

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

**SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ PATOGENEZİNDE ROL ALAN
GENETİK DÜZENLEYİCİLERİN İFADE ANALİZİ**

İnci Hande YENER

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2013**

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

**SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ PATOGENEZİNDE ROL ALAN
GENETİK DÜZENLEYİCİLERİN İFADE ANALİZİ**

İnci Hande YENER

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Didem Dayangaç- Erden**

**ANKARA
2013**

Anabilim Dalı :Tıbbi Biyoloji
 Program :Tıbbi Biyoloji
 Tez Başlığı :Spinal Müsküler Atrofi Patogenezinde Rol Alan Genetik
 Düzenleyicilerin İfade Analizi

Öğrenci Adı-Soyadı :İnci Hande YENER
 Savunma Sınavı Tarihi :04.09.2013

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Y. Çetin KOCAEFE
 (Hacettepe Üniversitesi)

(İmza)

Tez danışmanı: Doç. Dr. Didem DAYANGAÇ-ERDEN
 (Hacettepe Üniversitesi)

(İmza)

Üye: Prof. Dr. Sevim ERDEM- ÖZDAMAR
 (Hacettepe Üniversitesi)

(İmza)

Üye: Doç. Dr. Erdem KARABULUT
 (Hacettepe Üniversitesi)

(İmza)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU
 (Hacettepe Üniversitesi)

(İmza)

ONAY

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

(İmza)
 Prof.Dr. Ersin FADILIOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgisi ile bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Didem DAYANGAÇ- ERDEN'e, her konuda bana fikirleri ile ışık tutan hocam Prof. Dr. Hayat YURTER'e, veri setinin istatistiksel analizini gerçekleştiren, içtenlikle ve sabırla zamanını ayıran Dr. Erdal COŞGUN'a, Nöroloji Anabilim Dalı'nda SMA hastalarına klinik tanı koyan ve çalışma grubunun oluşmasına katkı sağlayan Prof. Dr. Haluk TOPALOĞLU'na ve Prof. Dr. Sevim ERDEM- ÖZDAMAR'a, çalışma sürecinde fikirlerine ve deneyimine başvurduğum Uzm. Dr. Gamze BORA-TATAR'a, eğitimim boyunca çok değerli bilgilerini paylaşan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm hocalarıma, öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarıma, maddi ve manevi her türlü destek ile her zaman yanımda olan ve her zaman da yanımda olacaklarını bildiğim canım anneme, babama, ağabeyim Yrd. Doç. Dr. Ali Ümit YENER ve eşi Uzm. Dr. Özlem YENER'e en içten duygularla teşekkür ederim.

ÖZET

Yener, İ. H. Spinal Müsküler Atrofi Patogenezinde Rol Alan Genetik Düzenleyicilerin İfade Analizi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2013. Spinal müsküler atrofi (SMA) otozomal resesif olarak kalıtılan ve alfa motor nöron dejenerasyonuna neden olan çocukluk çağı hastalığıdır. Hastaların % 95 -98'inde SMN1 geni 7. ve 8. ekzonlarda homozigot delesyon saptanmasına rağmen, klinik seyirlerinin farklı olması, SMA fenotipini etkileyen genetik düzenleyicilerin varlığını düşündürmektedir. Tez çalışması kapsamında, SMN1 gen delesyonuna sahip, farklı klinik tip ve yaştaki 11 SMA hastası ile 4 aile içerisinde yer alan SMA'lı kardeşlerde, akson uzama hatalarını düzelttiği bilinen plastin 3 (PLS3) ve nöritin 1 (NRN1) gen ifade düzeylerinin kan dokusunda araştırılması ve fenotipi modifiye edici rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Gen ifade analiz sonuçlarına göre, pediatrik tip III grubuna ait olan ve benzer klinik bulgular gösteren H6, H8'de PLS3 gen ifade düzeylerinin yakın olduğu (3.5-3.6 kat) saptanmıştır. Ancak bu iki hastaya göre, klinik bulguları daha hafif olan H1'de ise, PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeylerinin düşük olduğu tespit edilmiş olup, bu hastanın fenotipi üzerinde başka genlerin etkili olabileceği düşünülmektedir. Erişkin tip III grubunda ise, hastalık seyri hafif olan 2 hastada (H5, H9), PLS3 ve NRN1 gen ifadelerinin yüksek olduğu (0.9-1.6 kat) tespit edilmiş olup, bu iki genin hastaların fenotipini modifiye edebileceği düşünülmektedir. Aynı grupta yer alan H3 ve H4'ün kas güçsüzlük derecelerinin benzer olmasının yanı sıra, PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeylerinin de yakın olduğu tespit edilmiştir. Ancak H3, H4 ile benzer klinik gösteren H2'de NRN1 gen ifadesinin yüksek olduğu (1.1 kat) saptanmış olup, hastanın fenotipi üzerinde NRN1 geninin etkili olabileceği düşünülmektedir. Bir tip II ve iki tip I SMA hastalarında ise, beklenilenin aksine, PLS3 gen ifade düzeylerinin yüksek olduğu (2.1- 2.6 kat) gözlenmiştir. Çalışma grubuna dâhil edilen, 1.ailedeki hafif seyirli kardeşte ağır seyirli kardeşe göre NRN1 gen ifade düzeyinin yüksek olduğu (1.4 kat) tespit edilirken, 2.ailede yer alan hastalık seyri hafif olan kardeşte de PLS3 ve NRN1 gen ifadelerinin, ağır seyirli kardeşlerine göre arttığı (1.8- 2.7 kat) saptanmıştır. 3.ailede, klinik ciddiyeti benzer olan kardeşlerde PLS3 geninin aynı oranda ifadesinin olduğu gösterilmiştir. 4.ailede ise, PLS3 ve NRN1 dışında başka genlerin fenotipi etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu çalışma ile SMN1 gen delesyonuna sahip hastalarda PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeyleri belirlenerek, hastalık üzerinde fenotipi modifiye edici etkileri gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: SMA, genetik düzenleyici, gen ifade düzeyi, Plastin 3, Nöritin 1

ABSTRACT

Yener, İ. H. The Expression Analysis of Modifier Genes in Pathogenesis of Spinal Muscular Atrophy. Hacettepe University Institute of Health Sciences, M.Sc. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2013. Childhood-onset spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive disorder, which leads to alpha motor neuron degeneration. Although 95-98 % of the patients have homozygous deletions in exon 7 and 8 SMN1 gene, patients with different clinical severity suggest that modifier genes, which affect the phenotype, may exist in SMA. This study aims to investigate plastin 3 (PLS3) and neuritin 1 (NRN1) gene expression levels in blood, 11 SMA patients with different types, ages and in 4 families with different clinical characteristics. According to gene expression results, in pediatric type III group, similar PLS3 gene expression levels (3.5-3.6 fold) were detected in H6 and H8, who had similar clinical symptoms. However, in mildly affected H1, lower PLS3 and NRN1 gene expression levels were determined; therefore it was thought that modifier genes other than PLS3 and NRN1 may affect this patient's phenotype. In type III SMA group, in two mildly affected patients (H5, H9), high PLS3 and NRN1 gene expression levels (0.9-1.6 fold) were identified. In two patients, both PLS3 and NRN1 were thought to play a modifier role. In H3 and H4 patients that have similar levels of muscle weakness, similar PLS3 and NRN1 gene expression pattern was identified. However, in H2 who showed similar clinical symptoms with H3 and H4, higher NRN1 gene expression level was detected. It was thought that NRN1 gene may be effective on the phenotype of this patient. On the contrary in one type II and two type I SMA patients, high PLS3 expression levels (2.1- 2.6 fold) were determined. In addition, in family 1, NRN1 expression levels showed 1.4 fold increase in mildly affected sibling than his severely affected brother. In family 2, higher PLS3 and NRN1 gene expression levels (1.8-2.7 fold) were detected in mildly affected sibling compared to his severely affected brothers. In family 3, similar PLS3 expression levels were detected in siblings who had similar clinical severity. In family 4, it was thought that modifier genes other than PLS3 and NRN1 may be effective. In this study, PLS3 and NRN1 gene expression levels and their modifying roles were investigated in SMA patients that have deletions in SMN1 gene.

Keywords: SMA, modifier gene, gene expression level, Plastin 3, Neuritin 1

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Spinal Müsküler Atrofi (SMA)'nin Klinik Özellikleri	2
2.2. Spinal Müsküler Atrofi (SMA)'nin Moleküler Genetik Özellikleri	3
2.2.1. <i>Survival Motor Neuron</i> (SMN) Genleri	3
2.2.2. SMN2 Kopya Sayısı	4
2.2.3. SMN Proteini ve Fonksiyonları	5
2.3. SMA'da Tanımlanan Genetik Düzenleyiciler	8
2.3.1. Plastin 3 (PLS3) Geni	8
2.3.2. Nöritin 1 (NRN1) Geni	10
2.3.3. Çinko Parmak Protein (ZPR1) Geni	12
3. BİREYLER ve YÖNTEM	14
3.1. Bireyler	14
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	15
3.2.1. Total Kandan RNA İzolasyonu	15
3.2.2. cDNA Sentezi	15
3.2.3. cDNA Amplifikasyonunun PZR ile Kontrolü	15
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	16
3.2.5. Gerçek Zamanlı (<i>Real-Time</i>) PZR	16
3.3. Yöntemler	17

3.3.1. Total Kandan RNA İzolasyonu	17
3.3.2. RNA Derişimlerinin Ölçümü	19
3.3.3. cDNA sentezi	19
3.3.4. cDNA Amplifikasyonunun PZR ile Kontrolü	19
3.3.5. Gerçek Zamanlı (<i>Real-Time</i>) PZR	20
3.3.6. İstatistiksel Analizler	22
4. BULGULAR	23
4.1. Elde Edilen RNA Örneklerinin Derişimleri ve Saflıkları	23
4.2. cDNA Amplifikasyonunun PZR ile Kontrolü	24
4.3. Gerçek Zamanlı (<i>Real-Time</i>) PZR Analizi	25
4.3.1. PLS3 ve NRN1 Genlerinin İfade Analizi	25
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	41
EKLER	52
EK 1. PLS3 Geninin Gerçek Zamanlı (<i>Real-Time</i>) PZR Amplifikasyon Eğrisi, Standart Eğrisi, Erime Eğrisi ve Amplifikasyon Ürünlerinin Agaro Jeldeki Görünümü	
EK 2. NRN1 Geninin Gerçek Zamanlı (<i>Real-Time</i>) PZR Amplifikasyon Eğrisi, Standart Eğrisi, Erime Eğrisi ve Amplifikasyon Ürünlerinin Agaro Jeldeki Görünümü	
EK 3. PPIB Geninin Gerçek Zamanlı (<i>Real-Time</i>) PZR Amplifikasyon Eğrisi, Standart Eğrisi, Erime Eğrisi ve Amplifikasyon Ürünlerinin Agaro Jeldeki Görünümü	
EK 4. Kız ve Erkek Hastalarda PLS3 Gen İfadesinin Yaşa Göre Değişimi	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
bç	Baz çifti
C	Sitozin
cDNA	Komplementer DNA
Ct	<i>Threshold cycle</i>
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
ESE	<i>Exonic Splicing Enhancer</i>
F	Fenilalanin
F-aktin	Filamentöz aktin
FL-SMN	Tam uzunlukta SMN (<i>Full-length</i>)
g	<i>Gravity</i>
G-aktin	Globüler aktin
Gem	<i>Gemini of coiled bodies</i>
GPI	Glikozil- fosfotidilinositol
GTF2H2	<i>General Transcription Factor II H</i>
kb	Kilobaz
kDa	KiloDalton
K ⁺	Potasyum iyonu
mM	Milimolar
ml	Mililitre
M	Molar
mg/ml	Miligram/mililitre
mRNA	Mesajcı RNA
NAIP	<i>Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein</i>
ng	Nanogram
ng/μl	Nanogram/mikrolitre
nM	Nanomolar

NRN1	Nöritin 1
OCLN	<i>Occludin</i>
OSH	Ortalama Standart Hata
PLS3	Plastin 3
PPIB	Peptidil Prolil <i>Cis-Trans</i> İzomeraz B
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
SERF1	<i>small EDRK-rich factor 1</i>
SMA	Spinal Müsküler Atrofi
SMN	<i>Survival Motor Neuron</i>
SMNΔ7	7. ekzonu olmayan SMN proteini
sn	Saniye
snRNA	<i>small nuclear ribonucleic acid</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i>
T	Timin
TBP	TATA Bağlayıcı Protein
ZPR1	<i>Zinc Finger Protein 1</i> (çinko parmak protein 1)
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa	
Şekil 2.1.	SMN gen bölgesinin şematik olarak gösterimi	3
Şekil 2.2.	SMN1ve SMN2 genlerinden sentezlenen SMN protein miktarları	4
Şekil 2.3.	SMA tip I-III arasında değişkenlik gösteren SMN2 kopya sayıları	5
Şekil 2.4.	SMN proteininin snRNP biyogenezindeki rolü	6
Şekil 2.5.	Motor nöron aksonlarında SMN tarafından β-aktinin taşınması	7
Şekil 2.6.	SMA fare modellerinde PLS3’ün nöroprotektif rolü	10
Şekil 2.7.	Nöronlarda NRN1’in ERK/mTOR sinyal yolları üzerinden etki mekanizması	12
Şekil 3.1	SYBR Green Çalışma Prensipleri	21
Şekil 4.1.	cDNA amplifikasyonu kontrolüne ait örnek jel fotoğrafı	25
Şekil 4.2.	SMA I, II ve III hastalarında saptanan PLS3 ve NRN1 kat artışları	28
Şekil 4.3.	1. Aile’deki hasta kardeşlerde saptanan PLS3 ve NRN1 kat artış değerleri	30
Şekil 4.4.	2. Aile’deki hasta kardeşlerde saptanan PLS3 ve NRN1 kat artış değerleri	31
Şekil 4.5.	3. Aile’deki hasta kardeşlerde saptanan PLS3 ve NRN1 kat artış değerleri	31
Şekil 4.6.	4. Aile’deki hasta kardeşlerde saptanan PLS3 ve NRN1 kat artış değerleri	32

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1. RNA örneklerinin derişim ve saflık değerleri	23
Tablo 4.2. Hastaların klinik özellikleri, PLS3 ve NRN1 kat artış değerleri	27
Tablo 4.3. SMA'lı hasta kardeşlerin klinik özellikleri, PLS3 ve NRN1 kat artış değerleri	29

1. GİRİŞ

Spinal müsküler atrofi (SMA) ön boynuz motor nöronların dejenerasyonu ile karakterize nöromüsküler bir hastalıktır (1-3). SMA'ya neden olan *Survival Motor Neuron* (SMN1) geni 5q11.2-13.3'de lokalize olup; SMN1 geni 7. ve 8. ekzonlarda homozigot delesyonlar görülmektedir (4,5). Hastalarda aynı delesyon saptanmasına rağmen, hastalığın klinik şiddeti ağır (tip I), orta (tip II) ve hafif (tip III) olarak değişmektedir. Aynı genotipte, farklı klinik seyir gösteren hastaların varlığı, SMA fenotipini modifiye eden genetik düzenleyicilerin etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Son yıllarda, SMA'da görülen fenotip farklılıklarını açıklamak üzere, fenotipi modifiye edici genler hakkında yapılan araştırmalar hız kazanmıştır. Akson uzama hatalarını düzelttiği bilinen plastin 3 (PLS3) geninin SMA hastalığının ciddiyeti ile korelasyon gösterdiği, ifadesinin cinsiyete ve yaşa bağlı olarak değiştiği saptanmıştır (6-8). PLS3 geni dışında SMA fenotipini etkileyen yeni genleri araştırmak üzere grubumuz tarafından gerçekleştirilen transkriptom çalışmalarında tip III hastalarda nöritin 1 (NRN1, cpg15) isimli genin ifadesinin tip I'lere göre 5 kat arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu veri, NRN1 geninin SMA patogenezinde rol alabileceğini ve hastalık fenotipini etkileyen modifiye edici etkisi olabileceğini düşündürmüştür. SMA hastalarında, NRN1 geninin ifade düzeyi bilinmemekte olup, ilk defa bu tez çalışması kapsamında araştırılmıştır. Daha önce farklı araştırmacılar tarafından SMA'da modifiye edici özelliği tanımlanan PLS3 geni hakkında ise, Türkiye'de bir çalışma yapılmamıştır.

Tez çalışması kapsamında, farklı klinik tip ve yaştaki SMA hastaları ile aynı aile içerisinde klinik ciddiyeti farklı olan kardeşlerde, PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeylerini analiz etmek ve bu genlerin SMA hastalığı üzerindeki modifiye edici rollerini araştırmak amaçlanmıştır. Böylece, aynı genotipe sahip hastalar arası fenotip farklılıklarını açıklamak mümkün olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Müsküler Atrofi (SMA)'nin Klinik Özellikleri

Spinal Müsküler Atrofi (SMA), alfa motor nöron dejenerasyonundan kaynaklanan istemli kasların kuvvetsizliği ve atrofisi olarak bilinen, otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalıktır (1-3). Kistik fibrozisten sonra ikinci sıklıkta görülen SMA'nın taşıyıcı sıklığı 1/40- 1/60, insidansı ise 1/6000-1/10000 olarak saptanmıştır (9). Hastalığın tanı kriterleri arasında konjenital hipotoni, üst ve alt ekstremitelerde simetrik kas güçsüzlüğü, tremor, kontraktür, skolyoz ve dil kaslarında fasikülasyon yer almaktadır (10,11). SMA klinik olarak, Uluslararası SMA Konsorsiyumu tarafından dört gruba (Tip I-IV) ayrılmıştır. Bu klinik tipler, hastalığın görülme yaşına ve motor nöronların fonksiyonuna bağlı olarak sınıflandırılmıştır (12,13):

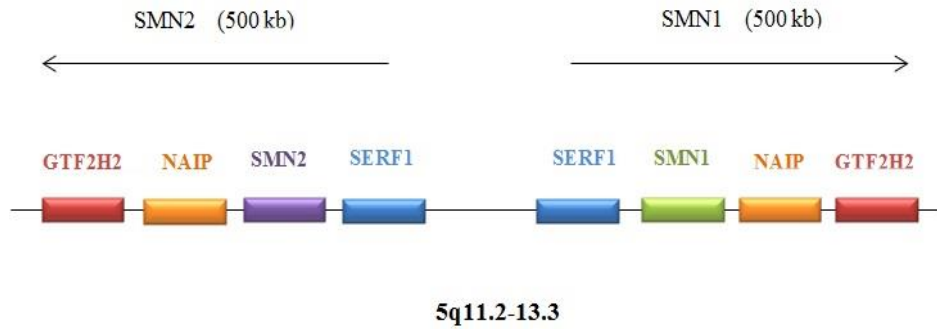
- Tip I SMA (Werdnig-Hoffmann Hastalığı, OMIM #253300) : SMA'nın en ağır formu olup, hastalık ilk 6 ayda belirtilerini göstermektedir. Bu hastalar başlarını dik tutamadığı gibi, desteksiz de oturamamaktadırlar. Tip I SMA hastalarında, kas zayıflığı, yutma ve solunumda zorlanma gözlenmektedir. Hastalar, 2 yaşından önce hayatını kaybetmektedirler (14,15).
- Tip II SMA(OMIM #253550) : Ara form olarak da bilinen tip II SMA, 6. aydan sonra belirtilerini göstermektedir. Tip II SMA grubunda yer alan hastalar, desteksiz oturmakta fakat yürüyememektedirler. Yaşam süresi tip I hastalara göre daha uzundur (14,16).
- Tip III SMA (Kugelberg-Welander Hastalığı, OMIM #253400) : Hafif seyirli olan bu form, 18. aydan sonra belirtilerini göstermektedir. Semptom başlangıç yaşına göre tip IIIa (3 yaşından önce) ve tip IIIb (3 yaşından sonra) olarak isimlendirilmektedir. Hastalar, yirmili yaşlara kadar destek ile yürüyebilmekte ancak ilerleyen yaşlarda tekerlekli sandalyeye bağlı olarak yaşamlarına devam etmektedirler (14).

- Tip IV SMA (OMIM #271150) : Erişkin tip olarak da bilinmektedir. En hafif SMA tipi olan ve nadir olarak gözlenen tip IV SMA, 30-40 yaşları arasında belirtilerini göstermektedir (14,16).

2.2. Spinal Müsküler Atrofi (SMA)'nin Moleküler Genetik Özellikleri

2.2.1. *Survival Motor Neuron* (SMN) Genleri

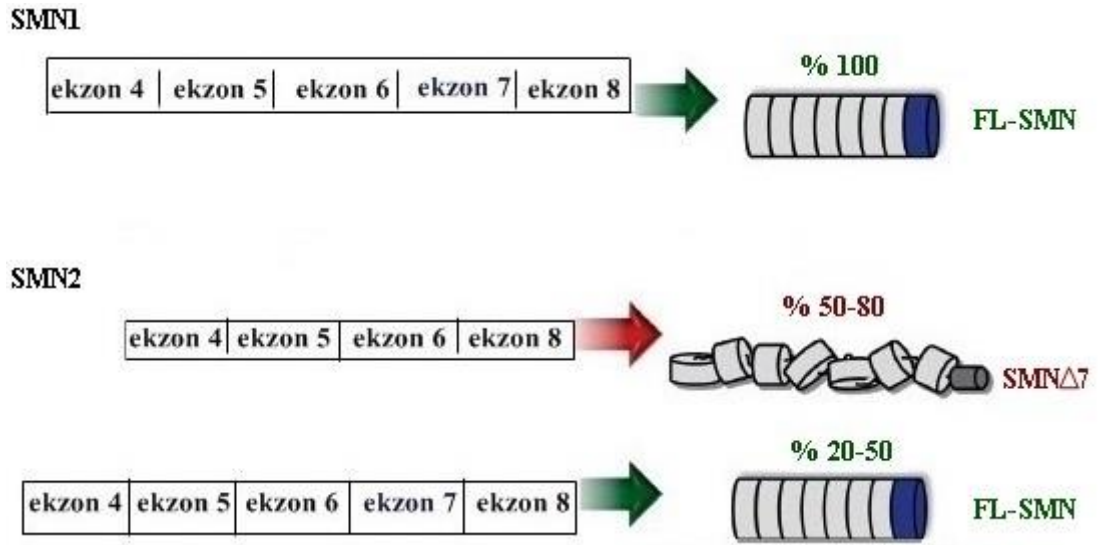
500 kilobazlık (kb) bir alanda yer alan SMN geni 5q11.2-13.3 bölgesine haritalanmıştır (5,17,18). SMN geninin, SMN1 ve SMN2 olmak üzere iki kopyası bulunmaktadır. Duplikasyon ve inversiyonlar içeren bu bölgede, SMN geni dışında; NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*), OCLN (*occludin*) geni, H4F5 genleri olarak da bilinen SERF1 (*small EDRK-rich factor 1*) genleri ve GTF2H2 (*general transcription factor II H*) genleri yer almaktadır (4,19) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. SMN gen bölgesinin şematik olarak gösterimi.

Hastalığa neden olan gen, 1995 yılında tanımlanarak SMN1 olarak adlandırılmıştır (4). Hastaların % 95 - 98'inde SMN1 geni 7. ve 8. ekzonlarda homozigot delesyonlar gözlenmekte olup; sadece 7.ekzon delesyonu taşıyan hastalar da bulunmaktadır (1,20,21). 9 ekzondan oluşan [1, 2a, 2b, 3- 8] SMN1 ve SMN2 genleri birbirlerine % 99 oranında homoloji göstermektedir (22). İki gen arasındaki en önemli farklılık 7. ekzonun 6. pozisyonundaki sitozin nükleotidinin timine (C→T) dönüşümüdür. SMN2 geninde oluşan bu transisyon sonucunda kodlanan amino asit

değişmemekte, (C→T, F280F) ancak bir post-transkripsiyonel mekanizma olan *splicing* etkilenmektedir. *Splicing* doğruluğunu kontrol eden *exonic splicing enhancer* (ESE) baz dizisi bozularak, değişen oranlarda 7. ekzon atlanmaktadır (23-25). SMN2 geninden % 50-80 oranında 7.ekzonu olmayan SMN proteini (SMN Δ 7), % 20-50 oranında tam uzunluktaki SMN proteini (FL-SMN) sentezlenmektedir. Düşük miktarda sentezlenen tam uzunluktaki SMN proteini, motor nöron kaybını önleyememekte ve nörit boylarının kısa kalması sonucu kası uyaramamaktadır. (26,27) (Şekil 2.2).

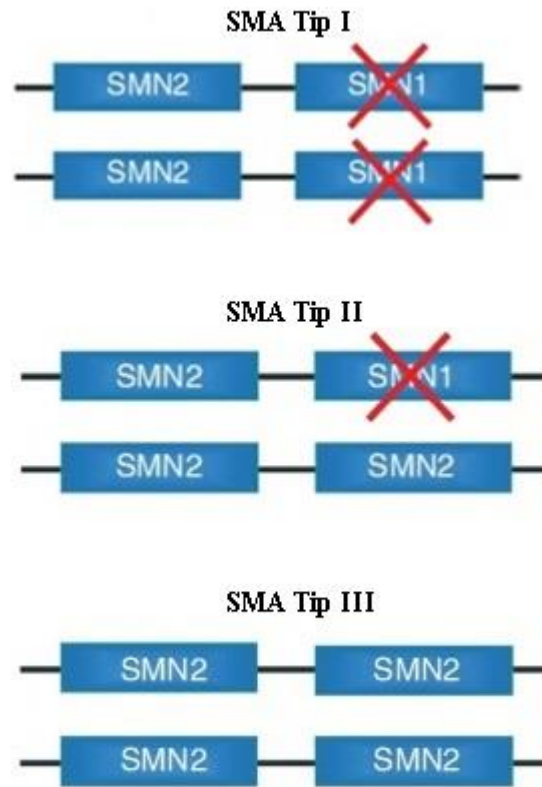


Şekil 2.2. SMN1 ve SMN2 genlerinden sentezlenen SMN protein miktarları (28) .

2.2.2. SMN2 Kopya Sayısı

Kararsız ve hareketli yapıya sahip olan SMN gen bölgesi, evrimsel süreçte *gene conversion* veya duplikasyonlara uğrayarak, SMN2 geninin oluşmasını sağlamıştır (29,30). SMN2 geninin hastalık oluşturmadağı ancak hastalık ciddiyeti ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır (31,32). Tip I SMA hastalarında SMN2 gen kopya sayısı 1-2; tip II SMA hastalarında 2-3; tip III SMA hastalarında 3 ile 6 arasında değişkenlik göstermektedir (20,32,33) (Şekil 2.3). Taşıyıcılarda ve kontrollerde SMN2 kopya sayısının ise 0 ile 4 arasında değiştiğı saptanmıştır (27,34). SMN2 kopya sayısının artışına bağılı olarak, bu genden sentezlenen tam uzunluktaki SMN

proteini de artmakta ve hastalığın klinik ciddiyeti azalmaktadır (28,31). Tip I hastalarında SMN2 geninden % 20 oranında tam uzunlukta protein sentezlenirken, tip III hastalarında % 50 oranında tam uzunlukta protein sentezlendiği bildirilmiştir (32,35).



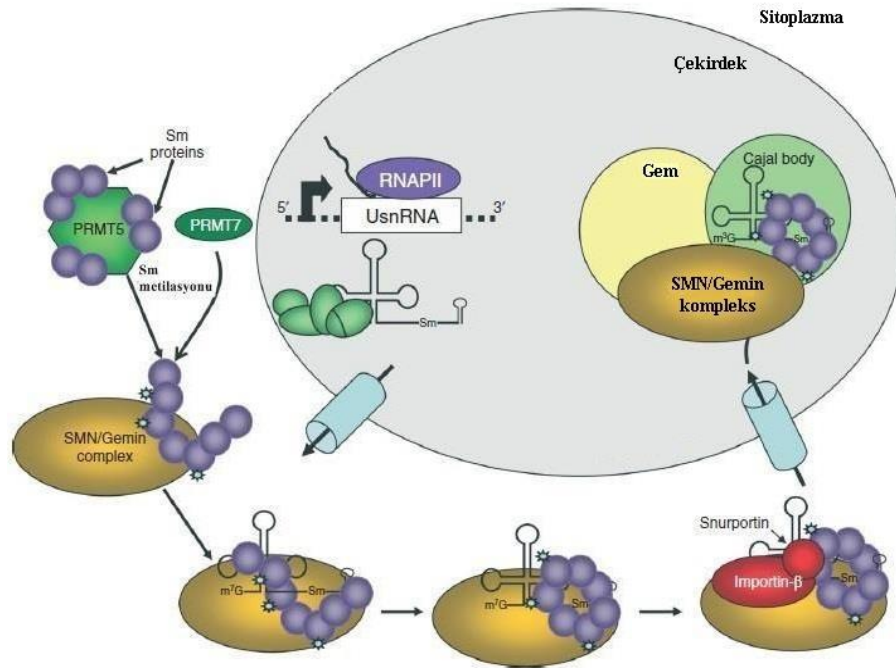
Şekil 2.3. SMA tip I-III arasında değişkenlik gösteren SMN2 kopya sayıları (36) .

2.2.3. SMN Proteini ve Fonksiyonları

294 amino asit uzunluğunda ve 38 kDa ağırlığındaki SMN proteini, çekirdekte *gem* (*gemini of coiled bodies*) yapıları içinde ve sitoplazmada yerleşim göstermektedir (37,38). SMN proteininin, beyin, omurilik, böbrek ve karaciğerde yüksek; kalp ve iskelet kasında orta; fibroblast ve lenfositlerde düşük seviyede ifadesi bulunmaktadır (35,36). SMN proteininin, N terminal ucunda nükleik asit bağlanma domaini (ekzon 2a - 2b) ve Sm core proteinleri ile etkileşime giren Tudor domaini (ekzon 3) yer almaktadır. C terminal ucunda ise, aktin bağlayıcı bir protein

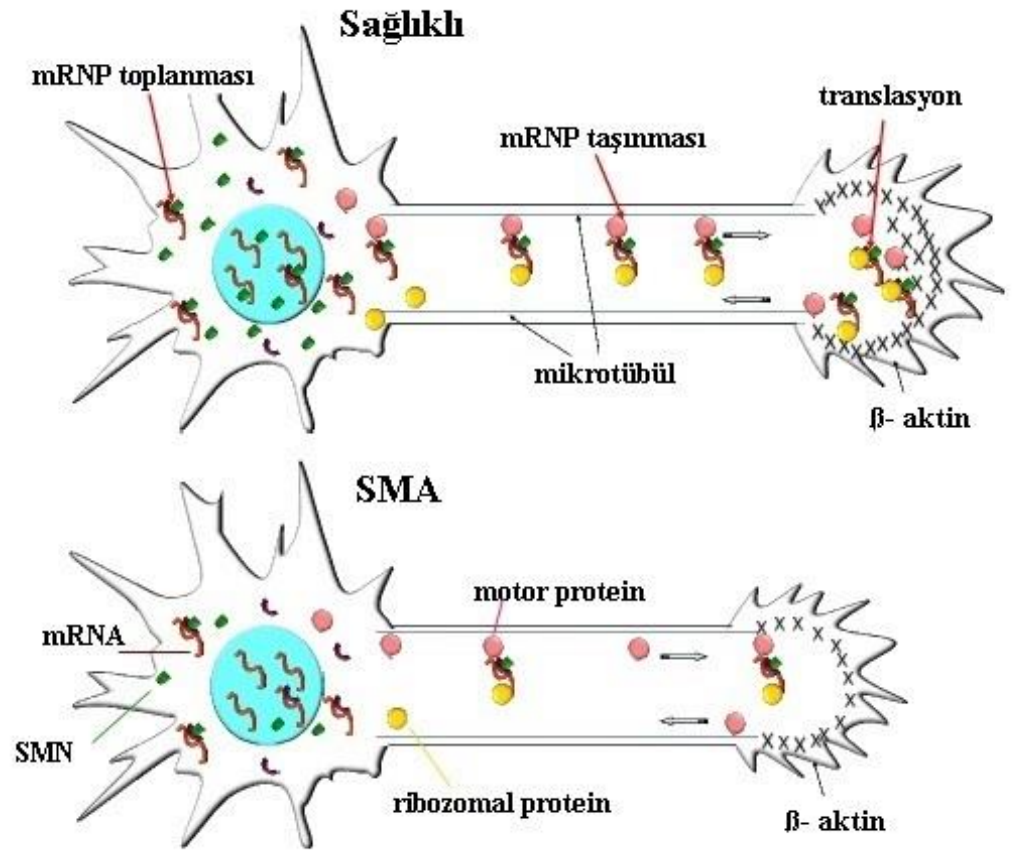
olan profilin ile etkileşime giren prolince zengin domain (ekzon 5), protein oligomerizasyonunu sağlayan Y/G kutusu (ekzon 6) ve sitoplazmik stabiliteyi sağlayan domaini (ekzon 7) bulunmaktadır. 3'- kodlanmayan bölgede ise, 8. ekzon yer almaktadır. (36,39).

Oligomerik yapıda olan SMN proteini, *splicing* anında protein- protein etkileşimini sağlayan Gemin proteinleri (Gemin2-8) ve unrip proteini ile etkileşime girerek, makro molekül yapıda olan SMN kompleks yapısını oluşturmaktadır (40,41). SMN kompleksinin; Sm proteinleri, snoRNP, hnRNP U, Q, R, RNA helikaz A, nükleolin, ZPR1 ve profilin gibi proteinlerle de etkileşime girdiği gösterilmiştir (38,41-43). SMN komplekse, Sm proteinlerinin ve snRNA'ların bağlanmasıyla, *splice* bölgelerin tanınmasında ve öncül mRNA'lardan intronların kesilmesinde görev alan *small nuclear ribonucleoprotein particle* (snRNP) oluşmaktadır (36,40,44-49) (Şekil 2.4). SMN proteini olmadığı durumlarda ise, snRNP'ler bir araya gelemediği için *splicing* hataları ortaya çıkmakta ve motor aksonların fonksiyonları etkilenmektedir (46). SMN proteininin snRNP biyogenezindeki rolü aydınlatılmış olmasına rağmen, SMA patogenezindeki fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir.



Şekil 2.4. SMN proteininin snRNP biyogenezindeki rolü (36) .

Housekeeping bir protein olan SMN, motor nöronların bütünlüğünü ve motor nöron farklılaşmasını sağlamanın yanı sıra, aksonal taşınmada da önemli bir role sahiptir (46,50). Nörit uzamasında etkili olan β -aktin mRNA'sı ile yapılan çalışmalarda, β -aktin'nin mikrotübüller üzerinden akson uçlarına doğru taşındığı gösterilmiştir (51). SMN protein seviyesinin azaldığı motor nöronlarda ise, bozulan aksonal taşınma sebebiyle akson uçlarındaki β -aktin mRNA seviyesinin azaldığı gözlenmiş olup, SMN'nin akson boyunca β -aktin'i taşımaya yardımcı olduğu bildirilmiştir (51,52) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Motor nöron aksonlarında SMN tarafından β -aktinin taşınması (53) .

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, SMN protein miktarının azalmasına bağlı olarak motor nöron hasarları, aksonal uzama hataları ve aktin hücre iskelet dinamiğinde bozukluklar gösterilmiştir. Azalan SMN proteininin motor nöron dışında; beyin, kalp, bağırsak, karaciğer gibi organları da etkilemesi nedeniyle, SMA multi-sistem bir hastalık olarak adlandırılmakta ve hastalığın moleküler patogenezinin aydınlatılması için çalışmalar devam etmektedir (54,55).

2.3. SMA’da Tanımlanan Genetik Düzenleyiciler

Tek gen hastalıkları, bir gen üzerindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan hastalıklar olup, aynı genotipe sahip bireylerde hastalık seyrinin benzer olması beklenmektedir (56,57). Yapılan çalışmalar sonucunda, tek gen hastalıklarında, hastalar arasında fenotipik çeşitliliğin var olduğu saptanmıştır. Fenotipik çeşitliliğin nedenleri arasında, çevresel faktörlerin yanı sıra fenotipi modifiye edici gen adı verilen genetik düzenleyiciler de yer almaktadır (58,59). Fenotipi modifiye edici genler, hastalığa neden olan gen dışında başka bir bölgede yer alıp; hastalığın penetransını, başlangıç yaşını ve klinik seyrini etkilemektedir (60). Tek gen hastalıklarında fenotipi modifiye edici genlerin belirlenmesi, hastalık patogenezinin anlaşılması ve tedaviye yönelik yaklaşımların geliştirilmesi açısından önemlidir. SMA’da, hastalar aynı gen delesyonu içermesine rağmen, hastalığın klinik seyri hafiften ağıra kadar geniş bir yelpazede değişmektedir. Bugüne kadar SMA’da birden fazla modifiye edici gen tanımlanmıştır (6-8,61,62) :

2.3.1. Plastin 3 (PLS3) Geni

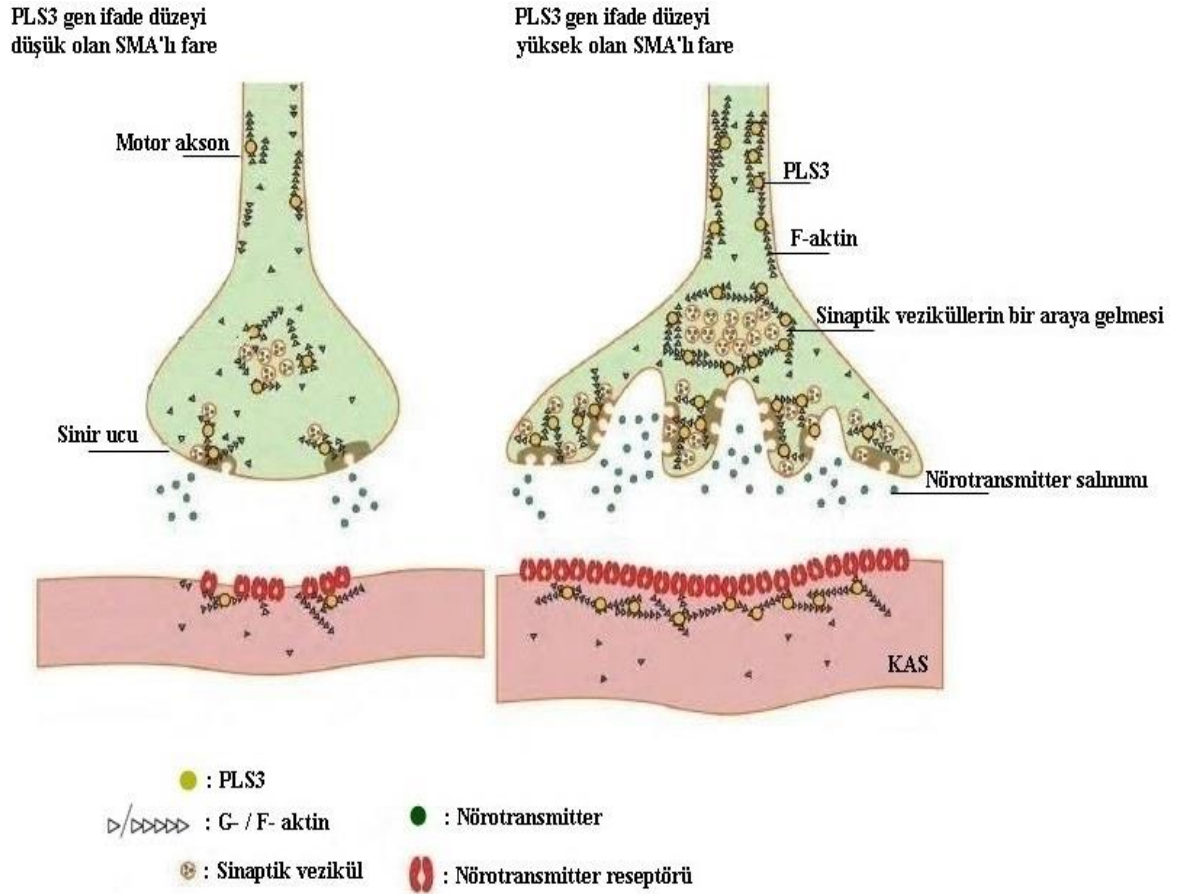
Aktin bağlayıcı proteinler sınıfında yer alan plastin, düşük ökaryotlardan insana kadar korunmuş bir yapıda olup; omurgalılarda L, I ve T-plastin olmak üzere üç farklı izoformu bulunmaktadır. Beyin ve omurilikte yüksek ifadesi bulunan T-plastin, aynı zamanda PLS3 olarak da bilinmektedir. Xq23 bölgesinde haritalanan PLS3 geninden 630 amino asitten oluşan, 70 kD ağırlığında protein

sentezlenmektedir. PLS3 proteini N terminal ucundaki aktin bağlayıcı domainler sayesinde aktin hücre iskelet dinamiğini düzenlemektedir (63,64).

Motor nöron aksonlarında SMN ile beraber yerleşim gösterdiği tespit edilen PLS3'ün SMA hastalığı üzerinde fenotipi modifiye edici rolü olduğu gösterilmiştir (6-8). Farklı gruplar tarafından yapılan araştırmalarda, aynı genotipe sahip semptomatik ve asemptomatik kardeşler incelendiğinde, asemptomatik kız bireylerde PLS3 gen ifadesinin semptomatik kardeşlerine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (6,8). Yapılan bir diğer çalışmada ise, PLS3 gen ifadesinin ergenlik sonrası tip III kız hastalarda yüksek bulunduğu saptanmıştır (7). Sonuçlar, PLS3 geninin cinsiyete ve yaşa bağlı fenotipi modifiye edici bir gen olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir.

PLS3, aktin filamentlerini paketlenerek monomerik yapıda olan globüler (G-aktin) aktinin filamentöz aktine (F-aktin) dönüşümünü sağlamaktadır. Artan F-aktin miktarı sayesinde motor nöron aksonlarında uzama ve dallanma görülmektedir. SMA hücre hatları ve hayvan modellerinde, PLS3 gen ifadesinin artırılması sonucunda nörit boylarının uzadığı ve motor akson hatalarının düzeldiği tespit edilmiştir (6).

PLS3'ün nöronları koruyucu rolünü açıklamak üzere yapılan çalışmada, insan PLS3 cDNA'sını içeren gen ifade vektörünün transfekte edildiği SMA'lı fare ile PLS3 gen ifade düzeyi düşük olan SMA'lı fare karşılaştırılmış ve PLS3'ün motor nöron aksonlarındaki etki mekanizması Şekil 2.6'da gösterilmiştir. PLS3 gen ifade düzeyi yüksek olan SMA'lı farede, nöron uçlarında dallanma, F-aktin miktarı ve sinaptik vezikül sayısı artmaktadır. Böylece, sinir uçlarından daha fazla nörotransmitter salınımı gerçekleşmekte ve kas liflerinin boyutunda artış gözlenmektedir (65) (Şekil 2.6). Bu çalışma ile PLS3'ün nöronlarda koruyucu bir rolü olduğu gösterilmiştir (65).



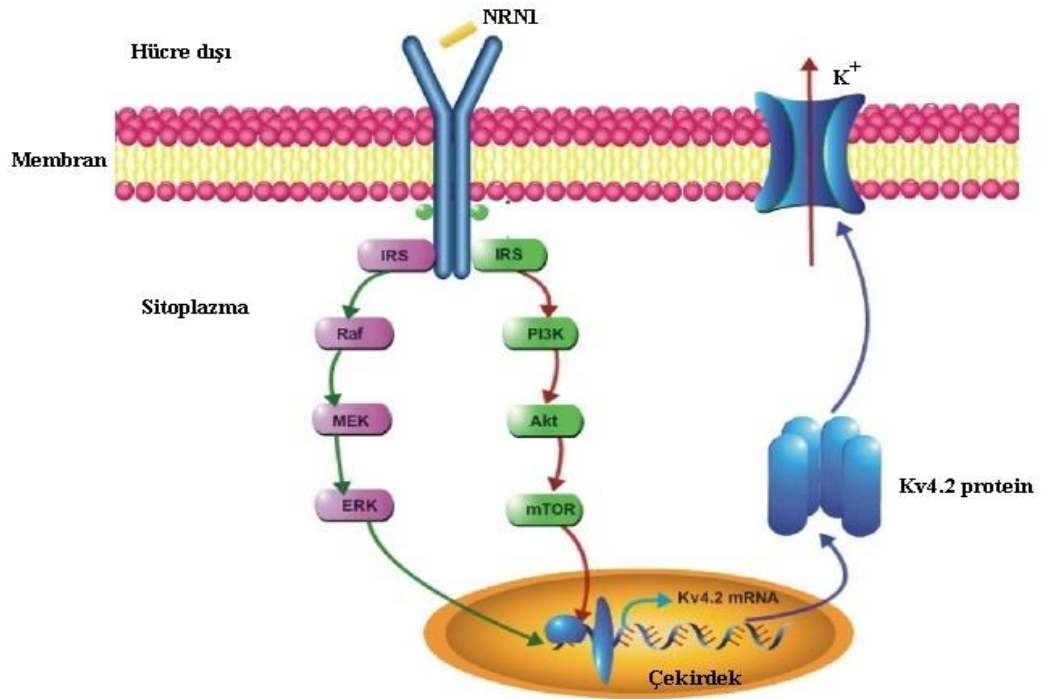
Şekil 2.6. SMA fare modellerinde PLS3'ün nöroprotektif rolü (65).

2.3.2. Nöritin 1 (NRN1) Geni

6p25.1 bölgesinde haritalanan NRN1 geni, beyin ve motor nöronlarda ifade olmakta ve nöronları apoptozdan korumaktadır (66-68). NRN1 proteini, 15 kDa ağırlığında, 142 aminoasitten oluşmakta ve sinaptik olgunlaşmayı, nörit uzamasını, nöron farklılaşmasını, dendritik dallanmayı, aksonal büyüme/gelişme ve yenilenmeyi sağlamaktadır (69-72). NRN1 proteininin N ucunda 27 amino asitlik salgı sinyal peptidi ve C ucunda hücre membranına glikozil- fosfatidilinositol (GPI) çapa yoluyla tutunmayı sağlayan peptidleri içermektedir. Bu sayede, membran proteini ve salgı proteini olarak görev alabilmektedir (73,74). GPI çapa proteinleri kesilerek, NRN1 proteini membrandan salınmaktadır (66,68). Salgılanan formu ise, hücrenin sağ kalımını teşvik etmektedir, ancak NRN1 proteinin hangi formunun hücre içinde daha etkili olduğu henüz bilinmemektedir (68,70).

Aksonlarda NRN1 ile beraber yerleşim gösterdiği bilinen SMN ile ilgili yapılan bir çalışmada, kütle spektrometre ve immün çöktürme analizleri sonucunda, motor nöronlarda, SMN-HuD protein kompleksinin NRN1 mRNA'sı ile etkileştiği, SMN proteininin azalmasına paralel olarak, NRN1 mRNA'sının da azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, insan NRN1 cDNA'sını içeren gen ifade vektörünün SMA'lı zebra balığı embriyosuna transfekte edilmesi sonucunda akson hasarlarının kısmen düzeldiği bildirilmiştir. Bu çalışma, NRN1 geninin SMA fenotipini olumlu yönde etkileyen genetik düzenleyici olabileceğini öne sürmüştür (61); ancak SMA hastalarında NRN1 geninin ifade düzeyi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Nörotrofik bir faktör olan NRN1'in etki mekanizmasını araştırmak üzere yapılan çalışma sonucunda ise, NRN1'in ERK/mTOR sinyal yollarını tetikleyerek, voltaj-kapılı potasyum (K^+) kanalını kodlayan Kv4.2 geninin ifadesini arttırdığı gösterilmiştir. Artan Kv4.2 gen ifadesi, nöron hücre membranından K^+ iyonunun salınımını arttırarak nöronların korunmasına yardımcı olmaktadır (69) (Şekil 2.7). SMA hastalarında yapılan bir çalışma sonucunda, akson membranındaki K^+ iletiminde bozukluk olduğu tespit edilmiş olup, ağır seyirli SMA hastalarında azalan K^+ iletiminin, nörodejenerasyona yol açtığı bildirilmiştir (75). K^+ iyon salınımını tetikleyerek nöronların korunmasına yardımcı olan ve aksonal uzama hatalarını kısmen düzelten NRN1 geninin, SMA fenotipini olumlu yönde etkileyen, genetik düzenleyici olduğu düşünülmektedir.



Şekil 2.7. Nöronlarda NRN1'in ERK/mTOR sinyal yolları üzerinden etki mekanizması (69).

2.3.3. Çinko Parmak Protein (ZPR1) Geni

ZPR1 geninin kodladığı ZPR1, çinko bağlayıcı bir protein olup, sitoplazmada ve çekirdekte bulunmaktadır (76,77). ZPR1 proteininin, Sm ve snRNP kompleksi ile etkileşime girerek *gem* ve *caval body*'lerde SMN ile birlikte yer aldığı bildirilmiştir (42,78).

ZPR1 geni mutasyona uğratılmış olan SMA'lı farede, ZPR1 proteini eksikliğine bağlı olarak SMN proteininde de azalma olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu farelerde yaşam süresinin kısalmasının yanı sıra, ön ve arka bacaklardaki kas güçsüzlüğünün de arttığı bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, ZPR1 protein eksikliğinin motor nöron kayıplarına sebep olduğu ve SMA hastalığının ciddiyetini arttırdığı tespit edilmiştir. ZPR1 geninin yüksek seviyede ifade edilmesi sonucunda ise, SMN proteininin seviyesinin arttığı gösterilmiştir (62).

Bu tez çalışması kapsamında, aynı genotipe sahip farklı klinik seyir gösteren SMA hastaları ile aynı aile içerisinde klinik ciddiyeti farklı olan kardeşlerde, akson uzama hatalarını düzelttiği bilinen PLS3 ve NRN1 genlerinin SMA hastalığı üzerindeki modifiye edici rolleri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda, farklı klinik tanı alan hasta gruplarında PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeyleri belirlenebilecek ve bu genlerin hastalık üzerinde fenotipi modifiye edici etkiye sahip olup olmadığı gösterilecektir.

3. BİREYLER ve YÖNTEM

3.1. Bireyler

Çalışma grubunu Hacettepe İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Çocuk Nöroloji Ünitesi ve Hacettepe Erişkin Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran 2 SMA tip I (H7, H11), 2 SMA tip II (H6, H10) ve 7 SMA tip III olmak üzere toplam 11 SMA hastası oluşturmuştur. Hastalarda, SMN1 geni 7. ve 8. ekzonlarda homozigot delesyonlar saptanmıştır.

Hastaların yanı sıra, farklı klinik seyre sahip birden fazla hasta kardeş içeren aileler de çalışma grubuna dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan 3 ailede yer alan hasta kardeşlerde SMN1 geni 7. ve 8. ekzonlarda homozigot delesyonlar saptanmıştır. 1 ailede yer alan üç hasta kardeşte ise, SMN1 geninde sadece 7. ekzonda homozigot delesyon tespit edilirken, 8. ekzonda delesyon görülmemiştir. Kontrol grubu olarak ise, herhangi bir hastalık öyküsü bulunmayan 5 birey seçilmiştir.

Tez çalışması hasta ve kontrol bireylerden “Bilgilendirilmiş Onam Formu” ve Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı alınarak (28.12.2012 tarihli LUT 12/138-20 karar no) gerçekleştirilmiştir.

3.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

3.2.1. Total Kandan RNA İzolasyonu

Total kandan RNA izolasyonu *PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen)* kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kit içerisinde; BR1 süspansiyon tamponu, guanidin tiyosiyanat içeren BR2 bağlama tamponu, guanidin tiyosiyanat ve etanol içeren BR3 yıkama tamponu, BR4 yıkama tamponu, BR5 elüsyon tamponu, RDD tamponu, 1500 Kunitz ünite DNaz I, Proteinaz K solüsyonu ve RNaz içermeyen distile su bulunmaktadır.

3.2.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi *QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen)* kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kit içerisinde; *Reverse Transcriptase* tampon 5X, *Reverse Transcriptase*, *Genomic DNA wipe out* tampon 7X, RT primer karışımı, RNaz içermeyen distile su bulunmaktadır.

3.2.3. cDNA Amplifikasyonunun PZR ile Kontrolü

cDNA sentezinin kontrolü için TATA Bağlanma Proteini (TBP) primerleri kullanılarak, PZR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Taq DNA polimeraz (Fermantas) (5u/μl)

Taq DNA Polimeraz Tamponu, 10X (NH₄)₂SO₄ (Fermantas)

MgCl₂ (Fermantas) (25 mM)

Deoksiribonükleosid trifosfat (dNTP) (Fermantas) (2.5 mM dATP, 2.5 mM dCTP, 2.5 mM dGTP, 2.5 mM dTTP)

TBP geni için primer dizileri:

TBP-F: 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'

TBP-R: 5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Prona)	:	Moleküler biyoloji kullanımı saflığında	
Tris-asetat tamponu (TAE) (pH: 8.0)	:	Tris baz (Merck)	2 M
		Glasiyal asetik asit (Merck)	1.14 ml
		Na ₂ EDTA (Merck)	0.5 M
Yükleme tamponu	:	Gliserol (Merck)	5.5 ml
		1X TAE tamponu	4.5 ml
		Orange G boya (Merck)	0.01gr
Etidyum bromür (Sigma)	:	10 mg/ ml distile su	
Moleküler ağırlık belirleyicisi	:	<i>Gene Ruler 50 bp DNA Ladder</i> (Fermantas)	

3.2.5. Gerçek Zamanlı (*Real-Time*) PZR

IQ SYBR Green karışımı (Bio-Rad) kullanılarak gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi.

IQ SYBR Green karışımı içerisinde; 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH:8.4 0,4 mM dATP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dGTP, 0,4 mM dTTP, 50 u/ml Taq

Polimeraz, 6 mM MgCl₂, SYBR Green I boyası, 20 nM floresein ve stabilizatörler bulunmaktadır.

PLS3 geni için primer dizileri:

PLS3-F : 5'-GAACGTTGAGTGAAGCTGGA-3'

PLS3-R : 5'-TTGCCACTCTTCACAAGGTC-3'

NRN1 geni için primer dizileri:

NRN1-F : 5'-GCTTTTCGGACTGTTTGCTC-3'

NRN1-R : 5'-CTGCCTTGGATGTTGAGGTT-3'

PPIB geni için primer dizileri:

PPIB-F : 5'-CTTAGCTACAGGAGAGAAAGGA-3'

PPIB-R : 5'-GCCTGCGTTGGCCATGCTC-3'

3.3. Yöntemler

3.3.1. Total Kandan RNA İzolasyonu

RNA yıkımını engelleyen solüsyon içeren *PAXgene* kan toplama tüplerine 2.5 ml kan alındı. RNA izolasyonu ve saflaştırılması, içinde silika jel membran bulunan

spin kolon yardımıyla *PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen)* kullanılarak gerçekleştirildi.

1. Kan hücrelerinin patlaması için, kan örnekleri en az 2 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra, *PAXgene Blood RNA* tüpü, 20 dk 3850 g'de santrifüj ile çöktürüldü.

2. Süpernatant atılarak, 4 ml RNaz içermeyen su çökelti üzerine eklendi ve çökelti çözünene kadar vorteks ile karıştırıldı. 20 dk 3850 g'de santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılarak, çökelti üzerine 350 µl BR1 süspansiyon tamponu eklendi ve çökelti çözünene kadar vorteks ile karıştırıldı.

3. Örnek 1.5 ml'lik *ependorf* tüpüne alındı ve 300 µl BR2 bağlama tamponu ve 40 µl Proteinaz K ayrı ayrı eklenerek, vorteks ile karıştırıldı. 20 dk, hibridizasyon fırınında 400 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında, 2 ml'lik tüpün içine yerleştirilmiş *PAXgene Shedder spin kolon* içine lizat eklendi ve 4 dk 15000 g'de santrifüj ile çöktürüldü.

4. Çöktürme sonrası çökeltiye zarar verilmeden, süpernatant 1.5 ml'lik *ependorf* tüpüne alındı ve üzerine %100'lük 300 µl etanol eklenerek, vorteks ile karıştırıldı.

5. 700 µl'lik örnek *PAXgene spin kolona* alındı ve 2 dk 15000 g'de santrifüj ile çöktürüldü.

6. 350 µl BR3 yıkama tamponu spin kolona eklendi, 2 dk 15000 g'de santrifüj ile çöktürüldü.

7. 10 µl Dnaz I stok solüsyonu ve 70 µl RDD karışımı 1,5 ml'lik *ependorf* tüpüne hazırlandı ve tüpün altına hafifçe vurarak karıştırıldı. Hazırlanan 80 µl Dnaz I inkübasyon karışımı direk kolon membrana eklenerek, oda sıcaklığında 15 dk bekletildi.

8. 350 µl BR3 yıkama tampon kolona eklendi ve 2 dk 15000 g'de santrifüj ile çöktürüldü.

9. 4 volüm etanol ile karıştırılarak toplam 500 µl BR4 yıkama tamponu kolona eklendi ve 2 dk 15000 g'de santrifüj ile çöktürüldü. İkinci kez, 500 µl BR4 yıkama tampon kolona eklendi ve 4 dk 15000 g'de santrifüj ile çöktürüldü.

10. Spin kolon yeni 2 ml'lik tüpe alınarak, 2 dk 15000 g'de santrifüj ile çöktürüldü.

11. Tüpü atarak kolon 1.5 ml'lik *ependorf* tüpüne yerleştirildi ve 40 µl BR5 elüsyon tamponu direk kolon membran üzerine aktararak, 2 dk 15000 g'de santrifüj ile çöktürüldü. Aynı tüp kullanılarak, 40 µl BR5 elüsyon tamponu eklendi ve 2 dk 15000 g'de santrifüj ile çöktürüldü.

12. Örnekler -80 °C'de saklandı.

3.3.2. RNA Derişimlerinin Ölçümü

RNA derişimleri ve saflıkları spektrofotometre (*NanoDrop ND-1000*) ile belirlendi. RNA'ların derişimleri ng/µl olarak ölçüldü. RNA saflığını belirten optik dansite 260/280 oranının 1.9- 2.2 arasında olması RNA'nın saflığını göstermektedir (79) . RNA'lar -80 °C'de saklandı.

3.3.3. cDNA sentezi

mRNA'lar tek zincirli olmaları nedeniyle dayanıksız olup; gen ifade analizi çalışmalarında kullanılmak üzere cDNA haline dönüştürülmeleri gerekmektedir.

cDNA sentezi, uygun tampon, reverse transkriptaz enzimi, random primer ile oligo(dT) karşımı yardımıyla *Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen)* kullanılarak gerçekleştirildi.

RNA'lar, son hacim 12 µl olacak şekilde sulandırıldıktan sonra genomik DNA'yı uzaklaştırmak için 2 µl *gDNA wipeout* solüsyonu eklenerek, 42 °C'de 5 dk denatüre edildi. Denatürasyon sonrasında, 1 µl RT primer karışımı, 1 µl reverse transkriptaz ve 4 µl RT tamponu eklenerek, 20 µl hacminde örnek elde edildi. 42°C'de 30 dk ve 95 °C'de 5 dk inkübe edilerek cDNA sentezi tamamlandı. cDNA'lar -20 °C'de saklandı.

3.3.4. cDNA Amplifikasyonunun PZR ile Kontrolü

cDNA sentezinin kontrolü için TBP primerleri kullanılarak, PZR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Reaksiyonda, 10X tampon, 400 nM primer, 2.5 mM dNTP, 0,25 mM MgCl₂, 0,125 µl Taq DNA polimeraz son hacim 12,5 µl olacak şekilde kullanıldı.

Reaksiyon Koşulları:

94 °C'de 2 dk

94 °C'de 30 sn

60 °C'de 20 sn

72 °C'de 45 sn

72 °C'de 2 dk

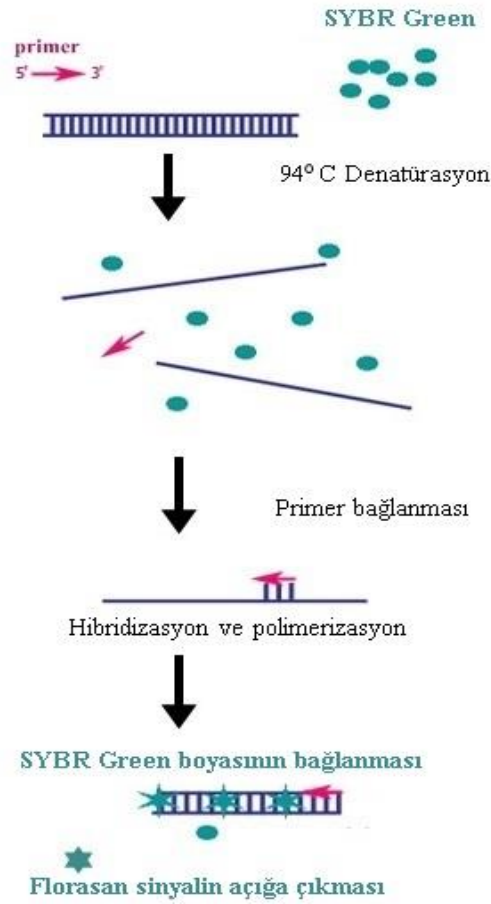
30 döngü

PZR ürünü, %3'lük agaroz jel elektroforezi ile ultraviyole ışık (UV) altında kontrol edildi.

3.3.5. Gerçek Zamanlı (*Real-Time*) PZR

Gerçek zamanlı PZR, hedef genlerdeki göreceli kat artışlarının floresan boya kullanılarak belirlenmesini sağlayan hassas bir yöntemdir.

Gerçek zamanlı PZR yönteminde kantitasyon, reaksiyon sırasında oluşan ürüne bağlanan floresan boya ile doğru orantılı olarak artan floresan ışımının ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Deney sisteminde kullanılan *SYBR Green* boyası, tek zincirli DNA yerine, çift zincirli DNA ürününe bağlanarak floresan ışımaya yaymaktadır. Reaksiyon döngüsü boyunca, artan ürüne paralel olarak floresan ışım miktarı da artmakta ve amplifikasyon eş zamanlı olarak bilgisayar ekranından takip edilebilmektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. SYBR Green Çalışma Prensibi.

Gerçek zamanlı PZR yönteminde, reaksiyona giren kalıp cDNA miktarı ne kadar fazla ise, ilk floresan sinyalinin alındığı döngü sayısı o kadar düşük olmaktadır. Üründeki ilk anlamlı artışı belirten *threshold cycle* (eşik döngü değeri, Ct) olarak tanımlanan bu nokta amplifikasyonunun logaritmik fazda oluştuğunu göstermektedir.

Reaksiyon sırasında oluşan amplifikasyon ürünlerinin özgüllüğü erime eğrisi grafiğinden analiz edilmektedir. Tüm örneklerin özgül bir Tm derecesinde tepe noktası vermesi gerekmektedir. Amplifikasyon etkinliğinin belirlenmesi için, standart bir örnekten seri dilüsyonlar hazırlanarak standart eğri çizilmektedir. Standart eğrinin R^2 değeri (korelasyon kat sayısı) deneysel datanın regresyon eğrisine uygunluğunu, replikalar arası farkı ifade etmektedir. Optimal değeri 0.99 ile 1.0 arasında olmalıdır. Bir döngü tamamlandığında PZR ürün miktarının iki kat

artması amplifikasyon etkinliği olarak tanımlanmaktadır. Gerçek zamanlı PZR analizlerinde, amplifikasyon etkinliği % 90 ile % 110 değerleri arasında olması beklenmektedir. Standart eğri eğiminin (*slope*) reaksiyon etkinliği ile de doğru orantılı olduğu bilinmekte ve bu eğimin -3.6 ile -3.1 arasında olması gerekmektedir (80) .

Çalışmamızda gerçek zamanlı PZR deneyleri, 96 kuyucuklu mikrolaplarda 12,5 µl *SYBR Green* karışımı, 400 nM primer çifti ve 100 - 127 ng cDNA kullanılarak 25 µl'de gerçekleştirildi. Örnekler üçlü tekrarlar şeklinde amplifiye edildi. Kantitatif analiz için, *housekeeping* gen olarak kanda ifade düzeyi değişmeyen bir gen olan Peptidil Prolil *Cis-Trans* İzomeraz B (*PPIB*, siklofilin B) kullanıldı (81).

25 µl *Real-Time* PZR reaksiyonu *BioRad IQ5 Real-time PCR* cihazı ile aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

95 °C'de 10 dk		
95 °C'de 15 sn	}	45 döngü
62 °C'de 30 sn		
72 °C'de 30 sn		
95 °C'de 1 dk		

Çalışmamızda, hedef genin miktarındaki değişim, örneklere ait replikaların ortalama Ct değerleri alınarak, *PPIB housekeeping* genine göre normalize edildi. Sonuçlar, kontrol örnekler ile karşılaştırılarak, *comparative Ct* yöntemi olarak da bilinen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemine göre hesaplandı.

3.3.6. İstatistiksel Analizler

Hastalarda saptanan PLS3 kat artışlarının ortalaması alınarak kontrollerle karşılaştırıldı. Sonuçlar, Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. Aynı analizler, NRN1 geni için de gerçekleştirildi. P değeri 0.05 ve altında olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Grafiklerdeki hata çubukları ortalama standart hata ($\pm$ OSH) değerini göstermektedir.

4. BULGULAR

4.1. Elde Edilen RNA Örneklerinin Derişimleri ve Saflıkları

Total kandan izole edilen RNA örneklerinin derişim ve saflıkları spektrofotometre (*Thermo Scientific NanoDrop® ND-1000*) ile ölçülmüş ve Tablo 4.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. RNA örneklerinin derişim ve saflık değerleri

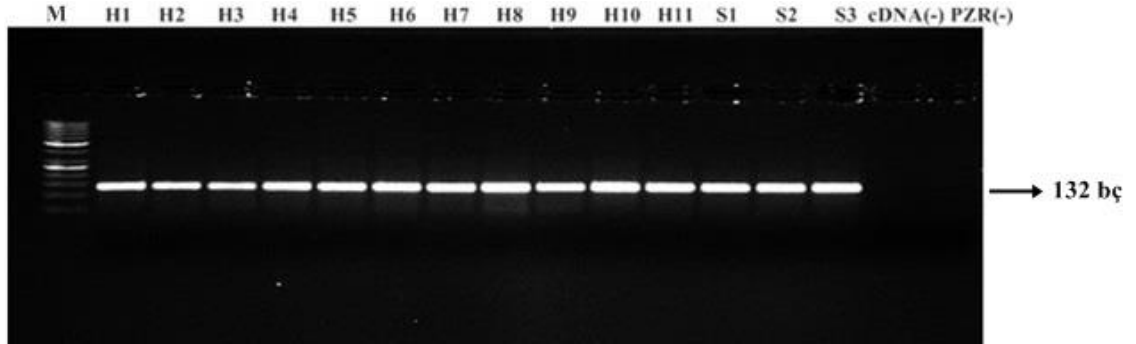
Örnekler	Derişim (ng/μl)	RNA Saflığı (260/280)
S1	129,3	2,14
S2	109,2	2,09
S3	111,1	2,08
S4	84,7	2,18
S5	75,2	2,10
S6	67,5	2,12
H1	139,2	2,16
H2	129,0	2,14
H3	138,0	2,08
H4	112,2	2,10
H5	103,0	2,06
H6	81,1	2,11
H7	122,1	2,11

H8	61,4	2,05
H9	63,7	2,18
H10	98,3	2,00
H11	117,5	2,05
A1-H1	116,3	2,01
A1-H2	125,4	2,02
A2-H1	130,7	2,05
A2-H2	82,1	2,06
A2-H3	57,9	2,13
A3-H1	102,5	2,10
A3-H2	86,9	2,11
A4-H1	123,1	2,05
A4-H2	104,7	2,08

S: Kontrol, H: Hasta, A: Aile

4.2. cDNA Amplifikasyonunun PZR ile Kontrolü

cDNA amplifikasyonunun kontrolü *TBP* PZR ile gerçekleştirilmiş ve örnek fotoğraf Şekil 4.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. cDNA amplifikasyonu kontrolüne ait örnek jel fotoğrafı

(1 µg RNA'dan cDNA sentezlenmiştir.)

(**M** : 50 baz çifti (bç) moleküler ağırlık belirleyicisi, **cDNA(-)** : cDNA sentez reaksiyonunda nükleik asit kontaminasyonu olmadığını kontrol etmek için RNA eklenmeyen örnek, **PZR(-)** : PZR reaksiyonunda DNA kontaminasyonu olmadığını kontrol etmek için cDNA eklenmeyen örnek)

4.3. Gerçek Zamanlı (*Real-Time*) PZR Analizi

4.3.1. PLS3 ve NRN1 Genlerinin İfade Analizi

cDNA amplifikasyonu hedef genlere ait primerler ve *SYBR Green* boyası kullanılarak *BioRad IQ5 Real-time PCR* cihazı ile gerçekleştirilmiştir. *PLS3* ve *NRN1* Ct değerinin 30, *PPIB* Ct değerinin ise 20 olduğu saptanmıştır. Standart eğriden elde edilen eğim *PLS3* ve *PPIB* genleri için -3.5, *NRN1* için -3.3 olarak hesaplanmıştır. R^2 değerinin ise, tüm genler için 0.99 olduğu belirlenmiştir. *PLS3* geninin amplifikasyon etkinliğinin % 92, *NRN1* geninin % 101.1, *PPIB* geninin ise %90.1 olarak hesaplanmıştır. Amplifikasyon ürünlerinin özgülüğü %3'lük agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. (*PLS3* : 138 bç , *NRN1* : 208 bç ve *PPIB*: 199 bç) *PLS3*, *NRN1* ve *PPIB* genlerine ait *Real-Time* PZR amplifikasyon eğrisi, standart eğrisi, erime eğrisi ve amplifikasyon ürününün agaroz jeldeki görünümü için bkz. Ek 1-3.

PLS3 ve NRN1 genleri PPIB genine göre normalize edilmiştir ve saptanan kat artışları Tablo 4.2 ile Şekil 4.2' de gösterilmiştir.

Çalışma grubunu oluşturan tip I, II, III SMA hastalarının PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeyleri hastalık teşhis yaşına ve hastaların klinik bulgularına göre sınıflandırılmıştır. Pediatrik hasta grubunda yer alan ve teşhis yaşları birbirine yakın olan (< 4 yaş) tip III kız hastalarından H6 ve H8 no'lu hastalardaki PLS3 gen ifade düzeyleri 3.5 ve 3.6 kat iken, NRN1 gen ifade düzeylerinin 0.7 ve 0.3 kat olduğu hesaplanmıştır. H6 no'lu hasta hafif bir tip II/ ağır bir tip III olarak değerlendirilmekte olup, yürüme yetisi bulunmamaktadır. H8 no'lu hasta ise, desteksiz olarak ayakta durabilmekte ancak adım atmakta zorlanmaktadır. Erkek tip III hastalarından pediatrik grupta yer alan H1'de PLS3 ve NRN1 gen ifadesinin olmadığı (0.3 kat) belirlenmiştir. Hastalık belirtileri 17 yaşında ortaya çıkan H5 no'lu hasta ile teşhis yaşı 13 olan H9 no'lu hastanın klinik belirtileri birbirine benzemektedir. Desteksiz yürüyen H5 ve H9 no'lu erkek hastaların, kas kuvvetsizlik derecelerinin de birbirine yakın olduğu saptanmıştır. H5 no'lu hastada PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeyleri 1.6 kat olarak hesaplanırken, H9 no'lu hastada PLS3 gen ifade düzeyinin 1.6 kat, NRN1 gen ifade düzeyinin ise 0.9 kat olduğu tespit edilmiştir. Tip III SMA tanısı alan ve teşhis yaşları birbirine benzer olan (> 14 yaş) H2, H3 ve H4 no'lu hastaların klinik özelliklerinin birbirine yakın olduğu saptanmıştır. Desteksiz olarak yürüyen bu hastaların PLS3 gen ifade düzeylerinin yaklaşık olarak 0.5 kat olduğu belirlenmiştir. NRN1 gen ifade düzeyinin H2 no'lu erkek hastada 1.1 kat olduğu hesaplanırken, H3 no'lu kız hastada 0.8 kat olduğu saptanmıştır. H4 no'lu erkek hastada ise NRN1 gen ifadesinin olmadığı (0.3 kat) belirlenmiştir.

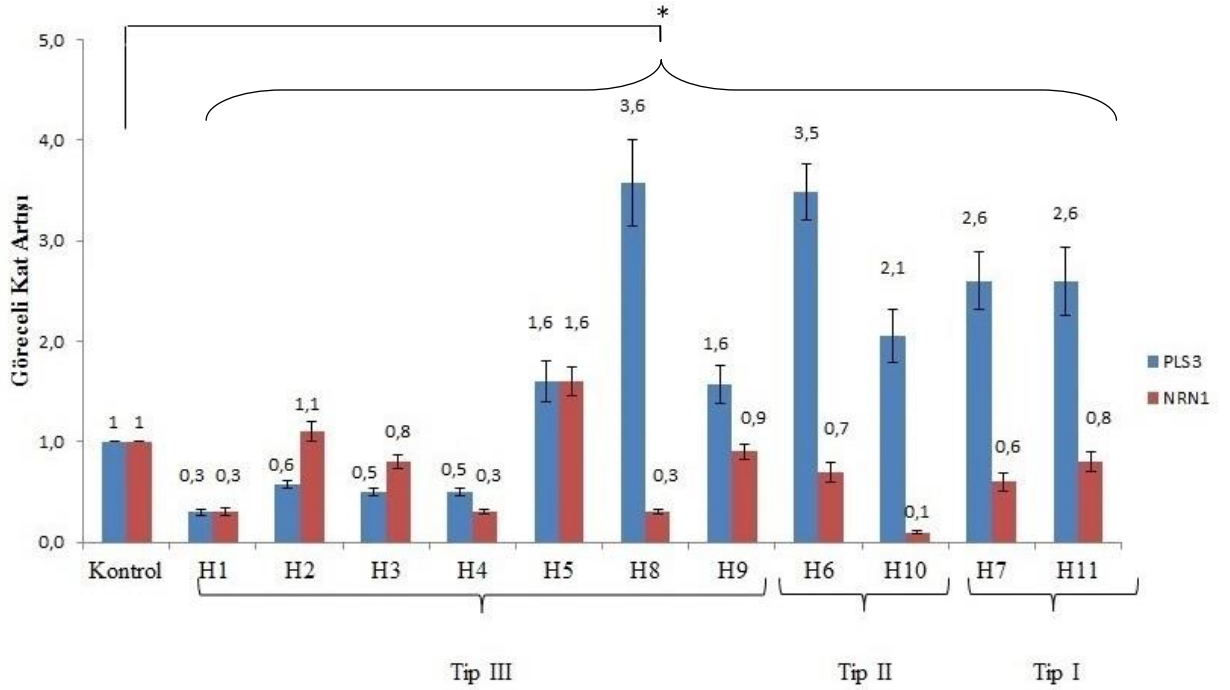
Tip II tanısı alan ve yürüme yetisi olmayan H10 no'lu erkek hastada PLS3 gen ifadesindeki kat artışının 2.1 kat olduğu saptanırken, NRN1 gen ifadesinin olmadığı (0.1 kat) belirlenmiştir.

Tip I hastalarında (H7 ve H11) PLS3 gen ifade düzeyinin her iki erkek hastada da 2.6 kat olduğu gösterilmiştir. NRN1 gen ifade düzeyinin H7'de 0.6 kat olduğu hesaplanırken, H11'de ise 0.8 kat olarak saptanmıştır (Tablo 4.2) (Şekil 4.2).

Tablo 4.2. Hastaların klinik özellikleri, PLS3 ve NRN1 kat artış değerleri

Hasta No	Hastanın Yaşı (ay/yıl)	Cinsiyet	SMA Tip	Teşhis Yaşı (ay/yıl)	Desteksiz Yürüyebilme	PLS3 Kat Artışı	NRN1 Kat Artışı
H1	15 yıl	E	III	4 yıl	Evet	0.3	0.3
H2	21 yıl	E	III	15 yıl	Evet	0.6	1.1
H3	32 yıl	K	III	23 yıl	Evet	0.5	0.8
H4	21 yıl	E	III	15 yıl	Evet	0.5	0.3
H5	19 yıl	E	III	17 yıl	Evet	1.6	1.6
H8	5 yıl	K	III	4 yıl	Hayır	3.6	0.3
H9	18 yıl	E	III	13 yıl	Evet	1.6	0.9
H6	3 yıl	K	II/ III	3 yıl	Hayır	3.5	0.7
H10	3 yıl	E	II	2 yıl	Hayır	2.1	0.1
H7	10 ay	E	I	4 ay	Hayır	2.6	0.6
H11	4 ay	E	I	1 ay	Hayır	2.6	0.8

E: Erkek, K: Kız



Şekil 4.2. SMA I, II ve III hastalarında saptanan PLS3 ve NRN1 kat artışları (Hata çubukları: $\pm$ OSH)

* : 11 hastada saptanan ortalama kat artışının kontrol ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir, $p = 0.01$.

11 hastanın (H1- H11) PLS3 ve NRN1 kat artışlarının ortalaması kontrol ile karşılaştırılmış ve bu ortalama kat artışının istatistiksel olarak anlamlılığı Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiştir. 11 hastanın ortalama kat artışı kontrol ile karşılaştırıldığında, hastalarda saptanan ortalama kat artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p = 0.01$) tespit edilmiştir.

Çalışma grubuna hastaların yanı sıra, aynı aile içinde klinik seyirleri farklı olan SMA'lı kardeşler de dâhil edilmiştir. 4 ailede yer alan hasta kardeşlerdeki PLS3 ve NRN1 genlerinin ifade değişimi analiz edilmiş ve saptanan kat artışları Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

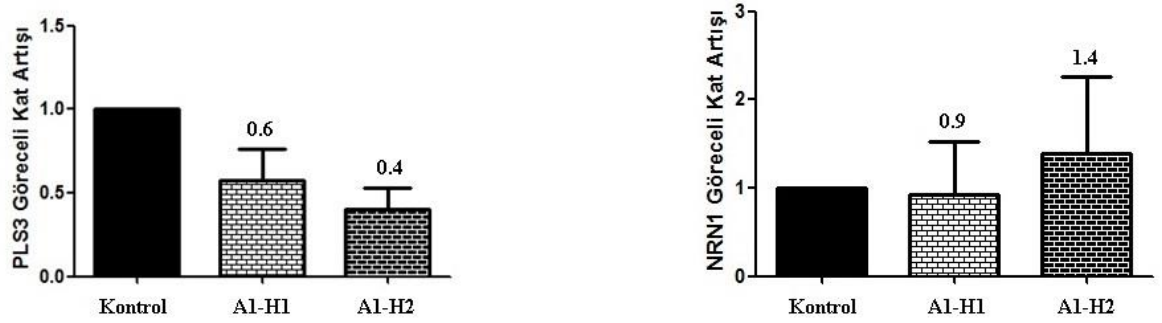
Tablo 4.3. SMA'lı hasta kardeşlerin klinik özellikleri, PLS3 ve NRN1 kat artış değerleri

Hasta No	Aile No	Hastanın Yaşı (ay/yıl)	Cinsiyet	SMA Tip	Teşhis Yaşı (ay/yıl)	Desteksiz Yürüyebilme	PLS3 Kat Artışı	NRN1 Kat Artışı
A1-H1	1	11 yıl	E	III	21 ay	Hayır	0.6	0.9
A1-H2	1	16 yıl	K	III	14 yıl	Evet	0.4	1.4
A2-H1	2	12 yıl	E	?	10 yıl	Evet	1.5	0.3
A2-H2	2	24 yıl	E	III	10 yıl	Hayır	1.1	1.7
A2-H3	2	19 yıl	E	III	17 yıl	Evet	1.8	2.7
A3-H1	3	16 yıl	E	III	15 yıl	Evet	1.2	0.5
A3-H2	3	9 yıl	E	III	8 yıl	Evet	1.0	0.1
A4-H1	4	13 yıl	E	III	13 yıl	Evet	0.8	1.3
A4-H2	4	10 yıl	K	II	10 yıl	Hayır	1.7	1.4

E: Erkek, K: Kız

Çalışma grubunda yer alan 1. ailedeki, tip III SMA tanısı alan kardeşlerde, H1 no'lu erkek hastada hastalık başlangıç yaşı 21 ay iken, H2 no'lu kız hastada hastalık 14 yaşında ortaya çıkmıştır. Hastalığın erken belirti verdiği H1, tekerlekli sandalye ile hayatına devam etmekte iken, H2 desteksiz olarak yürüyebilmektedir. Bu kardeşlerde gözlenen PLS3 gen ifade düzeylerinin birbirine yakın olduğu (0.6 ve 0.4 kat) saptanırken, NRN1 gen ifade düzeylerinin ise, H1 no'lu hastada 0.9 kat, H2 no'lu hastada 1.4 kat arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3).

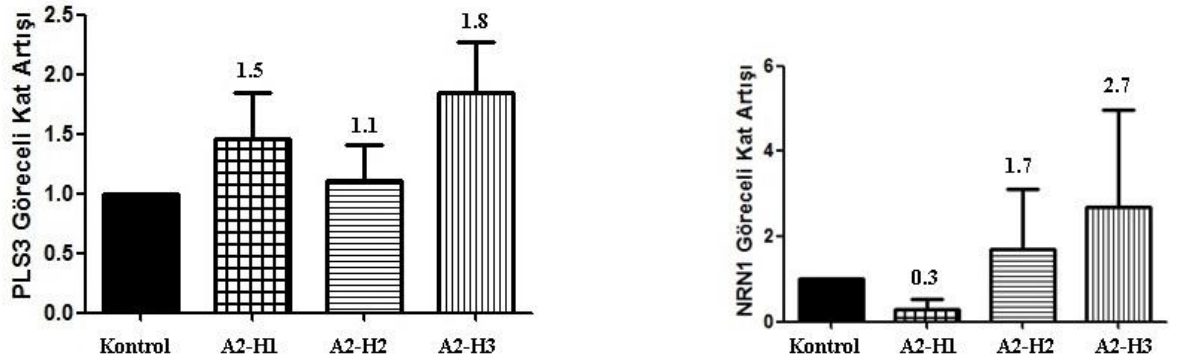
1. Aile



Şekil 4.3. 1. Aile'deki hasta kardeşlerde saptanan PLS3 ve NRN1 kat artış değerleri (Hata çubukları: + OSH)

2. ailede yer alan, 3 SMA'lı erkek kardeşden, 10 yaşında SMA tanısı almış olan H2, tekerlekli sandalyede hayatına devam etmektedir. PLS3 gen ifade seviyesindeki kat artışının 1.1 kat olduğu gösterilirken, NRN1 gen ifade seviyesindeki artışın 1.7 kat olduğu saptanmıştır. Hastalık semptomları 17 yaşında ortaya çıkan ve desteksiz olarak yürüyebilen H3'te ise, PLS3 gen ifade seviyesi 1.8 kat olarak hesaplanırken, NRN1 gen ifade seviyesinin 2.7 kat olduğu gösterilmiştir. Hastalık seyri H3 hastasına göre daha ağır olan H1'de, PLS3 gen ifade seviyesindeki artışın 1.5 kat olduğu tespit edilirken, NRN1 gen ifadesinin olmadığı (0.3 kat) belirlenmiştir (Şekil 4.4).

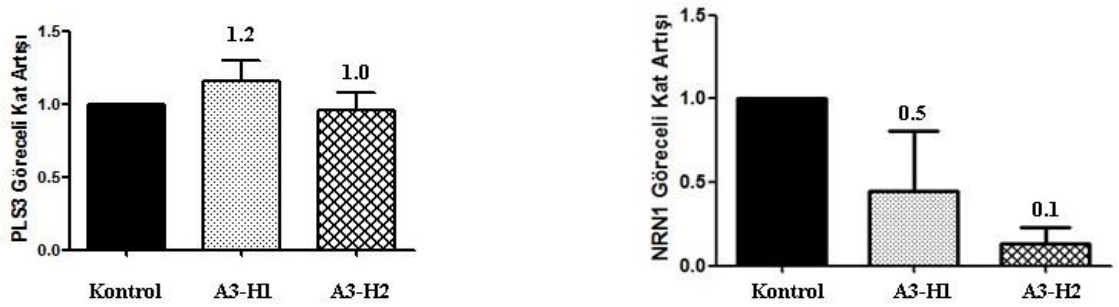
2. Aile



Şekil 4.4. 2. Aile'deki hasta kardeşlerde saptanan PLS3 ve NRN1 kat artış değerleri (Hata çubukları: + OSH)

3. ailede aynı klinik bulgulara sahip olan iki erkek kardeş, tip III SMA tanısı almıştır. H1 ve H2 no'lu SMA'lı kardeşlerin PLS3 gen ifade düzeylerinin birbirine yakın olduğu (1.2 ve 1.0 kat) belirlenirken, NRN1 gen ifadesinin ise her iki kardeşte de olmadığı (< 0.5 kat) tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

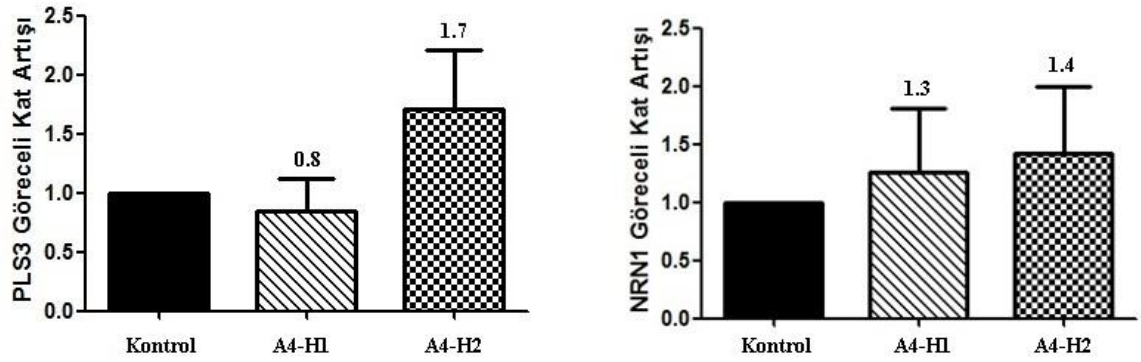
3. Aile



Şekil 4.5. 3. Aile'deki hasta kardeşlerde saptanan PLS3 ve NRN1 kat artış değerleri (Hata çubukları: + OSH)

Aile 4’de, tip III SMA tanısı alan H1 no’lu erkek hasta, desteksiz yürüyebilmekte iken, tip II tanısı alan H2 no’lu kız kardeşi, hayatına tekerlekli sandalye ile devam etmektedir. H1 no’lu hastada PLS3 gen ifade düzeyinin 0.8 kat olduğu, H2 no’lu hastada ise PLS3 gen ifade düzeyinin 1.7 kat olduğu hesaplanmıştır. Kardeşlerde gözlenen NRN1 gen ifade düzeylerinin ~1.3 kat olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).

4. Aile



Şekil 4.6. 4. Aile’deki hasta kardeşlerde saptanan PLS3 ve NRN1 kat artış değerleri (Hata çubukları: + OSH)

5. TARTIŞMA

Hastalıktan sorumlu olan gendeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan tek gen hastalıklarında, aynı genotipe sahip hastaların, hastalık şiddetlerinin benzer olması beklenmektedir. Hastalar arasında görülen fenotipik çeşitlilik genotip- fenotip korelasyonunun kurulmasını zorlaştırmaktadır (56,57). Fenotipik çeşitliliğin başlıca nedenleri arasında genetik düzenleyiciler yer almaktadır. Bugüne kadar tek gen hastalıklarında gözlenen fenotipik farklılıkları açıklamak üzere genetik düzenleyiciler hakkında pek çok araştırma yapılmıştır (59). Aynı genotipe sahip olmasına rağmen, farklı fenotipik özelliklerin tespit edildiği hastalıkların başında SMA gelmektedir. Çocukluk çağı ölümcül hastalıklar arasında ilk sırada yer alan SMA’da, hastaların % 95 - 98’inde SMN1 geni 7. ve 8. ekzonlarda homozigot delesyon görülmektedir (2,19). Aynı delesyona sahip olmalarına rağmen hastaların klinik ciddiyetlerinin farklı olduğu saptanmıştır. SMA’da bugüne kadar tespit edilen PLS3 ve NRN1 isimli genetik düzenleyicilerin, azalan SMN seviyesini kompanse ederek akson uzama hatalarını düzelttiği gösterilmiştir (6-8,61).

Akraba evliliklerinin sık görüldüğü ülkemizde, aynı delesyonu içermesine rağmen, hastalık ciddiyetleri farklı olan birden fazla kardeş içeren aileler bulunmaktadır. Bu nedenle, fenotipik farklılıkları açıklamak üzere, PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeylerinin araştırılması gerekmektedir. Daha önce farklı araştırmacılar tarafından SMA’da modifiye edici özelliği tanımlanan PLS3 geni hakkında Türkiye’de bir çalışma yapılmamıştır. NRN1 geninin ifade düzeyi ise, ilk defa bu tez kapsamında araştırılmıştır.

Çalışma grubunu, aynı genotipe sahip farklı klinik tip ve yaştaki 11 SMA hastası ile hastalık ciddiyeti farklı olan kardeşler içeren 4 SMA ailesi oluşturmuştur. Tez çalışması kapsamında, PLS3 ve NRN1 genlerinin ifade düzeyleri ile SMA fenotipi arasındaki ilişki araştırılmıştır.

SMN1 gen delesyonu içeren 11 SMA hastası teşhis yaşı ve klinik bulgularına göre : pediatrik tip III (H1, H6, H8), erişkin tip III (H2, H3, H4, H5, H9), tip II (H10) ve tip I (H7, H11) olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır.

H1, H6 ve H8 no'lu hastalar, Pediatrik Nöroloji Ünitesi'nde tip III tanısı almış olup, aynı grup içerisinde değerlendirilmiştir. H8 no'lu hasta ile hafif tip II/ ağır tip III olarak değerlendirilen H6 no'lu hastanın, teşhis yaşlarının yakın olduğu (3-4 yaş) bilinmektedir. Benzer klinik bulgu gösteren bu iki hastada, PLS3 gen ifade düzeylerinin birbirine yakın (3.5 ve 3.6 kat) olduğu gösterilmiştir. NRN1 geninin ise, fenotipi modifiye edici bir rolünün olmadığı belirlenmiştir. H6 ve H8 no'lu hastalarla aynı grupta yer almasına rağmen, bu iki hastaya göre daha hafif klinik bulgulara sahip olan H1 no'lu hasta, bağımsız olarak yürüyebilmekte ancak yerden desteksiz kalkmamaktadır. Beklenilenin aksine, H1'de PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeylerinin H6 ve H8'e göre düşük olduğu saptanmış olup, bu hastanın fenotipini başka genlerin etkileyebileceği düşünülmektedir.

2008 yılında, Oprea ve diğ. (6) tarafından 6 SMA ailesi ile yapılan çalışmada, 8 asemptomatik kız bireyde gözlenen PLS3 gen ifadesinin hasta kardeşlerine göre yüksek olduğu belirlenmiş olup, PLS3 geninin hastalık şiddetini hafifletici bir etkisinin olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, toplam 101 SMA hastasında kan dokusunda PLS3 gen ifade düzeyi araştırılmış ve PLS3 gen ifade düzeyinin yüksek olduğu saptanan 6 kız hastada, hastalık seyrinin hafif olduğu gözlenmiştir. PLS3 geninin kızlardaki nöroprotektif etkisinin hormonal etkileşimlerden kaynaklabileceği düşünülmektedir. Literatür ile uyumlu bir şekilde, çalışma grubumuzda yer alan, teşhis yaşları ve klinik bulguları benzer olan H6 ile H8 no'lu kız hastalarda da PLS3 gen ifadesinin yüksek olduğu saptanmıştır.

Tip III grubunda yer alan H2, H3, H4, H5 ve H9 no'lu hastalar ise, Erişkin Nöroloji Anabilim Dalı'nda tanı almıştır. Hastalık teşhis yaşları ve kas güçsüzlük dereceleri benzer olan H5 ve H9 no'lu hastaların, klinik bulgularının H2, H3, H4 no'lu hastalara göre daha hafif olduğu saptanmıştır. H5 ve H9'da, hastalık ciddiyeti ile korelasyon gösteren PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeylerinin diğer üç hastaya göre (H2, H3, H4) yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hastalık teşhis yaşları, kas güçsüzlük dereceleri ve fasikülasyonların benzer olmasından dolayı beraber değerlendirilen H2, H3 ve H4 no'lu hastaların PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeylerinin de yakın olduğu (0.5- 0.8 kat) tespit edilmiştir. PLS3 ve NRN1 gen ifadelerinin düşük olduğu tespit edilen H3 ve H4'de, bu genlerin hastaların fenotipi üzerinde etkisi olmadığı

belirlenmiştir. Ancak, H3 ve H4 ile benzer klinik gösteren H2’de, beklenenin aksine, NRN1 gen ifadesinin yüksek olması (1.1 kat), bu hastanın fenotipi üzerinde NRN1 geninin etkili olduğunu düşündürmektedir.

Hastalık ciddiyeti tip II ve tip III arasında seyreden H6, hafif bir tip II olarak da değerlendirilmektedir. Tip II grubunda yer alan H10 no’lu hasta ise, ağır tip II özellikleri göstermekte, hastanın pratik olarak yürüme yetisi bulunmamakta ve H6’ya göre daha ağır fenotipe sahip olduğu bilinmektedir. H10’da, PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeylerinin, H6’ya göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu veri, iki hastanın PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeyleri ile hastalık ciddiyeti arasında bir ilişki kurulabileceğini göstermektedir. SMA tip I tanısı alan H7 ve H11 no’lu iki hastada ise, NRN1 gen ifadesi düşük olmasına rağmen, beklenilen aksine, PLS3 gen ifade düzeyinde 2.6 katlık bir artış saptanmıştır. Oprea ve diğ. (6) ’nin yaptığı çalışmada, tip II hastalarının % 16’sında, tip I hastalarının ise % 6’sında PLS3 gen ifadesinin yüksek olduğunu gösterilmiştir. Çalışma grubumuzda yer alan tip I ve tip II hastalarında PLS3 gen ifadesinin yüksek olması, Oprea ve diğ. (6) yaptığı çalışmayı desteklemektedir. Ancak, istatistiksel olarak anlamlı verilerin elde edilebilmesi için, tip I ve II hasta sayısının arttırılması gerekmektedir.

SMA hastalarında NRN1 geninin ifade düzeyi, ilk defa tez çalışması kapsamında belirlenmiştir. Çalışma grubunda yer alan 3 hastada NRN1 geninin ifadesinin yüksek olması ve bu hastaların klinik bulgularının hafif olması, hastaların fenotipi üzerinde NRN1 geninin etkisi olduğunu düşündürmektedir.

SMA hastalarında PLS3 geninin etkisinin araştırıldığı Stratigopoulos ve diğ. (7) ’nin yaptıkları bir diğer çalışmada ise, ergenlik öncesi (< 11 yaş) hastalarda PLS3 gen ifade düzeyinin ergenlik sonrası (>11 yaş) hastalara göre yüksek olduğu gösterilmiştir. Çalışmamıza katılan toplam 11 hasta içinden ergenlik öncesinde tanı alan H6, H7, H8, H10, H11 no’lu hastalarda PLS3 gen ifadesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (bkz. Ek 4). Bu veri, Stratigopoulos ve diğ. (7) ’nin sonuçlarını desteklemekte ve PLS3 geninin yaşa bağlı olarak da ifadesinin değişebileceğini göstermektedir.

Aynı genotipe sahip olan kardeşlerde gözlenen fenotipik farklılıkları açıklamak üzere, çalışma grubuna hastaların yanı sıra, aynı aile içerisinde yer alan SMA'lı kardeşler de dâhil edilmiştir. 1.ailede, SMA tip III tanısı alan kardeşlerin hastalık teşhis yaşları ile klinik ciddiyetleri birbirinden farklıdır. H1 ve H2 no'lu kardeşlerde, PLS3 gen ifade düzeylerinin yakın olduğu (0.6 ve 0.4 kat) tespit edilmiş olup; bu genin fenotipi modifiye edici etkisinin olmadığı gösterilmiştir. NRN1 gen ifade düzeylerinin ise; H1'de 0.9 kat, H2'de 1.4 kat arttığı saptanmıştır. Hastalık seyri kardeşine göre hafif olduğu bilinen H2'de NRN1 gen ifadesinin yüksek olması, bu hastada NRN1 geninin hastalık şiddetini hafifletici bir etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

2. ailede klinik ciddiyetleri birbirinden farklı olan üç kardeş yer almaktadır. Teşhis yaşı 10 olan H2 no'lu kardeşte, hastalık seyri diğer iki kardeşine göre (H1 ve H3) ağırdır. Hastalığın daha geç ortaya çıktığı H3'de ise, hastalık seyrinin H1 ve H2'ye göre daha hafif olduğu bilinmektedir. H1 no'lu kardeşte delesyon saptanmasına rağmen hastalığın klinik tanısı konulmamıştır. Ancak bu hastanın, hastalık ciddiyetinin H2 ile H3 arasında olduğu bilinmektedir. Hastalık seyri en hafif olan H3'de, PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeylerinin hastalık seyri daha ağır olan H1 ve H2 no'lu kardeşlerine göre yüksek olduğu (PLS3: 1.8 kat, NRN1: 2.7 kat) saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu veri literatürle uyumlu olup; bu ailede PLS3 ve NRN1 genlerinin fenotipi modifiye edici etkisinin olduğunu göstermektedir.

3. ailede yer alan iki kardeş klasik tip III özellikleri göstermektedir. İki kardeşte, PLS3 gen ifade düzeylerinin birbirine yakın olduğu (1.2 ve 1.0 kat), NRN1 gen ifadesinin ise olmadığı saptanmıştır. Klinik özellikleri aynı olan bu kardeşlerin fenotiplerinin PLS3 geni tarafından benzer şekilde etkilendiği düşünülmektedir.

4. ailede, klinik tanıları ve klinik bulguları farklı olan iki kardeş yer almaktadır. Beklenilenin aksine, tip III tanısı alan H1'de PLS3 gen ifade düzeyinin tip II tanısı alan H2'ye göre düşük olduğu saptanmıştır. NRN1 gen ifade düzeylerinin ise, yakın olduğu (1.3 ve 1.4 kat) saptanan bu kardeşlerde, PLS3 ve NRN1 genleri dışında başka genlerin fenotipi etkileyebileceği düşünülmektedir.

Bernal ve diğ. (8) tarafından 4 SMA ailesi ile yapılan çalışmada, aynı SMN1 gen delesyonu içermesine rağmen, farklı fenotipe sahip semptomatik ve asemptomatik kardeşlerde PLS3 gen ifade düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmaya katılan 4 ailenin ikisinde, asemptomatik kız bireylerde PLS3 gen ifade düzeyi hasta kardeşine göre yüksek bulunurken, diğer iki ailedeki asemptomatik bireylerde PLS3 gen ifadesinin düşük olduğu tespit edilmiştir (8). Önceki çalışmalarla çelişen bu sonuç, hastaların fenotipi üzerinde PLS3 geni dışında başka genetik düzenleyicilerin rolünün olduğunu düşündürmektedir. Bernal ve diğ. (8) 'nin yaptığı araştırmaya ek olarak, çalışma grubumuzda yer alan 4 ailedeki hasta kardeşlerde, PLS3 geninin yanı sıra, NRN1 gen ifade düzeyleri de incelenmiştir. Çalışmaya katılan 4 ailenin üçü literatür ile uyum göstermekte iken, yalnızca 1 ailede yer alan kardeşlerde PLS3 ve NRN1 genlerinin hastaların fenotipi üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir.

Tez çalışması sonucunda, PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeylerinin SMA fenotipi üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda, genetik düzenleyicilerin ifade düzeylerinin artması ile hastalık seyrinin hafiflemesi arasında bir korelasyon olduğu düşünülmektedir. Ancak beklenilenin aksi sonuçları elde ettiğimiz ailelerde, yeni aday genlerin araştırılması gerekmektedir. Böylece, aynı genotipe sahip olmasına rağmen farklı fenotipik özellik gösteren bireyler arasında genotip- fenotip korelasyonunun kurulması mümkün olabilecek ve hastalık patogenezi aydınlatılabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Teşhis yaşları yakın olan H1, H6 ve H8 no'lu hastalar pediatrik tip III grubunda yer almaktadır. Benzer klinik bulgu gösteren H6 ve H8'de, PLS3 gen ifade düzeylerinin birbirine yakın (3.5 ve 3.6 kat) olduğu gösterilirken, bu hastaların fenotipi üzerinde NRN1 geninin modifiye edici rolü olmadığı belirlenmiştir. H6 ve H8'e göre daha hafif klinik bulgulara sahip olan H1'de, beklenilenin aksine PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeylerinin düşük olduğu saptanmış olup, bu hastanın fenotipi üzerinde başka genlerin etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.
- H2, H3, H4, H5 ve H9 no'lu hastalar erişkin tip III grubunda yer almaktadır. Hastalık teşhis yaşları ve klinik bulguları yakın olan H5 ve H9 no'lu hastalarda PLS3 ve NRN1 gen ifade düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hastaların fenotipi üzerinde bu genlerinin etkili olduğu düşünülmektedir. Klinik bulguları benzer olan H2, H3 ve H4 no'lu hastalarda PLS3 gen ifadesinin düşük olduğu tespit edilirken, sadece H2 no'lu hastada NRN1 gen ifadesinin yüksek olduğu (1.1 kat) saptanmıştır. H2 no'lu hastanın fenotipi üzerinde NRN1 geninin rolü olduğu belirlenirken, PLS3 geninin bu üç hastanın fenotipi üzerinde etkisi olmadığı düşünülmektedir.
- SMA tip II tanısı alan H10 no'lu hasta ile SMA tip I tanısı alan H7 ve H11 no'lu hastalarda, NRN1 gen ifadesinin düşük olduğu saptanırken, beklenilenin aksine, PLS3 gen ifadesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak, anlamlı sonuçların elde edilebilmesi için tip I ve tip II hasta sayısının artırılması gerekmektedir.
- PLS3 gen ifadesinin yaşa bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Farklı klinik tanı alan 11 SMA hastası ergenlik öncesi ve sonrasına (<11 yaş ve >11 yaş) göre gruplandırıldığında, PLS3 gen ifadesinin ergenlik öncesinde tanı alan hastalarda yüksek bulunduğu saptanmıştır.
- Çalışma grubuna hastaların yanı sıra, aynı aile içinde farklı ciddiye gösteren hasta kardeşler de dâhil edilmiştir. 1.ailede yer alan iki kardeş

PLS3 gen ifade değişimlerinin yakın olduğu (0.6 ve 0.4 kat) saptanırken, NRN1 gen ifade değişimi hastalık seyri hafif olan H2 no'lu kız hastada, hastalık seyri ağır olan H1 no'lu erkek kardeşine göre yüksek (1.4 kat) bulunmuştur. Klinik ciddiyeti hafif olan hastada NRN1 gen ifadesinin yüksek olması, NRN1 geninin hastalık ciddiyetini azaltan bir etken olabileceğini işaret etmektedir.

- 2. ailede yer alan SMA'lı üç kardeşten, klinik ciddiyeti hafif olan hastada (H3), hastalık seyri ağır olan diğer iki kardeşine göre (H1 ve H2), PLS3 ve NRN1 gen ifadesinin yüksek olduğu saptanmıştır. Klinik ciddiyeti birbirinden farklı olan 3 SMA'lı kardeşte gözlenen gen ifade düzeyleri, PLS3 ve NRN1 genleri ile hastalık ciddiyeti arasındaki ilişkinin kurulmasına yardımcı olmaktadır.
- 3.ailede SMA tip III tanısı alan iki hastada, PLS3 gen ifade düzeylerinin yüksek ve birbirine yakın olduğu (1.2 ve 1.0 kat) belirlenmiştir. Klinik bulguları benzer olan bu iki kardeşin fenotipinin PLS3 geni tarafından benzer şekilde etkilendiği dūřünülmektedir. Bu ailede yer alan her iki kardeşte de NRN1 gen ifadesinin olmaması (< 0.5 kat), kardeşlerin fenotipi üzerinde NRN1 geninin rolü olmadığını göstermektedir.
- 4.ailede Tip III tanısı alan H1'de PLS3 gen ifade düzeyinin tip II tanısı alan H2'ye göre düşük olduğu belirlenmiştir. Kardeřlerde gözlenen NRN1 gen ifade değişimlerinin yakın olması (1.3 ve 1.4 kat), kardeşlerin fenotipi üzerinde başka genlerin etkili olabileceğini dūřündürmektedir.
- SMN2 kopya sayısının hastalık ciddiyeti ile korelasyon gösterdiği, hastalık seyri hafifledikçe kopya sayısının arttığı bilinmektedir. Fenotipi modifiye edici etkisi olan SMN2 kopya sayısının hastalarda araştırılması gerekmektedir. Böylece SMN2 kopya sayısına bağlı olarak, PLS3 ve NRN1 genlerinin etkileri daha ayrıntılı olarak yorumlanabilecektir.
- Çalışmamız sonucunda PLS3 ve NRN1 genlerinin SMA hastaları ve aynı aile içinde farklı klinik ciddiyeti olan SMA'lı kardeşler üzerindeki fenotipi modifiye edici rolü araştırılarak, hastalarda PLS3 ve NRN1 RNA

genlerinin ifade düzeyleri saptanmıştır. PLS3 ve NRN1 protein miktarlarının da analiz edilerek RNA verilerinin desteklenmesi gerekmektedir.

- PLS3 veya NRN1 gen ifade değişimleri ile klinik ciddiyet arasında korelasyon kurulamayan hastalarda, fenotipi modifiye eden yeni genlerin araştırılması önerilmektedir.
- SMA hücre kültürü veya hayvan modellerinde modifiye edici genlerin ifadesinin baskılanması ve artırılması ile SMA patogenezinin aydınlatılması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Mesfin, A., Sponseller, P.D., Leet, A.I. (2012) Spinal muscular atrophy: manifestations and management. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* , 20 (6), 393-401.
2. Simic, G. (2008) Pathogenesis of proximal autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathologica*, 116 (3), 223-234.
3. Monani, U.R. (2005) Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron*, 48 (6), 885-896.
4. Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L. ve diğ erleri. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 80 (1), 155-165.
5. Brzustowicz, L.M., Lehner, T., Castilla, L.H., Penchaszadeh, G.K., Wilhelmssen, K.C., Daniels, R. ve diğ erleri. (1990) Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature*, 344 (6266), 540-541.
6. Oprea, G.E., Krober, S., McWhorter, M.L., Rossoll, W., Muller, S., Krawczak, M. ve diğ erleri. (2008) Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science*, 320 (5875), 524-527.
7. Stratigopoulos, G., Lanzano, P., Deng, L., Guo, J., Kaufmann, P., Darras, B. ve diğ erleri. (2010) Association of plastin 3 expression with disease severity in spinal muscular atrophy only in postpubertal females. *Archives of Neurology*, 67 (10), 1252-1256.
8. Bernal, S., Also-Rallo, E., Martinez-Hernandez, R., Alias, L., Rodriguez-Alvarez, F.J., Millan, J.M. ve diğ erleri. (2011) Plastin 3 expression in discordant spinal muscular atrophy (SMA) siblings. *Neuromuscular Disorders* , 21 (6), 413-419.

9. Ogino, S., Leonard, D.G., Rennert, H., Ewens, W.J., Wilson, R.B. (2002) Genetic risk assessment in carrier testing for spinal muscular atrophy. *American Journal of Medical Genetics*, 110 (4), 301-307.
10. Palladino, A., Passamano, L., Taglia, A., D'Ambrosio, P., Scutifero, M., Cecio, M.R. ve diğeri. (2011) Cardiac involvement in patients with spinal muscular atrophies. *Acta Myologica*, 30 (3), 175-178.
11. Alsaman, A.S., Alshaikh, N.M. (2013) Type III Spinal Muscular Atrophy Mimicking Muscular Dystrophies. *Pediatric Neurology*, 48 (5), 363-366.
12. Pearn, J. (1980) Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet*, 1 (8174), 919-922.
13. Munsat, T.L., Davies, K.E. (1992). International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscular Disorders*, 2, 5-6, 423-428.
14. Essawi, M.L., Al-Attribi, G.M., Gaber, K.R., El-Harouni, A.A. (2012) Molecular prenatal diagnosis of autosomal recessive childhood spinal muscular atrophies (SMAs). *Gene*, 509 (1), 120-123.
15. Lunn, M.R., Wang, C.H. (2008) Spinal muscular atrophy. *Lancet*, 371 (9630), 2120-2133.
16. Wirth, B., Brichta, L., Hahnen, E. (2006) Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. *Seminars in Pediatric Neurology*, 13 (2), 121-131.
17. Melki, J., Abdelhak, S., Sheth, P., Bachelot, M.F., Burlet, P., Marcadet, A. ve diğeri. (1990) Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature*, 344 (6268), 767-768.

18. Daniels, R.J., Thomas, N.H., MacKinnon, R.N., Lehner, T., Ott, J., Flint, T.J. ve diğerleri. (1992) Linkage analysis of spinal muscular atrophy. *Genomics*, 12 (2), 335-339.

19. Kelter, A.R., Herchenbach, J., Wirth, B. (2000) The transcription factor-like nuclear regulator (TFNR) contains a novel 55-amino-acid motif repeated nine times and maps closely to SMN1. *Genomics*, 70 (3), 315-326.

20. Chen, W.J., He, J., Zhang, Q.J., Lin, Q.F., Chen, Y.F., Lin, X.Z. ve diğerleri. (2012) Modification of phenotype by SMN2 copy numbers in two Chinese families with SMN1 deletion in two continuous generations. *Clinica Chimica Acta*, 413 (23-24), 1855-1860.

21. Hahnen, E., Forkert, R., Marke, C., Rudnik-Schoneborn, S., Schonling, J., Zerres, K. ve diğerleri. (1995) Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Human Molecular Genetics*, 4 (10), 1927-1933.

22. Ogino, S., Wilson, R.B. (2004) Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4 (1), 15-29.

23. Caceres, J.F., Kornblihtt, A.R. (2002) Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends in Genetics*, 18 (4), 186-193.

24. Singh, N.N., Androphy, E.J., Singh, R.N. (2004) An extended inhibitory context causes skipping of exon 7 of SMN2 in spinal muscular atrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315 (2), 381-388.

25. Douglas, A.G., Wood, M.J. (2013) Splicing therapy for neuromuscular disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 28 (13), 1-17.

26. Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J., Wirth, B. (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (11), 6307-6311.
27. Zheleznyakova, G.Y., Kiselev, A.V., Vakharlovsky, V.G., Rask-Andersen, M., Chavan, R., Egorova, A.A. ve diğeri. (2011) Genetic and expression studies of SMN2 gene in Russian patients with spinal muscular atrophy type II and III. *BMC Medical Genetics*, 12 (96), 1471-2350.
28. Wirth, B., Garbes, L., Riessland, M. (2013) How genetic modifiers influence the phenotype of spinal muscular atrophy and suggest future therapeutic approaches. *Current Opinion in Genetics & Development*, 23 (3), 330-338.
29. Rochette, C.F., Gilbert, N., Simard, L.R. (2001) SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Human Genetics*, 108 (3), 255-266.
30. Wirth, B., Schmidt, T., Hahnen, E., Rudnik-Schoneborn, S., Krawczak, M., Muller-Myhsok, B. ve diğeri. (1997) De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *The American Journal of Human Genetics*, 61 (5), 1102-1111.
31. Prior, T.W., Krainer, A.R., Hua, Y., Swoboda, K.J., Snyder, P.C., Bridgeman, S.J. ve diğeri. (2009) A positive modifier of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene. *The American Journal of Human Genetics*, 85 (3), 408-413.
32. Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A. ve diğeri. (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nature Genetics*, 16 (3), 265-269.

33. Crawford, T.O., Paushkin, S.V., Kobayashi, D.T., Forrest, S.J., Joyce, C.L., Finkel, R.S. ve diğerleri. (2012) Evaluation of SMN protein, transcript, and copy number in the biomarkers for spinal muscular atrophy (BforSMA) clinical study. *PLoS One*, 7 (4), 27.
34. Kim, J., Lee, S.G., Choi, Y.C., Kang, S.W., Lee, J.B., Choi, J.R. ve diğerleri. (2010) Association between survivor motor neuron 2 (SMN2) gene homozygous deletion and sporadic lower motor neuron disease in a Korean population. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 40 (4), 368-374.
35. Coover, D.D., Le, T.T., McAndrew, P.E., Strasswimmer, J., Crawford, T.O., Mendell, J.R. ve diğerleri. (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 6 (8), 1205-1214.
36. Coady, T.H., Lorson, C.L. (2011) SMN in spinal muscular atrophy and snRNP biogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2 (4), 546-564.
37. Liu, Q., Dreyfuss, G. (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *The EMBO Journal*, 15 (14), 3555-3565.
38. Sharma, A., Lambrechts, A., Hao, T., Le, T.T., Sewry, C.A., Ampe, C. ve diğerleri. (2005) A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. *Experimental Cell Research*, 309 (1), 185-197.
39. Pellizzoni, L., Charroux, B., Dreyfuss, G. (1999) SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (20), 11167-11172.
40. Pellizzoni, L. (2007) Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO reports*, 8 (4), 340-345.

41. Gubitz, A.K., Feng, W., Dreyfuss, G. (2004) The SMN complex. *Experimental Cell Research*, 296 (1), 51-56.
42. Gangwani, L., Mikrut, M., Theroux, S., Sharma, M., Davis, R.J. (2001) Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein. *Nature Cell Biology*, 3 (4), 376-383.
43. Rossoll, W., Kroning, A.K., Ohndorf, U.M., Steegborn, C., Jablonka, S., Sendtner, M. (2002) Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Human Molecular Genetics*, 11 (1), 93-105.
44. Battle, D.J., Kasim, M., Yong, J., Lotti, F., Lau, C.K., Mouaikel, J. ve diğeri. (2006) The SMN complex: an assembly machine for RNPs. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 71, 313-320.
45. Chari, A., Paknia, E., Fischer, U. (2009) The role of RNP biogenesis in spinal muscular atrophy. *Current Opinion in Cell Biology*, 21 (3), 387-393.
46. Burghes, A.H., Beattie, C.E. (2009) Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nature Reviews Neuroscience*, 10 (8), 597-609.
47. Boyer, J.G., Bowerman, M., Kothary, R. (2010) The many faces of SMN: deciphering the function critical to spinal muscular atrophy pathogenesis. *Future Neurology*, 5 (6), 873-890.
48. Kolb, S.J., Battle, D.J., Dreyfuss, G. (2007) Molecular functions of the SMN complex. *Journal of Child Neurology*, 22 (8), 990-994.

49. Battle, D.J., Kasim, M., Wang, J., Dreyfuss, G. (2007) SMN-independent subunits of the SMN complex. Identification of a small nuclear ribonucleoprotein assembly intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (38), 27953-27959.
50. Boda, B., Mas, C., Giudicelli, C., Nepote, V., Guimiot, F., Levacher, B. ve diğeri. (2004) Survival motor neuron SMN1 and SMN2 gene promoters: identical sequences and differential expression in neurons and non-neuronal cells. *European Journal of Human Genetics*, 12 (9), 729-737.
51. Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kroning, A.K., Karle, K., Monani, U.R. ve diğeri. (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *The Journal of Cell Biology*, 163 (4), 801-812.
52. Glinka, M., Herrmann, T., Funk, N., Havlicek, S., Rossoll, W., Winkler, C. ve diğeri. (2010) The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-R is necessary for axonal beta-actin mRNA translocation in spinal motor neurons. *Human Molecular Genetics*, 19 (10), 1951-1966.
53. Fallini C, Donlin- Asp P.G, Rouanet J, Bassell G.J, Rossoll W. (Haziran 2013) **The Role of SMN in Nerve Fibers** [Poster]. Recent Families of SMA Conferences, California.
54. Shababi, M., Lorson, C.L., Rudnik-Schoneborn, S.S. (2013) Spinal muscular atrophy: a motor neuron disorder or a multi-organ disease? *Journal of Anatomy*, 22 (10), 12083.
55. Hamilton, G., Gillingwater, T.H. (2013) Spinal muscular atrophy: going beyond the motor neuron. *Trends in Molecular Medicine*, 19 (1), 40-50.
56. Willard HF, H.A. (2007). Thompson & Thompson Genetics in Medicine (7 bs.). Philadelphia: WB Saunders.

57. Dipple, K.M.,McCabe, E.R. (2000) Modifier genes convert "simple" Mendelian disorders to complex traits. *Molecular Genetics and Metabolism*, 71 (1-2), 43-50.
58. Houlston, R.S.,Tomlinson, I.P. (1998) Modifier genes in humans: strategies for identification. *European Journal of Human Genetics*, 6 (1), 80-88.
59. Nadeau, J.H. (2003) Modifier genes and protective alleles in humans and mice. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13 (3), 290-295.
60. Kearney, J.A. (2011) Genetic modifiers of neurological disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21 (3), 349-353.
61. Akten, B., Kye, M.J., Hao le, T., Wertz, M.H., Singh, S., Nie, D. ve diğerleri. (2011) Interaction of survival of motor neuron (SMN) and HuD proteins with mRNA cp15 rescues motor neuron axonal deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (25), 10337-10342.
62. Ahmad, S., Wang, Y., Shaik, G.M., Burghes, A.H.,Gangwani, L. (2012) The zinc finger protein ZPR1 is a potential modifier of spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 21 (12), 2745-2758.
63. Lin, C.S., Chen, Z.P., Park, T., Ghosh, K.,Leavitt, J. (1993) Characterization of the human L-plastin gene promoter in normal and neoplastic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (4), 2793-2801.
64. Shinomiya, H. (2012) Plastin family of actin-bundling proteins: its functions in leukocytes, neurons, intestines, and cancer. *International Journal of Cell Biology*, 213492 (10), 4.
65. Ackermann, B., Krober, S., Torres-Benito, L., Borgmann, A., Peters, M., Hosseini Barkooie, S.M. ve diğerleri. (2013) Plastin 3 ameliorates spinal muscular

atrophy via delayed axon pruning and improves neuromuscular junction functionality. *Human Molecular Genetics*, 22 (7), 1328-1347.

66. Naeve, G.S., Ramakrishnan, M., Kramer, R., Hevroni, D., Citri, Y., Theill, L.E. (1997) Neuritin: a gene induced by neural activity and neurotrophins that promotes neuritogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (6), 2648-2653.

67. Fujino, T., Wu, Z., Lin, W.C., Phillips, M.A., Nedivi, E. (2008) cpg15 and cpg15-2 constitute a family of activity-regulated ligands expressed differentially in the nervous system to promote neurite growth and neuronal survival. *Journal of Comparative Neurology*, 507 (5), 1831-1845.

68. Putz, U., Harwell, C., Nedivi, E. (2005) Soluble CPG15 expressed during early development rescues cortical progenitors from apoptosis. *Nature Neuroscience*, 8 (3), 322-331.

69. Yao, J.J., Gao, X.F., Chow, C.W., Zhan, X.Q., Hu, C.L., Mei, Y.A. (2012) Neuritin activates insulin receptor pathway to up-regulate Kv4.2-mediated transient outward K⁺ current in rat cerebellar granule neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 287 (49), 41534-41545.

70. Zito, A., Cartelli, D., Cappelletti, G., Cariboni, A., Andrews, W., Parnavelas, J. ve diğerleri. (2012) Neuritin 1 promotes neuronal migration. *Brain Structure and Function*, 5, 5.

71. Javaherian, A., Cline, H.T. (2005) Coordinated motor neuron axon growth and neuromuscular synaptogenesis are promoted by CPG15 in vivo. *Neuron*, 45 (4), 505-512.

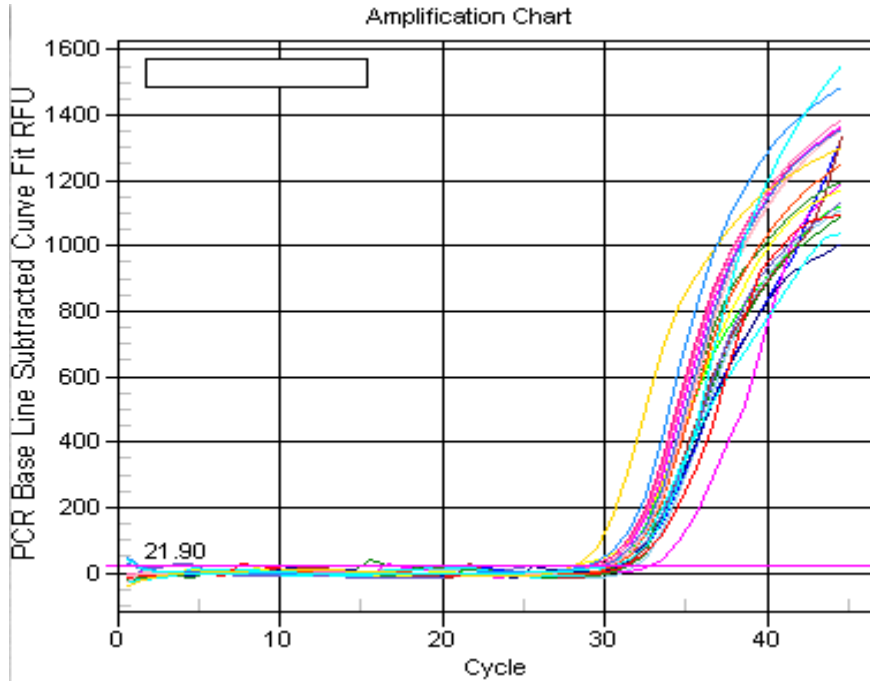
72. Nedivi, E., Hevroni, D., Naot, D., Israeli, D., Citri, Y. (1993) Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning. *Nature*, 363 (6431), 718-722.
73. Fujino, T., Lee, W.C., Nedivi, E. (2003) Regulation of cp15 by signaling pathways that mediate synaptic plasticity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24 (3), 538-554.
74. Nedivi, E., Wu, G.Y., Cline, H.T. (1998) Promotion of dendritic growth by CPG15, an activity-induced signaling molecule. *Science*, 281 (5384), 1863-1866.
75. Farrar, M.A., Vucic, S., Lin, C.S., Park, S.B., Johnston, H.M., du Sart, D. ve diğeri. (2011) Dysfunction of axonal membrane conductances in adolescents and young adults with spinal muscular atrophy. *Brain*, 134 (Pt 11), 3185-3197.
76. Galcheva-Gargova, Z., Gangwani, L., Konstantinov, K.N., Mikrut, M., Theroux, S.J., Enoch, T. ve diğeri. (1998) The cytoplasmic zinc finger protein ZPR1 accumulates in the nucleolus of proliferating cells. *Molecular Biology of the Cell*, 9 (10), 2963-2971.
77. Narayanan, U., Ospina, J.K., Frey, M.R., Hebert, M.D., Matera, A.G. (2002) SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Human Molecular Genetics*, 11 (15), 1785-1795.
78. Gangwani, L. (2006) Deficiency of the zinc finger protein ZPR1 causes defects in transcription and cell cycle progression. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (52), 40330-40340.
79. Fleige, S., Pfaffl, M.W. (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (2-3), 126-139.

80. Bustin, S.A. (2004). A to Z of Quantitative PCR. La Jolla, California: International University Line.

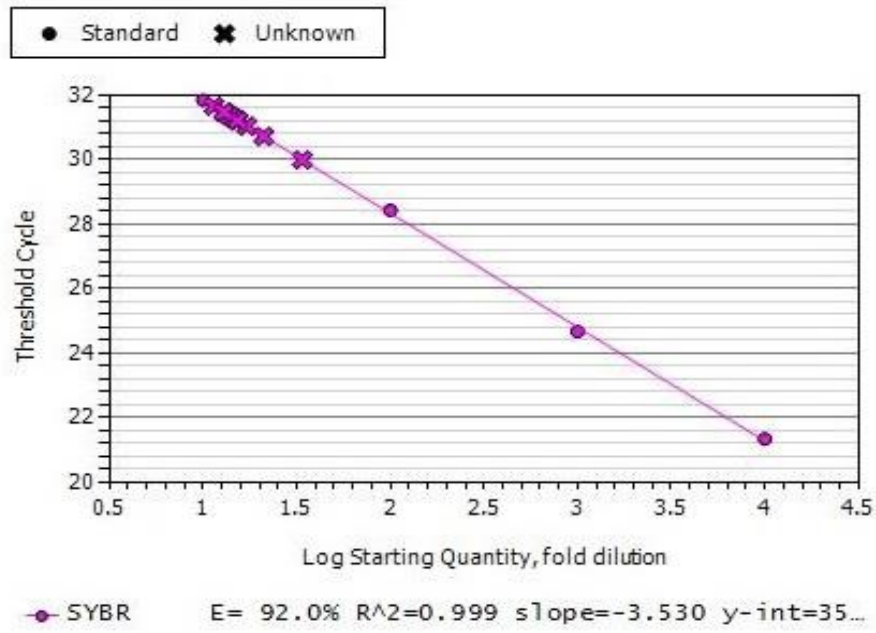
81. Pachot, A., Blond, J.L., Mougin, B., Miossec, P. (2004) Peptidylpropyl isomerase B (PPIB): a suitable reference gene for mRNA quantification in peripheral whole blood. *Journal of Biotechnology*, 114 (1-2), 121-124.

EKLER

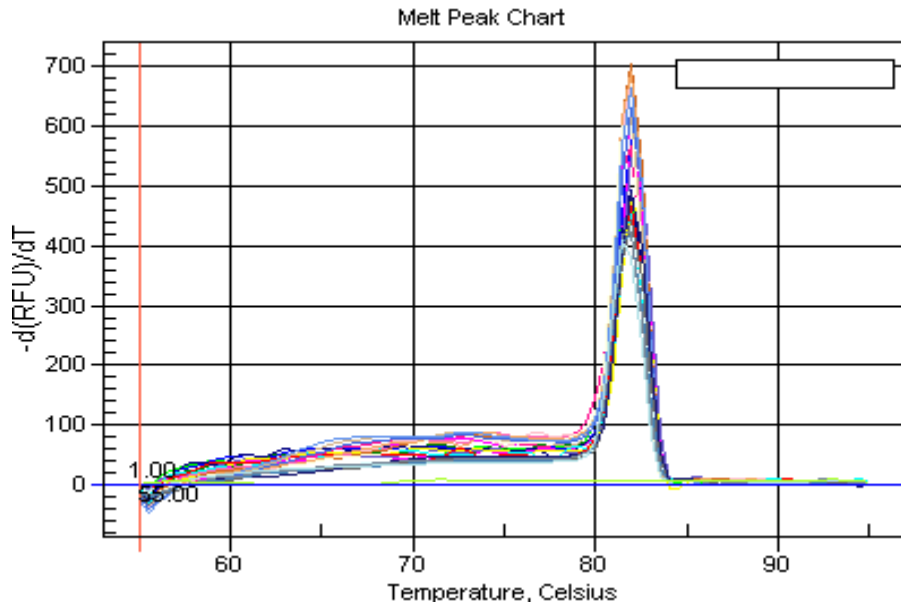
EK 1. PLS3 Geninin Gerçek Zamanlı (*Real-Time*) PZR Amplifikasyon Eğrisi, Standart Eğrisi, Erime Eğrisi ve Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jeldeki Görünümü



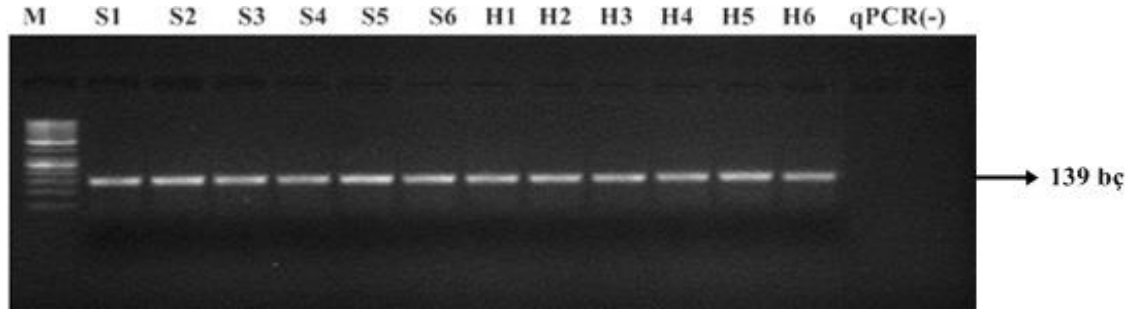
Şekil Ek.1.1. Kontrol ve hasta bireylere ait örneklerde PLS3 geni amplifikasyon eğrisi



Şekil Ek.1.2. Kontrol ve hasta bireylere ait örneklerde PLS3 geni standart eğrisi

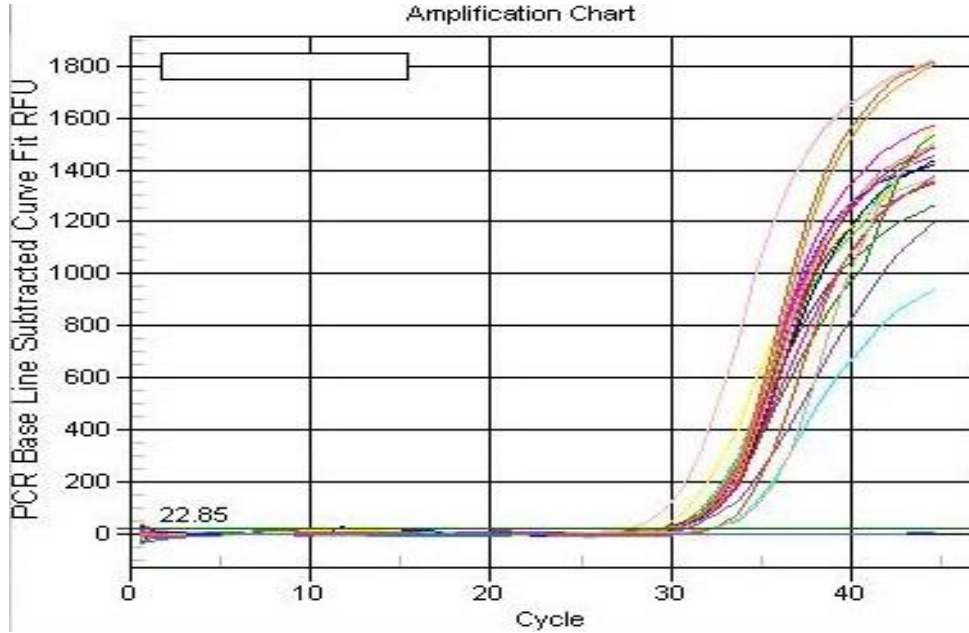


Şekil Ek.1.3. Kontrol ve hasta bireylere ait örneklerde PLS3 geni erime eğrisi

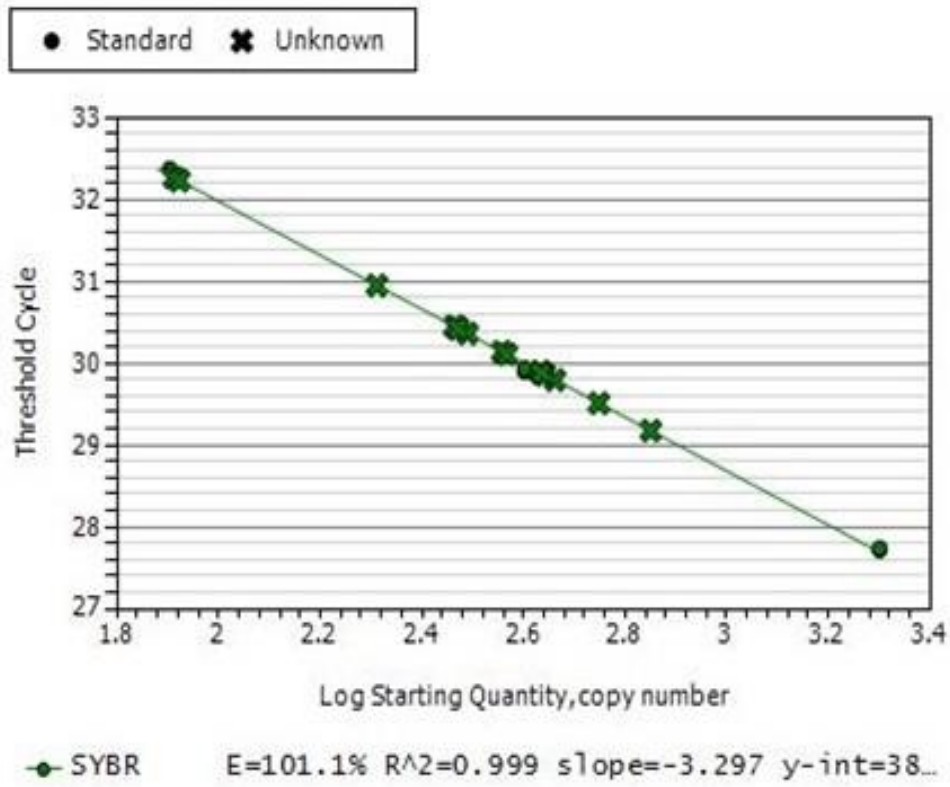


Şekil Ek.1.4. Kontrol ve hasta bireylere ait PLS3 geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki (%3) görünümü

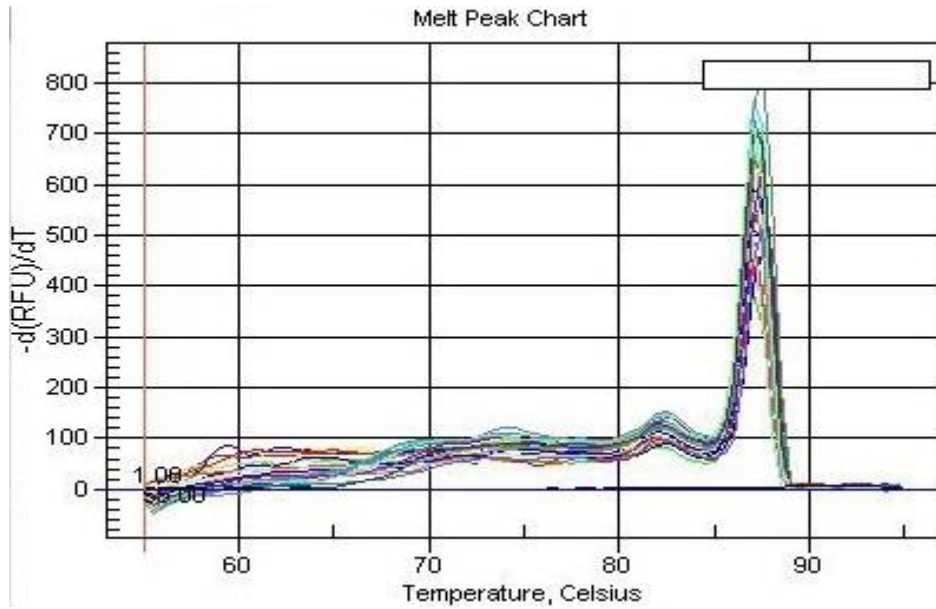
EK 2. NRN1 Geninin Gerçek Zamanlı (*Real-Time*) PZR Amplifikasyon Eğrisi, Standart Eğrisi, Erime Eğrisi ve Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jeldeki Görünümü



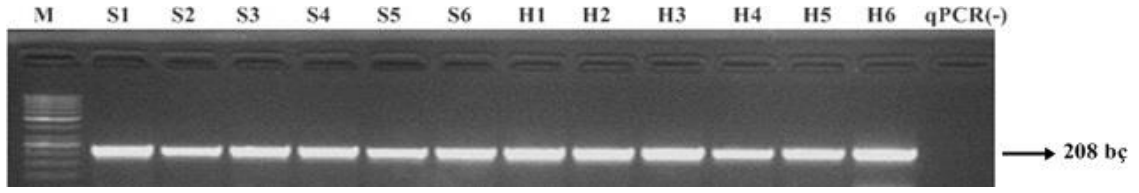
Şekil Ek.2.1. Kontrol ve hasta bireylere ait örneklerde NRN1 geni amplifikasyon eğrisi



Şekil Ek.2.2. Kontrol ve hasta bireylere ait örneklerde NRN1 geni standart eğrisi

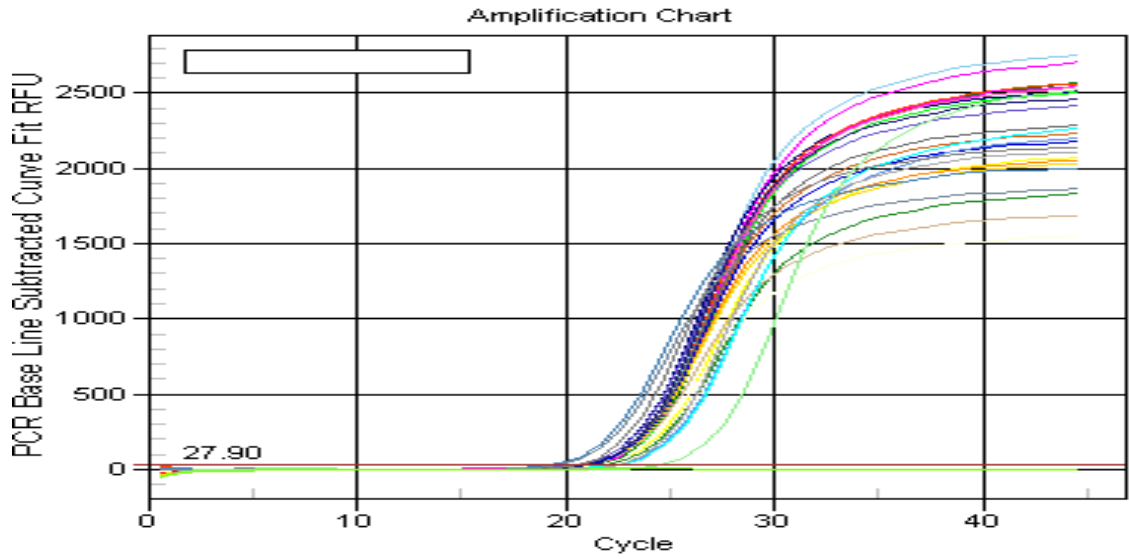


Şekil Ek.2.3. Kontrol ve hasta bireylere ait örneklerde NRN1 geni erime eğrisi

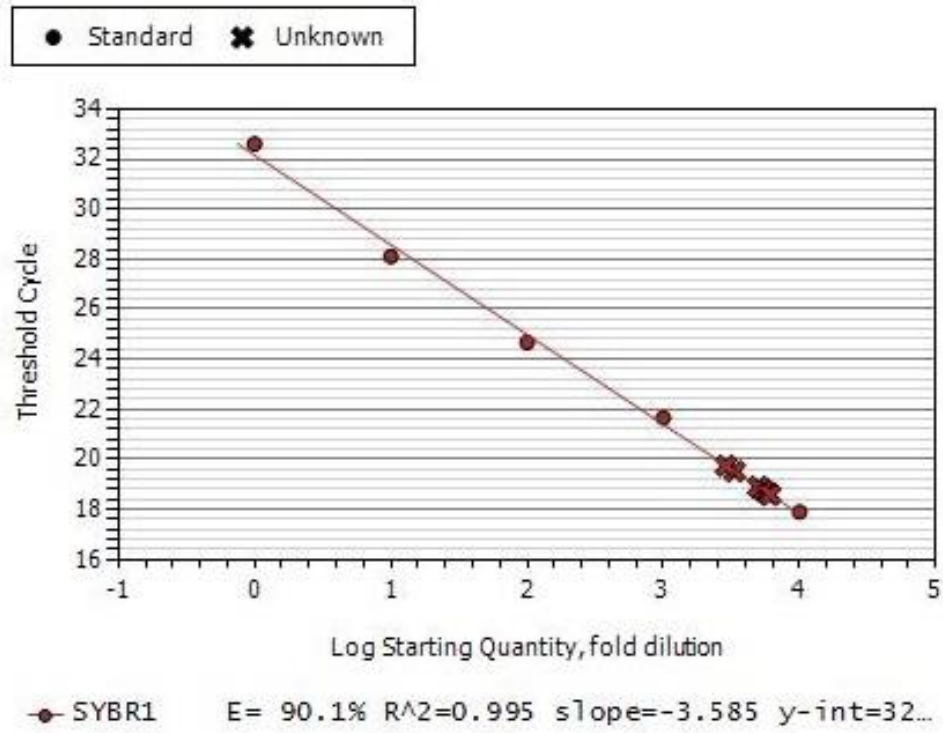


Şekil Ek.2.4. Kontrol ve hasta bireylere ait NRN1 geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki (%3) görünümü

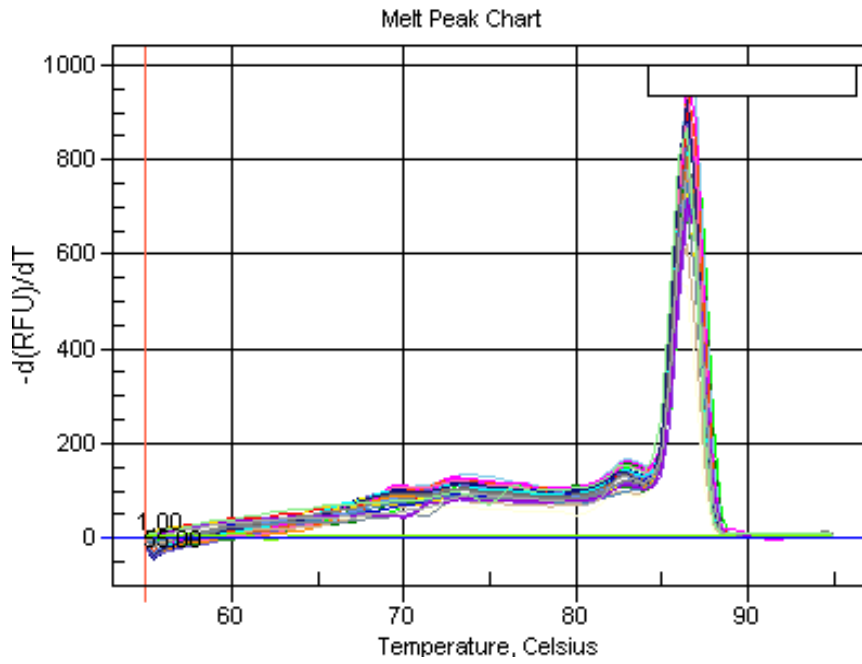
EK 3. PPIB Geninin Gerçek Zamanlı (*Real-Time*) PZR Amplifikasyon Eğrisi, Standart Eğrisi, Erime Eğrisi ve Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jeldeki Görünümü



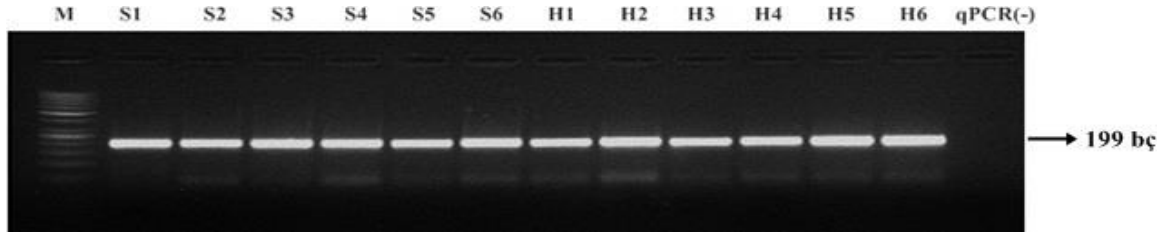
Şekil Ek.3.1. Kontrol ve hasta bireylere ait örneklerde PPIB geni amplifikasyon eğrisi



Şekil Ek.3.2. Kontrol ve hasta bireylere ait örneklerde PPIB geni standart eğrisi

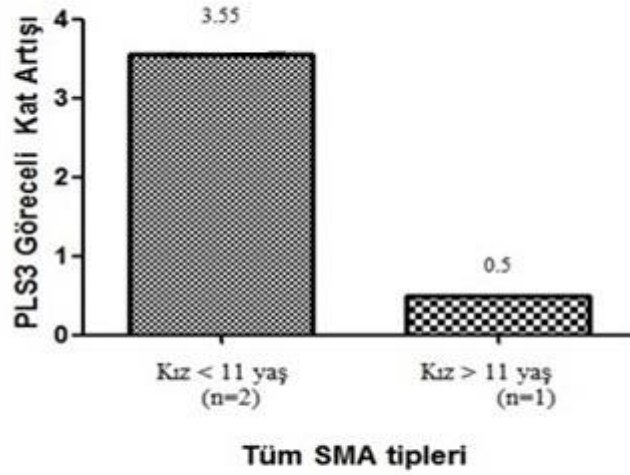


Şekil Ek.3.3. Kontrol ve hasta bireylere ait örneklerde PPIB geni erime eğrisi

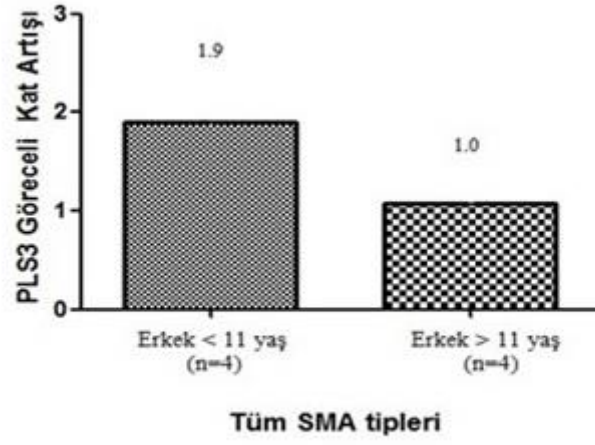


Şekil Ek.3.4. Kontrol ve hasta bireylere ait PPIB geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki (%3) görünümü

EK 4. Kız ve Erkek Hastalarda PLS3 Gen İfadesinin Yaşa Göre Değişimi



Şekil Ek.4.1. 11 yaş öncesi ve sonrasına göre kızlarda PLS3 gen ifade değişim grafiği



Şekil Ek.4.2. 11 yaş öncesi ve sonrasına göre erkeklerde PLS3 gen ifade değişim grafiği



Sayı: B.30.2.HAC.0.05.07.00 / 836

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 28 KASIM 2012 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2012/11
Proje No : LUT 12/138 (Değerlendirme Tarihi 19.10.2012)
Karar No : LUT 12/138 - 20

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Didem Dayangaç Erden'in sorumlu araştırmacı olduğu Prof. Dr. Haluk Topaloğlu ve Prof. Dr. Sevim Erdem Özdamar ile birlikte çalışacakları İ. Hande Yener'in tezi olan LUT 12/138 kayıt numaralı ve **"Spinal Müsküler Atrofi Patogenezinde Rol Alan Genetik Düzenleyicilerin İfade Analizi"** başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten Akarsu

(Başkan)

2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken

(Üye)

3. Prof. Dr. Hakan S. Orer

(Üye)

İZİNLİ

4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu

(Üye)

5. Prof. Dr. Cenk S. Kmensüer

(Üye)

6. Prof. Dr. Kafiye Eroğlu

(Üye)

7. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay

(Üye)

8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal

(Üye)

İZİNLİ

9 Prof. Dr. Songül Vaizozoğlu

(Üye)

10. Prof. Dr. Melahat Görduysus

(Üye)

11. Doç. Dr. R. Köksal Özgül

(Üye)

12. Doç. Dr. Cansın Saçkesen

(Üye)

13 Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan

(Üye)

14. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan

(Üye)

15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl

(Üye)

16. Av. Meltem Onurlu

(Üye)

