75] Deitch, J.S., Alexander, G.M., Del Valle, L. ve Heiman-Patterson, T.D., (2002). “GLT-1 glutamate transporter levels are unchanged in mice expressing G93A human mutant SOD1”, *J. Neurol. Sci.*, 193(2):117–126.
- [76] Appel, S.H. ve Simpson, E.P., (2001). “Activated microglia: the silent executioner in neurodegenerative disease?”, *Curr. Neurol. Neurosci.*, 1(4):303–305.
- [77] McGeer, P.L. ve McGeer, E.G., (2002). “Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis”, *Muscle Nerve*, 26(4):459–470.
- [78] Turner, M.R., Bowser, R., Bruijn, L., Dupuis, L., Ludolph, A., McGrath, M., Manfredi, G., Maragakis, N., Miller, R.G., Pullman, S.L., Rutkove, S.B., Shaw, P.J., Shefner, J. ve Fischbeck, K.H., (2013). “Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis”, *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 14(1):19-32.
- [79] Beal, M.F., Ferrante, R.J., Browne, S.E., Matthews, R.T., Kowall, N.W. ve Brown, R.H.Jr., (1997). “Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis”, *Ann. Neurol.*, 42(4):644-654.
- [80] Duan, W., Li, X., Shi, J., Guo, Y., Li, Z. ve Li, C., (2010). “Mutant TAR DNA-binding protein-43 induces oxidative injury in motor neuron-like cell”, *Neuroscience.*, 169(4):1621–1629.
- [81] Costa, J., Gomes, C. ve de Carvalho, M., (2010). “Diagnosis, pathogenesis and therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis”, *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9(6):764-768.
- [82] Harraz, M.M., Marden, J.J., Zhou, W., Zhang, Y., Williams, A., Sharov, V.S., Nelson, K., Luo, M., Paulson, H., Schöneich, C. ve Engelhardt, J.F., (2008). “SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model”, *J. Clin. Invest.*, 118(2):659–670.

- [83] Wu, D.C., Re, D.B., Nagai, M., Ischiropoulos, H. ve Przedborski, S., (2006). "The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice", *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103(32):12132–12137.
- [84] Marden, J.J., Harraz, M.M., Williams, A.J., Nelson, K., Luo, M., Paulson, H. ve Engelhardt, J.F., (2007). "Redox modifier genes in amyotrophic lateral sclerosis in mice", *J. Clin. Invest.*, 117(10):2913–2919.
- [85] Crow, J.P., Sampson, J.B., Zhuang, Y., Thompson, J.A. ve Beckman, J.S., (1997). "Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite", *J. Neurochem.*, 69(5):1936–1944.
- [86] Beckman, J.S., Estévez, A.G., Crow, J.P. ve Barbeito, L., (2001). "Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS", *Trends Neurosci.*, 24(11):15-20.
- [87] Estévez, A.G., Crow, J.P., Sampson, J.B., Reiter, C., Zhuang, Y., Richardson, G.J., Tarpey, M.M., Barbeito, L. ve Beckman, J.S., (1999). "Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase", *Science*, 286(5449):2498–2500.
- [88] Urushitani, M. ve Shimohama, S., (2001). "The role of nitric oxide in amyotrophic lateral sclerosis", *Amyotroph Lateral Sclerosis Other Motor Neuron Disord.*, 2(2):71-81.
- [89] Soto, C., (2003). "Unfolding the role of protein misfolding in neurodegeneration diseases", *Nature Reviews Neuroscience*, 4(1):49-60.
- [90] Okamoto, K., Mizuno, Y. ve Fujita, Y., (2008). "Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis", *Neuropathology*, 28(2):109-115.
- [91] Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., McCluskey, L.F., Miller, B.L., Masliah, E., Mackenzie, I.R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H.A., Trojanowski, J.Q. ve Lee V.M., (2006). "Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis", *Science*, 314(5796):130–133.
- [92] Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., Baralle, F., de Belleruche, J., Mitchell, J.D., Leigh, P.N., Al-Chalabi, A., Miller, C.C., Nicholson, G. ve Shaw, C.E., (2008). "TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis", *Science*, 319(5870):1668–1672.
- [93] Groen, E.J.N., van Es, M.A., van Vught, P.W.J., Spliet, W.G.M., van Engelen-Lee, J., de Visser, M., Wokke, J.H.J., Schelhaas, H.J., Ophoff, R.A., Fumoto, K., Pasterkamp, R.J., Dooijes, D., Cuppen, E., Veldink, J.H. ve van den Berg, L.H.,

- (2010). "FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis in the Netherlands", *Arch. Neurol.*, 67(2):224–230.
- [94] Hewitt, C., Kirby, J., Highley, J.R., Hartley, J.A., Hibberd, R., Hollinger, H.C., Williams, T.L., Ince, P.G., McDermott, C.J. ve Shaw, P.J., (2010). "Novel FUS/TLS mutations and pathology in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis", *Arch. Neurol.*, 67(4):455–461.
- [95] Bosco, D. A., Morfini, G., Karabacak, N.M., Song, Y., Gros-Louis, F., Pasinelli, P., Goolsby, H., Fontaine, B.A., Lemay, N., McKenna-Yasek, D., Frosch, M.P., Agar, J.N., Julien, J.P., Brady, S.T., ve Brown, R.H.Jr., (2010). "Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS" *Nat. Neurosci.*, 13(11):1396–1403.
- [96] Ince, P.G., Tomkins, J., Slade, J.Y., Thatcher, N.M. ve Shaw, P.J., (1998). "Amyotrophic lateral sclerosis associated with genetic abnormalities in the gene encoding Cu/Zn superoxide dismutase: molecular pathology of five new cases, and comparison with previous reports and 73 sporadic cases of ALS", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57(10):895–904.
- [97] Sobue, G., Hashizume, Y., Yasuda, T., Mukai, E., Kumagai, T., Mitsuma, T. ve Trojanowski, J.Q., (1990). "Phosphorylated high molecular weight neurofilament protein in lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases involving ventral horn cells", *Acta Neuropathol.*, 79(4):402–408.
- [98] Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A.J., Sendtner, M. ve Shaw, P.J., (2011). "Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis", *Nature Reviews Neurology*, 7(11):616-630.
- [99] Menzies, F.M., Cookson, M.R., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M.A., Dong, L., Figlewicz, D.A. ve Shaw, P.J., (2002). "Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis", *Brain*, 125(7):1522–1533.
- [100] Kong, J. ve Xu, Z., (1998). "Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1", *J. Neurosci.*, 18(9):3241–3250.
- [101] Wiedemann, F.R., Winkler, K., Kuznetsov, A.V., Bartels, C., Vielhaber, S., Feistner, H. ve Kunz, W.S., (1998). "Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis", *J. Neurol. Sci.*, 156(1):65–72.
- [102] Borthwick, G.M., Johnson, M.A., Ince, P.G., Shaw, P.J. ve Turnbull, D.M., (1999). "Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death", *Ann. Neurol.*, 46(5):787–790.

- [103] Fujita, K., Yamauchi, M., Shibayama, K., Ando, M., Honda, M. ve Nagata, Y., (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(3):276–281.
- [104] Wiedemann, F.R., Manfredi, G., Mawrin, C., Beal, M.F. ve Schon, E.A., (2002). "Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients", *J. Neurochem.*, 80(4):616–625.
- [105] Nakano, Y., Hirayama, K. ve Terao, K., (1987). "Hepatic ultrastructural changes and liver dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis", *Arch. Neurol.*, 44(1):103–106.
- [106] Curti, D., Malaspina, A., Facchetti, G., Camana, C., Mazzini, L., Tosca, P., Zerbi, F. ve Ceroni, M., (1996). "Amyotrophic lateral sclerosis: oxidative energy metabolism and calcium homeostasis in peripheral blood lymphocytes", *Neurology*, 47(4):1060–1064.
- [107] Vielhaber, S., Kunz, D., Winkler, K., Wiedemann, F.R., Kirches, E., Feistner, H., Heinze, H.J., Elger, C.E., Schubert, W. ve Kunz, W.S., (2000). "Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis", *Brain*, 123(7):1339-1348.
- [108] Field, L.S., Furukawa, Y., O'Halloran, T.V. ve Culotta, V.C., (2003). "Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria", *J. Biol. Chem.*, 278(20):28052–28059.
- [109] Liu, J., Lillo, C., Jonsson, P.A., Vande Velde, C., Ward, C.M., Miller, T.M., Subramaniam, J.R., Rothstein, J.D., Marklund, S., Andersen, P.M., Brannstrom, T., Gredal, O., Wong, P.C., Williams, D.S. ve Cleveland, D.W., (2004). "Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria", *Neuron*, 43(1):5–17.
- [110] Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W. ve Price, D.L., (1995). "An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria", *Neuron*, 14(6):1105–1116.
- [111] Hwang, H., Zhang, J., Chung, K.A., Leverenz, J.B., Zabetian, C.P., Peskind, E.R., Jankovic, J., Su, Z., Hancock, A.M., Pan, C., Montine, T.J., Pan, S., Nutt, J., Albin, R., Gearing, M., Beyer, R.P., Shi, M. ve Zhang, J., (2010). "Glycoproteomics in neurodegenerative diseases", *Mass. Spectrom. Rev.*, 29(1):79-125.
- [112] Simpson, E.P., Henry, Y.K., Henkel, J.S., Smith, R.G. ve Appel, S.H., (2004). "Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden", *Neurology*, 62(10):1758-1765.
- [113] Palma, A., de Carvalho, M., Barata, N., Evangelista, T., Chicau, P., Regalla, M. ve Costa, J., (2005). "Biochemical characterization of plasma in amyotrophic

lateral sclerosis: amino acid and protein composition", *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.*, 6(2):104-110.

- [114] Shaw, I.C., Fitzmaurice, P.S., Mitchell, J.D. ve Lynch, P.G., (1995). "Studies on cellular free radical protection mechanisms in the anterior horn from patients with amyotrophic lateral sclerosis", *Neurodegeneration* 4(4):391–396.
- [115] Shibata, N., (2001). "Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation", *Neuropathology*, 21(1):82–92.
- [116] Shibata, N., Hirano, A., Hedley-Whyte, E.T., Dal Canto, M.C., Nagai, R., Uchida, K., Horiuchi, S., Kawaguchi, M., Yamamoto, T. ve Kobayashi, M., (2002). "Selective formation of certain advanced glycation end products in spinal cord astrocytes of humans and mice with superoxide dismutase-1 mutation", *Acta Neuropathol.*, 104(2):171–178.
- [117] Damiano, M., Starkov, A.A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint Beal, M. ve Manfredi, G., (2006). "Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice", *J. Neurochem.* 96(5):1349–1361.
- [118] Parone, P.A., Da Cruz, S., Han, J.S., McAlonis-Downes, M., Vetto, A.P., Lee, S.K., Tseng, E. ve Cleveland, D.W., (2013). "Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis", *J. Neurosci.*, 33(33):4657–4671.
- [119] Pasinelli, P., Belford, M.E., Lennon, N., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., Trotti, D. ve Brown Jr., R.H., (2004). "Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria", *Neuron*, 43(1):19–30.
- [120] Wang, W., Li, L., Lin, W.-L., Dickson, D.W., Petrucelli, L., Zhang, T. ve Wang, X., (2013). "The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons", *Hum. Mol. Genet.*, 22(23):4706–4719.
- [121] Xu, Y.-F., Gendron, T.F., Zhang, Y.-J., Lin, W.-L., D'Alton, S., Sheng, H., Casey, M.C., Tong, J., Knight, J., Yu, X., Rademakers, R., Boylan, K., Hutton, M., McGowan, E., Dickson, D.W., Lewis, J. ve Petrucelli, L., (2010). "Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice", *J. Neurosci.* 30(32):10851–10859.
- [122] Sasaki, S. ve Iwata, M., (1996). "Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis". *Neurology*, 47(2):535–540.

- [123] Sasaki, S., Warita, H., Abe, K. ve Iwata, M., (2005). "Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene", *Acta Neuropathol.*, 110(1):48–56.
- [124] De Vos, K.J., Grierson, A.J., Ackerley, S. ve Miller, C.C.J., (2008). "Role of axonal transport in neurodegenerative diseases", *Annu. Rev. Neurosci.*, 31:151–173.
- [125] De Vos, K. J., Chapman, A.L., Tennant, M.E., Manser, C., Tudor, E.L., Lau, K.F., Brownlees, J., Ackerley, S., Shaw, P.J., McLoughlin, D.M., Shaw, C.E., Leigh, P.N., Miller, C.C.J. ve Grierson, A.J., (2007). "Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content", *Hum. Mol. Genet.*, 16(22):2720–2728.
- [126] Miller, K. E. ve Sheetz, M. P., (2004). "Axonal mitochondrial transport and potential are correlated", *J. Cell Sci.*, 117(13):2791–2804.
- [127] Tateno, M., Kato, S., Sakurai, T., Nukina, N., Takahashi, R. ve Araki, T., (2009). "Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3", *Hum. Mol. Genet.*, 18(5):942–955.
- [128] Rao, M. V. ve Nixon, R. A., (2003). "Defective neurofilament transport in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis: a review", *Neurochem. Res.*, 28(7):1041–1047.
- [129] Hirano, A., Donnenfeld, H., Sasaki, S. ve Nakano, I., (1984). "Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 43(5):461–470.
- [130] Julien, J.P., (1997). "Neurofilaments and motor neuron disease", *Trends Cell Biol.*, 7(6):243–249.
- [131] Julien, J.P., Couillard-Despres, S. ve Meier, J., (1998). "Transgenic mice in the study of ALS: the role of neurofilaments", *Brain Pathol.*, 8(4):759–769.
- [132] Schmidt, M.L., Carden, M.J., Lee, V.M. ve Trojanowski, J.Q., (1987). "Phosphate dependent and independent neurofilament epitopes in the axonal swellings of patients with motor neuron disease and controls", *Lab. Invest.*, 56(3):282–294.
- [133] Ackerley, S., Thornhill, P., Grierson, A.J., Brownlees, J., Anderton, B.H., Leigh, P.N., Shaw, C.E. ve Miller, C.C., (2003). "Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments", *J. Cell Biol.*, 161(3):489–495.
- [134] Brownlees, J., Yates, A., Bajaj, N.P., Davis, D., Anderton, B.H., Leigh, P.N., Shaw, C.E. ve Miller, C.C., (2000). "Phosphorylation of neurofilament heavy chain side-arms by stress activated protein kinase-1b/Jun N terminal kinase 3", *J. Cell Sci.*, 113(3):401–407.

- [135] Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., Le Paslier, D., Frezal, J., Cohen, D., Weissenbach, J., Munnich, A. ve Melki, J., (1995). "Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene", *Cell*, 80(1):155–165.
- [136] Burghes, A.H. ve Beattie, C.E., (2009). "Spinal muscular atrophy: Why do low levels of SMN make motor neurons sick?", *Nat. Rev. Neurosci.*, 10(8):597–609.
- [137] Mackenzie, I.R., Rademakers, R. ve Neumann, M., (2010). "TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia", *Lancet Neurol.*, 9(10):995-1007.
- [138] Liu-Yesucevitz, L., Bilgutay, A., Zhang, Y.J., Vanderweyde, T., Citro, A., Mehta, T., Zaarur, N., McKee, A., Bowser, R., Sherman, M., Petrucelli, L. ve Wolozin, B., (2010). "Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue", *PLoS One*, 5(10):e13250.
- [139] Ito, D., Seki, M., Tsunoda, Y., Uchiyama, H. ve Suzuki, N., (2011). "Nuclear transport impairment of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations in FUS/TLS", *Ann. Neurol.*, 69(1):152–162.
- [140] Dormann, D., , Rodde, R., Edbauer, D., Bentmann, E., Fischer, I., Hruscha, A., Than, M.E., Mackenzie, I.R., Capell, A., Schmid, B., Neumann, M. ve Haass, C., (2010). "ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import", *EMBO J.*, 29(16):2841–2857.
- [141] Sephton, C.F., Cenik, C., Kucukural, A., Dammer, E.B., Cenik, B., Han, Y., Dewey, C.M., Roth, F.P., Herz, J., Peng, J., Moore, M.J. ve Yu, G., (2011). "Identification of neuronal RNA targets of TDP-43 containing ribonucleoprotein complexes", *J. Biol. Chem.*, 286(2):1204-1215.
- [142] Greenway, M.J., Andersen, P.M., Russ, C., Ennis, S., Cashman, S., Donaghy, C., Patterson, V., Swingler, R., Kieran, D., Prehn, J., Morrison, K.E., Green, A., Acharya, K.R., Brown, R.H.Jr. ve Hardiman, O., (2006). "ANG mutations segregate with familial and "sporadic" amyotrophic lateral sclerosis", *Nat. Genet.*, 38(4):411–413.
- [143] 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. ve Chance, P.F., (2004). "DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4)", *Am. J. Hum. Genet.*, 74(6):1128–1135.
- [144] Kieran, D., Sebastia, J., Greenway, M.J., King, M.A., Connaughton, D., Concannon, C.G., Fenner, B., Hardiman, O. ve Prehn, J.H., (2008). "Control of motoneuron survival by angiogenin", *J. Neurosci.*, 28(52):14056–14061.

- [145] Li, S., Yu, W. ve Hu, G. F., (2012). "Angiogenin inhibits nuclear translocation of apoptosis inducing factor in a Bcl-2 dependent manner", *J. Cell Physiol.*, 227(4):1639-1644.
- [146] Karademir, B., Corek, C. ve Ozer, N.K., (2015). "Endoplasmic reticulum stress and proteasomal system in amyotrophic lateral sclerosis", *Free Radic Biol Med.*, 88:42-50.
- [147] Ito, Y., Yamada, M., Tanaka, H., Aida, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hozumi, I., Inuzuka, T., Takahashi, H. ve Hara, H., (2009). "Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice", *Neurobiol. Dis.*, 36(3):470–476.
- [148] Atkin, J.D., Farg, M.A., Turner, B.J., Tomas, D., Lysaght, J.A., Nunan, J., Rembach, A., Nagley, P., Beart, P.M., Cheema, S.S. ve Horne, M.K., (2006). "Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1", *J. Biol. Chem.*, 281(40):30152–30165;(Retracted Article).
- [149] Saxena, S., Cabuy, E. ve Caroni, P., (2009). "A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice", *Nat. Neurosci.*, 12(5):627–636.
- [150] Atkin, J.D., Farg, M.A., Walker, A.K., McLean, C., Tomas, D. ve Horne, M.K., (2008). "Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis", *Neurobiol. Dis.*, 30(3):400–407.
- [151] Vijayalakshmi, K., Alladi, P.A., Ghosh, S., Prasanna, V.K., Sagar, B.C., Nalini, A., Sathyaprabha, T.N. ve Raju, T.R., (2011). "Evidence of endoplasmic reticular stress in the spinal motor neurons exposed to CSF from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients", *Neurobiol. Dis.*, 41(3):695–705.
- [152] Bernard-Marissal, N., Medard, J.J., Azzedine, H. ve Chrast, R., (2015). "Dysfunction in endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk underlies SIGMAR1 loss of function mediated motor neuron degeneration", *Brain*, 138(4):875–890.
- [153] Kabashi, E. ve Durham, H.D., (2006). "Failure of protein quality control in amyotrophic lateral sclerosis", *Biochim. Biophys. Acta*, 1762(11-12):1038-1050.
- [154] Levine, B. ve Klionsky, D.J., (2004). "Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy", *Dev. Cell*, 6(4):463–477.
- [155] Kostic, V., Jackson-Lewis, V., de Bilbao, F., Dubois-Dauphin, M. ve Przedborski, S., (1997). "Bcl-2: prolonging life in a transgenic Mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis", *Science*, 277(5325):559–562.
- [156] Li, M., Ona, V.O., Guégan, C., Chen, M., Jackson-Lewis, V., Andrews, L.J., Olszewski, A.J., Stieg, P.E., Lee, J.P., Przedborski, S. ve Friedlander, R.M.,

- (2000). "Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model", *Science*, 288(5464):335–339.
- [157] Pasinelli, P., Houseweart, M.K., Brown, R.H. ve Cleveland, D.W., (2000). "Caspase-1, and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis", *PNAS*, 97(25):13901–13906.
- [158] Inoue, H., Tsukita, K., Iwasato, T., Suzuki, Y., Tomioka, M., Tateno, M., Nagao, M., Kawata, A., Saido, T.C., Miura, M., Misawa, H., Itohara, S. ve Takahashi, R., (2003). "The crucial role of caspase-9 in the disease progression of a transgenic ALS mouse model", *EMBO J.*, 22(24):6665–6674.
- [159] Kalmar, B., Lu, C.H. ve Greensmith, L., (2014). "The role of heat shock proteins in Amyotrophic Lateral Sclerosis: The therapeutic potential of Arimoclomol", *Pharmacol. Ther.*, 141(1):40–54.
- [160] Morimoto, R.I., Kroeger, P.E. ve Cotto, J.J., (1996). "The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions", *EXS*, 77:139–163.
- [161] Sabirzhanov, B., Stoica, B.A., Hanscom, M., Piao, C.S. ve Faden, A.I., (2012). "Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase-independent pathways and inhibits neuronal apoptosis", *J. Neurochem.*, 123(4):542–554.
- [162] Gorman, A.M., Szegezdi, E., Quigney, D.J. ve Samali, A., (2005). "Hsp27 inhibits 6-hydroxydopamine-induced cytochrome c release and apoptosis in PC12 cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 327(3):801–810.
- [163] Troost, D., Van den Oord, J.J. ve Vianney de Jong, J.M., (1990). "Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis", *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 16(5):401–410.
- [164] Zhao, W., Beers, D.R. ve Appel, S.H., (2013). "Immune-mediated mechanisms in the pathoprogession of amyotrophic lateral sclerosis", *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 8(4):888–899.
- [165] Henkel, J.S., Engelhardt, J.I., Siklos, L., Simpson, E.P., Kim, S.H., Pan, T., Goodman, J.C., Siddique, T., Beers, D.R. ve Appel, S.H., (2004). "Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue", *Ann. Neurol.*, 55(2):221–235.
- [166] Sta, M., Sylva-Steenland, R.M.R., Casula, M., de Jong, J.M.B.V., Troost, D., Aronica, E. ve Baas, F., (2011). "Innate and adaptive immunity in amyotrophic lateral sclerosis: evidence of complement activation", *Neurobiol. Dis.*, 42(3):211–220.
- [167] Kuhle, J., Lindberg, R.L.P., Regeniter, A., Mehling, M., Steck, A.J., Kappos, L. ve Czaplinski, A., (2009). "Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis", *Eur. J. Neurol.*, 16(6):771–774.

- [168] Ferraiuolo, L., Heath, P.R., Holden, H., Kasher, P., Kirby, J. ve Shaw, P.J., (2007). "Microarray analysis of the cellular pathways involved in the adaptation to and progression of motor neuron injury in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS", *J. Neurosci.*, 27(34):9201–9219.
- [169] Lincecum, J.M., Vieira, F.G., Wang, M.Z., Thompson, K., De Zutter, G.S., Kidd, J., Moreno, A., Sanchez, R., Carrion, I.J., Levine, B.A., Al Nakhala, B.M., Sullivan, S.M., Gill, A. ve Perrin, S., (2010). "From transcriptome analysis to therapeutic anti-CD40L treatment in the SOD1 model of amyotrophic lateral sclerosis", *Nat. Genet.*, 42(5):392–399.
- [170] Graber, D.J., Hickey, W.F. ve Harris, B.T., (2010). "Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis", *J. Neuroinflamm.*, 7:8.
- [171] Hensley, K., Mhatre, M., Mou, S., Pye, Q.N., Stewart, C., West, M. ve Williamson, K.S., (2006). "On the relation of oxidative stress to neuroinflammation: lessons learned from the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis", *Antioxid. Redox Signal.*, 8(11-12):2075–2087.
- [172] Di Giorgio, F.P., Boulting, G.L., Bobrowicz, S. ve Eggan, K.C., (2008). "Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation", *Cell Stem Cell*, 3(6):637–648.
- [173] Marchetto, M.C., Muotri, A.R., Mu, Y., Smith, A.M., Cezar, G.G. ve Gage, F.H., (2008). "Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells", *Cell Stem Cell*, 3(6):649–657.
- [174] Kevenaar, J.T. ve Hoogenraad, C.C., (2015). "The axonal cytoskeleton: from organization to function", *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8:44.
- [175] Ishikawa, H., Bischoff, R. ve Holtzer, H., (1968). "Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle", *J. Cell Biol.*, 38(3):538–555.
- [176] Sihag, R.K., Inagaki, M., Yamaguchi, T., Shea, T.B. ve Pant, H.C., (2007). "Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments", *Exp. Cell Press*, 313(10):2098-2109.
- [177] Nixon, R.A. ve Yuan, A. "Cytoskeleton of the Nervous System", Volume 3, Springer, New York, NY, 2011.
- [178] Liu, Q., Xie, F., Siedlak, S.L., Nunomura, A., Honda, K., Moreira, P.I., Zhua, X., Smith, M.A. ve Perry, G., (2004). "Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases", *Cell Mol Life Sci.*, 61(24):3057-3075.
- [179] Petzold, A., (2005). "Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss", *J. Neurol Sci.*, 233(1-2):183-198.
- [180] Al-Chalabi, A. ve Miller, C.C., (2003). "Neurofilaments and neurological disease", *Bioessays*, 25(4):346-355.

- [181] Szaro, B.G. ve Strong, M.J., (2010). "Post-transcriptional control of neurofilaments: New roles in development, regeneration and neurodegenerative disease", *Trends Neurosci.*, 33(1):27-37.
- [182] Yuan, A., Rao, M.V., Veeranna ve Nixon, R.A., (2012). "Neurofilaments at a glance", *J Cell Sci*, 125(14):3257-3263.
- [183] Yabe, J.T., Chan, W.K., Chylinski, T.M., Lee, S., Pimenta, A.F. ve Shea, T.B., (2001). "The predominant form in which neurofilament subunits undergo axonal transport varies during axonal initiation, elongation, and maturation", *Cell Motil Cytoskeleton*, 48(1):61-83.
- [184] Yabe, J.T., Pimenta, A. ve Shea, T.B., (1999). "Kinesin-mediated transport of neurofilament protein oligomers in growing axons", *J Cell Sci*, 112(21):3799-3814.
- [185] Roy, S., Coffee, P., Smith, G., Liem, R.K., Brady, S.T. ve Black, M.M., (2000). "Neurofilaments are transported rapidly but intermittently in axons: implications for slow axonal transport", *J Neurosci*, 20(18):6849-6861.
- [186] Wang, L., Ho, C.L., Sun, D., Liem, R.K. ve Brown, A., (2000). "Rapid movement of axonal neurofilaments interrupted by prolonged pauses", *Nat Cell Biol*, 2(3):137-141.
- [187] Brown, A., (2000). "Slow axonal transport: stop and go traffic in the axon", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1(2):153-156.
- [188] Yan, Y., ve Brown, A., (2005). "Neurofilament polymer transport in axons", *J. Neurosci.*, 25(30):7014-7021.
- [189] Pant, H.C., Veeranna ve Grant, P., (2000). "Regulation of axonal neurofilament phosphorylation", *Curr. Top. Cell Regul.*, 36:133-150.
- [190] Perrot, R., Berges, R., Bocquet, A. ve Eyer, J., (2008). "Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration", *Mol. Neurobiol.*, 38(1):27-65.
- [191] Lasek R.J. ve Hoffman, P.N., (1976). "The neuronal cytoskeleton, axonal transport and axonal growth", *Cell Motility*, 3:1021-1049.
- [192] Roots, B.I., (1983). "Neurofilament accumulation induced in synapses by leupeptin", *Science*, 221(4614):971-972.
- [193] Gong, C.X., Wang, J.Z., Iqbal, K. ve Grundke-Iqbal, I., (2003). "Inhibition of protein phosphatase 2A induces phosphorylation and accumulation of neurofilaments in metabolically active rat brain slices", *Neurosci. Lett.*, 340(2):107-110.
- [194] Gou, J.P. ve Leterrier, J.F., (1995). "Possible involvement of ubiquitination in neurofilament degradation", *Biochem Biophys Res Commun*, 217(2):529-538.

- [195] Friede, R.L. ve Samorajski, T., (1970). "Axon caliber related to neurofilaments and microtubules in sciatic nerve fibers of rats and mice", *Anat Rec.*, 167(4):379–387.
- [196] Julien, J.P., (1999). "Neurofilament functions in health and disease", *Curr Opin Neurobiol.*, 9(5):554-560.
- [197] Ohara, O., Gahara, Y., Miyake, T., Teraoka, H. ve Kitamura, T., (1993). "Neurofilament deficiency in quail caused by nonsense mutation in neurofilament-L gene", *J. Cell Biol.*, 121(2):387–395.
- [198] Sakaguchi, T., Okada, M., Kitamura, T. ve Kawasaki, K., (1993). "Reduced diameter and conduction velocity of myelinated fibers in the sciatic nerve of a neurofilament-deficient mutant quail", *Neurosci. Lett.*, 153(1):65–68.
- [199] Zhao, J. X., Ohnishi, A., Itakura, C., Mizutani, M., Yamamoto, T., Hayashi, H. ve Murai, Y., (1994). "Greater number of microtubules per axon of unmyelinated fibers of mutant quails deficient in neurofilaments: possible compensation for the absence of neurofilaments", *Acta Neuropathol.*, 87(4):332–336.
- [200] Eyer, J. ve Peterson, A., (1994). "Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein", *Neuron*, 12(2):389–405.
- [201] Kumar, S. ve Hoh, J.H., (2004). "Modulation of repulsive forces between neurofilaments by sidearm phosphorylation", *Biochem Biophys Res Commun*, 324(2):489–496.
- [202] Elder, G.A., Friedrich, V.L.Jr., Bosco, P., Kang, C., Gourov, A., Tu, P.H., Lee, V.M. ve Lazzarini, R.A., (1998). "Absence of the mid-sized neurofilament subunit decreases axonal calibers, levels of light neurofilament (NF-L), and neurofilament content", *J Cell Biol*, 141(3):727-739.
- [203] Jacomy, H., Zhu, Q., Couillard-Després, S., Beaulieu, M. ve Julien, J.P., (1999). "Disruption of type IV intermediate filament network in mice lacking the neurofilament medium and heavy subunits", *J Neurochem*, 73(3):972-984.
- [204] Rao, M.V., Houseweart, M.K., Williamson, T.L., Crawford, T.O., Folmer, J. ve Cleveland, D.W., (1998). "Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation", *J Cell Biol*, 143(1):171-181.
- [205] Zhu, Q., Lindenbaum, M., Levavasseur, F., Jacomy, H. ve Julien, J.P., (1998). "Disruption of the NF-H gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: relief of axonopathy resulting from the toxin beta,beta'-iminodipropionitrile", *J Cell Biol*, 143(1):183-193.
- [206] Qiao, X., Zhang, S., Zhao, W., Ye, H., Yang, Y., Zhang, Z., Miao, Q., Hu, R., Li, Y. ve Lu, B., (2015). "Serum phosphorylated neurofilament-heavy chain, a

potential biomarker, is associated with peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes", *Medicine*, 94(44):e1908.

- [207] McLachlan, D.R., Lukiw, W.J., Wong, L., Bergeron, C. ve Bech-Hansen, N.T., (1988). "Selective messenger RNA reduction in Alzheimer's disease", *Brain Research*, 427(3):255-261.
- [208] Bergeron, C., Beric-Maskarel, K., Muntasser, S., Weyer, L., Somerville, M.J. ve Percy, M.E., (1994). "Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motor neurons", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 53(3):221-230.
- [209] Wong, N.K., He, B.P. ve Strong, M.J., (2000). "Characterization of neuronal intermediate filament protein expression in cervical spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS)", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 59(11):972-982.
- [210] Menzies, F.M., Grierson, A.J., Cookson, M.R., Heath, P.R., Tomkins, J., Figlewicz, D.A., Ince, P.G. ve Shaw, P.J., (2002). "Selective loss of neurofilament expression in Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) linked amyotrophic lateral sclerosis", *J. Neurochem.*, 82(5):1118-1128.
- [211] Xu, Z., Cork, L.C., Griffin, J.W. ve Cleveland, D.W., (1993). "Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease", *Cell*, 73(1):23-33.
- [212] Wong, P.C., Marszalek, J., Crawford, T.O., Xu, Z., Hsieh, S.T., Griffin, J.W. ve Cleveland, D.W., (1995). "Increasing neurofilament subunit NF-M expression reduces axonal NF-H, inhibits radial growth, and results in neurofilamentous accumulation in motor neurons", *J. Cell Biol.*, 130(6):1413-1422.
- [213] Cote, F., Collard, J.F. ve Julien, J.P., (1993). "Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis", *Cell*, 73(1):35-46.
- [214] Rouleau, G.A., Clark, A.W., Rooke, K., Pramatarova, A., Krizus, A., Suchowersky, O., Julien, J.P. ve Figlewicz, D., (1996). "SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis", *Ann Neurol*, 39(1):128-131.
- [215] Munoz, D.G., Greene, C., Perl, D.P. ve Selkoe, D.J., (1988). "Accumulation of phosphorylated neurofilaments in anterior horn motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis patients", *J Neuropathol Exp Neurol*, 47(1):9-18.
- [216] Tu, P.H., Raju, P., Robinson, K.A., Gurney, M.E., Trojanowski, J.Q. ve Lee, V.M., (1996). "Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions", *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(7):3155-3160.

- [217] Borchelt, D.R., Wong, P.C., Becher, M.W., Pardo, C.A., Lee, M.K., Xu, Z.S., Thinakaran, G., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., Price, D.L. ve Hoffman, P.N., (1998). "Axonal transport of mutant superoxide dismutase 1 and focal axonal abnormalities in the proximal axons of transgenic mice", *Neurobiol Dis*, 5(1):27-35.
- [218] Manetto, V., Sternberger, N.H., Perry, G., Sternberger, L.A. ve Gambetti, P., (1988). "Phosphorylation of neurofilaments is altered in amyotrophic lateral sclerosis", *J Neuropathol Exp Neurol*, 47(6):642–653.
- [219] Morrison, B.M., Gordon, J.W., Ripps, M.E. ve Morrison, J.H., (1996). "Quantitative immunocytochemical analysis of the spinal cord in G86R superoxide dismutase transgenic mice: neurochemical correlates of selective vulnerability", *J Comp Neurol*, 373(4):619–631.
- [220] Tortelli, R., Ruggieri, M., Cortese, R., D'Errico, E., Capozzo, R., Leo, A., Mastrapasqua, M., Zoccolella, S., Leante, R., Livrea, P., Logroscino, G. ve Simone, I.L. (2012). "Elevated cerebrospinal fluid neurofilament light levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a possible marker of disease severity and progression", *Eur. J. Neurol.*, 19(12):1561-1567.
- [221] Morrison, B.M., Shu, I.W., Wilcox, A.L., Gordon, J.W. ve Morrison, J.H., (2000). "Early and selective pathology of light chain neurofilament in the spinal cord and sciatic nerve of G86R mutant superoxide dismutase transgenic mice", *Exp Neurol*, 165(2):207–220.
- [222] Chen, H., Qian, K., Du, Z., Cao, J., Petersen, A., Liu, H., Blackburn, L.W. 4th, Huang, C.L., Errigo, A., Yin, Y., Lu, J., Ayala, M. ve Zhang, S.C., (2014). "Modelling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons", *Cell Stem Cell*, 14(6):796-809.
- [223] Oeckl, P., Jardel, C., Salachas, F., Lamari, F., Andersen, P.M., Bowser, R., de Carvalho, M., Costa, J., van Damme, P., Gray, E., Grosskreutz, J., Hernández-Barral, M., Herukka, S.K., Huss, A., Jeromin, A., Kirby, J., Kuzma-Kozakiewicz, M., Amador, M.del M., Mora, J.S., Morelli, C., Muckova, P., Petri, S., Poesen, K., Rhode, H., Rikardsson, A.K., Robberecht, W., Rodríguez Mahillo, A.I., Shaw, P., Silani, V., Steinacker, P., Turner, M.R., Tüzün, E., Yetimler, B., Ludolph, A.C., Otto, M., (2016). "Multicenter validation of CSF neurofilaments as diagnostic biomarker for ALS", *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 17(5-6):404-413.
- [224] Garbuzova-Davis, S., Haller, E., Saporta, S., Kolomey, I., Nicosia, S.V. ve Sanberg, P.R., (2007). "Ultrastructure of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS", *Brain Research*, 1157:126–137.
- [225] Garbuzova-Davis, S., Saporta, S., Haller, E., Kolomey, I., Bennett, S.P., Potter, H. ve Sanberg, P.R., (2007). "Evidence of compromised blood-spinal cord barrier in early and late symptomatic SOD1 mice modeling ALS", *PLoS ONE*, 2(11):e1205.

- [226] Zhong, Z., Deane, R., Ali, Z., Parisi, M., Shapovalov, Y., O'Banion, M.K., Stojanovic, K., Sagare, A., Boillee, S., Cleveland, D.W. ve Zlokovic, B.V., (2008). "ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration", *Nat. Neurosci.* 11(4):420-422.
- [227] Nicaise, C., Mitrecic, D., Demetter, P., De Decker, R., Authelet, M., Boom, A. ve Pochet, R., (2009). "Impaired blood-brain and blood-spinal cord barriers in mutant SOD1-linked ALS rat", *Brain Research*, 1301:152–162.
- [228] Miyazaki, K., Ohta, Y., Nagai, M., Morimoto, N., Kurata, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Matsuura, T. ve Abe, K., (2011). "Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis", *J. Neurosci. Res.*, 89(5):718–728.
- [229] Tillmann, S., Bernhagen, J. ve Noels H., (2013). "Arrest Functions of the MIF Ligand/Receptor Axes in Atherogenesis", 4:115.
- [230] Leyton-Jaimes, M.F., Kahn, J. ve Israelson, A., (2018). "Macrophage migration inhibitory factor: A multifaceted cytokine implicated in multiple neurological diseases", *Exp. Neurol.*, 301:83-91.
- [231] Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T. ve Bernhagen, J., (2002). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease", *Microbes Infect.*, 4(4):449-460.
- [232] Calandra, T. ve Roger, T., (2003). "Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity", *Nature Review Immunol.*, 3(10):791-800.
- [233] Xu, L., Li, Y., Sun, H., Zhen, X., Qiao, C., Tian, S. ve Hou, T., (2013). "Current developments of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors", *Drug discovery Today*, 18(11-12):592-600.
- [234] O'Reilly, C., Doroudian, M., Mawhinney, L. ve Donnelly, S.C., (2016). "Targeting MIF in Cancer: Therapeutics Strategies, Current Developments, and Future Opportunities", *Med. Res. Rev.*, 36(3):440-460.
- [235] Babu, S.N., Chetal, G. ve Kumar, S., (2012). "Macrophage migration inhibitory factor: a potential marker for cancer diagnosis and therapy", *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 13(5):1737-1744.
- [236] Chrousos, G.P. ve Kino, T., (2009). "Glucocorticoid Signalling in the Cell Expanding Clinical implications to Complex Human Behavioral and Somatic Disorders". *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1179:153-166.
- [237] Kadmiel, M. ve Cidlowski, J.A., (2013). "Glucocorticoid receptor signaling in health and disease", *Trends Pharmacol. Sci.*, 34(9):518-30.
- [238] Suri, D. ve Vaidya, V.A., (2013). "Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity", *Neuroscience*, 239:196-213.

- [239] Flaster, H., Bernhagen, J., Calandra, T. ve Bucala, R., (2007). "The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity", *Mol. Endocrinol.*, 21(6):1267-1280.
- [240] Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H.Y., Mu, W., Metz, C.N., Chesney, J.A., Calandra, T., Gerns, D., Donnelly, T., Atkins, R.C. ve Bucala, R., (1997). "Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia", *Am J Pathol*, 150:235–246.
- [241] Santos, L.L. ve Morand, E.F., (2009). "Macrophage migration inhibitory factor: a key cytokine in RA, SLE and atherosclerosis", *Clin. Chim. Acta*, 399(1-2):1-7.
- [242] Bloom, J., Sun, S. ve Al-Abed, Y., (2016). "MIF, controversial cytokine: a review of structural features, challenges and opportunities for drug development", *Expert Opin Ther Targets*, 20(12):1463-1475.
- [243] Schindler, L., Dickerhof, N., Hampton, M.B. ve Bernhagen, J., (2018). "Post-translational regulation of macrophage migration inhibitory factor: Basis for functional fine-tuning", *Redox Biol.*, 15:135-142.
- [244] Lolis, E. ve Buccala, R., (2003)., "Anti-inflammatory Macrophage migration inhibitory factor", *Expert Opin. Targets*, 7(2):153-164.
- [245] Lang, T., Foote, A., Lee, J.P., Morand, E.F. ve Harris, J., (2015). "MIF: Implications in the Pathoetiology of Systemic Lupus Erythematosus", *Front Immunol.*, 6:577.
- [246] Hoi, A.Y., Iskander, M.N. ve Morand, E.F., (2007). "Macrophage migration inhibitory factor: a therapeutic target across inflammatory diseases", *Inflamm Allergy Drug Targets*, 6(3):183-190.
- [247] Fingerle-Rowson, G.R. ve Bucala, R., (2001). "Neuroendocrine properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF)", *Immunol Cell Biol.*, 79(4):368-375.
- [248] Shvil, N., Banerjee, V., Zoltsman, G., Shani, T., Kahn, J., Abu-Hamad, S., Papo, N., Engel, S., Bernhagen, J. ve Israelson, A., (2018). "MIF inhibits the formation and toxicity of misfolded SOD1 amyloid aggregates: implications for familial ALS", *Cell Death Dis.*, 9(2):107.
- [249] Goldstein, M.E., Sternberg, N.H. ve Sternberg, L.A., (1987). "Phosphorylation protects neurofilaments against proteolysis", *Journal of Neuroimmunology*, 14(2):149-160.
- [250] Brettschneider, J., Petzold, A., Süßmuth, S.D., Ludolph, A.C., Tumani, H.A., (2006). "Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS", *Neurology*, 66(6):852-6.
- [251] Liu, Y.L., Guo, Y.S., Xu, L., Wu, S.Y., Wu, D.X., Yang, C., Zhang, Y. ve Li, C.Y., (2009). "Alternation of neurofilaments in immune-mediated injury of spinal cord motor neurons", *Spinal Cord*, 47(2):166-170.

- [252] Li, Y., Zhang, L., Kallakuri, S., Cohen, A. ve Cavanaugh, J.M., (2015). "Correlation of mechanical impact responses and biomarker levels: A new model for biomarker evaluation in TBI", *J. Neurol. Sci.*, 359(1-2):280-286.
- [253] Gonçalves, M., Tillack, L., de Carvalho, M., Pinto, S., Conradt, H. S. ve Costa, J., (2015). "Phosphoneurofilament heavy chain and N-glycomics from the cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis", *Clinica Chimica Acta*, 438:342-349.
- [254] Ganesalingam, J., An, J., Bowser, R., Andersen, P.M. ve Shaw, C.E., (2013). "pNFH is a promising biomarker for ALS", *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 14(2):146-149.
- [255] Ganesalingam, J., An, J., Shaw, C. E., Shaw, G., Lacomis, D. ve Bowser, R., (2011). "Combination of neurofilament heavy chain and complement c3 as CSF biomarkers for ALS", *J. Neurochem.*, 117(3):528-537.
- [256] Steinacker, P., Feneberg, E., Weishaupt, J., Brettschneider, J., Tumani, H., Andersen, P.M., von Arnim, C.A., Böhm, S., Kassubek, J., Kubisch, C., Lulé, D., Müller, H.P., Muche, R., Pinkhardt, E., Oeckl, P., Rosenbohm, A., Anderl-Straub, S., Volk, A.E., Weydt, P., Ludolph, A.C. ve Otto, M., (2016). "Neurofilaments in the diagnosis of motoneuron diseases: a prospective study on 455 patients", *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*, 87(1):12-20.
- [257] Gonçalves, M., De Carvalho, M., Peixoto, C., Alves, P., Barreto, C., Oliva, A., Pinto S., Laborinho-Pronto, A., Gromicho, M. ve Costa, J., (2017). "Phosphoneurofilament heavy chain and vascular endothelial growth factor as cerebrospinal fluid biomarkers for ALS", *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 18(1-2):134-136.
- [258] Lu, C.H., Kalmar, B., Malaspina, A., Greensmith, L. ve Petzold, A., (2011). "A method to solubilize protein aggregates for immunoassay quantification which overcomes the neurofilament "hook" effect", *J. Neurosci. Methods*, 195(2):143-150.
- [259] Boylan, K.B., Glass, J.D., Crook, J.E., Yang, C., Thomas, C.S., Desaro, P., Johnston, A., Overstreet, K., Kelly, C., Polak, M. ve Shaw, G., (2013). "Phosphorylated neurofilament heavy subunit (pNF-H) in peripheral blood and CSF as a potential prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis", *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 84:467-472.
- [260] Li, D., Shen, D., Tai, H. ve Cui, L., (2016). "Neurofilaments in CSF As Diagnostic Biomarkers in Motor Neuron Disease: A Meta-Analysis", *Front Aging Neurosci.*, 8:290.
- [261] Gendron, T.F.; C9ORF72 Neurofilament Study Group, Daugherty, L.M., Heckman, M.G., Diehl, N.N., Wu, J., Miller, T.M., Pastor, P., Trojanowski, J.Q., Grossman, M., Berry, J.D., Hu, W.T., Ratti, A., Benatar, M., Silani, V., Glass, J.D., Floeter, M.K., Jeromin, A., Boylan, K.B. ve Petrucelli, L., (2017). "Phosphorylated neurofilament heavy chain: A biomarker of survival for

- C9ORF72-associated amyotrophic lateral sclerosis”, *Ann. Neurol.*, 82(1):139-146.
- [262] McCombe, P.A., Pfluger, C., Singh, P., Lim, C.Y.H., Airey, C. ve Henderson, R. D., (2015). “Serial measurements of phosphorylated neurofilament-heavy in the serum of subjects with amyotrophic lateral sclerosis”, *Journal of the neurological Sciences*, 353:122-129.
 - [263] Boylan, K., Yang, C., Crook, J., Overstreet, K., Heckman, M., Wang, Y., Borchelt, D. ve Shaw, G., (2009). “Immunoreactivity of the phosphorylated axonal neurofilament H subunit (pNF-H) in blood of ALS model rodents and ALS patients: evaluation of blood pNF-H as a potential ALS biomarker”, *Journal of Neurochemistry*, 111:1182-1191.
 - [264] Weydt, P., Oeckl, P., Huss, A., Müller, K., Volk, A.E., Kuhle, J., Knehr, A., Andersen, P.M., Prudlo, J., Steinacker, P., Weishaupt, J.H., Ludolph, A.C. ve Otto, M., (2016). “Neurofilament levels as biomarkers in asymptomatic and symptomatic familial amyotrophic lateral sclerosis”, *Ann Neurol*, 79(1):152-158.
 - [265] Gresle, M.G., Butzkueven, H. ve Shaw, G., (2011). “Neurofilament Proteins as Body Fluid Biomarkers of Neurodegeneration in Multiple Sclerosis”, *Multiple Sclerosis International*, 2011:7.
 - [266] Gresle, M.M., Liu, Y., Dagley, L.F., Haartsen, J., Pearson, F., Purcell, A.W., Laverick, L., Petzold, A., Lucas, R.M., Van der Walt, A., Prime, H., Morris, D.R., Taylor, B.V.; Ausimmune Consortium, Shaw, G. ve Butzkueven, H. (2014). “Serum phosphorylated neurofilament-heavy chain levels in multiple sclerosis patients”, *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*, 85(11):1209-1213.
 - [267] Hill, W.D., Arai, M., Cohen, J.A. ve Trojanowski, J.Q., (1993). “Neurofilament mRNA is reduced in Parkinson’s disease substantia nigra pars compacta neurons”, *J. Comp. Neurol.*, 329(3):328-336.
 - [268] Constantinescu, R., Zetterberg, H., Holmberg, B. ve Rosengren, L., (2009). “Levels of brain related proteins cerebrospinal fluid: An aid in the differential diagnosis of parkinsonian disorder”, *Parkinsonism and Related Disorders*, 15(3):205-212.
 - [269] de Jong, D., Jansen, R.W., Pijnenburg, Y.A., van Geel, W.J., Borm, G.F., Kremer, H.P. ve Verbeek, M.M., (2007). “CSF neurofilament proteins in the differential diagnosis of dementia”, 78(9):936-938.
 - [270] Sobierajski, J., Hendgen-Cotta, U.B., Luedike, P., Stock, P., Rammos, C., Meyer, C., Kraemer, S., Stoppe, C., Bernhagen, J., Kelm, M. ve Rassaf, T., (2013). “Assessment of macrophage migration inhibitory in humans: protocol for accurate and reproducible levels”, *Free Radic Biol. Med.*, 63:236-242.

- [271] Cherepkova, O.A., Lyutova, E.M., Eronina, T.B. ve Gurvits, B.Y., (2006). "Chaperon-like activity of macrophage migration inhibitory factor", *Int. J. Biochem Cell Biol.*, 38(1):43-55.
- [272] Oikonomidi, A., Tautvydaitė, D., Gholamrezaee, M.M., Henry, H., Bacher, M. ve Popp, J., (2017). "Macrophage Migration Inhibitory Factor is Associated with Biomarkers of Alzheimer's Disease Pathology and Predicts Cognitive Decline in Mild Cognitive Impairment and Mild Dementia", *J. Alzheimers Dis.*, 60(1):273-281.
- [273] Cox, G.M., Kithcart, A.P., Pitt, D., Guan, Z., Alexander, J., Williams, J.L., Shawler, T., Dagia, N.M., Popovich, P.G., Satoskar, A.R. ve Whitacre, C.C., (2013). "Macrophage migration inhibitory factor potentiates autoimmune-mediated neuroinflammation", *J. Immunol.*, 191(3):1043-1054.
- [274] Frakes, A.E., Ferraiuolo, L., Haidet-Phillips, A.M., Schmelzer, L., Braun, L., Miranda, C.J., Ladner, K.J., Bevan, A.K., Foust, K.D., Godbout, J.P., Popovich, P.G., Guttridge, D.C. ve Kaspar, B.K., (2014). "Mikroglia induce motor neuron death via the classical NF-κB pathway in amyotrophic lateral sclerosis", *Neuron*, 81(5):1009-1023.
- [275] Lee, J.P., Foote, A., Fan, H., Peral de Castro, C., Lang, T., Jones, S.A., Gavrilescu, N., Mills, K.H., Leech, M., Morand, E.F. ve Harris, J., (2016). "Loss of autophagy enhances MIF/macrophage migration inhibitory factor release by macrophages", *Autophagy*, 12(6):907-916.
- [276] Nguyen, M.T., Lue, H., Kleemann, R., Thiele, M., Tolle, G., Finkelmeier, D., Wagner, E., Braun, A. ve Bernhagen, J., (2003). "The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis", *J. Immunol.*, 170(6):3337-3347.
- [277] Yang, D.B., Yu, W.H., Dong, X.Q., Zhang, Z.Y., Du, Q., Zhu, Q., Che, Z.H., Wang, H., Shen, Y.F. ve Jiang, L. (2017). "Serum macrophage migration inhibitory factor concentrations correlate with prognosis of traumatic brain injury", *Clin. Chim. Acta.*, 469:99-104.
- [278] Bank, M., Stein, A., Sison, C., Glazer, A., Jassal, N., McCarthy, D., Shatzer, M., Hahn, B., Chugh, R., Davies, P. ve Bloom, O., (2015). "Elevated circulating levels of the pro-inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor in individuals with acute spinal cord injury", *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 96(4):633-644.
- [279] Nagaraja, T.N., Gourie-Devi, M., Nalini, A. ve Raju, T.R., (1994). "Neurofilament phosphorylation is encaded in cultured chick motor neurons exposed to cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients", *Acta Neuropathol.*, 88(4):349-352.

MİF HASTA VERİLERİ

HASTA NO	2016 YAŞ	HASTALIK	CİNSİYET	HASTALIK SEYRİ	TUTULUM TİPİ	MİF DEĞERİ (ng/ml)
1	72	ALS+PROSTAT+DM+TA+İSKEMİK KALP	E	YAVAŞ	BULBAR-UMN	5,15
2	55	ALS	K	YAVAŞ	LMN	2,77
3	72	ALS+PH	K	YAVAŞ	UMN	6,57
5	55	ALS+POLİNÖROPATİ	E	YAVAŞ	LMN	2,63
6	71	ALS	E	HIZLI	BULBAR-UMN-LMN	5,03
7	56	ALS	E	YAVAŞ	LMN	19,21
9	30	Kontrol	E			6,275
10	36	Kontrol	E			3,96
11	73	ALS	E	YAVAŞ	BULBAR-UMN	6,27
12	67	ALS+TA+QUATR	K	HIZLI	UMN	24,21
13	40	Kontrol	K			2,96
14	60	ALS	K	HIZLI	UMN	5,54
15	66	Kontrol	E			5,35
17	32	MS	K			2,38
18	27	ALS	E	YAVAŞ	UMN	5,17
19	32	Kontrol	E			9,54
20	26	ALS	E	YAVAŞ	UMN	4,15
21	45	Kontrol	E			6,93
22	62	ALS	K	YAVAŞ	UMN	23,87
23	50	Kontrol	E			4,35

24	56	ALS	K	YAVAŞ	UMN-LMN	4,93
25	50	ALS	E	YAVAŞ	BULBAR-UMN	11,02
26	50	Kontrol	E			3,34
27	70	ALS	K	YAVAŞ	UMN	16,96
28	75	DEMANS	K			4,21
29	39	ALS+MS	E	YAVAŞ	UMN	3,31
30	52	ALS	K	HIZLI	UMN-LMN	4,81
31	50	ALS+TİROİD HASIMATO+RAHİM MYOM	K	DURAĞA N	LMN	5,44
33	38	Kontrol	E			3
34	31	ALS	K	DURAĞA N	UMN	5,53
35	28	Kontrol	K			3
36	76	ALS+FTD	E	HIZLI	UMN	5,62
37	51	ALS+DM+TA	K	HIZLI	UMN	3,87
38	45	Kontrol	E			2,83
39	39	Kontrol	K			5,12
40	50	ALS	K	YAVAŞ	UMN	2,19
41	61	ALS	K	YAVAŞ	UMN	1,25
43	43	ALS	E	YAVAŞ	UMN	3,35
44	45	ALS	E	YAVAŞ	UMN	4,12
45	49	ALS+TA	K	YAVAŞ	UMN-LMN	2,51
46	62	PH	E			1,83
47	55	ALS-FAHR+DM	K	YAVAŞ	BULBAR	2,19
48	49	PSA+PH	E			2,47
49	24	ALS	K	DURAĞA N	LMN	40,58
50	36	ALS	K	DURAĞA N	UMN	2,69
53	42	ALS	E	YAVAŞ	UMN	13,24
55	81	PH	K			7,23
56	63	ALS+DM+QUATR	K	YAVAŞ	LMN	5,42
58	61	ALS+ADH	K	YAVAŞ	BULBAR-UMN	9,01
59	65	ALS	E	YAVAŞ	LMN	3,73
60	19	Hipoksit Ensafolapati	K			2,2
61	31	MS+UNUTKANLIK	K			5,86

62	51	PH	E			4,93
63	59	ALS+TA	E	HIZLI	UMN	6,06
64	84	PH	K			7,97
65	60	ALS	K	HIZLI	UMN-LMN	4,08
66	22	MS	E			11,13
67	22	MS	E			29,91
68	76	PH,DEM,HS	E			2,33
69	51	PH	E			3,86
70	49	ALS-FTD+PH	K	HIZLI	UMN	4,23
71	56	DEMANS	E			5,19
72	45	Kontrol	E			3,02
73	63	ALS	E	YAVAŞ	UMN	3,46
74	36	MS+HİPERTİROİDİ	E			2,53
75	31	MS	E			4,43
77	22	Kontrol	K			2,9
78	26	Kontrol	K			2,5
80	24	Kontrol	K			4,22
81	51	MS	K			4,32
82	77	ALS+TA	E	YAVAŞ	BULBAR	4,72
85	25	MS	K			20,72
86	69	ALS+PANKREAS CA	K	YAVAŞ	UMN	31,13
87	35	ALS	K	YAVAŞ	BULBAR-LMN	31,13
88	43	PH	E			26,38
89	44	ALS	E	YAVAŞ	UMN	5,25
90	54	PH	E			4,96
91	65	ALS+PH	K	YAVAŞ	UMN	9,92
93	70	ALS+PH	E	YAVAŞ	BULBAR-LMN	3,42
94	61	PH	E			5,08
95	41	MS	E			3,56
96	72	PH	K			5,81
99	59	ALS	K	YAVAŞ	LMN	14,28
100	46	PH	K			2,81
101	55	PH	E			2,77
102	47	PH	E			2,42
103	58	ALS	K	DURAĞA N	UMN	15,45
105	35	ALS	E	HIZLI	UMN	4,23

106	59	PH	E			4,4
108	48	PH	E			16,21
109	26	MS	K			7,34
110	28	MS	K			7,2
111	71	PH	E			2,92
114	76	ALS	K	YAVAŞ	LMN	5,46
116	71	ALS	E	HIZLI	BULBAR-UMN	1,43
117	67	ALS+FTD	E	HIZLI	UMN	3,85
118	67	ALS+KEKEME+PROSTAT	E	YAVAŞ	UMN	6,52
119	56	PH	E			2,88
120	55	ALS	E	YAVAŞ	LMN	5,49
121	55	ALS	E	YAVAŞ	UMN	4,15
123	53	ALS	E	YAVAŞ	BULBAR	3,52
127	41	ALS	E	HIZLI	UMN	2,4
128	25	ALS	K	YAVAŞ	LMN	0,9
130	48	PH	K			3,96
131	61	ALS+PH+FTD	E	YAVAŞ	BULBAR	4,66
132	64	ALS+FTD	K	YAVAŞ	BULBAR-UMN	5,87
133	44	ALS+TA	K	YAVAŞ	UMN	5,74
135	55	ALS+DM+FTD+TA	K	HIZLI	UMN	2,56
136	65	ALS	E	YAVAŞ	UMN-LMN	2,08
137	59	BAŞ AĞRISI	K			2,58
138	54	ALS	E	YAVAŞ	UMN	5,77
140	52	Kontrol	E			1,34
141	29	ALS	E	YAVAŞ	UMN	7,46
142	48	Kontrol	E			0,03
147	63	ALS	K	HIZLI	BULBAR-UMN	3,13
150	24	Kontrol	K			2
154	41	Kontrol	K			0,5
157	25	Kontrol	E			3,77
160	51	ALS+TA	E	YAVAŞ	UMN	3,4
166	25	MS	K			4,67
211	38	ALS	E	DURAĞA N	UMN	17,52
229	67	HALLOWEN SPATS ADULT FORM	E			1,01
233	43	HUNTINGTON HASTALIĞI	E			0,033

234	67	PH+DEMANS	E			7,28
242	57	ALS+DM+FTD	E	YAVAŞ	UMN	6,23
251	45	Kontrol	E			6,17
252	40	Kontrol	E			6,71
253	29	ALS	K	DURAĞA N	UMN	3,83
260	45	ALS	E	DURAĞA N	BULBAR- LMN	1,22
262	65	ALS+DM+KALP	E	YAVAŞ	BULBAR- UMN	14,51
266	40	ALS	K	YAVAŞ	UMNLM N	6,37



PNF-H HASTA VERİLERİ

HASTA NO	2016 YAŞ	HASTALIK	CİNSİYET	HASTALIK SEYRİ	TUTULUM TİPİ	PNFH DEĞERLERİ NG/ML
1	72	ALS+PROSTAT+DM+TA+İSKE MİK KALP	E	YAVAŞ	BULBAR-UMN	2,09
2	55	ALS	K	YAVAŞ	LMN	3,4
3	72	ALS +PH	K	YAVAŞ	UMN	3,45
4	47	ALS+NASH	E	HIZLI	UMN	2,5
5	55	ALS+POLİNÖROPATİ	E	YAVAŞ	LMN	2,84
6	71	ALS	E	HIZLI	BULBAR-UMN-LMN	2,91
7	56	ALS	E	YAVAŞ	LMN	53,01
8	67	ALS+TA+PROSTAT	E	DURAGA N	UMN	2,12
9	30	Kontrol	E			3,21
10	36	Kontrol	E			1,98
11	73	ALS	E	YAVAŞ	BULBAR-UMN	2,74
12	67	ALS+TA+QUATR	K	HIZLI	UMN	40
13	40	Kontrol	K			2,03
14	60	ALS	K	HIZLI	UMN	3,46
15	66	Kontrol	E			2,33
17	32	MS	K			1,91
18	27	ALS	E	YAVAŞ	UMN	2,92
20	26	ALS	E	YAVAŞ	UMN	2,2
21	45	Kontrol	E			2,07
22	62	ALS	K	YAVAŞ	LMN	88,3

23	50	Kontrol	E			2,72
24	56	ALS	K	YAVAŞ	UMN-LMN	2,58
25	50	ALS	E	YAVAŞ	BULBAR-UMN	3,28
28	75	DEMANS	K			2,35
29	39	ALS+MS	E	YAVAŞ	UMN	2,3
30	52	ALS	K	HIZLI	UMN-LMN	2,69
31	50	ALS+TİROİD HASIMATO+RAHİM MYOM	K	DURAĞA N	LMN	2,69
33	38	Kontrol	E			2,58
34	31	ALS	K	DURAĞA N	UMN	3
35	28	Kontrol	K			2,22
36	76	ALS+FTD	E	HIZLI	UMN	2,13
38	45	Kontrol	E			2,38
39	39	Kontrol	K			1,89
40	50	ALS	K	YAVAŞ	UMN	2,09
45	49	ALS+TA	K	YAVAŞ	UMN-LMN	0,17
46	62	PH	E			1,67
49	24	ALS	K	DURAĞA N	LMN	76,59
50	36	ALS	K	DURAĞA N	UMN	2,44
51	51	ALS	E	HIZLI	BULBAR	2,51
52	58	Kontrol	E			0,87
53	42	ALS	E	YAVAŞ	UMN	4,19
56	25	ALS+DM+QUATR	K	YAVAŞ	LMN	1,67
58	61	ALS+ADH	K	YAVAŞ	BULBAR-UMN	1,65
59	65	ALS	E	YAVAŞ	LMN	0,13
61	31	MS+UNUTKANLIK	K			0,14
64	84	PH	K			0,26
69	51	PH	E			53,21
70	49	ALS-FTD+PH	K	HIZLI	UMN	0,2
71	56	DEMANS	E			4,2
72	45	Kontrol	E			0,22
73	63	ALS	E	YAVAŞ	UMN	0,35
76	53	ALS+TİROİD	K	YAVAŞ	UMN	59,49

77	22	Kontrol	K			0,13
82	77	ALS+TA	E	YAVAŞ	BULBAR	0,16
86	69	ALS+PANKREAS CA	K	YAVAŞ	UMN	211,31
87	35	ALS	K	YAVAŞ	BULBAR-LMN	192,05
89	44	ALS	E	YAVAŞ	UMN	3,18
91	65	ALS+PH	K	YAVAŞ	UMN	184,15
93	70	ALS+PH	E	YAVAŞ	BULBAR-LMN	2,56
99	59	ALS	K	YAVAŞ	LMN	0,17
105	35	ALS	E	HIZLI	UMN	0,12
107	62	ALS	E	YAVAŞ	LMN	0,31
109	26	MS	K			0,31
114	76	ALS	K	YAVAŞ	LMN	1,77
115		Kontrol	E			0,14
116	71	ALS	E	HIZLI	BULBAR-UMN	0,36
117	67	ALS+FTD	E	HIZLI	UMN	0,19
118	67	ALS+KEKEME+PROSTAT	E	YAVAŞ	UMN	23,07
120	55	ALS	E	YAVAŞ	LMN	0,14
125	55	ALS	E	YAVAŞ	UMN	0,22
126	47	ALS	K	HIZLI	UMN-LMN	1,92
127	41	ALS	E	HIZLI	UMN	2,8
128	25	ALS	K	YAVAŞ	LMN	0,51
131	61	ALS+PH+FTD	E	YAVAŞ	BULBAR	0,15
132	64	ALS+FTD	K	YAVAŞ	BULBAR-UMN	0,16
133	44	ALS+TA	K	YAVAŞ	UMN	1,29
134	42	MS	K			0,15
135	55	ALS+DM+FTD+TA	K	HIZLI	UMN	0,85
136	65	ALS	E	YAVAŞ	UMN-LMN	1,47
137	59	BAŞ AĞRISI	K			1,43
138	54	ALS	E	YAVAŞ	UMN	4,4
139	46	ALS	K	YAVAŞ	BULBAR-UMN-LMN	133,41
140	52	Kontrol	E			0,14
141	29	ALS	E	YAVAŞ	UMN	1,61

142	48	Kontrol	E			0,92
313	35	ALS	K	YAVAŞ	UMN	7,97
315	37	MS	K			37,68
333	80	PH	K			67,8
334	57	PH	E			36,67
336	28	MS+TRİGEMİNAL NEVRALJİ	E			54,5
337	38	ALS	K	DURAĞA N	UMN- LMN	51,63
340	28	ALS	K	YAVAŞ	UMN	49,78
341	76	ET	E			61,15
342	74	ALS	E	DURAĞA N	UMN- LMN	41,07
343		ALS	K	DURAĞA N	UMN- LMN	69,66
348		MS	K			37,96
352	48	PH	E			145,42
355	67	PH+DM+HT	E			61,13
359		PH	E			173,17
362	54	ALS+RAMOTOİD ARTERİT	K	HIZLI	UMN- LMN	114,7
366	47	MS+MİGREN	K			42,96
371	55	ALS+TA	K	HIZLI	UMN- LMN	210,71
376	53	ALS+TA+TİROİD	K	DURAĞA N	UMN- LMN	74,62
377	34	ALS	K	YAVAŞ	LMN	190,02
381	49	ALS	E	DURAĞA N	UMN- LMN	57,28
386	42	ALS	E	DURAĞA N	UMN- LMN	89,21
387	59	ALS	E	HIZLI	UMN- LMN	95,87
388		ALS+MS	E	DURAĞA N	UMN- LMN	161,67
395	61	ALS+DEMANS+PH+DM+TRE MOR	K	YAVAŞ	UMN	39,94
404	56	PH	K			34,38
405	35	PH	E			31,51
406	74	PH+PSİKOJEN	E			42,4
407	65	ALS+PROSTAT+TA	E	YAVAŞ	BULBAR- UMN	45,67

408		PH	K			33,37
411	80	YAŞLILIK	K			42,88
412	82	anevrizma post op	K			35,46
413	70	ALS+TA+KALP	K	HIZLI	BULBAR- UMN- LMN	105,06
415	77	PH+ET+Astım	E			168,37
420	56	PH	K			25,34
422	63	ALS+PH	E	YAVAŞ	BULBAR- UMN	39,34



MİF VE PNF-H KORELASYON HASTA VERİLERİ

HASTA NO	2016 YAŞ	HASTALIK	CİNSİYET	PNFH DEĞERLERİ NG/ML	MİF DEĞERİ (ng/ml)
1	72	ALS+PROSTAT+DM+TA+İSKEMİK KALP	E	2,09	5,15
5	55	ALS+POLİNÖROPATİ	E	2,84	2,63
6	71	ALS	E	2,91	5,03
7	56	ALS	E	53,01	19,21
9	30	Kontrol	E	3,21	6,275
10	36	Kontrol	E	1,98	3,96
11	73	ALS	E	2,74	6,27
12	67	ALS+TA+QUATR	K	40	24,21
13	40	Kontrol	K	2,03	2,96
14	60	ALS	K	3,46	5,54
15	66	Kontrol	E	2,33	5,35
17	32	MS	K	1,91	2,38
18	27	ALS	E	2,92	5,17
20	26	ALS	E	2,2	4,15
21	45	Kontrol	E	2,07	6,93
22	62	ALS	K	88,3	23,87

23	50	Kontrol	E	2,72	4,35
24	56	ALS	K	2,58	4,93
25	50	ALS	E	3,28	11,02
28	75	DEMANS	K	2,35	4,21
29	39	ALS+MS	E	2,3	3,31
30	52	ALS	K	2,69	4,81
31	50	ALS+TİROİD HASİMATO+RAHİM MYOM	K	2,69	5,44
33	38	Kontrol	E	2,58	3
34	31	ALS	K	3	5,53
35	28	Kontrol	K	2,22	3
36	76	ALS+FTD	E	2,13	5,62
38	45	Kontrol	E	2,38	2,83
39	39	Kontrol	K	1,89	5,12
40	50	ALS	K	2,09	2,19
45	49	ALS+TA	K	0,17	2,51
46	62	PH	E	1,67	1,83
49	24	ALS	K	76,59	40,58
50	36	ALS	K	2,44	2,69
53	42	ALS	E	4,19	13,24
56	25	ALS+DM+QUATR	K	1,67	5,42
58	61	ALS+ADH	K	1,65	9,01
59	65	ALS	E	0,13	3,73
61	31	MS+UNUTKANLIK	K	0,14	5,86
64	84	PH	K	0,26	7,97
69	51	PH	E	53,21	3,86
70	49	ALS-FTD+PH	K	0,2	4,23

71	56	DEMANS	E	4,2	5,19
72	45	Kontrol	E	0,22	3,02
73	63	ALS	E	0,35	3,46
77	22	Kontrol	K	0,13	2,9
82	77	ALS+TA	K	0,16	4,72
86	69	ALS+PANKREAS CA	K	211,31	31,13
87	35	ALS	K	192,05	31,13
89	44	ALS	E	3,18	5,25
91	65	ALS+PH	K	184,15	9,92
93	70	ALS+PH	E	2,56	3,42
99	59	ALS	K	0,17	14,28
105	35	ALS	E	0,12	4,23
109	26	MS	K	0,31	7,34
114	76	ALS	K	1,77	5,46
116	71	ALS	E	0,36	1,43
117	67	ALS+FTD	E	0,19	3,85
118	67	ALS+KEKEME+PROSTAT	E	23,07	6,52
120	55	ALS	E	0,14	5,49
127	41	ALS	E	2,8	2,4
128	25	ALS	K	0,51	0,9
131	61	ALS+PH+FTD	E	0,15	4,66
132	64	ALS+FTD	K	0,16	5,87
133	44	ALS+TA	K	1,29	5,74
135	55	ALS+DM+FTD+TA	K	0,85	2,56
136	65	ALS	E	1,47	2,08
138	54	ALS	E	4,4	5,77
140	52	Kontrol	E	0,14	1,34

141	29	ALS	E	1,61	7,46
142	48	Kontrol	E	0,92	0,03
352	48	PH	E	145,42	16,21



MİF İSTATİSTİKSEL VERİLER

Yaş	N	Ortalama	Standart Sapma
<30	19	2,5862	1,42531
30-39	16	2,4119	1,07666
40-49	24	2,0502	1,10787
50-59	33	2,1869	,71639
>60	39	2,4544	1,01251
Total	131	2,3269	1,04541

Hastalık Grupları	N	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	23	1,8746	,63920
ALS	70	2,5039	1,10921
Nörolojik Kontrol	38	2,2745	1,05509
Total	131	2,3269	1,04541

Cinsiyet	N	Ortalama	Standart Sapma
Kadın	35	2,7084	1,35475
Erkek	35	2,2995	,75861

Hastalık Tipleri	Ortalama	N	Standart Sapma
Kontrol	3,90500	23	2,215573
ALS	7,48243	70	7,636384
Parkinson	5,92500	20	5,789661
Multiple Skleroz	8,67083	12	8,369281
Demans	4,70000	2	,692965
Total	6,65776	127	6,801299

Hastalık Seyiri	Ortalama	N	Standart Sapma
Durağan	11,53250	8	13,158206
Yavaş	7,45660	47	6,937013
Hızlı	5,40333	15	5,358621
Total	7,48243	70	7,636384

Başlangıç Yeri	Ortalama	N	Standart Sapma
UMN	7,58919	37	6,941174
LMN	9,62818	11	11,611169
BULBAR	3,77250	4	1,190725
UMN-LMN	4,13000	6	1,609310
UMN-BULBAR	7,04875	8	4,273100
LMN-BULBAR	11,92333	3	16,669794
UMN-LMN-BULBAR	5,03000	1	.
Total	7,48243	70	7,636384

PNF-H İSTATİSTİKSEL VERİLERİ

HastalıkSeyiri	Ortalama	N	Standart Sapma
Durağan	52,6650	12	47,44294
Yavaş	29,8622	46	57,91436
Hızlı	32,7211	18	59,49227
Total	34,1397	76	56,66947

Hastalık Grupları	Ortalama	N	Standart Sapma
Kontrol	1,6144	16	1,04203
ALS	34,1397	76	56,66947
Nörolojik Kontrol	42,7779	28	47,54205
Total	31,8186	120	51,87811

Cinsiyet	Ortalama	N	Standart Sapma
Kadın	35,8476	59	54,02937
Erkek	27,9216	61	49,84528
Total	31,8186	120	51,87811

Yaş	Ortalama	N	Standart Sapma
<30	17,4945	11	28,23424
30-39	33,1519	16	63,55904
40-49	25,9105	19	46,74791
50-59	28,4007	28	47,99252
>60	33,2968	40	52,50048
Total	29,3181	114	49,79953

Başlangıç Yeri	Ortalama	N	Standart Sapma
UMN	21.4103	31	49.76544
LMN	30.1107	14	55.41495
BULBAR	.9400	3	1.35967
UMN+LMN	65.0167	15	62.96699
LMN+UMN	11.9113	8	18.98824
BULBAR+LMN	97.3050	2	133.98966
UMN+LMN+BULBAR	80.4600	3	68.63988
Total	34.1397	76	56.66947

Hastalık Tipi	Ortalama	N	Standart Sapma
KONTROL	1,6144	16	1,04203
ALS	34,1397	76	56,66947
PARKINSON	62,4786	14	57,56210
MS	21,9512	8	23,37729
DEMANS	3,2750	2	1,30815
Total	31,7009	116	52,61412



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Güneriye ÖZEN
Doğum Tarihi ve Yeri :07/05/1991; Silistra/BULGARİSTAN
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :ozenguneriye@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2018
Lisans	Biyoloji	Hacettepe Üniversitesi	2014
Lise	Sayısal	Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi	2009

YAYINLARI

Bildiri

1. Özen, G., Yurtsever, M., Kuçak, M., Günel, A., İdrisoğlu, H.A., Korkut, Ş.V., (2016). "Investigation of The Use of NEFH, MIF, IL-1B, IL-2 Proteins as Biomarkers in Blood Serum and Plasma From ALS Patients". SANKO University Innovation in Medicine Summit-2, 5th-7th May, Gaziantep, Turkey.
2. Günel, A., İdrisoğlu, D., Özen, G., İdrisoğlu, H.A., Korkut, Ş.V., Yurtsever, M., Kurtulmuş, M., Polat, N., (2016). "Macrophage Migrations Inhibitory Factor Levels As A Biomarker In Symtomatic Als". The 27th International Symposium On Als/mnd Took Place In Dublin, 7th-9th December, Dublin, Ireland.
3. Özen, G., Korkut, Ş.V., Günel, A., (2018). "Amyotrofik Lateral Skleroz Hastalığında Vücut Sıvı Biyobelirteçleri". VI. Dünya Nadir Hastalıklar Günü Sempozyumu, 28 Şubat, Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.

Proje

1. ALS Hastalarındaki Nörofilament ve MiF Protein Düzeylerinin Araştırılması, 2016-2018, Araştırmacı, BAP Projesi

ÖDÜLLERİ

1. Poster Yarışması- Üçüncülük. Özen, G., Korkut, Ş.V., Günel, A., (2018). "Amyotrofik Lateral Skleroz Hastalığında Vücut Sıvı Biyobelirteçleri". VI. Dünya Nadir Hastalıklar Günü Sempozyumu, 28 Şubat, Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.