T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Müjdat Uysal

138027

SPORADİK AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZLU HASTALARDA CuZn-SÜPEROKSİT DİSMUTAZ GENİNDE MUTASYON TARANMASI

138027

DOKTORA TEZİ

M.Sc. Öznur KANBAĞLI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İSTANBUL-2003

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Giriş ve Amaç..... 1

Genel Bilgiler..... 4

Gereç ve Yöntem..... 19

Bulgular..... 34

Tartışma..... 38

Özet.....42

İngilizce Özet..... 43

Kaynaklar..... 44

Özgeçmiş.....56

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her zaman destek olan tez danışmanım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Müjdat Uysal'a

Bilginin yanı sıra sevgi ve dostluklarıyla da her zaman yanımda olan Prof. Dr. Gülçin Aykaç-Toker ve Prof. Dr. Necla Toker'e

Tez konusu seçimimde bana yol gösteren ve hastaları sağlayan İst. Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi sevgili Prof. Dr. A. Halil İdrisoğlu'na

Tez çalışmalarımda bana laboratuvarını açan ve maddi ve manevi destek olan Chris Shaw'a ve sempatik ekibine

Her ihtiyacım olduğunda yardıma koşan asistan arkadaşım Pınar Çetinalp'e

Tezimin düzenlenmesindeki yardımları için sayın Yılmaz Aydın'a

Tüm Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine

Her zaman yanımda olan sonsuz sevgi, destek ve pozitif enerjisini benimle paylaşan sevgili eşime teşekkürler.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir.

Proje no: T-1173/01112001

Etik Kurul Onayı: 15.10.2001 tarih B.30.2.İST.0.02.00.00/338

GİRİŞ VE AMAÇ

Amyotrofik lateral skleroz (ALS) beyin sapında, kranial sinir çekirdeklerinde, omurilikte ön boynuz hücrelerinin tutulmasıyla giden, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın nedeni bilinmemektedir. Başlangıç yaşı değişken olup, semptomlar genellikle orta yaşlarda görülür ve 3-5 yıl içinde ölümle sonuçlanır (3, 34, 110).

ALS genellikle "sporadik (SALS)" ve "ailesel (FALS)" geçişli olarak sınıflandırılır. Ayrıca endemik olarak Guam adasında Parkinson Demans kompleksi ile birlikte görülmüştür (Guam tipi ALS). Vakaların % 90'nı sporadik, % 7-10 'u ise aileseldir (11, 35, 108, 110).

ALS motor nöronların dejenerasyonuyla ortaya çıkan bir hastalıktır. Motor nöronlar iskelet kaslarının kasılmasından sorumludur. ALS'de kortikospinal (upper) ve spinal (lower) olmak üzere 2 grup nöron farklı derecelerde etkilenmektedir (20). ALS'de motor nöronlar fonksiyonlarını ilerleyici (progresif) olarak kaybeder ve sonunda ALS'nin karakteristik semptomları ortaya çıkar. Başlangıç yerine bağlı olarak semptomlar vücudun farklı anatomik bölgelerinde farklı kombinasyonlarda ortaya çıkar. Hastalık yorgunluk, seyirme, kramp ve kas zayıflığı ile başlar, kol ve bacaklarda güçsüzlük ve atrofiler görülülür ise bu Spinal tip ALS olarak isimlendirilir. Bazı hastalarda konuşma ve yutma güçlüğü ilk belirti olarak ortaya çıkar, bu tip ALS ise Progresif Bulbar-Paralizi adını alır (66). Bazen de her iki tipin belirtileri birlikte ortaya çıkar.

ALS'de nörodejeneratif olayları başlatan nedenler bilinmemekle birlikte multifaktöryel (genetik, endojen toksin vb) nedenlerle ortaya çıkan bir hastalık olduğu gerçektir. ALS patojenezinde en önemli faktörler Cu-Zn-superoksit

dismutaz (SOD1) geni mutasyonları, glutamat toksisitesi, apoptoz olarak sıralanabilir (20, 95, 107).

SOD1'i kodlayan gendeki mutasyonla hastalık arasındaki ilişki ilk defa ailesel ALS'li hastalarda 1993 yılında ortaya konmuştur (83). SOD1 proteinini kodlayan gen 21. kromozomda bulunur, 5 ekzon ve 153 kodondan ibarettir. Patolojik mutasyonlar bütün ekzonlarda gösterilmiştir. Günümüzde tanımlanmış 100'den fazla SOD1 mutasyonu vardır (19, 23, 29, 74, 75, 76, 88).

FALS'de vakaların %25'inde SOD1 geninde mutasyon olduğu bulunmuştur (19, 22, 82, 110). Nadir de olsa sporadik hastalarda da SOD1 geni mutasyonları saptanmıştır. Tüm ALS'li hastaların % 1-2'sinde SOD1 geninde mutasyon olduğu bildirilmiştir (75). SALS'li hastalarla FALS'li hastalar klinik ve patolojik olarak birbirinden ayırt edilememesine rağmen (14, 31, 59, 73, 80), FALS'li hastalardan SOD1 mutasyonu taşıyanlarda hastalığın başlangıç yeri ve hastaların yaşam süresi SOD1 mutasyonu taşımayan hastalardan farklılık göstermektedir (29, 59, 75).

SOD1 gen mutasyonları genellikle otozomal dominanttır, fakat otozomal resesif geçişli mutasyon da saptanmıştır (5, 25, 29, 59, 75). Dominant geçişli SOD1 gen mutasyonları Avrupalı, Amerikalı, İngiliz ve Japon ailelerinde yaygındır. Saptanan mutasyonların çok az bir kısmı ise Avrupa'ya özgü mutasyonlardır (29).

ALS'de en yaygın olarak çalışılan mutasyon ise D90A mutasyonudur (107). Bu mutasyon ilk olarak Andersen ve ark. (5) tarafından 1995 yılında İsveç ve Finlandiya'da tanımlanmıştır. D90A mutasyonu kodlama dizisinin 1078. pozisyonunda adenin bazının sitozin bazı (A $\longrightarrow$ C) ile yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkar. Sonuçta kodon 90'da (ekzon 4) aspartat yerine alanin kodlanır (1, 4, 6, 82). D90A mutasyonu SOD1 mutasyonları içinde en yaygın olanıdır ve D90A mutasyonu dışında daha önce SOD1 için tanımlanan bütün mutasyonlar dominant geçişlidir. Oysa D90A mutasyonu hem dominant hem de resesif geçişli olarak farklı toplumlarda tesbit edilmiştir (35, 107). Resesif geçişli mutasyon ilk olarak İsveç ve Finlandiya, daha sonra Fransa, Almanya, Rusya, İtalya, Avustralya ve Amerikada saptanmıştır (2, 4, 5, 11, 51, 55, 60, 61, 98, 107, 110). Dominant geçişli D90A mutasyonu ise Belçika. İsveç, Finlandiya İskoçya, İngiltere ve Fransa'da saptanmıştır (2, 6, 43, 51, 82, 98).

Görüldüğü gibi, SOD1 gen mutasyonları oldukça yaygındır ve heterojen bir dağılım göstermektedir. Bu nedenle farklı toplumlarda farklı mutasyonların

görülmesi de olasıdır (96). Dünyada ALS hastalarında yaygın olarak görülen SOD1 mutasyonları Türk toplumunda gerek FALS ve gerekse SALS vakalarında araştırılmamıştır. Çalışmamızda öncelikle sporadik ALS'li vakalarda, diğer toplumlarda yaygın olarak görülen D90A mutasyonunun Türk toplumunda görülüp görülmediğini araştırmak istedik. Ayrıca, bu hastalarda D90A mutasyonu dışında başka bir mutasyon olup olmadığını da araştırmak istedik. Bu amaçla güvenilir, uygulaması kolay ve oldukça ucuz bir test olan "single strand conformational polimorphism" (tek iplikli yapısal çok şekillilik, "SSCP") (1, 89) tekniğini kullanarak sporadik ALS'li hastalarda SOD1 geninde mutasyon taraması yaptık.

GENEL BİLGİLER

İnsan beyninde bazıları oldukça farklılaşmış milyonlarca sinir hücresi vardır. Bunlar 80'den fazla sayıda farklı tür sinir hücresidir. Alzheimer, Parkinson ve ALS hastalıkları nöron kaybı veya nöron fonksiyonlarının bozulmasıyla ortaya çıkan, özelleşmiş nöronları etkileyen bir grup nörodejeneratif hastalıktır. Alzheimer hastalığında etkilenen nöronlar hafıza ve zekayı kontrol ederken, Parkinson hastalığında etkilenenler vücut hareketlerini kontrol eden nöronlardır. ALS ise iskelet kaslarının kasılmasından sorumlu olan motor nöronların hastalığıdır (66).

ALS beyin sapında ve kranial sinir çekirdeklerinde ve omurilikte ön boynuz hücrelerinin hasarına neden olan, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın etyopatojenezi bilinmemektedir, başlangıç yaşı değişkendir, ancak semptomlar genellikle orta yaşlarda görülür ve 3-5 yılda ölümle sonuçlanabilir (34, 101, 110).

ALS ilk kez 1874 yılında Fransız nörolog Jean Martin Charcot tarafından tanımlanmıştır. Bu tanımlama bugün de geçerliliğini korumakta ve ALS dünyanın bazı bölgelerinde Charcot hastalığı olarak da bilinmektedir. İngiltere'de motor nöron hastalığı, Amerika'da Lou Gehrig's hastalığı olarak tanınmaktadır (16, 18, 39, 66, 101). Ülkemizde ise Fenerbahçeli Sedat Balkan'ın hastalığı olarak bilinmektedir.

Epidemiyolojik ve biyokimyasal veriler ALS'nin çok faktörlü bir hastalık olduğunu göstermektedir. ALS'nin bilinen üç farklı formu vardır. Bunlar sporadik (SALS), ailesel (FALS) ve Pasifikte Guam ve Rota adalarında görülen endemik (GALS) formlardır (59, 91).

1) SPORADİK ALS (SALS): ALS olgularının % 90'ı sporadiktir (24,93). Özellikle glutamat gibi endojen toksinler, polimiyelitis gibi viral enfeksiyonlar, immün sistem bozuklukları, mangan, kurşun, selenyum, aluminyum ve civa gibi toksik maddelerin etkisiyle ortaya çıkan intoksikasyonlar, elektriksel travma başta olmak üzere fiziksel travmalar, ağır egzersizlerin yapıldığı spor dalları veya iş gücü gerektiren meslekler SALS oluşumunda etkili faktörler arasında gösterilmektedir. Ancak bazı SALS vakalarında da SOD1 mutasyonları tanımlanmıştır (4, 43, 97).

2) AİLESEL ALS (FALS) : ALS'li hastaların yaklaşık %7-10'u aileseldir (11, 110). Otozomal dominant bir hastalık olup çok az vakada otozomal resesif geçiş gözlenmiştir (5). FALS'li vakalarda klinik belirtiler SALS'li hastalar gibidir (14, 59, 73). Ancak FALS'li hastalarda hastalığın başlangıç yeri sporadiklerden farklı olarak genellikle ayaklardır. Hastalık daha erken yaşlarda başlar, erkeklerde ve kadınlarda eşit oranda görülür (13, 104). Tek yumurta ikizlerinden birinde hastalık görüldüğünde diğerinde de görülmekte, ancak ikizlerin diğerinde görülmesi için 1-11 yıl arasında değişen bir zaman dilimi geçmektedir. Bu durum FALS'nin ortaya çıkışında çevresel faktörlerin de önemini ortaya koymaktadır (20, 101). Nöropatolojik olarak FALS iki ayrı gruba ayrılabilir. Birinci grupta spinal ve kortikospinal motor nöronlarda dejenerasyonla birlikte Bunino cisimcikleri ve/veya ubikitin-immünreaktif nöronal inklüzyonlar görülür. Diğer grupta ise Lewy cisimcikleri benzeri inklüzyonlarla birlikte motor nöronlarda dejenerasyon görülür. Birinci grupta hastalığın ilerleme hızı yüksekken (<2yıl), diğer grupta daha iyi bir prognoz gözlenir (>5 yıl) (48, 49, 87, 91, 104, 106).

3) GUAM ALS'Sİ (GALS): Pasifik'te Mariana Adalarında (Guam ve Rota) çok sayıda ALS vakası görülmüştür. Bu yüksek insidanstan bazı yöresel faktörler sorumlu tutulmuştur. Bu nedenle araştırıcılar GALS'nin nedeni olarak enfeksiyon, toksik ajan/ajanlar veya besinsel faktörler üzerinde durmuşlardır. Bununla birlikte, GALS'ye neden olabilecek bir enfeksiyon kaynağı bulunamamıştır. Bu adanın suyunda ve toprağında magnezyum ve kalsiyum düzeylerinin düşük olması dikkati çekmiştir. ALS'nin sık görüldüğü bu bölgelerde, hastalarda kronik kalsiyum eksikliğine bağlı olarak sekonder hiperparotiroidizmin geliştiği, alüminyum absorbsiyonunun arttığı ve nöronlarda alüminyum birikmesine bağlı olarak motor nöronların ölümünün gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Gerçekten, kalsiyum ve magnezyumca azaltılmış diyetle beslenen sıçanlarda motor nöron dejenerasyonu ve bazı kas atrofileri gösterilmiştir. Son zamanlarda, ada halkının beslenmesinde önemli rol oyanayan Cycad cevizinin (Cycas cirninalis) tohumunun tüketiminin GALS'nin nedenlerinden birisi olabileceği ileri sürülmüştür. Gerçekten, bu yörede Cycad cevizi tüketiminin engellenmesi ile Parkinson-Demans ALS kompleksi görülme sıklığının azaldığı bulunmuştur. Bu da çevresel faktörlerin/toksinlerin ALS'nin nedenlerinden birisi olabileceğini düşündürmektedir (20, 59, 101).

ALS'Lİ HASTALARDA MOTOR NÖRON HASARINDA ETKİLİ OLAN FAKTÖRLER

1. SOD1 gen mutasyonlarının rolü

ALS'li hastalarda motor nöron hasarında en etkili faktörlerden biri olarak SOD1 genindeki nokta mutasyonları sorumlu tutulmaktadır. Bilindiği gibi, genotipteki kalıtsal değişimlere mutasyon adı verilir. Genotipte meydana gelen bu olay bir karakterdeki değişimle kendini belli eder. Böyle bir değişikliğin ürünü mutant olarak adlandırılır.

Mutasyonlar aşağıdaki özellikleri gösterirler;

1- Kalıtsaldır.

2-Daha önceden şifrelenmemiş ya da programlanmamış değişikliklerdir.

3-Oldukça ender meydana gelirler. Çünkü kalıtsal madde önceden şifrelenmemiş ender değişimlerin meydana gelişlerine karşı, çift sarmal yapısı ve proteinlere bağlanması ile genellikle kendini koruma eğilimindedir.

Mutasyonlar 2 grup altında toplanabilir.

1-Kromozom yapı veya sayısını değiştiren mutasyonlar

Bu gruptaki mutasyonlar kromozomların sayısını veya kromozomlardaki geniş bölgeleri ilgilendiren büyük değişimlerdir. Bu nedenle daha çok kromozom değişimleri olarak bilinirler. Kromozom düzeyindeki değişimlerde genlerin ya sayıları ya da yerleşim düzenleri değişir, bunun sonucunda da bireyin fenotipinde kalıcı değişimler ortaya çıkar.

2-Gen mutasyonları

Moleküler genetikte mutasyon denildiğinde, ilk (hatta tek) akla gelen gen mutasyonlarıdır. Gen mutasyonları genlerin yerinde değişme olmaksızın, yapılarında meydana gelen değişmelerdir. Genlerin yapısındaki değişmeyle taşıdığı şifre değişeceği için o gene özgü ürün de değişime uğrar. Bu değişme bazen fenotipte gözlenmeyecek kadar önemsiz olabilir, bazen meydana gelen protein biraz değişik olabilir ya da genin fonksiyonu mutasyonla tamamen yok olabilir. Bu nedenle, mutasyonların sonuçları fenotipte saptanamayan etkiden öldürücü etkiye kadar geniş bir yelpaze gösterir. Genin ürünündeki kaybın fenotipte saptanabilecek bir kusura yol açmaması **sessiz mutasyon**,

organizmanın ürünün yokluğunda yaşamını sürdürememesi ise **öldürücü mutasyon** olarak adlandırılır. Bu iki zıt uç arasındaki durumlarda genotipteki değişmeler fenotipte az ya da çok farklı derecelerde ortaya çıkar. Nokta mutasyonları bir gen üzerindeki sadece tek bir baz (nükleotid) çiftinin değişimiyle oluşan mutasyonlardır. Böyle bir değişim gende çok kısıtlı bir bölgeyi kapsadığı için nokta mutasyonu olarak adlandırılır (102).

FALS ve SALS vakalarında SOD1 geninde mutasyonların bulunmasıyla çalışmalar SOD1 enziminin ALS'deki rolü üzerine odaklanmıştır. SOD1 organizmada serbest radikal reaksiyonları sonucu gelişen oksidatif stresi önlemekle görevli antioksidan sistemin önemli bir üyesidir.

Bilindiği gibi, organizmanın prooksidan-antioksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmemiz için çok önemlidir. Serbest radikal oluşumundaki artışa ve/veya antioksidan sistemdeki yetersizliğe bağlı olarak organizmada oksidatif stres gelişmektedir. Serbest radikal reaksiyonları biyolojik sistemlerde önemli yer tutmaktadır. Serbest radikaller, dış orbitalinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan bileşiklerdir. Ömürleri çok kısa olan ve kararsız bir yapı gösteren bu tanecikler etrafındaki moleküllerle etkileşime girerek elektron almaya çalışırlar ve bir an önce kararlı hale ulaşmak isterler (32, 50, 100).

Aerobik organizmalarda serbest radikallerin çoğu oksijen ve azot kaynaklıdır. Bunlardan bir kısmı radikal niteliklidir, bir kısmı ise bazı reaksiyonlara katılıp radikallere dönüşebilmektedir (32, 100) (Tablo 1).

Tablo 1. Oksijen ve azot kaynaklı reaktif bileşikler

Radikaller		**Radikal olmayanlar**	
Hidroksil	$HO^{\cdot}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Alkoksil	$RO^{\cdot}$	Singlet oksijen	$^*O_2$
Peroksil	$ROO^{\cdot}$	Ozon	O_3
Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	Hipoklorit asit	HOCl
Nitrik oksit	$NO^{\cdot}$	Lipit hidroperoksit	LOOH
Azot dioksit	$NO_2^{\cdot}$	Peroksinitrit	$ONOO^-$

Serbest radikallerden en reaktif olanı hidroksil radikalidir. Bu radikal hücredeki her molekülle hızlı bir şekilde reaksiyona girebilir ve onu organizmadan uzaklaştıracak bir enzim sistemi mevcut değildir. Hidroksil radikali oluşturan iki ana yol vardır ve her iki yolda da superoksit radikali hidroksil radikalinin öncüsüdür (57).

$H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + O_2$ (Haber-Weiss reaksiyonu)

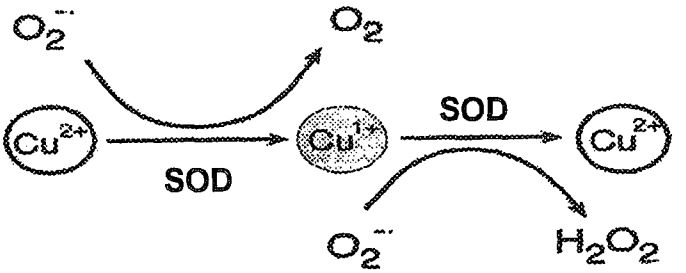
İkinci basamak Fenton raksiyonudur. Bu reaksiyonda superoksit radikali Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'ye indirger ve Fe^{2+} H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturur (57).

$Fe^{3+} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$

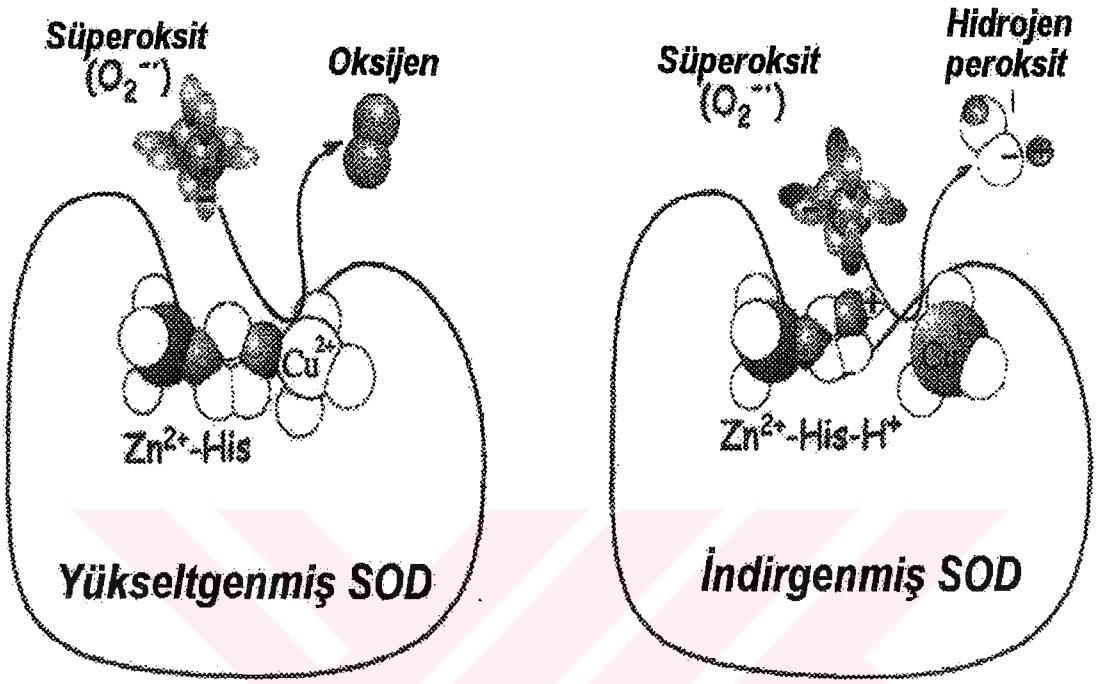
$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$

Bu nedenle ortamdan superoksit radikalinin uzaklaşması son derece önemlidir. CuZn-SOD (SOD1') in ana fonksiyonu süperoksit radikalini H_2O_2 ve oksijene dönüştürmektir. SOD1 enzimi sitozolde bulunur ve Cu-Zn bağlayan bir metalloenzimdir. Sitoplazmik SOD1' in yanı sıra mitokondride bulunan ve mangan içeren SOD (Mn-SOD, SOD2) ve ekstrasellüler SOD (SOD3) da vardır (20, 64, 94, 103). SOD1 bir bakır ve bir çinko atomu içeren 17 KD'luk homodimer bir proteindir. Her bir alt ünitesi 153 amino asit içerir ve karakteristik olarak β-varil katlanmaları görülür, aktif bölgesinde bir bakır (Cu) ve bir çinko (Zn) atomu içerir. Cu enzimin aktivitesi, Zn ise protein yapısının stabilizasyonu için gereklidir (21, 90, 93, 94). SOD1 proteininin β-varil katlanmaları ve alt ünitelerin dimerizasyonu enzimin normal fonksiyonu ve moleküler stabilitesi için gereklidir (21, 90, 93, 97).

SOD enzimi toksik süperoksit anyon radikallerinin ($O_2^{\cdot}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) dönüşümünü katalizler



Bu reaksiyon aşağıdaki gibidir (Şekil 1).



Şekil 1. SOD enziminin süperroksit anyon radikallerini ($O_2^{\cdot}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) dönüştürmesi.

Bu reaksiyonda ortaya çıkan H_2O_2 ise katalaz veya glutatyon peroksidaz tarafından su ve oksijene dönüştürülür.

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{katalaz}} H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{glutatyon peroksidaz}} 2H_2O + GSSG$$

Organizmada hidroksil radikali peroksinitrit anyonunun ayrışması ile de oluşmaktadır. Nitrik oksit (NO) superoksit radikali ile birleşme eğilimindedir. Bu iki molekül hızla birleşerek peroksinitrit anyonu oluşturmaktadır. Peroksinitrit hafif asit koşullarda protonlanarak peroksinitröz aside dönüşür, bu da yüksek derecede reaktif hidroksil radikalini ve azot dioksidi (NO_2) oluşturmak üzere ayrışabilir (8, 47).

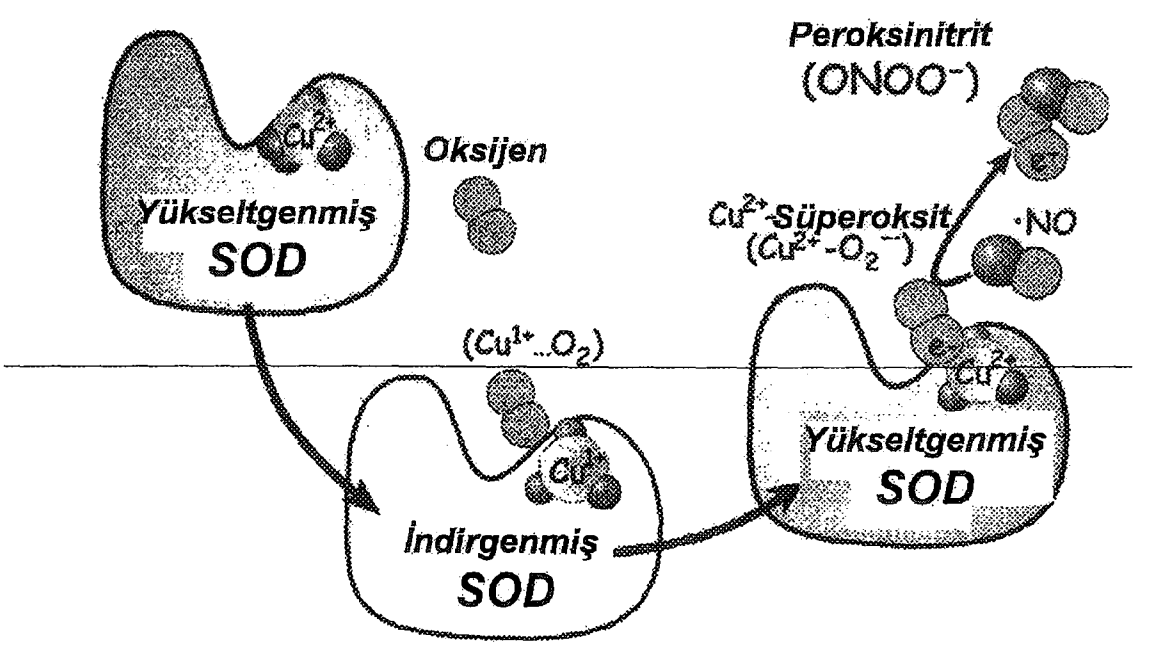
Süperoksit anyonu $O_2^{\cdot -} + NO^-$

Peroksinitrit anyonu $ONOO^- + H^+$

Peroksinitröz asit $ONOOH \longleftrightarrow OH^{\cdot} + NO_2$

SOD1 mutasyonlarının enzimin aktivitesini etkilemediği, enzimin alışılmışın dışında yeni bir fonksiyon kazanmasına yol açtığı görüşü benimsenmektedir (20, 36, 111). Mutant SOD1 eksprese eden transgenik farelerde SOD1 aktivitesinde bir değişiklik olmamasına karşılık motor nöron dejenerasyonu ve ALS gelişmektedir (29, 69, 72, 111). Buna karşılık, normal SOD1'in ne overekspresyonu, ne de "knockout"u transgenik farelerde hastalığa yol açmamaktadır (20). Bu bulgular normal SOD1 aktivitesinin azalmasının ya da artmasının hastalığın nedeni olmadığını göstermekte ve motor nöronların ölümününün mutant SOD1 enziminin toksik özellik kazanmasından kaynaklandığını düşündürmektedir (38, 88, 111).

Mutant SOD1'in toksik özellik kazanmasına yönelik olarak iki farklı hipotez ileri sürülmüştür (111). Birinci hipoteze göre SOD1'deki mutasyonlar enzimin çinkoya olan ilgisini azaltmakta ve Zn'nun enzimden uzaklaşmasına yol açmaktadır. Bu değişiklik süperoksit radikalinin dismutasyonunu etkilemekte, SOD1'in yapısındaki Cu^{++} süperoksit radikali yerine hücrede mevcut askorbat ve tioller tarafından Cu^+'e indirgenmektedir. Daha sonra bu Cu^+, oksijen ve NO ile birleşerek peroksinitrit oluşumuna neden olmaktadır (Şekil 2).

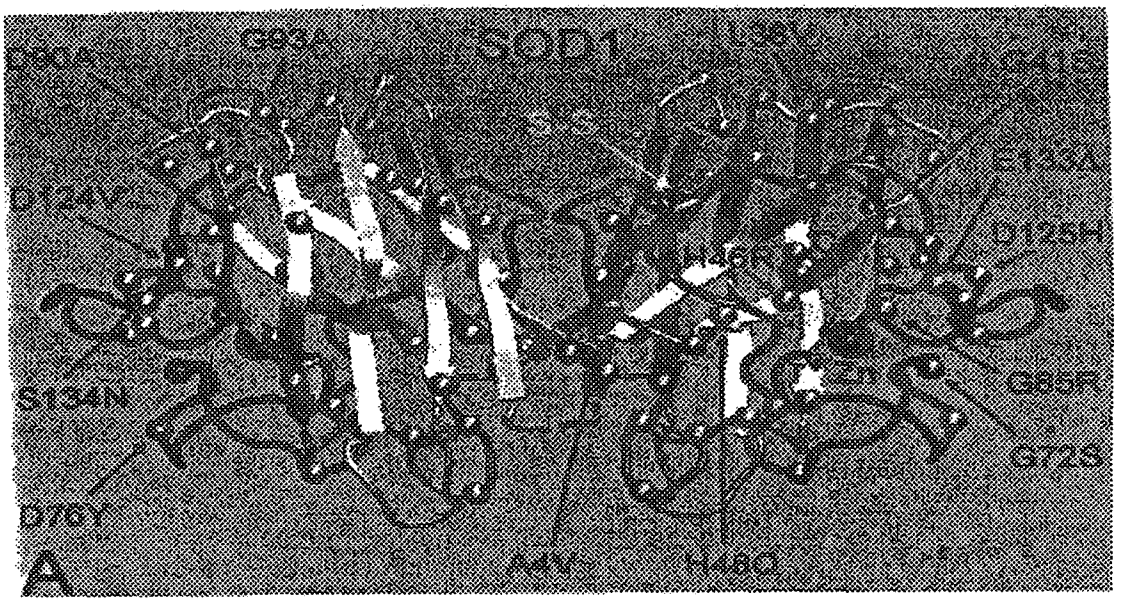


Şekil 2. SOD1 enzimi ve peroksinitrit oluşumu

Özetle, mutant SOD1 $O2^{\cdot-}$ i dismutasyona uğratma yerine, $O2^{\cdot-}$ ve NO ve dolayısıyla $ONOO^-$ üreten bir özellik kazanmaktadır. Mutant SOD1'in varlığı nedeni ile peroksinitrit oluşumundaki artış peroksinitrit ile tirozin arasındaki reaksiyonu da arttırmakta ve nitrozatif stresin artışına neden olmaktadır. Bu hipotezle uyumlu olarak hem ALS'li hastaların hem de mutant SOD1 eksprese eden transgenik farelerin omuriliklerinde motor nöron dejenerasyonuyla uyumlu olarak NO ve nitrotirozin düzeylerinin arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (8, 9, 111).

Mutant SOD1'in toksik özellik kazanmasını açıklayan 2. hipoteze göre, mutasyonlar enzimin peroksidaz aktivitesini de arttırmaktadır. ALS'li hastalarda ve mutant SOD1 eksprese eden farelerde nükleik asit, protein ve lipitlerin oksidatif hasarı sırasında açığa çıkan ürün düzeylerindeki artışlar ALS'de oksidatif ve nitrozatif stresin uyarıldığını açıkça göstermektedir (8, 15, 55, 56, 58, 109, 111).

SOD1 proteinini kodlayan gen 21. kromozomda bulunur, 5 ekzon ve 153 kodondan ibarettir. SOD1 mutasyonları öncelikle 2. ve 4. ekzonlarda bulunmuş, daha sonraları tüm ekzonlarda saptanmıştır. Günümüzde 100'den fazla SOD1 mutasyonu tanımlanmıştır (19, 23, 29, 74, 75, 76, 88). SOD1 mutasyonlarının katalitik bölgeden çok enzim dimerizasyonunun veya β varil dönmelerin olduğu bölgelerde bulunduğu gösterilmiştir (20, 36, 111) (Şekil 3). Mutasyonların çoğu otozomal dominant, küçük bir kısmı otozomal resesif geçişlidir (2, 6, 51, 75, 98, 107).



Şekil 3. Çeşitli SOD1 mutasyonları

Mutant SOD1'in hangi mekanizma ile motor nöron dejenerasyonuna yol açtığı tam olarak aydınlatılamamıştır (85). Bununla birlikte, farklı SOD1 mutasyonlarına sahip hastalarda farklı klinik belirtiler gözlenmiş, bazı mutasyonların hastalığın hızlı ilerlemesine yol açtığı bulunmuştur. Örneğin SOD1 Ala4Val mutasyonuna sahip hastalarda hastalık çok süratle, His46Arg mutasyonu görülenlerde ise çok yavaş ilerlemektedir (41, 81). Homozigot D90A mutasyonunda hastalık genellikle bacaklarda başlamakta ve yavaş ilerlemektedir (4, 65, 94, 107, 110).

Öte yandan, motor nöronların diğer hücrelere göre SOD1 mutasyonlarına duyarlılığının fazla olmasının nedeni açıkça bilinmemektedir. Ancak bazı hipotezler ileri sürülmüştür (111).

1) Motor nöronlar, diğer nöronal hücrelerden daha yüksek düzeylerde SOD1 eksprese ederler.

2) Nöronların büyüklüğü önemli bir faktör olabilir. Motor nöronlar memelilerde en uzun aksonlu ve en büyük nöronlardır. Dolayısıyla, bu büyüklüğü sürdürebilmek için yüksek metabolik aktiviteye gereksinim duyarlar. Bu durum oksijen kullanımında artışa ve yüksek düzeyde serbest radikal oluşumuna yol açabilir.

3) En büyük hücre tipi olan motor nöronlar diğer hücre tiplerine göre hücre içi organeller arasındaki yoğun transport işlemlerine bağımlılık gösterir. Mutant SOD1 mitokondri fonksiyonlarını etkileyerek veya nörofilamentlerin hasarına yol açarak bu transportu etkileyebilir.

4) Motor nöronlarda kalbindin ve parvalbumin gibi kalsiyum-tamponlayıcı proteinlerin düşük düzeylerde bulunması, motor nöronları Ca artışına duyarlı hale getirmektedir. Bu nedenle, seçimli motor nöron hassasiyetinden motor nöronların Ca homeostazını kontrol etme kapasitesinin düşük olması sorumlu tutulmaktadır (111).

2.Ekzotoksisite (Glutamat Toksisitesi)

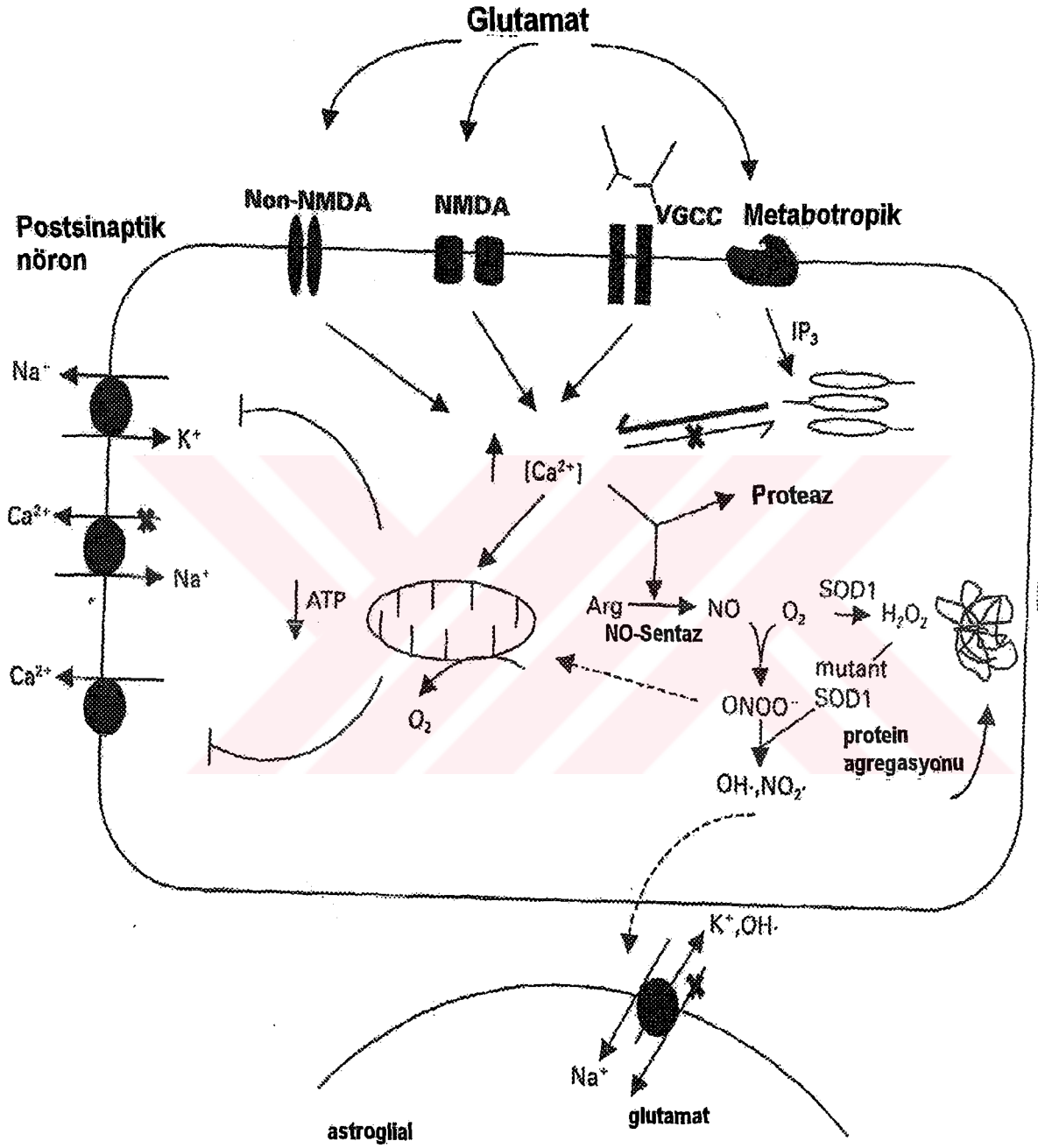
Glutamat beynin en önemli eksitatör nörotransmitteridir. Presinaptik terminal depolarize olduğunda, glutamat glutamaterjik nöronlardaki vesiküllerden kalsiyuma bağımlı bir mekanizma ile sinaptik cebe salınır. Burada ekzojen amino asit (EAA) reseptörleri olarak da bilinen glutamat reseptörlerinde aktivasyon gözlenir (17, 33,

44). Post-sinaptik bölgede motor nöronlarda 2 tür glutamat reseptörü ve astrositlerde glutamat taşıyıcı protein (GLT-1) bulunmaktadır. Motor nöron reseptörleri iyonotropik ve metabotropik reseptörlerdir. İyonotropik reseptörler N-metil-D-aspartat **(NMDA)** reseptörleri, α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izokazol-propionik asit **(AMPA)** ve **kainat** reseptörleri olmak üzere üç sınıfa ayrılır. AMPA ve kainat reseptörleri, **non-NMDA** reseptörleri olarak da adlandırılır. AMPA reseptörleri GluR1-Glu-R4 olarak isimlendirilen 4 farklı alt üniteden oluşur. Fonksiyonel AMPA reseptörlerinde bu alt ünitelerin farklı kombinasyonları vardır (15, 44, 92) (Şekil 4).

Glutamatın yüksek seviyeleri nörotoksiktir. Bu nedenle astrosit ve nöronların çevresinden spesifik glutamat taşıyıcıları ile uzaklaştırılmasının yaşamsal önemi vardır. Glutamatın metabotropik reseptörlere bağlanmasıyla sitozolik serbest inozitol-3-fosfat (IP_3) endoplazmik retikulumdaki reseptörüne bağlanarak sitoplazmaya kalsiyum salınımına neden olur. Glutamatın Ca^{2+}'ya geçirgen iyonotropik reseptörlere bağlanmasıyla hücre dışından nörona Ca^{2+} girer. Nöron içine kalsiyumun girişi glutamat reseptör alt ünitelerince düzenlenir. Alt ünitelerin çoğunluğu sodyum ve potasyuma geçirgenken, NMDA reseptör alt ünitesi kalsiyuma geçirgendir. GluR2 alt ünitesinin insan omurilik motor nöronlarında olmadığı gösterilmiştir. Dolayısı ile GluR2 alt ünitesi olmayan reseptörün aktivasyonu motor nöronlarda kalsiyum birikimine yol açar (15, 33, 44, 92).

Motor nöronlarda kalsiyum konsantrasyonunun yükselmesinin diğer nedeni de motor nöronların Ca^{2+} tamponlama kapasitesitelerinin düşük olmasıdır. Bunun nedeni motor nöronların parvalbumin ve kalbindin gibi kalsiyum tamponlayıcı proteinleri düşük oranda içermeleridir (44, 92).

Kalsiyumun hücre içine girmesi, hücre şişmesine ve NOS gibi enzimlerin aktiflenmesine neden olur. Bu da NO ve ortamda var olan süperoksitle birlikte toksik peroksinitrit oluşumuna ve sonuçta proteinlerin nitrozolanmasına ve çok sayıda proteinin inaktivasyonuna neden olur. Oksidatif stres sonucu mitokondri hasarı meydana gelir ve yine mitokondriden sitoplazmaya Ca^{2+} kaçışı olur ve ATP üretimi zarar görür. Enerji yokluğu Ca-ATPaz'a zarar verir ve motor nöronda kalsiyum birikir. Ayrıca motor nöronlar oldukça büyüktür ve uzun aksonları vardır. Bu nedenle hücre bütünlüğünün korunması için aksonal transportun etkin bir biçimde sürdürülmesi gerekir. Bu enerji gerektiren bir mekanizmadır ve bu nedenle motor nöronlar oksidatif hasara hassastırlar (33, 92).



Şekil 4. Glutamat reseptörleri

ALS'li hastaların beyin-omurilik sıvılarında ve plazmalarında glutamat ve aspartat düzeyleri yüksek bulunmuştur. Hem glutamat hem de aspartat ekstrasellüler ortamdan hücreye aynı taşıyıcı proteinle taşınmaktadır. Bu durum ALS'li hastalarda glutamat taşınmasında da bir bozukluk olabileceğini düşündürmüş ve daha sonra yapılan çalışmalarda glutamat taşınmasındaki inhibisyonun nörotoksisiteye neden olduğu bulunmuştur. Üç çeşit glutamat taşıyıcısı tesbit edilmiştir. Bunlar eksitatör amino asit taşıyıcısı (EAAC1), glutamat taşıyıcısı (GLT-1 veya EAAT2) ve hem glutamat hem aspartat taşıyıcısı (GLAST)'dir (33, 40, 44). GLT-1 merkezi sinir sisteminin en önemli glutamat taşıyıcısıdır. Yapılan çalışmalarda mutant SOD eksprese eden transgenik farelerde glutamatın hücre dışından taşınma kapasitesi azaldığı için hücre dışında glutamat ve aspartat seviyesinin yükseldiği bulunmuştur. SOD1 mutasyonuna sahip FALS'li hastalarda GLT-1 seviyesinin belirgin, EAAC1 seviyesinin ılımlı olarak azaldığı, GLAST seviyesinin ise değişmediği bulunmuştur. Bununla birlikte bu taşıyıcı proteinlerin mRNa seviyelerinin de değişmediği bulunmuştur. Bu durum bu proteinlerde translasyonal veya posttranslasyonal bir değişim olduğunu düşündürmektedir (15, 16, 33, 40, 44, 92).

Glutamat seviyelerinin ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun ALS patojenezinde önemli bir rol oynadığı açıktır. Bu da ALS'de glutamat salınımını inhibe eden riluzol gibi ilaçların veya eksojen amino asit antagonistlerinin tedavide kullanımına yol açmıştır (19, 44, 59).

3. Apoptoz

Apoptoz nöronal hücre ölümünde önemli rol oynar. Alzheimer, Parkinson, Huntington ve ALS gibi pek çok akut ve kronik nörolojik hastalıkta apoptozun nöron kaybında rol oynadığına dair kanıtlar her geçen gün artmaktadır. Bilindiği gibi, apoptoz programlanmış hücre ölümü mekanizması olarak tanımlanabilir. Hücrede meydana gelen primer apoptotik değişiklikler şunlardır: kromatin kondansasyonu, sitoplazmik vakuolizasyon, hücre büzülmesi ve hücre içi materyal içeren apoptotik membran oluşumunu izleyen plazma membranı tomurcuklanması. In vivo apoptotik parçacıklar hızlı bir şekilde komşu hücreler tarafından fagosite

edilir. Daha sonra nekroz meydana gelebilir, bu da hücre yıkımına ve plazma membranının kaybına yol açar (39, 77, 111).

Apoptoz Bcl-2-Bax protein ailesi, p53 tümör supresor gen, tümör nekroz faktör reseptör elemanları ve pek çok hücre siklusu genleri gibi pozitif ve negatif düzenleyici faktörleri içerir. Hücre ölümü mekanizmasının temel bileşikleri interlökin-1-β konverting enzim (ICE)- benzeri sistein proteazlardır, bunlar kaspazlar olarak da bilinir. Bu proteaz ailesi 11 üyeden oluşur ve üç alt gruba ayrılır. Proteazlar inaktif proenzimler olarak sentezlenir ve spesifik aspartatların yıkılması ile aktive olurlar. Proteazların aktivasyonu da aynı proteaz ailesinden proteazları veya başka proteaz ailesinden proteazları aktifler, bu da hücre ölümü mekanizmasını devam ettirir (19, 62, 86, 111).

ALS'de apoptozun rolü henüz açık değildir. Pek çok araştırıcı reaktif oksijen türlerinin (ROS) nöron apoptozunda önemli rol oynadığını düşünmektedir. SOD1 protein seviyesinin ve aktivitesinin azalması apoptotik nöron ölümünü arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda nöron hücre kültüründe SOD1'in overekspresyonun ROS aracılı apoptozu inhibe ettiği bulunmuştur. Buna karşılık, mutant SOD1'in apoptozu nasıl etkilediği açıklanamamıştır. Fakat mutant SOD1'in normal olmayan aktivite seviyeleri ile değil, başka bir fonksiyonla apoptotik davrandığı düşünülmektedir (15, 39, 53, 71, 77, 111).

4. Mitokondri Hasarı

ALS patojenezi ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda hücrelerde vakuolizasyon, golgide fragmantasyon ve mitokondri hasarının varlığı saptanmıştır. Mutant SOD1 toksisitesinde mitokondri en önemli hedeflerden biridir. Mitokondride serbest radikaller aerobik solunum sırasında doğal olarak oluşmaktadır. Ancak ortamda mutant SOD1 varsa serbest radikaller uzaklaştırılamadığı gibi, daha da toksik ürünlere dönüşmekte, bu da mitokondri hasarına yol açmaktadır. Mitokondri hasarının, sırayla enerji metabolizmasında azalmaya, oksidatif streste ve ekzotoksisiteye duyarlılıkta artmaya , yetersiz akzonal transport ve apoptoza neden olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (15, 37, 42, 43, 59).

Mitokondri hasarının, hastalığın erken döneminde görülmesi önemlidir. Bu hasardan serbest radikaller ve enerji yetersizliği sorumlu tutulmaktadır. Bu da

ekzotoksisiteye aşırı duyarlılığı indükleyerek nöronal degenerasyona yol açmaktadır (84, 105).

5. Kalsiyum Kanalları

ALS'de sorumlu faktörlerden bir tanesi olarak, voltaja-bağımlı Ca^{2+} kanalları üzerine yoğunlaşılmıştır. Çeşitli çalışmalarda, değişen hücre içi kalsiyum düzeyi ve Ca^{2+} kanallarındaki akış değişikliklerinin ALS üzerine etkileri incelenmiştir.

ALS'li hastalarda sinaptik terminallerde hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunun arttığı bulunmuştur. Bu artmış hücre içi kalsiyumdan sekonder olarak çok sayıda patofizyolojik mekanizma sonucu olabilir. Bunlar;

1-Ekzojen amino asit reseptörlerinin aktivasyonu

2- Voltaja bağımlı Ca kanallarının aktivasyonu

3-Mitokondri fonksiyonunda değişiklik

4-Ca-taşıyıcı proteinlerin düşük seviyeleri olarak belirtilebilir.

Değişmiş kalsiyum konsantrasyonu ALS'de gözlenir ve nöronlarda serbest radikal oluşumunu etkiler. Ca birçok noktada serbest radikal nörotoksisitesi için önemlidir. Özellikle artmış hücre içi serbest kalsiyum, ksantin dehidrojenazdan ksantin oksidaz oluşumunu katalizleyen serin proteaz (kalpain) aktivitesini arttırır. Ksantin oksidaz süperoksit anyonu, ürik asit ve H_2O_2 üretiminden sorumludur. Artmış hücre içi serbest Ca^{++} araşidonik asit salınmasını sağlayan fosfolipaz A2 ile reaksiyona girer ve sonuçta eikosonoidlerin seviyesi yükselir. Ca ayrıca nitrik oksit sentaz ile reaksiyona girer, bu da sonuçta nöronlar ve motor nöronlar için toksik olabilen nitrik oksit üretimine neden olur (20, 92).

Nöronlarda 5 tip voltaja bağımlı kalsiyum kanalı bulunur, bunlar elektrofizyolojik ve farmakolojik özelliklerine göre L, N, T, P/Q ve R olarak sınıflandırılır. Yapılan çalışmalarda Ca kanallarının α, β ve δ alt ünitelerini içeren bir kompleks olduğu bulunmuştur. Merkezi sinir sisteminde sentezlenen 5 tip $\alpha_{1A\text{-}E}$ alt ünitesi vardır ve her biri elektrofizyolojik ve farmakolojik olarak farklı Ca kanalını kodlar. Yapısal olarak her bir α_1 alt ünitesi 4 homolog domain (I-IV) içerir ve 6'dan 8'e kadar transmembran bölge içerdiği varsayılır. α_1 alt ünitesi tek başına Ca kanalı fonksiyonu oluşturur, major düzenleyici alt ünite ise β alt ünitesidir, kanalın hem kinetik hem de voltaj-bağımlılık özelliklerini düzenler (20).

ALS'de artmış kalsiyum akışı spesifik Ca kanalları aracılığı ile olur. Değişik populasyonlarda Ca kanalları farklı şekillerde davranabilir. ALS'de P-tip Ca kanallarında akış hızlanmaktadır. Yapılan son çalışmalarda ALS'li hastaların motor sinir terminallerinden elde edilen kas biyopsi çalışmalarında Ca düzeylerinde belirgin bir artışı tesbit edilmiştir (20).

7. Değişmiş Protein Kinaz Aktivitesi

Protein fosforilasyonu; sinir sisteminde nörotransmitter sentezi ve salınımı, iyon kanallarının geçirgenliğinin kontrolü ve aynı zamanda nöron farklılaşmasını da içeren pek çok biyolojik olayın kontrolünde rol oynar. Protein kinaz fonksiyonundaki değişiklikler bir çok mekanizma ile sonuçta ALS'de nöron kaybına neden olmaktadır. Bunlar ALS hastalarında protein kinaz aktivitesinin veya miktarının değişiklikleri ile ilgili olabilir. ALS hastalarının omurilik dokularında Ca-bağlı protein kinaz aktivitesi anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. Artmış aktivite tamamen olmasa da kısmen membran proteini artışı nedeniyledir. Motor nöron hücre kültürü ile yapılan son çalışmalarda artmış hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun protein kinaz aktivitesinin artmasına yol açabileceği gösterilmiştir. Ancak aktivitenin artma nedeni bilinmemektedir. ALS'li dokularda bulunan yükselmiş protein kinaz aktivitesinin hastalığın spesifik bir sonucu mu yoksa nöron ölümüne bir cevap mı olduğu bilinmemektedir (20, 54).

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran ve El-Escorial kriterlerine göre kesin ALS tanısı konmuş vakalardan ve herhangibir seçim yapılmaksızın sıradan çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmamıza alınan 30 hastanın 25'i erkek, 5'i kadın olup, hastaların yaşları 38-72 arasında (Ort ± SD; 53.7 ± 8.2) değişmektedir. Erkek kadın oranı 5/1'dir. SOD1 mutasyon taranması için, kan alındığında hastaların hastalık yaşı ortalaması 2.6 ± 1.8 yıldı. Kan alındıktan sonra yaklaşık 1 yıl süreyle takip ettiğimiz 30 olgunun 6'sı vefat etti. Bu süre içinde 2 hastaya trakestomi ve gastrostromi yapıldı. Trakestomi bu hastalarda hastalığın son noktası (end-point) kabul edildiğinden 30 hastanın 7'sini vefat etmiş gibi kabul edebiliriz. Hastaların tümünde rutin laboratuvar incelemeleri ve MR sonuçlarının normal olmasına karşılık 30 hastanın 20'sinde kreatin kinaz aktivitesi (CK) yüksek bulundu.

Hastalarımızın nörolojik muayeneleri en az 2 nörolog tarafından yapıldı ve EMG incelemelerini takiben ALS tanısı kondu. Hastaların düzenli kontrolleri 6 ay aralıklarla ayrıntılı bir nörolojik muayene ile yapıldı. Rutin kan incelemeleri (H6000, gikoz, BUN, kreatinin, elektrolitler, ALT, AST, GGT ve CK) kan ve idrarda kurşun tayini, akciğer grafisi ve solunum fonksiyon testlerini içermektedir. EMG bütün hastalara uygulanarak tanıya yardımcı önemli bir metod olarak kullanıldı. EMG'lerin çoğu, İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilimdalı EMG laboratuvarında EMG ve sinir ileti ölçme yöntemi 3 kanal 14 A 30 tipinde Disa elektromiyograf kullanılarak yapılmıştır. Motor ünit potansiyelleri konsantrik iğne elektrotları ile alınmıştır. Aksiyon potansiyelleri monitörde gözlenmiş ve nitelikleri vizüel olarak saptanmıştır. Sinir ileti hızı incelemelerinde bipolar yüzeyel elektrot uyarıcı elektrot olarak kullanılmıştır. İnceleme sükunetle spontan faaliyetlerin gözlenmesi hafif ve orta kasılmada motor ünit potansiyellerinin görülmesi ve maksimal kasılmada interferans paterninin değerlendirilmesi biçiminde uygulanmıştır. Hastaların bir bölümü ise EMG'lerini dışarıda bir laboratuvarda yaptırarak kliniğimize başvuran hastalardır.

Hastalarımızın tümüne kraniyal ve servikal MR (manyetik rezonans) görüntülemesi yapılmıştır. Hastaların yaş, cins, hastalık yaşı, hastalık tipi ve CK sonuçları Tablo-2'de gösterilmiştir.

Kontrol grubu olarak "Departments of Neurology and Medical and Molecular Genetics, Guy's King's and St Thomas's' School of Medicine and Institute of Psychiatry, King's College London" dan sağlanan ve mutasyon taşıdığı bilinen örnekler kullanılmıştır.

EI-ESCORİAL KRİTERLERİ (12)

ALS tanısı için aşağıdaki durumların olması gereklidir.

1- Alt motor nöron bulguları (klinik olarak normal kaslarda bile EMG'nin patolojik olması)

2- Üst motor nöron bulguları

3- Hastalıkta progresyon

A- Diagnostik kriterlerde alt sınıflandırma

1- Kesin ALS

Alt motor nöron + Üst motor nöron bulguları 3 bölgede

2- Muhtemel ALS

Alt motor nöron + Üst motor nöron bulguları 2 bölgede

3- Olası ALS

Alt motor nöron + Üst motor nöron bulguları 1 bölgede veya Üst motor nöron bulguları 2 veya 3 bölgede

4- Şüpheli ALS

Alt motor nöron bulguları 2 veya 3 bölgede veya diğer motor bulgular (aynı bölgede atrofi+ kemik veter refleksleri canlılığı monomelic ALS)

Bölgelerin tanımı: 4 bölge

1- Beyin sapı

2- Brakial

3- Crural

4- Gövde

ALS tanısına yardımcı bulgular ise;

1- Bir veya daha fazla bölgede fasikülasyon

2- EMG'de nörojenik değişiklikler

3- Normal motor ve duyusal sinir iletileri

4- Konduksiyon blokunun olmamasıdır.

Tablo 2: Hastaların cins, yaş, hastalık yaşı, CK ve hastalık tipi

Hasta No	Cins	Yaş	Hastalık yaşı(yıl)	CK	EMG	MR	Hastalık tipi	Sonuç
1	E	48	2	280	+	+	BP*	vefat
2	E	45	0,5	370	+	+	spinal	vefat
3	E	72	2	217	+	+	ALS+BP	vefat
4	E	45	4	112	+	+	spinal	-
5	E	55	10	98	+	+	spinal	vefat
6	K	57	0.5	297	+	+	ALS+BP	-
7	E	62	1,5	282	+	+	ALS	-
8	E	57	2	288	+	+	ALS	-
9	E	62	1,5	310	+	+	ALS	-
10	E	58	2	210	+	+	ALS	-
11	E	45	5	82	+	+	spinal	stabil
12	E	55	3	370	+	+	ALS+BP	vefat
13	E	40	3	248	+	+	ALS+BP	gastrostomi trakestomi
14	K	50	2	280	+	+	spinal	-
15	E	57	4	376	+	+	ALS+BP	-
16	E	61	5	318	+	+	ALS+BP	gastrostomi
17	E	48	2	197	+	+	ALSspinal	-
18	K	47	2	215	+	+	spinal	-
19	K	53	2	215	+	+	ALS+BP	-
20	E	48	3	310	+	+	ALS+BP	-
21	E	38	3	270	+	+	spinal	-
22	E	55	4	376	+	+	ALSspinal	-
23	E	55	2	374	+	+	spinal	-
24	E	43	2	217	+	+	spinal	-
25	E	67	1	187	+	+	spinal+BP	-
26	E	62	3	320	+	+	ALS+BP	trakestomi
27	K	55	1	276	+	+	ALS	-
28	E	48	1,5	292	+	+	spinal	-
29	E	56	3	318	+	+	ALS+BP	vefat
30	E	68	2	320			ALSspinal	-

Çalışmamızda hastaların SOD1 geninde ekzon 4'de D90A mutasyonu taşıyıp taşımadığı araştırılmıştır. Ayrıca hastaların tüm SOD1 geni (ekzon 1, 2, 3, 4 ve 5)'nde herhangi bir mutasyonun var olup olmadığı incelenmiştir. D90A mutasyonu tesbiti için hasta DNA'ları izole edilmiş, PCR ile çoğaltılmış ve uygun enzimle kesilerek mutasyonun varlığı araştırılmıştır. Ekzon 1, 2, 3, 4 ve 5'deki herhangi bir mutasyonu saptamak için SSCP yöntemi kullanılmıştır. PCR ile çoğaltılan DNA örnekleri tek iplikli hale getirilerek elektroforez uygulanmış ve bantlar gümüş boyama tekniği ile görünür hale getirilmiştir. Tanımlanan her iki yöntem için öncelikli olarak DNA izolasyonu yapılmıştır.

Çalışma materyali olarak izole edilen DNA örnekleri kullanılmıştır. EDTA'lı tüplere alınan 5 ml periferik kan örneği bekletilmeden dondurulmuş ve –20 °C'de DNA izolasyonu yapılıncaya kadar saklanmıştır.

I- DNA İZOLASYONU (10)

Ayıraçlar:

1-Tris-EDTA (TE) Tamponu: 1.576 g Tris-HCl ve 372.2 mg etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) tartılarak beher içine alındı. 900 ml bidistile su eklendi ve pH'sı 1 N NaOH ile 7.4'e ayarlandı. Çözelti ölçü balonuna alınarak 1 L'ye tamamlandı, ısıya dayanıklı cam şişelere aktarılarak 120 C'de 15 dk otoklavlandı ve + 4 C'de saklandı.

2-Parçalayıcı Tampon (L6 Tampon): 120 g guanidin tiyosiyanata 100 ml 0.1 M Tris-HCl (pH:6.4), 22 ml 0.2 M EDTA (pH:8.0) ve 2.6 g TritonX-100 eklendi koyu renkli bir şişede gece boyunca karıştırılarak çözüldü, oda sıcaklığında saklandı.

3-L2 Tampon: 120 g ganidin tiyosiyanata 100 ml 0.1 M Tris-HCl (pH:6.4) eklendi ve çözülünceye kadar 60 C'de karıştırıldı. Çözüldükten sonra oda sıcaklığında saklanarak kullanıldı.

4-Silika Çözeltisi: 60 g silikon dioksit tartılarak 500 ml'lik ölçü silindirine konuldu ve bidistile su ile 500 ml'ye tamamlanarak 24 saat oda sıcaklığında bırakıldı. 430 ml'lik süspansiyon pipet yardımıyla alındı ve ölçü silindiri yeniden bidistile su ile 500 ml'ye tamamlandı. Bu sürenin sonunda 440 ml üst faz alındı. Toplanan üst fazlar birleştirilerek 500 µl konsantre HCl ile pH:2.0'ye ayarlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişeye aktarılarak 120 C'de 15 dk otoklavlandı ve –20 C'de saklandı.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM

5-0.1 M Tris-HCl (pH:6.4): 15.76 g Tris-HCl tartılarak üzerine 800 ml bidistile su eklendi. pH 1 N NaOH ile 6.4'e ayarlandı, 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam bir şişede 120 C'de 15 dk otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

6-0.2 M EDTA (pH:8.0): 7.454 g EDTA tartılarak 80 ml bidistile suya eklendi. pH:8.0 oluncaya kadar 10 N NaOH eklendi ve 100 ml'ye tamamlandı. Cam şişede 120 C'de 15 dk otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

İşlem:

1-50 µl kan örneği üzerine 900 µl parçalayıcı L6 tampon ve 50 µl silika çözeltisi eklendi ve tüpün kapağı kapatıldı.

2-Tüp 5 sn vortekslendi ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Bekletme aşamasında her 2 dk'da 5 sn vortekslendi. Örnekler 30 sn 2500 x g'de santrifüj edildi. Üst faz steril pastör pipeti yardımıyla atıldı.

3-Pellet 1 ml parçalayıcı L2 tamponu ile vortekslenerek süspande edildi. 2500 x 'de 30 sn santrifüj edildi ve üst faz steril pastör pipeti ile atıldı.

4-Pellet için 3. basamak tekrar edildi.

5-Pelletin üzerine %70 ethanol eklendi vortekslenerek süspanse edildi ve 30 sn 2500 x g'de santrifüj edildi. Üst faz steril pastör pipeti yardımıyla atıldı.

6-Pelletin üzerine 1 ml aseton eklendi, süspande edildi ve 2500 x g'de santrifüj edildi. Süpernatan steril pastör pipeti yardımı ile atıldı.

7-Tüpler 10 dk 56 C'de 10 dk ısıtılmış blokta kapakları açık bekletildi ve tamamen kurumaları sağlandı.

8-50 µl TE tampon eklenerek vortekslendi. 56 C'de 10 dk bekletilerek çözüldü vortekslendi ve 2 dk 2500 x g'de santrifüj edildi.

9-Üst faz dikkatlice otomatik pipet kullanılarak çekildi ve +4 C'de saklandı.

DNA Miktar Tayini:

DNA miktar tayini için örneklerin 280 nm'de spektrofotometrede absorbansları okundu. 280 nm'de okunan 1 absorbans 50mg/ml DNA miktarına karşılıktır. Buna göre okunan değerlerden basit bir orantı ile miktarlar tesbit edildi.

II- D90A MUTASYONUNUN SAPTANMASI (99)

SOD1 proteinini kodlayan gen 21. kromozomda bulunur ve beş ekzondan ibarettir. Patolojik mutasyonlar bütün ekzonlarda gösterilmiştir. D90A mutasyonu ekzon 4'de 1078. pozisyonda adenin bazını sitozin bazına dönüşmesi ile ortaya çıkar. Sonuçta kodon 90'da aspartat alanine dönüşür.

D90A mutasyonunu saptamak için öncelikle SOD1'in 4. ekzon bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı.

a) Ekzon 4 için PCR koşulları (99)

20 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. PCR karışımına 2.5mM deoksinukleotid trifosfat (dNTPs; dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), x 10 reaksiyon tamponu, 25 mM MgCl2, 10pmol primer çifti, 9.3 µl bidistile su, 0.4 U/ µl Taq polimeraz enzimi ve yaklaşık 65 ng olacak şekilde DNA örnekleri eklendi. Örneklerin üzerine pastör pipeti ile bir damla mineral yağ damlatılarak reaksiyon Progene Techne Thermal Cycler'da gerçekleştirildi.

Ekzon 4 için reaksiyon koşulları:

Reaksiyon 3 bölümde gerçekleşmektedir.

1.bölüm: 94 0C'de 1dk denatürasyon,

2. bölüm: 94 ^{0}C'de 30 sn denatürasyon

57 ^{0}C'de 30 sn primerlerin bağlanması

72 ^{0}C'de 1 dk zincir uzaması **35 DÖNGÜ**

3. bölüm: 72 ^{0}C'de 5 dk uzama

Ekzon 4 için primer dizisi:

F-Primer 5'CATCAGCCCTAATCCATCTGA 3'

R-Primer 5'CGCGACTAACAATCAAAGTGA 3'

b) Agaroz Jel Elektroforezi (99)

PCR ile çoğaltılan ürünleri incelemek için % 1'lik agaroz jel hazırlandı.

Ayıraçlar

1-Jel yükleme tamponu: 15 g Fikol 400, 250 mg bromfenol mavisi, 250 mg ksilen siyanol tartılarak 100 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

2-Etidyum bromür stok (10 mg/ ml) : 10 mg etidyum bromür tartılarak distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Koyu renkli bir şişede oda sıcaklığında saklandı.

3-Etidtum bromür çözeltisi: Stok etidyum bromür çözeltisinden 100 µl alınarak 100 ml distile suya eklendi.

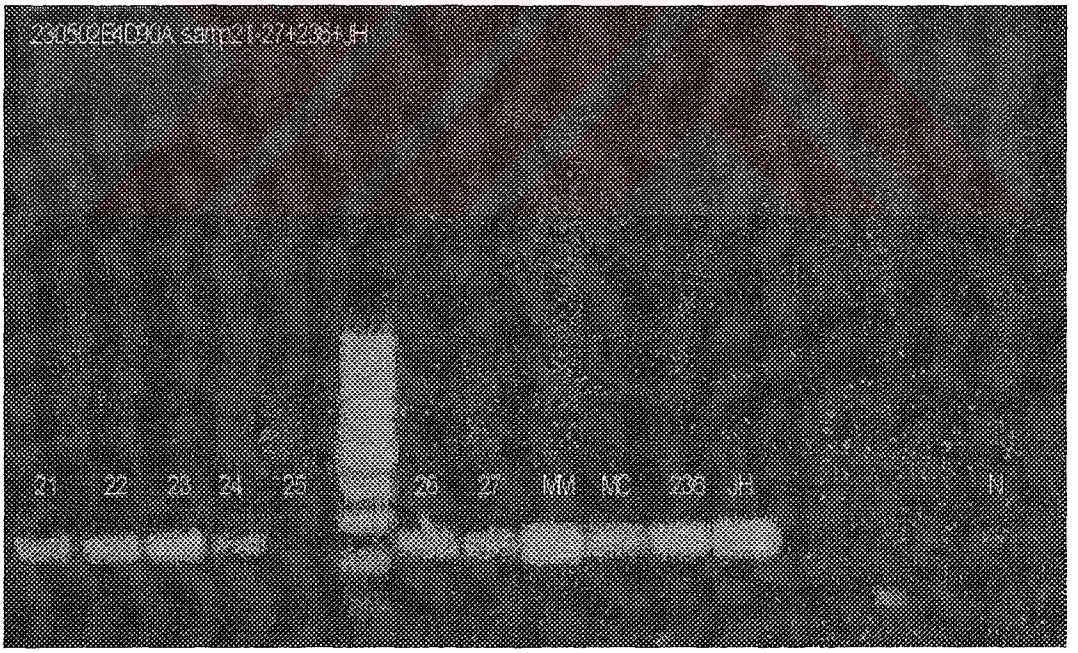
4-X 10 Tris-borik asit-etilen diamin tetra asetat (TBE) tamponu: 800 ml distile suya 108 g Tris-baz, 55g borik asit ve 40 ml o.5 M EDTA (pH:8.0) eklendi. Çözüldükten sonra 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklanarak kullanıldı.

Agaroz jelin hazırlanışı:

150 mg agaroz tartılarak behere alındı. Üzerine 100 ml 1 x TBE çözeltisi eklendi ve mikrodalga fırında 3 dk'da çözüldü. Bir miktar soğutulduktan sonra jel tepsisine döküldü, taraklar yerleştirildi ve oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

Agaroz jel kuruduktan sonra örneklerin yüklenmesi işlemine geçildi. Örnekler jel yükleme tamponu ile ½ oranında sulandırılarak 10 µl olacak şekilde jele yüklendi. 100 V'luk elektrik akımında oda sıcaklığında 30 dk yürütüldü.

Jelde örneklerin görüntülenmesi: Karanlık odada jel % 1'lik etidyum bromürlü çözeltide 30 dk çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Bu sürenin sonunda jel UV transilluminatöre alındı. Kodak digital kamera ile fotoğraf çekimi yapıldı.



c) Enzimle Kesme (99)

PCR ile çoğaltılmış örneklerde D90A mutasyonu varsa Fnu4H1 restriksiyon enzimi için yeni bir kesim noktası oluşmuş olur. Mutasyonu saptamak için çoğaltılan DNA örnekleri Fnu4H1 ile kesildi, poliakrilamid jelde yürütüldü ve gümüş boyama yapılarak görüntülendi.

Kesme işlemi: Çoğaltılmış DNA örneklerinden 12 µl bir ependorfa alındı üzerine 1.5 µl Fnu4H1, 2.25 µl tampon (NEB 4) ve 6.75 µl bidistile su eklendi. Hızlı çevirme (quick spin)'den sonra 37 0C'de 24 saat bekletildi. Poliakrilamid jelde yürütüldü.

Poliakrilamid Jel Elektroforezi (99)

Ayıraçlar

1-Akrilamid / bisakrilamid : % 30'luk hazır solusyon (37.5, akrilamid : 1,bisakrilamid)

2-X 10 Tris-borik asit-etilen diamin tetra asetat (TBE) tamponu: 800 ml distile suya 108 g Tris-baz, 55g borik asit ve 40 ml 0.5 M EDTA (pH:8.0) eklendi. Çözüldükten sonra 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklanarak kullanıldı.

3-1 x TBE solusyon : 10 x TBE solusyondan 10 ml alınarak ölçü balonunda bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4-%10 Amonyum persülfat (APS): 1 g amonyum persülfat tartılarak distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Taze olarak kullanıldı.

5-TEMED (Sigma)

6-Jel yükleme tamponu: 15 g Fikol 400, 250 mg bromfenol mavisi, 250 mg ksilen siyanol tartılarak 100 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Jelin Hazırlanması : % 10'luk jel hazırlandı. 50 ml Jel karışımı için; 18.75 ml akrilamid / bisakrilamid, 5.0 ml 1x TBE, 0.5 ml %10 APS ve 0.025 ml TEMED alındı ve bir falkon tüpüne konularak bidistile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Solusyon hızlı bir şekilde önceden hazırlanmış cam plakların arasına hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilerek döküldü, taraklar yerleştirildi ve oda sıcaklığında polimerize olması beklendi. Jel polimerize olduktan sonra yürütücü tanka alındı. Tank 1 x TBE ile doldurularak örnekler jele yüklendi. Bu işlem için 15 µl örnek karışımı ve 15 µl jel yükleme tamponu ile karıştırıldı. 20 µl jele yüklendi, 100 V'da 24 saat yürüldü. Yürütme işlemi soğuk odada yapıldı.

24. saatin sonunda jel tanktan alındı ve boyama işlemine geçildi. Jelde ayrılmış olan DNA'ları görünür hale getirmek için gümüş boyama tekniği kullanıldı.

e) Gümüş Boyama İşlemi (89)

Ayıraçlar

1-% 10 etanol: % 96lık etanolden hazırlandı. 10 ml % 96'lık etanol bidistile su ile 96 ml'ye tamamlandı.

2-% 1 nitrik asit solusyonu: 14 ml % 69 nitrik asit bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3-% 0.2 gümüş nitrat solusyonu: 1 g $AgNO_3$ ve 1.25 ml % 40 formaldehit bidistile su ile 500 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

4-283 mM sodyum karbonat solusyonu (Developing solusyonu): 30 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) ve 1.25 ml % 40 formaldehit 1000 ml bidistile suda çözüldü.

5-%10 glasiyal asetik asit solusyonu (Stop solusyonu): 100 ml % 100'lük glasiyal asetik asit bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

İşlem:

Tüm işlemler oda sıcaklığında ve çalkalayıcı üzerinde yapıldı. Jel tanktan alındıktan sonra, DNA'ları fikse etmekiçin jel %10'luk ethanol solusyonuna alındı, 5 dk bekletildi. Solusyon dökülerek, %1'lik nitrik asit solusyonu eklenerek 5 dk bekletildi. Bu solusyonda dökülerek 30 dk gümüş boyama çözeltisinde bekletildi. Bu sürenin sonunda gümüş çözeltisi 10 ml konsantre HCl üzerine döküldü (gümüş ertesi gün çöker ve süzülerek filtre kağıdı ile atılır). Jel bidistile su ile 1 dk yıkandı. DNA'ları görünür hale getirmek için devoloping solusyonu eklendi. DNA bantları görünür hale gelinceye kadar bekletildi ve döküldü. Reaksiyonu durdurmak için stop solusyon eklendi ve 30 dk bekletildi. Stop solusyon döküldü jel bidistile su ile 1 dk yıkandı ve kurutma işlemine geçildi.

Jel kuyucukları jel kesicisi ile jelin yırtılmamasına dikkat edilerek kesildi. Kurutma işlemi kurutucu filmler arasında yapıldı. Jeller cam levha üzerinde jel filmi ile kaplanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. 24 saat sonra kuruyan jeller kesilerek filmden ayrıldı ve digital kamera ile görüntülendi.

III- SİNGLE-STRAND CONFORMATİONAL POLYMORPHISM (SSCP) ile SOD1 GENİNDE MUTASYON ARANMASI

SSCP ile mutasyon aranması için öncelikle PCR ürünlerine ihtiyaç vardır. SSCP için öncelikle her bir ekzon (ekzon 1, 2, 3, 4 ve 5) PCR ile ayrı ayrı çoğaltıldı. Çoğaltılan DNA örnekleri tek iplikli hale getirilerek elektroforez ile ayrıldı. Gümüş boyama tekniği ile boyanarak görüntülendi.

a) PCR koşulları:

Ekzon 1 (18, 43)

20 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımına 2.5 mM deoksinukleotid trifosfat (dNTPs), x10 reaksiyon taponu, 25 mM MgCl2, 10 pmol primer çifti, 8.3 µl bidistile su, 1 µl DMSO, 0.4 U/ml Taq polimeraz ve yaklaşık 65ng olacak şekilde DNA örnekleri eklendi. . Örneklerin üzerine pastör pipeti ile bir damla mineral yağ damlatılarak reaksiyon Progene Techne Thermal Cycler'da gerçekleştirildi.

Ekzon 1 için reaksiyon koşulları:

1.bölüm: 94 0C'de 1dk denatürasyon

2. bölüm: 94 ^{0}C'de 40 sn denatürasyon

52 ^{0}C'de 40 sn primerlerin bağlanması

72 ^{0}C'de 1 dk zincir uzaması **35 DÖNGÜ**

3. bölüm: 72 ^{0}C'de 10 dk uzama

Ekzon 1 için primer dizisi:

F-Primer 5' TTCCGTTGCAGTCCTCGGAA 3'

R-Primer 5' GCGGCCTCGCAAACAAGCCT 3'

***Ekzon 2 (11, 43)**

20 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımına 2.5 mM deoksinukleotid trifosfat (dNTPs), x10 reaksiyon taponu, 25 mM MgCl2, 10 pmol primer çifti, 7.5 µl bidistile su, 1 µl DMSO, 0.4 U/ml Taq polimeraz ve yaklaşık 65ng olacak şekilde DNA örnekleri eklendi. . Örneklerin üzerine pastör pipeti ile bir damla mineral yağ damlatılarak reaksiyon Progene Techne Thermal Cycler'da gerçekleştirildi.

Ekzon 2 için reaksiyon koşulları:

1.bölüm: 94 0C'de 1dk denatürasyon

2. bölüm: 94 ^{0}C'de 40 sn denatürasyon

52 ^{0}C'de 40 sn primerlerin bağlanması

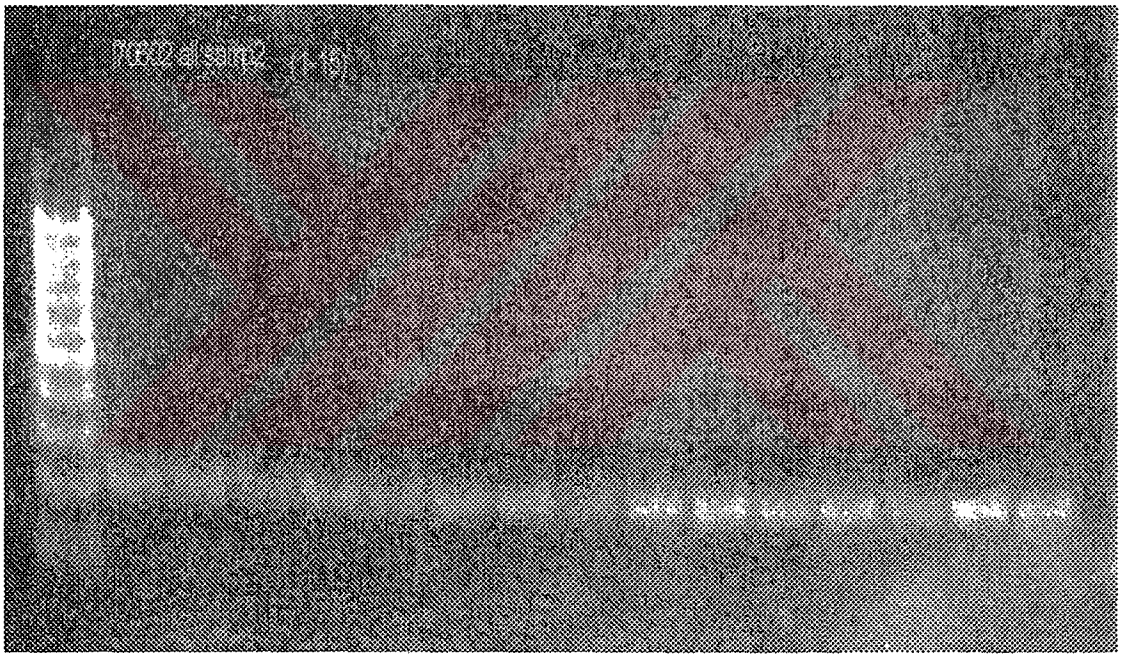
72 ^{0}C'de 1 dk zincir uzaması **35 DÖNGÜ**

3. bölüm: 72 ^{0}C'de 10 dk uzama

Ekzon 2 için primer dizisi:

F-Primer 5' TTCAGAAACTCTCTCCAACTT 3'

R-Primer 5'CGTTTAGGGGCTACTCTACTGT 3'



***Ekzon 3 (11, 43)**

20 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımına 2.5 mM deoksinukleotid trifosfat (dNTPs), x10 reaksiyon taponu, 25 mM MgCl2, 10 pmol primer çifti, 8.5 µl bidistile su, 0.4 U/ml Taq polimeraz ve yaklaşık 65ng olacak şekilde DNA örnekleri eklendi. Örneklerin üzerine pastör pipeti ile bir damla mineral yağ damlatılarak reaksiyon Progene Techne Thermal Cycler'da gerçekleştirildi.

Ekzon 3 için reaksiyon koşulları:

1.bölüm: 94 0C'de 1dk denatürasyon

2. bölüm: 94 ^{0}C'de 1 dk denatürasyon

53 ^{0}C'de 40 sn primerlerin bağlanması

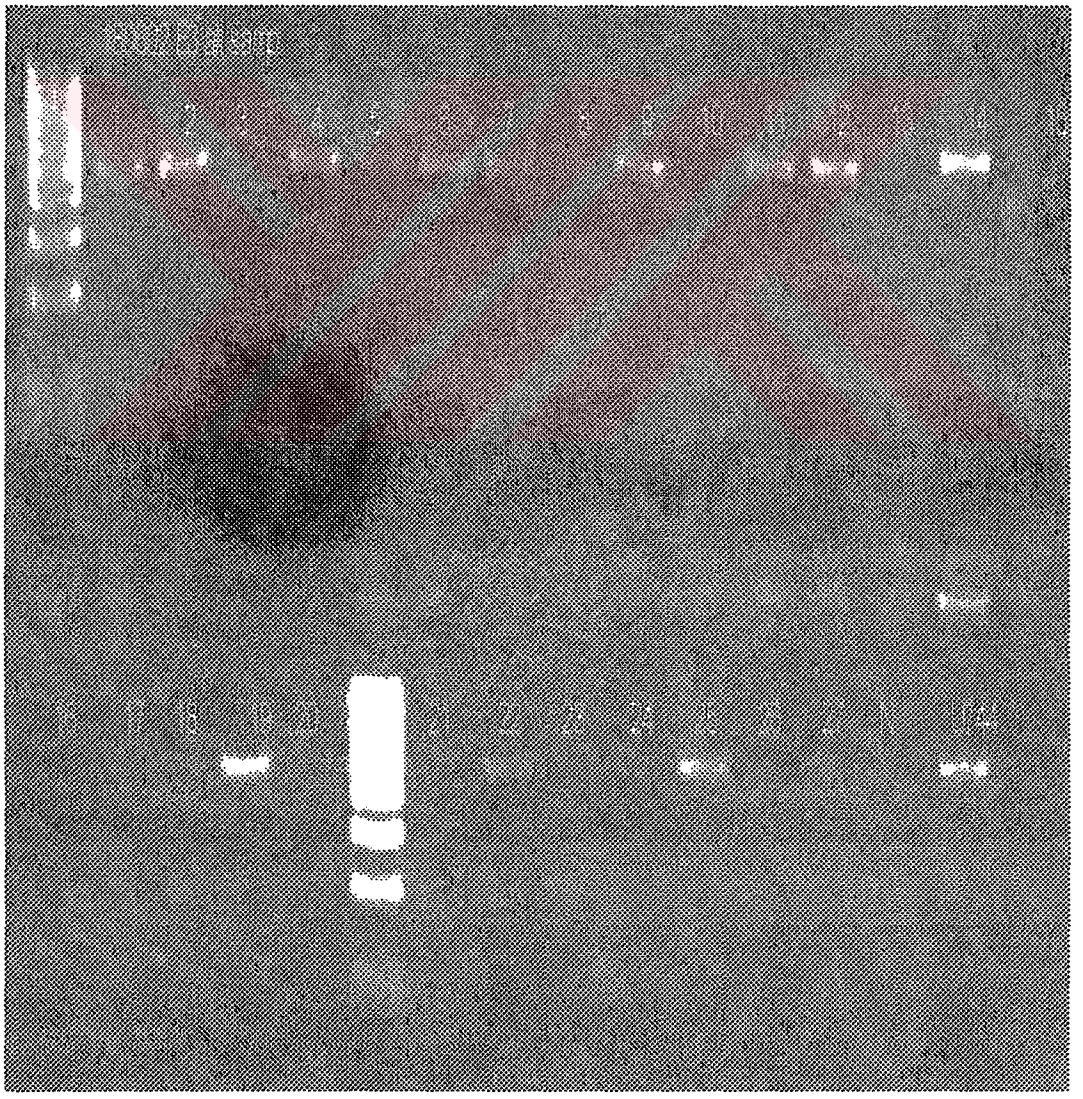
72 ^{0}C'de 40 sn zincir uzaması **30 DÖNGÜ**

3. bölüm: 72 ^{0}C'de 5 dk uzama

Ekzon 3 için primer dizisi:

F-Primer 5' TTCTGTTCCCTTCTCACTGT 3'

R-Primer 5' TCCCCTTTGGCACTTGTATT 3'



***Ekzon 4 (43, 61)**

20 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. PCR karışımına 2.5mM deoksinukleotid trifosfat (dNTPs) x 10 reaksiyon tamponu, 25 mM MgCl2, 10pmol primer çifti, 9.3 µl bidistile su, 0.4 U/ µl Taq polimeraz enzimi ve yaklaşık 65 ng olacak şekilde DNA örnekleri eklendi. Örneklerin üzerine pastör pipeti ile bir damla mineral yağ damlatılarak reaksiyon Progene Techne Thermal Cycler'da gerçekleştirildi.

Ekzon 4 için reaksiyon koşulları:

1.bölüm: 94 0C'de 1dk denatürasyon

2. bölüm: 94 ^{0}C'de 30 sn denatürasyon

57 ^{0}C'de 30 sn primerlerin bağlanması

72 ^{0}C'de 1 dk zincir uzaması **35 DÖNGÜ**

3. bölüm: 72 ^{0}C'de 5 dk uzama

Ekzon 4 için primer dizisi:

F-Primer 5'CATCAGCCCTAATCCATCTGA 3'

R-Primer 5'CGCGACTAACAATCAAAGTGA 3'

***Ekzon 5 (18, 43)**

20 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımına 2.5 mM deoksinukleotid trifosfat (dNTPs), x10 reaksiyon taponu, 25 mM MgCl2, 10 pmol primer çifti, 8.3 µl bidistile su, 1 µl DMSO, 0.4 U/ml Taq polimeraz ve yaklaşık 65ng olacak şekilde DNA örnekleri eklendi. . Örneklerin üzerine pastör pipeti ile bir damla mineral yağ damlatılarak reaksiyon Progene Techne Thermal Cycler'da gerçekleştirildi.

Ekzon 5 için reaksiyon koşulları:

1.bölüm: 94 0C'de 1dk denatürasyon

2. bölüm: 94 ^{0}C'de 40 sn denatürasyon

52 ^{0}C'de 40 sn primerlerin bağlanması

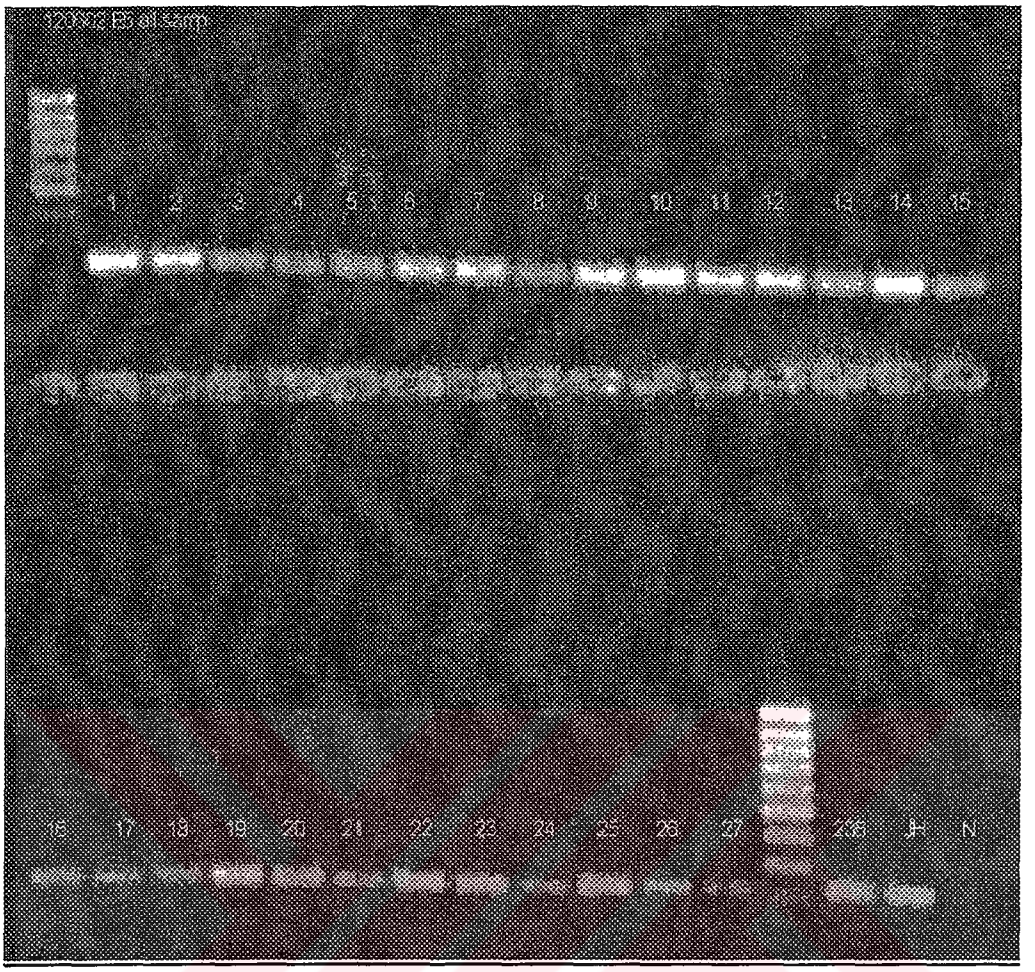
72 ^{0}C'de 1 dk zincir uzaması **35 DÖNGÜ**

3. bölüm: 72 ^{0}C'de 10 dk uzama

Ekzon 5 için primer dizisi:

F-Primer 5' GTATTGTTGGGAGGAGGTAGTGAT 3'

R-Primer 5'GCAGGATAACAGATGAGTTAAGGG 3'



b) SSCP'NİN UYGULANMASI (89)

Elde edilen her PCR ürünü için % 8'lik poliakrilamid jel hazırlandı.

Ayıraçlar

1-Stop Çözelti: 90 ml deionize formamit ölçülerek üzerine 0.04 g NaOH, 25mg bromfenol mavisi (% 0.025) ve 25 mg ksilen siyanol tartılarak eklendi. Çözelti ölçü balonuna alınarak 100 ml'ye tamamlandı. Koyu renkli bir şişede +4 0C'de saklandı.

2-Akrilamid / bisakrilamid : % 30'luk hazır solusyon.

3-X 10 Tris-borik asit-etilen diamin tetra asetat (TBE) tamponu: 800 ml distile suya 108 g Tris-baz, 55g borik asit ve 40 ml 0.5 M EDTA (pH:8.0) eklendi. Çözüldükten sonra 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklanarak kullanıldı.

4-1 x TBE solusyon : 10 x TBE solusyondan 100 ml alınarak ölçü balonunda bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

5-%10 Amonyum persülfat (APS): 1 g amonyum persülfat tartılarak distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Taze olarak kullanıldı.

6-TEMED (Sigma)

7-Gliserol (Sigma)

8-MDE jel solusyonu(2x konsantre) (Flowgen)

9-Jel yükleme tamponu: 15 g Fikol 400, 250 mg bromfenol mavisi, 250 mg ksilen siyanol tartılarak 100 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Jelin Hazırlanması: 50 ml jel karışımı için: 13.33 ml akrilamid / bisakrilamid, 5.0 ml 1x TBE, 2.5 ml gliserol, 0.5 ml %10 APS, 0.25 ml MDE ve 0.025 ml TEMED alındıdı ve bir falkon tüpüne konularak bidistile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Solusyon hızlı bir şekilde önceden hazırlanmış cam plakların arasına hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilerek döküldü, taraklar yerleştirildi ve oda sıcaklığında polimerize olması beklendi. Jel polimerize olduktan sonra yürütücü tanka alındı. Tank 1 x TBE ile doldurularak örnekler jele yüklendi.

Örneklerin jele yüklenmek üzere hazırlanması: 10 µl PCR ile çoğaltılmış DNA örneği ve 10 µl stop çözelti ile karıştırıldı. 5 dk 95 0C'de denatüre edildi. Örnekler, renatüre olmaması için, hızla buz üzerine alındı. Örneklerin üzerine ve 10 µl jel yükleme tamponu eklendi ve jele yüklendi, 100 V'da 24 saat yürüldü. Yürütme işlemi soğuk odada yapıldı.

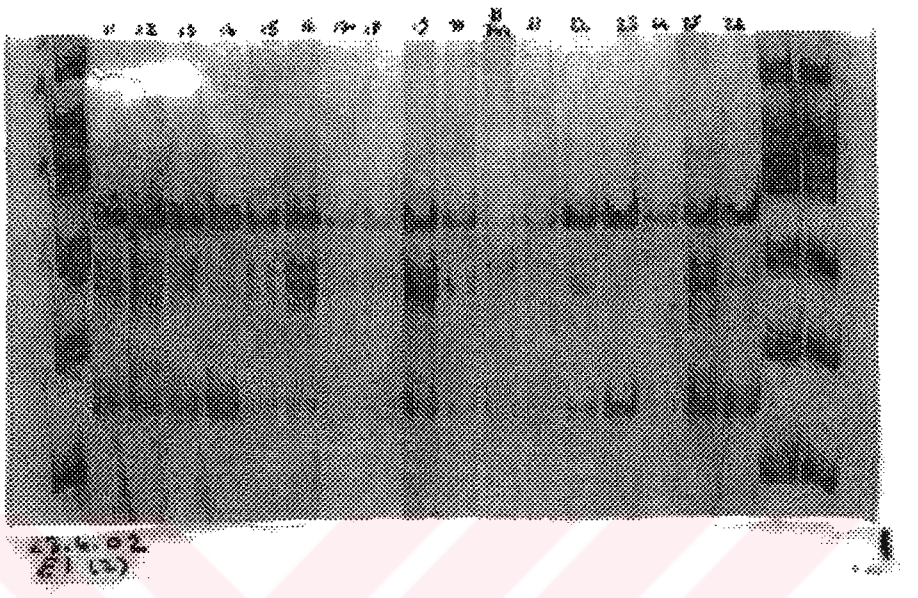
24. saatin sonunda jel tanktan alındı ve boyama işlemine geçildi. Jelde ayrılmış olan DNA'ları görünür hale getirmek için daha önce anlatılmış olan gümüş boyama tekniği kullanılarak boyama işlemi yapıldı ve jeller kurutuldu ve değerlendirildi.

BULGULAR

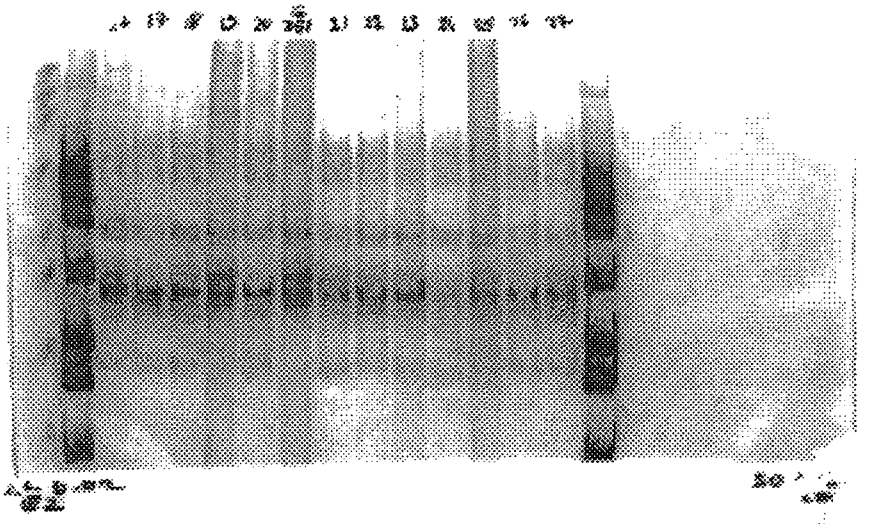
1-Çalışmamızda D90A mutasyonun saptanması için örnekler PCR ile çoğaltıldı, PCR örnekleri Fnu4H1 restriksiyon enzimi ile kesildi ve poliakrilamid jelde görüntülendi. Ayrıca kontrol olarak homozigot ve heterozigot mutasyon taşıdığı bilinen pozitif örnekler kullanıldı. Sonuçlarımıza göre hastaların hiç birinde D90A mutasyonu saptanmadı (Şekil 5).

2- Hastaların SOD1 geninin tümünde (ekzon 1, 2, 3, 4 ve 5) herhangi bir mutasyonun var olup olmadığını araştırmak için ekzon 1, 2, 3, 4 ve 5 PCR ile çoğaltıldı. Daha sonra SSCP uygulandı ve jel görüntüleri değerlendirildi. Kontrol olarak mutasyon taşıdığı bilinen pozitif örnekler kullanıldı. Buna göre örneklerimizin hiç birinde herhangi bir SOD1 mutasyonu bulunamadı (Şekil 6-10).

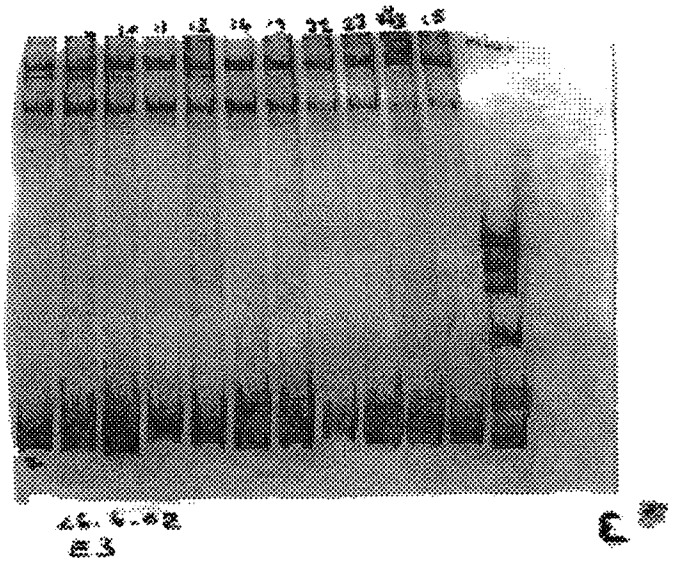
Şekil 5. Ekzon 4 PCR ürünlerinde D90A mutasyonunun saptanmasında kullanılan poliakrilamid jel görüntüsü örneği



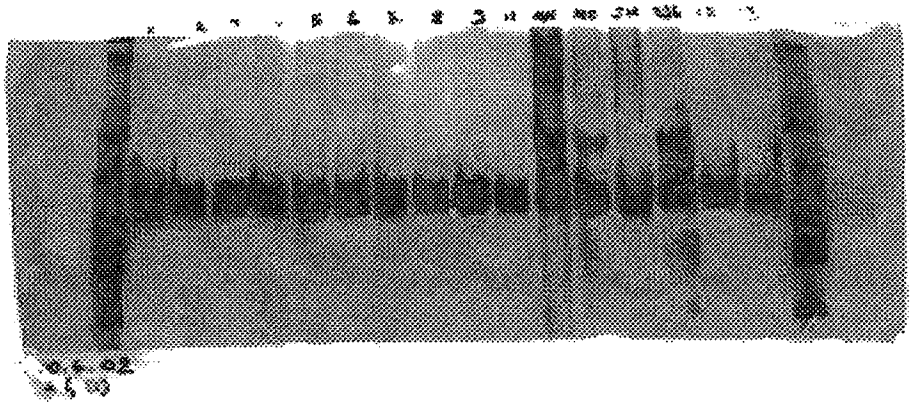
Şekil 6. Ekzon 1 PCR ürünlerinin SSCP gel görüntüsü örneği



Şekil 7. Ekzon 2 PCR ürünlerinin SSCP gel görüntüsü örneği

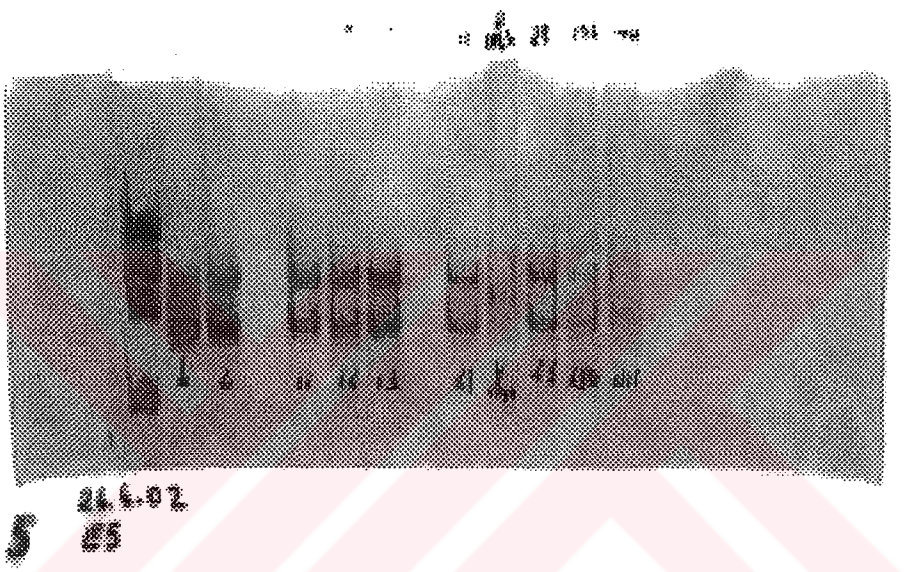


Şekil 8. Ekzon 3 PCR ürünlerinin SSCP gel görüntüsü örneği



Şekil 9. Ekzon 4 PCR ürünlerinin SSCP gel görüntüsü örneği

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU



Şekil 10. Ekzon 5 PCR ürünlerinin SSCP gel görüntüsü örneği

TARTIŞMA

ALS ciddi klinik sonuçlara yol açan ve nedeni henüz yeterince açıklanamamış bir motor nöron hastalığıdır. Çeşitli hipotezler ileri sürülmekle birlikte SOD1 mutasyonları hastalığın patojenezinde önemli bir etken olarak gözükmektedir (5, 107). SOD1 genindeki mutasyonların motor nöron hücre ölümüne hangi mekanizma ile neden olduğu bilinmemekle birlikte, mutant SOD1'in toksik fonksiyon kazanmasının hasar oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir (20, 36, 111). Bu hastalarda mutant SOD1'in farklı bir fonksiyon kazanarak, süperoksit radikalini yok etmek yerine üreten bir nitelik kazandığı ve ayrıca bir peroksidaz gibi davrandığı ileri sürülmektedir (8, 55, 59, 94, 97, 109, 112).

FALS'li hastalarla SALS'li hastaların klinik belirtiler yönünden birbirinden ayırt edilemediği (14, 59, 73, 79, 103), ancak her iki formun da aynı biyokimyasal mekanizmaları paylaştığı düşünülmektedir. Normal (Wild-type) SOD1'in yarı ömrü 30 saattir. Bu süre I113T mutantı için 20, G93C için 16, G37D için 13, G417D için 10, G85R ve A4V için 7,5 saattir. ALS hastalarının çoğunluğunda mutasyonlar heterozigot olduğundan SOD1 enziminin beklenen aktivitesi normalden %20-50 oranında az olmalıdır. Bu durum katalitik aktivitenin azalması veya azalmış SOD1 yarı ömrü ile kendini gösterir (31). Gerçekten farklı SOD1 mutasyonu taşıyan ALS'lı hastalarda farklı klinik sonuçlar gözlenmiştir. Örneğin G37R, ve L38V mutasyonunun bulunduğu hastalarda hastalığın daha erken yaşta başladığı, G37R, G41D, H46R ve G93C mutasyonu taşıyanlarda uzun yaşam süresi gözlendiği, A4Vve Ile113Thr mutasyonu taşıyanlarda ise yaşam süresinin kısaldığı ve hastalığın hızla ilerlediği gözlenmiştir (7, 14, 30, 31, 63, 81).

SOD1 mutasyonları arasında en çok araştırılan D90A mutasyonudur. D90A mutasyonu ilk olarak FALS'li hastalarda 1995 yılında tesbit edilmiştir (5). D90A SOD1 mutasyonu enzimin katalitik bölgesinde olmayıp dimer etkileşimini de etkilememektedir. Bu nedenle, bu mutasyon enzim aktivitesini ve stabilitesini etkilememektedir (36, 45, 82, 98). Daha önce tanımlanmış bütün SOD1 mutasyonları dominant geçişli olduğu halde, D90A mutasyonu ilk kez resesif geçişli olarak tesbit edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda farklı toplumlarda dominant geçişli D90A mutasyonu da tesbit edilmiştir. D90A mutasyonu hem dominant hem resesif geçiş gösteren bugüne kadar tesbit edilmiş tek mutasyondur

(76). D90A mutasyonu da normalde diğer SOD1 mutasyonları gibi dominant geçişlidir. Oysa resesif geçişli ailelerde tek bir ata söz konusudur (35). Resesif aileler İsveç, Finlandiya, Fransa, Amerika, Almanya ve Avusturalya'da tesbit edilmiştir (4, 6, 11, 51, 98, 103, 107, 110). Dominant aileler ve D90A mutasyonuna sahip sporadik hastalar Finlandiya, Fransa, Belçika ve İngilterede'de tesbit edilmiştir (2, 6, 43, 51, 82, 98).

Talasemi ve α1-antitripsin eksikliği gibi bazı hastalıklarda heterozigotluk ılımlı bir hastalık sergilenmesine neden olurken, klasik hastalık homozigot durumda ortaya çıkmaktadır. SOD1 mutasyonu taşıyan heterozigot hastalar teorik olarak mutant homodimer, mutant ve wild-type heterodimer ve wild-type homodimere sahiptir. Mutant alt üniteler wild-type alt ünitelere zarar vermez. Ancak heterozigot bir bireyde wild-type homodimer miktarı daha azdır, çünkü mutant alt üniteler normal enzim yapısının oluşmasına engel olur (31, 90).

Normalde de dominant geçişli bir mutasyonda her iki allel mutant ise hastalığın daha şiddetli geçmesi beklenir. Gerçekten SOD1 mutasyonlarından N86S mutasyonu dominant geçişli bir mutasyondur ve heterozigot durumda orta yaşta tipik ALS görülmesine neden olur. Tıpkı D90A gibi N86S'de ekzon 4 de ve periferdedir. Fakat kişi N86S mutasyonu için homozigot olduğunda hastalık beklenmedik bir şekilde erken yaşta başlamış, çok hızlı ilerlemiş ve çok kısa sürede ölümle sonuçlanmıştır (2). Buna zıt olarak homozigot resesif geçişli D90A mutasyonu görülen ailelerde hastalık yavaş ilerler ve hastalar genellikle 10 yıldan uzun süre yaşarlar (4, 65, 94, 107, 110). Heterozigot bireyler ise heterojen bir grup oluştururlar ve SOD1 mutasyonu taşımayanlardan ve sporadiklerden ayırt edilemezler (107, 108).

SOD1 mutasyonuna sahip FALS ve SALS hastalarının eritrositlerinde mutasyonların çoğu SOD1 enzim aktivitesinin %30-60 oranında azalmasına neden olur (13, 26, 46, 78, 90). Mutant SOD1'e sahip hastalarda azalmış SOD aktivitesi azalmış SOD1 konsantrasyonu ve azalmış SOD1 yarı ömrü ile açıklanabilir. Çünkü mutasyonlar SOD1 molekülünü stabil olmayan hale getirir. SALS hastalarının motor korteksinde SOD1 enzim aktivitesi normalken, mutant SOD1'e sahip FALS hastalarında düşüktür. SOD1 immureaktivitesi SALS'li hastalarda spinal motor nöronlarda daha yoğunken SOD1 mutasyonuna sahip FALS'li hastalarda düşüktür (67, 90). Bütün bu bulgular ALS'li hastalarda SOD1

mutasyonlarının saptanmasının hastalığın klinik seyrini göstermede yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Çeşitli ülkelerde ALS hastalığı ile SOD1 mutasyonu ilişkisi gerek ailesel gerekse sporadik vakalarda değişik araştırma gruplarınca incelenmiştir. İtalya'da Gellera ve ark. (27, 28) 84 FALS ve SALS hastasını incelemiş, FALS hastalarında hastalığın oldukça hızlı ilerlemesine neden olan A4V mutasyonunu tesbit etmişlerdir. Ayrıca Avrupa populasyonunda nadir görülen ve İngiltere'de sadece bir ailede tesbit edilmiş olan L84F mutasyonu ile birlikte G93D ve F45C mutasyonunu da İtalyan hastalarda bulmuşlardır. SALS'li bir hastada ise homozigot D90A mutasyonunu saptamışlardır.. Bu hastada D90A mutasyonuna özgü olarak hastalığın tipik olarak yavaş ilerlediği görülmüştür. Ayrıca SALS'li hastalarda I113T, A95T ve G12R mutasyonlarını da tesbit etmişlerdir. Aguirre ve ark.'larının (1) yaptığı çalışmada SALS ve FALS'li hastalarda heterozigot D90A mutasyonu bulunmuştur. Shaw ve ark.'ları (88) ise İngiltere'de FALS'li SALS'li hastalarda sırasıyla L84F ve G72S mutasyonlarını tesbit etmişlerdir. Geç başlangıçlı Ala140Gly mutasyonu Naini ve ark (70) tarafından FALS'li hastada tesbit edilmiştir. İspanya'da SALS'li bir hastada N65S mutasyonunun yanı sıra FALS hastalarında I112M mutasyonu saptanmıştır (25). Japonya'da FALS hastalarında I126S mutasyonu saptanmıştır. Bu ailede hastalık orta şiddette seyretmiştir. Hastalık sadece erkeklerde görülmüş, aileden 80 yaşındaki bir kadın mutasyonu taşıdığı halde hastalık gözlenmemiştir (atipik). Yine Japonya'da Cys6Gly mutasyonu saptanmıştır, bu mutasyonda hastalık oldukça hızlı ilerleme göstermiştir (52, 68, 71).

Görüldüğü gibi, SOD1 mutasyonları değişik toplumlarda gerek ailesel, gerekse sporadik ALS vakalarında saptanmıştır. Ülkemizde ALS hastaları üzerinde böyle bir çalışma yapılmamıştır. Başlangıçta SOD1 mutasyonlarını, özellikle D90A mutasyonunu hem ailesel hem de sporadik vakalarda incelemeyi planladık. Ancak ailesel ALS vakası temin etmedeki güçlükler nedeni ile çalışmamız sporadik vakalarda yapılabildi. Bulgularımıza göre El Escorial kriterlerine göre sporadik olduğu belirlenen 30 ALS hastasında D90A SOD1 mutasyonu bulamadık. Bunun üzerine çalışmamızı genişleterek hastalarda herhangi başka SOD1 mutasyonu olup olmadığını araştırmak istedik. Bu amaçla PCR temeline dayalı ön tarama yöntemlerinden biri olan SSCP'yi kullandık. SSCP amplifiye olmuş DNA'da dizi değişikliğini belirlemek için kullanılan basit, güvenilir

ve güçlü bir tekniktir (1, 89). Bu teknik tek zincir DNA'nın molekül içi etkileşim sonucu her zincirin farklı formda katlanıp kıvrılması ile değişik konformasyonların (ikincil yapı) oluşmasına ve böylece poliakrilamit jel elektroforezinde farklı hızda hareket etmesine dayanmaktadır. Mutasyon içeren DNA molekülü tek bir baz bile farklı olsa normal diziden farklı bir yapı oluşturacağından 'nondenatüre' jel elektroforezinde normalden farklı yerlerde bantlar gözlenmektedir. SSCP'de 200 bç'lik PCR ürünleri kullanıldığında, bu yöntem tek baz değişimi için hassas bir yöntem olarak bilinmektedir. Ancak ülkemizde bu yönde bir çalışmanın yapılmamış olması nedeni ile, bu güne kadar SOD1 geni için tesbit edilmiş veya edilmemiş başka mutasyonların bu hastalarda bulunabileceğini göz önüne alarak bütün SOD1 geninde mutasyon taraması yaptık. Bu amaçla bütün SOD1 geninin ekzonlarını (ekzon 1, 2, 3, 4 ve 5) ayrı ayrı PCR ile çoğaltıp SSCP yöntemi ile mutasyon olup olmadığını araştırdık. Bu test sonuçlarına göre de bu hastalarda SOD1'e ait hiçbir mutasyon saptamadık.

Sonuç olarak, ülkemizde ilk kez yapılan bu çalışma ile 30 sporadik ALS vakasında SOD1 geninde bir mutasyon bulunmamıştır.

ÖZET

Amyotrofik lateral skleroz (ALS) beyin sapında, kranial sinir çekirdeklerinde, omurilikte ön boynuz hücrelerinin tutulmasıyla giden, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Vakaların % 90'nı sporadik, % 10 'nu ise aileseldir. Hastalığın etyopatojenezi bilinmemektedir. Ancak ALS patojenezinde Cu-Zn-SOD (SOD1) geni mutasyonları, glutamat toksisitesi ve apoptoz gibi bazı faktörler sorumlu tutulmaktadır. Bunlar içersinde üzerinde en çok durulan SOD1 geni mutasyonlarıdır.

SOD1 proteinini kodlayan gen 21. kromozomda bulunur, 5 ekzon ve 153 kodondan ibarettir. Patolojik mutasyonlar bütün ekzonlarda gösterilmiştir ve günümüzde tanımlanmış 100'den fazla SOD1 mutasyonu vardır. Ailesel vakaların %20'sinde SOD1 geninde mutasyon olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, sporadik hastalarda da SOD1 geni mutasyonları saptanmıştır. D90A mutasyonu ise ALS vakalarında SOD1 mutasyonları içinde en çok araştırılan mutasyondur.

Ülkemizde ALS hastalarında SOD1 mutasyonları araştırılmamıştır. Bu nedenle, çalışmamızda El Escorial kriterlerine göre sporadik olduğu belirlenen 30 ALS hastasında D90A SOD1 mutasyonunu inceledik ve bu hastalarda D90A mutasyonu saptamadık. Bunun üzerine çalışmamızı genişleterek hastalarda başka SOD1 mutasyonu olup olmadığını tek iplikli yapısal çok şekillilik " single strand conformational polimorphism" (SSCP) tekniğini kullanarak inceledik. SOD1 genindeki tüm ekzonları tarayarak gerçekleştirdiğimiz bu testle sporadik ALS'li hastalarda SOD1'e ait hiçbir mutasyon bulmadık.

Sonuç olarak, ülkemizde ilk kez yapılan bu çalışma ile 30 sporadik ALS vakasında SOD1 geninde bir mutasyon bulunmamıştır.

SUMMARY

Title: The Screning of SOD1 Gene Mutations in Patients with Sporadic Amyotrpohic Lateral Sclerosis.

Amyotrophic lateral sclerosis is a progressive paralytic fatal disorder, which results from the degeneration of motor neurons in the motor cortex, brainstem and spinal cord. ALS is subclassified into sporadic (%90) and familial (%10). The ethiopathogenesis of ALS is unknown, but several factors such as the gene mutations for superoxide dismutase-1 (SOD1, CuZn-SOD), glutamate excitotoxicity and apoptosis may play a role in the pathogenesis of ALS. Among these, SOD1 gene mutations have been investigated intensively.

The gene encoding the SOD1 is present on chromosome 21 and consists of 5 exons and 153 codons. Pathological mutations related to SOD1 have been demonstrated in all five exons. At present more than 100 mutations have been reported . 20 % of FALS cases and a small percentage of sporadic ALS have been found to have SOD1 mutations in most populations. The D90A mutation is the most investigating mutation among the SOD1 mutations.

There is no epidemiological study about SOD1 gene mutations in ALS patients in Turkey. In this study, D90A mutation was studied in 30 sporadic ALS patients defined according to El Escorial criteria and D90A mutation was not detected in these cases. In addition, to investigate whether sporadic cases have another mutations in the SOD1 gene, single-stranded conformational polymorphism (SSCP) technique was used and any mutations in SOD1 gene of sporadic cases was not found.

In conclusion , in this study which is done for the first time in Turkey, SOD1 gene mutations were not detected in 30 sporadic ALS cases .

KAYNAKLAR

1. Aguirre T, Matthijs G, Robberecht W, Tilkin P, Cassiman JJ. Mutational analysis of the Cu/zn superoxide dismutase gene in 23 familial and 69 sporadic cases of amyotrophic lateral sclerosis in Belgium. Eur J Hum Genet 1999;7:599-602.
2. Al-Chalabi A, andersen PM, Chioza B, Shaw C, Sham PC, Robberecht W, Matthijs G, Camu W, Marklund SL, Forsgren L, Rouleau G, Laing NG, Hurse PV, Siddique T, Leigh PN, Powell JF. Recessive amyotrophic lateral sclerosis families with the D90A SOD1 mutation share a common founder:evidence for a linked protective factor. Hum Mol Genet 1998;7:2045-2050.
3. Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P, Chioza B, Andersson JL, Russ C, Shaw CE, Powell JF, Leigh PN. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet 1998;8:157-164.
4. Andersen PM, Forsgen L, Binzer M, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keranen ML, Bergmark L, Saarinen A, Haltia T, Tarvainen I, Kinnunen E, Udd B Marklund SL. Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation A clinical and genealogical study of 36 patients. Brain 1996;119:1153-1172.
5. Andersen PM, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keranen ML, Tarvainen I, Haltia T, Nilsson L, Binzer M, Forsgren L, Marklund SL. Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase.Nat Genet. 1995 May;10(1):61-6.
6. Andersen PM, Nilsson P, keranen ML, Forsgren L, Hagglund J, Karlsborg M, Ronnevi LO, Gredal O, Marklund SL. Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinava. Brain 1997;120:1723-1737.
7. Batchelor JR. "Sporadic" motoneuron disease due tofamilial SOD1 mutation with low penetrance. Lancet 1994;344:1773-1774.

8. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol 1996; 271:C1424-1437.
9. Beckman JS. Protein tyrosine nitration and peroxynitrite. FASEB J 2002;16:1144.
10. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 1990 ;28:495-503.
11. Boukaftane Y, Khoris J, Moulard B, Salachas F, Meininger V, Malafosse A, Camu W, Rouleau GA. Identification of six novel gene mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. Can J Neurol Sci 1998;25:192-196.
12. Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology. Criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci 1994;124 (suppl):96-107.
13. Camu W, Khoris j, Moulard B, Salachas F, Briolotti V, Rouleau GA, Meininger V. Genetics of familial ALS and consequences for diagnosis. J Neurol Sci1999;165:S21-S26.
14. Ceroni M, Malaspina A, Poloni TE, Alimonti D, Rognoni F, Habgood J, Imbesi F, Antonelli P, Alfonsi E, Curti D, De Belleroche J. Clustering of ALS patients in central Italy due to the occurrence of the L84F SOD1 gene mutation. Neurology 1999;53:1064-1071.
15. Cluskey S, Ramsden DB. Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. J Clin Pathol: Mol Pathol 2001;54:386-392.
16. Cwik V. What is amyotrophic lateral sclerosis. In : Mitsumoto H, Munsat TL (eds). Amyotrophic Lateral Sclerosis. A Guide for Patients and Families. 2. ed. Demos Medical Publishing, New York, 2001; pp. 1-2.
17. Deitch JS, Alexander GM, Del Valle L, Heiman-Patterson TD. GLT-1 glutamate transporter levels are unchanged in mice expressing G93A human mutant SOD1. J Neurol Sci 2002 ;193:117-126.
18. Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab a, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP, Warner C, Deng G, Soriano E, Smyth C, Parge HE, Ahmed A, Roses AD, Hallewll RA, Pericak-Vance MA, Siddique T. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. Science 1993;261:1047-1051.
19. Dib M. Amyotrophic Lateral Sclerosis. Drugs 2003;63:289-310.

20. Eisen A, Krieger C. Amyotrophic Lateral Sclerosis. A Synthesis of Research and Clinical Practise. Cambridge University Press, Cambridge, 1998, pp.107-132.
21. Elliott JL. Zinc and copper in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. Prog Neuro-Phychopharmacol Biol Psychiat 2001;25:1169-1185.
22. Eneyat ZE, Orrell RW, Claus A, Ludolph A, Bachus R, Brockmüller J, Ray-Chaudhuri K, Radunovic A, shaw C, wilkinson J, King A, Swash M, Leigh PN, De Belleroche J, Powell J. Two nowel mutations in the gene for copper zinc superoxide dismutase in UK families with amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet 1995;4:1239-1240.
23. Figlewicz DA, McInnis MG, Goto J, Haines JL, Warren AC, Krizus A, Khodr N, Brown JRr RH, Mckenna-Yasek D, Antonarakis SE, Rouleau GA. Identification of flanking markers for the familial amyotrophic lateral sclerosis gene ALS1 on chromosome 21. J Neurol Sci 1994;14(Suppl):90-95.
24. Fiszman ML, Borodinsky LN, Ricart KC, Sanz OP, Sica REP. Cu/Zn superoxide dismutase activity at different ages in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci. 1999 ;162:34-37.
25. Garcia-Redondo A, Bustos F, Juan Y Seva B, Del Hoyo P, Jimenez S, Campos Y, Martin MA, Rubio JC, Canadillas F, Arenas J, Esteban J. Molecular analysis of the superoxide dismutase 1 gene in spanish patients with sporadic or familial amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve 2002;26:274-278.
26. Garofalo O, Figlewicz DA, Thomas SM, Butler R, Lebuis L, Rouleau G, Meininger V, Leigh PN. Superoxide dismutase activity in lymphoblastoid cells from motor neurone disease / amyotrophic lateral sclerosis (MND / ALS) patients. J Neurol Sci 1995;129(suppl):90-92.
27. Gellera C, Castellotti B, Riggio MC, Silani V, Morandi L, Testa D, Casali C, Taroni F, Di Donato S, Zeviani M, Mariotti C. Superoxide dismutase gene mutations in Italian patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis: identification of three novel missense mutations. Neuromuscul Disord 2001;11:404-410.
28. Gellera C. Genetics of ALS in Italian families. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2001;2(suppl 1):S43-S46.

29. Gestri D, Cecchi C, Tedde A, Latorraca S, Orlacchio A, Grassi E, Massaro AM, Gianfranco L, St George-Hysloop PH, Sorbi S. Lack of SOD1 gene mutations and activity alterations in two Italian families with amyotrophic lateral sclerosis. Neurosci Lett 2000;289:157-160.

30. Grohme K, Maravic MV, Gasser T, Borasio GD. A case of amyotrophic lateral sclerosis with a very slow progression over 44 years. Neuromuscul Disord 2001;11:414-416.

31. Hall JR, Strathdee CA. Disease-Associated mutations in SOD1 are impervious to dominant positive or negative effects. Biochem Biophys Res Commun 2000;276:1056-1061.

32. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Sci Publ, Oxford, 1999.

33. Hand CH, Rouleau GA. Familial amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve 2002;25:135-159.

34. Hand CK, Khoris J, Salachas F, Gros-Louis F, Lopes AAS, Mayeux-Portas V, Brown RH, Meininger V, Camu W, Rouleau GA. A novel locus for familial amyotrophic lateral sclerosis on chromosome 18q. Am J Hum Genet 2002;70:251-256.

35. Hand CK, Mayeux-Portas V, Khoris J, Briolotti V, Clavelou P, Camu W, Rouleau GA. Compound heterozygous D90A and D96N SOD1 mutations in recessive amyotrophic lateral sclerosis family. Ann Neurol 2001;49:267-271.

36. Hayward JL, Rodriguez JA, Kim JW, Tiwari A, Goto JJ, Cabelli DE, Valentine JS, Brown RH, Jr. Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. J Biol Chem 2002;277:15923-15931.

37. Higgins CMJ, Jung C, Ding H, Xu Z. Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. J Neurosci 2002;22:1-6.

38. Hirano M, Hung WY, Cole N, Azim AC, Deng HX, Siddique T. Multiple Transcripts of the human Cu,Zn superoxide dismutase gene. Biochem Biophys Res Commun 2000;276:52-56.

39. Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. Am J Med 2000;108:317-330.

40. Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, De Vito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Proc Nat Acad Sci USA. 2002;99:1604-1609.

41. Ince PG, Tomkins J, Slade JY, Thatcher NM, Shaw PJ. Amyotrophic lateral sclerosis associated with genetic abnormalities in gene encoding Cu/Zn superoxide dismutase: molecular pathology of five new cases, and comparison with previous reports and 73 sporadic cases of ALS. J Neuropathol Exp Neurol 1998;57:895-904.

42. Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JAC, Hawkins R, van Dujin W, Verspaget HW, London J, Holstege JC. Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. Neurobiol Dis 2000;7:623-643.

43. Jackson M, Al-Chalabi A, Eneyat ZE, Chioza B, Leigh PN, Morrison KE. Copper/zinc superoxide dismutase 1 and sporadic amyotrophic lateral sclerosis:Analysis of 155 cases and identification of a novel insertion mutation.Annals of Neurology 1997;42:803-807.

44. Jackson M, Rothstein JD.Excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. In : Brown RH Jr, Meininger V, Swash M (eds). Amyotrophic Lateral Sclerosis. Martin Dunitz, London, 2000, pp.263-276.

45. Jacobsson J, Jonsson PA, Andersen PM, Forsgren L, Marklund SL. Superoxide dismutase in CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients with and withut CuZn-superoxide dismutase mutations. Brain 2001;124:1461-1466.

46. Jones CT, Brock DJH, Chancellor AM, Warlow CP, Swingler RJ. Cu/Zn superoxide dismutase free radicals and motoneuron disease. Lancet 1993;342:1051-1052.

47. Jourd'heuil D, Mills L, Miles AM, Grisham MB. Effect of nitric oxide on hemoprotein-catalyzed oxidative reactions. Nitric Oxide. 1998;2:37-44.

48. Kadekawa J, Fujimura H, Yanagihara T, Sakoda S. A clinicopathological study of patient with familial amyotrophic lateral sclerosis associated with a

two-base pair deletion in the copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) gene. Acta Neuropathol 2001;101:415.

49. Kato S, Sumi-Akamaru H, Fujimura H, Sakoda S, Kato M, Hirano A, Takikawa M, Ohama E. Copper chaperone for superoxide dismutase co-aggregates with superoxide dismutase 1 (SOD1) in neuronal Lewy body-like hyaline inclusions: an immunohistochemical study on familial amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 gene mutation. Acta Neuropathol 2001;102:233-238.

50. Kehrer JP, Smith CV. Free radicals in biology: Sources, reactivities and roles in the etiology of human diseases. In: Frei B (ed). Natural Antioxidants in Human Health and disease. Academic Press, San Diego, 1994, pp. 25-62.

51. Khoris J, Moulard B, Briolotti V, Hayer M, Duriex A, Clavelou P, Malafosse A, Rouleau GA, Camu W. Coexistence of dominant and recessive familial amyotrophic lateral sclerosis with the D90A Cu,Zn superoxide dismutase mutation within the same country. Eur J Neurol 2000;7:207-211.

52. Kohno S, Takahashi Y, Miyajima H, Serizawa M, Mizoguchi K. A novel mutation(Cys6Gly) in the Cu/Zn superoxide dismutase gene associated with rapidly progressive familial amyotrophic lateral sclerosis. Neuroscience Letters 1999;276:135-137.

53. Lee M, Hyun DH, Halliwell B, Jenner P. Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative stress and cell death induced by hydrogen peroxide, 4-hydroxynonenal or serum deprivation: potentiation of injury by ALS-telated mutant superoxide dismutases and protection by Bcl-2. J Neurochem 2001;78:209-220.

54. Lima AF, Evangelista T, de Carvalho M. Increased creatine kinase and spontaneous activity on electromyography, in amyotrophic lateral sclerosis. Electromyogr Clin Neurophysiol. 2003 ;43:189-192.

55. Liochew SI, Fridovich I. Mutant Cu,Zn superoxide dismutases and familial amyotrophic lateral sclerosis: Evaluation of oxidative hypotheses. Free Radic Biol Med 2003;34:1383-1389.

56. Liu D, Wen J, Liu J, Li L. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phorpholipids. FASEB J 1999;13:2318-2328.

57. Liu D. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis. J Mol Neurosci 1996;7:159-167.

58. Liu H, Zhu H, Eggers DK, Nersissian AM, Faull KF, Goto JJ, Ai J, Sanders-Loehr J, Gralla EB, Valentine JS. Copper (2+) binding to the surface residue cysteine 111 of His46Arg human copper-zinc superoxide dismutase, a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant. Biochemistry 2000;39:8125-8132.

59. Majoor-Krakauer D, Willems PJ, Hofman A. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. Clin Genet 2003;63:83-101.

60. Malaspina A, Zaman R, Mazzini L, Camana C, Poloni E, Curti D, Ceroni M. Heterogeneous distribution of amyotrophic lateral sclerosis patients with SOD-1 gene mutations: preliminary data on an Italian survey. J Neurol Sci 1999;162:201-204.

61. Mancuso M, Filosto M, Naini A, Rocchi A, Del Corona A, Sartucci F, Siciliano G, Murri L. A screening for superoxide dismutase-1 D90A mutation in Italian patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 2002;3:215-218.

62. Martin LJ. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis:possible contribution of a programmed cell death mechanism. J Neuropathol Exp Neurol 1999;58:459-471.

63. Mase G, Ros S, Gemma A, Bonfigli L, Carraro N, Cazzato G, Rolfo M, Zanconati F, Sepcic J, Jurjevic A, Pirulli D, Boniotto M, Zezlina S, Crovella S, Amoroso A. ALS with variable phenotypes in a six-generation family caused by leu 144phe mutation in the SOD1 gene. J Neurol Sci 2001;191:11-18.

64. McEachern G, Kassovska-Bratinova S, Raha S, Tarnopolsky MA, Turnbull J, Bourgeois J, Robinson B. Manganese superoxide dismutase levels are elevated in a proportion of amyotrophic lateral sclerosis patient cell lines. Biochem Biophys Res Commun 2000;273:359-363.

65. Mezei M, Andersen PM, Stewart H, Weber M, Eisen A. Motor system abnormalities in heterozygous relatives of a D90A homozygous CuZn-SOD ALS patient of Finnish extraction J Neurol Sci 1999;169:49-55.

66. Mitsumoto H. The Clinical features and prognosis of ALS. In : Mitsumoto H, Munsat TL (eds). Amyotrophic Lateral Sclerosis. A Guide for Patients and Families. 2. ed. Demos Medical Publishing, New York, 2001, pp.1-2.

67. Moumen R, Nouvelot A, Duval D, Lechevalier B, Viader F. Plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J Neuro Sci 1997;151:35-39.

68. Murakami T, Warita H, Hayashi T, Sato K Manabe Y, Mizuna S. Yamane K, Abe K. A novel SOD1 gene mutation in familial ALS with low penetrance in females. J Neurol Sci.2001;189:45-47.

69. Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH Jr, Itoyama Y. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. J Neurosci 2001;21:9246-9254.

70. Naini A, Musumeci O, Hayes L, Pallotti F, Del Bene M, Mitsumoto H. Identification of a novel mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci 2002;198:17-19.

71. Nakano R, Sato S, Inuzuka T, Sakimura K, Mishina M, Takahashi H, Ikuta F, Honma Y, Fujii J, Taniguchi N, Tsuji S. A novel mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene in japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. Biochem Biophys Res Commun 1994;200:695-703.

72. Nishiyama K, Murayama S, Kwak S, kanazawa I. Expression of the copper-zinc superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 1997;41:551-556.

73. Orrell RW, Habgood JJ, Gardiner I, King AW, Bowe FA, Hallewell RA, Marklund SL, Greenwood J, Lane RJM, deBelleroche J. Clinical and functional investigation of 10 missense mutations and a novel frameshift insertion mutation of the gene for copper-zinc superoxide dismutase in UK families with amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 1997;48:746-751.

74. Orrell RW, Marklund SL, debelleroche JS. Familial ALS is associated with mutations in all exons of SOD1: a novel mutation in exon 3 (Gly72Ser). J Neurol Sci 1997;153:46-49.

75. Orrell RW. Amyotrophic lateral sclerosis: copper /zinc superoxide dismutase (SOD1) gene mutations. Neuromuscul Disord 2000;10:63-68.

76. Parton MJ, Broom W, Andersen PM, Al-Chalabi A, Leigh PN, Powell JF, Shaw CE. D90A-SOD1 mediated amyotrophic lateral sclerosis: a single founder for all cases with evidence for a Cis-acting disease modifier in the recessive haplotype. Hum Mutat. 2002 ;20: 473.

77. Pasinelli P, Brown RH Jr. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review. In : Brown RH Jr, Meininger V, Swash M (eds). Amyotrophic Lateral Sclerosis. Martin Dunitz, London, 2000, pp.263-276.

78. Puyrimat J, Cossette L, Gosselin F, Bouchard JP. Red blood cell Cu/Zn superoxide dismutase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci 1994;127:121-123.

79. Radunovic A, Delves HT, Robberecht W, Tilkin P, Enayat ZE, Shaw CE, Stevic Z, Apostolski S, Powell JF, Leigh PN. Copper and zinc levels in familial amyotrophic lateral sclerosis patients with CuZnSOD gene mutations. Ann Neurol 1997;42:130-131.

80. Radunovic A, Porto WG, Zeman S, Leigh PN. Increased mitochondrial superoxide dismutase activity in Parkinson's disease but not amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. Neurosci Lett 1997;239:105-108.

81. Radunovic A, Shaw CE, Akman-Demir G, İdrisoğlu H, Leigh PN. CuZnSOD-associated amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 1997;42:273-274.

82. Robberecht W, Aguirre T, Van Den Bosch L, Tilkin P, Cassiman JJ, Matthijs G. D90A heterozygosity in the SOD1 gene is associated with familial and apparently sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 1996;47:1336-1339.

83. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung WY, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown Jr RH. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 1993;362:59-62.

84. Rowland LP. Six important themes in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) research, J Neurol Sci 2000;180:2-6.

85. Said Ahmed M, Hung WY, Zu JS, Hockberger P, Siddique T. Increased reactive oxygen species in familial amyotrophic lateral sclerosis with mutations in SOD1. J Neurol Sci 2000;176:88-94.

86. Sathasivam S, Ince PG, Shaw PJ. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. Neuropathol App Neurobiol 2001;27:257-274.

87. Shaw CE, Enayat ZE, Powell JF, Anderson VER, Radunovic A, Al-Sarraj S, Leigh PN. Familial amyotrophic lateral sclerosis . Molecular pathalogy of a patient with a SOD1 mutation. Neurology 1997;49:1612-1616.

88. Shaw CE, Eneyat ZE, Chioza BA, Al-Chalabi A, Radunovic A, Powell JF, Leigh PN. Mutations in all five exons of SOD-1 may cause ALS. Annals of Neurology 1998;43:390-394.

89. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. Genomics 1993;16:325-332.

90. Shibata N, Hirano A, Yamamoto T, Kato Y, Kobayashi M. Superoxide dismutae-1 mutation-related neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2000;1.143-161.

91. Shibata N, Nagai R, Miyata S, Jono T, Horiuchi S, Hirano A, Kato S, Sasaki S, Asayama K, Kobayashi M. Nonoxidative protein glycation is implicated in familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. Acta Neuropathol 2000;100:275-284.

92. Shibata N. Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. Neuropatholgy 2001;21:82-92.

93. Siddique T, Deng HX. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet 1996;5:1465-1470.

94. Siddique T, Nijhawan D, Hentati A. Molecular genetic basis of familial ALS. Neurology 1996;47(Suppl 2):S27-S35.

95. Siddique T, Pericak-Vance MA, Brooks BR, Roos RP, Hung WY, Antel JP, Munsat TL, Philips K, Warner K, Speer M, Bias WB, Siddique NA, Roses AD. Linkage analysis in familial amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 1989;39:919-925.

96. Silahtaroğlu AN, Brondum-Nielsen K, Gredal Ole, Werdelin L, Panas M, Petersen MB, Niels Tommerup Tümer Z. Human CCS gene:genomic organization and exclusion as a candidate for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). BMC Genet 2002;3:5.

97. Singh RJ, Karoui H, Gunther MR, Beckman JS, Mason RP, Kalyanaraman B. Reexamination of the mechanism of hydroxyl radical adducts formed from the reaction between familial amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn superoxide dismutase mutants and H_2O_2. Proc Natl Acad Sci 1998;95:6675-6680.

98. Sjalander A, Beckman G, Deng HX, Iqbal Z, Tainer JA, Siddique T. The D90A mutation results in a polymorphism of Cu,Zn superoxide dismutase that is prevent in northern Sweden and Finland. Hum Mol Genet 1995;4:1105-1108.

99. Skvortsova VI, Limborska SA, Slominsky PA, Levitskaya NI, Levitsky GN, Shadrina MI, Kondratyeva EA. Sporadic ALS associated with the D90A Cu,Zn superoxide dismutase mutation in Russia. Eur J Neurol 2001;8:167-172.

100. Southorn PA. Free radicals in medicine. Chemical nature and biological reactions. Mayo Clin Proc 1998; 63:390-408.

101. Swash M. Clinical features and diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. In : Brown RH Jr, Meininger V, Swash M (eds). Amyotrophic Lateral Sclerosis. Martin Dunitz, London, 2000, 263-276.

102. Temizkan G. II. Moleküler Genetik. İstanbul Üniversitesi Yayınlarından. İstanbul 1999, pp. 359-361.

103. Tomkins J, Banner SJ, Mcdermott CJ, Shaw PJ. Mutation screening of manganese superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. Neurochemistry 2001;12:2319-2322.

104. Tsuchiya K, Shintani S, Nakabayashi H, Kikugawa K, Nakano R, Haga C, Nakano I, Ikeda K, Tsuji S. Familial amyotrophic lateral sclerosis with onset in bulbar sign, benign clinical course, and Bunina bodies: a clinical, genetic, and pathological study of a Japanese family Acta Neuropathol 2000;100:603-607.

105. Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, Wiedemann FR, Kirches E, Feistner H, Heinze HJ, Elger CE, Schubert W, Kunz WS. Mitochondrial DNA

abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Brain 2000;123:1339-1348.

106. Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. Neurobiol Dis 2001;8:933-941.

107. Weber M, Eisen A, Stewart HG Andersen PM. Preserved slow conducting corticomotoneuronal projections in amyotrophic lateral sclerosis with autosomal recessive D90A CuZn-superoxide dismutase mutation. Brain 2000;123:1505-1515.

108. Weber M, Eisen A, Stewart HG, Andersen PM, Hirota N. The physiological basis of conduction slowing in ALS patients homozygous for the D90A CuZn-SOD mutation. Muscle Nerve 2001;24:89-97.

109. Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S, Gralla EB, Roe JA, Lee MK, Valentine Js, Bredesen DE. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic laeral sclerosis. Science 1996;271:515-518.

110. Winter SM, Claus A, Oberwittler C, Völkel H, Wenzler S, Ludolph AC. Recessively inherited amyotrophic lateral sclerosis: a German family with the D90A CuZn-SOD mutation. J Neurol 2000;247:783-786.

111. Xu Z. Mechanism and treatment of motoneuron degeneration in ALS: What have mutants told us? Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2000;1:225-234.

112. Zhang Hao, Joseph J, Gurney M, Becker D, Kalyanaraman B. Bicarbonate enhances peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase. J Biol Chem 2002;277:1013-1020.

ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı: Öznur Kanbağlı

Kısa Özgeçmişi:

Doğum Tarihi ve Yeri: 1971, Gaziantep

Bitirdiği Okullar: İ.Ü. Fen Fak. Biyoloji (1989-1993)

Yüksek Lisans : İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biokimya A.B. D. (1995-1997)

Doktora: İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biokimya A.B. D. (1998-)

Yurtdışı Bilimsel Yayınlar:

1) Mehmetçik G, Özdemirler G, Kanbağlı Ö, Toker G, Uysal M. Age related changes in plasma lipid peroxidation and antioxidant system in humans and rats. Arch Gerontol Geriatr 25:305-310, 1997.
2) Doğru-Abbasoğlu, Kanbağlı Ö, Bulur H, Babalık E, Öztürk S, Aykaç-Toker G, Uysal M. Lipid peroxides and antioxidant satus in serum of patients with angiographically defined coronary atherosclerosis. Clin Biochem 32: 671-672,1999.
3) Kanbağlı Ö, Özdemirler G, Bulut T, Yamaner S, Aykaç-Toker G, Uysal M. Mitochondrial lipid peroxides and antioxidant enzymes in colorectal adenocarcinamas tissues. Jpn J Cancer Res 91;1258-1263, 2000
4) Doğru-Abbasoğlu, Kanbağlı Ö, J Balkan, Çevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M. The protective effect of taurine against thioacetamide hepatotocicity of rats. Hum Exp Toxicol 20;23-27, 2001.
5) Balkan J, Doğru-Abbasoğlu, Kanbağlı Ö, Çevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M. Taurine has protective effect against thioacetamide-induced liver cirrhosis by decreasing oxidative stress. Human and Experimental Toxicology 2001;20:
6) Doğru-Abbasoğlu, J Balkan, Kanbağlı Ö,Çevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M. Aminoguanidine, an inducible nitric oxide synthase inhibitor, plus N-acetylcysteine treatment reduce the lipopolysaccharide-augmented hepatotoxicity in rats. Hum Exp Toxicol 2002;21:359-364.

7) Balkan J, Kanbağlı Ö, Mehmetçik G, Mutlu-Türkoğlu Ü, Aykaç-Toker G, Uysal M. Increased lipid peroxidation in serum and low-density lipoproteins associated with aging in humans. Int J Vitan Nutr Res 2002;72:315-320.

8) Balkan J, Kanbağlı Ö, Hatipoğlu U, Küçük M, Çevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M.Improving effect of dietary taurine supplementation on yhe oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. Biosci Biotechnol Biochem 2002;66:1755-1758

9) Balkan J, Kanbağlı Ö, Aykaç-Toker G, Uysal M. Taurine treatment reduces hepatic lipids and oxidative stress in chronically ethanol-treated rats. Biol Pharm Bull. 2000;25:1231-1233.

10) Kanbağlı Ö, Balkan J, Çevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M. Hepatic mitochondrial prooxidant and antioxidant status in ethanol-induced liver injury in rats. Biol Pharm Bull 2002;25:1482-1484.

Yurtiçi Bilimsel Yayınlar:

1) Kanbağlı Ö, Mutlu-Türkoğlu Ü, Öztezcan S, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M, Toker G. Galaktozamin ve endotoksin uygulanan sıçanların karaciğer ve plazmalarında lipit peroksidasyonunun ve antioksidan sistem enzimlerinin incelenmesi. Klinik Gelişim 11:441-443, 1998.

2) Uysal M, Kanbağlı Ö, Doğru-Abbasoğlu S, Mehmetçik G, Özdemirler G, Aykaç-Toker G, Aterosklerozla ilişkili hastalıklarda lipit peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine incelemeler. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 20:141-154, 1999.

3) Kanbağlı Ö, G, Özdemirler G, Bulut T, Yamaner T, Aykaç-Toker G, Uysal M, kolorektal kanserli hastaların barsak dokusunun mitokondri fraksiyonunda ve serumda prooksidan-antioksidan dengenin incelenmesi. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 20:197-209, 1999.

4) Kanbağlı Ö, Doğru-Abbasoğlu S, Özdemirler G, Toker G, Uysal M. Oksidatif stres göstergesi olarak serumda total sülfidril düzeyleri ve glutatyon peroksidaz aktivitesi. İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi 63(3) :264-267, 2000.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ