



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

**METAKROMATİK LÖKODİSTROFİ: ÜÇ ARİLSÜLFATAZ A
MUTASYONUNUN (p.307Glu→Lys, p.318Trp→Cys ve c.1165G delesyonu)
ARİLSÜLFATAZ A AKTİVİTESİ VE ARİLSÜLFATAZ A PROTEİNİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN TANIMLANMASI**

Dr. ADEM ÖZKAN

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2013**

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

**METAKROMATİK LÖKODİSTROFİ: ÜÇ ARİLSÜLFATAZ A
MUTASYONUNUN (p.307Glu→Lys, p.318Trp→Cys ve c.1165G delesyonu)
ARİLSÜLFATAZ A AKTİVİTESİ VE ARİLSÜLFATAZ A PROTEİNİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN TANIMLANMASI**

Dr. ADEM ÖZKAN

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. H. ASUMAN ÖZKARA**

ANKARA

2013

TEŞEKKÜR

Tez çalışması boyunca danışmanlığımı yürüten, gerekli bilimsel zemini hazırlaması yanında tecrübeleri ve fikirleriyle bana bu konuda yol gösteren, değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. H. Asuman Özkara'ya teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca çalışmalarımın her aşamasında katkılarını esirgemeyen, her konuda bana destek olan değerli hocalarıma,

Bana güzel bir çalışma ortamı sunan, her zaman yanımda hissettiğim asistan arkadaşlarıma, tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına,

Eğitim hayatım boyunca her anımda kayıtsız şartsız yanımda olan aileme sonsuz sevgi, minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Biriminin 02G085 ve 013T07101001 numaralı projeleri tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Dr. Adem Özkan. Metakromatik Lökodistrofi: üç Arilsülfataz A mutasyonunun (p.307Glu→Lys, p.318Trp→Cys ve c.1165G delesyonu) Arilsülfataz A aktivitesi ve Arilsülfataz A proteini üzerine etkisinin tanımlanması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi, Ankara, 2013.

Metakromatik lökodistrofi (MLD) lizozomal enzim Arilsülfataz A (ASA) veya aktivatör proteininin eksikliği sonucu oluşan, otozomal resesif geçişli bir sfingolipit depo hastalığıdır. Bu çalışmada, ülkemizde geç bebeklik tipi MLD hastalığında daha önceki çalışmalarımızla tanımlanan iki “missense” mutasyon (ekson 5’te c.919G→A, p.307Glu→Lys ve c.954G→T, p.318Trp→Cys) ve bir polimorfizm mutasyonu (ekson 7’de c.1172C→G, p.391Thr→Ser) plazmide takılı ASA cDNA’sı üzerinde oluşturuldu. DNA dizi analizi ile, WT-ASA cDNA’sı üzerinde c.919G→A ve c.954G→T mutasyonlarının, c.1172C→G polimorfizm mutasyonunu ile c.1165G delesyonunun oluşturulduğu gösterildi. Mutant ve normal ASA cDNA’sını taşıyan plazmid DNA, CHO hücrelerine geçici transfeksiyon ile aktarıldı. ASA proteini üretildi. Transfeksiyonun etkinliğini ölçmek için ASA cDNA’sı ile birlikte heksozaminidaz enzimi beta-altbirim geni cDNA’sını içeren plazmid, CHO hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler toplandı, homojenize edildi ve santrifüjlendi. Süpernatanda protein tayininin ardından ekspresse olan ASA ve heksozaminidaz B aktivitesi ölçüldü. p.307Glu→Lys ve p.318Trp→Cys mutasyonları ASA enziminin aktivitesini kontrole göre %100 oranında azalttı. Western blot ile 62 kDa büyüklüğündeki ASA proteini normal kontrol örneğinde, p.307Glu→Lys ve p.318Trp→Cys değişiminde saptandı, 1165G delesyon mutasyonunda saptanmadı. Bu da mutant proteinlerde p.307Glu→Lys ve p.318Trp→Cys değişimi sonucunda aktivite eksikliğine neden olan katlanma bozukluğu olduğunu düşündürdü. c.1165G delesyon mutasyonunun ise, proteinin yapısını önemli derecede değiştirdiği ve yıkımına neden olduğu sonucuna varıldı. İnaktif proteinin varolduğu p.307Glu→Lys ve p.318Trp→Cys değişimi şaperon tedavi uygulamasına aday olabilir. Bu çalışma ile, her iki mutasyonun ASA aktivitesini hastalardakine benzer şekilde tama yakın azalttığı ve hücrede mutant proteinlerin olduğu gösterilmiştir. p.307Glu→Lys ve p.318Trp→Cys mutasyonları, klinik seyri şiddetli olan geç infantil tip MLD hastalığına neden olmaktadır.

Anahtar sözcükler: Metakromatik Lökodistrofi, Arilsülfataz A, Türk popülasyonu, mutasyon, *in vitro* mutagenез, enzim analizi, transfeksiyon, hücre kültürü, Western blot

ABSTRACT

Dr. Adem Özkan. Metachromatic Leukodystrophy: characterization of the effect of three Arylsulfatase A mutations (p.307Glu→Lys, p.318Trp→Cys, c.1165G deletion) on Arylsulfatase A activity and Arylsulfatase A protein. Hacettepe University, Medical Biochemistry Speciality Thesis, Ankara, 2013.

Metachromatic leukodystrophy (MLD) is an autosomal recessively inherited sphingolipid storage disease that occurs as a result of a lack of lysosomal enzyme Arylsulfatase A (ASA) or its activator protein. In this study, two missense mutations (c.919G→A, p.307Glu→Lys and c.954G→T, p.318Trp→Cys in exon 5) that were defined in our previous studies and a polymorphism mutation (c.1172C→G, p.391Thr→Ser in exon 7) were constructed on WT-ASA cDNA plasmid. It is shown by DNA sequence analysis that both c.919G→A and c.954G→T mutations as well as c.1165G deletion mutation were created with c.1172C→G polymorphism mutation on the WT-ASA cDNA. Plasmid DNA that was carrying mutant and normal ASA cDNA was transferred to CHO cells through transient transfection. ASA protein was produced by CHO cells. To measure the efficiency of the transfection, ASA cDNA together with hexosaminidase enzyme beta-altbirim subunit gene were cotransfected to the CHO cells. 48 hours after transfection, cells were collected, homogenized and centrifuged. After protein measurement in supernatant, ASA and hexosaminidase activity were measured. p.307Glu→Lys and p.318Trp→Cys mutations decreased ASA enzyme activity 100% compared to the control. 62 kDa sized ASA protein were detected in normal control sample, in p.307Glu→Lys mutation, and in p.318Trp→Cys mutation, and was not detected in c.1165G deletion mutation by Western blotting. This led to the thought that there is incomplet folding in mutant proteins which leads to lack of activity and that the c.1165G deletion mutation makes an important structural change that causes protein degradation. p.307Glu→Lys change in which there is an inactive protein may be a candidate for chaperone treatment. With this study, it is shown that both mutations reduce ASA activity almost completely similar to how it is in patients, and there are mutant proteins in the cell. p.307Glu→Lys and p.318Trp→Cys mutations cause late infantile form of MLD disease that has a severe clinical phenotype.

Key words: Metachromatik leukodystrophy, arylsulfatase A, Turkish population, mutation, *in vitro* mutagenesis, enzyme activity, transfection, cell culture, Western blot

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. MLD'nin Tanımı.....	3
2.2. Klinik Özellikleri	3
2.2.1. Geç İnfantil Tip MLD	3
2.2.2. Juvenil tip MLD	4
2.2.3. Erişkin tip MLD	4
2.2.4. Sapozin B Eksikliği.....	4
2.3. MLD Hastalığının Tanısı	5
2.4. Prenatal Tanı	6
2.5. Tedavi.....	6
2.5.1. Kemik İliği Transplantasyonu.....	7
2.6. Hayvan Modeli.....	8
2.7. Enzim Defekti	9
2.8. Gen ve RNA.....	9
2.9. ASA Enziminin Yapısı ve Fonksiyonu	11
2.10. ASA Enziminin Yalancı Eksikliği	14
2.11. MLD Hastalığının Moleküler Patolojisi.....	15
2.12. Sülfatlı Glikolipidler	16
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	20
3.1. Gereçler	20
3.1.1. Maddeler	20
3.1.2. Alet ve cihazlar	20
3.2. Yöntemler.....	21

3.2.1. E.coli için Bakteriyel Kültür Ortamları.....	21
3.2.2. Antibiyotik Hazırlanması	21
3.2.3. Ön Kültür Hazırlanması	21
3.2.4. Bakteri Stoklarının Korunması	21
3.2.5. Kompetan Hücre Hazırlanması	21
3.2.6. Transformasyon.....	22
3.2.7. Plazmid DNA İzolasyonu	23
3.2.8. DNA Miktar Tayini.....	25
3.2.9. Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile DNA Kesimi	25
3.2.10. Agaroz Jel Elektroforezi	25
3.2.11. Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu.....	25
3.2.12. Ligasyon.....	26
3.2.13. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)- Mutasyonu Taşıyan Primerlerle ASA cDNA'sı Üzerinde Mutasyonların Oluşturulması.....	26
3.2.14. Hücre Kültürü ve Transfeksiyon.....	28
3.2.15. Protein tayini-“Bicinchoninic” asit (BCA) yöntemi	29
3.2.16. Heksozaminidaz Enzimi Aktivite Tayini	30
3.2.17. ASA Enzimi Aktivite Tayini.....	31
3.2.18. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	31
3.2.19. Western-Blot analizi	32
4. BULGULAR.....	35
4.1. Transformasyon.....	35
4.2. Plazmid DNA Saflaştırması	35
4.3. PZR ile Mutasyonların Oluşturulması	36
4.4. Mutant ve ASA Geni İçermeyen Plazmit DNA'ların Midiprep Sonuçları	38
4.5. Arilsülfataz A ve Heksozaminidaz Enzim Aktivitesi Sonuçları	39
4.6. Western Blot Analizi.....	40
5. TARTIŞMA	41
6. KAYNAKLAR	47
EK1- Besiyeri, Tampon ve Çözeltiler.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

APS	Amonyum Persülfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
MLD	Metakromatik Lökodistrofi
ASA	Arilsülfataz A
SAP-B	Sapozin-B
ER	Endoplazmik Retikulum
TEMED	N,N,N',N' Tetrametiletildiamin
TBE	Tris Borat EDTA
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
WT	Wild Type
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CHO	Chinese Hamster Ovary Cell

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. ASA enziminin serebrozid 3-sülfatı galaktozil seramide hidrolizi...	11
Şekil 2.2. ASA enziminin üç boyutlu yapısı.....	12
Şekil 2.3. ASA monomerinin yapısı.....	13
Şekil 2.4. Dört homodimerin birleşimi ile oluşan ASA oktamer yapısı.....	13
Şekil 2.5. Bazı sülfatlı glikolipidlerin yapısı.....	18
Şekil 3.1. WT-ASA plazmid vektör haritası.....	22
Şekil 3.2. QIAGEN Plasmid Mini-Purification kiti kullanılarak DNA pürifikasyon işlemi ile plazmid DNA saflaştırılması	24
Şekil 3.3. “QuikChange site-directed” mutagenез yöntemi	27
Şekil 4.1. Miniprep işlemi ile elde edilen plazmid DNA’sı içeren örneğin agaroz jel görüntüsü	36
Şekil 4.2. PZR işlemi ile oluşturulan c.919G→A ve c.954G→T mutant DNA’larının agaroz jel görüntüsü.....	37
Şekil 4.3. PZR işlemi ile oluşturulan c.1172C→G ve 1165G delesyonu için mutant DNA’nın agaroz jel görüntüsü.....	38
Şekil 4.4. Midiprep işlemi ile saflaştırılan mutant DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü	38
Şekil 4.5. Midiprep işlemi ile saflaştırılan WT ASA plazmid DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü	39
Şekil 4.6. ASA proteininin Western blot analizi.....	40
Şekil 5.1. ASA proteininin ikincil yapısı.....	42
Şekil 5.2. ASA proteininin üç boyutlu yapısının şema ile gösterimi.....	43
Şekil 5.3. ASA monomeri üzerinde ASA’nın yapay substratı paranitrokatekolsülfat ile aktif merkez aminoasiti Cys69’un oluşturduğu kompleks	45

TABLÖLAR

Tablo 3.1. SDS-PAGE için ayırma jeli bileşimi	32
Tablo 3.2. SDS-PAGE için yığılma jeli bileşimi.....	32
Tablo 4.1. Miniprep işleminden elde edilen örneklerin absorban değerleri ve DNA konsantrasyonları.....	35
Tablo 4.2. Plazmid DNA örneğinin absorban değeri ve DNA konsantrasyonu	36
Tablo 4.3. Örneklerin DNA konsantrasyonu ölçümü.....	39
Tablo 4.4. Transfeksiyon sonrası örneklerde protein, ASA ve Hex aktivite değerleri	40

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Metakromatik lökodistrofi, Arilsülfataz A enzimi ya da aktivatör proteini sapozin B'nin eksikliği ile oluşan otozomal resesif geçişli bir sfingolipit depo hastalığıdır. ASA enziminin fonksiyonundaki bozukluk sonucu 3-O-sülfogalaktozil birimi içeren glikolipitlerin desülfasyonu hatalı olur. Sülfatlı glikolipitler myelin kılıflarında ve periferik sinir sisteminde daha fazla, karaciğer, böbrek, safra kesesi gibi iç organlarda ise daha az bulunurlar. MLD hastalığında parçalanamayan sülfatlı glikolipitler dokularda birikir ve ilerleyici demiyelinizasyona neden olur. MLD hastalığının başlangıç yaşına göre geç infantil, juvenil ve erişkin olmak üzere üç tipi vardır. Bu üç tipte hastalığın klinik başlangıcı ve ciddiyeti değişiklik gösterir. Geç infantil tip genellikle hayatın ikinci yılında başlar ve erken çocukluk döneminde ölümle sonuçlanır. Juvenil tip 4 yaş ve puberte arası dönemde, erişkin tip ise, puberteden sonra herhangi bir yaşta başlar. ASA aktivitesinin eksik olması her zaman tanıyı koymaya yardımcı olmayabilir. Çünkü, yalancı eksiklik mutasyonunu homozigot taşıyan bireylerde %5-15 arasında ASA enzim aktivitesi görülebilmektedir. Ayrıca ASA enzim aktivitesi için kullanılan kolorimetrik substratın hidrolizi sapozin B bağımlı olmadığı için, sapozin B proteininin bozuk olduğu MLD hastalarında da normal ASA enzim aktivitesi görülebilmektedir. Enzim tayininine ek olarak, DNA'ya dayalı metotlar ve aktivatör protein tayini tanıya yardımcı olur.

Bu çalışmada amaç, ülkemizde, geç bebeklik tipi MLD hastalığında daha önceki çalışmalarımızla (1) tanımlanmış olan 2 yanlış anlamlı (ekson 5'te c.919G→A, p.307Glu→Lys ve c.954G→T, p.318Trp→Cys) ve bir polimorfizm mutasyonunu (ekson 7'de c.1172C→G, p.391Thr→Ser) *in vitro* mutagenез yöntemi ile oluşturmak ve enzim aktivitesi, enzim yapısı üzerine etkisini araştırmaktır.

Bu amaçla, bu çalışmada, plazmide takılı ASA cDNA'sı üzerinde 2 yanlış anlamlı (ekson 5'te c.919G→A, p.307Glu→Lys ve c.954G→T, p.318Trp→Cys) ve bir polimorfizm mutasyonu (ekson 7'de c.1172C→G, p.391Thr→Ser) oluşturuldu. Normal ve mutant geni taşıyan plazmid DNA'lar DH5alfa hücrelerine transforme edilip çoğaltıldı ve saflaştırıldı. Daha sonra elde edilen normal ve mutant plazmid DNA'lar CHO hücrelerine geçici transfeksiyon ile aktarıldı. Transfeksiyondan 48

saat sonra elde edilen hücre lizatlarından süpernatantlar ayrıldı, Süpernatanda protein tayini, ASA ve heksozaminidaz enzim analizleri, poliklonal ASA antikoru ile Western blot analizi yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MLD'nin Tanımı

MLD, otozomal resesif geçişli bir sfingolipit depo hastalığıdır. MLD'de 3-0-sülfogalaktozil içeren sfingozin ya da gliserol-içeren glikolipitlerin desülfasyonu bozulmuştur. En önemli 3-0-sülfogalaktozil içeren sfingozin, sülfatiddir (3-0-sülfogalaktozilseramid). Sülfatid, en fazla merkezi ve periferik sinir sisteminde bulunmaktadır. Boşaltım epiteline sahip bazı dokularda örneğin; solunum sistemi ve mide mukozasında, safra kesesi ve uterusun endometrium tabakasında, aynı zamanda serum, idrar, beyin omirilik sıvısı (BOS) gibi vücut sıvılarında da bulunmaktadır.

3-0-sülfogalaktozil içeren glikolipidlerin parçalanmasında ilk basamak ASA enzimi tarafından sülfat gruplarının koparılmasıdır. Bu olay Sapoizin B bağımlıdır.

2.2. Klinik Özellikleri

MLD, dünyada her 40000 canlı doğumda 1 sıklıkta görülmektedir. Hastalık başlangıç yaşına göre 3 klinik alt gruba ayrılmaktadır. Geç infantil tipte (%50-60) 2 yaşında semptomlar gözlenir. Juvenil tipin (%20-30) başlangıç yaşı 3-16'dır. Erişkin başlangıçlı da (%15-20) ise, 16 yaş sonrasında semptomlar ortaya çıkar (1). MLD hastalığı kliniğine ASA eksikliği ve Sapoizin B eksikliği neden olur.

2.2.1. Geç İnfantil Tip MLD

15 ay-2 yaş arasında klinik belirtiler görülür (2). Kazanılmış motor becerilerin kaybı hastalığın karakteristik ilk semptomlarından biridir (3).

Geç infantil tip, MLD hastalığının en sık görülen tipidir. Birçok hastada ataksi ve hipotoni gözlenir. Hastalık hastaların çevre ile ilişkilerini kaybetmelerine kadar varabilen mental bozulmayla devam eder. Bu hastalar genellikle hastalığın başlangıcından 7 yıl sonra kaybedilirler (4). Hagberg sınıflandırmasına göre, klinik gidiş 4 evrede incelenmektedir (5). Birinci evrede çoğu hastanın tüm ekstremitelerinde hipotoni olur. Desteksiz yürüyemezler ve kalkamazlar. İlerleyici polinöropatiye bağlı olarak derin tendon refleksleri azalmıştır. Bu evre birkaç ay, en fazla 1 yıl kadar sürer. İkinci evredeki hastalar uzun süre ayakta kalamazlar. Zeka geriliği oluşabilir. Dizatri ve afazi gelişebilir. Bacaklarda ve kollarında inatçı ağrılar

olur. Kas tonusu artar. Bu evre sadece birkaç ay sürer. Üçüncü evrede bulbar ve psödobulbar parezi gelişir. Beslenme ve solunum güçlüğü ortaya çıkar. Hasta yatağa bağımlı hale gelir. Çocukların %25'inde epileptik nöbetler görülür (6). Son evrede hasta çevreyle iletişimini kaybeder. Nazogastrik ve gastrostomi tüpüyle beslenmek zorunda kalır. Bu evre birkaç yıl sürer ve genellikle semptomların başlamasından yaklaşık 5 yıl sonra ölüm gerçekleşir (7).

2.2.2. Juvenil tip MLD

Juvenil tip MLD hastalığı 4-12 yaşlar arasında başlar. Motor fonksiyon bozukluğu ile karakterizedir. Yaşı daha ileri olan hastalar ise psikoz ve demans gibi duygu-durum bozuklukları görülebilir (2,3). Hastalık ilerledikçe okulda performans düşüklüğü ve yürümede beceriksizlik kademeli olarak artar. Genellikle duygu ve davranış bozuklukları görülür. Spastik paraparezi ve serebellar ataksi gelişir. Hastaların %50 sinde optik atrofi gelişir. Son olarak tam tetrapleji ile çocuklar yatağa bağımlı hale gelir. İlerleyen zamanlarda yutmada güçlük olur ve hastalar besleme tüpüne ihtiyaç duyar. Genellikle 20'li yaşlarda ölüm gerçekleşir (7).

2.2.3. Erişkin tip MLD

Erişkin tip MLD hastalığı puberteden sonra 63 yaşına kadar görülebilmektedir (8). Hastalık yavaş ilerler. Başlangıç semptomları arasında psikiyatrik problemleri düşündürecek davranış değişiklikleri vardır. Bu nedenle tanıda gecikme olur (2,3). Birçok hastada şizofreni, anksiyete ve duygu-durum değişikliği görülür. Okul ya da iş performansında kademeli bir azalma gözlenir. Dışkı ve idrar tutamama, harekette beceriksizlik hastalığın bu tipinde görülen diğer semptomlardır.

2.2.4. Sapozin B Eksikliği

Sapozin B eksikliği 1979 yılında Shapiro ve ark. tarafından ilk kez rapor edilmiştir. O tarihten bu yana sapozin B eksikliği sadece birkaç hastada tanımlanmıştır (9). Başlangıç yaşının doğumdan itibaren 30 yaşına kadar olduğu kabul edilmektedir (10). ASA enzimi normaldir, ancak aktivatör proteini eksik

olduğu için sülfatidi hidroliz edememektedir. Bu nedenle Sapozin B eksikliğine sahip hastaların kliniği, ASA eksikliği nedeniyle oluşan MLD hastalığına benzemektedir.

2.3. MLD Hastalığının Tanısı

MLD hastalığının başlangıç belirtileri hayatın ilk yılı ile 7. dekat arasında herhangi bir yaşta görülebilir. Entellektüel kayıp, halsizlik, koordinasyon kaybı erken belirtilerdir. İlerleyen dönemlerde spastik tetraparezi ve inkontinans görülebilir. Optik atrofi ve periferik nöropati varlığı tanıya önemli katkı sağlar. Beyin BT ya da MRI, sinir iletim hızı ölçümü ve uyarılmış potansiyel çalışması tanıda kullanılan klinik laboratuvar testleridir. Belirgin semptomu olan hastalarda beyinin beyaz cevher hasarını gösteren karakteristik BT ya da MRI değişiklikleri izlenir. Hastalığın tanısı klinik belirtilere dayansa da, kesin tanı için biyokimyasal testlere ihtiyaç vardır (7). MLD tanısında kullanılan başlıca laboratuvar testi ASA aktivite tayinidir. Enzim analizi, diğer biyokimyasal testler ve mutasyon analizi ile beraber değerlendirildiğinde daha hassas tanı konulmasını sağlar (11).

Bireyler arasında değişik varyasyonlarda enzim aktivitesi görüldüğü için enzim analizi yanılgıya neden olabilir. Fibroblast kültürlerinde ölçülebilir ASA aktivitesi kültür koşullarına ve yalancı eksiklik allel varlığına bağlı olarak değişir. %5-15 rezidüel aktiviteye sahip yalancı eksiklik alleli bulunması tanıda ya da taşıyıcılığı değerlendirmede hataya neden olur. MLD hastalarında idrara sülfatid atılımı artar. Fakat yalancı eksiklik mutasyonu taşıyan hastalarda normal ya da çok az bir atılım gözlenir (12). ASA aktivite tayini için en uygun ve güvenilir kaynaklar lökositler ve fibroblast kültürleridir. ASA ekspresyonu tüm dokularda olur. Bu nedenle diğer dokularda ve vücut sıvılarında da aktivite ölçümü yapılabilmektedir (13,14).

Yapay p-nitrokatekol sülfat ve 4-metilumbelliferil sülfat kolorimetrik ve fluorometrik ASA tayininde kullanılmaktadır. İyon değiştirici kromatografi, elektroforez ya da izoelektrik odaklama tekniklerinden yararlanarak ASA enzimi saflaştırıldıktan sonra, aktivite tayini yapıldığında testin özgülülüğü artabilmektedir (15,16). Sapozin B eksikliği nedeniyle oluşan MLD'de normal ASA aktivitesi gözlenir. Çünkü ASA aktivite tayini aktivatör proteininden bağımsızdır. Bu

hastaların idrarında sülfatid saptanabilir. Bu bağlamda mutasyon analizinin tanıdaki önemi artmaktadır (17).

ASA geninde 459+1G>A, P426L ve I1179S mutasyonları en sık rastlanan 3 mutasyondur ve MLD hastalarının %50 sine yakınında bu mutasyonlar bulunur (12).

Yalancı eksiklik mutasyonu ve sapozin B eksikliği enzim analizi ile yapılan tanıda önemli sorunlara yol açmaktadır. Homozigot yalancı eksiklik mutasyonu olan ve hem yalancı eksiklik mutasyonu, hem de MLD hastalık mutasyonuna aynı anda sahip hastalarda yapılan kolorimetrik aktivite tayinlerinde MLD hastaları ile örtüşen sonuçlar görülebilmektedir. Sapozin B eksikliğinde sentetik substrat kullanılarak yapılan ASA ölçümleri normal seviyelerdedir. Bu nedenle MLD hastalığını kanıtlamak ya da dışlamak için ASA aktivite ölçümü tek başına yeterli olmamaktadır. Nörolojik semptom gösterebilen yalancı eksiklik mutasyonuna sahip kişiler MLD hastaları ile karıştırılabilir. Yalancı eksiklik mutasyonuna sahip bireyler MLD'den sülfatid yükleme testi ile ayırt edilebilir. Oldukça zahmetli ve pahalı olan bu test bu durumu ayırt etmek için kullanılan tek güvenilir yöntemdir. MLD hastalarının aksine yalancı eksiklik mutasyonuna sahip bireylerin idrarlarında sülfatid bulunmaz. İdrara lipid atılım miktarı da ASA eksikliklerini ayırt etmek için kullanılabilir (7).

2.4. Prenatal Tanı

Prenatal tanı için kültürü yapılan amniyon hücrelerinde, koryonik villuslarda (6-10. gebelik haftası) ya da koryonik villuslardan üretilen hücrelerde ASA aktivite ölçümü yapılabilir. Ancak tanıyı desteklemede tek başına yeterli değildir. Kültürü yapılan hücrelerde ASA aktivitesi hücrelerin büyüme durumuna bağlıdır. Birçok lizozomal enzim aktivitesi hücrelerin konfluens duruma geçmesiyle beraber artmaktadır.

2.5. Tedavi

Şu anda, bu yıkıcı hastalığın öldürücü sonuçlarını tersine çevirebilecek hiçbir etkili tedavi yoktur (12). Diyet tedavisi, enzim replasman tedavisi (ERT) ya da mutant enzimi aktive ya da inaktive eden ilaç tedavileri başarısızdır. Hematopoetik hücre transplantasyonunun (HKHT), genellikle belirgin nöropsikolojik veya

nörolojik bulguları olan hastalarda ve geç infantil tip MLD hastalığı olan çocuklarda etkisiz olduğu kanıtlanmıştır (18,19). Enzim replasman tedavisinin klinik denemeleri yapılmaya başlanmıştır, ancak kan-beyin bariyeri sistemik olarak uygulanan terapötik moleküller için önemli bir engel teşkil etmektedir (12). ERT ömür boyu uygulama gerektiren bir tedavi şeklidir ve kan-beyin bariyeri sistematik tedavinin beyine ulaşmasına izin vermeyerek etkilerini kısıtlamaktadır. Ayrıca ekzojen bir proteinin devamlı paranteral uygulanması beraberinde immün cevabı indüklemeye riskini taşımaktadır (12). Hastalığın ciddiyeti ve etkili tedavilerin yokluğu yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyacı gerektirmektedir. Konvansiyonel allojenik HKHT ile karşılaştırıldığında gen tedavisi stratejileri önemli bir ilerlemeyi temsil edebilir. Otolog hematopoetik hücreler, yüksek düzeyde terapötik enzim üretmeleri için genetik olarak değiştirilebilir. Ayrıca, otolog transplantasyon önemli ölçüde nakil ile ilişkili morbiditeyi azaltır ve “Graft versus host” hastalığı (GVHD) riskini önler (12). HKHT gen terapisi uzun zaman lizozomal depo hastalıkları tedavisi için çekici bir seçenek olarak görülmüştür. Otolog HKHT gen tedavisi ile, Merkezi Sinir Sistemine (MSS) daha yüksek seviyede ve daha etkili fonksiyonel enzim sağlanabilir. Allojenik HKHT yan etkileri, bu tedavi ile azaltılabilir. Bu tedavi transplantasyonla ilgili morbitide ve GVHD riskini engelleyebilir. Hastalık belirtileri kontrolünde HKHT gen tedavisinin tedavi edici etkinliği, MLD hastalığının klinik öncesi modellerinde de gösterilmiştir (20,21).

Yeni çalışmalarla, insan ASA cDNA'sı rekombinant bir retroviral vektör içine yerleştirilerek, geç infantil tip MLD hücrelerine aktarılmıştır. Retroviral gen transferinden sonra hasta hücrelerde tek başına vektör uygulanan normal insan fibroblast hücrelerine kıyasla 5-10 kat daha yüksek ASA aktivitesi saptanmıştır. Normal ASA proteini sentezlendiği ve sentezlendikten sonra işlenip lizozoma alındığı gösterilmiştir (22,23).

2.5.1. Kemik İliği Transplantasyonu

Hematopoietik kök hücre tedavisinin amacı, alıcının hematopoietik ve lenfoid dokularını fonksiyonel enzim salgılayan hücrelerle doldurmaktır. Makrofaj ve mikrogliya biriken materyalin katabolizmasında önemli etkiye sahiptir. HKHT belirgin nörolojik semptomları olan ya da erken ve agresif infantil tip hastalığa sahip

olanlarda etkisizdir. Bunun ana nedeni, alıcı doku makrofaj ve mikroglia replasmanının yavaş hızda gerçekleşmesi ve primer hastalığın hızlı ilerleyici olmasıdır (12).

Hematopoietik kök hücre kullanılarak yapılan gen tedavisinin lizozomal depo hastalıkları için önemli bir seçenek olduğu düşünülmektedir. Otolog hematopoietik kök hücre gen tedavisi ile etkilenen dokular, vericinin myeloid hücreleri (MSS mikroglia dahil) tarafından doldurulur. Otolog hücrelerin genetik modifikasyonu ile daha etkili bir tedavi geliştirilebilir. Böylece normal verici hücrelerden daha yüksek düzeyde enzim eksprese eden kaynaklar elde edilebilir. Allojenik hematopoietik kök hücrenin transplantı ile ilişkili morbidite ve GVHH riski bu tedavi ile azaltılabilir.

Tedavinin mantığını anlamak için lizozomal enzimlerin ve mikroglial hücrelerin bazı biyolojik yönlerini bilmek gereklidir. Yeni sentezlenen lizozomal enzim, enzime ve hücre tipine bağlı olarak tamamen lizozoma yönlenebilir. %10-30 oranında enzim salgılayabilir. Salgılanan enzim komşu hücre membranında mannoz 6-fosfat reseptörüne bağlanır. Bu reseptör enzimin endositoz yoluyla içeri alınmasını sağlar ve lizozoma yönlendirir. Salgı yoluyla normal hücre, lizozomal enzimi hasarlı hücreye taşımakta ve metabolik defektin düzelmesini sağlamaktadır. MLD hastalarında enzim glial hücrelere yönlendirilmek zorundadır ancak plazma enzimleri kan beyin bariyerinden geçemezler. Merkezi sinir sisteminin mikroglia hücreleri, diğer adıyla perivasküler mikroglia hücreleri monositik kökenlidir ve kemik iliğinden üretildiği gösterilmiştir. Bu nedenle bu hücrelerin kan beyin bariyerini geçebildiği ve perivasküler mikroglia olarak yerleştiği düşünülebilir. Bu hücreler ASA salgılayabilir ve enzimi hasarlı hücrelere verebilir.

Kemik iliği transplantasyonu hastalığın juvenil ve erişkin tipinde önerilmektedir. Kemik iliği naklinin geç başlangıçlı tiplerinde geç infantil tipden daha etkilidir.

2.6. Hayvan Modeli

MLD sadece insanlarda tanımlanmıştır, doğal olarak oluşan bir hayvan modeli yoktur. Fare embriyonik kök hücrelerinde homolog rekombinasyon yoluyla ASA-eksikliği oluşturulmuştur. Biyokimyasal ve genetik inceleme ile hayvanların ASA aktivitesinin tam yokluğu kanıtlanmış, farelerin böbrek, safra kesesi ve akciğer

epitelinde sülfatid depolandığı gösterilmiştir. MLD'li farelerde nöron dışı dokulardaki birikimin insanlarla büyük ölçüde aynı olduğu, nöronal dokulardaki sülfatid birikiminin ağırlıklı olarak beyaz cevherde, daha az oranda da gri cevherde olduğu saptanmıştır. Beyindeki sülfatid birikimi oligodendrositte, astrositlerde ve bazı nöronlarda bulundu. Nöronlarda sülfatid birikimi, beyin sapı, omurilik, diensefalon ve beyinciğin birkaç çekirdeğinde bulunan nöronlarda gösterildi. Lipid birikimi dışında, diğer çeşitli anormallikler ASA-eksikliği olan farelerin sinir sistemlerinde tespit edildi. Beyaz maddede önemli seviyede astroglisis, hayatın ikinci yılında mikrogial aktivasyon saptandı. Optik sinir aksonları çapında da kontrollerle kıyaslandığında yüzde 70 azalma olduğu gösterildi.

2.7. Enzim Defekti

Primer enzim defekti Arilsülfataz A enziminde olmaktadır. Doğal substratları düşünüldüğünde sülfatidaz ya da serebrozid 3-sülfataz da denilebilmektedir. Laktozilseramid 3-sülfat, seminolipid ve psikozin sülfat diğer doğal substratlarıdır. ASA aktivitesi şimdiye kadar incelenmiş tüm doku ve hücrelerde eksiktir.

2.8. Gen ve RNA

ASA geni 22. kromozomun uzun kolunda q13 bölgesinde bulunmaktadır. 1521 nükleotid uzunluğunda mRNA kodlamaktadır (1).

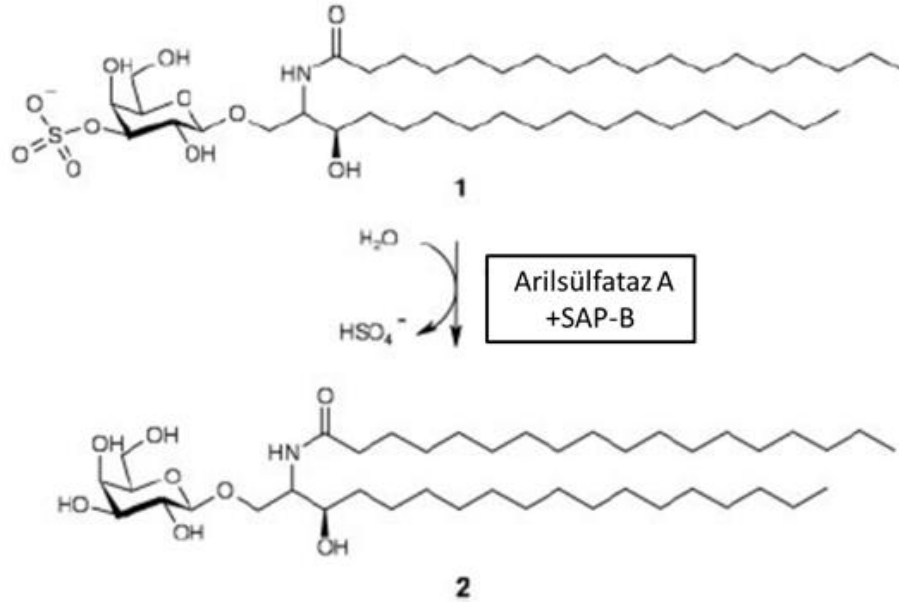
ASA geni 3,2 kb büyüklüğündedir ve 8 ekzondan (103-320 nükleotid uzunluğunda) oluşur (24). Promotör bölgesinde TATA ya da CAT dizileri yoktur ancak birkaç GC kutusu bulunmaktadır. Başlangıç kodonunun ilerisinde 367 ve 387. bazlar arasında 4 transkripsiyon başlangıç bölgesi bulunmaktadır (25).

MLD hastalığına neden olan 90'dan fazla mutasyon bilinmektedir (26). Beyaz ırkta 3 mutasyon en sık görülür. Bunların ilki ekson 2/intron 2 sınırında bulunan kesim bölgesi mutasyonudur. Bu mutasyon sonucu tespit edilebilir bir ASA mRNA ekspresyonu olmamaktadır (27). İkinci sık görülen mutasyon bir yanlış anlamlı mutasyondur (Pro426Leu). 426. pozisyonundaki prolin aminoasitinin lösin aminoasiti ile yer değiştirmesi sonucu oluşmaktadır. Bilinen mutasyonların %25'ini bu iki mutasyon oluşturmaktadır (27,28). Kesim bölgesi mutasyonu %15-%43,2, Pro426Leu mutasyonu ise, %16,2-%25 arasında sıklıkta görülmektedir (28-30).

Homozigot kesim bölgesi mutasyonu için homozigotluk şimdiye kadar sadece geç infantil hastalarda tespit edilmiştir. Homozigot Pro426Leu mutasyonu juvenil ve ya erişkin tip hastalığa neden olur (27). Avusturyalı Juvenil MLD hastalarında Pro426Leu mutasyonu sıklığı %50'nin üzerindedir ve aynı grup hastaların Polonya toplumunda mutasyon sıklığı ise %3,5'un altındadır (30). Genel olarak homozigot mutasyon şiddetli geç infantil tip hastalığa neden olmaktadır. Heterozigot mutasyon ve rezidüel aktivite gösteren mutasyon sıklıkla juvenil hastalarda görülmektedir. Üçüncü sık görülen mutasyon, 179. pozisyonadaki izolösünün serin ile yer değiştirmesidir. Mutasyonların %6'sından sorumludur (31). Bugüne kadar sadece heterozigot mutasyonu tespit edilmiştir (31,32). Sağlıklı bireylerin %2 sinde MLD hastası olmadığı halde önemli bir ASA eksikliği olduğu tespit edilmiştir (33,34). Bu eksikliğin nedeni ASA geninde oluşan polimorfizmlerdir. Yalancı eksiklik olarak adlandırılan bu durum normal enzim aktivitesinde %5-10 kadar azalmaya neden olmaktadır (33). MLD hastası olmayıp kökeni bilinmeyen nörolojik belirtilere ve enzim eksikliğine sahip hastalarda bu durum tanıda karışıklığa neden olmaktadır (33). Türk toplumundaki mutasyonlar Anabilim dalımızda tanımlanan 307Glu →Lys, 318Trp→Cys mutasyonları ile 423-426. aminoasitler arasındaki His-Glu-Pro-Pro normal dizilimin Pro-Pro-Pro dizilimi değişikliği sonucu oluşan mutasyonlardır (35,36).

2.9. ASA Enziminin Yapısı ve Fonksiyonu

ASA doğal substratı olan serebrozid 3-sülfatı parçalayan hidrolitik bir enzimdir.



Şekil 2.1. ASA enziminin serebrozid 3-sülfatı (1), galaktozil seramide (2) hidrolizi.

Sfingolipid aktivatör protein (SAP-B) sfingolipidlerin çözünürlüğünün artmasına yardımcı olan bir kofaktördür.

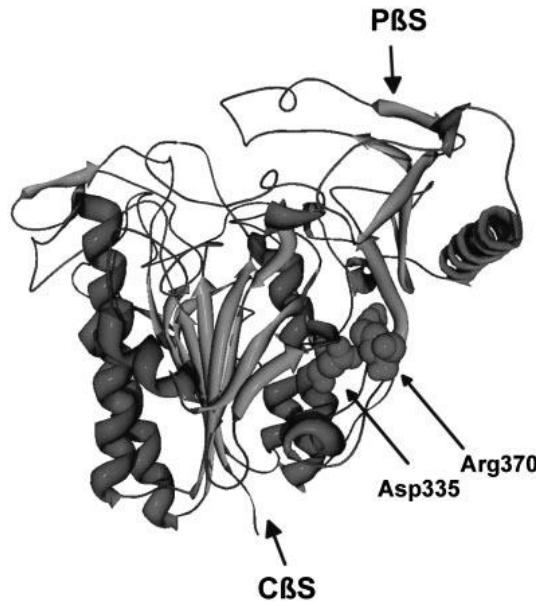
ASA, sülfataz ailesine ait bir enzimdir. Bu ailenin üyeleri mukopolisakkaridlerin, serebrozitlerin ve steroidlerin dahil olduğu çeşitli sülfat ester bağları içeren bileşiklerin hidrolizini gerçekleştirir. Bilinen diğer sekiz sülfataz ile insandaki ASA, %47-59 gibi yüksek bir dizi benzerliğine sahiptir (37).

ASA tüm dokularda bulunan ve gerekli bir proteindir. ASA birçok sülfat içeren substratı parçalamaktadır. Ana fizyolojik substratı sülfatidlerdir. Laktozil seramid 3-sülfat, seminolipid ve psikozin 3-sülfatta ASA tarafından hidroliz edilmektedir. Kondroidin sülfat, 6-O-sülfogalaktozil seramid ya da galaktoz 6- sülfat ASA tarafından hidroliz edilememektedir. ASA fosfodiesteraz aktivitesine de sahiptir ve cAMP ve cGMP'yi parçalayabilmektedir. *In vitro* ASA aktivitesi genellikle yapay bir substrat olan p-nitrokatekolsülfat ile saptanmaktadır (7).

Lizozomal sülfatazlar yapı olarak benzer (homolog) ancak farklı fonksiyonlara sahip bir enzim grubudur (38). ASA (EC 3.1.6.8), bir sfingolipid olan

3-O-sülfogalaktozseramidi sülfat parçasından ayırır. ASA proteini 62-kDa'luk bir polipeptid olarak sentezlenir; 158, 184, ve 350. pozisyonlarındaki asparajin aminoasitlerinde 3 adet N-bağlı oligosakkarit yan zinciri taşır. İki oligosakkarit yan zinciri (Asn-158 ve 350) fosfotransferazlar tarafından tanınmasına karşın, Asn-184 de bulunan oligosakkarit yan zinciri fosforile olmaz (39).

ASA enziminin kristal yapısı 1998 yılında açığa kavuşturulmuştur (40). İkincil yapısı incelendiğinde enzimin merkezinde etrafı α -helikslerle çevrili paralel β -tabaka yapılar bulunmaktadır. Enzimin çevresinde de 4 adet antiparalel β -tabaka bulunmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. ASA enziminin üç boyutlu yapısı. CBS: merkezi beta zincir, PBS: çevresel beta zincir. Asp335 ve Arg370 dimer yapıda tuz köprüsü oluşturmada görev alan aminoasitlerdendir (41).

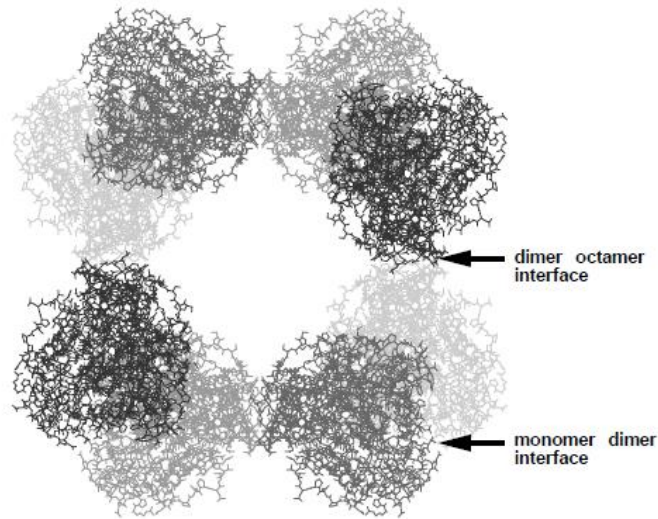
Homo-oktomer yapısında bulunduğu pH:5'te enzim, optimal katalitik aktivitesini göstermektedir. Daha yüksek pH'da ise, enzim homodimer yapısına sahiptir.

Globüler ASA monomerleri şapka-şekilli yapıda ve 489 aminoasitten oluşmaktadır. Enzimin aktif bölgesinde formilglisin kalıntısı (cys69) ile beraber Mg^{+2} bulunmaktadır. ASA 4 homodimerden ($\alpha 2$) oluşan homo-oktomer ($\alpha 2$)₄ yapısındadır. Monomer-monomer etkileşimin bulunduğu 2 adet yüzey vardır. Bunlardan daha büyük olan yüzey homodimerler içinde monomer-monomer

etkileşimini sağlar. Diğer küçük olan yüzey ise, dimer-dimer etkileşimini sağlamakta ve esas olarak birbirine yakın antiparalel α -heliksler arasındaki hidrofobik etkileşimler tarafından oluşturulmaktadır.



Şekil 2.3. ASA monomerinin yapısı, ikincil yapıda alfa heliks ve beta tabakalı yapılar görülmektedir (42).



Şekil 2.4. Dört homodimerin birleşimi ile oluşan ASA oktamer yapısı. Yapıda dimer-dimer ve monomer-dimer etkileşim bölgeleri görülmektedir (42).

ASA proteini granüllü endoplazmik retikulumda 507 aminoasitlik öncül protein halinde sentezlenir. Endoplazmik retikulumda çeşitli sentez sonrası düzenlemeler geçirir. 69. pozisyondaki sistein aminoasitinin protein sentezlendikten sonra oksidasyonu ile oluşan formilglisin69 kalıntısı sülfataz aktivitesi için çok önemlidir (25). Yeni sentezlenen enzimin aktif olabilmesi için, bu sentez sonrası değişikliğin mutlaka olması gereklidir. Formilglisin rezidüsü tiyol grubunun aldehit grubuna oksidasyonu ile protein translokasyonunun son evrelerinde doğal yapısını kazanmadan oluşmaktadır ve Cys69 etrafındaki 16 aa'lık lineer kalıntı bu modifikasyon için gereklidir.

ASA proteininden, Endoplazmik retikulum (ER) lümeninde sinyal peptidi ayrılır ve enzim 3 asparajin aminoasiti üzerinden N-glikozillenir. Enzim protein ER'den mannozdan zengin oligosakkarit yan zincirleri üzerinde mannoz 6-fosfat (M6P) kalıntılarını kazandığı Golgi aygıtına taşınır. Veziküler transport yoluyla Golgi aygıtından lizozoma gelen M6P taşıyan enzimler M6P reseptörüne bağlanırlar (43). Lizozomal enzimlerin Golgi aygıtında fosfodiesterazlar tarafından tanınması kritik bir aşamadır. Bu enzim salgılanacak proteinlerin lizozomal enzimlerden ayırt edebilmesini sağlamaktadır. Lizin kalıntıları çeşitli lizozomal enzimler de dahil olmak üzere ASA'nın fosfodiesterazlar tarafından tanınmasında önemli rol oynamaktadır (44). Lizozomal enzimler, Golgi aygıtında iki aşamalı bir süreçte mannoz 6-fosfat kalıntıları kazanır. N-asetilglukozaminfosfotransferaz enzimi ile oligosakkarit yan zincirlerinin mannoz kalıntılarına N-asetilglukozamin 1-fosfat transfer edilir. İkinci aşamada fosfodiesteraz enzimi ile N-asetilglukozamin kaldırılarak mannoz 6-fosfat kalıntısı oluşur. Bu kalıntı M6P reseptörüne bağlanabilir (43). ASA diğer lizozomal enzimlerden farklı olarak transport sırasında ya da lizozoma taşınmasından sonra proteolitik bir yıkım geçirmemektedir (7).

2.10. ASA Enziminin Yalancı Eksikliği

Sağlıklı bireylerde düşük ASA aktivitesiyle karakterize bir durumdur. İlk olarak MLD hastalarının yakınlarında hastalara benzer şekilde düşük ASA aktivitesine sahip bireyler de tanımlanmıştır (45). Avrupa toplumları arasında %1-2 oranında görülmektedir. ASA yalancı eksikliğinde hücrelerde metakromatik madde birikimi olmaz ve idrara sülfatid atılımı normaldir. Etkilenen bireyler yaklaşık %5-15

normal ASA aktivitesine sahiptir ve bu düzeyde enzim aktivitesi normal sülfatid metabolizmasının devamı için yeterlidir (46-48). ASA yalancı eksikliğine neden olan 2 adet A—G baz değişimi gösterilmiştir. Bunların biri 350.aa dizisinde arjininin serinle yerdeğiştirmesine neden olmaktadır. Bu mutasyon 1 tane N-glikozilasyon bölgesi kaybına yol açar. Normal ASA enzimi protein yapısında 3 tane N-glikozilasyon bölgesi bulunmasına rağmen, ASA-PD de 2 adet N-glikozilasyon bölgesi bulunmaktadır (39). Bundan dolayı ASA enzimi yapı olarak daha küçük boyutlarda olmaktadır. Tek başına bu mutasyon ASA aktivitesinde bir azalmaya neden olmamaktadır (33). Diğer A—G baz değişimi dur kodonundan 95 bç ilerideki poliadenilasyon sinyalinde olmaktadır. Bu durum 2,1 kb büyüklüğündeki mRNA'nın eksikliğine neden olur. Bundan dolayı ASA sentezi azalır. N-glikozilasyon ve poliadenilasyon bölge polimorfizmleri tek başına incelendiğinde, N-glikozilasyon bölge polimorfizmi wild-type allele kıyasla %50 aktivite göstermektedir, poliadenilasyon bölge polimorfizminde ise %10 dan daha az aktivite tespit edilmiştir (49). Avrupa toplumlarında yalancı eksiklik alleli sıklığı %10-20 arasında değişmektedir (50).

Yalancı eksiklik durumunda N-glikozilasyon bölge kaybına poliadenilasyon sinyal kaybından daha sık rastlanmaktadır. Türk popülasyonunda ASA PD mutasyon sıklığı %11,5'dur (51).

2.11. MLD Hastalığının Moleküler Patolojisi

Birçok mutasyon için genetik değişiklik ile enzim eksikliği arasındaki ilişki kolayca kurulabilir. Bu durum bazı anlamsız ya da mRNA üretimini kuvvetlice engelleyen kesim bölgesi mutasyonları için geçerlidir (27,30,31). ASA enziminin üç boyutlu yapısı bilinmesine rağmen yanlış anlamlı mutasyonlarda bu şekilde bir bilgiye sahip olmak için detaylı biyokimyasal deneylere ihtiyaç vardır (40). Normal enzim aktivitesi gösteren ASA'daki P426L mutasyonu bu duruma çok iyi bir örnektir (52). Bu mutasyona sahip hücrelerde normal miktarda ve normal aktiviteye sahip mutant enzim sentez edilir (53,54). ASA P426L mutasyonu olan ASA proteininin kristalize X ışını analizinde önemli bir yapısal değişim tespit edilememiştir. Lizozoma uygun şekilde taşınımı gerçekleşir, fakat daha sonra lizozom içinde hızlı bir şekilde parçalanır (53). Bu mutasyonun ASA proteininin oktamerizasyonunu

olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Lizozomlarda proteaza dirençli enzimin üretilmesi ve canlılığının devamı için bu süreç gereklidir. Fibroblast kültürlerinde hücrelere sistein proteinaz uygulandığında yeterli seviyede bir sülfatid metabolizması gerçekleşmektedir (53).

309. aminoasit olan glisinin serin ile yer değiştirmesinde aynı durum gözlenmektedir. Enzimatik aktivite korunmakta, ancak enzimin lizozom içi yarı ömrü ciddi şekilde azalmaktadır (55).

MLD'de 7 tane yalancı eksiklik mutasyonu tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar tanısı testlerde karışıklığa yol açmaktadır. Yalancı allel mutasyonlarından 5 tanesi ASA proteininde aminoasit yer değiştirmesine, 2 tanesi ise, 1 ya da 2 aminoasitin delesyonuna neden olmaktadır (7).

ASA proteininin üç boyutlu yapısını bilmek mutasyonların etkisini anlamayı kolaylaştırmaktadır. Bugüne kadar olan hiçbir mutasyon enzimin katalitik aktivitesi ile ilişkili aminoasidi etkilememiştir. Yarıdan fazla mutasyon enzimin yüzey bölgesini diğer yarısı iç bölgesini etkilemektedir. Mutasyonların %60 dan fazlası alfa-heliks ve ya beta-tabaka dışında yapısal olmayan bölgelerdedir. Geri kalanları alfa helikslerde ve beta-tabakalarda bulunmaktadır. ASA ya özgü olan sisteinden zengin C-terminal bölgesi hemen hemen mutasyondan uzaktır. Çeşitli mutasyonlar merkez beta-tabakayı (G119R, G122S, A224V, T274M, A314T, G325C) ve periferik beta-tabakaları etkiler (R390Q, R390W, H397W, P426L, L428P). Alfa-helikslerde A212V, T201Y, S250Y, D255H, G308V ve G309S mutasyonları olmaktadır.

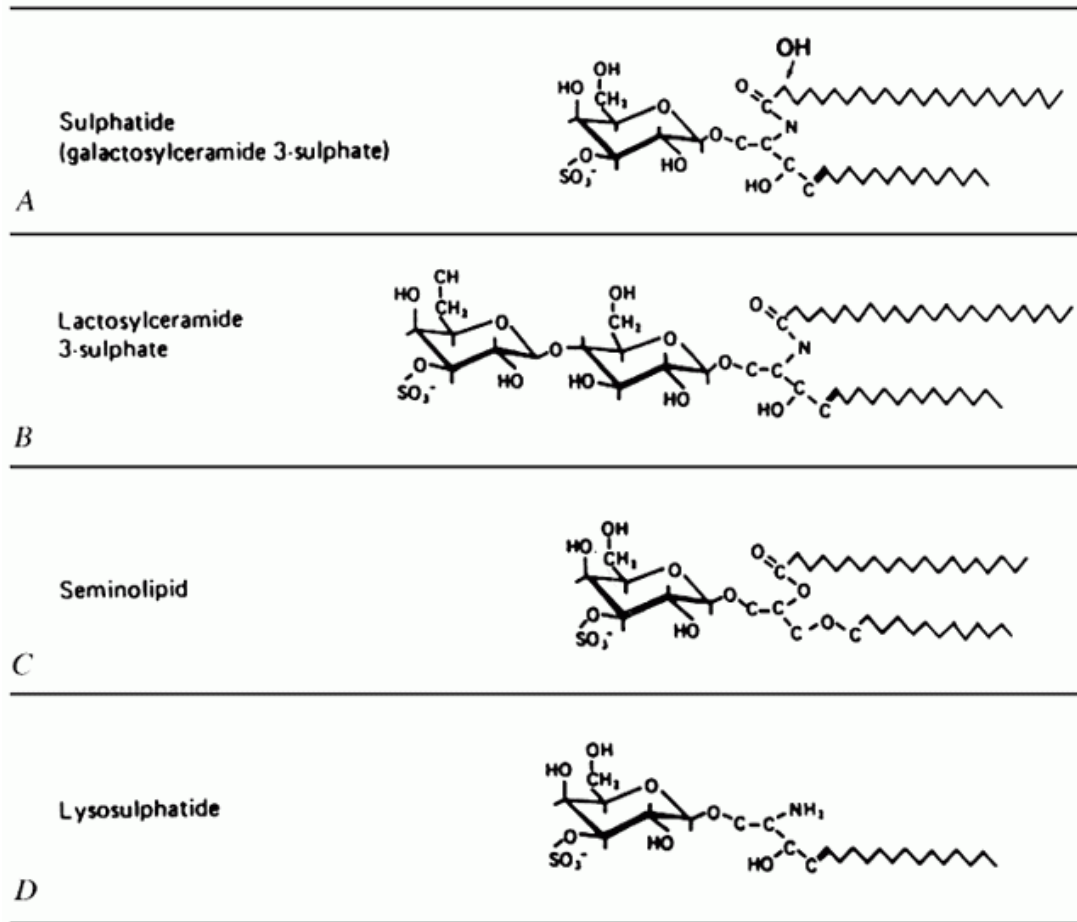
2.12. Sülfatlı Glikolipidler

Galaktozilsülfatid ilk keşfedilen memeli sülfatlı glikolipidlerinden olup, 1884'te Thudichum tarafından insan beyninden saflaştırılmıştır (56). Memelilerde bulunan başlıca iki sülfoglikolipid vardır. Bunlar sülfatid ve seminolipiddir. Sülfatid bir sfingolipiddir. Seminolipid ise, eter glikolipiddir. Sülfatid miyelin kılıftaki ana lipid komponentidir ve miyelin üreten hücrelerde, oligodendrositlerde sentezlenir. Seminolipid spermatositlerde sentezlenir. Sülfatid ve seminolipidin karbohidrat yan zinciri benzer yapıdadır ve seramid galaktoziltransferaz ve serebrozid sülfotransferaz sentezde görevli enzimlerdir. Seramid galaktoziltransferaz endoplazmik retikulumda, serebrozid sülfotransferaz ise Golgi membranında bulunur (57).

Sülfogalaktozilseramid asidik bir glikosfingolipittir ve süfatid olarak ta adlandırılır. 3-O-sülfogalaktozilseramid (serebrozidsülfatid) merkezi ve periferik sinir sisteminde miyelin kılıfının başlıca bileşenlerindendir. Aynı zamanda böbrekte, gastrointestinal kanalda ve endometriyumda bulunur (56). Nöron hücre farklılaşmasında, myelin oluşumunda, miyelin yapısının korunmasında rolü olduğu düşünülmektedir (58). Platelet agregasyonunda P-selektin yolu ile rolü olduğu bilinir (59). Sülfatidlere bağlanarak etkisi olduğu bilinen diğer hücre dışı proteinler laminin, trombospondin (60,61) ve büyüme faktörüdür. Kolorektal, hepatoselüler, renal, beyin, küçük hücreli akciğer ve over kanserlerinde sülfatid düzeyleri artmış bulunabilir (62-66).

Sinir sisteminde miyelin kılıfında sülfatid fazla miktarda bulunmaktadır. Sülfatid, miyelin lipidlerinin %4-6'sını oluşturmaktadır (67). Galaktozilseramid ile beraber sülfatid miyelin lipidlerinin yaklaşık üçte birini oluşturmaktadır.

Sülfatid sentezi ER zarının lümenal yüzeyinde, UDP-galaktozdan galaktozun seramide transferi ile başlar. Reaksiyonu UDP-galaktoz:seramid galaktoziltransferaz [CGT (EC 2.4.1.45)] enzimi katalizler (68). ER'de artmış UDP-galaktoz konsantrasyonu UDP-galaktoz taşıyıcı proteini ile sağlanır (69). Galaktozilseramidin Golgi'ye taşınmasından sonra, son olarak 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosülfat:serebrozid sülfotransferaz (CST; EC 2.8.2.11) enzimi tarafından sülfatid sentezlenir. CST enzimi Golgi'de yerleşik homodimer yapıda bir proteindir (70). Sülfatid yıkımı ASA enzimi tarafından sülfat grubunun hidrolizi ile lizozomda gerçekleşir. SAP-B proteini, membranlardan sülfatidi kopararak ASA enzimine sunar (71).



Şekil 2.5. Bazı sülfatlı glikolipidlerin yapısı. Sülfatidlerin doğal yapısında değişik yağ açıl gruplarının ve sfingozin uzun zincirli bazıları görmek mümkündür (A) 3-0-Sülfogalaktozil seramid; sülfatid; 3-0- Sülfogalaktozil serebrozid. (B) Laktozil-seramid 3-sülfat, laktozil sülfatid. (C) Seminolipid; 3-0- Sülfogalaktozil gliserolipid. (D) 3-0- Sülfogalaktozil sfingozin; lizosülfatid; psikozin sülfat (74).

Beyinden sonra en fazla sülfatid içeren organ böbrektir. Sülfatid böbrekte beyindeki sülfatid konsantrasyonunun onda biri miktarda bulunur. Buna karşılık böbrekte beyin dokusuna kıyasla, 10 kat fazla behenik asit vardır. Böbrekte nervonik asit konsantrasyonu lignoserik asitten daha fazla bulunur (72). Laktozil seramid 3-sülfat böbrek dokusunda ve idrarda bulunur, ancak beyin dokusunda bulunmaz (73), esas olarak karaciğerde bulunur. Deaçile sülfatlı bir glikolipid olan psikozin sülfat (lizosülfatid) beyin beyaz cevheri, omurilik ve böbrekte az miktarda bulunur (74).

Sülfogalaktoyliserolipidlerin diaçil ve alkilaçil şekilleri fare beyinde sülfatlı glikolipidlerin %2,1-7,2 sini oluşturmaktadır. Alkilaçil yapısı genel olarak

seminolipidler diye adlandırılır. Memeli testisi ve sperminde bulunan başlıca sülfolipittir (75).

Son yıllarda başka sülfatlı glikolipidler de tanımlanmıştır. Bunların bazıları barsak epitel hücrelerinin zarlarında bulunmaktadır (76). Şekerlerinin 6 nolu OH grubuna süfat eklenerek glukozilseramid, trihekzoilseramid ve trihekzoilalkilaçilseramid sülfatlanabilir. Bu sülfatlı glikolipidlerin mukozal bütünlükte katkısı olduğu bilinmekte ve ülser patogeneğinde etkisi olduğu düşünülmektedir. Böbrekte ve sütte sülfatlı ganglioizidler bulunmaktadır (77). 3-O-sülfatlı glukuronik asit rezidüsü HNK-1 (human natural killer-1) ile antijen reaksiyonunun bir parçası olarak tanımlanmıştır. HNK-1 T hücreleri tarafından membrana yönlendirilen ve gelişen sinir sisteminde seçilmiş bazı hücelere etkili bir antikordur (78). MLD hastalığında bu sonradan bulunan sülfatlı glikolipidlerin birikimi gösterilememiştir. Sülfatlı glikolipidlerden yalnızca sülfatidler, laktozilseramid 3-sülfat ve seminolipidler ASA enziminin etkisi ile sülfat gruplarını kaybederler.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Maddeler

Agar, agaroz, akrilamid, ampisilin, bisakrilamid, amonyum persülfat, asetik asit, borik asit, bromfenol mavisi, etilendiamintetraasetikasit (EDTA), gliserol, izopropanol, etanol, glisin, metanol, tween-20, sığır serum albümini (BSA), DNA marker (GenKB LC DNA Ladder GM1000-LC), etidyum bromür, sodyum klorür, tris, trizma baz, HCl, sodyumdodesil sülfat (SDS), Taq DNA polimeraz, T4 DNA ligaz, MgCl₂, sodyum hidroksit (NaOH), protein marker (Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers), bisinkoninik asit, yeast extract, sükröz, fikol, EcoR1 restriksiyon enzimi, soyum karbonat, sodyum tartrat, sodyum bikarbonat, bakır sülfat pentahidrat, p-nitrokatekol sülfat, tetrasodyum pirofosfat, soyum asetat trihidrat, 4-MUG, kalsiyum klorür, bakto-triptan, MOPS, PCR primerleri, dNTPler, DMEM besiyeri, PBS Sigma Chemical company, ABD'den, DH5alpha hücreleri İnvitrogene'den sağlanmıştır. Kullanılan diğer kimyasal malzemeler analitik saflıktadır. CHO hücreleri Prof. Dr. Nuhan Puralı (Hacettepe, Ankara)'dan temin edildi. WT ASA plazmidi ve ASA antikoru Prof.Dr. Volkmar Gieselmann (Bonn Üniversitesi, Almanya) tarafından sağlandı.

3.1.2. Alet ve cihazlar

Deneylerde, Thermocycler (İCycler Biorad), kuru ısıtıcı (Techne Dri-Block DB-2D), elektroforez tankı (Owl EasyCast B1A Mini Gel Electrophoresis Systems), güç kaynağı (Consort EV 265), pH Metre (Consort C830 multi-parameter analyser), hassas tartım cihazı (Mettler Toledo AG 204), kaba Tartım Cihazı (E.Mettler Zurich), soğutmalı santrifüj (Nüve NF 800R), mini santrifüj (Hettich zentrifugen mikro 22), saf su cihazı (Nanopure infinity Bernstead), dikey çalkalayıcı (FinePCR compact rocker CR100), yatay çalkalayıcı (Heidolph Titramax 101), Vorteks (MS2 minishaker IKA), su banyosu cihazı (mrc BH-200), ısı kontrollü çalkalamalı etüv (Hybridization incubator combi-SV12 FinePCR), jel görüntüleme sistemi (KODAK Gel Logic 1500 Imaging System), ELİSA Plate Okuyucu (SpectraMax M2

Molecular Devices), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601 spectrophotometer), buz makinesi (Fiocchetti AF 100), derin dondurucu -20°C (Arçelik), derin dondurucu -80°C (Sanyo MDF-U6086S), mikrodalga fırın (Bosch), SDS-PAGE Sistemi (Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell), Western blot sistemi (Bio-Rad Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell), UV transillüminatör (Herolab UVT-20M), laminar akım kabini (NUAİRE NU425-400E), soğutmalı santrifüj (Hettich Rotina 38R), mikroskop (Leica DM IL), CO₂'li inkübatör (NUAİRE NU-5510E) kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. *E.coli* için Bakteriyel Kültür Ortamları

E.coli için gerekli kültür ortamı olarak LB ve LB-agar kullanıldı (bkz. EK1).

3.2.2. Antibiyotik Hazırlanması

Kültürlerde kullanılan ampisilin stokları 50 mg/mL olacak şekilde steril distile su ile hazırlandı. Steril şartlarda LB ortamında ve LB-agarda ampisilin son konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde seyreltildi (79).

3.2.3. Ön Kültür Hazırlanması

-80°C' de bulundurulan DH5α *E.coli* bakterileri platin öze ile alınıp LB-agar'a ekildi. Üreyen bakteri kolonilerden tek bir koloni alınarak 3-4 ml sıvı LB ortamına aşılandı. 37°C' de çalkalayıcı 232 rpm hızda 16-18 saat inkübe edildi (80).

3.2.4. Bakteri Stoklarının Korunması

İlgili bakteri soyları ve plazmid soyları ön kültürle üretildikten sonra %99'luk steril gliserolle son konsantrasyonu % 15 olacak şekilde sulandırıldı. Direkt olarak –80°C dondurucu içerisine alınarak muhafaza edildi (80).

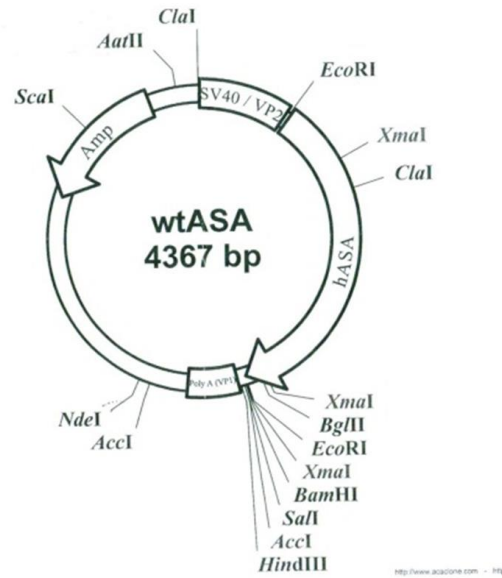
3.2.5. Kompetan Hücre Hazırlanması

DH5-α *E.coli* hücreleri, 5 ml LB içinde 16 saat 37°C'de 232 rpm de çalkalanarak inkübe edildi. Daha sonra 100 ml LB besiyerine aktarılarak OD600 0,5 ile 0,6 arasına gelinceye kadar çalkalamalı etüvde 37°C'de inkübe edildi. 50 ml

hacimlere ayrıldıktan sonra 15 dakika buz üzerinde bekletildi. 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. 10 ml TFB-1 tamponu ile pellet yeniden çözüldü ve 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Daha sonra tekrar çöktürülerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 2 ml TFB-2 tamponu ile çözülerek 100-200 µl olacak şekilde ependorflara paylaştırıldı. İşlem sonunda 3 ependorf tüpüne 50, 100 ve 150 µl kompetan hücre konuldu. Geri kalan kompetan hücreler, her 100 µl kompetan bakteri için, 7 µl DMSO eklenerek -80°C’de saklandı (81).

3.2.6. Transformasyon

Transformasyon, hücre duvarı geçirgen hale getirilmiş (competent) *E. coli* bakterisine plazmid DNA’nın aktarılması işlemidir. ASA genini içeren plazmidin şeması Şekil 3.1. de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. WT-ASA plazmid vektör haritası

-80°C’de saklanan kompetan hücreler alındı ve 30-60 dakika süreyle buzda bekletildi. Ependorfa 50-100 µl kompetent hücreden alındı ve üzerine 50-150 ng plazmid DNA koyuldu. Dikkatlice karıştırılarak 30 dakika buz içinde bekletildi. Isı şoku için 42°C’de 90 saniye ısıtıcı blok içerisinde tutuldu ve hemen buza alınarak burada da 2 dakika bekletildi. Önceden 37°C ısıtılmış 800 µl SOC Besiyeri, DNA-kompetant hücre karışımı üzerine eklendi. 37°C’de çalkalayıcı etüvde 1 saat inkübe

edildi. Bu kültürün 100 µl'si alınarak taze hazırlanmış, 100 µg/ml ampisilin içeren LB-agar petrisine damlatıldı ve öze ile tek koloni tarzında ekim yapıldı. Petrideki kolonilerin durumuna bakarak transformasyon etkinliği saptandı. Bu plaklardan tek koloni alınıp 3 ml ampisilinli LB sıvı besiyerlerine ekim yapıldı. 37°C de inkübasyon gerçekleştirildi. 10 saat sonunda tüm besiyerlerinde üreme gözlemlendi.

50, 100 ve 150 ng plazmid DNA, 50 ve 100 µl hacimlerindeki kompetan *E.coli* hücrelerine 6 farklı şekilde transforme edildi. Bu şekilde WT ASA plazmid DNA transformasyonu yapılan *E.coli* hücreleri 6 adet ampisilinli LB agara ekildi. 16 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Plaklarda üreme olup olmadığı değerlendirildi. 100 µl kompetan hücreye 50 ve 100 ng plazmid DNA transformasyonu ile yapılan kültürde 3 koloni, 50 µl kompetan hücreye 150 ng plazmid DNA transformasyonu ile yapılan kültürde 1-2 koloni ve 100 µl kompetan hücreye 150 ng plazmid DNA transformasyonu ile yapılan kültürde ise inkübasyon sonunda 4 koloni ürediği görüldü.

Üreme olan plaklardan tek koloni alınıp, 3 ml ampisilinli LB besi yerlerine ekildi. Hazırlanan her bir kültür ortamı için 37°C'de çalkalayıcı etüvde ortalama 7 saatlik inkübasyon gerçekleştirildi. Yeterli üreme olduğu görüldükten sonra önce herbir kültür ortamından gliserol stok hazırlandı ve sonra kültür ortamları kullanılarak miniprep işlemi yapıldı (82).

3.2.7. Plazmid DNA İzolasyonu

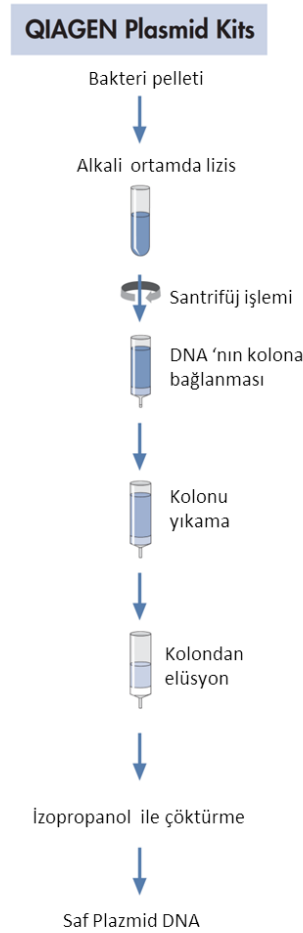
Bu işlem, WT plazmid DNA, mutasyon oluşturulmuş plazmid DNA ve ASA geni çıkarılmış plazmid DNA izolasyonu için kullanıldı.

Miniprep

Bu protokol *E.coli* kültüründe yüksek kopya sayılı plazmid DNA'nın mini pürifikasyonu için kullanıldı. Küçük miktarlarda DNA izolasyonu yapılacağı için Miniprep DNA isolation kiti (Qiagen) kullanıldı. Kit protokolüne göre, son konsantrasyonu 100 µg/ml ampisilin içeren 3 ml LB besiyerine transformasyon gerçekleşmiş olan tek koloni ekim yapıldı ve bir gece 37°C çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Kültür 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve bakteri pelletine protokole uygun şekilde yapılan işlemlerden sonra DNA elüe edildi (83).

Midiprep

Büyük miktarda plazmid DNA elde etmek için midiprep yapıldı ve plazmid DNA izolasyonu için Midiprep DNA isolation kiti (Qiagen) kullanıldı. Kit protokolüne göre, uygun konsantrasyonda seçici antibiyotik içeren 2-5 ml LB besiyeri içerisine tek koloni ekim yapıldı. 37°C de 8 saat 300 rpm’de çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Süre sonunda başlangıç kültürü 1/500-1/1000 arasında seçici antibiyotik içeren 25 ml LB medyumda dilue edildi. 37°C de 12-16 saat 300 rpm’de inkübe edilerek bakterilerin büyümesi beklendi. Bakteriler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra inkübatörden çıkarılıp 4°C’de 4100 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi ve protokolün diğer basamakları uygun şekilde yapıldı. Sonuçta yüksek saflıkta ve yoğunlukta DNA elde edildi (83).



Şekil 3.2. QIAGEN Plasmid Mini-Purification kiti kullanılarak DNA pürifikasyon işlemi ile plazmid DNA saflaştırılması (83)

3.2.8. DNA Miktar Tayini

Plazmid DNA'dan 5 µl alınıp 1/500 oranında distile su ile sulandırıldı. Kör tüpüne 500 µl distile su kondu. Spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında kuvartz küvetler kullanılarak absorbanları ölçüldü; A260/A280 oranına bakıldı. Örnekteki DNA miktarı, 260 nm dalga boyunda 50 µg DNA'nın 1 optik dansite okuma vermesinden yararlanılarak hesaplandı (84).

3.2.9. Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile DNA Kesimi

Kesim stratejisi olarak kesilmesi planlanan plazmid DNA örneğinden 10µL, kesim için uygun olarak tespit edilen EcoR1 restriksiyon enziminden 1µL (10U/µl) ve son konsantrasyon 1X olacak şekilde 2 µL 10X EcoR1 reaksiyon tamponu ve steril distile su eklenerek 37°C'de 1,5 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kesim enzimi 65°C'de 10 dak inkübe edilerek inaktive edildi. İnkübasyon sonrası örnekler %1 agaroz jelde yürütüldü. DNA bantları UV ışığı altında değerlendirildi (85).

3.2.10. Agaroz Jel Elektrofrez

1XTBE tamponu içinde %1'lik agaroz jel kullanıldı. Mikrodalga fırında TBE tamponu içerisinde agaroz tamamen eritildi. 50⁰C sıcaklığına ulaştığında 10 mg/ml derişimindeki etidyum bromürden 3 µl eklendi ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak homojen şekilde dağılması sağlandı. 8X8 cm² boyutlarında elektroforez plağına hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü ve uygun tarak yerleştirildi. 30 dakika kadar jelin donması beklendi. Uygun miktarda DNA'dan alınarak ayrı bir ependorf tüpünde uygun miktarda yükleme (loading) tamponu (%0,05 bromfenol mavisi, %15 Ficoll 400, %10 gliserol, 1XTBE olacak şekilde) ile karıştırıldı. 10X20 cm² boyutlarındaki elektroforez tankı 1XTBE ile dolduruldu. Hazırlanan örnekler jeldeki kuyucuklara uygulandı. 80 voltta yaklaşık 1 saat kadar zamanda örnekler jelde yürütüldü. Elektroforez plağından çıkarılan jeldeki bantlar transillüminatör ile gözlendi.(86)

3.2.11. Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu

İstenilen büyüklükteki DNA parçalarının agaroz jelden saf olarak elde edilmesini sağlayan bir işlemdir. Yapılan saflaştırmada, DNA bağlanması için

optimal pH' yı gösteren pH indikatörü içeren tampon içinde jel parçası çözülür ve ardından silika jel membranı bulunan küçük kolonlara örnek uygulanır. Kolonlardan önce yüksek tuz konsantrasyonu içeren bir tampon geçirilmesi ile nükleik asitler silika jel membranına bağlanır. Ardından düşük tuz konsantrasyonunda bir tamponun geçirilmesi ile DNA saf bir şekilde elde edilir.

Çalışmamızda agaroz jelden DNA izolasyonu için QIAGEN firmasına ait “MinElute Gel Extraction Kit” kullanıldı.

İstenilen DNA bantları UV transilluminator üzerinde agaroz jelden kesilerek alındı ve QIAGEN firmasına ait “MinElute Gel Extraction Kit”i (DNA jel ekstraksiyon kiti) kullanılarak protokole uygun şekilde DNA elüe edildi. Jelden kazanılan DNA'nın küçük bir kısmı tekrar jelde yürütülerek kontrol edildi. DNA miktarı ve temizliğinin kontrolü için 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbansları alındı (87).

3.2.12. Ligasyon

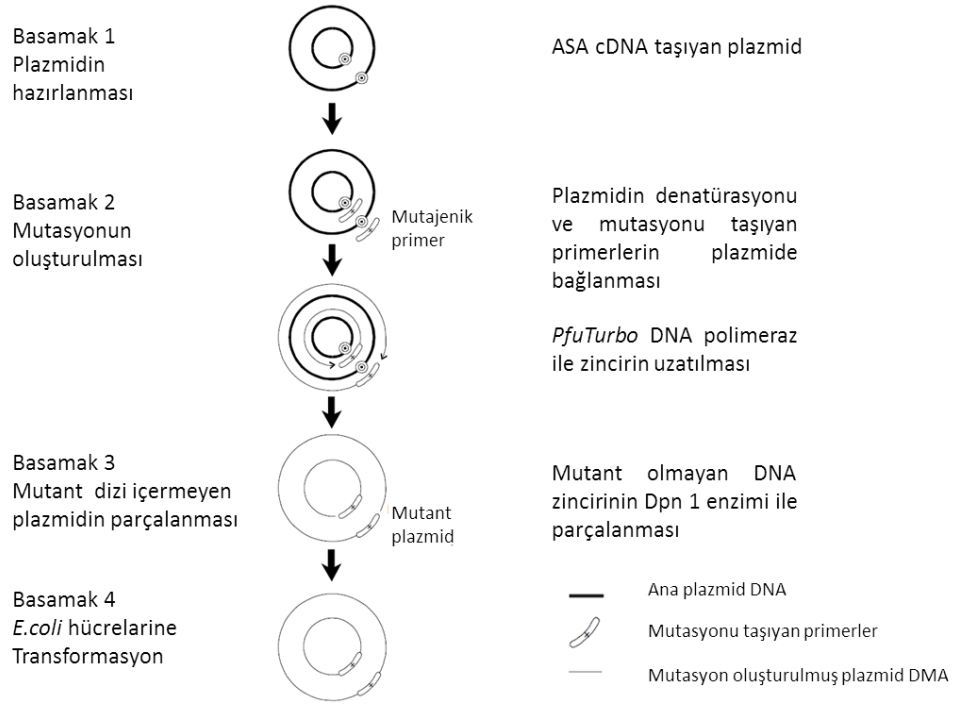
Ligasyon karışımı kesim yapılacak DNA parçasından 45 ng (4 µl) , 1XT4 DNA ligaz tamponu, 1µL T4 DNA Ligaz (4000U/mL) enzimi ve distile su ile toplam hacim 50 µl olacak şekilde bir ependorfta hazırlandı. 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve ardından 22°C'de 1,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon bittiğinde 65°C'de 10 dakika bekletilerek T4 DNA ligazın inaktivasyonu sağlandı. Ligasyon sonrasında hazırlanan plazmid, DH5α*E.coli* kompetan hücreleri içerisine transforme edildi (88).

3.2.13. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)- Mutasyonu Taşıyan Primerlerle ASA cDNA'sı Üzerinde Mutasyonların Oluşturulması

Esası:

Hedef DNA dizisinin her iki ucuna özgü primerler kullanılarak ısıya dayanıklı DNA polimeraz yardımıyla üssel oranda çoğaltılır. İlk aşamada DNA molekülünün çift iplikli yapısı yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılmaktadır. (denatürasyon) Daha sonra düşük ısılarda primerler tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar. (annealing) Son aşamada ısı 72°C ye artırılarak DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat

(dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar (extention). Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Ardı ardına tekrarlanan bu döngü ile DNA parçaları üssel olarak artarlar.



Şekil 3.3. “QuikChange site-directed” mutagenез yöntemi (89)

Yapılışı:

PCR tüplerinin içine 125 ng primer 1 (forward) ve primer 2 (reverse), 5 µl 10X reaksiyon tamponu, 1 µl dNTP mix ve 1 µl örnek konuldu. Toplam hacim 50 µl'ye deiyonize su ile tamamlandı. Daha sonra 1 µl Pfu Turbo DNA pol (2,5 U/ µl) eklendi. 1 µl Dpn 1 restriksiyon enzimi (10 U/µl) de eklendikten sonra nokta mutasyonu olduğu için PCR işlemi 12 siklusa tabi tutuldu. Her örnek 94°C'de 5 dak 1 siklus; 95°C' de 30 sn denatürasyon (DNA zincirlerinin ayrılması), 95°C'de 30 sn annealing (primer yapışması), 55°C'de 60 sn extension (zincir uzaması) basamaklarını içeren 12 siklus; 72°C'de 10 dak 1 siklusa tabi tutuldu. Örnekler +4°C'de saklandı (89).

3.2.14. Hücre Kültürü ve Transfeksiyon

Hücre kültürü ortamının hazırlanması

Çalışmalarımızda DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) hücre kültür medyumunu olarak kullanıldı. DMEM içerisinde son konsantrasyonu %1 L-glutamin ve % 10 FCS olacak şekilde hazırlandı (90).

Hücre Kültürünün Başlatılması

Uzun süre sıvı azot içerisinde saklanan CHO hücre hatları sıvı azot tankından çıkarıldı ve çözümleri sağlandı. Pasajlama işleminden önce laminar akım kabininin (Nuair NU425-400E) çalışma alanı ve içinde bulunan tüm malzemeler %70'lik etil alkol çözeltisi ile temizlendi. Çözünen hücreler %10 FCS içeren medyuma alınarak %5 CO₂ inkübatöründe büyümeye bırakıldı (90).

Hücrelerin Büyütülmesi

Hücreler 75 cm² flasklarda %10 FCS içeren 15 mL medyum içerisinde CO₂ (%5) inkübatöründe büyütüldü (90).

Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler bulundukları yüzeyden %80-90 oranında kapladıklarında içinde bulundukları medyum uzaklaştırıldı. Hücreler üç kez steril PBS ile yıkandı ve 3mL tripsin-EDTA (% 0,05) ile 1-3dk muamele edildi. Bu şekilde tekrar inkübatöre alındı ve yaklaşık 5 dakika hücrelerin tutundukları zeminden ayrılmaları için beklendi. Hücreler 5 dakika sonra inkübatörden laminar akım kabinine alınarak üzerlerine tripsinin parçalayıcı etkisinin ortadan kaldırılması amacıyla 5 mL besi medyumunu eklendi ve 1500 rpm de 5dk santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet %10 oranında FCS içeren 1 ml DMEM içerisinde homojenize edildi. 500 µl homojenat alınarak 15 mL DMEM içeren flasklara ekim yapıldı. Hücre içerikli flasklar etiketlenerek 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre koyularak büyümeye bırakıldı (90).

Hücre Sayımı

Deneylerimizde gerekli olan toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için; üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1 mm² alanı, 0,1mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacimin hesaplanabildiği hemositometre lamı (Thoma lamı) kullanıldı. Hücre sayımı yapmak amacıyla 10 µL hücre süspansiyonu

kullanıldı. Mikroskop yardımıyla hücrelerin sayımları yapıldı. Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

Toplam hücre sayısı /mL = hemositometre sayım sonucu x seyreltme katsayısı x 10^4

Süperfekt Tranfeksiyon Reaktifi Kullanarak Geçici Transfeksiyon

5 farklı hücre grubu hücre kültüründe üretildi. Daha sonra her birine 1,5 µg Hex B konuldu. ASA-boş plazmid, WT-ASA plazmid, ASA 919, ASA 954, ASA 1165 üzerine 4 µg örnek miktarı olacak şekilde 5 tüp hazırlandı. Toplam hacim 150 µl olacak şekilde üzerlerine DMEM besiyeri solüsyonu eklendi. 30 µl süperfekt transfeksiyon reaktifinden eklenerek 5 kez altüst edildi. 5-10 dak oda ısısında bırakıldı. Bu arada hücreler çıkarılarak PBS leri aspire edildi. Her bir hücre 4 ml PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 1 ml DMEM (%10 FCS) eklendi ve 2 kez pipetle çekilip bırakıldı. 3 saat 37°C, %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. 3 saat sonunda medium aspire edildi. 4 ml PBS ile yıkandı. 5 ml (%10 FCS) DMEM eklendi. 48 saat 37°C, %5 CO₂ li etüvde inkübasyona bırakıldı (91).

Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması

Transfeksiyondan 47 saat sonra besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler 3 kez 5 ml PBS ile yıkandı. PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı. Petrilere 1'er ml PBS eklendi ve hücreler kazıyıcı yardımıyla petri tabanlarından sıyırıldı. Buz üzerinde tutulan ependorflara aktarıldı. 12000 g'de 10 sn oda ısısında santrifüj edildi. Supernatan kısım atıldı. Hücre pelleti 1 ml soğuk PBS ile nazikçe süspanse edildi. 12000 g'de 10 sn tekrar santrifüj edildi. Üstte kalan kısım atıldı. Elde edilen her bir hücre pelleti üzerine 100 µl 0,25 M Tris-HCl pH 7,8 tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı. 10 µl proteaz inhibitörü eklendi. Bu aşamadan sonra hücreler 3'er defa sıvı azotta dondurulup, 37°C'de çözülerek ekstrakte edildi. Hücre homojenatı 12000 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan kısım -80°C'de saklandı.

3.2.15. Protein tayini-“Bicinchoninic” asit (BCA) yöntemi

Esası:

Örneklerin protein miktarları BCA metodu kullanılarak tayin edildi (BCA protein ASSAY kit, Sigma Aldrich). Alkali koşullar altında Cu⁺² iyonları protein ile kompleks oluşturur ve ardından Cu⁺² iyonları Cu⁺¹ iyonlarına indirgenir. Sistein,

sistin, triptofan, tirozin ve peptid bağları Cu^{+2} iyonlarının Cu^{+1} iyonlarına indirgenmesinden sorumludur. Örnekte var olan protein miktarı indirgenme miktarı ile orantılıdır. Alkali şartlarda Cu^{+1} iyonları BCA ile mor-mavi renkli bir kompleks oluşturur. Bu şekilde Cu^{+2} iyonlarının indirgenmesi tespit edilebilir. Oluşan suda çözünebilir kompleks spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda ölçülerek protein miktarı hesaplanır.

Yapılışı:

4 ml Reaktif A çözeltisi (final pH 11,25 olacak şekilde 0,1 N NaOH içinde bicinconinik asid, sodyum karbonat, sodyum tartrat ve sodyum bikarbonat) ile 50 µl Reaktif B çözeltisi (%4 w/v bakır (II) sülfat pentahidrat) karıştırılarak çalışma reaktifi hazırlandı. Kör, 5 adet standart ve örnek tüpleri hazırlandı. Protein standardı olarak 500 µg/ml stok sığır serum albümini (BSA) hazırlandı. Stok çözeltiden son hacimleri 10 µl olacak şekilde distile su ile 1/2 ve 1/4 oranında dilüsyonlar yapılarak 250 ve 125 µg/ml, 1/10 ve 1/20 oranında dilüsyonlar yaparak 50 ve 25 µg/ml konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. Kör tüpüne 10 µl distile su pipetlendi. örnek tüpüne son hacim 10 µl olacak şekilde 2 µl örnek ve 8 µl distile su pipetlendi. Daha sonra her tüpe hazırlanmış olan 200 µl çalışma reaktifi eklendi ve 30 dak. 37°C' de inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon bittiğinde 562 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı (92).

3.2.16. Heksozaminidaz Enzimi Aktivite Tayini

Esası:

Heksozaminidaz sentetik substrat 4-MUG'u hidroliz eder. Açığa çıkan fluoresan molekül 4-MU flourometrede 365 nm eksitasyon ve 448 nm emisyon dalga boylarında okunur.

Yapılışı:

Ölçüm yapılacak örneğin 0,1 ml' sinde 5-15 µg protein miktarının bulunması gerekmektedir. Tüplere yeterli protein miktarı konulduktan sonra hacim 0,1 M pH:4,5 sodyum-sitrat-fosfat tamponu ile 100 µl ye tamamlandı. Kör tüpü hariç tüm tüplere 0,3 ml substrat çözeltisi (0,1 M pH:4,5 sitrat-fosfat tamponunda hazırlanan 2mM 4-MUG) eklenerek 1 saat 37° C de inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonra her tüpe 3,6 ml 0,2 M pH:10,8 glisin-NaOH tamponu eklenerek reaksiyon durduruldu. Kör

tüpüne 0,3 ml substrat çözeltisi eklendi. Ölçümler spektrofotometrede 365 nm eksitasyon ve 446 nm emisyon dalga boylarında yapıldı. 2 nmol-10 nmol arasında 4-MU (0,2 M pH 10,8 glisin-NaOH tamponunda) ile hazırlanan standartlar ile elde edilen standart eğriden aktiviteler hesaplandı. Sonuçlar nmol/mg protein/saat olarak ifade edildi (93).

3.2.17. ASA Enzimi Aktivite Tayini

Esası:

p-nitrokatekolsülfat kromojenik bir maddedir. ASA enzimi p-nitrokatekolsülfatın sülfatını ayırmaktadır. İntakt bileşik renksiz olduğu halde hidroliz ürünü olan p-nitrokatekol tuğla kırmızısı rengindedir. Spektrofotometrede 515 nm de ışığı absorbe eder.

Yapılışı:

Bu metotta kullanılan örnek 0,1 ml'de 100-400 µg protein içermelidir. 25 µl örnek üzerine 25 µl substrat çözeltisi (0,5 mM Na₄P₂O₇ ve % 10 NaCl içeren 0,5 M pH 5 sodyum asetat içinde 10 mM p-nitrokatekol sülfat) eklendi. 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Kör tüpüne 0. dakikada 250 µl 1N NaOH çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. 1 saat sonunda deney tüplerine de 250 µl 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 standartlar ile elde edilen standart eğriden aktiviteler hesaplandı. Sonuçlar nmol/mg protein/saat olarak ifade edildi (93).

3.2.18. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Örneklerin SDS-PAGE analizi Laemmli tarafından bildirilen metod kullanılarak yapıldı.

SDS-PAGE için ayırma jeli (seperating) Tablo 3.3.'e göre ve yığma jeli (stacking) bileşimleri Tablo 3.4.'e göre hazırlanmıştır. Ayırma jeli iyice karıştırıldı ve iki camın arasına yukarıdan 2,5 cm kalacak şekilde döküldü. Jel karışımının oksijenle temasını kesmek için üzeri su ile tamamlandı. Jelin donması için 45 dak. bekletildi. Üzerindeki su çıkartıldı. Yığma jeli üst cam hizasına ulaşana kadar

eklendi. Uygun tarak yerleştirildi ve donması için en az 30 dakika beklendi. Polimerleşmenin tamamlanmasından sonra, jel kaseti elektroforez tankına yerleştirildi. Hazırlanan yürütme tamponu elektroforez tankına uygun hacimde döküldükten sonra tarak dikkatlice çıkartıldı. Protein markırı (Amersham full-range rainbow molecular marker 12000-225000 Da) ve örnekler 10 µg protein içerecek şekilde hazırlandı. Uygun hacimde örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95°C’de 5 dakika denatüre edildi. Daha sonra elektroforez jeli kuyucuklarına yüklendi. 2,5 saat boyunca 125 volt uygulanarak elektroforez işlemi yapıldı (94).

Tablo 3.1. SDS-PAGE için ayırma jeli bileşimi

Ayırma jeli (%10)	hacim(µl)
akrilamid/bis-akrilamid çözeltisi (%30)	3300
jel tamponu(1,5 M Tris-HCl pH 8,8)	2500
saf su	4100
SDS(%10)	100
APS(%10)	50
TEMED	5

Tablo 3.2. SDS-PAGE için yığma jeli bileşimi

Yığma jeli (%4)	hacim(µl)
akrilamid/bis-akrilamid çözeltisi (%30)	1300
jel tamponu(0,5 M Tris-HCl pH 6,8)	2500
saf su	6100
SDS(%10)	100
APS(%10)	50
TEMED	10

3.2.19. Western-Blot analizi

Esası:

Western blotlama tekniği jelde ayırma uğrayan proteinlerin poliakrilamid jelden adsorblama özelliği olan bir membran üzerine elektrik akımı etkisiyle aktarılması işlemidir. Proteinlerin jelden membrana aktarımındaki amaç proteinlerin

tanımlanmasında kullanılacak çeşitli problemlerin proteinlere daha kolay ulaşmasını ve etkileşmesini sağlamaktır. Proteinler jelde gömülü halde bulunduğu için bu etkileşim mümkün değildir. Proteinleri jelden membrana aktarım işleminde nitroselüloz veya PVDF (Poli Vinilidin Di Florid) membranları kullanılabilir.

Yapılışı:

Proteinlerin jelden membrana aktarımı işlemi öncesinde membran kağıdının hidrofobik özelliğini azaltmak amacıyla transfer tamponunda ıslatılır. Membran, filtre kağıtları ve süngerler arasına yerleştirilerek hazırlanan jel sandviçi transfer cihazının plakaları arasına sıkıca yerleştirilir. Membranın jel ile anod arasında kalacak şekilde yerleştirilmesi ve elektrik akımı uygulanması ile yaklaşık 2 saat içinde proteinlerin membrana transferi gerçekleştirilir. Elektrik akımının uygulanmasından dolayı ortaya çıkacak ısının engellenmesi için transfer işleminin soğuk ortamda yapılması gerekir. Jelde farklı bölgelerde bulunan proteinler SDS ile kaplı ve negatif yüklü oldukları için anoda ve bundan dolayı da membrana doğru ilerlerler. Transfer işleminden sonra proteinler jeldeki ayrışım bölgeleri korunmuş halde membran üzerinde lokalize olurlar.

Bu çalışmada, elektroforez işlemi 2,5 saat boyunca 125 volt uygulanarak yapıldı. Elektroforez işlemi bittiğinde jeller camlardan ayrıldı. Poiakrilamid jel sistemine ait membran-jel kasetinin önce bir kapağına tamponla ıslatılarak hava boşlukları çıkartılmış olan sünger yerleştirildi. Bu işlemten sonra süngerin üzerine transfer tamponu ile ıslatılmış filtre kağıdı yerleştirildi. Filtre kağıdının üzerine elektroforez işlemi sonucu elde edilen jel yerleştirildi. Jelin üzerine transfer tamponunda 5 dakika bekletilerek hazır hale getirilen nitroselüloz membran yerleştirildi. Membran ile jel arasında hava kabarcığı kalmaması için üzerinden cam tüp geçirildi. Membran yerleştirildikten sonra üzerine sırası ile transfer tamponu ile ıslatılarak havası çıkartılmış filtre kağıdı ve sünger yerleştirildi. Daha sonra kasetin kapakları sıkıca kapatıldı ve kaset transfer tamponu ile dolu olan tanka yerleştirildi. Tankın kapağı katot elektrodu nitroselüloz membran, anot elektrodu ise jelin olduğu tarafa gelecek şekilde kapatıldı. Western blotlama işlemi süresince iyonik dengenin sağlanması için tankın içine teflon balık atıldı ve tank manyetik karıştırıcının üzerine konuldu. uygun şekilde tanka yerleştirildi ve daha sonra tank transfer tamponu ile

dolduruldu. Jelden nitroselüloz membrana proteinlerin aktarım işlemi soğuk ortamda 80 voltluk bir gerilim uygulanarak 2 saat boyunca gerçekleştirildi.

Proteinlerin membrana transferinin tamamlanmasından sonra membran bloklama çözeltisi içerisinde jel ile temas etmiş olan yüzeyi üstte kalacak şekilde 2 saat bekletildi. Membranı bloklama işlemi yatay çalkalayıcı üzerinde yapıldı. Bu işlemin amacı membran üzerinde protein bağlanmamış bölgeleri bloklama çözeltisi ile kapatarak kendisi de protein olan birincil antikorların yanlışlıkla bağlanmasını engellemektir. Bu işlemden sonra membran TBS-T çözeltisi ile 3 kere onar dakikalık sürelerle yıkandı. Oda sıcaklığında 1 saat membrana uygun oranda (1/10000) TBS-T çözeltisi ile seyreltilmiş birincil antikor (anti-fare insan ASA) ile inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra membran aynı şekilde TBS-T çözeltisi ile 3 kere onar dakika sürelerle yıkandı. Yıkama işleminden sonra membran uygun oranda (1/200) TBS-T çözeltisinde seyreltilmiş ikincil antikor (tavşan anti-fare antikor) ile oda ısısında 1 saat yatay çalkalayıcıda bekletildi. Bu aşamadan sonra membran aynı şekilde TBS-T çözeltisi ile yıkandı ve ardından membranın kemilüminesan metod (ECL, Amersham) ile görüntülenmesi yapıldı (95).

4. BULGULAR

4.1. Transformasyon

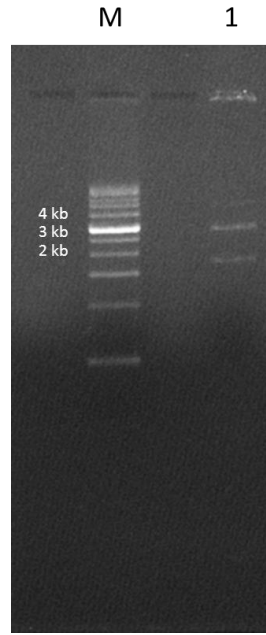
Transformasyonda kullanılan 50, 100 ve 150 ng miktarlardaki plazmid DNA ile koloniler elde edildi. En etkili koloni 100 μ l medium ve 50 ng plazmid DNA kullanımı ile elde edildi.

4.2. Plazmid DNA Saflaştırması

Deneyler sonucunda örneklerden saflaştırılan plazmid DNA miktarları Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Plazmid DNA miktarları 127,5-357,5 ng/ μ l arasında ve yeterli temizlikte elde edildi (Şekil 4.1). 260/280 nm oranları 0,98-1,09 arasında bulundu. Plazmid DNA saflaştırması için transforme edilen *E.coli* hücrelerinin hazırlanmış gliserol stokları da etkili bir plazmid saflaştırması sağladı (Tablo 4.1). Restriksiyon enzim kesimi ile lineer hale getirilen 4,367 kb büyüklükteki plazmid DNA elde edildi.

Tablo 4.1. Miniprep işleminden elde edilen örneklerin absorbens değerleri ve DNA konsantrasyonları

Tüp no	Plazmid DNA (ng)	Kompetan <i>E.coli</i> (μ l)	Absorbans 260 nm	Absorbans 280 nm	A260/A280	DNA konsantrasyonu (ng/ μ l)
1	150	50	0,061	0,06	1,02	152,5
2	150	100	0,096	0,1	0,96	240,0
3-1	150	50	0,096	0,091	1,05	240,0
3-2	150	50	0,117	0,107	1,09	292,5
4	100	100	0,057	0,052	0,98	127,5
5	50	100	0,143	0,136	1,05	357,5



Şekil 4.1. Miniprep işlemi ile elde edilen plazmid DNA'sı içeren örneğin agaroz jel görüntüsü M. Gen-KB DNA ladder DNA markırı (0,2-14 kb), 1. Örnek

Plazmid DNA içeren örneğin DNA konsantrasyonu hesabı spektrofotometrede 260 nm de verdiği absorbanstan faydalanarak yapıldı ve 60 ng/μl bulundu (Tablo 4.2.).

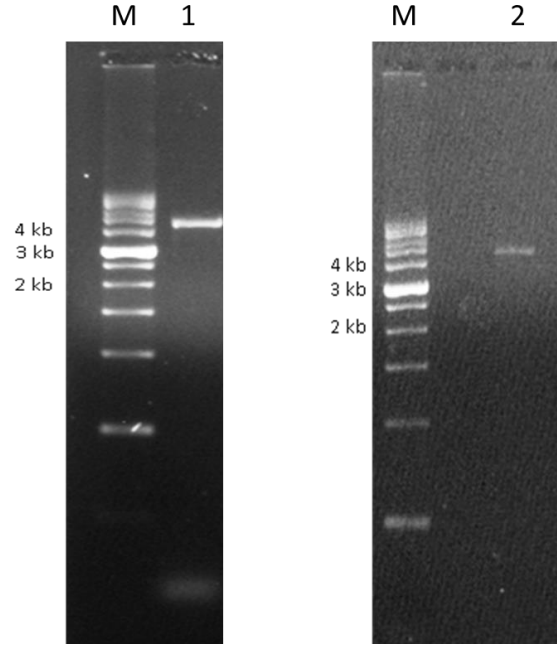
Tablo 4.2. Plazmid DNA örneğinin absorbens değeri ve DNA konsantrasyonu

birleştirilen tüp	Absorbans (260 nm)	Absorbans (280 nm)	A260/A280	DNA konsantrasyonu (ng/μl)
	0,012	0,014	0,86	60

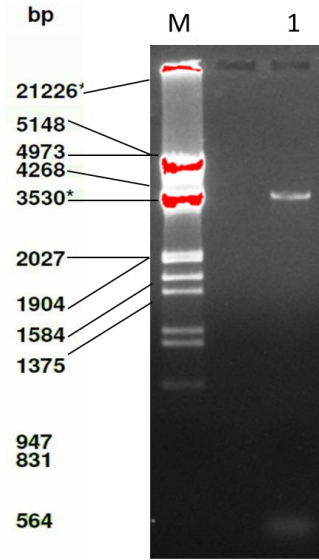
4.3. PZR ile Mutasyonların Oluşturulması

Mutasyonu (c.919G→A p.307Glu→Lys, 954G→T p.318Trp→Cys ve c.1172C→G p.391Thr→Ser) taşıyan oligonükleotid primerler ile WT ASA geni üzerinde PZR ile mutasyonlar oluşturuldu. Elde edilen mutant DNA örneklerinin PZR ürünleri agaroz jelde yürütüldü ve spesifik olarak çoğaldıkları gösterildi (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Mutasyonların kontrolü için yapılan DNA dizi analizi sonucu

c.919G→A, 954G→T değişimlerinin WT-ASA cDNA'sı üzerinde oluşturulduğu, ancak c.1172C→G mutasyonu yanısıra tesadüfen 1165G delesyonunun oluşturulduğu belirlendi.



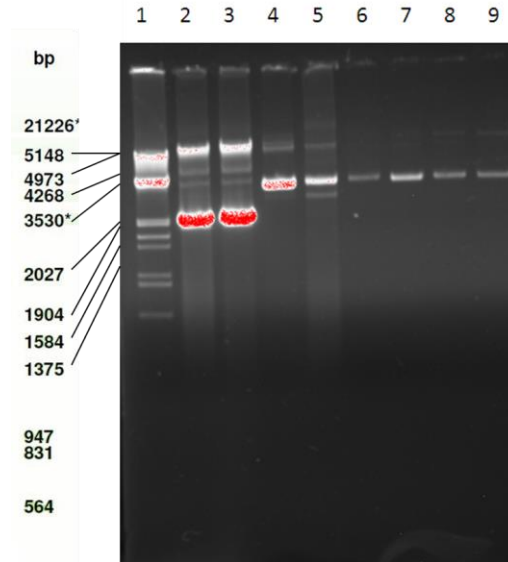
şekil 4.2. PZR işlemi ile oluşturulan c.919G→A ve c.954G→T mutant DNA'larının agaroz jel görüntüsü M. Gen-KB DNA ladder DNA markırı (0,2-14 kb) 1. 919G→A mutant DNA, 2. 954 G→T, mutant DNA



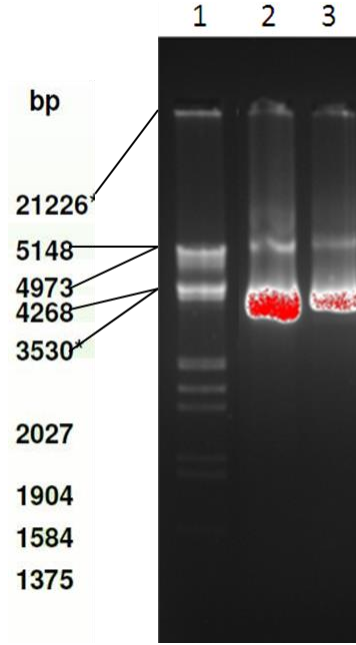
Şekil 4.3. PZR işlemi ile oluşturulan c.1172C→G ve 1165G delesyonu için mutant DNA'nın agaroz jel görüntüsü M. Hind3 lambda DNA markır, 1. 1172C→G ve 1165G delesyonu için mutant DNA

4.4. Mutant ve ASA Geni İçermeyen Plazmit DNA'ların Midiprep Sonuçları

Mutasyonu taşıyan plazmid DNA'ları midiprep işleminin ardından agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve saf oldukları gözlemlendi (Şekil 4.3, Şekil 4.4)



Şekil 4.4. Midiprep işlemi ile saflaştırılan mutant DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü 1. Hind3 lambda DNA markır, 2 ve 3. ASA geni çıkarılmış plazmid DNA, 4. ve 5. 1172C→G ve 1165G del mutant DNA, 6. ve 7. 919G→A mutant DNA, 8. ve 9. 954G→T mutant DNA örnekleri



Şekil 4.5. Midiprep işlemi ile saflaştırılan WT ASA plazmid DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü 1. Hind3 lambda DNA markır, 2. ve 3. WT ASA plazmid DNA

Midiprep işlemi ile elde edilen örneklerde DNA konsantrasyonları nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4.3 de gösterilmiştir. Elde edilen DNA miktarları transfeksiyon işlemi için yeterli bulunmuştur.

Tablo 4.3. Örneklerin DNA konsantrasyonu ölçümü

Örnekler	1 (ng/µl)	2 (ng/µl)
MOCK	80	93
ASA-WT	120,6	59,1
919G→A	3,9	6,9
954G→T	5,3	4
1165G del	35,7	31,4

4.5. Arilsülfataz A ve Heksozaminidaz Enzim Aktivitesi Sonuçları

Geçici transfeksiyon sonrasında hücre lizatlarından elde edilen süpernatantlarda ölçülen enzim aktivitelerinin spesifik aktivite ve % değerleri Tablo 4.4.'de verilmiştir. ASA aktivitesi tüm mutantlarda normal ile karşılaştırıldığında

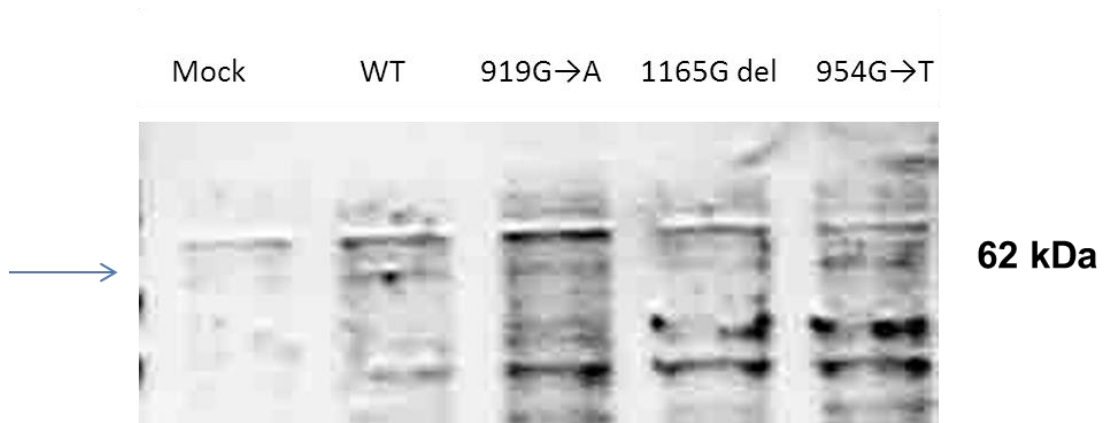
eksik bulunmuştur. Heksozaminidaz aktivitesi WT, 954 ve 1172 de benzer, 919 da yarısı kadar bulunmuştur.

Tablo 4.4. Transfeksiyon sonrası örneklerde protein, ASA ve Hex aktivite değerleri

Transfeksiyon Sonuçları (2 ölçümün ortalaması)					
	Protein konsantrasyonu (µg/ml)	ASA aktivite (nmol/mg protein/saat)	ASA aktivite (%)	Hex aktivite (nmol/mg protein/saat)	Hex aktivite (%)
MOCK	523	201	0	1956	0
WT	888	416	100	3353	100.0
919G→A	1717	95	0	2637	48.7
954G→T	900	152	0	4215	161.8
1165G del	1372	132	0	3566	115.3

4.6. Western Blot Analizi

Western blot analizinde 62 kDa büyüklüğündeki olgun ASA proteinini normal kontrol örneği (WT) M1 ve M3’de bulunurken, M2’de gözlenmedi.

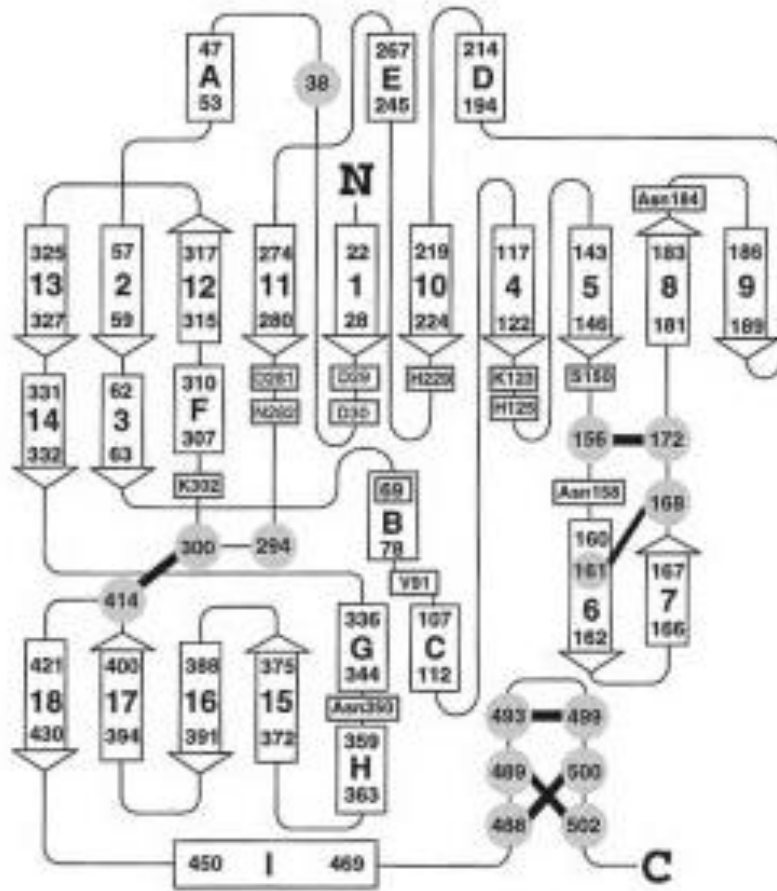


Şekil 4.6. ASA proteininin Western blot analizi.

5. TARTIŞMA

Metakromatik lökodistrofi, otozomal resesif geçişli, lizozomal enzim ASA veya onun aktivatör proteininin eksikliği sonucu oluşan bir sfingolipit depo hastalığıdır. Anabilim Dalımızda yapılan bir çalışmaya göre Türk toplumunda en sık görülen sfingolipidozdur. Türkiye için hesaplanan en düşük insidans 1,43/100000 dir (96). Dünya genelinde sıklığı 1/40000 ile 1/160000 arasında değişmektedir. Geç infantil dönemde başlayan tipinin insidansı Kuzey İsveç için 1/40000, Fransa için 1/130000, USA için 1/40000, Almanya için 1/170000 dir (97-99). Bu çalışmada, ASA geni üzerinde oluşturulan iki yanlış anlamlı (ekson 5'te c.919G→A 307Glu →Lys ve c.954G→T, 318Trp →Cys mutasyonları) ve bir delesyon mutasyonunu (ekson 7'de c.1165G) taşıyan plazmidin CHO hücrelerine geçici transfeksiyonu ile sentezlenen ASA proteini, enzim aktivitesi ve protein miktarı ölçülerek karakterize edilmiştir. Mutant örneklerde enzim aktivitesi hastalardaki gibi eksik bulunmuş, ASA proteininin 307Glu →Lys değişimi ve 318Trp →Cys değişiminde var olduğu, c.1165G delesyonunu etkisi ile yıkılmış olduğu gösterilmiştir.

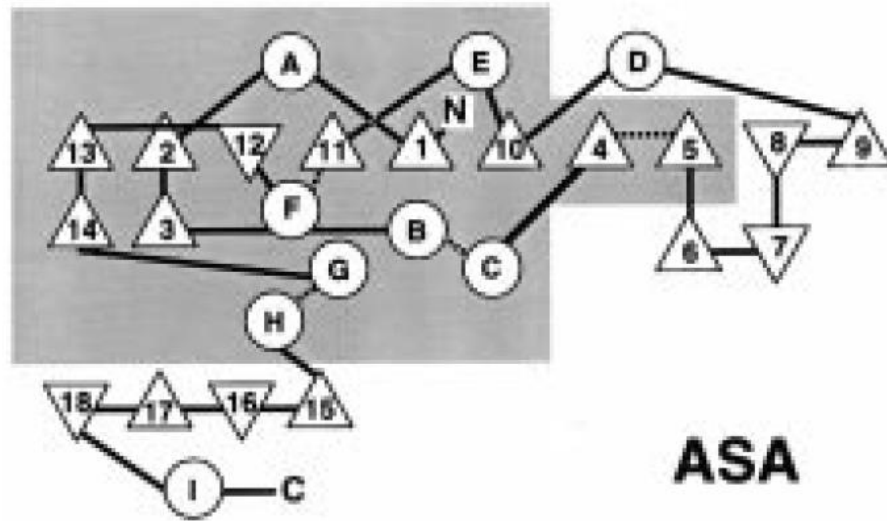
ASA'nın ikincil yapısı alfa-heliks ve beta-tabakalı yapıların bir karışımıdır. %26 α -heliks ve 3_{10} heliks, %16 β -tabaka ve %46 β ve 3_{10} döngü, %12 sekonder yapıya katılmayan primer yapıya sahip kısımlardan oluşmaktadır. Enzimin merkezi iki önemli β -tabakayı içerir (Şekil 1). Küçük β -tabaka 4 antiparalel β -tabakasından β 15- β 18 tabakalarını içerir; büyük β tabakada, 10 ayrı β tabaka vardır (Şekil 1). Bunlar β 8 ve 12 dışında paralel yerleşimlidirler ve diğerlerine antiparalel olurlar. Büyük β -tabaka bir tarafta α A; D ve E, diğer tarafta α B, C, G ve H ile sandviç yapılmıştır haldedir. Kısa α -heliks F antiparalel β 11 ile β 12 yi birleştirmektedir. Büyük ve küçük β tabakalar su molekülleri üzerinden sağlanan hidrojen bağları ile ve Cys300-Cys414 arasındaki disülfid bağı ile kontak kurarlar (40,100).



Şekil 5.1. ASA proteininin ikincil yapısı. α -heliksler A-I, β -tabakalar 1-18 ile gösterilmiştir. Asn158, Asn184 ve Asn350 3 glikozilasyon bölgeleridir. Sisteinler arası disülfid bağları koyu bantlarla gösterilmiştir (40).

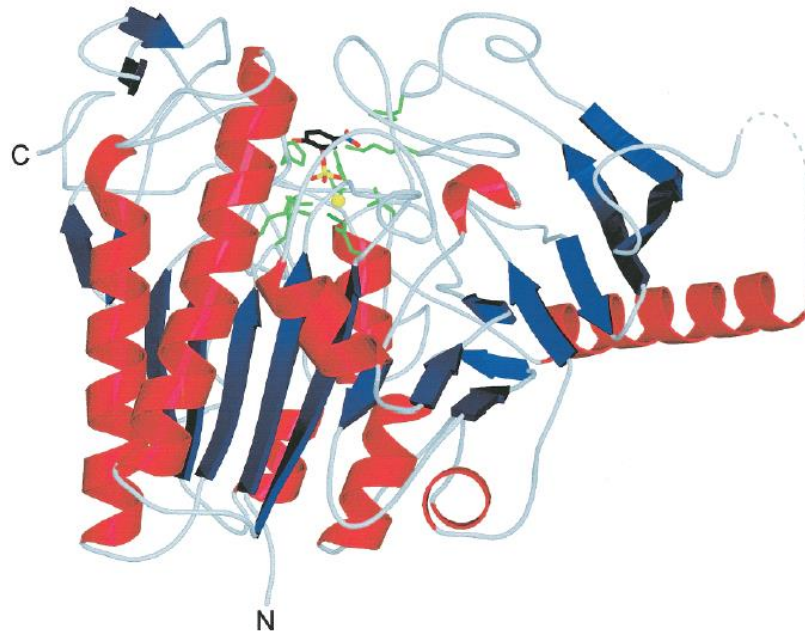
Türk hastalarda saptanan exon 5'teki 919 G→A mutasyonu ASA proteininde asidik bir aminoasit olan glutamik asitin bazık bir aminoasit olan lizin ile yer değiştirmesine neden olmuştur. 307. aminoasit insan sülfatazlarında yüksek derecede korunmuş bölgede bulunan α -heliks F yapısının bir elemanıdır ve iki antiparalel beta tabakayı birleştirmede görev almaktadır (Şekil 1, Şekil 2). Asidik aminoasit yerine bazık aminoasitin geçişi muhtemelen α -heliks F'nin yapısını değiştirerek aktif merkezdeki beta tabakaların birbiri ile ilişkisini bozmakta ve aktivite eksikliğine neden olmaktadır. Bu değişiklik hastalarda ve *in vitro* gen transkripsiyonunda gördüğümüz gibi enzim aktivitesinde bozukluğa neden olmaktadır. Bu mutasyona sahip hastalarda lökositlerde ölçülen ASA aktivitesi 0 ve 2 nmol/mg protein/saat, mutant genin eksprese edildiği CHO hücrelerinde ise %0 bulunmuştur. Western blot

analizinde proteinin tam yıkılmadığı, var olduğu gözlenmiştir. Bu da mutasyonun proteinde fonksiyonu bozacak bir katlanma bozukluğuna neden olduğunu göstermektedir. Literatürde aynı alfa-heliks yapısına katılan komşu aminoasitlerde farklı mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu mutasyonların etkilerini değerlendirmek için yapılan çalışmalarda da bizim çalışmamızla benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hepsi bizim hastalarımızda olduğu gibi MLD'nin geç bebeklik tipine neden olmaktadır. Bunlardan bazılarında protein karakterizasyonu yapılmıştır. Bu mutasyonlardan p.308Gly→Val değişiminde (Japon ve Avrupa mutasyonları) COS-1 hücreleri ile yapılan geçici transfeksiyonla elde edilen ürünlerde enzim aktivitesi tam eksik bulunmuştur (101). Ayrıca p.309Gly→Ser mutasyonunda yapılan geçici transfeksiyon çalışmalarında enzim aktivitesi kontrol hücrelerine göre %13 bulunmuş ve mutant enzimin lizozoma girmiş olduğu ama dayanıklı olmadığı gösterilmiştir (102).



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 β 11'deki (Asp281, Asn282), β 1'deki (Asp29, Asp30), β 10'daki (His229), β 4'deki (Lys123, His125) ve β 5'deki (Ser150) ve N-ucunda α -heliks F'deki (Lys302) ve α -heliks B'deki (Arg73) tür. FGly69 katalizde önemlidir (40).

ASA geninde c.954 G→T değişimi, p.318Trp →Cys değişimine neden olmaktadır. Bu değişim hidrofobik bir amino asit olan triptofanın yerine yapısında SH grubu bulunduran yüksüz polar yapıda sistein amino asitinin gelmesini sağlamaktadır. 318 no lu aminoasit ASA proteininde 12 no lu beta-tabaka ile 13no lu antiparalel beta tabaka arasındaki primer yapının ilk aminoasitidir. ASA proteininde 15 tane sistein aminoasiti bulunmaktadır. Bunlardan 12 tanesi dislfıt bağına katılır. Dislfıtlardan biri 2 beta tabakayı birleştirir, 2 tanesi beta 6 ve 7 nin yaptığı sağ tokası yapısını stabilize eder, 3 tanesi C ucundaki 20 aminoasiti düğümler. Bu 6 sistein kümesi ASA için özeldir, ona spesifiktir. Kalan 3 sistein tektir. Sistein 38 ve 294 homodimer ara yüzeyinde yerleşiktir, heliks alfabeta nın N ucundaki sistein 69 sentez sonrası formilglisine çevrilir. Formilglisine evrilen Cys69, ASA enziminin aktif merkez aminoasitidir. p.318 Trp→ Cys değişimi ASA proteininin ikincil yapısı için çok önemli sistein aminoasitlerine bir yenisini eklemektedir. Hastadaki enzim aktivitesinin düşüklüğü, mutant proteini oluşturan CHO hücrelerinde enzim aktivitesinin tam eksikliği ve Western blotta proteinin olmayışı bu aminoasit değişiminin proteinde diğer mutasyonlara göre en önemli etkiyi yaptığını düşündürmektedir. Bu etki serbest sistein aminoasitleri ile yeni dislfıt bağı oluşumu veya aktif merkez aminoasiti Cys69 ile formilglisin oluşumu öncesi yeni dislfıt bağı yapımı şeklinde olabilir. Sonunda proteinin yapısı tamir edilemez şekilde bozulur ve protein proteozomda parçalanabilir. Bu mutasyona sahip hastalar geç bebeklik tip MLD tanısı almışlardır (1). Cys69 da sentez sonrası modifikasyon eksikliği tüm slfatazların eksikliğine neden olmaktadır. ASA aktif merkezinde sülfat bağlamada görev alan aminoasitler lizin123, lizin 302, serin150, histidin 229 ve sistein 69 dur. Slfatı bağlayan aminoasit FGly69 dur. şekil 3'te Cys69'un yapay substrat p-nitrokatekol sülfat ile olan bağlanması gösterilmiştir.



Şekil 5.3. ASA monomeri üzerinde ASA'nın yapay substratı paranitrokatekolsülfat ile aktif merkez aminoasiti Cys69'un oluşturduğu kompleks (100).

ASA geninde c.1172 C →T değişimi oluşturulurken eş zamanlı tesadüfen oluşturulan 1165G delesyonu p.389Val→Cys değişimi ile birlikte bu aminoasitten sonraki devam eden cDNA dizisinin yanlış anlamalı olmasına ve 441. aminoasitte dur kodonuna neden olur. 507 aminoasitten oluşması gereken ASA proteinin sentezi 441 aminoasitte sonlanır. CHO hücrelerinde yapılan enzim analizi sonucunda kodonda kaymaya neden olan bu delesyon mutasyonunun enzimin tam eksikliğine neden olduğu, Western blotla proteinin yıkıldığı gösterildi. ASA proteininde 389. aminoasitten itibaren 441. aminoasite kadar değişikliğe neden olan bu mutasyon proteinin karboksi ucuna yakın yapısının bozulmasına, dimer-oktamer yapıda görev alan aminoasitlerin değişmesine, tüm yapının değişmesine neden olur. Zira ASA dimerlerinin tetramer oluşturması 424. Pozisyondaki glutamin aminoasitinin protonlanması, dimer-oktamer hale geçişi Glu424 ile Phe398 arasındaki hidrojen bağları ile sağlanır. Phe398 delesyonu enzimin lizozom içinde oktamerleşmesine neden olmaktadır. Ar335 ile Arg370 arasındaki tuz köprüsü, ASA enziminin aktif bölgesinin uygun konfigürasyonu için gereklidir (8, 80). Monomerler arasında dimer oluşturan bölge bir köşede major beta tabakada beta13 dizisi ve diğer köşede 4 halka içerir. Bunlardan ikisi çözücünden korunmuş serbest sisteinler bulundurur. Halka 32-

44 (serbest Cys38) ve halka 286-300 (serbest Cys294), disülfid Cys300-Cys414'e halka 406-414; ve halka 430-439 üzerinden kovalent olarak bağlıdır (Şekil 5.1.) (39). Proteinin karboksi ucunda doğal olarak oluşan mutasyonlar hastalığın şiddetli tiplerine neden olmuşlardır (8, 35). ASA proteininde 414. aminoasitten sonraki aminoasitlerin olmayışı karboksi ucundaki filkete yapısına katılan halkaların ve disülfid bağı oluşturan aminoasitlerin de yokluğuna, proteinin katlanmasının ve üçüncül, dördüncül yapılarının bozulmasına yol açar (Şekil 5.1.).

Sonuç olarak, bu çalışma ile toplumumuzda MLD hastalığına neden olan ASA mutasyonlarının protein yapısı üzerindeki etkileri kanıtlanmıştır. Enzim tayininin tek başına yeterli olmadığı MLD hastalığında bu mutasyonlara sahip olan hastalarda doğum öncesi tanı amacıyla kullanılabilirler. Proteinin var olduğu ancak aktivitesinin olmadığı durumlar proteinin yanlış katlandığını düşündürmektedir. Bu durum substrat azaltma veya farmakolojik şaperonlarla tedavi için uygun olabilir. Farmakolojik şaperonlar polipeptitlere bağlanarak onların fonksiyonel yapılarını almalarına yardımcı olur, bu şekilde proteinin ER kalite kontrol sistemini geçerek lizozoma ulaşmalarını sağlarlar. Bundan sonra protein modelleme çalışmaları ile mutasyonların protein yapısına olan etkileri enzimin kristal yapısı üzerinde gösterilecektir.

6. KAYNAKLAR

1. Gieselmann V. Metachromatic leukodystrophy: genetics, pathogenesis and therapeutic options. *Acta Paediatr Suppl* 2008;97:15-21.
2. Kolodny EH. Metachromatic leukodystrophy and multiple Sulfatase deficiency: sulfatide lipidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *Metabolic basis of inherited disease*. 6 ed. New York: McGraw-Hill, 1989:1721-50.
3. Benson PF, Fensom AH. *Genetic biochemical disorders*. Oxford: Oxford University Press, 1985.
4. Barth ML, Fensom A, Harris A. The arylsulphatase A gene and molecular genetics of metachromatic leucodystrophy. *J Med Genet* 1994;31:663-6.
5. Hagberg B. Clinical symptoms, signs and tests in metachromatic leukodystrophy. In: Folch-Pi J, Bauer H, editors. *Brain Lipids and Lipoproteins and the Leukodystrophies*. Amsterdam: Elsevier, 1963:134.
6. Balslev T, Cortez MA, Blaser SI, Haslam RH. Recurrent seizures in metachromatic leukodystrophy. *Pediatr Neurol* 1997;17:150-4.
7. Figura KV, Gieselman V, Jaeken J. Metachromatic leukodystrophy. In: Scriver CR, beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 8 ed. New York: McGraw- Hill, 2001:3695-3724.
8. Shapiro EG, Lockman LA, Knopman D, Krivit W. Characteristics of the dementia in late-onset metachromatic leukodystrophy. *Neurology* 1994;44:662-5.
9. Shapiro LJ, Aleck KA, Kaback MM et al. Metachromatic leukodystrophy without arylsulfatase A deficiency. *Pediatr Res* 1979;13:1179-81.
10. Kolodny EH, Fluharty AL. Metachromatic leukodystrophy and multiple sulfatase deficiency sulfatide lipidosis,. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al., editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7 ed. New York: McGraw-Hill, 1995:2693.

11. Baum H, Dodgson KS, Spencer B. The assay of arylsulphatases A and B in human urine. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1959;4:453-5.
12. Biffi A, Lucchini G, Rovelli A, Sessa M. Metachromatic leukodystrophy: an overview of current and prospective treatments. *Bone Marrow Transplant* 2008;42 Suppl 2:S2-6.
13. Thomas GH, Howell RR. Arylsulfatase A activity in human urine: quantitative studies on patients with lysosomal disorders including metachromatic leukodystrophy. *Clin Chim Acta* 1972;36:99-103.
14. Hultberg B. Fluorometric assay of the arylsulphatases in human urine. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry Zeitschrift fur klinische Chemie und klinische Biochemie* 1979;17:795-7.
15. Raghavan SS, Gajewski A, Kolodny EH. Leukocyte sulfatidase for the reliable diagnosis of metachromatic leukodystrophy. *Journal of neurochemistry* 1981;36:724-31.
16. Baldinger S, Pierpont ME, Wenger DA. Pseudodeficiency of arylsulfatase A: a counseling dilemma. *Clinical genetics* 1987;31:70-6.
17. Eng B, Nakamura LN, O'Reilly N et al. Identification of nine novel arylsulfatase a (ARSA) gene mutations in patients with metachromatic leukodystrophy (MLD). *Human mutation* 2003;22:418-9.
18. Peters C, Steward CG. Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:229-39.
19. Orchard PJ, Blazar BR, Wagner J, Charnas L, Krivit W, Tolar J. Hematopoietic cell therapy for metabolic disease. *J Pediatr* 2007;151:340-6.
20. Biffi A, De Palma M, Quattrini A et al. Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* 2004;113:1118-29.
21. Biffi A, Capotondo A, Fasano S et al. Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J Clin Invest* 2006;116:3070-82.

22. Hess B, Saftig P, Hartmann D et al. Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14821-6.
23. Lutschg J. Pathophysiological aspects of central and peripheral myelin lesions. *Neuropediatrics* 1984;15 Suppl:24-7.
24. Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A, von Figura K. A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 1995;82:271-8.
25. Dierks T, Schmidt B, von Figura K. Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:11963-8.
26. Human-Gene Mutation Database.
27. 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.
28. Barth ML, Fensom A, Harris A. Prevalence of common mutations in the arylsulphatase A gene in metachromatic leukodystrophy patients diagnosed in Britain. *Hum Genet* 1993;91:73-7.
29. Harvey JS, Nelson PV, Carey WF, Robertson EF, Morris CP. An arylsulfatase A (ARSA) missense mutation (T274M) causing late-infantile metachromatic leukodystrophy. *Hum Mutat* 1993;2:261-7.
30. Pastor-Soler NM, Rafi MA, Hoffman JD, Hu D, Wenger DA. Metachromatic leukodystrophy in the Navajo Indian population: a splice site mutation in intron 4 of the arylsulfatase A gene. *Hum Mutat* 1994;4:199-207.
31. Fluharty AL, Fluharty CB, Bohne W, von Figura K, Gieselmann V. Two new arylsulfatase A (ARSA) mutations in a juvenile metachromatic leukodystrophy (MLD) patient. *American journal of human genetics* 1991;49:1340-50.
32. Tylki-Szymanska A, Berger J, Loschl B, Lugowska A, Molzer B. Late juvenile metachromatic leukodystrophy (MLD) in three patients with a similar clinical course and identical mutation on one allele. *Clin Genet* 1996;50:287-92.

33. Gieselmann V, Polten A, Kreysing J, von Figura K. Arylsulfatase A pseudodeficiency: loss of a polyadenylation signal and N-glycosylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:9436-40.
34. von Figura K, Gieselmann V, Jaeken J. Metachromatic leukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8 ed. New York: McGraw-Hill, 2000:2693–2740.
35. Onder E, Sinici I, Mujgan Sonmez F, Topcu M, Ozkara HA. Identification of two novel arylsulfatase A mutations with a polymorphism as a cause of metachromatic leukodystrophy. *Neurological research* 2009;31:60-6.
36. Anlar B, Waye JS, Eng B, Oguz KK. Atypical clinical course in juvenile metachromatic leukodystrophy involving novel arylsulfatase A gene mutations. *Developmental medicine and child neurology* 2006;48:383-7.
37. Franco B, Meroni G, Parenti G et al. A cluster of sulfatase genes on Xp22.3: mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embryopathy. *Cell* 1995;81:15-25.
38. Parenti G, Meroni G, Ballabio A. The sulfatase gene family. *Curr Opin Genet Dev* 1997;7:386-91.
39. Sommerlade HJ, Selmer T, Ingendoh A et al. Glycosylation and phosphorylation of arylsulfatase A. *The Journal of biological chemistry* 1994;269:20977-81.
40. Lukatela G, Krauss N, Theis K et al. 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;37:3654-64.
41. Schestag F, Yaghootfam A, Habetha M et al. The functional consequences of mis-sense mutations affecting an intra-molecular salt bridge in arylsulphatase A. *The Biochemical journal* 2002;367:499-504.
42. Vagedes P, Saenger W, Knapp EW. Driving forces of protein association: the dimer-octamer equilibrium in arylsulfatase A. *Biophysical journal* 2002;83:3066-78.
43. Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 1989;5:483-525.

44. Schierau A, Dietz F, Lange H, Schestag F, Parastar A, Gieselmann V. Interaction of arylsulfatase A with UDP-N-acetylglucosamine:Lysosomal enzyme-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *J Biol Chem* 1999;274:3651-8.
45. Dubois G, Turpin JC, Baumann N. Letter: Absence of ASA activity in healthy father of a patient with metachromatic leukodystrophy. *N Engl J Med* 1975;293:302.
46. Kihara H, Ho CK, Fluharty AL, Tsay KK, Hartlage PL. Prenatal diagnosis of metachromatic leukodystrophy in a family with pseudo arylsulfatase A deficiency by the cerebroside sulfate loading test. *Pediatric research* 1980;14:224-7.
47. Herz B, Bach G. Arylsulfatase A in pseudodeficiency. *Human genetics* 1984;66:147-50.
48. Shen N, Li ZG, Waye JS, Francis G, Chang PL. Complications in the genotypic molecular diagnosis of pseudo arylsulfatase A deficiency. *American journal of medical genetics* 1993;45:631-7.
49. Schaap T, Zlotogora J, Elian E, Barak Y, Bach G. The genetics of the aryl sulfatase A locus. *Am J Hum Genet* 1981;33:531-9.
50. Lott IT, Dulaney JT, Milunsky A, Hoefnagel D, Moser HW. Apparent biochemical homozygosity in two obligatory heterozygotes for metachromatic leukodystrophy. *J Pediatr* 1976;89:438-40.
51. Emre S, Topcu M, Terzioglu M, Renda Y. Arylsulfatase A pseudodeficiency incidence in Turkey. *Turk J Pediatr* 2000;42:115-7.
52. von Bulow R, Schmidt B, Dierks T et al. Defective oligomerization of arylsulfatase a as a cause of its instability in lysosomes and metachromatic leukodystrophy. *J Biol Chem* 2002;277:9455-61.
53. Kappler J, Sommerlade HJ, von Figura K, Gieselmann V. Complex arylsulfatase A alleles causing metachromatic leukodystrophy. *Hum Mutat* 1994;4:119-27.
54. Gieselmann V, Fluharty AL, Tonnesen T, Von Figura K. Mutations in the arylsulfatase A pseudodeficiency allele causing metachromatic leukodystrophy. *Am J Hum Genet* 1991;49:407-13.

55. Regis S, Filocamo M, Stroppiano M, Corsolini F, Caroli F, Gatti R. A 9-bp deletion (2320del9) on the background of the arylsulfatase A pseudodeficiency allele in a metachromatic leukodystrophy patient and in a patient with nonprogressive neurological symptoms. *Human genetics* 1998;102:50-3.
56. Ishizuka I. Chemistry and functional distribution of sulfoglycolipids. *Prog Lipid Res* 1997;36:245-319.
57. Honke K, Zhang Y, Cheng X, Kotani N, Taniguchi N. Biological roles of sulfoglycolipids and pathophysiology of their deficiency. *Glycoconj J* 2004;21:59-62.
58. Eckhardt M. The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol Neurobiol* 2008;37:93-103.
59. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis. *Z Kardiol* 2004;93:855-63.
60. Shikata K, Suzuki Y, Wada J et al. L-selectin and its ligands mediate infiltration of mononuclear cells into kidney interstitium after ureteric obstruction. *J Pathol* 1999;188:93-9.
61. Kobayashi T, Honke K, Miyazaki T et al. Hepatocyte growth factor specifically binds to sulfoglycolipids. *J Biol Chem* 1994;269:9817-21.
62. Morichika H, Hamanaka Y, Tai T, Ishizuka I. Sulfatides as a predictive factor of lymph node metastasis in patients with colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1996;78:43-7.
63. Hiraiwa N, Fukuda Y, Imura H et al. Accumulation of highly acidic sulfated glycosphingolipids in human hepatocellular carcinoma defined by a series of monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1990;50:2917-28.
64. Sakakibara N, Gasa S, Kamio K et al. Distinctive glycolipid patterns in Wilms' tumor and renal cell carcinoma. *Cancer Lett* 1991;57:187-92.
65. Li J, Pearl DK, Pfeiffer SE, Yates AJ. Patterns of reactivity with anti-glycolipid antibodies in human primary brain tumors. *J Neurosci Res* 1994;39:148-58.

66. Gnewuch C, Jaques G, Havemann K, Wiegandt H. Re-assessment of acidic glycosphingolipids in small-cell-lung-cancer tissues and cell lines. *Int J Cancer Suppl* 1994;8:125-6.
67. Norton WT, Cammer W. Isolation and characterization of myelin. In: Morell P, editor *Myelin* Plenum, New York: NY, 1984:147–195.
68. Morell P, Radin NS. Synthesis of cerebroside by brain from uridine diphosphate galactose and ceramide containing hydroxy fatty acid. *Biochemistry* 1969;8:506-12.
69. Sprong H, Degroote S, Nilsson T et al. Association of the Golgi UDP-galactose transporter with UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase allows UDP-galactose import in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 2003;14:3482-93.
70. Yaghootfam A, Sorkalla T, Haberlein H, Gieselmann V, Kappler J, Eckhardt M. Cerebroside sulfotransferase forms homodimers in living cells. *Biochemistry* 2007;46:9260-9.
71. Kolter T, Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:81-103.
72. Leffler H, Hansson GC, Stromberg N. A novel sulfoglycosphingolipid of mouse small intestine, IV3-sulfogangliotetraosylceramide, demonstrated by negative ion fast atom bombardment mass spectrometry. *J Biol Chem* 1986;261:1440-4.
73. Natomi H, Sugano K, Takaku F, Iwamori M. Glycosphingolipid composition of the gastric mucosa. A role of sulfatides in gastrointestinal mucosal defense? *J Clin Gastroenterol* 1990;12 Suppl 1:S52-7.
74. Toda K, Kobayashi T, Goto I et al. Lysosulfatide (sulfogalactosylsphingosine) accumulation in tissues from patients with metachromatic leukodystrophy. *J Neurochem* 1990;55:1585-91.
75. Liao YH, Lopez RA, Slomiany A, Slomiany BL. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide effect on the synthesis and secretion of gastric sulfomucin. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:1411-7.

76. Iida N, Toida T, Kushi Y et al. A sulfated glucosylceramide from rat kidney. *J Biol Chem* 1989;264:5974-80.
77. Hauser G. Labeling of Cerebrosides and Sulfatides in Rat Brain. *Biochim Biophys Acta* 1964;84:212-5.
78. Coetzee T, Fujita N, Dupree J et al. Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell* 1996;86:209-19.
79. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: Nolan C, editor *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2 ed. NY: Cold spring harbor laboratory press, 1989:A.6.
80. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: Nolan C, editor *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2 ed. NY: Cold spring harbor laboratory press, 1989:A.5.
81. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Preparation and transformation of competent *E.coli*. In: Nolan C, editor *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2 ed. NY: Cold spring harbor laboratory press, 1989:1.74-1.82.
82. MAX Efficiency DH5 α Competent Cells. Invitrogen.
83. QIAGEN Plasmid Purification Handbook. Qiagen.
84. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: nolan C, editor *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2 ed. NY: Cold spring harbor laboratory press, 1989:E.5.
85. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: Nolan C, editor *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2 ed. NY: Cold spring harbor laboratory press, 1989:5.28-5.32.
86. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: Nolan C, editor *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2 ed. NY: Cold Spring Harbor laboratory press, 1989:6.3-6.13.
87. MinElute Handbook MinElute Gel Extraction Kit. Qiagen.
88. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: Nolan C, editor *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2 ed. NY: Cold Spring Harbor laboratory press, 1989:1.68-1.71.
89. QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit instruction manual.
90. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: Nolan C, editor *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2 ed. NY: Coldy Spring Harbor laboratory press, 1989:16.30- 16.56.

91. SuperFect Transfection Reagent Handbook. Qiagen.
92. Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit Technical Bulletin. Sigma-Aldrich.
93. Suzuki K. Enzymatic diagnosis of sphingolipidoses. *Methods in enzymology* 1987;138:727-62.
94. Mini-PROTEAN Tetra Cell Instruction Manual. Bio-Rad.
95. Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system. GE Healthcare.
96. Ozkara HA, Topcu M. Sphingolipidoses in Turkey. *Brain & development* 2004;26:363-6.
97. Von Figura K, Gieselmann V, Jaeken J. The metabolic and molecular basis of inherited disease. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. *Metachromatic leukodystrophy*. 8 ed. NewYork: McGraw-Hill, 2001:3695–725.
98. Heim P, Claussen M, Hoffmann B et al. Leukodystrophy incidence in Germany. *American journal of medical genetics* 1997;71:475-8.
99. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1999;281:249-54.
100. von Bulow R, Schmidt B, Dierks T, von Figura K, Uson I. Crystal structure of an enzyme-substrate complex provides insight into the interaction between human arylsulfatase A and its substrates during catalysis. *Journal of molecular biology* 2001;305:269-77.
101. Tsuda T, Hasegawa Y, Eto Y. Two novel mutations in a Japanese patient with the late-infantile form of metachromatic leukodystrophy. *Brain & development* 1996;18:400-3.
102. Kreysing J, Bohne W, Bosenberg C et al. High residual arylsulfatase A (ARSA) activity in a patient with late-infantile metachromatic leukodystrophy. *American journal of human genetics* 1993;53:339-46.

EK1- Besiyeri, Tampon ve Çözeltiler

Laura Bertoni (LB) Agar

5 gr bacto-trypton, 2,5 gr bacto-yeast extract ve 5 gr NaCl 250 ml distile suda çözüldü. 2 N NaOH ile pH 7,0' ye ayarlandı. 7,5 gram agar (15 gr/L) eklenerek distile su ile 500 ml'ye tamamlandı ve otoklavda 20-25 dk (121°C, 15 lb/sq) sterilize edildi.

Laura Bertoni (LB) Sıvı Besiyeri

10 gr bacto-trypton, 5 gr bacto-yeast extract, 10 gr NaCl 950 ml distile suda çözüldü. 5N NaOH ile pH 7,0'ye ayarlandı. Distile su ile hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra otoklavda 20 dk (121°C, 15 lb/sq) sterilize edildi.

Ampisilinli LB medium

1 ml 50 mg/ml konsantrasyonda steril olarak ampisilin hazırlandı. LB agar en son otoklavdan çıktıktan sonra 1ml ampisilin 500 ml LB agarda çözüldü. Son konsantrasyon 0,1 mg/ml şeklinde hazırlanmış oldu.

TFB-1 Tamponu

500 ml distile suda son konsantrasyonları 30 mM sodyum asetat (pH 6,0), 50 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 100 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ve %15 gliserol olacak şekilde hazırlandı. pH 5,8'e ayarlandı ve steril filtreden geçirilerek süzülür.

TFB-2 Tamponu

Son konsantrasyonları 10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mM NaCl ve %15 gliserin olacak şekilde 50 ml distile suda hazırlandı. pH 6,4-7,0 arasında olacak şekilde ayarlandı ve steril filtreden geçirilerek süzülür.

Tris-Borik Asit-EDTA pH 8.0 (5X/litre) (TBE)

54 g Tris-baz, 27.5 g Borik asit ve 20 mL 0,5 M EDTA distile su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlandı.

Tris-Borik Asit-EDTA (1X) (TBE)

100 ml 5XTBE çözeltisi 400 ml distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak on kat seyreltilir. Hazırlanan çözelti +4°C de muhafaza edilir.

%1 Agaroz Jel

500 mg Agaroz 50 ml TBE solüsyonuna eklendi. Mikrodalga fırında 360°C' de 2,5 dk kaynatıldı. Hepsinin çözünmüş olduğundan emin olduktan sonra manyetik

karıştırıcıda 50°C' ye inmesi beklendi. DNA tespiti için hazırlanan agaroz jele 3 µl etidium-bromür (10 mg/ml) konuldu.

Western Blot İşleminde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

PAGE Yürütme Tamponu

3,03 gram Trisma baz, 14,4 gram glisin ve 1 gram SDS distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak çözüldü. +4°C'de muhafaza edildi.

Örnek Yükleme Tamponu

1,25 ml 0,5 M pH 6,8 Tris-HCl çözeltisi, 2,5 ml gliserol, 2 ml %10 SDS çözeltisi, 0,2 ml %0,5 Bromfenol mavisi çözeltisi ve 0,05 ml β-merkaptoetanol distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Jelden Membrana Proteinleri Aktarım Tamponu

6 gr Tris baz, 28,8 gr glisin ve 200 ml metanol distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp çözülerek hazırlandı.

TBS çözeltisi

1,21 gram Tris-baz ve 9 gram NaCl 900 ml distile suda çözüldü. Çözelti NaOH ve HCl kullanılarak pH 7,8'e ayarlandı ve distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

TBST (Tris-tuz-tween 20)

1000 ml TBS çözeltisine 1 ml tween-20 eklenerek hazırlandı.

Amonyum Persülfat Çözeltisi (1 ml %10)

100 mg amonyumpersülfat distile su ile 1 ml'ye tamamlanarak distile suda çözüldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi (1 ml %10)

100 mg SDS distile su ile 1 ml'ye tamamlanarak çözüldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

Kapatma (blocking) Çözeltisi (50 ml)

50 ml TBST çözeltisinde 2,5 gr BSA çözülerek hazırlandı.