

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TÜRKİYE'DE METAKROMATİK LÖKODİSTROFİ
HASTALIĞINA NEDEN OLAN MUTASYONLARIN
BELİRLENMESİ : BİYOKİMYA-GENOTİP-FENOTİP
İLİŞKİSİNİN KURULMASI**

Dr. Evren ÖNDER

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

ANKARA

2007

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TÜRKİYE’DE METAKROMATİK LÖKODİSTROFİ
HASTALIĞINA NEDEN OLAN MUTASYONLARIN
BELİRLENMESİ : BİYOKİMYA-GENOTİP-FENOTİP
İLİŞKİSİNİN KURULMASI**

Dr. Evren ÖNDER

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. H. Asuman ÖZKARA**

ANKARA

2007

TEŞEKKÜR

Bütün uzmanlık eğitimim boyunca bana her türlü konuda yol gösteren, biyokimya bilimini bana tanıtan ve sevdiren, tez dönemimde konuyu saptamamda ve sonuca ulaşmamda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. H. Asuman ÖZKARA'ya teşekkürü bir borç bilirim. Titiz çalışma yöntemi, araştırmacı kişiliği ve sonuca ulaşmadaki azmiyle bana her zaman örnek olmuştur.

Bölüm başkanımız Prof. Dr. İ. Hamdi ÖĞÜŞ'e, tez hazırlama süreci boyunca bana gösterdiği anlayış için teşekkür ederim. Çalıştığım süre içerisinde bölüm başkanlığı yapmış Prof. Dr. Kamer KILINÇ'a teşekkürlerimi sunarım. Bölüme ilk başladığım sene bölüm başkanlığı yapmış olan emekli Prof. Dr. Ferhan TEZCAN'a, beni bölüme kabul edip bu nezih ortamda çalışma şansı tanıdığı için teşekkür ederim.

Tez deneylerim sırasında teorik ve pratik konulardaki yardımlarını esirgemediği, iyi ve kötü günümde yanımda olduğu için Yard. Doç. Dr. İncilay SİNİCİ'ye teşekkür ederim.

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nın kıymetli öğretim üyelerine sahip olduğum bütün biyokimya bilgisini bana kazandırdıkları için teşekkür ederim. Araştırma görevlisi arkadaşlarıma her an yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Meral TOPÇU ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Müjgan SÖNMEZ'e tez çalışmamda buldukları katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca bana verdikleri sevgi, gösterdikleri anlayış ve destek için eşim Volkan ÖNDER'e, annem Muazzez OYSUL'a, babam Muvaffak OYSUL'a ve kardeşim Pınar OYSUL'a, arkadaşım Ayşe ERCAN'a çok teşekkür ederim.

ÖZET

Dr. Evren ÖNDER. Türkiye’de metakromatik lökodistrofi hastalığına neden olan mutasyonların belirlenmesi biyokimya-genotip-fenotip ilişkisinin kurulması. Uzmanlık tezi. ANKARA 2007. Metakromatik lökodistrofi (MLD), sülfatidi parçalayan arilsülfataz A (ASA) enzimi veya aktivatör proteini olan sapozin B’nin eksikliği nedeni ile oluşan bir lizozomal depo hastalığıdır. Bu eksiklik sonucu lizozom içinde sülfatid birikerek, periferik ve santral sinir sisteminde ilerleyici tipte demiyelinizasyona neden olur. Bu çalışmada klinik bulguları ve enzim analizi ile MLD tanısı almış 6 hasta ile bir ailenin ASA genindeki mutasyonları araştırıldı. Bu mutasyonların saptanması için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) analizi, DNA dizi analizi yapıldı. Çalışmamız sonucunda hastalığa neden olan 2 yeni mutasyon ve 2 polimorfizm bulundu. Yeni mutasyonlar ekson 5’te 1568G→A, 307Glu→Lys ve 1603G→T, 318Trp→Cys mutasyonları, polimorfizmler ise ekson 7’de 2161C→G, 391Thr→Ser ve ekson6’da 1788A→G, 350Asn→Ser değişimleridir. Yeni tanımlanan ekson5 mutasyonları ASA proteininin iyi korunmuş yapısal elemanlar bölgesinde bulunmaktadır. Bu nedenle, ekson5’teki 307Glu→Lys ve 318Trp→Cys mutasyonları, muhtemelen ASA proteininde sırasıyla 6. alfa-heliks ve 12. beta-tabakalı yapıyı bozarak aktif bölge konformasyonunu değiştirmekte ve enzim aktivitesinde eksikliğe neden olmaktadır. Ekson5’te 1568G→A 307Glu→Lys mutasyonu olan iki hastada hastalığa neden olan bu mutasyonun yanısıra, ekson7’de daha önce tanımlanmış 2161C→G, Thr391→Ser polimorfizmi de saptanmıştır. Ekson7 polimorfizminin 6 hastanın 3 tanesinde bulunması bu polimorfizmin Türkiye’de MLD hastalığına yatkınlık yapan bir faktör olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışma, MLD’li Türk hastalarda, hastalığın mekanizmasını anlamak için yapılan moleküler düzeydeki ilk çalışmadır ve MLD’ye neden olan mutasyonların ülkemize özgü olduğunu ve polimorfizmlerle birlikte olabileceğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Metakromatik Lökodistrofi, Arilsülfataz A; Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) analizi.

TÜBİTAK tarafından desteklenen 105S009 (SBAG-HD-13) no’lu projedir.

ABSTRACT

Dr. Evren ÖNDER. Determination of mutations causing Metachromatic Leukodystrophy disorder in Turkey: Building the biochemical-genotype-phenotype relationship. Specialist thesis. ANKARA 2007.

Metachromatic leukodystrophy (MLD) is a lysosomal storage disorder caused by the deficiency of arylsulfatase A (ASA) that hydrolyzes sulfatide or its activator protein saposin B. This deficiency causes sulfatide accumulation in lysosome leading to demyelination in central and peripheral nervous system. In this research, ASA gene mutations in 6 patients and a family diagnosed as MLD through clinical symptoms and enzyme analysis were investigated; polymerase chain reaction (PCR), single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and DNA sequence analysis were carried. Findings revealed that two novel mutations and two polymorphisms caused the disorder. The novel mutations are 1568G→A, 307Glu→Lys, 1603G→T, 318Trp→Cys in exon5, polymorphisms are 2161C→G, 391Thr→Ser in exon7, 1788A→G, 350Asn→Ser in exon6. Newly identified exon5 mutations are in highly conserved structural elements region of ASA protein. Thus, 307Glu→Lys and 318Trp→Cys mutations in exon5 probably change the active site conformation by disrupting the 6th alpha helix and the 12th beta-sheet structure of ASA protein, respectively and cause deficiency in enzyme activity. In two of the patients, in addition to exon5 1568G→A, 307Glu→Lys mutation that caused the disorder, 2161C→G, 391Thr→Ser polymorphism that was previously identified in exon 7 was also detected. Three out of 6 patients had exon7 polymorphism showing the possibility that polymorphism is a predisposition causing MLD disorder in Turkey. This is the first study on the molecular basis to understand the mechanism of the disorder in Turkish patients with MLD and revealed that mutations leading to MLD are unique to our country and could develop together with polymorphism.

Key words: Metachromatic Leukodystrophy, Arylsulphatase A; Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis.

The project was supported by TUBITAK 105S009 (SBAG-HD-13).

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
TABLolar	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. MLD'nin Tanımı	2
2.2. Sülfatidin Yapısı ve Fonksiyonu	2
2.3. ASA Enziminin Yapısı ve Fonksiyonu	5
2.4. ASA Enziminin Sentezi	8
2.5. ASA Enziminin Genetiği	9
2.6. ASA Enziminin Yalancı Eksikliği ve Genetiği	9
2.7. ASA Geninin Mutasyonları	11
2.8. MLD'nin İnsidansı	14
2.9. MLD'nin Tarihçesi	14
2.10. MLD'nin Klinik Tipleri	15
2.11. MLD'nin Tanısı	16
2.12. MLD'de Tedavi	18
2.13. MLD'de Hayvan Modelleri	19
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	21
3.1. Gereçler	21
3.1.1. Maddeler	21
3.1.2. Aygıtlar	21
3.1.3. Çalışma Materyali	22
3.2. Yöntemler	22
3.2.1. ASA Enziminin Aktivite Tayini	22
3.2.1.1. Tam Kandan Lökositlerin İzolasyonu	22

3.2.1.2.Lökosit Peletlerinin Homojenizasyonu	22
3.2.1.3.Protein Tayini	23
3.2.1.4.ASA Enziminin Aktivite Tayini	23
3.2.2. Mutasyon Analizi	24
3.2.2.1.Tam Kandan DNA izolasyonu	24
3.2.2.2.DNA Miktar Tayini	25
3.2.2.3.PCR	25
3.2.2.4.Agaroz Jel Elektroforezi	26
3.2.2.5.SSCP Analizi	26
3.2.2.6.Gümüş Boyama	28
3.2.2.7.DNA Bantlarının Değerlendirilmesi	28
3.2.2.8.DNA Dizi Analizi	29
3.2.2.9.Jelden PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	29
3.2.2.10.Kesim Enzimi Analizi	30
3.2.2.11.NuSieve Agaroz Jel Elektroforezi	31
4. BULGULAR	32
4.1. ASA Enziminin Aktivite Tayini	32
4.2. Mutasyon Analizi ile ASA Genindeki Mutasyonların Saptanması	32
4.2.1. PCR Yöntemi ile ASA Geninin 8 Eksonunun Çoğaltılması	32
4.2.2. SSCP Analizi Bulguları	38
4.2.3. DNA Dizi Analizi Bulguları	43
4.2.3.1.Ekson 5 Mutasyonları	44
4.2.3.2. Ekson 6 Mutasyonu	46
4.2.3.3. Ekson 7 Mutasyonu	47
4.2.4. Kesim Enzimi Analizi Sonuçları	49
5. TARTIŞMA	52
6. KAYNAKLAR	59
EK 1. ASA Geninin “ <i>Primer</i> ” Dizileri	
EK 2. Molekül ağırlığı belirteçleri jel resimleri	
EK 3. Genetik Şifre Tablosu	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ASA	Arilsülfataz A
ASB	Arilsülfataz B
ASA-PD	<i>Arylsulfatase A Pseudodeficiency</i>
APS	Amonyum Persülfat
B	Kör (<i>Blank</i>)
bç	baz çifti
<i>BsrSI</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>DdeI</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
DMSO	Dimetilsülfoksit
dNTP	2'-deoksi5'-trifosfat nükleotid
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ER	Endoplazmik Retikulum
K	Kontrol
M	Belirteç (<i>Marker</i>)
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MLD	Metakromatik Lökodistrofi
<i>MsII</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
NaOH	Sodyum Hidroksit
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	<i>Pseudodeficiency</i>
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SSCP	<i>Single Stranded Conformational Polymorphism</i>
TBE	Tris Borat EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER

<u>Şekil No.</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Galaktozilseramid-3-sülfat'ın (sülfatid) yapısı	2
Şekil 2.2 Laktozilseramid-3-sülfatın yapısı	3
Şekil 2.3 Psikozin sülfatın (lizosülfatid) yapısı	4
Şekil 2.4 Seminolipitin yapısı	4
Şekil 2.5 ASA enziminin sülfatiddeki sülfat grubunu ayırdığı bölge.	5
Şekil 2.6 ASA enziminin sentetik substratları	6
Şekil 2.7 ASA enziminin üç boyutlu yapısı	8
Şekil 4.1. Ekson 1 PCR analizi jel resmi	33
Şekil 4.2. Ekson 2 PCR analizi jel resmi	34
Şekil 4.3. Ekson 3 PCR analizi jel resmi	34
Şekil 4.4. Ekson 4 PCR analizi jel resmi	35
Şekil 4.5. Ekson 5 PCR analizi jel resmi	35
Şekil 4.6. Ekson 6 PCR analizi jel resmi	36
Şekil 4.7. Ekson 7 PCR analizi jel resmi	36
Şekil 4.8. Ekson 8A PCR analizi jel resmi	37
Şekil 4.9. Ekson 8B PCR analizi jel resmi	37
Şekil 4.10. Ekson 1 SSCP analizi jel resmi	39
Şekil 4.11. Ekson 2 SSCP analizi jel resmi	39
Şekil 4.12. Ekson 3 SSCP analizi jel resmi	40
Şekil 4.13. Ekson 4 SSCP analizi jel resmi	40
Şekil 4.14. Ekson 5 SSCP analizi jel resmi	41
Şekil 4.15. Ekson 6 SSCP analizi jel resmi	41
Şekil 4.16. Ekson 7 SSCP analizi jel resmi	42
Şekil 4.17. Ekson 8A SSCP analizi jel resmi	42
Şekil 4.18. Ekson 8B SSCP analizi jel resmi	43
Şekil 4.19. 5 numaralı hastanın ekson 5 DNA dizi analizi sonucu.	44
Şekil 4.20. 6 numaralı hastanın ekson 5 DNA dizi analizi sonucu.	45
Şekil 4.21. 9 numaralı hastanın ekson 5 DNA dizi analizi sonucu.	46

Şekil 4.22. 8 numaralı hastanın ekson 6 DNA dizi analizi sonucu.	47
Şekil 4.23. 2 numaralı hastanın ekson 7 DNA dizi analizi sonucu.	47
Şekil 4.24. 6 numaralı hastanın ekson 7 DNA dizi analizi sonucu.	48
Şekil 4.25. 9 numaralı hastanın ekson 7 DNA dizi analizi sonucu.	49
Şekil 4.26. 5 numaralı hastanın ekson 5 DNA'sının " <i>MspI</i> " kesim enzimi analizi	50
Şekil 4.27. Ekson 6 PCR ürünlerinin " <i>BsrSI</i> " kesim enzimi ile analizi	50
Şekil 4.28. Ekson 8 PCR ürünlerinin " <i>DdeI</i> " kesim enzimi ile analizi	51
Şekil 5.1 ASA proteininin ikincil yapısı.	53
Şekil 5.2 ASA proteininin üç boyutlu yapısı.	55

TABLolar

<u>Tablo No.</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 ASA enziminin çeşitli sülfat esterlerini hidroliz etme hızları	6
Tablo 4.1. ASA enzim aktivite değerleri	32
Tablo 4.2. SSCP analizinde normalden farklı olan sonuçlar	38
Tablo 4.3. Türk MLD hastalarında hastalığa neden olan mutasyonlar ve polimorfizmler	44

1. GİRİŞ

MLD otozomal resesif geçiş özelliği gösteren, ilerleyici tipte demiyelinizasyonla karakterize bir sfingolipit depo hastalığıdır. Bu hastalıkta lizozomal bir enzim olan ASA veya enzimin aktivatör proteini olan sapozin B eksikliği mevcuttur. Bu eksiklik sonucunda sülfatid parçalanamaz ve lizozomlarda birikir. MLD sfingolipit depo hastalıkları içinde ülkemizde en sık görülenidir. Hesaplanabilen minimum insidansı 1,43/100.000 (1/69.892) olarak bildirilmiştir. Bu oran Avrupa toplumunda saptanan oranla benzerlik göstermektedir. Geç bebeklik, gençlik ve erişkin tip olmak üzere üç tane klinik tipi belirlenmiştir. Ayrıca klinik olarak sağlıklı fakat enzim aktivitesi normale göre düşük olan hastalar tanımlanmıştır. Yalancı eksiklik olarak adlandırılan bu tablo MLD hastalığının klinik bulgularına sebep olmamakla beraber, MLD hastalığının zemininde bulunabildiğinden tanıyı zorlaştıran bir durum oluşturur. Enzimin tam veya tama yakın eksikliği tanı koydururken enzim aktivitesinin alt sınırlarına yakın değerlerde saptanması kesin tanı için yeterli değildir. Enzimde yalancı eksiklik yapan mutasyonların varlığı nedeniyle ara değerlerde çıkan enzim aktivitesine sahip hastalarda MLD tanısı için ileri incelemelere gerek vardır.

Anabilim Dalımızda MLD ile ilgili yaşayan bireylerde ve anne karnında bebeklerde ASA tayini yapılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, enzim tayininden sonra saptanan enzim eksikliğinin gerçek bir eksiklik olup olmadığını, gerçek ise eksikliğe neden olan mutasyonu ve bu mutasyon nedeni ile ortaya çıkan aktivite eksikliğinin olası mekanizmasını belirlemektir. Bu amaçla, öncelikle, enzim eksikliğinin MLD hastalığından mı yoksa yalancı eksiklikten mi kaynaklandığı bulunmaya, saptanan eksikliğin gende ne tip değişiklikler yaptığına dair cevaplar aranmaya çalışılmıştır. Bu amaçlara ulaşmak için ASA geninin DNA'sı PCR yöntemi ile çoğaltılmış, mutasyonların olası yerini saptamada bir mutasyon tarama yöntemi olan SSCP analizi, mutasyonun doğrulanmasında DNA dizi analizi yöntemi kullanılmış, yalancı eksikliğin varlığını belirlemede ise kesim enzimi analizi yapılmış ve MLD'li hastalarda hastalığı ortaya çıkaran moleküler mekanizmalar belirlenmeye çalışılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

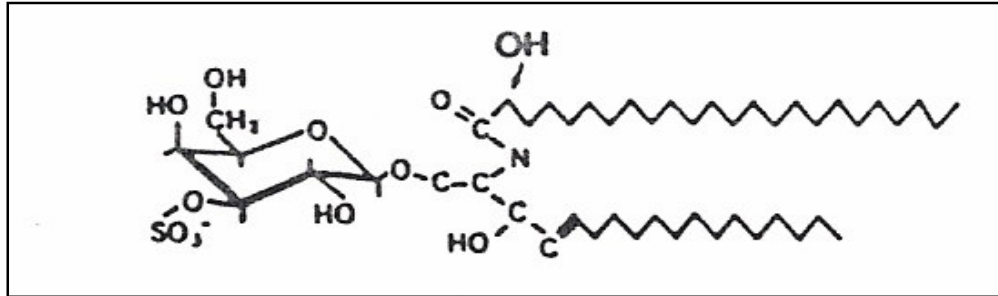
2.1. MLD'nin Tanımı

MLD, ASA enziminin eksikliği nedeni ile 3-O-sülfogalaktozil içeren glikolipitlerin (sülfatidler) yıkımındaki bozukluk sonucu ortaya çıkan ve otozomal resesif kalıtılan bir sfingolipit depo hastalığıdır. MLD'de parçalanamayan sülfatidler hücrelerin lizozomlarında birikir ve metakromatik boyanmaya neden olur. Sülfatidler, merkezi ve periferik sinir sistemindeki miyelin kılıfının önemli bileşenidirler. Bu nedenle, parçalanamayan sülfatidlerin lizozomlarda birikmesi, merkezi ve periferik sinir sisteminde ilerleyici demiyelizasyona yol açmaktadır (1).

2.2. Sülfatidin Yapısı ve Fonksiyonu

Sülfatidler ilk olarak Thudichum tarafından sülfür içeren lipit olarak tanımlanmış ve adlandırılmıştır. 1933 yılında Blix sülfatidleri izole ederek, serebronik asit, sfingozin, galaktoz ve sülfat içerdiğini belirtmiştir.

Sülfatid, galaktoserebrozid molekülünün galaktozunun hidroksillenmiş 3 no'lu karbon atomuna 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosülfattan (PAPS) sülfat aktarılması sonucu oluşan bir glikosfingolipittir. Mikrozomal sülfotransferazların katalizlediği bu reaksiyonun birçok memeli dokusunda meydana geldiği bildirilmiştir (2).

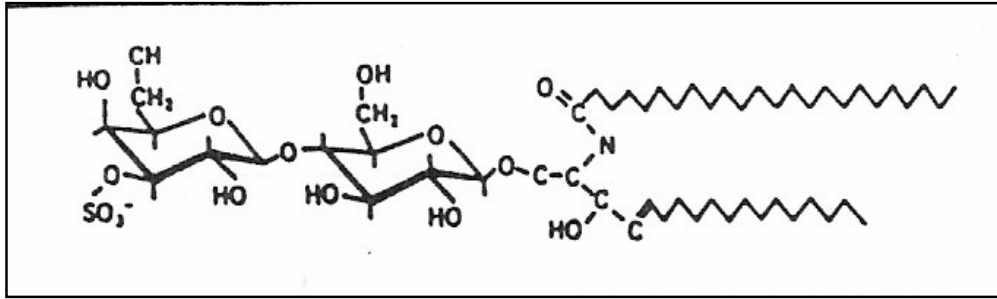


Şekil 2.1 Galaktozilseramid-3-sülfat'ın (sülfatid) yapısı. (1)

Hem sülfatidler hem de serebrozidler yüksek oranda 2-hidroksi grubuna sahip uzun zincirli yağ asitleri içerirler. Yetişkin bir bireyin beyindeki sülfatidlerin içerdiği hidroksillenmiş yağ asitlerinin %20-25'i serebronik (C24; n:0) ve oksinervonik (C24; n:1) asitlerdir. Fetal beyinde ise hidroksillenmiş yağ asitlerinin

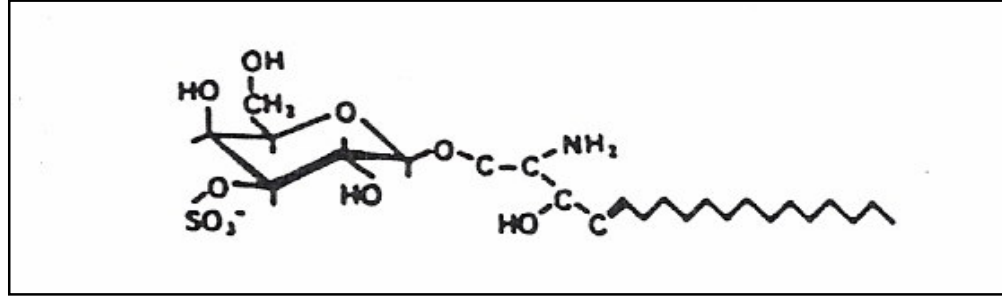
oranı daha düşüktür. Yetişkin bireyin beynindeki en önemli hidroksillenmemiş yağ asidi ise nervonik asit (C24; n:1) ve lignoserik asittir (C24; n:0). Fetal beyinde ise orta zincirli yağ asitleri hakimdir. Spinal kord sülfatidleri beyin beyaz cevherinde bulunan sülfatidlerle benzer yapıya sahiptirler. Fakat periferik sinir sistemindeki sülfatidlerin içerdiği yağ asitleri, miyelin zarını sıkıca paketlemek için daha fazla doymuş yağ asitlerinden meydana gelmişlerdir (3).

Sülfatidlerin beyinden sonra en fazla bulunduğu ikinci organ böbrektir. Böbrekteki derişimleri beyindeki derişimlerinin ancak onda biri kadardır; beyindekilere göre on kat daha fazla behenik asit (C22; n:0) içerirler. Ayrıca lignoserik ve nervonik asitler de beyine oranla böbrekte daha yüksek derişimlerde bulunurlar. Laktozilseramid-3-sülfat böbrekte bulunan bir sülfatid çeşididir. Aynı zamanda karaciğerin en önemli sülfatlanmış glikolipitidir. Laktozilseramid-3-sülfat insan beyinde bulunmaz.



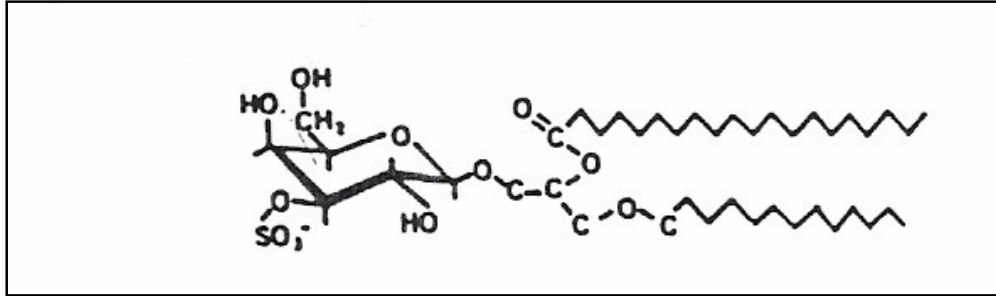
Şekil 2.2 Laktozilseramid-3-sülfatın yapısı (1)

Sülfatidin diaçil şekli olan psikozin sülfat (diğer adıyla lizosülfatid) beyin beyaz cevherinde, omurilikte ve böbrekte düşük oranda bulunur.



Şekil 2.3 Psikozin sülfatın (lizosülfatid) yapısı (1)

Sülfogalaktoyliserolipitin alkilaçil şekli olan seminolipit rat beyindeki sülfatlanmış glikolipitlerin %2,1-7,2'sini oluşturur. Memelilerde testis ve spermdeki en önemli sülfatid şeklidir. Normal insanların ya da MLD hastalarının beyinde rastlanmamıştır.



Şekil 2.4 Seminolipitin yapısı (1)

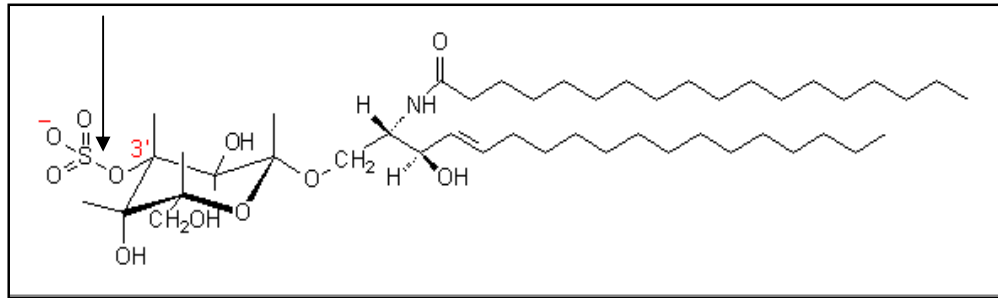
Sülfatid, miyelin dokusundaki toplam lipitlerin %3,5-4' ünü oluşturmaktadır. Sülfatid sentezi esas olarak Golgi aygıtının lümeninde sülfotransferazlar aracılığı ile gerçekleşmektedir. Sentezi en yüksek oranda miyelinizasyon sırasında olur; erişkin dönemde ise yavaşlar. Sülfatid sentezi kortizol tarafından uyarılmakta, neonatal hipotiroidizm gibi metabolizmayı yavaşlatan durumlarda ise azalmaktadır. Nöronlar ve oligodendroglial hücrelerin her ikisi de sülfatid sentezleme yeteneğine sahiptirler. Ama sülfotransferaz enzim aktivitesi glial kökenli hücrelerde çok daha fazladır.

3-Sülfogalaktozil içeren glikolipitlerin lizozomal bir enzim olan ASA ile sülfatının koparılması, bileşiğin parçalanmasında ilk basamaktır ve bir sülfatid aktivatör proteini olan sapozin B bağımlıdır. ASA veya sapozin B eksikliğinde parçalanamayan sülfatid lizozomlarda birikerek MLD hastalığına neden olmaktadır.

Sülfatid plazma zarının dış yüzeyinde yer alır; diğer zar lipitleri ile birlikte hidrofilik ve hidrofobik etkileşimde önemli bir role sahiptir (1). Kolesterol ile birlikte diaçilgliserol bazlı lipitlerin likit fazında yüzen agregatlar meydana getirir. Bunlara lipit “raft” lar denir (4). Sülfatidin anyonik yükü, zarın elektrik yükünün nötralizasyonunun devamı için gereklidir. Zarın elektriksel nötralizasyonunu inorganik katyonlarla organik aminlerin birarada bulunması sağlar. Sülfatid, miyelin kılıfın zar yüzeyine yerleşen önemli bir bileşendir ve proteolipit proteine “*myelin basic protein*” ile güçlü iyonik bağlarla bağlıdır. Sülfatid kofaktör olarak Na^+ - K^+ bağımlı ATPaz’ı kullanır ve Na^+ taşınımını sağlar. Sülfatidin ayrıca laminin, trombospondin, tenascin R, von Willebrand faktör gibi çeşitli hücre adezyon moleküllerine yüksek affinitesi vardır. “*Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis*” bakterileri, solunum yolu epiteline; malaryal sporozoitler de karaciğer hücrelerine invazyonda sülfatidleri bağlanma bölgesi olarak kullanabilmektedirler. Sülfatid ayrıca HIV-I’in gp-120 zarf proteini için ve “*helicobacter pylori*”nin gastrik hücrelere bağlanması için spesifik ligand görevi görür (1,3).

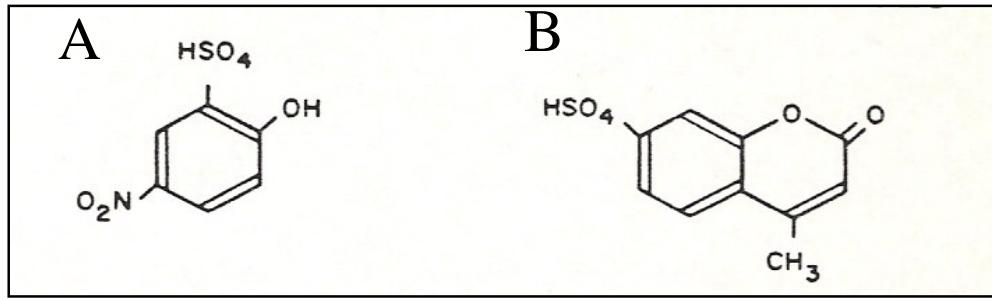
2.3. ASA Enziminin Yapısı ve Fonksiyonu

Sülfolipitlerin enzimatik hidrolizindeki ilk basamak, ASA enzimi ile sülfat grubunun polar uçtan koparılmasıdır. ASA enzimi bu hidroliz için substrat olarak steroid sülfat dışındaki diğer sülfat esterlerini kullanabilmektedir. En önemli fizyolojik substratı sülfatiddir. Laktozilseramid-3-sülfat, seminolipit ve psikozin sülfat da ASA enzimi ile hidroliz edilebilmektedirler.



Şekil 2.5 ASA enziminin sülfatiddeki sülfat grubunu kopardığı bölge. (1)

ASA ayrıca p-nitrokatekol sülfat ve 4-metilumbeliferil sülfat gibi sentetik aromatik sülfat esterlerini de hidroliz edebilmektedir (Şekil 2.5). Bu sentetik bileşiklerin hidrolizi sonucu ölçülebilen kromojenik ve florojenik ürünler oluşur, bu sonuçtan yola çıkarak ASA enzimi için aktivite tayin yöntemleri geliştirilmiştir (1). Bahsedilen sentetik substratlar aynı zamanda arilsülfataz B (ASB) (5) ve arilsülfataz C (ASC) tarafından da hidrolize uğramaktadırlar. ASB, mukopolisakkaridozların metabolizmasında görevli bir lizozomal enzim, ASC ise, steroid sülfat katabolizmasında aktif olan bir mikrozomal enzimdir (1).



Şekil 2.6 ASA enziminin sentetik substratları. **A:** p-nitrokatekol sülfat
B: 4-metilumbeliferil sülfat (3)

Tablo 2.1’de ASA enziminin hidroliz edebildiği çeşitli sülfat esterleri için spesifik aktivitesi gösterilmiştir. Tablodan sentetik sülfat esterlerinin fizyolojik substratlara göre daha yüksek bir oranda hidroliz edildikleri anlaşılmaktadır (1).

Tablo 2.1 ASA enziminin çeşitli sülfat esterlerini hidroliz etme hızları (3)

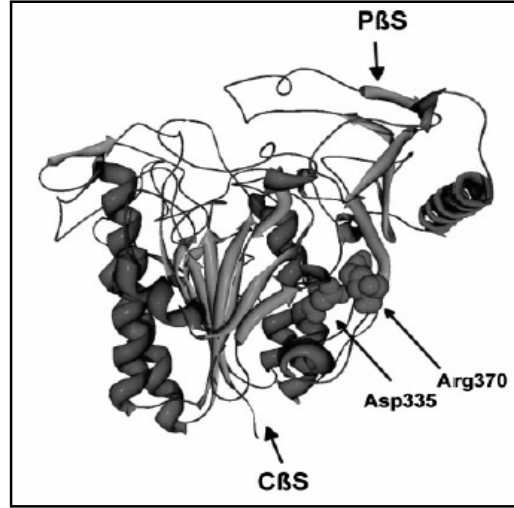
Substrat	$\mu\text{mol/dak mg protein}$
p-nitrokatekolsülfat	160,0
4-metilumbeliferil sülfat	40,0
Askorbik asit-2-sülfat	85,0
Serebrosid-3-sülfat	6,6
Seminolipit	5,0
Psikozin sülfat	3,0

ASA tüm dokularda ve vücut sıvılarında bulunur. Çok çeşitli dokulardan saflaştırılmıştır (ör: karaciğer, plasenta, idrar). İçerdiği oligosakkarit zincirinin yükündeki farklılıklara bağlı olarak, bu dokulardaki izoelektrik noktaları ve elektroforezdeki davranışları farklılık gösterir. Yüksek derişimlerde içerdiği aspartik asit ve glutamik asit nedeni ile düşük izoelektrik noktaya sahip bir asidik glikoproteindir. Prolinden zengindir. pH 4,5'ta dimerler $[(\alpha_2)_4]$ halinde biraraya gelen homo-oktamer yapısını oluşturur. Dimerlerin tetramer oluşturmasını 424. pozisyondaki glutamin amino asidinin protonlanıp protonlanmaması kontrol eder. pH 6'nın altında 424. pozisyondaki glutamin protonlanır ve Phe-398 ile arasındaki hidrojen bağlarının sayesinde dimer-oktamer yapısı dayanıklı hale gelir. ASA enziminde ortam pH'sının 7'nin üstünde olduğu durumlarda Glu-424 ile Phe-398 arasındaki hidrojen bağları daha fazla dayanamaz ve dimer-oktamer yapısı dayanıklılığını kaybeder, moleküler ağırlığı yaklaşık 100 kDa olan monomerler haline dönüşür. Monomerler globuler bir yapıya sahiptirler (6).

ASA aktif bölgesinde histidin ve iki veya daha fazla arjinin amino asiti içermektedir. ASA enzimini milimolar derişimlerden daha düşük değerlerde inhibe eden anyonlar (SO_4^{-2} , PO_4^{-3} , SO_3^{-2} , F^-) ve katyonlar (Ag^+ , Cu^{+2}) bulunmaktadır. “*In vitro*” ortamda enzimin aktif hale gelebilmesi için optimum iyonik derişimin oluşturulması gerekmektedir, bu da safra tuzları (sodyum kolat, taurodeoksikolat) ile sağlanmaktadır. “*In vivo*” ortamda ise, safra tuzlarının yaptığı bu görevi sapozin B yapar. Sapozin B ile bağlanan sülfatid hidroliz için enzime sunulur. Sapozin B iki tane izoelektrik noktaya sahip (4,1; 4,5) enzimatik özelliği olmayan lizozomal bir glikoproteindir (1, 3).

ASA enzimi kristalize edilmiş ve üç boyutlu yapısı belirlenmiştir (7). Bu yapı, amino asit değişimlerinin enzimin işlevi üzerindeki etkisini ve bu değişimlere sebep olan mutasyonların yapısal boyutta etkilerini anlamak için önemlidir. ASA, çoğu birbirine paralel olan 13 zincirin ortada oluşturduğu β -tabakalı yapı ve bunun her iki tarafında yer alan birkaç α heliksten meydana gelmektedir (Şekil 2.6). Ortadaki β -tabakalı yapının dışında, enzimin daha periferinde yerleşmiş ve dört anti paralel zincirden oluşan ek bir β -tabakalı yapı daha bulunmaktadır. Negatif yüklü Asp-335 ile pozitif yüklü Arg-370 rezidüleri arasında bir tuz köprüsü bulunmaktadır. Asp-335, merkezi yerleşim gösteren geniş β -tabakaya yakın olan helikslerden birinin

başlangıcında yer alırken; Arg-370 periferik yerleşimli küçük β -tabakalı yapının sonunda yer almaktadır. Tuz köprüsünün varlığı, aktif merkeze doğrudan etki etmese de, ASA'nın aktif merkezinin uygun konfigürasyonu için gerekli görünmektedir (7, 8).



Şekil 2.7 ASA enziminin üç boyutlu yapısı (8). C β S ve P β S sırayla merkezi ve periferik β -tabakalı yapıyı göstermektedir.

2.4. ASA Enziminin Sentezi

Düz endoplazmik retikulumda (ER) sentezlenen ASA proteini 507 amino asitten oluşmaktadır ve birçok sentez sonrası düzenlemeye uğramaktadır.

ASA 62 kDa ağırlığında bir polipeptid olarak ER'da sentezlenir. Tüm memeli sülfatazlarında olduğu gibi aktif bölgesindeki en önemli rezidü formilglisindir. Formilglisin rezidüsü ER içinde ASA proteininde 69. pozisyondaki sistein (Cys69) rezidüsünden üretilmekte, tiyol grubunun aldehite oksitlenmesi ile meydana gelmektedir. Bu düzenleme sülfataz aktivitesi için gereklidir ve ASA henüz üç boyutlu yapısını kazanmadan, protein translokasyonunun son evrelerinde meydana gelir. Cys69'u çevreleyen 16 amino asit rezidülük lineer dizi bu sentez sonrası oksidasyonun başlaması için yeterlidir.

ER'un lümeninde 18 amino asitlik sinyal peptid kesilir. Sinyal peptid kesildikten sonraki ilk amino asit Arg19'dur ve polipeptid zinciri bu amino asit ile başlar, Ala507'e kadar devam eder (7). Üç tane yüksek mannoz içerikli oligosakkarit

yan zincirine sahiptir (Asn158, Asn184, Asn350). Bunlardan birincisi ve üçüncüsü fosforillenmiştir (9), ikinci oligosakkarit yan zincirinin fosforillendiği ise mutant ASA'da "*in vitro*" olarak gösterilmiştir (10). Golgi aygıtında oligosakkarit yan zincirleri işlenen ASA buradaki mannoz-6-P reseptörlerine bağlanır ve daha sonra veziküler taşınım ile buradan ayrılır. Lizozoma ulaşan ASA lizozom zarı ile füzyon yaparak içeri alınır. İçerideki asidik ortam nedeniyle mannoz-6 fosfat reseptöründen ayrılır ve lizozom içinde serbest kalır. Diğer lizozomal enzimlerde olduğu gibi lizin amino asidi ASA'nın fosfotransferaz enzimi tarafından tanınmasında önemlidir. Fosfotransferaz enzimi ASA'nın sahip olduğu fosfatı ASA'dan ayırır ve bu son basamaktan sonra olgun ASA oluşmuş olur (1).

2.5. ASA Enziminin Genetiği

ASA geni 22. kromozomun uzun kolu üzerinde bulunur (11), 8 eksondan (103-320 nükleotid uzunluğunda) oluşur ve 3,2 kb büyüklüğündedir. Bu eksonlar 507 amino asitten oluşan bir polipeptit sentezlerler. Promotor bölgesinde -10, -40, -50 ve -60 pozisyonunda birden fazla GC kutusu bulunur, ancak TATA veya CAAT kutusu bulunmaz. Bu yerleşim transkripsiyon faktörü Sp1 ile etkileşiminde uygun bir pozisyon oluşturur. Başlangıç kodonunun üstünde, 367-387 baz çifti (bç) arasında yerleşmiş dört tane transkripsiyon başlangıç bölgesi içermektedir. ASA cDNA'sı 3 farklı boyutta mRNA ile hibrid oluşturur (2,1 kb, 3,7 kb, 4,8 kb) (12, 1). Poliadenilasyon sinyali sonlanma kodonundan sonraki 95 nükleotidlik bölümdedir ve poli A kuyruğunun 23 bç üzerindedir (13). İlk meydana gelen transkripsiyon ürünü 2,1 kb büyüklüğünde olan mRNA'dır. Bu mRNA ASA geninden kopyalanan toplam mRNA'ların %30-40'ını oluşturmaktadır (14). Kalan %60-70'lik bölümü oluşturan mRNA'lar ise 3,7 ve 4,8 kb büyüklüğündedir (1). 2,1 kb büyüklüğündeki ASA cDNA'sı 363 nükleotidlik 5' kodlanmamış bölgeyi takiben 1521 nükleotid uzunluğundaki kodlanan bölgeyi ve yine 130 nükleotidlik 3' kodlanmamış bölgeyi oluşturur (12, 13).

2.6 ASA Enziminin Yalancı Eksikliği ve Genetiği

Avrupa toplumunda klinik olarak hiçbir belirti vermeyen, ancak ASA aktivite tayininde eksikliğe neden olan bireyler tanımlanmıştır. Bu bireylerdeki ASA

aktivitesi normal ASA aktivitesinin “*in vitro*” ortamda %5-15’i kadardır; ama “*in vivo*” olarak normal sülfatid katabolizmasını etkilememektedir. Bu tablo yalancı eksiklik (*pseudodeficiency*) olarak adlandırılmıştır (ASA-PD). ASA enziminin yalancı eksikliğine neden olan 2 tane A→G “*tranzisyon*”u tanımlanmıştır. Bunlardan biri N-glikozilasyon kaybına, diğeri ise, poliadenilasyon bölgesi kaybına neden olmaktadır. Avrupa toplumunda biyokimyasal ve genetik analizlerle tespit edilen ASA-PD allel sıklığı %10-20’dir ve N-glikozilasyon bölgesinde oluşan mutasyonun evrimsel olarak daha önce olduğu varsayılmaktadır (1, 15, 16). ASA-PD vakalarının mutasyonları çoğunlukla homozigot alleller içerir. Bazı vakalarda PD allel ve MLD allel için “*compound*” heterozigotluk gösterilmiştir. Genel olarak, ASA-PD vakalarında “*compound*” heterozigotluğun herhangi bir nörolojik hastalık için risk oluşturmadığı (17) benimsenmiş, ancak bazı yayınlarda bu vakalarda çeşitli nörolojik hastalıkların görülme sıklıklarının arttığı bildirilmiştir (18).

ASA-PD N-glikozilasyon bölge mutasyonu olan bireylerde normal bireylere göre, ASA proteini 2-4 kDa daha küçüktür. Bu farklılık genellikle C-ucundaki N-glikozilasyon bölgesinde 350. pozisyondaki asparajin amino asidini serin amino asidine çeviren nokta mutasyonu nedeni ile oluşur; amino asit değişikliği proteinde bir N-oligosakkarit zincirin eksikliğine yol açar. Normalde üç tane bulunan N-glikozilasyon bölgesi ASA-PD’de yalnızca iki tanedir.

ASA geninde bulunan ikinci PD mutasyonu ise, sonlanma kodonundan aşağıya doğru 95 bç’lik poliadenilasyon sinyali oluşturan bölümde bulunur (1524+95A → G) (14, 19) ve 2,1 kb’lık mRNA kaybına yol açar. Her iki mutasyon da A → G değişimidir ve birbirlerinden bağımsız olarak bulunurlar.

N-glikozilasyon bölge kaybı, poliadenilasyon sinyal kaybına göre daha sık görülür. Türkiye’de poliadenilasyon sinyal kaybının sıklığı sağlıklı bireylerde %11,5, MLD hastalarında ise %8,3 bulunmuştur (20). Güney Amerika’da N350S için %20,7, 1524+95A → G için %7,9 sıklık gözlenmiştir (21). PD mutasyonlarına çeşitli toplumlarda farklı sıklıklarda rastlanmaktadır. Örneğin; Danimarka’da %6, Avustralya’da %10, İsrail’de %10, Fransa’da %12 (1), İspanya’da %12 (22), İngiltere’de %13, İtalya’da %10.1 (23), Portekiz’de %18,3 (24) tür. Hırvatistan’da ise N350S için sıklık %6.8, 1524+95A → G için %2.8 olarak rapor edilmiştir (25).

Yalancı eksiklikte “*in vitro*” ortamdaki enzim aktivitesi azdır. “*In vivo*” ortamda yalancı eksikliğe sahip bireylerin enzim aktiviteleri substrat affinitesi, optimum pH, inhibitör duyarlılığı ve sıcaklık dayanıklılığı bakımından test edilmiş ve kontrol bireyelerine göre farklılık bulunamamıştır (1). Çeşitli çalışmalarda, N-glikozilasyon bakımından mutant hücrelerden ifade edilen enzimlerin aktivitelerinde normale göre bir fark bulunamamıştır (14). “*In vitro*” koşullarda N-glikozilasyon bölgesi mutasyonunda ASA aktivitesi normalin %50’si kadar, poliadenilasyon bölgesi mutasyonunda ise ASA aktivitesi normalin ancak %10’u kadar bulunmuştur.

2.7. ASA Geninin Mutasyonları

ASA geninde 80’den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bunlardan yalnızca üç tanesi sık görülmektedir (1). 459+1G → A ve P426L mutasyonları tüm mutant allellerin %50’sini oluşturmaktadır. I179S ise %5’lik bir orana sahiptir. Hastalık genetik heterojenite gösterir, mutasyonların çoğu sadece bir hastada veya ailede bulunmaktadır. Kalan %45’lik oranı bu tip mutasyonlar oluşturmaktadır. MLD’ye neden olan allellerin bazıları, mutasyonun etkileri bakımından incelenmiştir (26, 27). Sekiz ekson için yanlış anlamlı (*missense*), anlamsız (*nonsense*) ve çerçeve kayması (*frameshift*) mutasyonları tanımlanmış ve birçok kesim bölgesi (*splice site*) mutasyonu rapor edilmiştir. Ayrıca bir MLD ailesinde ASA geninin tam delesyonuna rastlanmıştır (28).

Bu mutasyonlardan çok azının enzim üzerindeki etkileri biyokimyasal olarak açıklanabilmiştir. Biyokimyasal açıdan incelenen bazı mutasyonlar, mutant ASA’nın ER içinde kalmasına sebep olmuş, diğerleri ise ASA’nın düzgün biyosentezine ve hücre içi dağılımına izin vermiş, ancak Golgi aygıtı sonrası ya da lizozom içi dayanıksızlığa neden olmuşlardır. Bunun sonucu olarak ASA Golgi aygıtı sonrası yolda ya da lizozomda parçalanmıştır (29). Biyokimyasal ve genetik verilere dayanarak MLD için bir genotip-fenotip korelasyonu belirlenmiştir. Araştırmacılar mutant allelleri iki gruba ayırmaktadırlar. İlk grupta allellerde oluşan mutasyon fonksiyonel enzimlerin sentezini engellemektedir (“*null*” alleller), ikinci grupta ise rezidual enzim aktivitesi (R alleller) gözlenmektedir. İşlevsel bir enzimin sentezine izin vermeyen alleller (“*null*” alleller) için homozigot olan hastalarda, hastalığın en ağır seyreden geç bebeklik tipi görülür. “*Null*” allel ve R allel “*compound*”

heterozigotluğu olan hastalarda hastalığın daha az ağır seyreden gençlik tipi görülürken, rezidüel enzim aktivitesi ile ilişkili alleller için homozigot olan hastalarda ise genellikle hastalığın hafif seyreden erişkin tipi görülür (30, 1).

Mutasyonlar içinde amino asit yer değişimi en büyük grubu oluşturur. Bu mutasyonların varlığı “*in vitro mutagenез*” deneylerinde birçok vakada gösterilmiştir. Bu gruptaki mutasyonlar polimorfizme değil de daha çok enzimde eksikliğe yol açarlar. Amino asit yer değişimi ekson 1 dışında tüm ASA gen bölgelerinde bulunmuştur (1).

MLD mutasyonlarından 3 tanesi Avrupa toplumunda sık görülür: 459+1G → A mutasyonu, Pro426 → Leu mutasyonu ve Ile179 → Ser mutasyonu. Bu mutasyonlardan en sık görüleni 459+1G → A mutasyonudur. Ekson 2 ile intron 2'nin sınırında yer alan bir kesim bölgesi (*splice site*) mutasyonudur (30). Büyük çoğunlukla geç bebeklik tipinde görülen bir alleldir. Bu allel Arap toplumunda da sık bulunmaktadır.

En sık görülen ikinci mutasyon ise, amino asit yer değişimi ile oluşan Pro426 → Leu mutasyonudur. Ekson 8 bölgesinde yer alır. Bu mutasyon bir yanlış anlamlı (*missense*) mutasyondur. Gençlik tipi MLD'ye neden olur. Mutasyona sahip olan hastaların başlangıç semptomları genellikle nörolojik semptomlardır. Bu mutant genle sentezlenen enzimin sentezlenme miktarı ve enzim aktivitesi normal sınırlardadır. Fakat enzim hızla lizozom içinde yıkılır. Yani lizozom içi dayanıklılık kaybı vardır (31).

Üçüncü en sık görülen mutasyon ise yine amino asit yer değişimi ile meydana gelen Ile179 → Ser mutasyonudur; ekson 3 bölgesinde yer alır. Homozigotluğu gösterilememiştir; hep bir “*null*” allelle “*compound*” heterozigot olarak bulunur ve geç başlangıçlı MLD'ye (gençlik veya erişkin tip) neden olur (32). Mutasyona sahip olan hastaların genellikle başlangıç semptomları psikiyatrik semptomlardır.

Tanımlanan diğer ASA mutasyonlarından Gly309→ Ser amino asit değişimi mutasyonunda enzim aktivitesi normal ama lizozom içi yarılanma ömrü kısalmıştır (29). C300F ve P425T mutasyonlarında da enzimin yarılanma ömrü kısalmıştır. Lizozom içinde yıkıma rastlanmaktadır. Mutasyon sonucu proteinin lizozomal proteazlara olan hassasiyeti artmıştır(33). P377L, D381V, G154D, P167R, T274M,

D335V (Asp-335 –Val) gibi birkaç amino asit yer değişimi mutasyonu da enzimin ER içinde tutulmasına lizozoma geçememesine sebep olmuştur (34, 1).

Yapılan moleküler çalışmalarda çeşitli mutasyonların ysek oranlarda görüldüğü değişik etnik gruplar ortaya çıkmıştır. Thr274 → Met değişimi birkaç Lübnan orijinli hastada saptanmıştır. Alaskalı Eskimolarda ve Navajo yerlilerinde kesim bölgesi mutasyonu olan 848 + 1G → A mutasyonu bulunmuştur (1). Kk bir topluluk olan İsrail Musevilerinde tüm hastalar Pro426 → Leu alleli bakımından homozigottur (35). Sık görülen MLD allelleri bakımından Japonlar Avrupalılara göre değişik mutasyonlar içerir. Japon hastalarda Gly99 → Asp mutasyonunun insidansı %30 civarındadır (1). İsrail Araplarında 8000 canlı doğumda 1 olduğu rapor edilmiş ve tüm hastaların akraba evliliğinin en sık olduğu kuzey bölgeden geldiği bildirilmiştir. Ayrıca bu bölgeden gelen hastalarda yapılan çalışmalarda bulunan beş farklı mutasyonun hepsinin homozigot olduğu belirtilmiştir (35).

MLD'nin ağır seyreden, geç bebeklik tipinin görüldüğü hastalarda iki mutasyon (Asp-335-Val ve Arg-370-Trp) daha tanımlanmıştır. Ayrıca hastalığın geç başlangıçlı olduğu hastalarda yeni bir mutasyon olan Arg-370-Gln tanımlanmıştır (8). Asp-335-Val mutasyonu ile mutasyona uğrayan enzimin ER içinde kaldığı ve yıkıldığı bilinmektedir (34). Asp-335-Val ve Arg-370-Trp amino asitlerindeki yer değişimleri enzim aktivitesini tamamen durdururken, Arg-370-Gln amino asitlerindeki yer değişimi olan ASA'da düşük düzeyde rezidüel enzim aktivitesi görülebilmektedir. Bu durum, MLD için bulunan genotip-fenotip korelasyonu ile uyumludur. Düşük düzeyde rezidüel enzim aktivitesi bulunan hastalarda, MLD geç başlangıçlı olmaktadır. Geç başlangıçlı hastalarda Arg-370-Gln mutasyonu bulunurken, diğer mutasyonlar daha ciddi biçimde etkilenen geç bebeklik tipi hastalarında bulunmuştur. Asp-335 ve Arg-370 rezideleri, tuz köprüsünün oluşumunda rol almalarının yanı sıra enzimin doğru yapılanmasına da katkı sağlamaktadırlar.

ASA dimerlerinin oktamer hale geçişi Glu424 ile Phe398 arasındaki hidrojen bağlarına bağlıdır. Phe398 delesyonu enzimin lizozom içinde oktamerleşme kaybına yol açmaktadır (1).

ereve kayması (*frameshift*) mutasyonlarına en güzel örnekler de 2007 yılında in'de yapılan bir çalışma sonucunda elde edilmiştir. c.1338dupC ereve

kayması mutasyonunda normal sonlanma kodonu kaybı görülmekte, bunun sonucu olarak ilk 444 amino asit normal olarak okunmakta fakat takip eden 119 amino asit poliadenilasyon sinyali ile karşılaşana kadar sapmış olarak uzamaktadır. Bu mutasyon anormal okunma-uzama mutasyonudur. Ekson 8 bölgesinde meydana gelmektedir. Diğer çerçeve kayması mutasyonu ise c.179_180dupCA ekson 1 bölgesinde oluşmuştur. Bu mutasyonda da ilk 60 amino asit normal okunmuş, takip eden yeri kaymış 16 amino asit proteinde erken sonlanmaya neden olmuştur (36).

2.8. MLD'nin Görülme Sıklığı

MLD ülkemizde en sık görülen sfingolipit depo hastalığıdır. Ülkemizde hesaplanan en düşük insidansı 100.000 canlı doğumda 1,43 dür (37). Bu rakam hastalığın sık görüldüğü batı toplumları ile benzerdir. (38, 39). Son yıllarda çok merkezli yapılan çalışmalarla da 459+1G → A mutasyonunun ve P426L mutasyonunun Avrupa toplumunda en sık rastlanan mutasyonlar olduğu bilgisi pekiştirilmiştir (40).

2.9. MLD'nin Tarihçesi

MLD ilk defa 1910 yılında Alman nörolog ve psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından sinir sistemindeki metakromatik boyanan cisimciklerin gösterilmesi ile tanımlanmıştır. Bu hastaların klinik semptomları bugünkü bilgilerimize dayanarak erişkin tip MLD'ye uymaktaydı. 1921 yılında Witte metakromatik materyallerin sadece beyinde değil; karaciğer, böbrek ve testislerde de biriktiğini gösterdi. 1925 yılında Scholz aynı aileye ait üç çocukta ilerleyici tip lökodistrofinin miyelin anormalliğinden olabileceği üzerinde durdu ve bunun glial hücre defektine bağlı olabileceğini açıkladı. Fakat dokulardaki metakromatik cisimcikleri saptamada başarılı olamadı. von Hirsch ve Peiffer 1955'te asetik asit-krezil viyole boyasının MLD hastalarının dokularında kahverengiye dönüştüğünü gösterdiler. Bu boyamayı kullanarak Peiffer ve Scholz, Scholz'un hastalarında çarpıcı metakromaziye buldular. Bunun ışığında gençlik tip MLD için klinik ve patolojik gerçeklere dayalı ilk ayrıntılı yayını yaptılar. MLD'nin 3. tipi olan geç bebeklik döneminde başlayan tipi ise 1933 yılında Greenfield tarafından yayınlandı.

Uzun yıllar diffüz beyin sklerozu olarak bilinen hastalık 1938 yılında Einarson ve Neel tarafından metakromatik lökoensefalopati olarak yeniden adlandırıldı. Daha sonraki yıllarda Norman bu hastalığı lipidozis sınıflaması içine soktu. Birbirinden bağımsız olarak 1958 ve 1959 yıllarında sırayla Jatzkewitz ve Austin MLD hastalarının dokularında bulunan 3-O sülfogalaktozil seramid'i keşfederek bunu ispatladılar. 1963'te Austin MLD'de ASA enzim eksikliği olduğunu yayınladı. Bundan 2 yıl sonra Mehl ve Jatzkewitz sülfatid metabolizmasındaki blokajı gösterdiler. ASA, daha sonra sülfatid sülfatazın ısıya duyarlı olan şekli olarak tanımlandı. Mehl ve Jatzkewitz ayrıca sülfatid sülfatazın ısıya dayanıklı şeklini, şimdiki adıyla sapozin B'yi tanımladılar. MLD hastalarında ASA eksikliğinden daha az olmak üzere bu faktörün de eksikliği olabileceği gösterildi.

1975'te normal bireylerde çok düşük ASA seviyelerine rastlanıldığını gösteren yayınlar başladı ve bu yeni durum ASA'nın yalancı eksikliği olarak adlandırıldı (1).

2.10. MLD'nin Klinik Tipleri

MLD başlangıç yaşı esas alınarak geç bebeklik, gençlik ve erişkin tip olarak 3 klinik tipe ayrılmıştır. En sık görülenler geç bebeklik ve gençlik tip MLD'dir. Erişkin tip MLD ise MLD hastalarının %25'ini oluşturur.

Geç bebeklik tip MLD:

Başlangıç yaşı 6 ay ile 4 yaş arasındadır. Hogberg bu klinik tipi kendi altında 4 safhaya daha ayırmıştır.

1. klinik safha: Bu safhadaki çoğu hastanın bacaklarında ya da tüm ekstremitelerinde hipotonisite mevcuttur. Ayağa kalkmada ya da yürümede desteğe ihtiyaçları vardır. Yürüyüşleri kararsızdır. Derin tendon refleksleri ikincil ilerleyici polinöropatiye bağlı azalmış ya da yoktur. Bu safha birkaç aydan bir yıla kadar değişen sürelerde devam edebilir.

2. klinik safha: Bu safhadaki hastalar ayakta duramazlar ve mental gerileme mevcuttur. Konuşma bozukluğu, nistagmus ve optik atrofi görülür. Ağrılı nöropati ve ataksi vardır. Bu safha ise yalnızca birkaç ay sürer.

3. klinik safha: Bu safhada ise ekstansör plantar refleks gibi patolojik reflekslerle seyreden spastik tetrapleji mevcuttur. Hasta yatağa bağlıdır. Beslenme

güçlükleri ve hava yolu obstrüksiyonu görülebilir. Epileptik nöbetler bu safhadaki hastaların %25'inde görülür.

4. klinik safha: Bu son klinik safhada hasta çevreyle olan bağlantılarını kaybetmiştir. Nazogastrik veya gastrostomi tüpüyle beslenir. Bu safha yaklaşık birkaç yıl sürer. Ölüm genellikle klinik semptomların ortaya çıkışından itibaren 5 yıl içerisinde gerçekleşir.

Gençlik tip MLD:

Başlangıç yaşı 5-16 yaş arasındadır. Okul başarısında düşme, konuşmada bozulma, yürüyüşte sakarlıklar ve inkontinans belli bulgularıdır. Ayrıca duygusal ve davranışsal bozukluklar görülür. 1 yıl içerisinde hasta yürüyemez hale gelir. Spastik parezi ve serebellar ataksi gelişir. Bebeklik tipinin aksine derin tendon refleksleri genellikle normaldir. Optik atrofi ve nöbetler de görülebilir. Sonunda hasta yatağa bağımlı hale gelir (deserebre safha). Çoğu hasta 20 yaşına gelmeden önce ölür.

Erişkin tip MLD:

Puberteden 63 yaşa kadar pek çok değişik yaşta başladığına dair yayınlar mevcuttur. Entellektüel kapasitede düşme, okul veya iş başarısında azalma görülebilir. Bellek bozuklukları, disorganize düşünceler, davranışsal bozukluklar ve halüsinasyonlar gibi psikiyatrik semptomlara sık rastlanır. Bazen başlangıçta tanısı şizofreni veya psikotik depresyonla karışır. Sakar hareketler, üriner ve bazen fekal inkontinans görülebilir. Epileptik nöbetler nadirdir. En son safhada hasta bitkisel hayata geçebilir.

Sapozin B eksikliği:

Başlangıç yaşı doğumdan 30 yaşa kadar olabilir. Klinik görüntü ASA eksikliğine bağlı MLD'den ayırtdilemez, ama ASA aktivitesi normaldir (1, 3)

2.11. MLD'nin Tanısı

MLD hastalığının tanısı klinik ve laboratuvar bulgularının heterojenitesi nedeni ile karmaşıktır. Doğru tanı için en çok kullanılan laboratuvar testleri beyin BT ya da MRI görüntüleme, sinir iletkenlik hızının ölçümüdür. Ayrıca klinik bulguların biyokimyasal deneylerle desteklenmesi şarttır. MLD için en önemli belirteç ASA enzim eksikliğidir. ASA enziminin aktivite eksikliği saptanan kişilerde PD mutasyonlarına bakmak gereklidir (1).

ASA enzim aktivitesi için en çok tercih edilen kaynak periferik kan ya da kültürde üretilmiş fibroblastlardır. p-nitrokatekol sülfat ve 4-metilumbeliferil sülfat ticari olarak elde edilebilen, kolorimetrik ve florometrik olarak enzim aktivitesinin saptanabilmesine olanak sağlayan sentetik substratlardır. Fakat ASB enzimi de bu sentetik substratları hidroliz edebilmektedir. Bu sebepten dolayı ASB enziminin yüksek tuz derişiminde inhibe olmasından yola çıkarak yeni bir tayin yöntemi geliştirilmiştir (5). ASA'nın diğer arilsülfatazlardan ayırımı iyon değiştirici kromatografi, elektroforez ve izoelektrik odaklama ile yapılabilir. ASA'nın doğal substratı olan sülfatidin radyoaktif işaretleme ASA aktivite tayininde bir başka yol olarak karşımıza çıkmaktadır (1).

MLD'ye enzimatik tayin yöntemleri ile tanı konulmasındaki en önemli problemler, ASA PD allellerinin sıklığı ve seyrek de olsa karşılaştığımız sapozin B eksikliğidir. ASA aktivite tayininin kolorimetrik ya da florometrik olarak yapıldığı durumlarda, PD alleleri için homozigot bireyler ile PD/MLD heterozigot bireylerin rezidüel enzim aktivitesi bakımından birbirinden ayrılması mümkün değildir. Ayrıca sapozin B eksikliği ile oluşan MLD hastalarının sentetik substratlar kullanılarak yapılan ASA aktivite tayinleri normal sınırlardadır. Sentetik substratlarla ASA eksikliği saptanan hücre homojenatlarında yalancı eksiklik durumu ekarte edilmedikçe MLD tanısı kanıtlanamaz. Etiyolojisi bilinmeyen nörolojik semptomları olan yalancı eksikliğe sahip bireyler yanlışlıkla MLD tanısı alırlar. Yalancı eksiklik durumu sülfatid yükleme testi ile MLD'den ayrılmalıdır. Bu test zahmetli ve pahalı bir yöntemdir. ASA aktivitesi düşük ama klinik semptomları MLD'yi desteklemeyen hastalarda ya da ASA aktivitesi normal klinik semptomları MLD'yi destekleyen hastalarda tanı için yardımcı bir testtir. Fibroblastların ya da hücre kültüründe üretilen hücrelerin sülfatidi parçalama yeteneklerini ölçer (1). Bu yöntem PD/MLD heterozigot bireylerle MLD'nin erişkin tipinin ayırımında başarısız olabilir (41). Sülfatid yükleme testi sapozin B eksikliğinin ayırımında da önemlidir. Sülfatidin parçalanması ASA ve sapozin B'nin her ikisinin de ortamda olmasına bağlıdır. Normal enzim aktivitesi varlığında sülfatid yükleme testinde sülfatidin parçalanmasında eksiklik varsa bu sapozin B eksikliğine bağlı MLD için tanısaldır (1).

ASA eksikliklerinin ayırımında yardımcı bir diğer test ise sülfatidin idrarla atılımının değerlendirilmesidir. MLD hastalarında sülfatidin idrarla atılımı yüksek oranda artmıştır. Yalancı eksikliğe sahip bireylerde ise sülfatidin idrarla atılımı normaldir. İdrardaki bu sülfatidin kaynağı böbreklerdir. ASA aktivitesi düşük olan bireylerde (PD/PD veya PD/MLD) sülfatid atılımının normal ya da çok az oranda artmış olabileceği rapor edilmiştir (17).

MLD ile ilişkili mutasyonlar yalancı eksiklik zemininde de oluşabilmektedirler. PD alleli bakımından taşıyıcı olan bir birey MLD alleli de taşıyor olabilir. Bu yüzden MLD ile yalancı eksiklik ayırımında genetik testlerin yeri çok büyüktür (42, 43). Bu tipte taşıyıcılığa sahip ailelere gelecek nesillerin sağlıklı olması için aynı zamanda genetik danışmanlığın da verilmesi gerekmektedir.

Bu hastalıkla ilgili prenatal tanı mümkün olup Anabilim Dalımızda yapılmaktadır. Enzimin tam veya tama yakın yokluğu hastalık için kesin tanıyı koydururken ara değerler için kesin bir karar verilememektedir (44, 45). Prenatal tanı amniyotik sıvı hücre kültürü hücrelerinde ya da koryonik villus örneklerinde (hamileliğin 6-11. haftasında) ASA aktivite tayinine dayanmaktadır.

2.12 MLD'de Tedavi

Günümüzde bu hastalık için özel diyetlerle ya da ilaçlarla tedavi mümkün değildir. Hastanın semptomlarına ilişkin yaşam kalitesini yükseltmek adına GABA transaminaz inhibitörleri (vigabatrin vs.) spastisite ve ataksia şikayetleri için; antiepileptik ajanlar ise nöbetler için kullanılmaktadır.

Kemik iliği tranplantasyonunun MLD hastalarında yararlı olabileceği düşünülerek çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Geç bebeklik tipi MLD hastalarının semptomatik olanlarında bu tedavi başarılı olmamıştır. Presemptomatik geç bebeklik tipi MLD hastalarında ise kesin bir kaniya varmak için transplantasyon yapılan hastaların daha uzun süre izlenmeleri gerekmektedir. Herhangi bir sonuca varmak için transplantasyon sonrası süre açısından henüz erken olduğu bildirilmiştir. Geç başlangıçlı (gençlik tipi MLD ve erişkin tipi MLD) MLD hastalarında yapılan çalışmalarda ise, bir hasta transplantasyondan 6 yıl sonra hastalığın doğal gidişatına geri dönmüştür. Bu hasta dışında sekiz hastada ise başarılı transplantasyonlar bildirilmiştir. Ama bu hastaların da transplantasyon sonrası izlenme süreleri

açısından henüz kısa bir süre geçmiştir ve herhangi bir kanıya varmak için erkendir. Genel olarak MLD hastalarında kemik iliği transplantasyonu geç başlangıçlı (gençlik tipi ve erişkin tipi) MLD hastalarında geç bebeklik tipi MLD hastalarına göre daha başarılı olmuştur (1).

Enzim replasman tedavisi de MLD hastaları için tartışılan ve geliştirilmeye çalışılan bir diğer tedavi biçimidir. Bu tedavi kalıtsal metabolik hastalıkların tedavisi için ümit verici bir tedavidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda enzimin çözünebilir şekli hızlı bir şekilde saflaştırılmıştır (46). ASA eksikliği olan farelere rekombinant insan ASA'sı enjeksiyonu sonrası periferik sinir sistemindeki sülfatid birikiminin yanı sıra merkezi sinir sistemindeki sülfatid birikiminde de azalma görülmüştür (47).

Merkezi sinir sistemini hedef alan hastalıkların tedavilerinde kan-beyin bariyeri en önemli engeldir. Aktive edilmiş lenfositler, monositler ve mikrogial öncül hücreleri bu bariyeri geçebilmekte ve ilaçların, genlerin beyne taşınmasında bir araç olarak görev görebilmektedirler. Bu gen terapisi yöntemi MLD hastalığının tedavisi için denenen bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır. Gen terapisinde kullanılan retroviruslardan bir çoğu bölünemeyen hücrelerin (ör: nöronlar) bu virüslara gösterdiği direnç yüzünden kullanılamamaktadır. Bugüne kadar adenoviruslar ve lentivirüsler etkili olabilmişlerdir (48). Fakat adenovirus kullanılan vakalarda tedavi sonrası ciddi inflamasyon bildirilmiştir. Geç başlangıçlı MLD hastalarında, hastalığın erken evrelerinde beyindeki demiyelinizasyonu durdurabildiği bildirilmiş, ama periferik sinirlerdeki demiyelinizasyon üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. Geç bebeklik tipi MLD hastalarında ise kesinlikle etkili olmamıştır (49, 50). Embriyonik kök hücrelerle yapılan çalışmalarda ise bunların insan ASA enzimini salgılayabilen nöronal öncül hücrelere değişebildiği ve nörogial hücrelerde ASA aktivitesindeki artışı göstermişlerdir (51).

2.13 MLD'de Hayvan Modelleri

MLD hastalığı sadece insanlar üzerinde tanımlanabilmiş, doğal ortamda hayvanlar üzerinde gösterilememiştir. Deneysel olarak oluşturulan ASA eksikliği olan farelerde ASA aktivitesi düşüktür; ama MLD hastalarına göre görülen fenotip daha hafif seyirlidir ve beyinde demiyelinizasyon çok azdır (52). Nöronal olmayan

dokulardaki sülfatid birikimi insanda meydana gelen birikimle benzerlik gösterir. Nöronal dokularda olan birikim ise beyaz cevherde ve lizozom içinde yerleşiktir (1). ASA eksikliği olan farelerde özellikle purkinje hücre kaybı, akustik gangliomda dejenerasyon mevcuttur ve nöronlar da etkilenmişlerdir (4). İnsanlardaki ciddi seyirli beyinde sülfatid birikimi ile seyreden MLD hastalığı hayvan modellerinde merkezi sinir sistemi patolojileri açısından benzer bir şekilde oluşturulamamıştır (53).

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Maddeler

Folin-Ciocalteu reaktifi, formamid, bromofenol mavisi, etilendiamintetraasetikasit (EDTA), amonyum persülfat (APS), TEMED, ksilen siyanol, gliserol, akrilamid, agaroz, formaldehit, gümüş nitrat (AgNO_3), borat, silan, NuSieve agaroz, sodyum hidroksit (NaOH), sığır serum albümini, histopaque 1077, sodyum borohidrit (NaBH_4), izopropanol, trizma baz, PCR “primer”leri, dimetilsülfoksit (DMSO), proteinaz K, sodyumdodesil sülfat (SDS), amonyum asetat, sodyum klorür (NaCl), etanol, glasiyal asetik asit, potasyum klorür (KCl), Na_2HPO_4 , Na_2CO_3 , sodyum potasyum tartrat, bakır sülfat, p-nitro-katekolsülfat, Sigma (ABD)’dan; 2’-deoksi 5’-trifosfat nükleotidler (dNTP’ler), düşük molekül ağırlıklı DNA ladder marker, Taq DNA polimeraz, “DdeI” ve “MsiI” kesim enzimleri, MgCl_2 , New England Biolabs (ABD)’dan; Minelute jel ekstraksiyon kiti Qiagen (ABD)’den; “BsrSI” restriksiyon kesim enzimi Promega (ABD) dan; ΦX174 DNA/*Bsu*RI (HaeIII) marker Fermentas (ABD) dan sağlandı.

3.1.2. Aygıtlar

PCR tekniğinde Thermocycler Biorad (ABD); SSCP tekniğinde Gibco-BRL Model S2 Life Technologies Inc. elektroforez cihazı (ABD); DNA bantlarının izlenmesinde Herolab UVT-20M UV Transilluminator (Almanya), SSCP tekniğinde Consort EV265 güç kaynağı (Belçika), agaroz jel elektroforezinde Biorad Power PAC 300 (ABD), jelden DNA ekstraksiyonu tekniği ve SSCP tekniğinde Techne Dri-Block DB-2D kuru ısıtıcı (İngiltere), tartımlarda Mettler analitik ve kaba terazi (İsviçre), pH ölçümlerinde Orion pHmetre (İngiltere), santrifügasyonlarda Nüve NF 800 (Türkiye) ve Heraeus Biofuje A mikrofüj (Almanya), inkübasyonlarda Nüve BM 402 su banyosu (Türkiye), karıştırma işlemleri için MS1 minishaker IKA (ABD), DNA miktar tayininde Shimadzu UV-1601 spektrofotometresi (Japonya), Gilson 10 μl , 20 μl , 200 μl , 1000 μl ’lik otomatik pipetler (Fransa) ve pipet uçları kullanıldı.

3.1.3.Çalışma Materyali

Bu araştırmada hasta grubunu, klinik bulguları MLD ile uyumlu olan ve Anabilim Dalımızda ASA enzimi aktivitesinde eksiklik saptanan 6 hasta ile bu hastalardan birinin anne, baba ve kardeşi oluşturmuştur. Kontrol olarak metabolik bir hastalığa sahip olmayan sağlıklı bir birey çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol ile birlikte çalışılan örnek sayısı 10 dur.

Bu hastaların DNA'larına Hacettepe Hastanesi DNA Bankası'ndan ulaşılmış ve DNA örnekleri TBK 05/6-19 no'lu etik kurul kararı ile kullanılmıştır.

3.2.Yöntemler

3.2.1.ASA Enziminin Aktivite Tayini

3.2.1.1.Tam Kandan Lökositlerin İzolasyonu

EDTA'lı tüplere 10 ml kan alındı. Üzerine 7,5 ml Histopaque 1077 bir tabaka oluşturacak şekilde yavaş yavaş eklendi. 1500xg'de 20 dak. santrifüj edildi. Ortadaki beyaz lökosit tabakası, bir pastör pipeti yardımı ile başka bir tüpe aktarıldı. Bu hücrelerin üzerine 15 ml soğuk PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCL, 1,15 g Na₂HPO₄.7H₂O, 0,2 g KH₂PO₄ 1 L distile suda pH 7,4 olacak şekilde çözüldü.) eklendi. Tüp birkaç kere alt üst edilerek karıştırıldı. 1500xg'de 20 dak. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Lökositler içinde eritrositler gözleniyorsa lökosit çökeleği üzerine 1 ml soğuk distile su eklendi. Hücreler pastör pipeti ile birkaç kez çekilip tekrar pipetlendi. Mikrofüjde maksimum hızda (13000xg) 1 dak. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Dipteki hücre çökeleğinde hala eritrosit gözleniyorsa aynı işlem tekrarlandı. Lökosit çökeleği çalışılncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.2.1.2.Lökosit Peletlerinin Homojenizasyonu

Esası:

Hücrelerin dondurma-çözme işlemine tabi tutulması ve bunun birkaç kez tekrarlanması hücrelerde parçalanmaya yol açar. İşlemin temeli, donan su moleküllerinin hacminin genişlemesi ve hücrelerde oluşan buz kristallerinin hücre zarına zarar vererek parçalanmayı sağlamasıdır (54).

Yapılışı:

Lökosit peletleri üç kez dondurulup çözüldü. Her çözme işleminin ardından tüpler vortekslendi. İyice vortekslendikten sonra mikrofüjde 13000xg'de 1 dak. santrifüj edildi. Süpernatantlar başka ependorf tüplerine aktarılarak +4°C'de saklandı.

3.2.1.3. Protein Tayini**Esası:**

Lowry ve arkadaşlarının önerdiği yöntem kullanıldı. Bu yöntemde, proteinlerdeki peptid bağları ile bakır iyonları alkali ortamda kompleksler oluştururlar. Folin-Ciocalteu çözeltisinin eklenmesi ile bu kompleksler redüklenir ve tirozin, triptofan amino asitleri ile birleşerek mavi-mor bir renk verirler. Oluşan rengin %75'i bakır komplekslerine bağlıdır. 650-750 nm'de oluşan renkli komplekslerin absorbansı okunarak protein miktarı tayin edilir (55).

Yapılışı:

Protein standardı olarak sığır serum albumini kullanıldı. Her 10 µl lökosit çökeleği, 140 µl distile su kullanılarak 150 µl'ye tamamlandı. Üzerlerine 3 ml alkalin bakır çözeltisi (50 ml 0,1 N NaOH içinde çözülmüş %2 Na₂CO₃ ile 1 ml %1 sodyum veya potasyum tartarat içinde çözülmüş %0,5 CuSO₄.5H₂O karıştırılır.) eklendi. Vortekslendi. 15 dak. oda sıcaklığında beklendi. 1:1 v/v olarak seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,3 ml eklenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 1 saat beklendi. Kör tüpüne lökosit çökeleği yerine distile su kondu. Oluşan mavi-mor renklerin absorbansları 750 nm'de spektrofotometrede okundu. Sonuçlar µl/ml olarak ifade edildi.

3.2.1.4. ASA Enziminin Aktivite Tayini**Esası:**

Bu yöntem, ASA enziminin p-nitrokatekol sülfatın sülfatını ayırması, açığa çıkan sarı renkli p-nitrokatekolün 515 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. p-nitrokatekol standartlarıyla oluşturulan standart eğri yardımı ile enzim aktivitesi hakkında sayısal bir değer elde edilir.

Yapılışı:

ASA aktivite tayini için örneğin 0,1 ml'sinde 100-400 µg protein olmalıdır. 0,1 ml süpernatant üzerine, 0,1 ml 0,5 mM Na₄P₂O₇ ve %10 NaCl içeren 0,5 M pH 5 sodyum asetat içinde 10 mM hazırlanmış p-nitrokatekol sülfat eklendi. 37°C'de 30 dak. inkübe edildi. Kör tüpüne 0. dak.'da 1 ml 1N NaOH çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. 30. dak. sonunda deney tüplerine de 1ml 1N NaOH çözeltisi eklendi, bu tüplerde de reaksiyon durduruldu. Sonuçlar 515 nm'de spektrofotometrede okunarak elde edildi. p-nitrokatekolün 1,2-48 nmol arasında hazırlanan standardı ile elde edilen standart eğriden aktiviteler hesaplandı (56). Tüm örnekler çift çalışıldı.

3.2.2. Mutasyon Analizi**3.2.2.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu****Esası:**

Hücreler lizis tamponu ile parçalanarak yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın açığa çıkması sağlanır. Proteoliz ile DNA-protein komplekslerinin ayrılmasının ardından proteinler tuz ile çöktürülür. DNA süpernatanda çözünür halde elde edilir. Çözünür hale gelmiş olan DNA'nın sarmalları arasındaki H⁺ bağları soğuk etanol ile yeniden kurularak DNA kompakt halde elde edilir (54).

Yapılışı:

EDTA'lı tüplere alınan 10 ml kan örnekleri 40 ml soğuk-steril su ile iyice çalkalanarak karıştırıldı. +4°C'de 2000xg'de 15 dak santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, pellet üzerine 30 ml soğuk-distile su konularak tekrar çalkalandı ve yeniden +4°C'de 15 dak santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülerek pellet üzerine 1,5 ml Lizis çözeltisi (10 mM Tris HCl, 400 mM NaCl 2 mM Na₂EDTA) konuldu, süspansiyon haline getirildi. Vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra 150 µl SDS ve 75 µl Proteinaz K eklendi. Yavaş olarak ters yüz edilerek 16 saat 37°C'de su banyosunda bırakıldı. İnkübasyon sonunda 9,5 M derişimindeki amonyum asetatın 2 ml eklendi, 15 dak oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 30 dak +4°C'de 3500xg'de santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde temiz bir tüpe alınarak üzerine süpernatant miktarının iki katı oranında +4°C'de saklanan saf etanol eklendi.

DNA saç teli şeklinde görülene kadar yavaş olarak ters yüz edildi. Steril bir baget yardımıyla DNA ependorf tüpüne alındı Oda ısısında tüpler ters çevrilerek çökelek kurutuldu. Çalışılncaya kadar -20°C 'de saklandı (57).

3.2.2.2.DNA Miktar Tayini

5 μl DNA 1/500 oranında sulandırıldı. Kör tüpüne 500 μl distile su kondu. Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm'de absorbansları ölçülerek A260/A280 oranına bakıldı. Bu oranın 1,5 veya üzerinde bir değere sahip olması gerekmektedir. Örnekteki DNA miktarı, 260 nm'de 50 μg DNA'nın 1 optik dansite okuma vermesinden yararlanılarak hesaplandı. (58)

3.2.2.3. PCR

Esası:

PCR çift iplikli DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid "*primer*"in bağlanması ve uzaması esasına dayanır. "*Primer*"ler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde "*denatüre*" edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülü üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle bağlanırlar (*annealing*). Bu bağlanma düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında "*primer*"in 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar (*extension*). Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Ardarda tekrarlanan bu döngü ile DNA parçaları üssel olarak artarlar (54).

Yapılışı:

Her bir PCR tüpünde toplam 50 μl olacak şekilde 0,2 μg DNA; 0,5 mM "*primer*" A; 0,5 mM "*primer*" B; her biri için 0,2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP; toplam hacimde 1x olacak şekilde 10x Taq polimeraz tamponundan 5 μl ; her ekson için değişik derişimlerde MgCl_2 (ekson 1, ekson 2, ekson 3, ekson 5, ekson 6 için 1 mM; ekson 4, ekson 8A, ekson 8B için 1,5 mM; ekson 7 için 0,8 mM); ekson 4, ekson 5, ekson 7 için toplam hacimde %10 olacak şekilde DMSO; 1,5 U Taq DNA polimeraz konuldu. Eksik olan hacim steril su ile 50 μl 'ye tamamlandı. Her örnek 94°C 'de 5 dak 1 siklus; 94°C 'de 30 sn, "*denatürasyon*" (DNA zincirlerinin ayrılması), 60°C 'de 40 sn "*annealing*" ("*primer*" yapışması), 72°C 'de

90 sn “*extension*” (zincir uzaması) basamaklarını içeren 35 siklus; 72⁰C’de 10 dak 1 siklusa tabi tutuldu. Örnekler +4⁰C’de saklandı. (59)

3.2.2.4. Agaroz Jel Elektrofrez

Esası:

Agaroz jel elektrofrezinin esası DNA molekülünün elektriksel bir alanda, jel üzerindeki göçüne dayanır. Bu jelde yürümüş DNA molekülünü gözlemek için UV ışık altında floresan etki gösteren etidyum bromür kullanılır. Etidyum bromür DNA bağları arasına bağlanır. 300-360 nm’de ışığı absorblaması sonucu floresan etki göstermektedir (54).

Yapılışı:

1x TBE (12 g Tris, 6 g Borat, 4 ml 0,5 M EDTA pH 8.0 olacak şekilde) tamponu içinde %2’lik agaroz jel hazırlandı. 10 mg/ml derişimindeki etidyum bromürden 4 µl eklendi ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak homojen bir şekilde dağılması sağlandı. 8x8 cm² boyutlarında elektrofrez plağına hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. 30 dak. kadar jelin donması beklendi. 5 µl çoğaltılmış DNA’dan alınarak ayrı bir ependorf tüpünde 2 µl *loading* (yükleme) tamponu (%0,05 bromofenol mavisi, %15 Ficoll 400, %10 gliserol, 1x TBE tamponu ile 1 ml olacak şekilde) ile karıştırıldı. 10x20 cm² boyutlarındaki elektrofrez tankı 1x TBE ile dolduruldu. Hazırlanan örnekler jeldeki kuyucuklara uygulandı. Oda sıcaklığında 100 V’da bromofenol mavisi, 4 cm ‘lik bölüme gelinceye kadar elektrofrez yapıldı. Elektrofrez plağından çıkarılan jeldeki bantlar transilluminatör ile gözlendi. (58)

3.2.2.5. SSCP Analizi

Esası:

PCR ürünü çift iplikli DNA “*denatüre*” edilerek SSCP jeline uygulanır. “*Denatüre*” edilerek tek zincir haline gelmiş DNA’lar zincir içi zayıf bağlarla yeni bir ikincil yapı alırlar. Mutasyon sonucu değışen tek bir baz bile tek zincir konformasyonunu etkileyeceğinden o bölgenin elektrofrezdeki hareketinde kontrol ile karşılaştırıldığında farklılık gözlenir (60).

Yapılışı:

a) Elektroforez jelinin hazırlanması:

Elektroforez işlemi için ilk olarak jelin döküleceği cam plaklar hazırlandı. 33cm x 39cm x 0,4 cm boyutlarındaki cam plaklar distile sudan geçirilip alkol ile temizlendi. Cam yüzeye jelin yapışmasını sağlayacak silan içeren çözültiden (50 µl silan, 50 µl glisiel asetik asit 10 ml etanol içinde) 1 ml alınarak cam plaklardan birinin yüzeyine homojen dağılacak biçimde uygulandı. Diğer cam plağa jelin kolay ayrılması için 1 ml silikon uygulandı. Cam plaklar jelin dökülebilmesi için 0,4 mm aralık olacak şekilde yan “*spacer*”larla birlikte sabitlendi.

%10 gliserol içeren %12’lik poliakrilamid çözültisi üzerine 234 µl %20’lik amonyum persülfat (APS) ve 50 µl TEMED pipetlenerek karıştırıldı ve hemen enjektöre çekilerek cam plaklar arasındaki 0,4 mm’lik aralığa döküldü. Hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Oda sıcaklığında 1,5 saat polimerizasyon için bekletildi. Polimerize olmuş jel elektroforez tankına yerleştirildi. Örnek uygulama yerleri kontrol edildikten sonra cam üzerinde uygulanacak yerler işaretlendi.

b) Örneklerin jele uygulanması ve elektroforez

Her eksonun çoğaltılmış DNA örneklerinden 1 µl alınarak ayrı bir ependorf tüpünde 4 µl “*sequencing stop*” çözültisi (8 ml formamid, %0,1 ksilen siyanol, %0,1 bromofenol mavisi, 100 µl 1M NaOH, 20 µl 0,5M EDTA toplam hacim 10 ml olacak şekilde) ile karıştırıldı. Elektroforez tankı 1x TBE tamponu ile dolduruldu. Jelin 500 V’da 15 mA’de 30 dak. yürütülerek ısınması sağlandı. Hazırlanan örnekler denatürasyon için 5 dak. 95⁰C’de tutuldu. Tek zincir haline gelen örnekler buz içine yerleştirilerek “*denatüre*” halde kalması sağlandı ve hemen elektroforez jeline uygulandı. Oda sıcaklığında 400 V’da 12 mA’de 16-20 saat elektroforez yapıldı. Bromofenol mavisi jelin dibine gelince elektroforez sonlandırıldı.

Jelin yırtılmamasına özen gösterilerek yavaş bir şekilde cam plakların birbirinden ayrılması sağlandı. Jelin yapıştırılmış olduğu cam plak gümüş boyama işlemine tabi tutuldu.

3.2.2.6.Gümüş Boyama

Esası:

DNA bantlarının poliakrilamid jel elektroforezinde gözlenebilmesi için gümüş boyama yöntemi kullanıldı (61). Bu yöntemde, asetik asit ile DNA sabitlenir. AgNO_3 DNA'nın negatif yükleri ile iyonik etkileşime girer. Formaldehit AgNO_3 'ı indirgeyerek DNA bantlarını görünür hale getirir. Jel su ile yıkanarak zemindeki fazla AgNO_3 uzaklaştırılır. NaBH_4 Ag^+ iyonlarına bağlanıp jeldeki özgül olmayan boyanmayı yok eder. Bu şekilde gümüş ile bağlı DNA bantları görünür hale gelir.

Yapılışı:

Jel, 100 ml %99,5 etanol, 5 ml %99,5 asetik asit içeren 1 L olarak hazırlanan çözelti ile büyük kap içerisinde 3 dak. yıkandı ve jele zarar vermeden yavaşça döktü. Aynı çözeltiden 1 L alınarak tekrar 3 dak. yıkandı ve dikkatlice boşaltıldı. %0,1'lik AgNO_3 çözeltisi içinde 10 dak. bekletilerek jelin AgNO_3 ile boyanması sağlandı. Çözelti boşaltıldıktan sonra iki kere distile su ile yıkandı. %1,5'lik NaOH , %0,01'lik NaBH_4 , 4 ml formaldehit içeren 1 L olarak hazırlanan çözelti içinde 20 dak. bekletilerek bantlar görünür hale getirildi. Son kez fiksasyon çözeltisi ile (%0,75'lik Na_2CO_3) içinde 10 dak. bekletilerek boya sabitlendi.

Gümüş boyama ile boyanan bantların fotoğrafları Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fotofilm Merkezi'nde çekilerek bantlar karşılaştırıldı.

3.2.2.7.DNA Bantlarının Değerlendirilmesi

SSCP analizinde aldıkları farklı konformasyonlar nedeniyle her zaman çift iplikli DNA'lar ("nativ" DNA) tek iplikli DNA'lara göre hızlı hareket ederler. Tek iplikli DNA'lara ait iki bant gözlenirken, çift iplikli DNA'lara ait tek bant görülür. Bu yöntemle mutasyona uğramış bir DNA eğer heterozigotsa iki bant normal allelden, iki bant mutant allelden gelmek üzere toplam dört adet bant; eğer homozigotsa iki adet mutant allelden olmak üzere toplam iki bant gözlenir. Aynı DNA tek zincirinin elektroforez koşullarına göre değişik ikincil yapıları oluşabileceğinden "metastable conformers" denilen ek bantlar görülebilir. Bu nedenle değerlendirme yapılırken hasta ve kontrol arasındaki bant farklılıkları tespit edilmeye çalışıldı.

3.2.2.8.DNA Dizi Analizi

Esası:

Hücre içinde “*primer*”e ait 3’ hidroksil grupları, dNTP’ler ile fosfodiester bağı oluşturur. Sanger yönteminde dideoksinükleozid trifosfat (ddNTP) analogları DNA sentezini durdurmak için kullanılır. dNTP yerine ddNTP sokulduğunda iplikçiğin uzaması durur, çünkü ddNTP 3’ hidroksil grubu içermemektedir. Her bir dideoksinükleotid floresan molekülle işaretlenir. Normal tepkime karışımı içine ilave edilen işaretli ddNTP’ler sentezlenmekte olan iplikçiğe bağlanır. Bu nükleotidle sonlanan her parçacığın kendine özgü bir rengi bulunur. Oluşan renkli DNA parçacıkları kılcal bir tüpte bulunan elektroforetik jelle uzunluklarına göre birbirlerinden ayrılır. Ayrılan parçaların renkleri laser ışını ile gözlenir ve dedektörün önünden geçerek DNA dizilimindeki renkli tepeler tespit edilir. Bilgisayardaki özel programlar sayesinde bu dizilim okunmak için hazır hale getirilir (62).

Yapılışı:

SSCP analizi ile elektroforezde farklı yürümüş eksonların DNA örnekleri %1,5’luk agaroz jelden PCR ürünlerini saflaştırma kiti (QIAGEN) kullanılarak saflaştırıldı; jel üzerinde molekül ağırlığı bantlarının yoğunluğundan faydalanılarak derişimleri hesaplandı ve uygun miktarda “*primer*”ler ile İontek laboratuvarına DNA dizi analizi için gönderildi. Bu laboratuvarda nükleotid dizileri Sanger’in dideoksi zincir sonlandırılması yöntemi ile analiz edildi. Blast programında, normal ASA geni DNA dizisi ile hastanın DNA dizisi karşılaştırıldı ve mutasyon noktası belirlendi. Dizi analizi her örnek için iki kez tekrarlandı.

3.2.2.9.Jelden PCR Ürünlerini Saflaştırma İşlemi

İstenilen boyuttaki DNA fragmanlarını jelden saf olarak geri kazanmak veya DNA’yı herhangi bir aşamada saflaştırmak mümkündür. Ticari olarak üretilen küçük kolonlarla yapılan saflaştırmada, üretici firmanın önerdiği tamponlar kullanılarak istenilen boyuttaki DNA’yı içeren jel parçaları kolona yüklenir ve DNA’nın kolona bağlanması sağlanır. Daha sonra elüsyon tamponu kullanılarak DNA kolondan geri alınır (54).

QIAGEN firmasına ait “*MinElute Gel Extraction Kit*” i kullanıldı.

%1,5'lik “*reducta prona agarose*” jel hazırlandı; 6'lı tarakla jel tankına döküldü (4 µl etidyum bromür ve 40 ml TBE ile). 2-2,5 saat donması beklendi. PCR ürününün tamamı (50 µl), 8-10 µl bromofenol mavisini ile yüklendi. 45dak.-1 saat 1 V/cm²'ta yürütüldü. UV ışık altında istenilen bant steril bistüri ile kesilip steril Eppendorf tüplerine konuldu. Kesilen jelin ağırlığının en fazla 400 mg olması koşulu esas alınarak Eppendorf tüpündeki jel tartıldı. Kesilen jelin ağırlığının 3 katı oranında QG tamponu eklendi. QG tamponu agaroz jelin erimesini ve silika jel membran bağlanmasını sağlayan bir tampondur. İçerisinde özellikle bağlanmanın en iyi şekilde olmasını sağlamak için gerekli optimum pH'yı sağlayan pH indikatörü bulunmaktadır. QG tamponu eklendikten sonra 50⁰C'de kuru ısıtıcıda 10 dak. erimesi beklendi. 2-3 dakikada bir vorteksle karıştırıldı. Jel tamamen eriyince kesilen jelin ağırlığı kadar isopropanol eklenip yavaşça alt üst edildi ve silika jel membran ile DNA'yı tutmak için özel hazırlanmış olan kolonlara yüklendi. Kolonlar en fazla 800 µl aldığı için eğer örnek fazla geldiyse ikinci bir defa aynı işlem tekrarlandı. Yüklenen kolonlar 13000 rpm'de 1 dak. santrifüj edildiler. Altta kalan süzüntü atıldı. Yeniden 500 µl QG tamponu konularak 13000 rpm'de 1 dak. santrifüj tekrarlandı, altta kalan süzüntü atıldı. Kolona bu sefer 750 µl PE tamponu eklendi. PE tamponu istenmeyen bileşenleri özellikle tuzları uzaklaştırmak için tasarlanmış içerisinde etanol barındıran bir yıkama tamponudur. PE tamponu eklendikten sonra oda ısısında 5 dak. bekletilir ve 13000 rpm'de 1 dak. santrifüj edildi. Alttaki süzüntü atıldı, artık etanol kalmaması için santrifüj tekrarlandı. Kolonun altına steril Eppendorf tüpü konularak 10 µl elüsyon tamponu eklendi (10 mM Tris HCl, pH 8,5). elüsyon tamponu kolonun merkezine pipetlendi. 1 dak. beklendi ve 1 dak. 13000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen ürün -20 ⁰C'de saklandı.

3.2.2.10. Kesim Enzimi Analizi

Esası:

DNA'nın enzimatik kesimi “*restriksiyon endonükleazlar*” ı kullanılarak yapılır. Bunlar çift iplikli DNA'da özel nükleotid dizilerini tanıyan ve DNA'nın her iki ipliğini kesen enzimlerdir. Bakterilerde bulunan bu enzimler DNA'da özgün kısa dizileri tanır ve kesme işlemini gerçekleştirir (54).

Yapılışı:

“Yalancı eksikliğe” neden olan 2 mutasyon için PCR ile çoğaltılan ekson 6 bölgesinde bulunan N-glikozilasyon bölgesi (275bç) ve ekson 8 bölgesinde bulunan poliadenilasyon bölgesi (114bç) DNA örneklerinden 10’ar µl alındı. N-glikozilasyon bölgesinin PCR ürünü 10 u “*BsrSI*”, poliadenilasyon bölgesinin PCR ürünü 10 u “*DdeI*” kesim enzimi ile 37°C’de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kesim enziminin inaktivasyonu için reaksiyon karışımı 65°C’de 15 dak bekletildi (25). N-glikozilasyon bölgesinde mutasyon varlığında “*BsrSI*” kesim enzimi için kesim bölgesi ortaya çıkar ve 275bç’lik PCR ürünü DNA parçası 165bç’lik ve 110bç’lik iki parçaya ayrılır, poliadenilasyon bölgesinde mutasyon varlığında ise “*DdeI*” kesim enzimi için kesim bölgesi ortaya çıkar ve 114bç’lik PCR ürünü DNA parçası 97bç’lik ve 17bç’lik iki parçaya ayrılır. Ayrıca ekson 5’te bulunan mutasyonun varlığını doğrulamak için mutasyon olan bölgeye denk gelen bir kesim bölgesine sahip olan “*MslI*” enzimi ile diğer kesim enzimleri için kullanılan koşullarda kesim yapıldı. Mutasyon varlığında 180bç’lik DNA parçası kesim enzimi “*MslI*” ile 130bç’lik ve 50bç’lik iki parçaya ayrılır.

3.2.2.11.NuSieve Agaroz Jel Elektroforezi

0,5xTBE tamponu içinde %3’lük NuSieve agaroz jel (1,5 g NuSieve agaroz, 1 g agaroz 50 µl 0,5x TBE’de olacak şekilde) hazırlandı. Agaroz jel elektroforezinde anlatıldığı şekilde elektroforez yapıldı. Bantlar etidyum bromür boyası ile görünür hale getirildi.

4. BULGULAR

4.1. ASA Enziminin Aktivite Tayini

6 hasta ve 3 aile üyesinin araştırma laboratuvarımızda elde edilen ASA enzim aktivitesi sonuçları Tablo 4.1’de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. ASA enzimi aktivite değerleri

Hasta Numaraları	Enzim Aktivitesi (nmol/saat/mg protein)	Referans Değer
1	0	50-990
2	24	50-990
3	24	50-990
4	-	50-990
5	7	50-990
6	0	50-990
7	0	50-990
8	26	50-990
9	2	50-990

ASA enzim aktivite değerleri yukarıdaki tüm hastalar için normal değer in altında bulunmuştur. Bu enzim aktivite değerleriyle MLD tanısı alan hastaların örnekleri üniversitemiz DNA bankasında saklanmıştır.

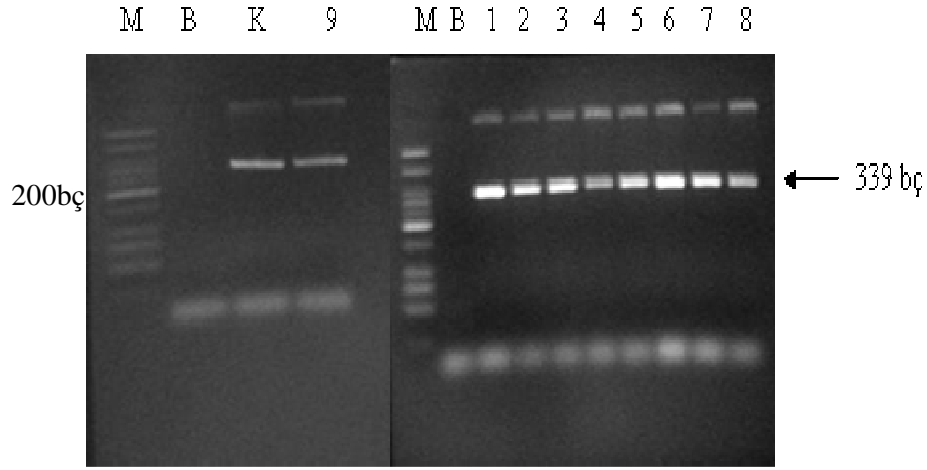
4.2. Mutasyon Analizi ile ASA Genindeki Mutasyonların Saptanması

4.2.1. PCR Yöntemi ile ASA Geninin 8 Eksonunun Çoğaltılması

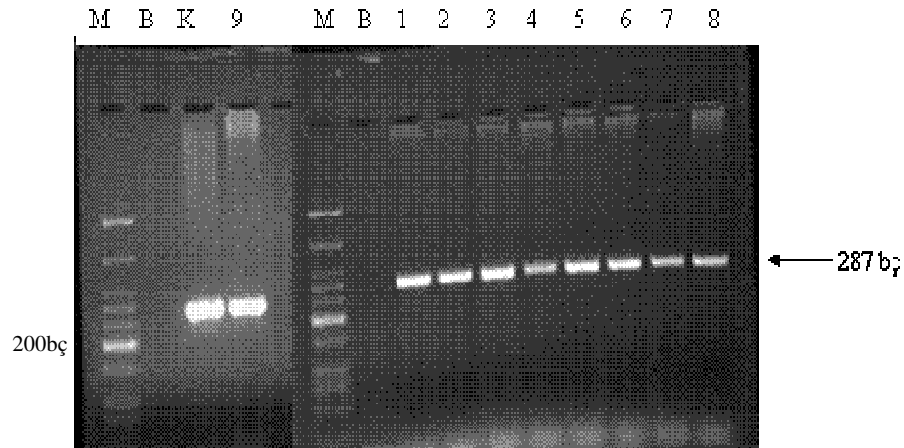
ASA geninin 8 adet eksonu ve çevresindeki diziler, uygun “*primer*”ler kullanılarak çoğaltıldı. Her bir ekson için gereçler ve yöntemler bölümünde belirtilen koşullar uygulandı. PCR reaksiyonunun gerçekleştiğinden ve kontaminasyon olmadığından emin olmak için %2’lik agaroz jelde 100 V’ta yaklaşık 1 saat yürütülerek agaroz jel elektroforezi yapıldı. UV lamba altında çoğalıp çoğalmadığı kontrol edildi ve resimleri çekildi. Her defasında çoğalan bölgenin büyüklüğünü

ölçmek ve doğru bölgenin çoğaldığına karar verebilmek için 25-766 bç aralığındaki DNA moleküler ağırlık belirteci kullanıldı. Kontaminasyon olmadığına, kör (B) kuyucuğunda çoğalma görülmemesiyle karar verildi.

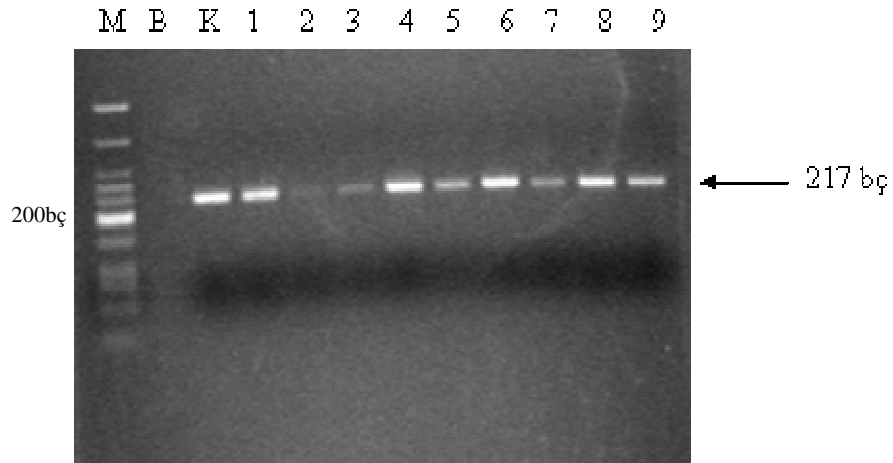
Tüm bireylerde bütün ekson ve çevresindeki dizilerin tek bir bant halinde doğru olarak çoğaldığı gözlemlendi (Şekil 4.1-9).



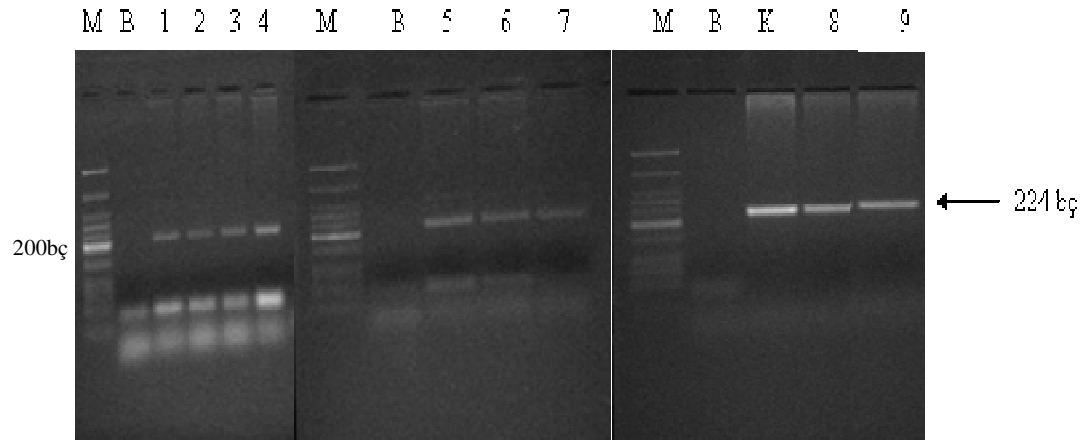
Şekil 4.1. Ekson 1 PCR analizi jel resmi görülmektedir. Moleküler ağırlık belirteci (M) olarak “*low molecular weight DNA Ladder*” (New England Biolabs) kullanılmıştır. B ile belirtilen kuyucukta kör (B) mevcuttur. K ile belirtilen kuyucuğa kontrol (K) DNA’sı, diğer kuyucuklara ise belirtilen numaralı hasta DNA’ları yüklenmiştir. Çoğalan bölgenin büyüklüğü 339 bç’dir. %2’lik agaroz jel kullanılmıştır.



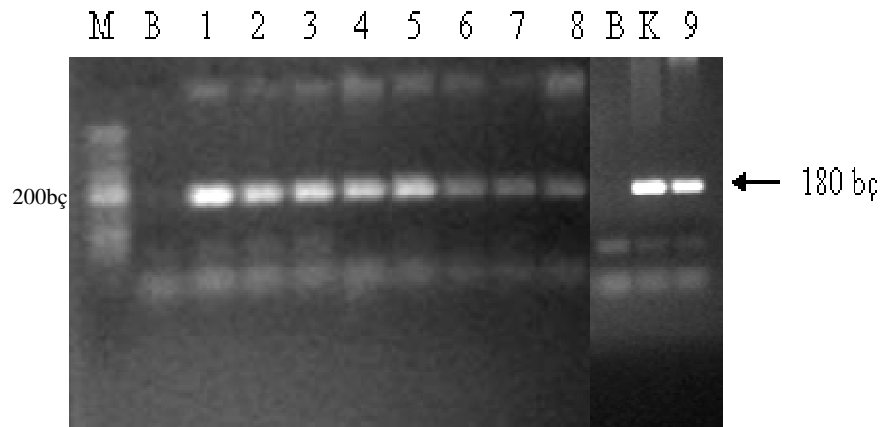
Şekil 4.2. Ekson 2 PCR analizi jel resmi görülmektedir. Moleküler ağırlık belirteci (M) olarak “*low molecular weight DNA Ladder*” (New England Biolabs) kullanılmıştır. B ile belirtilen kuyucukta kör (B) mevcuttur. K ile belirtilen kuyucuğa kontrol (K) DNA’sı, diğer kuyucuklara ise belirtilen numaralı hasta DNA’ları yüklenmiştir. Çoğalan bölgenin büyüklüğü 287 bç dir. %2’lik agaroz jel kullanılmıştır.



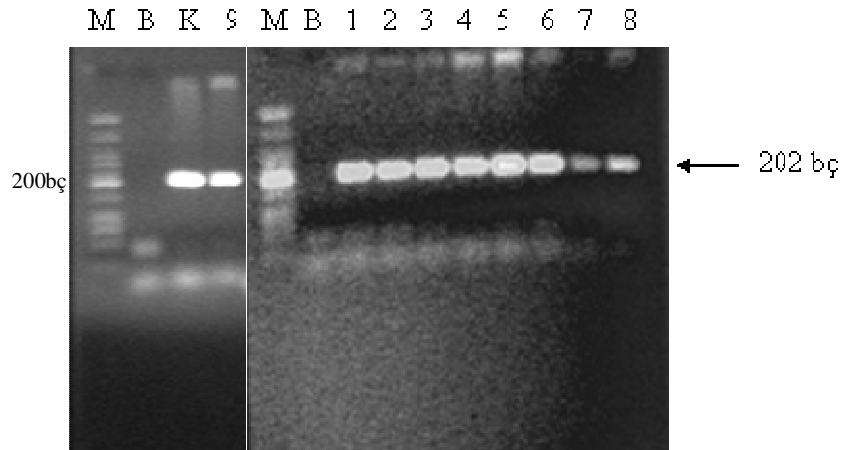
Şekil 4.3. Ekson 3 PCR analizi jel resmi görülmektedir. Moleküler ağırlık belirteci (M) olarak “*low molecular weight DNA Ladder*” (New England Biolabs) kullanılmıştır. B ile belirtilen kuyucukta kör (B) mevcuttur. K ile belirtilen kuyucuğa kontrol (K) DNA’sı, diğer kuyucuklara ise belirtilen numaralı hasta DNA’ları yüklenmiştir. Çoğalan bölgenin büyüklüğü 217 bç dir. %2’lik agaroz jel kullanılmıştır.



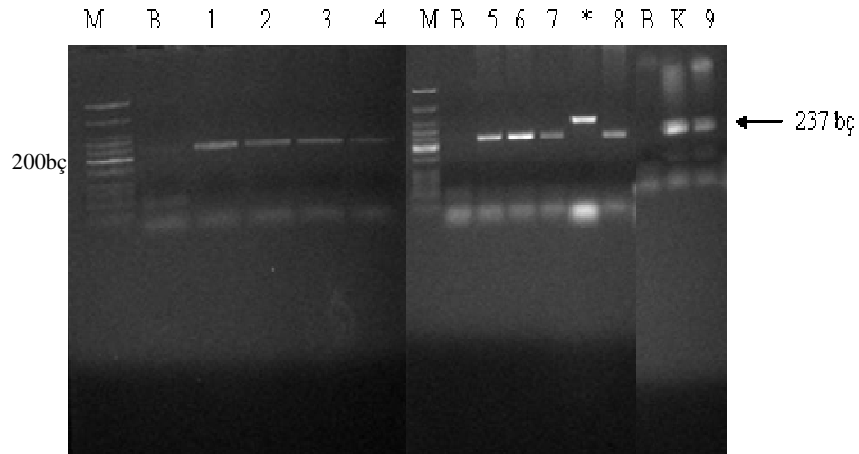
Şekil 4.4. Ekson 4 PCR analizi jel resmi görülmektedir. Moleküler ağırlık belirteci (M) olarak “*low molecular weight DNA Ladder*” (New England Biolabs) kullanılmıştır. B ile belirtilen kuyucukta kör (B) mevcuttur. K ile belirtilen kuyucuğa kontrol (K) DNA’sı, diğer kuyucuklara ise belirtilen numaralı hasta DNA’ları yüklenmiştir. Çoğalan bölgenin büyüklüğü 224 bç’dir. %2’lik agaroz jel kullanılmıştır.



Şekil 4.5. Ekson 5 PCR analizi jel resmi görülmektedir. Moleküler ağırlık belirteci (M) olarak “*low molecular weight DNA Ladder*” (New England Biolabs) kullanılmıştır. B ile belirtilen kuyucukta kör (B) mevcuttur. K ile belirtilen kuyucuğa kontrol (K) DNA’sı, diğer kuyucuklara ise belirtilen numaralı hasta DNA’ları yüklenmiştir. Çoğalan bölgenin büyüklüğü 180 bç dir. %2’lik agaroz jel kullanılmıştır.

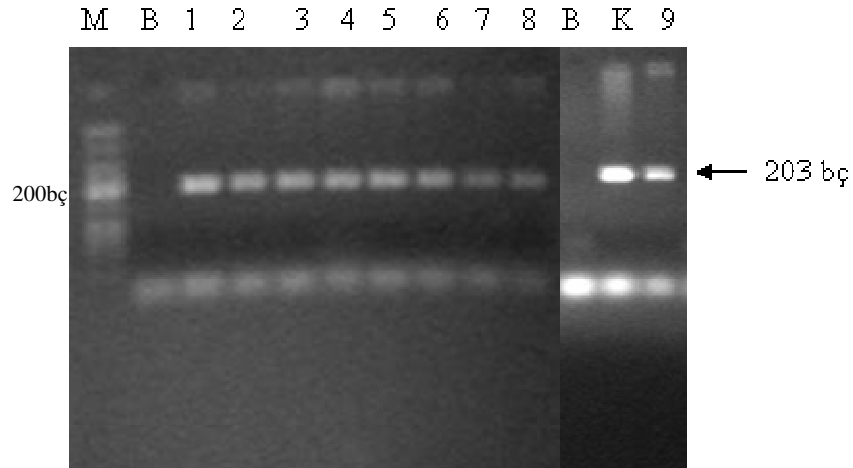


Şekil 4.6. Ekson 6 PCR analizi jel resmi görülmektedir. Moleküler ağırlık belirteci (M) olarak “*low molecular weight DNA Ladder*” (New England Biolabs) kullanılmıştır. B ile belirtilen kuyucukta kör (B) mevcuttur. K ile belirtilen kuyucuğa kontrol (K) DNA’sı, diğer kuyucuklara ise belirtilen numaralı hasta DNA’ları yüklenmiştir. Çoğalan bölgenin büyüklüğü 202 bç dir. %2’lik agaroz jel kullanılmıştır.

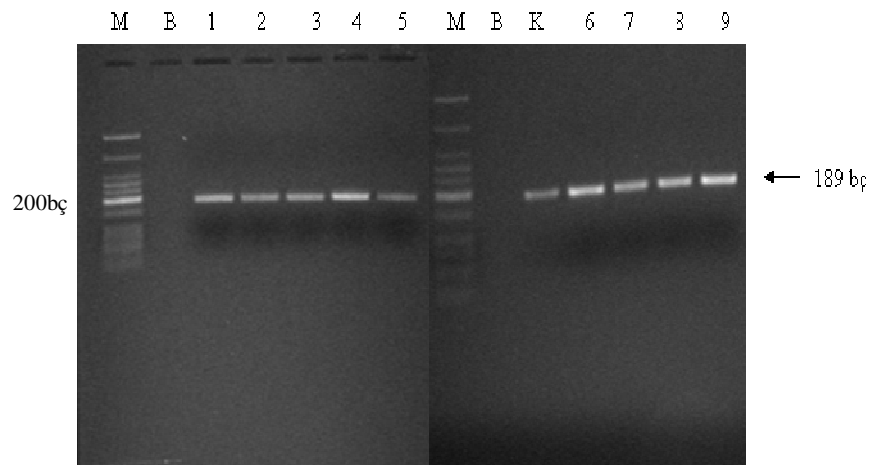


Şekil 4.7. Ekson 7 PCR analizi jel resmi görülmektedir. Moleküler ağırlık belirteci (M) olarak “*low molecular weight DNA Ladder*” (New England Biolabs) kullanılmıştır. B ile belirtilen kuyucukta kör (B) mevcuttur. K ile belirtilen kuyucuğa kontrol (K) DNA’sı, diğer kuyucuklara ise belirtilen numaralı hasta DNA’ları yüklenmiştir. Çoğalan bölgenin büyüklüğü 237 bç dir. * ile gösterilen kuyucuktaki

PCR ürünü 8 numaralı hastasının ekson 1'ine aittir ve 339 bç büyüklüğündedir. %2'lik agaroz jel kullanılmıştır.



Şekil 4.8. Ekson 8A PCR analizi jel resmi görülmektedir. Moleküler ağırlık belirteci (M) olarak “*low molecular weight DNA Ladder*” (New England Biolabs) kullanılmıştır. B ile belirtilen kuyucukta kör (B) mevcuttur. K ile belirtilen kuyucuğa kontrol (K) DNA'sı, diğer kuyucuklara ise belirtilen numaralı hasta DNA'ları yüklenmiştir. Çoğalan bölgenin büyüklüğü 203 bç dir. %2'lik agaroz jel kullanılmıştır.



Şekil 4.9. Ekson 8B PCR analizi jel resmi görülmektedir. Moleküler ağırlık belirteci (M) olarak “*low molecular weight DNA Ladder*” (New England Biolabs)

kullanılmıştır. B ile belirtilen kuyucukta kör (B) mevcuttur. K ile belirtilen kuyucuğa kontrol (K) DNA'sı, diğer kuyucuklara ise belirtilen numaralı hasta DNA'ları yüklenmiştir. Çoğalan bölgenin büyüklüğü 189 bp dir. %2'lik agaroz jel kullanılmıştır.

4. 2. 2. SSCP Analizi Bulguları

PCR yöntemi ile çoğaltılan ASA geninin 8 eksonu SSCP analizi ile mutasyon açısından incelendi.

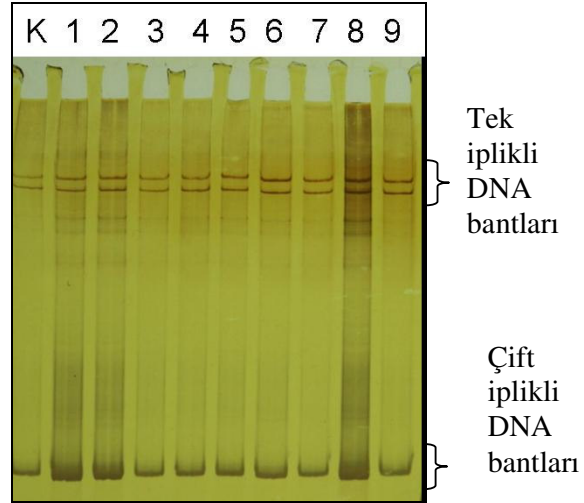
Ekson 1'in (Şekil 4.10), Ekson 3'ün (Şekil 4.12), Ekson 4'ün (Şekil 4.13), Ekson 8A (Şekil 4.17) ve Ekson 8B'nin (Şekil 4.18) SSCP analizi sonucu yürüyen bantları kontrol DNA'sının bantlarına uygunluk gösterdi. Bu sonuçtan yola çıkarak yukarıda sayılan eksonlar normal kabul edildi.

SSCP analizinde farklı bant görülen eksonlar (2, 5, 6 ve 7) hasta numaraları ve şekilleri Tablo 4.2'de özetlenmiştir.

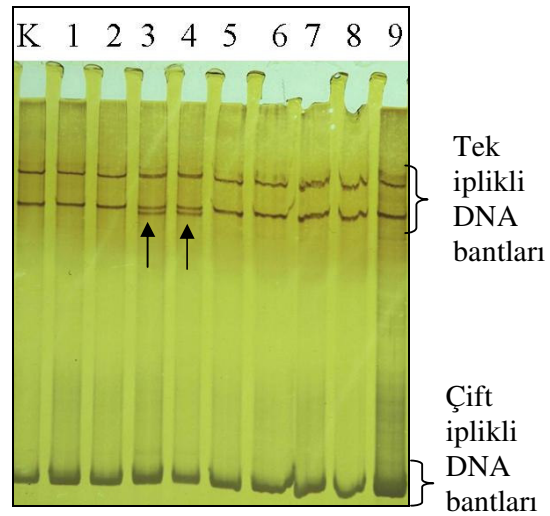
Tablo 4.2. SSCP analizinde normalden farklı olan sonuçlar

Ekson no	SSCP jelinde kontrole göre farklı DNA bandı olan hasta no	Şekil no
Ekson 2	3, 4	4.11
Ekson 5	5, 6, 9	4.14
Ekson 6	8	4.15
Ekson 7	2, 6, 7, 9	4.16

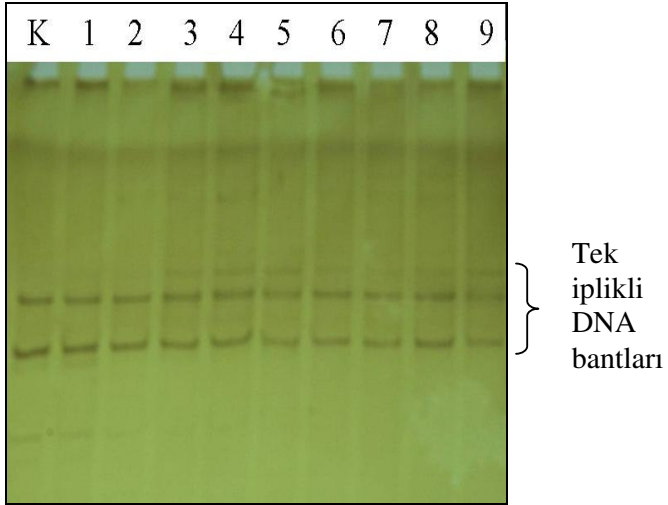
Bu bulgular ışığında anormal bant tespit edilen hastaların söz konusu eksonlarının dizi analizi ie mutasyon açısından incelenmesine karar verildi.



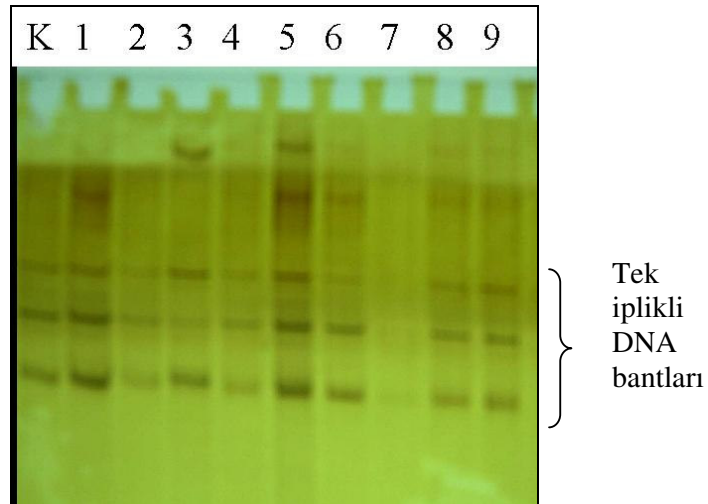
Şekil 4.10. Ekson 1 SSCP analizi jel resmi görülmektedir. 1 numaralı kuyucukta kontrol DNA'sı mevcuttur. Diğer kuyucuklara hasta DNA'ları yüklenmiştir. Hasta DNA'larının bantları kontrol DNA'sının bantlarından farklılık göstermemektedir.



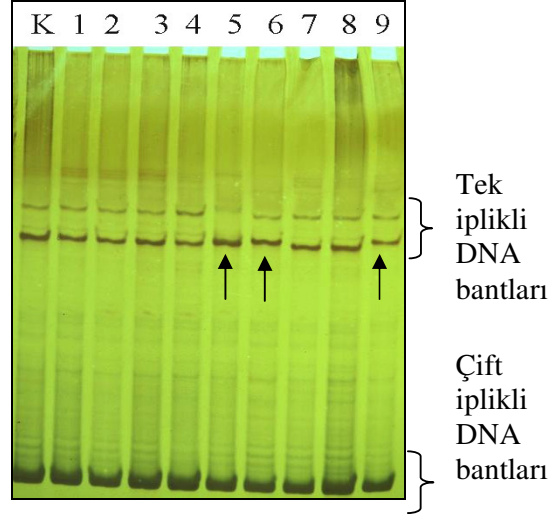
Şekil 4.11. Ekson 2 SSCP analizi jel resmi görülmektedir. 1 numaralı kuyucukta kontrol DNA'sı mevcuttur. Diğer kuyucuklara hasta DNA'ları yüklenmiştir. Ok işareti ile gösterilen 3 ve 4 numaralı hastada çift bant mevcuttur. Diğer hastaların DNA'larının bantları kontrol DNA'sının bantlarından farklılık göstermemektedir.



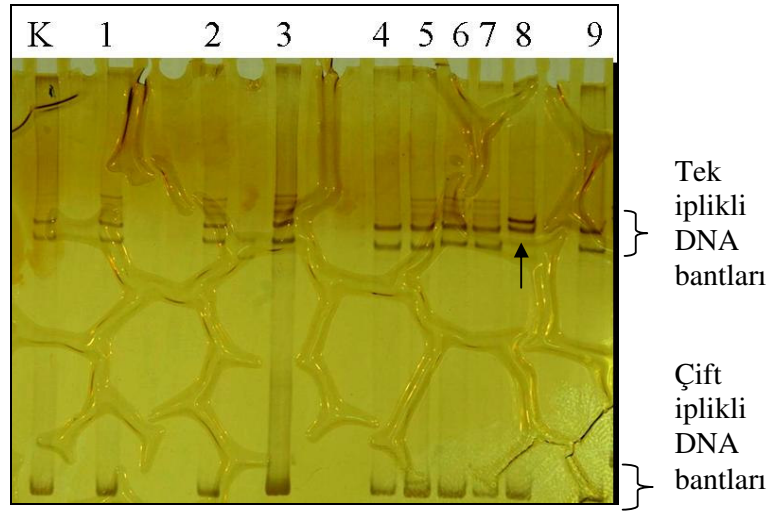
Şekil 4.12. Ekson 3 SSCP analizi jel resmi. 1 numaralı kuyucukta kontrol DNA'sı mevcuttur. Diğer kuyucuklara hasta DNA'ları yüklenmiştir. Hasta DNA'larının bantları kontrol DNA'sının bantlarından farklılık göstermemektedir



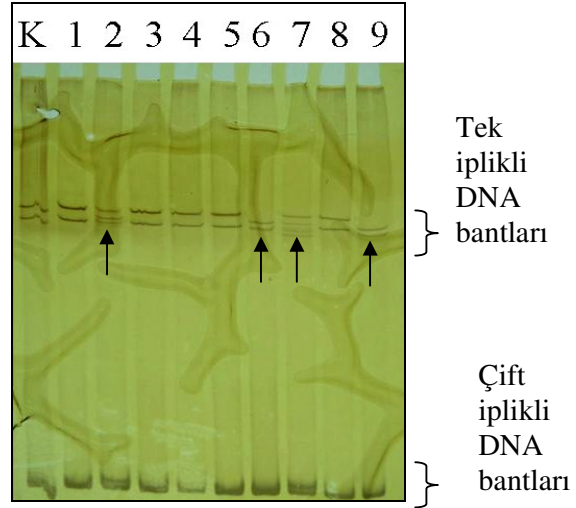
Şekil 4.13. Ekson 4 SSCP analizi jel resmi görülmektedir. 1 numaralı kuyucukta kontrol DNA'sı mevcuttur. Diğer kuyucuklara hasta DNA'ları yüklenmiştir. Hasta DNA'larının bantları kontrol DNA'sının bantlarından farklılık göstermemektedir.



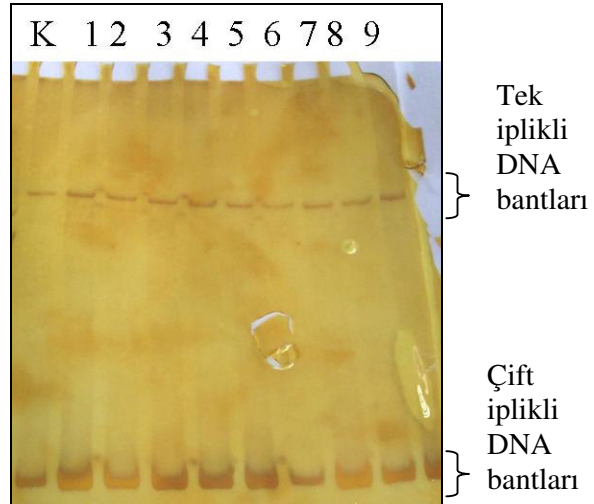
Şekil 4.14. Ekson 5 SSCP analizi jel resmi görülmektedir. 1 numaralı kuyucukta kontrol DNA'sı mevcuttur. Diğer kuyucuklara hasta DNA'ları yüklenmiştir. Şekilde ok ile gösterilen 5, 6 ve 9 numaralı hastaların bantlarının kontrol DNA'sının bandına göre daha yukarıda yer aldığı, diğer hasta DNA'larının kontrol DNA'sına göre farklılık göstermediği görülmektedir.



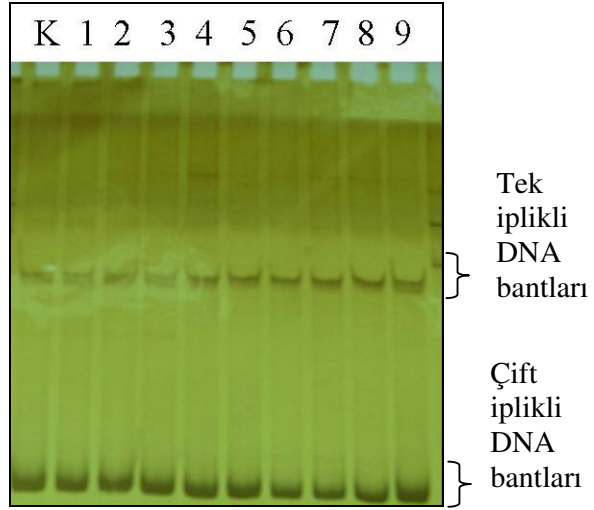
Şekil 4.15. Ekson 6 SSCP analizi jel resmi görülmektedir. 1 numaralı kuyucukta kontrol DNA'sı mevcuttur. Diğer kuyucuklara hasta DNA'ları yüklenmiştir. Ok ile gösterilen 8 numaralı hastanın bantlarında kontrol DNA bantlarına göre yukarı doğru yer değiştirme mevcuttur. Diğer hastaların DNA'larının bantları kontrol DNA'sının bantlarından farklılık göstermemektedir.



Şekil 4.16. Ekson 7 SSCP analizi jel resmi görülmektedir. 1 numaralı kuyucukta kontrol DNA'sı mevcuttur. Diğer kuyucuklara hasta DNA'ları yüklenmiştir. Ok ile gösterilen 2, 6, 7 ve 9 numaralı hastaların DNA'sında farklı yürümüş bantlar mevcuttur, diğer hastaların DNA'ları kontrol DNA'sına göre farklılık göstermemektedir.



Şekil 4.17. Ekson 8-A SSCP analizi jel resmi görülmektedir. 1 numaralı kuyucukta kontrol DNA'sı mevcuttur. Diğer kuyucuklara hasta DNA'ları yüklenmiştir. Hastaların DNA bantları kontrol DNA'sının bantlarına göre farklılık göstermemektedir. Bu yüzden normal olarak adlandırılmışlardır.



Şekil 4.18. Ekson 8-B SSCP analizi jel resmi görülmektedir. 1 numaralı kuyucukta kontrol DNA'sı mevcuttur. Diğer kuyucuklara hasta DNA'ları yüklenmiştir. Hasta DNA'larının bantları kontrol DNA'sının bantlarından farklılık göstermemektedir.

4.2.3. DNA Dizi Analizi Bulguları

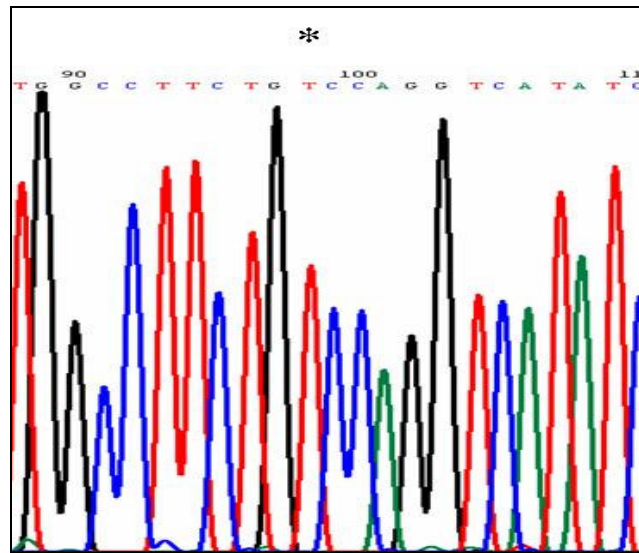
SSCP analizi sonucunda farklı yürümüş bantlara sahip olduğu tespit edilen hastaların belirtilen eksonlarına DNA dizi analizi yapıldı. Analizi yapılan hastalardan 3 tanesinde ekson 5'te, 2 yeni mutasyon tanımlandı. Bu hastaların 2 tanesinde ekson 5 mutasyonları ile birlikte ekson 7'de daha önce tanımlanmış bir polimorfizm mutasyonu gösterildi. Bir hastada ekson 7'deki polimorfizm mutasyonu saptandı. Bir diğer hastada ise yalancı eksiklik durumuna yol açan ekson 6'daki N350S ASA-PD mutasyonu gösterildi. DNA dizi analizi ile saptanan bu mutasyonlar Tablo 4.3'de özetlenmiştir. Mutasyonlara ait dizi analizi grafikleri Şekil 4.19-25'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Türk MLD hastalarında hastalığa neden olan mutasyonlar ve polimorfizmler.

Hasta No	Ekson 5 mutasyonu	Ekson 6 mutasyonu (yalancı eksiklik)	Ekson 7 mutasyonu (polimorfizm)
2			2161 C → G
5	1603 G → T		
6	1568 G → A		2161 C → G
8		1788 A → G N350S	
9	1568 G → A		2161 C → G

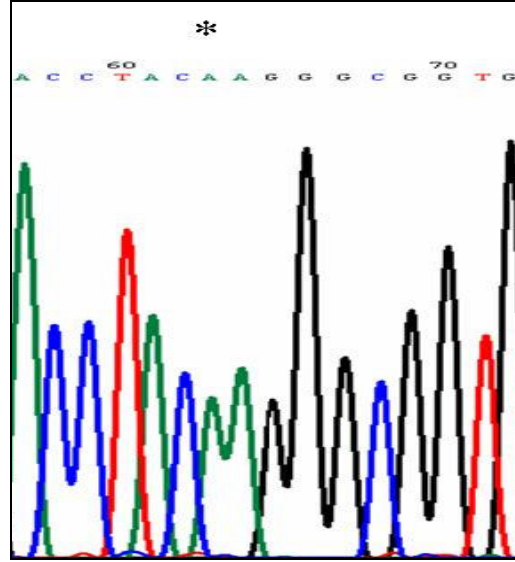
4.2.3.1. Ekson 5 Mutasyonları

5 numaralı hastanın ekson 5 DNA dizi analizi sonucu Şekil 4.19’da gösterilmiştir. Buna göre 1603. pozisyondaki guanin bazı timin bazı ile yer değiştirmiştir (“*transversiyon*” mutasyonu). Bu mutasyon sonucunda 318 numaralı kodondaki triptofan amino asiti sistein amino asitine dönüşmüştür. (1603 G → T, 318 Trp → Cys). Mutasyonun görüldüğü baz * işareti ile tüm DNA dizi analizi şekilleri üzerinde gösterilmiştir.



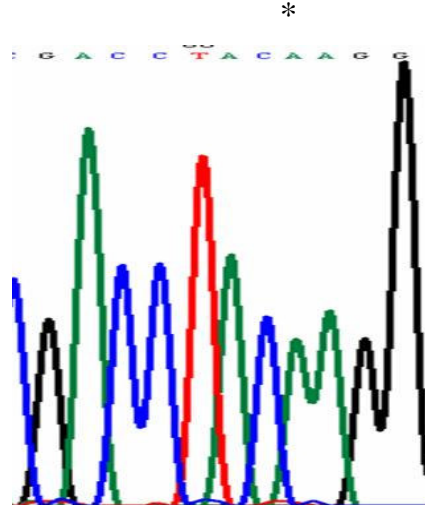
Şekil 4.19. 5 numaralı hastanın ekson 5 DNA dizi analizi sonucu.

6 numaralı hastanın ekson 5 DNA dizi analizi sonucu Şekil 4.20’de gösterilmiştir. Buna göre 1568. pozisyondaki guanin bazı adenin bazı ile yer değiştirmiştir (“*tranzisyon*” mutasyonu). Bu mutasyon sonucunda 307 numaralı kodondaki glutamat amino asiti lizin amino asitine dönüşmüştür. (1568 G → A, 307 Glu → Lys).



Şekil 4.20. 6 numaralı hastanın ekson 5 DNA dizi analizi sonucu.

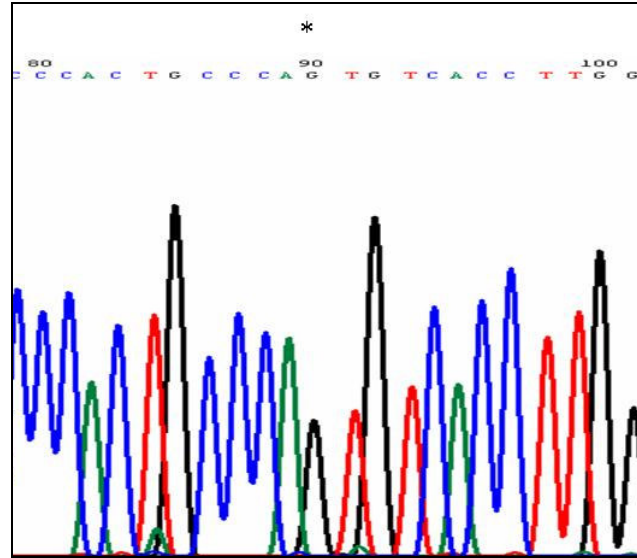
9 numaralı hastanın ekson 5 DNA dizi analizi sonucu Şekil 4.21’de gösterilmiştir. Buna göre 1568. pozisyondaki guanin bazı adenin bazı ile yer değiştirmiştir (“*tranzisyon*” mutasyonu). Bu mutasyon sonucunda 307 numaralı kodondaki glutamat amino asiti lizin amino asitine dönüşmüştür. (1568 G → A, 307 Glu → Lys).



Şekil 4.21. 9 numaralı hastanın ekson 5 DNA dizi analizi sonucu.

4.2.3.2. Ekson 6 Mutasyonu

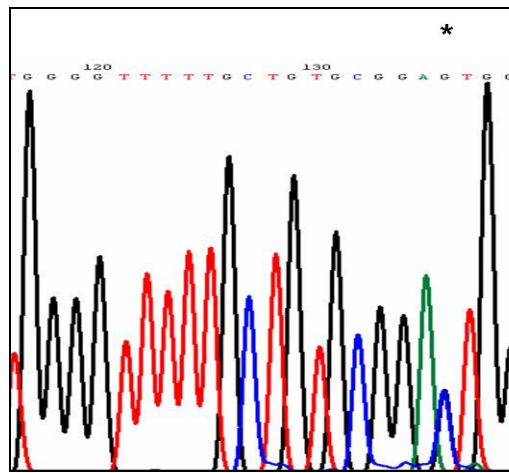
8 numaralı hastanın ekson 6 DNA dizi analizi sonucu Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Buna göre 1788. pozisyondaki adenin bazı guanin bazı ile yer değiştirmiştir (“*tranzisyon*” mutasyonu). Bu mutasyon sonucunda 350 numaralı kodondaki asparajin amino asiti serin amino asitine dönüşmüştür. (1788 A → G, N350S). Oluşan bu mutasyonla protein N-glikozilasyon bölge kaybına uğramıştır.



Şekil 4.22. 8 numaralı hastanın ekson 6 DNA dizi analizi sonucu.

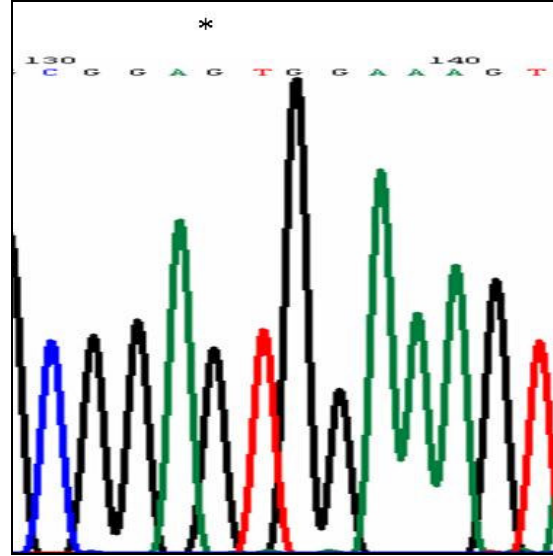
4.2.3.3. Ekson 7 Mutasyonu

2 numaralı hastanın ekson 7 DNA dizi analizi sonucu Şekil 4.23'te gösterilmiştir. Buna göre 2161. pozisyondaki sitozin bazı guanin bazı ile yer değiştirmiştir ("*transversiyon*" mutasyonu). Bu mutasyon sonucunda 391 numaralı kodondaki treonin amino asiti serin amino asitine dönüşmüştür. (2161 C → G, 391 Thr → Ser). Oluşan bu mutasyon açısından hasta heterozigottur. Mutasyon olan bölgede hem C, hem de G nükleotidi bulunmaktadır.



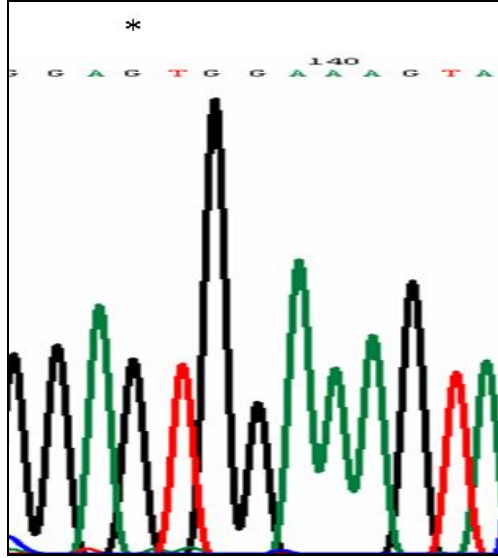
Şekil 4.23. 2 numaralı hastanın ekson 7 DNA dizi analizi sonucu.

6 numaralı hastanın ekson 7 DNA dizi analizi sonucu Şekil 4.23'te gösterilmiştir. Buna göre 2161. pozisyondaki sitozin bazı guanin bazı ile yer değiştirmiştir ("*transversiyon*" mutasyonu). Bu mutasyon sonucunda 391 numaralı kodondaki treonin amino asiti serin amino asitine dönüşmüştür. (2161 C → G, 391 Thr → Ser).



Şekil 4.24. 6 numaralı hastanın ekson 7 DNA dizi analizi sonucu.

9 numaralı hastanın ekson 7 DNA dizi analizi sonucu Şekil 4.25'te gösterilmiştir. Buna göre 2161. pozisyondaki sitozin bazı guanin bazı ile yer değiştirmiştir ("*transversiyon*" mutasyonu). Bu mutasyon sonucunda 391 numaralı kodondaki treonin amino asiti serin amino asitine dönüşmüştür. (2161 C → G, 391 Thr → Ser).

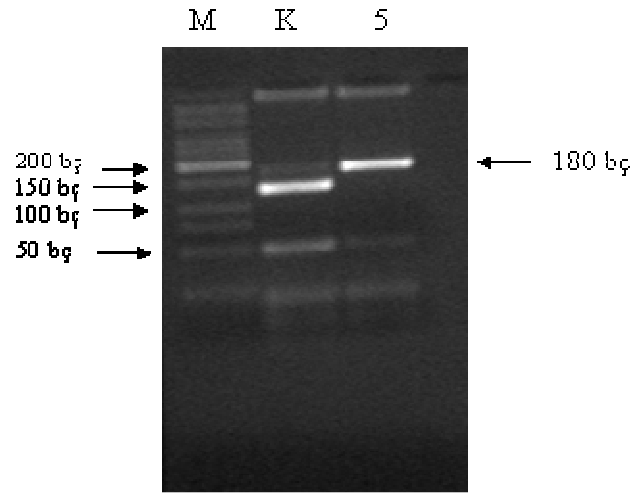


Şekil 4.25. 9 numaralı hastanın ekson 7 DNA dizi analizi sonucu.

Ekson 2'deki 3 ve 4 numaralı hastaların SSCP analizi sonucu saptanan çift bant görüntüsünün DNA dizi analizinde herhangi bir mutasyondan kaynaklanmadığı gösterildi.

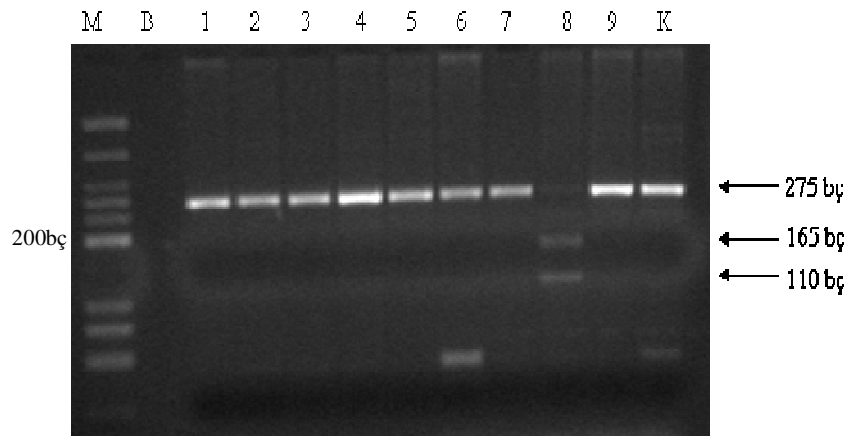
4.2.4. Kesim Enzimi Analizi Sonuçları

5 numaralı hastanın ekson 5'te bulunan mutasyonunu (1603 G → T) bir başka yöntemle de doğrulamak için kesim enzimi araştırıldı. Bu mutasyon bölgesini tanıyan bir restriksiyon enzimiyle ("*MspI*", New England BioLabs) ekson 5 PCR ürünü kesildi. Bu kesim analizinde kontrol olarak ekson 5'te mutasyonu bulunmayan 1 numaralı hasta kullanıldı. Eğer bulunan mutasyon "*MspI*"in kestiği bölgede ise kesim enzimi analizinde kontrolün kesilmesi, mutasyon olan hastanın DNA'sının kesilmemesi beklenmektedir. Şekil 4.26'da görüldüğü gibi kontrol DNA'sı kesim enzimi tarafından kesilmiş, hasta DNA'sı kesilmemiştir. Böylece DNA dizi analizi ile bulunan mutasyonun varlığı kesim enzimi analiziyle de kanıtlanmıştır.

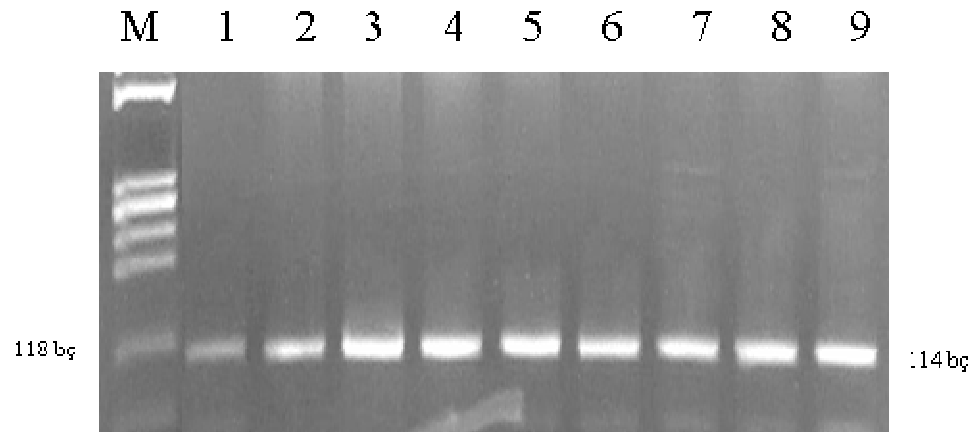


Şekil 4.26. 5 numaralı hastanın ekson 5 DNA'sının "*MspI*" kesim enzimi ile analizi.

ASA enziminin yalancı eksikliğine neden olan iki mutasyonun (N-glikozilasyon ve poliadenilasyon bölge mutasyonları) varlığı "*BsrSI*" ve "*DdeI*" kesim enzimleri kullanılarak analiz edildi. SSCP analizi ile ekson 6'da farklı bantları olan ve DNA dizi analizi ile bu bölgede mutasyonu bulunan bir hastada (Tablo 4.2'de 8 numaralı hasta) "*BsrSI*" enzimi ile mutasyon sonucu oluşan kesim bölgesinden DNA kesildi (Şekil 4.27). Bu hastada N-glikozilasyon bölgesi mutasyonu olduğu gösterildi. "*DdeI*" kesim enzimiyle ekson 8 kesilemediği için poliadenilasyon bölgesi mutasyonunun olmadığına karar verildi (Şekil 4.28).



Şekil 4.27. Ekson 6 PCR ürünlerinin "*BsrSI*" kesim enzimi ile analizi.



Şekil 4.28. Ekson 8 PCR ürünlerinin “*DdeI*” kesim enzimi ile analizi.

5. TARTIŞMA

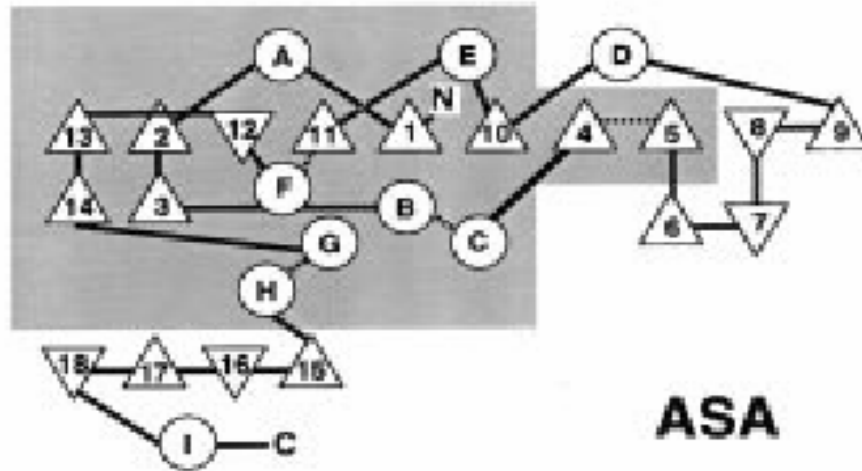
MLD sfingolipit depo hastalıkları içinde ülkemizde en sık görülenidir. Hesaplanabilen minimum insidansı 1,43/100.000 (1/69,892) olarak bildirilmiştir (37). Ülkemizdeki bu insidansı Avrupa toplumlarındaki görülme sıklıkları ile benzerdir (38, 39, 40). Enzimin tam veya tama yakın eksikliği tanı koydururken enzim aktivitesinin alt sınırlarına yakın değerlerde saptanması kesin tanı için yeterli değildir. Enzimde yalancı eksiklik yapan mutasyonların varlığı nedeniyle ara değerlerde çıkan enzim aktivitesine sahip hastalarda MLD tanısı için ileri incelemelere gerek vardır. Yalancı eksiklik yapan mutasyonlar Avrupalı toplumlarda %10-20 oranında görülmektedir (16). Bu eksiklik ASA genindeki bir polimorfizme bağlı olarak gelişmektedir. ASA enzimindeki aktivite eksikliği “*in vitro*” koşullarda normalin %5’i ile %10’u arasında değişen değerlerdedir. “*In vivo*” olarak ise enzim sülfatid katabolizması üzerindeki görevini yapabilmektedir (1). Bu yalancı eksiklik mutasyonlarının bazı nörolojik hastalıklar için yatkınlık yaptığı rapor edilmiştir (19). Bu yüzden unutulmamalıdır ki ASA enzimindeki her aktivite eksikliğinden MLD’ye neden olan mutasyonlar sorumlu değildir. Aynı zamanda, bu mutasyonların MLD’ye sebep olan mutasyonların zemininde de oluşabiliyor olması enzim analizinin moleküler çalışmalarla desteklenmesi gerçeğini gözler önüne sermektedir (43). ASA proteininin üç boyutlu yapısının biliniyor olması ASA enziminin genetik yapısında meydana gelen mutasyonların enzimin yapısında ne tür değişiklikler yapabileceğine dair bize fikir vermektedir (7).

Yapmış olduğumuz bu çalışma ile iki yeni yanlış anlamlı (*missense*) mutasyon (ekson 5’teki 1568G→A, 307Glu→Lys ve 1603G→T, 318Trp→Cys mutasyonları), bir polimorfizm (ekson 7’de 2161C→G, Thr391→Ser) ve bir yalancı eksiklik mutasyonu (ekson 6’da 1788A→G 350Asn→Ser) bulunmuştur.

Buna göre ekson 5’te tanımlanan 1568G→A 307Glu→Lys ve 1603G→T 318Trp→Cys mutasyonları, ASA proteininde sırasıyla 6. alfa-heliks ve 12. beta-tabakalı yapının (Şekil 5.1) elemanlarından birinin değişmesine yol açtıkları için proteinde iyi korunmuş olan bu yapıların (Şekil 5.2) değişmesine neden olabilirler. Çünkü bu mutasyonlardan 1568G→A 307Glu→Lys asidik bir amino asit olan glutamati, bazik bir amino asit olan lizine, diğer mutasyon 1603G→T318Trp→Cys

mutasyonunda yapılan geçici transfeksiyon çalışmalarında enzim aktivitesi kontrol hücrelerine göre %13 bulunmuş ve mutant enzimin lizozoma girmiş olduğu ama dayanıklı olmadığı görülmüştür. Bu mutasyon ile enzimin yarılanma ömrü kısalmıştır (29). Cezayirli bir hastada da ekson 5'te 314Ala→Thr mutasyonu tespit edilmiştir (64) Bu mutasyon 12. beta-tabakalı yapının başında, bizim bulduğumuz 318Trp→Cys mutasyonu ise bu beta-tabakalı yapının sonunda yer almaktadır ve her iki mutasyon da enzim eksikliğine sebep olmaktadır.

Ekson 5'te 1568G→A 307Glu→Lys mutasyonu olan iki hastada hastalığa neden olan bu mutasyonun yanı sıra, ekson 7'de daha önce tanımlanmış 2161C→G, Thr391→Ser polimorfizmi de saptanmıştır (Tablo 4.3). Literatürde polimorfizmlerle birlikte hastalığa neden olan ASA mutasyonunun olduğu çeşitli hastalar bildirilmiştir. 2161C→G, Thr391→Ser polimorfizmi bir Türk gençlik tipi MLD hastasında, 6 İtalyan ailede ve 11 Avrupalı hastada rapor edilmiştir (64, 65, 66, 67). Bu nedenle, polimorfizm saptanan hastalarda ASA geninin tüm eksonları mutasyon açısından analiz edilmelidir. Ekson 7 polimorfizmi, SSCP yöntemi ile diğer eksonlarında normale göre farklılık saptanamayan bir başka hastada da heterozigot düzeyde saptanmıştır. Ekson 7 polimorfizminin 6 hastanın 3 tanesinde bulunması bu polimorfizmin Türkiye'de MLD hastalığına yakınlık yapan bir faktör olabileceğini düşündürmektedir. Bu bilgi ışığında, yeni tanımlanan hastaları ekson 7 polimorfizmi açısından değerlendirmeli ve incelenen hasta sayısını arttırarak toplumuz için önemli olan muhtemel yakınlık faktörü açısından daha gerçekçi veriler elde etmeliyiz.



Şekil 5.2. ASA proteininin üç boyutlu yapısının şema ile gösterimi. Taralı alan tüm sülfatazlarda iyi korunmuş yapısal elemanlar bölgesini göstermektedir. Aktif bölge boşluğu C ucuna yakın beta-tabakalardan zengin bölgedeki yüklü amino asitlerle döşenmiştir. Bu amino asitler beta 11'deki (Asp281, Asn282), beta1'deki (Asp29, Asp30), beta10'daki (His229), beta4'deki (Lys123, His125) ve beta5'deki (Ser150) ve N-ucunda alfa-heliks F'deki (Lys302) ve alfa-heliks B'deki (Arg73) tür. FGly69 katalizde önemlidir (7).

Yalancı eksikliğe neden olan iki mutasyon (N-glikozilasyon ve poliadenilasyon bölge mutasyonları) tüm hastalarda kesim enzimi analizi ve DNA dizi analizi ile araştırıldı. ASA aktivitesi normale göre düşük bulunan bir hastada N-glikozilasyon mutasyonu; 1788A→G, N350S bulundu. Hasta mutasyon açısından hem dizi analizinde hem de kesim enzimi analizinde elde ettiğimiz veriler ışığında değerlendirildiğinde homozigot olduğu görüldü. ASA enziminde var olan 3 N-glikozilasyon bölgesinden üçüncüsündeki Asn amino asiti yerine Ser amino asiti geçmişti. Bu değişim proteinde normal ASA proteinine göre bir oligosakkarit zinciri daha az bulunmasına ve enzimin konformasyonu etkilenerek, aktivitesinde normale göre %50 veya daha fazla azalmasına neden olmaktadır (14, 68). Bu hastada ASA enzim aktivitesi normalden düşük bulunmuş (26 nmol/mg protein/saat), nörolojik bulguların MLD hastalığının nörolojik bulguları ile örtüşmesi üzerine MLD tanısı almıştır. DNA bankasına da bu tanı ile kayıt olan hastanın daha sonradan yapılan ileri incelemelerinde tanısının subakut sklerozan panensefalit (SSPE) olduğu tespit

edilmiştir. Bizim çalışmamızda da bu hastanın sahip olduğu mutasyon ekson 6 bölgesinde yer alan N-glikozilasyon bölge mutasyonudur. Bu hastada yalancı eksikliğe neden olan mutasyon dışında MLD hastalığına ait başka bir mutasyona rastlanmadı. Bu mutasyondan etkilenen bireylerde yalancı eksiklik durumu oluşmakta, bu durum MLD hastalığına değil sadece ASA enzim eksikliğine yol açmaktadır. Yapılan yayınlarda yalancı eksiklik durumunun bazı bireylerde diğer nörolojik hastalıklara yatkınlık yapabildiğine dair veriler mevcuttur (25). Bu hastada da SSPE gelişiminin ASA-PD mutasyonu ile ilgisi olduğu düşünülebilir.

Yaptığımız SSCP analizi ekson 1, ekson 2, ekson 5 ve ekson 6 için iki kere yapıldı. Ekson 1 her iki SSCP analizinde de normal bulundu. Ekson 2’de 3 no’lu ve 4 no’lu hastalara ait bantlarda kontrol DNA’sına ait bantlara göre saptanan farklılık tekrarlanan SSCP analizi ile de gösterildi. Ekson 5’te de 5 no’lu, 6 no’lu ve 9 no’lu hastaların bantlarına ait farklılıklar her iki çalışmada da görüldü. Ekson 6’da 8 no’lu hastaya ait bant farklılığı üst üste yapılan çalışmalarda tekrar etti. Özetle, tek iplikli DNA bantlarında değişiklik saptanan hastaların DNA bantları her iki SSCP analizinde de kontrol DNA bantlarına göre farklı bulunmuştur; yani, SSCP analizinin sonuçları deneyler arası değişim göstermemiştir.

Tekrarlanan SSCP analizlerinde ekson 2’de 3 no’lu ve 4 no’lu hastalar ile ekson 7’de 7 no’lu hastanın bantlarında görülen farklılıklar DNA dizi analizi ile doğrulanamadı. Daha önce yapılan SSCP çalışmalarında da benzer sonuçlar elde edilmiş, SSCP analizi ile farklı banda sahip olan DNA’ların DNA dizi analizi sonucunda o eksona ait herhangi bir mutasyon taşımadıkları saptanmıştır (69). Bu yalancı pozitif sonuçlar DNA dizi analizi ile bir kısmını görebildiğimiz intronik bölgelerdeki kişiler arası farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

SSCP analizinde ekson5, ekson 6, ekson 7’de mutasyon saptanan toplam 7 hasta ve ekson 2, ekson 7’deki dizi analizi ile doğrulanamayan farklı bantlara sahip toplam 3 hasta dışındaki tüm DNA bantları kontrol DNA bantları ile birebir benzerlik göstermişlerdir. Bu sonuç belirtilen eksonlar için hastalar tamamıyla normaldir anlamına gelmemektedir. Çünkü SSCP en uygun koşullarda yapıldığı zaman bile mutasyonları saptama oranı %80 civarında olan bir mutasyon tarama yöntemidir. Olan mutasyonların SSCP ile saptanamamasının çeşitli sebepleri olabilir. SSCP analizinde ortamın sıcaklığı, DNA’nın boyu, elektroforez jelinin özellikleri,

DNA'yı “denatiire” etme biçimi tek iplikli DNA'nın ikincil yapısını etkilemektedir (70). Her mutasyon DNA'nın ikincil yapısını etkileyen nitelikte olmayabilir. Bazı baz değişimleri DNA'nın ikincil yapısını bozmayabilir. Böyle bir mutasyon varlığında SSCP analizimizin sonucu normal olarak karşımıza çıkar. SSCP'de en doğru sonuca ulaşmak için SSCP koşullarımızın optimum olması gerekmektedir. SSCP'nin en duyarlı olduğu koşullardan bir tanesi DNA'nın 150-200 bp uzunluğunda olduğu durumdur (71). Eğer DNA'nın uzunluğu 150 bp'nin altındaysa DNA parçaları arasında ikincil yapı oluşumu azalmakta bu da SSCP analizinde güçlük yaratmaktadır. DNA uzunluğu 200 bp'nin üstünde olduğu durumlarda ise tek baz değişimi bile konformasyonda daha az değişiklik meydana getirecektir. Bu durumda jelde bu değişikliği görmemiz güçleşecektir. Bu çalışmada ASA geninin PCR ile çoğaltılan 8 eksonuna ait 9 parçasından 4 tanesi (ekson 1, 2, 4 ve 7) belirlenen üst sınırın üstünde büyüklüğe sahiptirler. SSCP analizini etkileyen bir diğer önemli koşul ise sıcaklıktır. SSCP için genelde en uygun sıcaklık oda sıcaklığıdır (72). Sıcaklık değişimlerinin çok olması ikincil yapıların konformasyonlarını bozabilmektedir. Çalışmamızda SSCP analizleri Kasım-Mart ayları arasında yapılmış ve bu aylarda laboratuvarın oda sıcaklığı değişim göstermemiştir. Ayrıca SSCP'de bantlarda oluşan değişiklikleri en iyi şekilde görebilmek için kullanılan camların uzun olmaları ve DNA örneklerinin düşük voltajda uzun süre yürütülmeleri ve jelin ince olması gerekmektedir. Bu koşullar çalışmalarımızda sağlanmış ve mutasyon saptama oranı %83 (5/6) bulunmuştur, hastalığa neden olan mutasyon saptama oranı %60 (3/5) dir. Optimum koşullar sağlandığında SSCP'nin duyarlılığı %90'lara kadar çıkabilmektedir.

Bu çalışma ile Türkiye'de görülen MLD hastalığının moleküler mekanizmasını anlamak için bir başlangıç yapılmıştır. Hastalığa neden olan 2 yeni mutasyon tanımlanmış, hastaların %50'sinde varolan bir polimorfizm gösterilmiş ve bir hastada da yalancı eksiklik mutasyonu saptanmıştır. Polimorfizm saptanan hastalarda tüm ASA geninin DNA dizi analizi yapılmalıdır. Yeni tanımlanan mutasyonların protein üzerindeki etkileri “*in vitro mutagenез*” yöntemi ile desteklenmelidir. Bu çalışmanın sonuçları, Tay-Sachs hastalığının moleküler analizlerinde elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir (73, 74). Yani, MLD hastalığına Türkiye'de diğer ülkelerde görülen mutasyonlardan farklı mutasyonlar

neden olmaktadır. Bu nedenle, sfingolipidozlarda enzim analizi ile birlikte moleküler araştırmaların genişletilerek Tay-Sachs ve MLD'den sonra grubun diğer hastalıklarına da uygulanması, literatüre bu hastalıkların ülkemizdeki moleküler mekanizmalarını anlamak için önemli bir katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- Figura KV, Gieselmann V, Jaeken J: Metachromatic leukodystrophy. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D) McGraw-Hill New York, eighth edition 2001, Vol.3 3695-3724.
- 2- Stoffyn P, Stoffyn A: Structure of sulfatides. *Biochim Biophys Acta* 1963, 70:218-220.
- 3- Kolodny EH, Fluharty AL: Metachromatic leukodystrophy and multiple sulfatase deficiency: sulfatide lipidosis, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Stanbury JD, Wyngaarden JB, Fredrickson DS (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill New York, 7th ed 1995, 1721-1750.
- 4- Gieselmann V, Franken S, Klein D, Mansson JE, Sandhoff R, Lüllmann Rauch R, Hartmann D, Saravanan VPM, De Deyn PP, D'Hooge R, Van Der Linden AM, Schaeren-Wiemers N: Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulphatide accumulation. *Acta Paediatr Suppl* 2003, 443:74-79.
- 5- Baum H, Dodgson KS, Spencer B: The assay of arylsulfatase A and B in human urine. *Clin Chim Acta* 1950, 4:453-455.
- 6- Vagedes P, Saenger W, Knapp EW: Driving forces of protein association: The dimer-octamer equilibrium in arylsulfatase A. *Biophys J* 2002, 83:3066-3078.
- 7- Saenger W, von Fifura K, Gieselmann V, Selmer T, Theis K, Lukatela G: Crystal structure of human Arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry* 1998, 37:3654-3664.
- 8- Schestag F, Yaghootfam A, Habetha M, Poeppel P, Dietz F, Klein RA, Zlotogora J, Gieselmann V: The functional consequences of mis-sense mutations affecting an intra-molecular salt bridge in arylsulfatase A. *Biochem J* 2002, 367:499-504.
- 9- Sommerlade HJ, Selmer T, Ingendoh A, et al. Glycosylation and phosphorylation of arylsulfatase A. *J Biol Chem* 1994; 33(19): 20977-20981.

- 10-** Gieselmann V, Schmidt B, von Figura K: In vitro mutagenesis of potential N-glycosylation sites of arylsulfatase A. *J Biol Chem* 1992, 267:13262-13266.
- 11-** Phelan MC, Thomas GR, Saul RA, Rogers RC, Taylor HA, Wenger DA, McDermid HE: Cytogenetic, biochemical and molecular analyses of a 22q13 deletion. *AmJ Med Genet* 1992, 43:872-876.
- 12-** Kreysing J, von Figura K, Gieselmann V: Structure of the arylsulfatase A gene. *Eur J Biochem* 1990, 191:627-631.
- 13-** Stein C, Gieselmann V, Kreysing J, Schmidt B, Pohlmann R, Waheed A, Meyer HE, et al.: Cloning and expression of human arylsulfatase A. *J Biol Chem* 1989, 264:1252-1259.
- 14-** Gieselmann V, Polten A, Kreysing J, von Figura K: Arylsulfatase A pseudodeficiency: Loss of polyadenylation signal and N-glycosylation site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:9436-9440.
- 15-** Ott R, Waye JS, Chang PL: Evolutionary origins of two tightly linked mutations in arylsulfatase A pseudodeficiency. *Hum Genet* 1997, 101:135-140.
- 16-** Nelson VP, Carey WF, Morris CP: Population frequency of the arylsulfatase A pseudodeficiency allele. *Hum Genet* 1991, 87:87-88.
- 17-** Penzien JM, Kappler J, Herschkowitz N, Schuknecht B, Leinekugel P, Propping P, Tonnesen T, Lou H, Moser H, Zierz S, Conzelmann E, Gieselmann V: Compound heterozygosity for Metachromatic Leukodystrophy and arylsulfatase A pseudodeficiency alleles is not associated with progressive neurological disease. *Am J Hum Genet* 1993, 52:557-564.
- 18-** Mihaljevic-Peles A, Jakovljevic M, Milicevic Z, Kracun I: Low arylsulfatase A activity in the development of psychiatric disorders. *Neuropsychobiology* 2001, 43:75-78.

- 19-** Harvey JS, Carey WF, Morris CP: Importance of the glycosylation and polyadenylation variants in metachromatic leukodystrophy pseudodeficiency pseudodeficiency phenotype. *Hum Mol Genet* 1998; 7(8): 1215-1219.
- 20-** Emre S, Topcu M, Terzioglu M, Renda Y: Arylsulfatase A pseudodeficiency incidence in Turkey. *Tur J Pediatr* 2000, 42:115-117.
- 21-** Pedron CG, Gaspar PA, Guigliani R, Pereira MLS. Arylsulfatase A pseudodeficiency in healthy Brazilian individuals. *Br J Med Biol Res* 1999, 32:941-945.
- 22-** Chabas A, Castellvi S, Bayes M, Balcells S, Grinberg D, Vilageliu L, Marfany G, Lissens W, Gonzales-Duarte R: Frequency of the arylsulfatase A pseudodeficiency allele in the Spanish population. *Clin Genet* 1993, 44:320-323.
- 23-** Regis S, Filocamo M, Stroppiano M, Corsolini F, Gatti R: Molecular analysis of the arylsulfatase A gene in late infantile metachromatic leukodystrophy patients and healthy subjects from Italy. *J Med Genet* 1996, 33:251-252.
- 24-** Marcao A, Pinto E, Rocha S, Miranda MC, Ferreira L, Amaral O. ARSA-PD associated alleles in Portuguese population: frequency determination and haplotype analysis. *Mol Genet Metab* 2003, 79:305-307.
- 25-** Bogner KS, Furac I, Kubat M, Cosovic C, Demarin V. Croatian population data for arylsulphatase A pseudodeficiency-associated mutations in healthy subjects, and in patients with Alzheimer-type dementia and Down syndrome. *Arch Med Res* 2002, 33: 473-477.
- 26-** Berna L, Gieselmann V, Poupetova H, Hrebicek M, Elleder M, Ledivnova J. Novel mutations associated with Metachromatic Leukodystrophy. *Am J Med Genet* 2004, 129A:277-281.
- 27-** Barth ML, Fensom A, Harris A: Prevalence of common mutations in the arylsulfatase A gene in metachromatic leukodystrophy patients diagnosed in Britain. *Hum Genet* 1993, 91:73-77.

- 28-** Eng B, Heshka T, Tarnopolsky MA, et al. Infantile Metachromatic leukodystrophy (MLD) in a compound heterozygote for the IVS2+1 G to A mutation and a complete deletion of the arylsulfatase A gene. *Am J Med Genet A* 2004; 128(A):95-97
- 29-** Kreysing J, Bohne W, Bösenberg C, et al. High residual arylsulfatase A (ARSA) activity in a patient with late-infantile metachromatic leukodystrophy. *Am J Hum Genet* 1993; 53:339-346
- 30-** Polten A, Fluharty AL, Fluharty CB, Kappler J, von Figura K, Gieselmann V: Molecular basis of different forms of metachromatic leukodystrophy. *N Engl J Med* 1991, 324:18-22.
- 31-** Von Bülow R, Schmidt B, Dierks T, Schwabauer N, Schilling K, Weber E, Uson I, von Figura K: Defective oligomerization of arylsulfatase A as a cause of its instability in lysosomes and metachromatic leukodystrophy. *J Biol Chem* 2002, 227(11):9455-9461.
- 32-** Gieselmann V: Metachromatic leukodystrophy: Recent research development. *J Child Neurol* 2003, 18:591-594.
- 33-** Marcao A, Simonis H, Schestag F, Miranda MC, Gieselmann V: Biochemical characterization of two (C300F, P425T) arylsulfatase A missense mutations. *Am J Med Genet* 2003, 116A:238-242.
- 34-** Hess B, Kafert S, Heinisch U, Wenger DA, Zlotogora J, Gieselmann V: Characterization of two arylsulfatase A missense mutations D335V and T274M causing late infantile metachromatic leukodystrophy. *Hum Mutat* 1994, 7:311-317.
- 35-** Heinisch U, Zlotogora J, Kafert S, Gieselmann V: Multiple mutations are responsible for the high frequency of metachromatic leukodystrophy in a small geographic area. *Am J Hum Genet* 1995, 56:51-57.
- 36-** Wang J, Zhang W, Pan H, Bao X, Wu Y, Wu X, Jiang Y: ARSA gene mutations in five Chinese metachromatic leukodystrophy patients. *Pediatr Neurol* 2007, 36(6):397-401.

- 37-** Özkara HA, Topçu M. Sphingolipidoses in Turkey. *Brain Dev* 2004, 26(6): 363-366.
- 38-** Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *J Am Med Assoc* 1999, 281: 249-254.
- 39-** Heim P, Claussen M, Hoffmann B, Conzelmann E, Gartner J, Harzer K: Leukodystrophy incidence in Germany. *Am J Med Genet* 1997, 71: 475-478.
- 40-** Lugowska A, Amaral O, Berger J, Berna L, Bosshard NU, Chabas A, Fensom A, Gieselmann V, Gorovenko NG, Lissens W, Mansson JE, Marcao A, Michelakakis H, Bernheimer H, Ol'khovych V, Regis S, Sinke R, Tylki-Szymanska A, Czartoryska B: Mutations c.459 + 1G → A and p.P426L in the ARSA gene: Prevalence in metachromatic leukodystrophy patients from European countries. *Mol Genet Metab* 2005, 86:353-359.
- 41-** Bach G, Dagen A, Herz B, Gatt S: Diagnosis of arylsulfatase A deficiency in intact cultured cells using a fluorescent derivative of cerebroside sulfate. *Clin Genet* 1987, 31:211-217.
- 42-** Gieselmann V, Fluharty AL, Tonnesen T, von Figura K: Mutations in the arylsulfatase A pseudodeficiency allele causing metachromatic leukodystrophy. *Am J Hum Genet* 1991, 49:407-413.
- 43-** Gieselmann V: An assay for rapid detection of the arylsulfatase A pseudodeficiency allele facilitates diagnosis and genetic counseling for metachromatic leukodystrophy. *Hum Genet* 1991, 86:251-255.
- 44-** Özkara HA, Çevik Arıkan M, Topçu M, Emre S, Renda Y. A study on enzyme activities of some sphingolipidoses. *Tur J Pediatr* 1994, 36(3):215-223.
- 45-** Emre S, Topçu M, Aktan G, Seyrantepe V, Özkara A, Renda Y. Çocukluk çağı Metakromatik lökodistrofi tanısı alan olgularda Arilsülfataz A enzim aktivite değerleri, klinik ve laboratuvar bulguları. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 1995, 38(4):575-582.

- 46-** Martino S, Consiglio A, Cavalieri C, Tiribuzi R, Costanzi E, Severini GM, Emiliani C, Bordignon C, Orlacchio A: Expression and purification of a human, soluble arylsulfatase A for metachromatic leukodystrophy enzyme replacement therapy. *J Biotech* 2005, 117:243-251.
- 47-** Matzner U, Herbst E, Hedayati KK, Lüllmann-Rauch R, Wessig C, Schröder S, Eistrup C, Möller C, Fogh J, Gieselmann V: Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Hum Mol Genet* 2005, 14:1139-1152.
- 48-** Kawabata K, Migita M, Mochizuki H, Miyake K, Igarashi T, Fukunaga Y, Shimada T: Ex vivo cell-mediated gene therapy for metachromatic leukodystrophy using neurospheres. *Brain Res* 2006, 1094:13-23.
- 49-** Sevin C, Aubourg P, Cartier N: Enzyme, cell and gene-based therapies for metachromatic leukodystrophy. *J Inher Metab Dis* 2007, 30:175-183.
- 50-** Biffi A, Capotondo A, Fasano S, Del Carro U, Marchesini S, Azuma H, Malaguti MC, Amadio S, Brambilla R, Grompe M, Bordignon C, Quattrini A, Naldini L: Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficient in mice. *J Clin Invest* 2006, 116:3070-3082.
- 51-** Klein D, Schmandt T, Muth-Köhne E, Perez-Bouza A, Segschneider M, Gieselmann V, Brüstle O: Embryonic stem cell-based reduction of central nervous system sulfatide storage in an animal model of metachromatic leukodystrophy. *Gene Therapy* 2006, 13:1686-1695.
- 52-** Hess B, Saftig P, Hartmann D, Coenen R, Lüllmann-Rauch R, Goebel HH, Evers M, von Figura K, D'Hooge R, Nagels G, De Deyn P, Peters C, Gieselmann V: Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: Relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci* 1996, 93:14821-14826.
- 53-** Gieselmann V, Matzner U, Hess B, Lüllmann-Rauch R, Coenen R, Hartmann D, D'Hooge R, DeDeyn P, Nagels G. Metachromatic Leukodystrophy. Molecular genetics and an animal model. *J Inher Metab Dis* 1998, 21:564-574.

- 54-** Temizkan G, Arda N: Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler Nobel tıp kitapevleri İstanbul, ikinci baskı 2004.
- 55-** Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193:265.
- 56-** Suzuki K Enzymatic diagnosis of sphingolipidoses. In: Ginsburg V, editor. *Methods Enzymol*, Florida: Academic Press; 1987, 138:727-763.
- 57-** Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out method for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
- 58-** Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, 1982.
- 59-** Gort L, Coll J, Chabas A. Identification of 12 novel mutations and two new polymorphisms in the Arylsulfatase A gene: Haplotype and genotype-phenotype correlation studies in Spanish Metachromatic Leukodystrophy patients. *Hum Mutat* 1999, 14: 240-248.
- 60-** Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5(4): 874-879
- 61-** Bassam B, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991;196:80-83.
- 62-** Nelson DL, Cox MM: *Lehninger principles of biochemistry* Worth publisher New York, third edition 2000.
- 63-** Tsuda T, Hasegawa Y, Eto Y: Two novel mutations in a Japanese patient with the late infantile form of metachromatic leukodystrophy. *Brain Dev* 1996, 18:400-403.
- 64-** Draghia R, Letourneur F, Drugan C, et al. Metachromatic Leukodystrophy: Identification of the first deletion in exon I and of nine novel point mutations in the arylsulfatase A gene. *Hum Mutat* 1997; 9:234-242

- 65-** Anlar B, Waye JS, Eng B, et al. Atypical clinical course in juvenile metachromatic leukodystrophy involving novel arylsulfatase A gene mutations. *Dev Med Child Neurol* 2006; 48(5):383-387.
- 66-** Regis S, Corsolini F, Stroppiano M, et al. Contribution of arylsulfatase A mutations located on the same allele to enzyme activity reduction and leukodystrophy severity. *Hum Genet* 2002; 110:351-355
- 67-** Bertelli M, Gallo S, Buda A, et al. Novel mutations in the arylsulfatase A gene in eight Italian families with metachromatic leukodystrophy. *J Clin Neurosci* 2006; 13:443-448.
- 68-** Coulter-Mackie MB, Gagnier L. Spectrum of mutations in the arylsulfatase A gene in a Canadian DNA collection including two novel frameshift mutations, a new missense mutation (C488R) and an MLD mutation (R84Q) in cis with a pseudodeficiency allele. *Mol Genet Metab* 2003; 79:91-98
- 69-** Özkara HA: Tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP) analizinde yanlış pozitiflik. *Türk Biyokimya Dergisi* 2002, 27:106-111.
- 70-** Fan E, Levin DB, Glickman BW, Logan DM: Limitations in the use of SSCP analysis. *Mutat Res* 1993, 288:85-92.
- 71-** Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, SandstromDW, Stone EM: The sensitivity of single stranded conformational polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993, 16:325-332.
- 72-** Humphries SE, Gudnason V, Whittall R, Ian NM: Single stranded conformational polymorphism analysis with high throughput modifications and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 1997,43:427-435.
- 73-** Özkara HA, Navon R. At least six different Hex A mutations cause Tay-Sachs disease among the Turkish population. *Mol Genet Metab* 1998, 65(3):250-253.
- 74-** Özkara HA, Sandhoff K. A new point mutation (G412 to A) at the last nucleotide of exon 3 of hexosaminidase alpha-subunit gene affects splicing. *Brain Dev* 2003;

25(3):203-206

EK 1. ASA Geninin “Primer” Dizileri

EKSONLAR VE PRİMER DİZİLERİ	Büyüküğü (bç)
EKSON 1:	
F- CTGCTGGAGCCAAGTAGCCC	339
R- TGCAATCCATTGGGAGGAAA	
EKSON 2:	
F- GACTCTGTGACTTGTCCCGC	287
R- GCTGAGGGCCCCGGGTGGTTC	
EKSON 3:	
F- ACCTGCCAGCCCAGCCCTCA	217
R- TTGGGCCAAGATCACTTAC	
EKSON 4:	
F- CTA ACTCCAGTCTTTGCCCC	224
R- GCCGGAGCACCCAGCTG	
EKSON 5:	
F- GCTCATGAGCGCCTCCTGTG	180
R- GGGTTCCAAGGAGAGGGCCTGCGGACTGA	
EKSON 6:	
F- CTTGATGGCGAACTGAGTGAC	202
R- AAGGATCTGGGATCAGGGGT	
EKSON 7:	
F- CACGTCCAGGGCCTCCCACC	237
R- GGGGTCAGCAGGTTCCGGGGG	

EKSON 8A:

F-TTGCCCTGTGCACAGAATTG 203
R- CTGTTTCAGGGCTTGCAGCAC

EKSON 8B:

F- GAAACAGCTCTAGCTGTCCA 189
R- GCCATCACATGCCCAGGCCA

ASA-PD Poliadenilasyon bölge dizisi:

F- TTGATGGCGAACTGAGTGAC 114
R- CAGTGCAGGAGGCACTGAGG

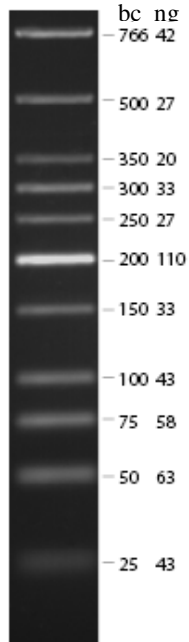
ASA-PD N-glikozilasyon bölge dizisi:

F- GGTTTGTGCCTGATAACTTA 275
R- TTCCTCATTCGTACCACAGG

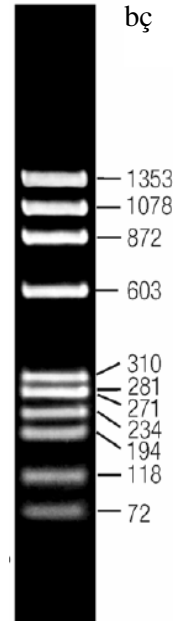
EK 2. Molekül ağırlığı belirteçleri jel resimleri

“Low molecular weight” DNA belirteci

Φ X174 DNA/*Bsu*RI(*Hae*III)belirteci



0,5 μ g DNA
belirtecinin
%1,8'lik TBE
agaroz jelde
yürümüş ve
etidyum bromur
ile boyanmış
görüntüsü.



0,5 μ g DNA
belirtecinin
%1,4'lik TBE
agaroz jelde
yürümüş ve
etidyum bromur
ile boyanmış
görüntüsü.

EK 3. Genetik Şifre Tablosu

		Kodondaki İkinci Pozisyon					
		T	C	A	G		
B i r i n c i P o z i s y o n	T	TTT Phe [F]	TCT Ser [S]	TAT Tyr [Y]	TGT Cys [C]	T C A G	Ü ç ü n c ü P o z i s y o n
		TTC Phe [F]	TCC Ser [S]	TAC Tyr [Y]	TGC Cys [C]		
		TTA Leu [L]	TCA Ser [S]	TAA <i>Ter</i> [end]	TGA <i>Ter</i> [end]		
		TTG Leu [L]	TCG Ser [S]	TAG <i>Ter</i> [end]	TGG Trp [W]		
	C	CTT Leu [L]	CCT Pro [P]	CAT His [H]	CGT Arg [R]	T C A G	
		CTC Leu [L]	CCC Pro [P]	CAC His [H]	CGC Arg [R]		
		CTA Leu [L]	CCA Pro [P]	CAA Gln [Q]	CGA Arg [R]		
		CTG Leu [L]	CCG Pro [P]	CAG Gln [Q]	CGG Arg [R]		
	A	ATT Ile [I]	ACT Thr [T]	AAT Asn [N]	AGT Ser [S]	T C A G	
		ATC Ile [I]	ACC Thr [T]	AAC Asn [N]	AGC Ser [S]		
		ATA Ile [I]	ACA Thr [T]	AAA Lys [K]	AGA Arg [R]		
		ATG Met [M]	ACG Thr [T]	AAG Lys [K]	AGG Arg [R]		
	G	GTT Val [V]	GCT Ala [A]	GAT Asp [D]	GGT Gly [G]	T C A G	
		GTC Val [V]	GCC Ala [A]	GAC Asp [D]	GGC Gly [G]		
		GTA Val [V]	GCA Ala [A]	GAA Glu [E]	GGA Gly [G]		
		GTG Val [V]	GCG Ala [A]	GAG Glu [E]	GGG Gly [G]		