

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

METAKROMATİK LÖKODİSTROFİ HASTALIĞININ
ALT TİPLERİNİN TANIMLANMASI, PATOJENİK
MUTASYONLARIN BELİRLENMESİ, PATOGENEZDE
İNFLAMASYONUN İNCELENMESİ

Arş. Gör. Dr. Faruk PEKGÜL

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

ANKARA

2018

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

METAKROMATİK LÖKODİSTROFİ HASTALIĞININ
ALT TİPLERİNİN TANIMLANMASI, PATOJENİK
MUTASYONLARIN BELİRLENMESİ, PATOGENEZDE
İNFLAMASYONUN İNCELENMESİ

Arş. Gör. Dr. Faruk PEKGÜL

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. H. Asuman ÖZKARA

ANKARA

2018

TEŞEKKÜR

Uzun ve zorlu eğitim hayatımda, beni her konuda koşulsuz destekleyen aileme, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim süresince, mesaisinin önemli bir kısmını benim için harcayarak bilgi ve tecrübelerini aktaran tez danışmanım Prof. Dr. H. Asuman Özkara'ya, Anabilim Dalımızın tüm öğretim üyeleri ve asistanlarına, tez projesi ekibinde yer alan Prof. Dr. Ersin Tan, Prof. Dr. Meral Topçu, Prof. Dr. Banu Anlar, Prof. Dr. Nurten Akarsu, Prof. Dr. Sevim Erdem Özdamar, Prof. Dr. Ergun Karaağaoğlu, Doç. Dr. Can Ebru Bekircan-Kurt, Dr. Öğr. Üyesi Arda Çetinkaya, Dr. Öğr. Üyesi Bahadır Konuşkan ve Uzm. Dr. Nesibe G. Eroğlu Ertuğrul'a, bölümümüzde lizozomal enzim analizlerini gerçekleştiren Tek. Perihan Aksu ve Tek. Hacı Arınmış'a, Tıbbi Genetik Anabilim Dalında DNA dizi analizlerini gerçekleştiren Biy. Deniz Ceylan'a, anti-MOG analizini gerçekleştiren Gizem Türközü'ne ve anti-MOG analizini değerlendiren Ayten Öz'e, Western blot analizlerinde kullandığımız Arilsülfataz A ve Sapozin B antikorlarını sağlayan Bonn Üniversitesi'nden Prof. Dr. Konrad Sandhoff ve Prof. Dr. Volkmar Gieselmann'a ve Erişkin ve Çocuk Nöroloji bölümü hemşirelerine ve tez projemi destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Pekgöl, F., Metakromatik lökodistrofi hastalığının alt tiplerinin tanımlanması, patojenik mutasyonların belirlenmesi, patogeneizde inflamasyonun incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi, Ankara, 2018. Metakromatik lökodistrofi (MLD), çeşitli dokularda sülfatid birikimiyle karakterize bir lizozomal depo hastalığıdır. Otozomal resesif kalıttır. MLD hastalığı klinik başlangıç yaşına göre üç tipe ayrılır. Bunlar geç infantil, jüvenil ve erişkin tipleridir. Lizozomal bir enzim olan arilsülfataz A (ASA) veya bu enzimin aktivatör proteini olan sapozin B (Sap-B) proteininin eksikliğinde MLD meydana gelir. Sülfatidlerin parçalanmasında görevli olan ASA'nın fonksiyonunu yerine getirememesi sonucu yıkılamayan sülfatidler, pek çok dokuda ve özellikle de sinir sistemi hücrelerinde birikerek harabiyete yol açar. Laboratuvarlarda MLD tanısı, arilsülfataz A (ASA) enzim tayini yapılarak konulmaya çalışılmaktadır. Bu testin yapılması MLD tanısı için gerekli iken, kesin tanı konulabilmesi için tek başına yetersiz kalmaktadır. Bu çalışmada, ülkemizde MLD hastalığının tanısı için gerekli tüm analizleri kurmak ve hastalığın moleküler mekanizmasını ortaya çıkarmak için spektrofotometrik ve florometrik yöntemlerle lizozomal enzim taraması, Western blot ile enzim proteini ve aktivatör protein tayini, ince tabaka kromatografisi ile sülfatid analizi ve PCR-kesim enzimi analizi ile yalancı eksiklik mutasyonu tayini yapıldı. DNA dizi analizi ile ARSA geninde yalancı eksiklik mutasyonu, hastalığa neden olan mutasyonlar ve polimorfizmler belirlendi. Ayrıca MLD hastalığında fenotip farklılığında inflamasyonun rolünü incelemek amacıyla anti-sülfatid ile miyelin oligodendrosit glikoproteinine (MOG) karşı gelişen anti-MOG analizleri yapıldı. Sonuç olarak, bu çalışmada MLD düşünülen bireyler, MLD'nin tüm tiplerini tanımlamak için gerekli analizlerle değerlendirilmiş, hastalığa neden olan mutasyonlar ve mutasyonun protein üzerine etkisi saptanmış, antikor oluşumları üzerinden klinik şiddette inflamasyonun rolü değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Sülfatid, arilsülfataz A, sapozin B, anti-sülfatid, anti-MOG, DEAE-selüloz kromatografi, ince tabaka kromatografisi, mutasyon, lökodistrofi

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje no: TSA-2017-12891

ABSTRACT

Pekgul, F., Identification of subtypes of metachromatic leukodystrophy, determination of pathogenic mutations, investigation of inflammation in pathogenesis, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Medical Biochemistry, Ankara, 2018. Metachromatic leukodystrophy (MLD) is a lysosomal

storage disease characterized by sulfatide accumulation in various tissues. It is inherited autosomal recessively. MLD is divided into three types according to the age of clinical onset of the patients. These are late infantile, juvenile and adult types. MLD occurs in the deficiency of a lysosomal enzyme, arylsulfatase A (ASA) or the saposin B (Sap-B) protein, the activator protein of this enzyme. Sulfatides that cannot be hydrolysed due to the failure of the ASA, which is responsible for the breakdown of sulfatides, accumulate in many tissues, especially in the nervous system cells and cause neural damage. In the laboratories, the diagnosis of MLD is made by the arylsulfatase A (ASA) enzyme assay. Although this test is necessary for the diagnosis of MLD, it is insufficient to make an accurate diagnosis. In this study, we aimed to establish all the necessary analyzes for the diagnosis of MLD in our country and to reveal the molecular mechanism of the disease. For this purpose, 12 lysosomal enzyme analysis by spectrophotometric and fluorometric methods, enzyme protein and activator protein determination by Western blot analysis, sulfatide analysis by thin layer chromatography, and pseudo-deficiency mutation by PCR-restriction enzyme analysis were performed. In addition, anti-sulfatide and anti-MOG analyzes were performed to investigate the role of inflammation in the phenotypic variation in MLD. In conclusion, patients presenting with the suspicion of MLD were evaluated with the necessary analyzes to identify all MLD types. The mutations caused by the disease and the effect of the mutations on the protein were detected. The role of the inflammation in the severity of the clinical symptoms has been evaluated through antibody formations.

Key words: Sulfatide, arylsulfatase A, saposin B, anti-sulfatide, anti-MOG, DEAE-cellulose chromatography, thin layer chromatography, mutation, leukodystrophy

This work was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit. Project number: TSA-2017-12891

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sülfatidler	3
2.2. Arilsülfatazlar	5
2.2.1. Arilsülfataz A (ASA) Enzimi	6
2.3. Prosapozin ve Sapozinler	9
2.3.1. Sapozin B (Sap-B) Proteini	9
2.4. Metakromatik Lökodistrofi	10
2.4.1. Metakromatik Lökodistrofi Hastalığının Tipleri	10
2.4.2. Metakromatik Lökodistrofinin Patofizyolojisi	11
2.4.3. Metakromatik Lökodistrofinin Moleküler Patolojisi	11
2.4.4. Biyokimyasal Tanı Yöntemleri	12
2.4.5. Genetik Tanı Yöntemleri	13
2.4.6. Prenatal Tanı	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Gereçler	14
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Bileşikler ve Kitler	14
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	15
3.2. Araştırmanın Yeri	16
3.3. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	17
3.4. Yöntemler	17
3.4.1. Plazma ve lökositlerde lizozomal enzim analizi	17
3.4.2. PCR ve kesim enzimi yöntemleri ile yalancı eksiklik analizi	22

3.4.3. DEAE-selüloz iyon değıştirici kromatografi ile ASA ve ASB izoenzimlerinin ayırımı ve aktivite tayini	25
3.4.4. İnce tabaka kromatografisi ile idrarda sülfatid analizi	28
3.4.5. Western blot yöntemi ile arilsülfataz A ve sapozin B proteinlerinin analizi	29
3.4.6. ASA ve sapozin B geninde mutasyon analizi	32
Polimeraz Zincir Reaksiyonu	35
PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu	38
Dizi Analizi	38
DNA Dizileme Ürünlerinin Pürifikasyonu	39
Dizi analizi sonuçlarının değeriendirilmesi	39
3.4.7. Plazma anti-MOG IgG ve anti-sülfatid IgM ve anti-sülfatid IgG analizleri	39
3.4.8. İstatistiksel analiz	42
4.1. Lizozomal Enzim Analizi Sonuçları	43
4.2. Yalancı Eksiklik Analizi Sonuçları	48
4.2.1. DNA izolasyonu sonuçları	48
4.2.2. ARSA geninin PCR-kesim enzimi analizi	50
4.3. DEAE-selüloz iyon değıştirici kromatografi ile ayrıştırlan ASA ve ASB izoenzimlerinin aktivite tayini sonuçları	54
4.4. İnce tabaka kromatografisi ile idrarda sülfatid analizi sonuçları	66
4.5. Western blot yöntemi ile arilsülfataz A ve sapozin B protein analizi sonuçları	67
4.6. ASA ve sapozin B genlerinde mutasyon analizi sonuçları	69
4.6.1. RNA konsantrasyon sonuçları	69
4.6.2. DNA dizi analizi sonuçları	71
4.7. Plazma anti-MOG IgG, anti-sülfatid IgM ve anti-sülfatid IgG analizlerinin sonuçları	76
4.7.1. Hücreye dayalı yöntem (cell-based assay) ile anti-MOG IgG analizi sonuçları	76
4.7.2. ELISA yöntemi ile anti-sülfatid IgM antikoru analizi sonuçları	77
4.7.2. ELISA yöntemi ile anti-sülfatid IgG antikoru analizi sonuçları	79
5. TARTIŞMA	81
5.1. ASA enzim analizi ve yalancı eksikliği	82

5.2. DEAE-selüloz iyon değıştirici kromatografi ile ASA ve ASB izoenzimlerinin fiziksel özelliklerine göre ayrımı	84
5.3. İnce tabaka kromatografisi ile idrarda sülfatid analizi	85
5.4. Hastalığa neden olan mutasyonların genotip-fenotip ilişkisi	88
5.5. İnflamasyonun patogenezdaki rolü	91
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	95
7. KAYNAKLAR	96
8. EKLER	101
EK 1. Çözeltiler	101
EK 2. Çalışmadan Hazırlanan Yazılı ve Sözlü Sunumlar	104



SİMGELER VE KISALTMALAR

4-MU	: 4-metil umbelliferon
4-MUS	: 4-metil umbelliferil sülfat
ALD	: Adrenolökodistrofi
ARSA	: Arilsüfataz A geni
ASA	: Arilsülfataz A
ASB	: Arilsülfataz B
BSA	: Sığır serum albümini
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CGT	: Seramid galaktozil transferaz
CST	: Seramid sülfotransferaz
DEAE	: Dietil amino etil
DEPC	: Dietil prokarbonat
dH ₂ O	: Deiyonize su
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
ECL	: Güçlendirilmiş kemilüminesan
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
FITC	: Floresein izotiyosiyanat
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HSCT	: Hematopoetik kök hücre tedavisi
IgG	: İmmünglobülin G
IgM	: İmmünglobülin M
kDa	: Kilo-dalton
MLD	: Metakromatik lökodistrofi
MOG	: Miyelin oligodendrosit glikoprotein
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MS	: Multipl skleroz

MSD	: Çoklu sülfataz eksikliği
OD	: Optik dansite
PAPS	: 3'-fosfoadenozin 5'-fosfosülfat
PBS	: Fosfatla tamponlanmış salin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PD	: Yalancı eksiklik
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Gerçek zamanlı PCR
Sap-B	: Sapozin B
SUMF-1	: Sülfataz modifiye edici faktör 1
TBE	: Tris borat EDTA
TBS-T	: Tween 20 eklenmiş Trisle tamponlanmış salin
TMB	: Tetrametil benzidin

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2. 1. Sülfatid yapısının basit şematik gösterimi	3
Şekil 2. 2. Sülfatid sentezi	4
Şekil 2. 3. Sülfatid yıkımı	5
Şekil 4. 1. ASA aktivitesi sonuçları	47
Şekil 4. 2. ARSA geninin 6. eksonunun PCR ürünü kullanılarak, BsrI kesim enzimi ile N-glikozilasyon mutasyonunun (N350S) analizi sonrası yapılan %3'lük NuSieve agaroz jel elektroforezi görüntüsü	54
Şekil 4. 3. İyon değiştirici kromatografi sonrası ASA ve ASB izoenzimlerinin inhibitörlü (125 µM AgNO ₃) ve inhibitörsüz florometrik aktivite tayini grafikleri	65
Şekil 4. 4. İnce tabaka kromatografisi ile idrarda sülfatid analizi	67
Şekil 4. 5. Farklı protein konsantrasyonlarında hazırlanan kontrol örneğinde protein elektroforezi	68
Şekil 4. 6. Farklı protein konsantrasyonlarında hazırlanan kontrol örneğinde, ASA proteininin Western blot analizi	68
Şekil 4. 7. Farklı protein konsantrasyonlarında hazırlanan kontrol örneğinde ASA proteininin analizi sonrasında “stripping – reprobing” yapılarak Sapozin B proteininin Western blot analizi	68
Şekil 4. 8. On altı MLD ve 1 MSD hastasının ASA ve β-aktin proteinlerinin Western blot analizi	69
Şekil 4. 9. Hücreye dayalı yöntemle anti-MOG IgG tayini immünofloresan mikroskobu görüntüsü	76
Şekil 4. 10. Anti-sülfatid IgM analiz grupları	78
Şekil 4. 11. Anti-sülfatid IgG analiz grupları	80

TABLÖLER**Sayfa**

Tablo 3. 1. ARSA, SUMF1 ve PSAP genlerine ait primer dizileri ve erime sıcaklıkları (T _m)	37
Tablo 3. 2. PCR koşulları	38
Tablo 4. 1. Plazma (μmol/L/sa) ve lökosit (μmol/g protein/sa) örneklerinde lizozomal enzim aktiviteleri	44
Tablo 4. 2. Hastalar ve aile bireylerinin DNA izolasyonu ile elde edilen DNA konsantrasyonları	48
Tablo 4. 3. Hastalar ve aile bireylerinin RNA izolasyonu ile elde edilen RNA konsantrasyonları	70
Tablo 4. 4. MLD şüphesiyle gelen hastalarda ARSA ve SUMF1 genlerinin dizi analizi ile tespit edilen mutasyon ve polimorfizmler	72
Tablo 4. 5. Anti-sülfatid IgM analiz grupları	77
Tablo 4. 6. Anti-sülfatid IgM analiz gruplarının karşılaştırılması	78
Tablo 4. 7. Anti-sülfatid IgG analiz grupları	79
Tablo 4. 8. Anti-sülfatid IgG analiz gruplarının karşılaştırılması	80

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Metakromatik lökodistrofi (MLD), çeşitli dokularda sülfatid birikimiyle karakterize bir lizozomal depo hastalığıdır. Otozomal resesif kalıtılır. Bu nedenle akraba evliliklerinden dünyaya gelen çocuklarda görülme sıklığı daha yüksektir. Bu hastalığın ülkemizde görülme sıklığı 69892 doğumda 1'dir [1].

MLD, hastalığın klinik başlangıç yaşına göre üç tipe ayrılır. Bunlar geç infantil, juvenil ve erişkin tipleridir. Geç infantil tip, klinik olarak en şiddetli seyreden tiptir ve genellikle erken yaşlarda ölümle sonuçlanır.

Bu hastalarda görülen genel klinik belirtiler mental gelişim geriliği, ataksi, ilerleyici spastik tetraparezi, optik atrofi ve demanstır [2]. Bu bulguların pek çok hastalığın ortak bulguları olması nedeniyle bu hastalığın ayırıcı tanısının yapılmasında klinik muayene bulguları tek başına yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle MLD tanısı ve ayırıcı tanısı için çeşitli laboratuvar ve görüntüleme testlerinden yararlanılmaktadır.

Laboratuvarlarda MLD tanısı, arilsülfataz A (ASA) enzim tayini yapılarak konulmaya çalışılmaktadır. Bu testin yapılması MLD tanısı için gerekli iken, kesin tanı konulabilmesi için tek başına yetersiz kalmaktadır. Çünkü bu hastalığın ortaya çıkmasının tek nedeni ASA enziminin eksikliği değildir. ASA enzim düzeyi normal olsa da bu enzimin aktivatör proteini olan sapozin B (Sap-B) eksikliğinde de MLD görülmektedir. Bu nedenle enzim düzeyinin normal olması, MLD hastalığının olmadığını göstermez. Klinik olarak MLD hastalığından şüphelenilen fakat ASA enzim düzeyi normal bulunan bireylerde sapozin B proteininin tayini gerekmektedir.

Arilsülfataz enzim ailesinden arilsülfataz B'nin varlığı da ASA enzim aktivitesi ölçümünde yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Bu nedenle bu iki izoenzimin ayrıştırılarak tayin edilmesi gerekmektedir.

ASA enzim düzeyi düşüklüğü sadece MLD hastalarında görülmez. Çoklu sülfataz eksikliği (MSD) hastalarında ASA enzimi eksiktir; beraberinde diğer lizozomal sülfatazların eksikliği de bulunabilir. Bu nedenle MSD ile MLD'yi ayırtedebilmek için ASA enziminin yanı sıra diğer sülfatazların tayini de yapılmalıdır.

Yalancı eksiklik mutasyonlarından birine sahip bireylerde de ASA düzeyi düşük bulunabilir. Fakat bu bireylerde MLD hastalığı görülmez. [3]. Bu bireylerde

sadece ASA enzim düzeyine bakılması hatalı pozitif sonuçlar ortaya çıkaracaktır. Bu durumda genetik testlerle yalancı eksiklik mutasyonu analizine ihtiyaç duyulmaktadır.

MLD, otozomal resesif geçişli bir hastalık olduğu için soy ağacı çalışması yapılması kalıtımın kanıtlanması ve ailedeki diğer hasta bireylerin tanımlanması için gerekmektedir. Bu analiz aynı zamanda presemptomatik dönemdeki hastaları tanımlamak için de önemlidir. MLD hastalarında mutasyon analizi yapılması ülkemizdeki MLD hastalarının ARSA genindeki moleküler lezyonlarının belirlenmesini sağlamaktadır. Bu sonuç, gelecekte potansiyel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için kullanılabilir.

Lizozomal depo hastalıklarının klinik muayene bulgularının benzerlik göstermesi, bu hastalıkların ayırıcı tanısının yapılabilmesi için lizozomal enzim taraması yapılmasını da gerekli kılmaktadır.

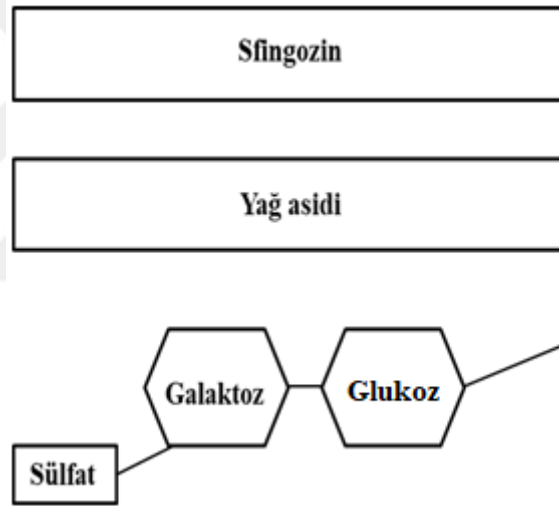
MLD tanısında önemli olan bir diğer analiz de idrarda biriken substrat sülfatidin ince tabaka kromatografisi ile analizidir. İdrarda sülfatid varlığının tespit edilmesi, ASA enzim aktivitesinin normal saptandığı durumlarda sapozin B eksikliği ayırıcı tanısını yapmak için değerlidir.

MLD hastalığının laboratuvar tanısındaki bu ihtiyaçlar nedeniyle bu çalışmada, ülkemizde MLD'nin tanısı için gerekli tüm analizleri kurmak ve hastalığın moleküler mekanizmasını ortaya çıkarmak amaçlandı. Bu amaçla spektrofotometrik ve florometrik yöntemlerle lizozomal enzim taraması, Western blot ile enzim proteini ve aktivatör protein tayini, ince tabaka kromatografisi ile sülfatid analizi, PCR-kesim enzimi analizi ile yalancı eksiklik mutasyonu tayini ve DNA dizi analizi ile ARSA geninde yalancı eksiklik mutasyonu, hastalığa neden olan mutasyonlar ve polimorfizmler tespit edildi. Ayrıca MLD hastalığında fenotip farklılığında inflamasyonun rolünü incelemek amacıyla anti-sülfatid ile miyelin yapısındaki en antijenik protein olan miyelin oligodendrosit glikoproteinine (MOG) karşı gelişen anti-MOG analizleri yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sülfatidler

MLD hastalığında biriken sülfatidler, ilk olarak “sülfür içeren lipidler” olarak tanımlanan glikosfingolipit grubu moleküllerdir [4]. Sülfatidler izole edildiğinde serebronik asit, sfingozin, galaktoz ve sülfat içerdikleri gösterilmiştir. Sülfatid, bir sfingozin bazı ve bir yağ asidinin amid bağıyla bağlanarak oluşturduğu seramid molekülüne, glikozidik bağla glukoz ve galaktozun bağlanması ve galaktoza da ester bağıyla sülfatın bağlanmasından oluşmuş bir sülfatlı glikosfingolipittir. Sfingozin içeren sülfatlı glikolipitlerin en yaygını olan sülfatidler, “3-0-sülfogalaktozil seramidler” veya “SM4” şeklinde de isimlendirilmektedir [5].



Şekil 2. 1. Sülfatid yapısının basit şematik gösterimi

Sülfatidler serebrozidlerin sülfat esterleridir. Sülfatidlerin yapısında genellikle 18 karbonlu sfingozin bulunur. Sülfatidlerin yağ asiti içeriği dokular arasında değişkenlik gösterir. Erişkin bir bireyin beynindeki sülfatidlerin yapısında yüksek oranda, α -hidroksi gruba sahip uzun zincirli yağ asitleri bulunur. Fetal beyinde ise orta zincirli yağ asitleri daha baskındır. Böbrek sülfatidleri, beyin sülfatidlerine kıyasla 10 kat daha fazla behenik asit (22:0) içerir. Böbrek sülfatidlerinde lignoserik asit (24:0) daha yüksek oranda bulunurken, beyin sülfatidlerinde nervonik asit (24:1) daha yüksek oranda bulunur [6].

Sülfatidler en çok santral ve periferik sinir sistemlerinde; oligodendrositlerde, Schwann hücrelerinde, astrositlerde, nöronlarda ve özellikle miyelinin yapısında bulunur. Miyelin lipidlerinin %4-6'sını oluşturur. Öncül lipidi olan galaktozilseramidle birlikte ise miyelin lipidlerinin yaklaşık üçte birini oluşturur. Miyelin kılıfın dış yüzeyinin üçte ikisine kadar olan kısmını da oluşturur [7]. Beynin bazı kısımlarında miyelin oluşumu altıncı dekata kadar tamamlanmadığı için sülfatid birikimi bu yaşlara kadar devam eder [6]. Sülfatidler sinir sisteminden sonra en çok böbreklerde bulunur. Ayrıca dalakta, karaciğerde, salgı epitelinde, vücut sıvılarında ve diğer pek çok dokuda da bulunur [8].

Sülfatid sentezi endoplazmik retikulum lümeninde başlar. UDP-galaktoz: seramid galaktozil transferaz (CGT) enzimi ile UDP-galaktozdan alınan galaktoz, seramide eklenir ve galaktozilseramid oluşur. Galaktozilseramid, Golgi aygıtına taşınır. 3'-fosfoadenililsülfat: galaktozil seramid 3'-sülfotransferaz (CST) enzimi ile 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosülfattan (PAPS) galaktozil seramide sülfat transfer edilerek sülfatid sentezi tamamlanır [9].



Şekil 2. 2. Sülfatid sentezi. CGT: UDP-galaktoz: seramid galaktozil transferaz, CST: 3'-fosfoadenililsülfat: galaktozil seramid 3'-sülfotransferaz

Sülfatidler, heparin, kondroidin sülfat ve gangliozidler gibi renk değişimini indükleyebilen kromotrop moleküllerdir. Toluidin mavisi, krezil viole, metilen mavisi ve tionin gibi boyalar, kromotrop moleküllerin varlığında uzun dalga boylu bir ışığı geçirirken kırmızı-pembe görünür. Bu olaya metakromazi denir [6].

Sülfatidlerin çok çeşitli fonksiyonları bulunmaktadır. Miyelin kılıfın yüzeyinde bulunarak yalıtımı sağlamasının yanı sıra beyin gelişiminde de rol alır [10]. Sülfatidler miyelin yapımının başlamasını uyarır. Sülfatidler ayrıca oligodendrositlerin farklılaşmasında negatif bir düzenleyicidir [7].

Anyonik yüke sahip olan sülfatidler, diğer membran lipidleri ile hidrofilik ve hidrofobik etkileşimlere girerek membranın elektriksel yük dengesine katkıda

bulunurlar [5]. Sülfatidlerin Na/K-ATPaz'ın kofaktörü olarak, sodyum taşınımında rol aldıkları da düşünülmektedir [11, 12].

Sülfatidlerin pek çok nörotransmitterin reseptörlerine bağlanmasında rolü bulunmaktadır. Ayrıca bazı nörotransmitterlerin çözünürlüklerini de artırır. Sülfatidler pek çok hücrel adezyon moleküllerine yüksek afinite ve özgüllükle bağlanır. Bu moleküllerin bağlanma bölgeleri, ortak amino asit dizisine sahiptir. Sülfatidler, hem koagülan hem de antikoagülan mekanizmalarda rol alır [5]. Birçok mikroorganizmanın sülfatide özgül bağlanma bölgeleri bulunur. [13]. Sülfatidler testis ve spermin majör glikolipididir ve spermatogenezde rol alır [14, 15].

Arilsülfataz A (ASA) enzimi, lizozomlarda inorganik sülfat kısmını kopararak sülfatidlerin yıkımını gerçekleştirir. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi, ortamda ASA enziminin aktivatör proteini olan sapozin B (sap-B) proteininin bulunmasına bağlıdır. Bu protein ASA enziminin, membranla bütünleşmiş substratların sülfat gruplarına erişimini kolaylaştırır [5]. Endozomlarda ise β -galaktozidaz enzimi ile sülfatidlerin sülfat atılımı olmaksızın direkt olarak seramidlere hidrolizi gerçekleşir [16].



Şekil 2. 3. Sülfatid yıkımı. ASA: Arilsülfataz A

2.2. Arilsülfatazlar

Arilsülfatazlar; mukopolisakkaritler, serebrozidler ve steroidler gibi çeşitli aromatik yapıların sülfat ester bağlarını hidrolizleyen enzim gruplarıdır [17, 18]. Arilsülfatazların önemli bir kalıntısı, sistenin post-translasyonel oksidasyonu sonucu oluşan C α -formilglisindir. Bu modifikasyon gerçekleşmediğinde enzim inaktif olur [19].

Sülfataz enzim ailesinin protein yapısı incelendiğinde, polipeptid zincirinin amino-terminal yarı kısmında bulunan aktif bölge kalıntılarının korunmuş bölgede olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, sülfatazların katalitik mekanizmalarının ortak olduğunu gösterir.

Protein ve genleri tanımlanmış dokuz adet sülfataz enzimi bulunmaktadır. Bunların altısı arilsülfataz izoenzimleridir. Bunlar Arilsülfataz A, B, C, D, E ve F'dir.

Arilsülfataz A ve B lizozomal enzimlerdir. Arilsülfataz C, steroid sülfataz veya östron/dehidroepiandrosteron sülfataz (ES) olarak da adlandırılan mikrozomal bir enzimdir. Arilsülfataz C plasenta, meme dokusu, fallop tüpleri ve cilt fibroblastları gibi dokularda sentezlenir. Arilsülfataz D, E ve F'nin endoplazmik retikulum ve Golgi'de bulundukları düşünülmektedir. Arilsülfataz A ve B izoenzimleri suda çözünebilirken arilsülfataz C izoenzimi hidrofobik yapıda olup sadece deterjanla çözünebilir ve endoplazmik retikulum membranına bağlı halde bulunur. Arilsülfataz A ve B izoenzimleri asidik pH'da optimum aktivite gösterirken arilsülfataz C nötral pH'da optimum aktivite göstermektedir [20].

Arilsülfataz A sülfatidlerin yıkımında görev alır. Arilsülfataz B'nin bazı kompleks mukopolisakkarit sülfatları parçaladığı düşünülmektedir. Maroteaux-Lamy (mukopolisakkaridoz tip 6) hastalarında arilsülfataz B aktivitesi düşük bulunmaktadır [21]. Arilsülfataz C östron, dehidroepiandrosteron ve kolesterolün 3-hidroksisteroid sülfat esterlerini substrat olarak kullanır. Bu izoenzimin inaktivasyonu X'e bağlı iktiyoz hastalığıyla ilişkilidir [20].

2.2.1. Arilsülfataz A (ASA) Enzimi

ASA bir lizozomal hidrolazdır. ASA enzimi, sülfat içeren çeşitli substratların yıkımını gerçekleştirir. Bu enzimin en önemli fizyolojik substratı ise sülfatidlerdir. ASA, bu substratların sülfat kısımlarını kopararak fonksiyon gösterir. Bu enzimin sülfataz aktivitesinin yanı sıra fosfodiesteraz aktivitesi de bulunmaktadır. Böylece düşük etkinlikte de olsa, cAMP ve cGMP'nin yıkımını da katalizler. ASA, düşük bir izoelektrik noktaya sahiptir.

ASA sentezi granüllü endoplazmik retikulumda başlar. ASA mRNA'sından, enzimin 507 amino asitlik öncülünün translasyonu gerçekleşir. Sonrasında ASA, endoplazmik retikulumda formilglisin kalıntısı eklenmesi, sinyal peptidinin ayrılması ve N-oligosakkarit yan zincirlerinin eklenmesi gibi posttranslasyonel modifikasyonlara uğrar. Tiyol grubunun bir aldehite oksidasyonu sonucu oluşturulan formilglisin kalıntısı, tüm ökaryotik sülfatazlarda sisteine bağlanır. ASA enziminde de sistein 69'a bağlanır. Bu modifikasyon, bu enzim grubunun sülfataz aktivitesine sahip olabilmesi için gereklidir. Bu modifikasyonun gerçekleşmemesi, inaktif sülfatazların sentezine ve bunun sonucu olarak da çoklu sülfataz eksikliği hastalığına neden olur.

Endoplazmik retikulum lümeninde sinyal peptidi ayrılır ve enzimin üç adet bulunan N-glikozilasyon bölgelerine N-oligosakkarid yan zincirleri eklenir. Katlanma tamamlandıktan sonra ASA, Golgi'de lizozomal enzim fosfotransferaz tarafından mannoz rezidüsünden fosforillenir ve mannoz 6-fosfat reseptörlerine bağlanarak lizozoma gönderilmek üzere ayrılır, veziküler transportla önce geç endozoma, daha sonra da lizozoma gönderilir. Lizin amino asitleri, sülfatazların fosfotransferaz tarafından tanınmaları için önem taşır.

Mannoz-6-fosfat kalıntıları, genelde birinci ve üçüncü N-glikozilasyon bölgelerinde bulunmaktadır. Enzimin lizozoma taşınımı, mannoz-6-fosfat reseptör yolağı tarafından prelizozomal asidik kompartmanla sağlanır.

Diğer lizozomal enzimlerin aksine ASA, lizozoma taşınım esnasında ve lizozoma ulaştıktan sonra çoğunlukla proteolitik parçalanmaya uğramaz. ASA enziminin büyük çoğunluğu işlenmemiş halde bulunan 62 kDa'luk bir polipeptid yapısındadır. Az miktarda ise 57 kDa'luk bir polipeptid olarak bulunur. Çok az bir kısmı da C-terminal kısmına yakın bir yerden internal proteolitik parçalanma sonucunda, birbirine öncesinden disülfid köprüleri ile bağlı halde bulunan 51 ve 7 kDa'luk iki parçaya ayrılır [5].

Enzimin ikincil yapısı α/β sarmal tabaka karışımı şeklindedir. Enzim, aktif bölgesinde formilglisin 69 kalıntısı ile birlikte Mg^{+2} iyonu taşır. Asidik ortamda (pH: ~5) optimal aktivite gösterir ve homo-oktamer $(\alpha_2)_4$ yapıya dönüşür. Alkali ve nötral pH'da homo-dimer (α_2) yapıdadır [18]. ASA monomeri, alkali fosfatazın yapısal analogudur. ASA'dan farklı olarak alkali fosfatazın aktif bölgesinde iki çinko iyonu bulunur ve formilglisin bulunmaz [22].

ASA, pek çok dokuda bulunan, yapısı korunmuş bir enzimdir. ARSA geni 22. kromozomun q13 bandının uzun kolunda bulunmaktadır ve 8 eksonludur. 103-320 nükleotid uzunluğundadır. Genomik dizisi 3,2 kb'dır. Promotor bölgesinde TATA ve CAAT kutuları bulunmazken, -10, -40, -50 ve -60 baz pozisyonlarında GC kutuları bulunur. Bu pozisyonlar, Sp1 transkripsiyon faktörü için tipik pozisyonlardır. Başlangıç kodonunun ilerisindeki 367 ve 387 baz çifti arasında 4 adet transkripsiyon başlangıç bölgesi bulunmaktadır. ARSA geninde TGA sonlanma kodonundan sonra 95-100. nükleotidler arasında bir poliadenilasyon sinyali bulunur. Primer transkript, "splicing" ve poliadenilasyon sonrasında çoğunlukla 2,1 kb'lık bir mRNA oluşturur.

Az da olsa 3,7 ve 4,8 kb'lık mRNA'lar da oluştururlar. 2,1 kb'lık mRNA'lar, ASA polipeptidlerinin sentezinin esas sorumlusudur [5].

ASA Yalancı Eksikliği

Avrupa toplumunun yaklaşık %1-2'sinde belirgin ASA aktivitesi dūřuklūđu gözlenirken, bu bireylerde sülfatidin birikimi veya idrarla atılımı bulgularına rastlanmamıştır. Klinik olarak normal olan bu bireyler, preklinik evre MLD vakalarına da benzememektedirler. Bu şekilde, klinik sonuçları bulunmayan ASA eksikliği durumları “yalancı eksiklik” olarak tanımlanmaktadır. Yalancı eksiklik mutasyonu, enzim aktivitesinden ziyade enzim proteinin kaybıyla ilişkilidir. Eksik olan enzimin aktivitesi normaldir [5].

ASA yalancı eksikliği, genellikle yalancı eksiklik allellerinin homozigot olarak bulunduğu bireylerde görülür. Daha nadir olarak da (1.500 bireyde 1) yalancı eksiklik alleli ile bir MLD allelinin “birleşik heterozigot” olarak bulunduğu bireylerde görölmektedir. “Birleşik heterozigot” bireylerde idrarla sülfatid atılımına rastlanabilmektedir. Avrupa toplumunun yaklaşık %10-20'sinde yalancı eksiklik alleli bulunmaktadır [5]. Ülkemizde de bu oran %11,5'tir [23].

Yalancı eksiklik mutasyonu bulunan bireylerin ARSA geni 2-4 kDa daha kısadır. Bu fark, genellikle C-terminalindeki N-glikozilasyon bölgesinde, serin ile asparajinin (350) yer değiştirmesine neden olan bir nokta mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu mutasyon en sık görölen yalancı eksiklik mutasyonudur ve ASA enzimi üzerinde üç adet olması gereken N-bağlı oligosakkarid yan zincirlerinden birinin kaybına neden olur. Bu kaybın, enzimin yarı ömrünün kısalmasına yol açtığı dūřünülmektedir [5].

Daha nadir görölen diğer yalancı eksiklik mutasyonunda ise sonlanma kodonunun 95 baz çifti gerisinde bulunan poliadenilasyon bölgesinde adenin-guanin değişikliği meydana gelir. Bunun sonucunda poliadenilasyon sinyalinde kayıp ve 2,1 kb'lık mRNA'ların sayısında azalma oluşur [5].

N-glikozilasyon bölgesindeki mutasyon, enzim miktarında yaklaşık %50, poliadenilasyon bölgesindeki mutasyon ise %90'dan fazla kayba yol açmaktadır [5].

2.3. Prosapozin ve Sapozinler

Sülfatidlerin lizozomda hidrolizi reaksiyonunda ASA enzimi, sapozin B proteini ile birlikte çalışır. Sapozin B, bir sfingolipit aktivatör proteindir ve prosapozin proteininden elde edilir. Sapozinlerin prekürsörü olan prosapozin, 70 kDa'luk bir glikoproteindir. Sapozinler gibi prosapozinler de çeşitli sfingolipidlerin metabolizmasında görev alan lizozomal hidrolazları aktive eder. Prosapozinler ayrıca bir integral membran proteindir. Bazı biyolojik sıvılarda da bulunurlar. Prosapozinler, lizozomlarda proteolizise uğrayarak sapozin A, B, C ve D'yi oluştururlar. Sapozinler yapıca birbirlerine çok benzemektedirler. Yapılarında altışar adet sistein bulundurulur. Bir adet glikozilasyon bölgeleri bulunur. Korunmuş prolinleri aynı bölgede yer alır. Isıya dayanıklı glikoproteinlerdir. Sapozinlerin yapısal benzerliklerinin aksine özgüllükleri ve sfingolipid hidrolazları aktive etme biçimleri birbirlerinden farklıdır [24].

Prosapozin geni, 10. kromozomun uzun kolunda (q21-22) bulunmaktadır. Bu gen 17 kb'lık genomik diziye ve 14 eksona sahiptir [24].

2.3.1. Sapozin B (Sap-B) Proteini

Sapozin B proteini çok farklı isimlerle anılmaktadır. Sfingolipid aktivatör protein-1, sülfatid aktivatör protein, GM₁-ganglioizid aktivatör, dispersin ve özgül olmayan aktivatör bu isimlerden bazılarıdır. Sapozin B proteini; arilsülfataz A, α -galaktozidaz A ve β -galaktozidaz enzimlerinin aktive edilmesinde görev alır. Ayrıca glikolipitlerin dışında gliserolipitlerin metabolizmasında da görev alır. Sap-B, enzimlerin aktivasyonu için substratlarla etkileşime girerek, enzimlerle etkileşime giren sapozin ailesinin diğer üyelerinden farklılık gösterir [24].

Sap-B, 80 amino asitli bir polipeptid zincirinden ve asparajine (21) N-bağlı bir karbonhidrat zincirinden oluşmaktadır [25]. Kristal yapısı, geniş bir hidrofobik kaviteyi çevreleyen tek katmanlı α -sarmallarını içeren deniz kabuğu biçimindeki bir dimer şeklindedir [26]. Homodimerik yapıdadır ve açık ve kapalı konformasyonlarda bulunabilmektedir [27].

Glikosfingolipitlerin hem seramid kısmının açıl kalıntısı hem de karbonhidrat zinciri, çapa görevi görerek lipitin Sap-B tarafından tanınmasında rol oynar. Sap-B'nin

açık konformasyonu direk membrana bağlanır ve lipid molekülünün alkil zincirlerini yeniden düzenleyerek geniş hidrofobik kavitesinde lipid molekülünü açığa çıkarır ve suda çözünür bir kompleks oluşturur. Daha sonra kapalı konformasyona dönerek membrandan ayrılır ve lipid molekülünü ASA enzimine substrat olarak sunar. ASA, aktivatör bağlı substrat molekülünden terminal kısmı koparır [27, 28].

2.4. Metakromatik Lökodistrofi

Lizozomal bir enzim olan arılsülfataz A (ASA) veya bu enzimin aktivatör proteini olan Sap-B proteininin eksikliğinde MLD meydana gelir. Sülfatidlerin parçalanmasında görevli olan ASA'nın fonksiyonunu yerine getirememesi sonucu yıkılamayan sülfatidler, pek çok dokuda ve özellikle de sinir sistemi hücrelerinde birikerek harabiyete yol açar.

2.4.1. Metakromatik Lökodistrofi Hastalığının Tipleri

MLD, hastalığın başlangıç yaşına ve klinik bulgularının derecesine göre 3 farklı klinik tipe ayrılır. En sık görülen tipi olan geç infantil tip, hasta bireylerin yüzde 60'ını oluştururken, juvenil tip yüzde 30, erişkin tipi ise yüzde 10 oranında görülür [2].

Geç infantil tipe, klinik bulgular 1,5-2 yaşlarında başlar ve ilk olarak kazanılmış motor kabiliyetlerin kaybı görülür [29]. Hipotoni ve ataksi de hastaların çoğunda görülen klinik bulgulardır. Hastalığın ilerlemesiyle çevreye karşı tamamen ilgisizlik görülür. MLD'nin bu tipi en ölümcül tiptir ve ölüm genellikle 1-7 yaşlarında meydana gelir [30].

Jüvenil tipe, klinik bulguların başlangıç yaşı 4 ila 12 arasındadır. Küçük yaşlarda motor fonksiyon bozuklukları, ilerleyen yıllarda ise yürüme ve konuşmada zorluk, psikoz ve duygu durum bozuklukları görülebilir [29]. MLD'nin juvenil tipi genellikle ölümcüldür fakat bazı bireyler 20 yıldan fazla yaşayabilmektedir [30].

Erişkin tipinde, klinik bulgular genellikle 19 ila 46 yaşları arasında başlar. Hastalığın ilerleyişi yavaş olur. Hayatta kalma süreleri genellikle 5 ila 10 yıl arasında değişmektedir. Başlangıç bulguları genellikle davranışsal değişikliklerdir. Bu durum sıklıkla psikiyatrik hastalıkların ayırıcı tanısıyla karıştırıldığı için erişkin tipli MLD hastalarının erken tanı alması zorlaşmaktadır [29]. Bazı hastalar şizofreni, anksiyete bozukluğu veya duygu durum bozukluğu hastalıklarına benzer klinik belirtiler

gösterir. Hastalığın son evresinde konuşamama, hareket kısıtlılıkları ve inkontinans görülür [30].

Sap-B eksikliği ise MLD'nin nadir görülen bir diğer nedenidir. Başlangıç yaşı doğumdan 30 yaşına kadar değişebilir [5]. Klinik olarak ASA eksikliği kaynaklı MLD'den farksızdır, ancak laboratuvar bulgusu olarak sentetik substratla analiz edilen ASA aktivitesi normaldir. Sapozin B eksikliği lökositler, fibroblastlar ve idrarda gösterilebilir.

2.4.2. Metakromatik Lökodistrofinin Patofizyolojisi

MLD'nin tüm tiplerindeki biyokimyasal bozukluk, sülfatidin enzimatik hidrolizinin yetersizliğidir. Bu durum, sülfatidin esas olarak lizozomlarda sürekli olarak birikmesine neden olur. Bu birikme, tüm dokularda aynı biçimde olmaz. Bu nedenle dokularda meydana gelen fonksiyonel kayıp, biriken sülfatid miktarıyla orantılı değildir.

Kalp, akciğer, dalak, deri ve kemiklerde sülfatid birikimi neredeyse hiç gözlenmezken karaciğer, pankreas, böbrekler, böbrek üstü ve ter bezlerinde fonksiyonel bozukluğa yol açmayan sülfatid birikimi gözlenir. Safra kesesindeki sülfatid birikimi ilerleyici fonksiyonel bozukluğa yol açarken sinir sistemindeki beyaz cevherde sülfatid birikimi ölümcül seyreder.

Farklı dokularda biriken sülfatidlerin içerdikleri yağ asitlerinin türlerinin birbirlerinden farklı olması, farklı organlarda sülfatid birikiminin birbirinden bağımsız gerçekleştiğinin göstergesidir.

Miyelin oluşumundan sorumlu olan oligodendrositler ve Schwann hücrelerinde meydana gelen sülfatid birikimi sonucunda lizozom sayılarında artış meydana gelir. Bu hücrelerin fonksiyonlarını yerine getirememesi nedeniyle demiyelinasyon meydana gelir. Bu durum sinir iletim hızında ve sinaptik iletimde gecikmeye ve uyarılmış potansiyellerin gecikme süresinde uzamaya neden olur [5].

2.4.3. Metakromatik Lökodistrofinin Moleküler Patolojisi

ARSA geninde şimdiye kadar 160'tan fazla MLD ilişkili mutasyon tespit edildi. Amino asit değişikliklerine sebep olan mutasyonlar, bu mutasyonların

içerisinde en kalabalık grubu oluşturur. Bu mutasyon grubu polimorfizm değildir ve enzim üzerinde zararlı etkiler oluşturmurlar [5].

MLD hastalarında çok sık görülen iki mutasyondan biri 459+1G>A değişikliğine neden olan “splice” (uç birleştirme) bölge mutasyonudur ve geç infantil tip MLD ile ilişkili olduğundan “yaygın geç infantil mutasyonu” olarak da bilinir. Diğer mutasyon ise p.P426L “missense” (kayıp) mutasyonudur ve erişkin tip MLD ile ilişkili olduğundan “yaygın erişkin mutasyonu” olarak da bilinir. Bu iki mutasyonun “birleşik heterozigotluğu” ise juvenil tipi MLD ile ilişkilidir [31].

Mutant ASA allelleri iki farklı grup olarak sınıflandırılmıştır. Enzim sentezine hiç olanak tanımayan mutasyona sahip alleller “boş allel” grubunu oluştururken, az miktarda enzim aktivitesine olanak tanıyan mutasyona sahip alleller ise “R allel” grubunu oluşturdu. Boş allellerin homozigotluğu, şiddetli seyreden geç infantil tip MLD’ye neden olurken, iki R allelin birlikteliği hafif seyreden erişkin tip MLD ile ilişkilidir. Boş allel ile R allelinin birlikteliği ise, orta düzeyde seyreden juvenil tipi MLD ile ilişkili bulunmuştur. Bu durum, hastalık tiplerinin oluşumu ve hastalığın şiddetinin belirlenmesinde tek etmen değildir. Diğer pek çok genetik ve çevresel etmenin de katkısı bulunmaktadır [5].

2.4.4. Biyokimyasal Tanı Yöntemleri

ASA Enzim Aktivitesinin Tayini

ASA aktivitesinin tayini için en güvenilir kaynaklar lökositler ve fibroblast kültürü olsa da bu enzim vücudumuzda pek çok yerde eksprese edildiği için, tanıda çeşitli vücut sıvıları da kullanılabilir. ASA aktivitesinin kolorimetrik yöntemle ölçümü için en çok kullanılan sentetik substrat p-nitrokatekol sülfattır. Florometrik ölçüm için en çok kullanılan sentetik substrat ise 4-metilumbeliferil sülfattır. Radyoaktif işaretli sülfatid de doğal substrat olarak kullanılabilir.

ASA enziminin diğer izoenzimlerinden fiziksel ayrımı için iyon değiştirici kromatografi, elektroforez veya izoelektrik odaklama yöntemlerinden biri kullanılabilir.

Fibroblastlarda veya diğer hücre kültürlerinde ASA aktivitesini ölçmek için sülfatid yükleme testi yapılabilir [5].

ASA ve Sap-B Proteinlerinin Tayini

ASA ve Sap-B proteinlerinin varlığı bu proteinlere özgü antikorlar kullanılarak Western blot yöntemi ile anlaşılabilmektedir. Araştırma amaçlı olarak uygulanan bu yöntem, çok az sayıda laboratuvarda yapılabilmektedir.

Sülfatid Tayini

MLD hastalarında biriken madde olan sülfatidin idrarla atılımı da artar. İdrarla atılan sülfatidler analiz edildiğinde, bu sülfatidlerin genellikle böbrek kaynaklı oldukları tespit edilmiştir. İdrarda sülfatid tayini için lipid ekstraksiyonunu takiben ince tabaka kromatografisi veya yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yapılmaktadır [5].

2.4.5. Genetik Tanı Yöntemleri

Yalancı eksiklik mutasyonlarının analizi için kesim enzimi analizi, MLD'ye neden olan mutasyonların analizi için DNA dizi analizi yapılabilmektedir.

2.4.6. Prenatal Tanı

Prenatal tanı için erken gebelik döneminde direkt koryonik villus örneğinde veya kültür yapılmış koryonik villus hücrelerinde, geç gebelik döneminde ise kültür yapılmış amniyon hücrelerinde ASA aktivite ölçümü yapılabilmektedir. Prenatal tanı, daha önce hasta çocuğu olmuş olan ailelere yapılabilmektedir. Eğer alınan örnek yeterli ise, enzim analizi ile birlikte DNA dizi analizinin yapılması tanıyı daha güçlü kılmaktadır.

Prenatal tanı öncesi ebeveynlerin yalancı eksiklik alleli taşıyıp taşımadıklarının belirlenmesi gerekmektedir. Çünkü enzim aktivite düşüklüğü yalancı eksiklik kaynaklı olabilir ve bu nedenle fetüs yanlışlıkla MLD tanısı alabilir. Böyle bir durumda, amniyon hücrelerinde yalancı eksikliğin moleküler yöntemlerle tespiti mümkündür.

Amniyon ve koryonik villus hücre kültürlerinde sülfatid yükleme testi de yapılabilmektedir [5].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Bileşikler ve Kitler

1. PCR premiks: Bioneer Accu Power (Kore)
2. DNA izolasyon kiti: QiaGen QIAamp DNA blood mini kit (Almanya)
3. RNA izolasyon kitleri: QiaGen QIAamp RNA blood mini kit (Almanya) ve Zymo Research Direct-Zol RNA miniprep plus (ABD)
4. Agaroz: Sigma (Almanya)
5. Nusieve GTG Agaroz: Bio Science, Lonza, Combrex (ABD)
6. Moleküler ağırlık markırları: ϕ X174 DNA-HaeIII Digest, Biolabs (ABD) ve Amersham Rainbow full range, Sigma (Almanya)
7. BCA protein tayin kiti: Thermoscientific, Pierce (ABD)
8. DEAE selüloz: Santa Cruz Biotechnology, Chem Cruz (ABD)
9. 4-Metilumbeliferilsülfat, 6-hekzadekanoil-4-metilumbeliferon, 6-hekzadekanoil-4-metilumbeliferil-beta-D-galaktopiranozid, 4-MU-beta-D-mannopiranozid, 4-MU-N-asetil-beta-D-glukozaminid, 4-MU-N-asetil-beta-D-glukozaminid-6-sülfat, 4-MU-beta-D-glukuronid, 4-MU-beta-D-glukopiranozid, 4-MU-beta-D-galaktopiranozid, 4-MU-alfa-D-mannopiranozid, 4-MU-alfa-D-galaktopiranozid ve 4-MU-alfa-L-fukopiranozid, Glycosynth, (Birleşik Krallık), kinin sülfat, p-nitrokatekol sülfat ve 4-nitro katekol, Sigma, (Almanya)
10. C-18 sülfatid: Matreya LLC, sığır sülfatidi (ABD)
11. İnce tabaka kromatografi silika jel plakaları: ALUGRAM Xtra SIL G/UV254, Macherey Nagel (Almanya)
12. Orsinol: BDH, Poole (Birleşik Krallık)
13. Bromfenol mavisi: Sigma (Almanya)
14. Proteaz inhibitör kokteyl tableti: Roche complete mini, EDTA'sız, Sigma (Almanya)
15. ECL kiti: Bio-Rad Clarity Max ve Bio-Rad Clarity Western ECL substrate (ABD)
16. DNaz 1: QiaGen RNaz free DNaz set (Almanya)
17. cDNA sentez ve PCR kiti: Clontech Advantage RT-PCR kiti (ABD)
18. cDNA PCR primerleri: Sentegen (Türkiye)

19. ASA DNA ve yalancı eksiklik mutasyonları için PCR primerleri: Sigma (Almanya)
 20. Anti-MOG IgG kiti: Euroimmun (Almanya)
 21. İnsan anti-sülfatid IgM ve IgG kitleri: MyBiosource (ABD)
 22. SDS-PAGE jeli: Bio-Rad stain-free precast gels (Almanya)
 23. Kesim enzimleri (BsrI ve DdeI): Biolabs (ABD)
 24. Taq-DNA polimeraz: Sigma (ABD)
 25. Western-Blot primer antikoru: Bonn Üniversitesi (Almanya)
 26. Western-Blot sekonder antikorları: Peroksidaz işaretli anti-tavşan antikor, Amersham (Birleşik Krallık) ve peroksidaz işaretli anti-keçi antikor, Santa Cruz (ABD)
 27. Kloroform, metanol ve etanol: Sigma (Almanya)
- Deneylerde kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıktaydı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

1. Vorteksler: IKA Vortex3 (Almanya) ve Genie K-550 (ABD)
2. Elektroforez güç kaynağı: Consort EV 265 (Almanya)
3. Manyetik karıştırıcı: IKA mini MR (Almanya)
4. Isıtıcı manyetik karıştırıcı: Torrey Pines (ABD)
5. Su banyoları: Nüve BM-302 ve BM-402 (Türkiye)
6. Mikrosantrifüj: Hettich Mikro 22 (Almanya)
7. Nanodrop Spektrofotometre: Denovix DS-11 (ABD)
8. Thermocycler: Bio-Rad iCycler (ABD)
9. Mikroplaka Okuyucu: SpectraMax M2 Molecular Devices (ABD)
10. Kuru ısıtıcı: Major Science (ABD)
11. Hassas teraziler: Mettler Toledo AG204 ve PB303-S (ABD)
12. pH metre: Consort C830 (Almanya)
13. Mikroplaka karıştırıcı: Heidolph Titramax 101 (Almanya)
14. Yatay mikroplaka çalkalayıcı FINEPCR CR100 Compact Rocker (Kore)
15. Azot uçurucu: Teknosem Tab40-Wel WT (Türkiye)
16. Etüv: Labline (ABD)
17. Distile su cihazı: Mini Pure (Türkiye)

18. Buz makinesi: Scotsman AF 100 (Birleşik Krallık)
19. Santrifüjler: Nüve NF800 ve NF800R (Türkiye)
20. Görüntüleme cihazı: Bio-Rad ChemiDoc Touch (ABD)
21. Transfer cihazı: Bio-Rad Trans-Blot Turbo (ABD)
22. Spektroflorometre: Aminco Bowman Photomultiplier Microphotometer (ABD)
23. İnce tabaka kromatografi tankı: Macharey-Nagel (Almanya)
24. Mini agaroz jel elektroforez tankı: Owl B1A (ABD)
25. Poliakrilamid jel elektroforez tankı: Bio-Rad tetracell (ABD)
26. Otomatik pipetler: 2, 10, 100, 200, 1.000, 5.000 µl, Gilson (ABD)
27. Buzdolabı: Arçelik (Türkiye)
28. Derin Dondurucular: Arçelik 2031D (-20°C, Türkiye), Sanyo (-35°C ve -80°C, Japonya)

3.2. Araştırmanın Yeri

Tam kandan plazma ve lökosit izolasyonu, DNA izolasyonu, spektrofotometrik ve fluorometrik yöntemlerle lizozomal enzim taraması, DEAE selüloz kromatografisi ve florometrik yöntemle arilsülfataz izoenzim analizi, BCA yöntemiyle arilsülfataz proteininin tayini, DNA ve RNA izolasyonu, PCR ve kesim enzimi ile ASA enziminin yalancı eksiklik mutasyonunun analizi, cDNA sentezi, ince tabaka kromatografisi yöntemi ile idrarda sülfatid analizi, Western blot yöntemi ile arilsülfataz A ve sapozin B analizi, ELISA yöntemi ile plazmada anti-sülfatid tayini, “cell-based assay” ile anti-MOG analizi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma laboratuvarlarında yapıldı.

DNA dizi analizi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yapıldı.

Hastaların klinik değerlendirmesi Erişkin Nöroloji ve Çocuk Nöroloji bölümlerinde yapıldı.

Anti-sülfatid tayini sonuçlarının istatistiksel analizi Biyoistatistik Anabilim Dalında yapıldı.

3.3. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Araştırmaya çocukluk ve erişkin yaş grubundan klinik ve radyolojik bulguları ile MLD hastalığı şüphesi olan kişiler ve aile bireyleri dahil edildi. Ek olarak MLD patogenezinde inflamasyonun rolünün incelenmesi çalışmasında multipl skleroz (MS), adrenolökodistrofi (ALD) ve diğer demiyelinizan hastalıklara sahip hastalar ve kontrol grubu çalışmaya dahil edildi.

MLD ön tanısı ile 29 hasta ve bu hastaların 40 aile bireyi olmak üzere toplam 69 kişinin kan, idrar, DNA ve RNA örnekleri kullanıldı. Anti-MOG ve anti-sülfatid analizleri için hasta örneklerine ek olarak demiyelinizan bulguları olan 21 hastanın, nörodejeneratif hastalığı olmayan 10 hastanın ve 10 sağlıklı bireyin plazma örnekleri, kontrol gruplarını oluşturdu.

Bu çalışma, 25 Ekim 2016 tarihinde alınan GO 16/658-24 karar numaralı Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izniyle yapıldı. Bu proje, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin TSA-2017-12891 no'lu ve "Metakromatik lökodistrofi hastalığının alt tiplerinin tanımlanması, patojenik mutasyonların belirlenmesi, patogeneizde inflamasyonun incelenmesi" başlıklı kapsamlı proje olarak desteklenmiştir.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Plazma ve lökositlerde lizozomal enzim analizi

Hastalardan alınan 10 ml tam kandan plazma ve lökositler izole edildi. Plazma ve lökosit izolasyonu ile plazmada 4, lökositlerde 8 olmak üzere toplam 12 lizozomal enzimin aktivitesinin tayininde, Dr. Alan Cooper'ın (İngiltere Manchester Willink Biochemical Genetics laboratuvarı) kullandığı yöntemler Prof. Dr. Asuman Özkara tarafından modifiye edilerek kullanıldı [32-39]. Lökositlerde protein tayini için Lowry yöntemi kullanıldı. Bu analizler Anabilim Dalı teknisyeni tarafından yapıldı.

Plazma ve lökosit izolasyonu

Esası:

EDTA'lı tam kan örneğinin santrifüj edilmesiyle üst tabakada plazma elde edilir. Kalan kanın lizis tamponuyla muamele edilmesiyle eritrositler parçalanır. Elde edilen lökosit örneklerinin, salin çözeltisi ile yıkanarak kalan lizis tamponundan temizlenmesi sağlanır.

Yapılışı:

EDTA'lı tüpe alınmış 10 ml tam kan örneği, Nüve NF800R santrifüj cihazında 4°C'de 2000 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Üst fazda oluşan plazmadan 500 µl bir eppendorfa pipetlenip -80°C'de saklandı.

Kalan kan 50 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı. Soğuk lizis tamponuyla (EK.1) hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Buz içinde 20 dakika bekletildi. Bu sırada birkaç kez alt üst edilerek karıştırıldı. 4°C'de 2000 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant atılıp, oluşan çökelti 5 ml soğuk lizis tamponu ile karışım pipetle çekilip-bırakılarak yeniden süspansiyon haline getirildi. Buz içinde 10 dakika inkübe edilirken belirli aralıklarla alt üst edilerek karıştırıldı. %0,9'luk soğuk salin çözeltisi ile hacmi 50 ml'ye tamamlandı. 4°C'de 3.000 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant atılıp, oluşan çökelti 1-2 ml %0,9'luk soğuk salin çözeltisi ile karışım pipetle çekilip-bırakılarak yeniden süspansiyon haline getirildi ve eppendorf tüpe aktarıldı. Mikrofüj cihazında 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve lökosit pelleti -80°C'de saklandı.

Lowry yöntemiyle protein tayini

Esası:

Bu yöntemde bakır iyonları ile proteinlerin peptid bağları alkali ortamda kompleks oluşturur. Folin-Ciocalteu çözeltisi bu kompleksleri indirger ve tirozin ve triptofan amino asitleriyle birleşerek mavi-mor karışımı bir renk oluşumu gözlenir. Bu renk oluşumunun %75'i bakır kompleksleri kaynaklıdır. 500 nm'de oluşan renkli komplekslerin verdiği absorbans okunarak protein miktarı tayin edilir [40].

Yapılışı:

Yüzde 1 (w/v) bakır sülfat, %20 (w/v) sodyum-potasyum tartrat, 0,1 N sodyum hidroksit ve %2 (w/v) sodyum karbonat hazırlandı. Alkalın bakır çözeltisi, 5 ml %2 (w/v) sodyum karbonat (0,1 N sodyum hidroksit içinde), 50 µl %20 (w/v) sodyum-potasyum tartrat ve 50 µl %1 (w/v) bakır sülfat karıştırılarak elde edildi. Folin-Ciocalteu çözeltisi distile suyla 2/5 oranında seyreltilti.

Standart olarak 0,5 mg/ml sıgır serum albümini kullanıldı. Kör, standartlar ve örnekler çift çalışıldı. Kör tüpüne 100 µl distile su pipetlendi. Standart tüplerine sırasıyla 10, 20 ve 40 µl stok standart pipetlendikten sonra distile suyla hacimleri 100 µl'ye tamamlandı. Böylece sırasıyla 50, 100 ve 200 µg/ml standartlar hazırlanmış oldu. Örnek tüpüne 10 µl lökosit süpernatanı ve 90 µl distile su pipetlendi. Tüm tüplere 500 µl alkalın bakır çözeltisi pipetlenip oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Tüm tüplere 50 µl dilüe Folin çözeltisi pipetlenip oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.

Mikroplakanın kuyucuklarına tüm tüplerden 250 µl pipetlendi. SpectraMax cihazında 500 nm'de absorbansları okundu [40].

Spektrofotometrik ve florometrik yöntemlerle plazma ve lökositlerde lizozomal enzim analizleri

Tüm deneylerde kör tüpüne örnek yerine aynı hacimde distile su pipetlendi. Sadece ASA deneyinde kör tüpüne substrat ve örnek pipetlendikten sonra 0. dakikada reaksiyon 1N NaOH ile durduruldu. Krabbe için 0,25-0,5-1,0-1,5-2,0 nmol arası 6-hekzadekanoyil-4-metilumbeliferon standardı kullanıldı. 4-MU floresan substratların kullanıldığı deneylerde, standart olarak 2 nmol/2 ml 4MU'ya karşılık gelen kinin sülfat solüsyonu (0,05 M H₂SO₄'te hazırlanmış) kullanıldı.

Lökosit süpernatanında çalışılan enzim sonuçları µmol/g pr/saat, plazma enzim sonuçları µmol/L/saat olarak ifade edildi.

Plazma çitotriozidaz aktivitesi

0,1 M sitrat/0,2 M fosfat tamponu pH: 5.2 içinde hazırlanmış 0,022 mM 4-MU-beta-D-N,N',N''-triasetilçitotriozid substrat solüsyonu (200 µl) ile 10 µl plazma 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 2 ml 0,2 M pH: 9,5 karbonat tamponu ile durduruldu.

360 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boyunda florometrede okundu.

Plazma beta-mannozidaz aktivitesi

0,1 M/0,2 M sitrat/fosfat pH: 3,2 tamponunda hazırlanmış 4mM 4-MU-beta-D-mannopiranozid (20 µl) ile 10 µl plazma 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. Reaksiyon 2 ml 0,2 M pH: 9,5 karbonat tamponu ile durduruldu.

360 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boyunda florometrede okundu.

Plazma total heksozaminidaz aktivitesi

0,1 M pH: 4,4 sitrat tamponunda hazırlanmış 6 mM 4-MU-N-asetil-beta-D-glukozaminid ile (20 µl), 10 µl plazma 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. Reaksiyon 2 ml 0,2 M pH: 9,5 karbonat tamponu ile durduruldu.

360 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boyunda florometrede okundu.

Plazma heksozaminidaz A aktivitesi

0,1 M pH: 4,4 sitrat tamponunda hazırlanmış 3 mM 4-MU-N-asetil-beta-D-glukozaminid-6-sülfat ile (20 µl), 10 µl plazma 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Reaksiyon 2 ml 0,2 M pH: 9,5 karbonat tamponu ile durduruldu.

360 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boyunda florometrede okundu.

Lökosit galaktoserebrozidaz aktivitesi

0,1 M pH: 4,4 sitrat tamponunda hazırlanmış 1,6 mM 6-hekzadekanoyil-4-metilumbeliferil-beta-D-galaktopiranozid (50 µl) 0,25 mg oleik asit ve 1,25 mg sodiumtaurokolat varlığında 25 µl lökosit süpernatanı ve 25 µl %0,1'lik Triton X-100 ile 4 saat 37°C'de inkübasyonun ardından 2 ml 0,05 M pH: 10,4 glisinat/etanol (1:1) tamponuyla reaksiyon durduruldu. 385 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boyunda florometrede okundu.

Lökosit beta-glukuronidaz aktivitesi

0,1 M pH: 4,0 asetat tamponunda hazırlanmış 5 mM 4-MU-beta-D-glukuronid (20 µl) ile 10 µl lökosit süpernatanı 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. Reaksiyon 2 ml 0,2 M pH: 9,5 karbonat tamponu ile durduruldu.

360 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boyunda florometrede okundu.

Lökosit beta-glukozidaz aktivitesi

0,1 M pH: 4,4 asetat tamponunda hazırlanmış 5 mM 4-MU-beta-D-glukopiranozid (50 µl) ile 50 µl lökosit süpernatanı 2 saat 37°C'de inkübe edildi. Reaksiyon 2 ml 0,2 M pH: 9,5 karbonat tamponu ile durduruldu.

360 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boyunda florometrede okundu.

Lökosit beta-galaktozidaz aktivitesi

0,1 M sodyum klorid içeren 0,1M/0,2M sitrat/fosfat pH: 4,0 tamponunda hazırlanmış 1 mM 4-MU-beta-D-galaktopiranozid (20 µl) ile 10 µl lökosit süpernatanı 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. Reaksiyon 2 ml 0,2 M pH: 9,5 karbonat tamponu ile durduruldu.

360 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boyunda florometrede okundu.

Lökosit alfa-mannozidaz aktivitesi

0,1M/0,2M sitrat/fosfat pH: 3,5 tamponunda hazırlanmış 5 mM 4-MU-beta-D-galaktopiranozid (20 µl) ile 10 µl lökosit süpernatanı 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. Reaksiyon 2 ml 0,2 M pH: 9,5 karbonat tamponu ile durduruldu.

360 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boyunda florometrede okundu.

Lökosit arilsülfataz A aktivitesi

%10 sodyum klorid ve 0,8mM tetrasodyum pirofosfat içeren 0,5 M pH: 5,0 asetat tamponunda hazırlanmış 15 mM p-nitrokatekol sülfat (25 µl) ile 25 µl lökosit süpernatanı 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Reaksiyon 250 µl 1N NaOH ile durduruldu. Oluşan renk 500 nm'de spektrofotometrede okundu. Standart olarak 4-nitrofenol kullanıldı.

Lökosit alfa-galaktozidaz aktivitesi

0,3 M N-asetil galaktozamin içeren 0,1 M pH: 4,8 asetat tamponunda hazırlanmış 1 mM 4-MU-alfa-D-galaktopiranozid solüsyonu (20 µl) ile 10 µl lökosit

süpernatanı 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 2 ml 0,2 M pH: 9,5 karbonat tamponu ile durduruldu.

360 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boyunda florometrede okundu.

Lökosit alfa-fukozidaz aktivitesi

0,1 M/0,2 M sitrat/fosfat pH: 5,8 tamponunda hazırlanmış 0,75 mM 4-MU-alfa-L-fukopiranozid (20 µl) ile 10 µl lökosit süpernatanı 15 dakika 37°C’de inkübe edildi. Reaksiyon 2 ml 0,2 M pH: 9,5 karbonat tamponu ile durduruldu.

360 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boyunda florometrede okundu.

3.4.2. PCR ve kesim enzimi yöntemleri ile yalancı eksiklik analizi

DNA izolasyonu

Esası:

Bu yöntemde proteaz ile hücrel protein komponentleri sindirilir. Çekirdeksiz oldukları için genomik DNA bulundurmayan eritrositler lizise uğratılarak verim artırılır. Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip tamponun kullanılması ve santrifüj işlemi neticesinde DNA, silika membrana bağlanıp tutunur. Yıkama tamponlarıyla kontaminasyon azaltılır. Düşük tuz konsantrasyonuna sahip tamponun kullanılması ve santrifüj işlemi neticesinde DNA elüe olur.

Yapılışı:

QiaGen DNA izolasyon kiti ve kit protokolü uygulandı.

200 µl tam kan örneğinin üzerine 20 µl proteaz pipetlendi. Ardından 200 µl AL (eritrosit lizis) tamponu pipetlendi. 15 saniye vorteksle karıştırıldıktan sonra kuru ısıtıcıda 56°C’de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mikrofüjde 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası 200 µl absölü etanol eklenip 15 saniye vorteksle karıştırıldı. 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Karışım, 2 ml koleksiyon tüpü içindeki mini spin kolona aktarıldı. 8.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.

Kolon yeni bir koleksiyon tüpüne aktarıldı. Ardından kolona 500 µl AW1 (yıkama) tamponu pipetlendi. 8.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni bir

koleksiyon tüpüne aktarıldı. Ardından 500 µl AW2 (yıkama) tamponu pipetlendi. 13.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni bir koleksiyon tüpüne aktarılıp 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.

Kolon, 1,5 ml’lik DNaz içermeyen eppendorfa yerleştirildi. Kolona 50 µl AE (elüsyon) tamponu pipetlendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 8.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen izolattan 1 µl kullanılarak, nanodrop spektrofotometrede ng/µl cinsinden DNA konsantrasyonu ölçüldü.

Polimeaz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Esası:

Bu yöntemde genomik DNA’daki özgül bölgeler çoğaltılır. PCR’ın prensibi tekrarlanan 3 reaksiyona dayanır. İlk olarak çoğaltılacak DNA yüksek sıcaklıkta (94°C) denatüre edilir. Daha sonra primerlerin DNA’daki hedef bölgelerle özgül hibridizasyonuna olanak verecek sıcaklığa düşürülür (~60°C). Son olarak Taq-DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığa (72°C) yükseltilerek primerlerin uzaması ve tamamlayıcı zincirin sentezi sağlanır [41].

Yapılışı:

İçeriğinde 250 µM dATP, dGTP, dCTP ve dTTP, 15 mM MgCl₂, 1 ünite Taq DNA polimeraz ve 1x PCR tamponu bulunan liyofilize Bioneer AccuPower HotStart PCR PreMix kullanıldı.

Her deneyde kör çalışıldı. Her premiks tüpüne 0,4 µl 6. eksonda N-glikozilasyon bozukluğu mutasyonu analizi için uygun primerler (EK.2), 2 µl dimetil sülfoksit (DMSO), örnek tüpüne yaklaşık 0,1 µg olacak miktarda DNA ve tüm tüplere total hacmi 20 µl’ye tamamlayacak miktarda distile su pipetlendi.

“Thermocycler” cihazında 94°C’de 30 saniye ‘denatürasyon’, 60°C’de 40 saniye “annealing”, 72°C’de 90 saniye “ekstansiyon” basamaklarını içeren 35 siklusta PCR tamamlandı [42].

Agaroz (%2) jel elektroforezi

Esası:

Agaroz, deniz yosunlarından elde edilen, dallanmamış zincirli bir polimerdir. Bu yöntem DNA moleküllerinin ayrımı, tanımlanması ve saflaştırılmasında kullanılır. Jeldeki sürtünme kaynaklı ayırım gücü, molekülleri büyüklüklerine göre ayırarak moleküler elek görevi yapar. Negatif yüklü olan DNA molekülleri elektrik alanda pozitif kutup olan anoda doğru ilerlerler. Daha küçük molekül ağırlığına sahip moleküllerin göçü daha hızlı gerçekleşir. DNA'nın jeldeki konumu, floresans veren etidyum bromid ile boyanarak belirlenir [43].

Yapılışı:

1xTBE tamponuyla %2'lik agaroz jel hazırlandı. Isıtıcı karıştırıcıda karıştırılarak kaynatıldı. Başka bir karıştırıcıda soğutuldu. Yaklaşık 50°C'a geldiğinde, 4 µl etidyum bromür pipetlenip bir müddet daha karıştırıldıktan sonra tarak yerleştirilmiş jel dökme tepsisinin üzerine döküldü. Donup jel kıvamına geldikten sonra tarak çıkarıldı.

Kuyucuklar katot tarafına gelecek şekilde, jel dökme tepsisi elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı jelin bir miktar üstü seviyeye kadar 1xTBE tamponuyla dolduruldu.

3 µl 6x örnek yükleme tamponu ve 1 µl moleküler ağırlık markırı (ϕX174 DNA-HaeIII Digest) bir eppendorfta karıştırılıp ilk kuyucuğa yüklendi. Diğer kuyucuklara 3 µl PCR ürünü pipetlendi. Tankın kapağı kapatılıp, elektrotları güç kaynağına bağlandı. 80 voltta 1 saat yürütüldü. PCR ürünü DNA bantları Bio-Rad ChemiDoc Touch görüntüleme cihazında ultraviyole ışık altında görüntülendi.

Kesim enzimi analizi

Esası:

Bu yöntemde kesim enzimleri, özgül bir nükleotid dizisini tanır ve DNA'da çift zincirli bir kesik oluşturur [44].

Yapılışı:

En sık görülen yalancı eksiklik mutasyonu olan N-glikozilasyon bozukluğu mutasyonunun (N350S) analizi için 6. eksonun PCR ürününden 10 µl alınıp üzerine 10 ünite BsrI kesim enziminden 1 µl pipetlendi. Bu karışımların üzerine 2 µl 10x enzim tamponu, 2 µl sığır serum albümini (BSA, 1 mg/ml) ve son olarak da 5 µl distile su pipetlenerek son hacim 20 µl'ye tamamlandı. Thermocycler cihazında 37°C'de 16 saat inkübasyon sonrası, kesim enziminin inaktivasyonu için 65°C'de 15 dakika inkübe edildi ve 4°C'de saklandı.

NuSieve agaroz (%3) jel elektroforezi

Esası:

NuSieve agaroz, agarozla kıyasla daha küçük DNA moleküllerini elektroforezde ayırabilme özelliğine sahip bir agarozdur. 10-1000 baz çiftlik DNA fragmanlarının tespitinde kullanılır.

Yapılışı:

0,5xTBE tamponunda %3'lük jel hazırlandı. 2 µl 6x örnek yükleme tamponu, 1 µl düşük moleküler ağırlık markırı (ΦX174 DNA-HaeIII Digest) ve 12 µl distile su bir eppendorfta karıştırılıp ilk kuyucuğa yüklendi. Diğer kuyucuklara 20 µl kesim enzimi analizi ürünleri ve 2 µl 6x örnek yükleme tamponu pipetlendi.

3.4.3. DEAE-selüloz iyon değiştirici kromatografi ile ASA ve ASB izoenzimlerinin ayırımı ve aktivite tayini

Esası:

Kolon içine fizyolojik pH'da pozitif yük taşıyan, zayıf baz özelliğindeki bir selüloz türevi olan dietil amino etil (DEAE)-selüloz konulur. Bu bileşiğe negatif yük taşıyan (anyonik) proteinler bağlanırken diğer proteinler kolondan çıkarlar. Daha sonra kullanılan tamponların iyonik kuvveti değiştirilerek kolon materyaline geçici olarak bağlanmış olan bu proteinler kolonda tutundukları gruplardan ayrılarak elüe olurlar.

Yapılışı:

Lökosit homojenatının hazırlanması

Lökositler 250 µl %0,1 (v/v) Nonidet P40 deterjanı içeren 25 mM Tris/HCl pH: 7,5 tamponu ile homojen hale getirildi. Beş kez sıvı azotla dondurulup çözöldü. Her çözme işleminde vorteksle karıştırıldı. 14.000 rpm’de 3 dakika santrifüj sonrası elde edilen süpernatant ayrı bir eppendorfa alındı. Bisinkoninik asit (BCA) yöntemi ile protein miktarı tayin edildi.

DEAE-selölozun hazırlanması

2 gram DEAE-selöloz tartılıp, hacminin 5 katı kadar hacimde deiyonize su ile karıştırıldı. 4°C’de 45 dakika inkübe edildi.

Buchner hunisine filtre kağıdı yerleştirildikten sonra vakum pompasına bağlandı. DEAE-selöloz huniye aktarıldı ve vakumla suyu süzöldü. DEAE-selöloz cam baget ile sıyrılarak mezöre aktarıldı ve üzerine iki katı hacimde 10x kolon tamponu (250 mM Tris/HCl, pH: 7,5) eklenerek yeniden süspansiyon haline getirildi. Ardından yeni bir filtre kağıdı yerleştirilmiş huniye aktarılıp vakumla süzöldü. DEAE selöloz yeniden cam baget ile sıyrılarak mezöre aktarıldı ve üzerine 5 katı kadar hacimde 1x kolon tamponu (25 mM Tris/HCl, pH: 7,5) eklenip yeniden süspansiyon haline getirildikten sonra vakumla süzöldü. Daha sonra 7,5 ± 0,15 pH aralığına gelinceye kadar 1x kolon tamponuyla yıkandı. Her seferinde pH metreyle ölçüm yapıldı. İstenilen pH aralığına ulaşılınca 2 katı hacimde 1x kolon tamponu eklenip yeniden süspansiyon haline getirildikten sonra 4°C’de saklandı.

DEAE-selöloz kromatografisi

Tuz gradiyenti oluşturmak için 500 µl 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 ve 0,25 M NaCl içeren 1x kolon tamponu hazırlandı. Cam pastör pipetinin içine bir miktar cam yünü konularak, pipetin ince olan alt kısmı kapatıldı. Pastör pipetiyle hazırlanan bu kolon, bir kolon tutucuya dik olarak yerleştirildi.

1 ml 1x kolon tamponuyla yün yıkandı. Ardından 1 ml DEAE-selöloz (%50) pipetlendi. 2 ml 1x kolon tamponuyla yıkandı. İki kez 500 µl 1x kolon tamponu pipetlenirken kolondan akan damlalar ilk iki fraksiyon olarak iki eppendorfta toplandı. Üçüncü fraksiyon için önce 250 µl protein izolasyonu yapılmış örnek, ardından da 250

μl 1x kolon tamponu pipetlendi. 6 kez 500 μl 1x kolon tamponu uygulandı ve 4-9. fraksiyonlar elde edildi. Tuz gradiyenti için hazırlanan çözeltiler sırasıyla seyreltikten derişige doğru gidecek şekilde pipetlenirken 10-14. fraksiyonlar elde edildi. 4 kez 500 μl 1x kolon tamponu uygulandı ve 15-18. fraksiyonlar elde edildi.

İzoenzim tayini

Fraksiyonlarda arilsülfataz A ve B izoenzimlerinin tayini için substrat olarak 0,1 M asetat tamponu, pH: 5,4 içinde hazırlanmış 125 μM AgNO_3 içeren ve içermeyen 17 mM 4-metil umbeliferil sülfat (4-MUS) kullanıldı.

İnhibitörsüz tayin için kör tüpüne 50 μl 1x kolon tamponu ve 100 μl substrat pipetlendi. Örnek tüplerine ise 50 μl fraksiyon ve 100 μl substrat pipetlendi.

İnhibitörlü tayin için ise kör tüpüne 50 μl 1x kolon tamponu, 90 μl substrat ve 10 μl AgNO_3 pipetlendi. Örnek tüplerine 50 μl fraksiyon, 90 μl substrat ve 10 μl AgNO_3 pipetlendi.

Vorteksle karıştırılan tüpler su banyosunda 37°C’de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla tüm tüplere 2 ml 0,2 M, pH: 9,5 karbonat tamponu pipetlenip vorteksle karıştırıldı.

Florometrede (SpectraMax cihazında) 360 nm eksitasyon ve 460 nm emisyonunda ölçüm yapıldı. Standart olarak kinin sülfat, standart körü olarak da 0,05 M H_2SO_4 solüsyonları kullanıldı [45-48].

BCA yöntemiyle protein tayini

Esası:

Biüret reaksiyonunda, alkali bir solüsyonda proteinler Cu^{+2} ’yi Cu^{+1} ’e indirger. Bisinkoninik asit Cu^{+1} ile mor renkli bir kompleks oluşturur. Başlıca sistein, sistin, tirozin ve triptofan amino asitleri bakırın indirgenmesine neden olur. Peptit iskeleti de renk oluşumuna katkıda bulunur. Oluşan bu renk, protein konsantrasyonuyla orantılı olarak koyulaşan, 562 nm’de maksimum absorbands veren ve stabil kalan bir kromofordur [49].

Yapılışı:

BCA reaktifi hazırlamak için BCA kitinde bulunan A ve B reaktifleri 50/1 oranında karıştırıldı.

Stok BSA (sığır serum albümini, 500 µg/µl) kullanılarak uygun dilüsyonlarla 200, 100, 50, 25 ve 12,5 µg/µl standartları hazırlandı.

96 kuyucuklu Falcon Clear ELISA plakasında, kör kuyucuğuna 25 µl distile su, standart kuyucuklarına 25 µl standartlar ve örnek kuyucuklarına 25 µl fraksiyonlar pipetlendikten sonra tüm kuyucuklara 200 µl BCA reaktifi pipetlendi.

Etüvde 37°C'de 30 dakika inkübasyon sonrası, SpectraMax cihazında 562 nm'de absorbans ölçüldü.

3.4.4. İnce tabaka kromatografisi ile idrarda sülfatid analizi

Esası:

Bu yöntem bir katı-sıvı adsorpsiyon kromatografisidir. Bu yöntemde sabit faz, çözünmez ve polar yapıdadır. Hareketli faz ise polar/non-polar çözücülerin karışımından oluşur. Hareketli fazın sabit faz üzerinde ilerleyişi aşağıdan yukarıya doğrudur. Sabit faza afinitesi daha yüksek olan moleküllerin hareketi daha yavaş gerçekleşir. Polar lipidlerin polar yapıdaki silika jele afinitesi daha yüksektir. Nötral lipidler daha hızlı ilerler.

Yapılışı:

Lipit Ekstraksiyonu

Glasiyel asetik asit kullanılarak 20 ml idrar pH: 5'e ayarlandı. 4°C'de 16 saat inkübe edildi. Nüve NF800R santrifüj cihazında 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Dipte kalan çökelti 1 ml distile suyla yeniden süspansiyon haline getirildikten sonra kapaklı cam tüpe aktarıldı. Tüpe 5 ml kloroform/metanol (2:1, v/v) pipetlendikten sonra vorteksle 1 dakika karıştırıldı. 3.000 rpm'de 5 dakika edildikten sonra üst faz cam pastör pipetle alınıp atıldı. Alt faz azot gazıyla uçuruldu.

İnce tabaka kromatografisi

207 ml kloroform/metanol/su (144:56:7, v/v/v) hareketli faz çözeltisi kromatografi tankına aktarıldı. Silika jel plaka (20x20 cm, sabit faz) üzerinde, alttan ve üstten 3 cm, yanlardan 1,5 cm boşluk bırakıldı. Alt hizada aralara 1 cm mesafe bırakarak 1 cm uzunluğunda 9 adet çizgi çizildi. Üst hizaya çekilen çizgi ise “solvent front” (hareketli fazın ulaştığı son hat) çizgisi oldu.

1 µmol/ml C18-sülfatid standart solüsyonundan 20 µmol standart hazırlandı. Ekstrakte edilen örnekler 50 µl kloroform/metanol (2:1, v/v) çözeltisi ile yeniden süspansiyon haline getirildi.

İlk çizgi üzerine standart, diğer çizgilere örnekler pipetlendi. Kuruduktan sonra ikinci uygulamaya geçildi. Tüm standart ve örnek solüsyonları bitene kadar uygulamaya devam edildi. Kuruduktan sonra plaka kromatografi tankına yerleştirildi. Hareketli faz, “solvent front” çizgisine ulaşana kadar (1 saat) yürütüldü. Sonrasında plaka çeker ocakta kurumaya bırakıldı. Orsinol çözeltisi plakanın her tarafına homojen şekilde püskürtüldükten sonra kuruması beklendi. Etüvde 110°C’de 5 dakika inkübe edildi. Bio-Rad ChemiDoc Touch görüntüleme cihazında görüntüleme yapıldı [50].

3.4.5. Western blot yöntemi ile arilsülfataz A ve sapozin B proteinlerinin analizi

Esası:

Bu yöntemde proteinler sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrılır. Daha sonra elektroforezde ayrılan proteinler jelden nitroselüloz membrana aktarılır. Membrana aktarılan proteinler içinde hedef protein kendisine özgü primer antikörle bağlanarak ayırt edilir. Primer antikora özgü sekonder antikör üzerindeki enzim sayesinde ortama eklenen substrat renkli bir ürüne dönüşür ve verdiği kemilüminesans ışımaya kamera tarafından algılanır ve hedef protein saptanır.

Yapılışı:

Protein izolasyonu

100 µl Arturo’nun protein lizis tamponu (EK.1), lökosit pelletinin üzerine pipetlenip yeniden süspansiyon haline getirildi. 4°C’de 30 dakika ve 37°C’de 5 dakika inkübe edildi. Sıvı azotla 3 kez dondurulup, 37°C’de 5 dakika inkübe edilerek çözüldü.

Mikrofüj cihazında 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni bir eppendorfa alındı. BCA yöntemiyle protein tayini yapıldı.

Dot Blot

Primer ve sekonder antikor dilüsyonlarını belirlemek amacıyla yapıldı.

60 µg protein içeren lökosit homojenatı nitroselüloz membrana uygulandı. Kuruması için beklendi. Membranın üstünü kaplayacak kadar %5 bloklama solüsyonu içinde oda sıcaklığında çalkalayıcı ile 1 saat karıştırıldı. Membran yıkama tamponu ile 2 kez yıkandı. Primer antikor (tavşan anti-insan ASA antikor), TBS-T ile 1/10000 oranında seyreltilip membranın üzerine uygulandıktan sonra oda sıcaklığında çalkalayıcı ile 1 saat karıştırıldı. Yıkama tamponuyla 2 kez hızlıca yıkandıktan sonra 1x15 ve 3x5 dakika yıkama tamponuyla tekrar yıkandı. Sekonder antikor (peroksidaz işaretli anti-tavşan antikor), TBS-T ile 1/2500 oranında seyreltilip membranın üzerine uygulandıktan sonra oda sıcaklığında çalkalayıcı ile 1 saat karıştırıldı. 1x15 ve 3x5 dakika yıkama tamponuyla yıkandı. ECL kitinin her iki solüsyonu 1/1 oranında karıştırıldıktan sonra membranın üzerine, her tarafını kaplayacak şekilde uygulandı [51]. Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme cihazında görüntü alındı.

SDS-PAGE

Protein konsantrasyonu optimizasyonu için 5 eppendorf tüpüne 5 µl 4x Laemmli örnek yükleme tamponu pipetlendi. Tüplere sırasıyla 6,25-12,5-20-25 ve 30 µg protein bulunacak şekilde kontrol lökosit homojenatı pipetlendi. (Daha sonraki deneylerde ise hasta örnekleri 50 µg uygulandı.) Son hacimler distile suyla 20 µl’ye tamamlandı. Thermocycler cihazında 95°C’de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edildi.

Bio-Rad marka elektroforez tankı ve boyanma gerektirmeyen hazır jel (Bio-Rad Mini-Protean TGX Stain-Free Gels, 4-20%) kullanıldı. Hazır jel kasedi tanka yerleştirildikten sonra tarak çıkarıldı. Tank yürütme tamponuyla dolduruldu. Kuyucuklar yürütme tamponuyla yıkandı. Tankın kapağı kapatılıp, 80 V’ta 15 dakika boyunca elektroforez boşken çalıştırılıp durduruldu. 5 µl moleküler ağırlık markırı ve hazırlanan örnekler kuyucuklara pipetlendi. 80 V, 25 mA ve 2 W’ta boya jelin sonuna ulaşana kadar (2 saat) yürütüldü.

Jel çıkarılıp üstten ve alttan kesilerek düzeltildikten sonra Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme cihazında görüntü alındı.

Jelden membrana transfer aşaması

6x8,5 cm² boyutlarında 4 adet filtre kağıdı ve 1 adet nitroselüloz membran kesilerek 1x transfer tamponunda 5 dakika inkübe edildi. Filtre kağıtları ve membranın içinde bulunduğu tampon süzöldükten sonra, TransBlot cihazının (Bio-Rad) kasedine en alta iki filtre kağıdı, üzerine membran, üzerine jel ve en üste de iki filtre kağıdı yerleştirildi. Bir cam test tüpü, filtre kağıdı üzerinde kesintisiz şekilde sürülerek hava kabarcıkları çıkartıldı. Ardından transfer kutusunun kapağı kilitlenerek cihaza yerleştirildi. Uygun programda 30 dakikada transfer işlemi gerçekleştirildi. Jelden proteinlerin nitroselüloz membrana transferi işlemi için başlangıç deneylerinin dışındaki diğer tüm deneylerde “Bio-Rad Trans-Blot Turbo Nitrocellulose Starter Kit, Transfer Pack” kullanıldı. Bu hazır membran paketleri ile yapılan transfer 7 dakikada gerçekleştirildi.

Transfer işlemi sonrası Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme cihazında jel ve membranın görüntüsü alındı.

Antikorların Uygulanması

Membran, %5 bloklama solüsyonuyla oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat karıştırıldıktan sonra yıkama tamponu ile 2 kez yıkandı. Primer antikor (tavşan anti-insan ASA antikor), %2 bloklama solüsyonu ile 1/10000 oranında seyreltilip membranın üzerine uygulandıktan sonra soğuk odada çalkalayıcıda gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Yıkama tamponuyla 2 kez hızlı yıkamanın ardından yıkama tamponu ile tekrar 1x15 ve 3x5 dakika yıkandı. Sekonder antikor (peroksidaz işaretli anti-tavşan antikor), TBS-T ile 1/10000 oranında seyreltilip membranın üzerine uygulandı ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. Yıkama tamponuyla 1x15 ve 3x5 dakika yıkandı. Bir pens yardımı ile sıvı içinden alınarak üzerindeki sıvı süzdürüldü. Şeffaf bir hibridizasyon torbasının yaprakları arasına membran alındı. ECL kitinin her iki solüsyonundan 1/1 oranında karıştırıldı ve membranın üzerine, her tarafını kaplayacak şekilde pipetlendi. ECL karışımı pipetlendikten sonra torbanın yaprakları arasındaki membranın üzerindeki ECL hafifçe yayıldı. 5 dakika karanlıkta

oda sıcaklığında inkübe edildi. Membran torbanın yaprakları arasından bir pens yardımı ile çıkartıldı. Üzerindeki fazla ECL süzdürüldü. Yeni bir şeffaf naylon torbanın yaprakları arasına yerleştirilip hava kabarcıklarından uzaklaşmak amacı ile üzeri parmaklarla sıvazlandı. Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme cihazında ilk saniye ve sonrasında her 3 saniyede bir olacak şekilde 5 dakika görüntü alındı.

“Stripping – Reprobing”

Membran, stripping tamponu (*EK-1*) ile 50°C’de 45 dakika inkübe edildikten sonra distile suyla çalkalayıcıda 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve yeni bir petri kabında yıkama tamponuyla 5x5 dakika yıkandı. %5 bloklama solüsyonuyla çalkalayıcıda 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. %2 bloklama solüsyonu içinde 1/500 oranında seyreltilen primer antikorla (keçi anti-insan sap-B antikor), çalkalayıcıda gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Yıkama solüsyonuyla 3x5 dakika yıkandı. TBS-T içinde 1/5.000 oranında seyreltilen sekonder antikorla (peroksidaz işaretli anti-keçi antikor), çalkalayıcıda 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Yıkama solüsyonuyla 3x5 dakika yıkandı.

ECL kitinin her iki solüsyonundan 1/1 oranında karıştırıldıktan sonra membranın üzerine, her tarafını kaplayacak şekilde pipetlendi. Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme cihazında görüntü alındı.

3.4.6. ASA ve sapozin B geninde mutasyon analizi

RNA izolasyonu

Esası:

Bu yöntemde ilk olarak eritrositler lizise uğratılır ve homojenizasyon yapılır. Ardından lizata etanol eklenerek RNA’nın silika membrana bağlanabilmesi için uygun ortam oluşturulur. Yıkama solüsyonlarıyla kontaminasyon azaltılır. DNaz ile muamele edilerek kalan DNA’lar yıkılır. Son olarak elüsyon yapılarak RNA elde edilir.

Yapılışı:

Tam kan örneklerinden RNA izolasyonu yapıldı. İki farklı RNA izolasyon kiti kullanıldı. Taze kanları çalışmak için QiaGen RNeasy Mini Kit kullanılırken, donmuş kan örneklerinde Zymo Research Direct-zol RNA MiniPrep Plus kiti tercih edildi.

QiaGen RNeasy Mini Kit ile RNA izolasyonu:

400 µl tam kan örneği ile 2 ml EL (eritrosit lizis) tamponu karıştırıldı. Buzda 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon esnasında iki kez anlık vortekslenerek karıştırıldı. İnkübasyon sonrasında Nüve NF800R santrifüj cihazında 1.500 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı. Pelletin üzerine 800 µl EL tamponu pipetlenip anlık vorteksle yeniden süspansiyon haline getirildi. 1.500 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı.

350 µl RLT tamponu pipetlendi. Hücre kümelerini yok etmek için karışım pipetle çekilip-bırakılarak yeniden süspansiyon haline getirildi. Oluşan lizat, 2 ml koleksiyon tüpü içinde bulunan QIAshredder spin kolonuna aktarıldı. Mikrofüj cihazında 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra kolon çıkarıldı.

Koleksiyon tüpüne çöken lizata 350 µl absölu etanol eklenip karışım pipetle çekilip-bırakılarak yeniden süspansiyon haline getirildi. Karışım, 2 ml koleksiyon tüpü içinde bulunan QIAmp spin kolonuna aktarıldı. 14.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü çıkarıldı ve kolon yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi. 350 µl RW1 (yıkama) tamponu pipetlendi. 14.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü çıkarıldı ve kolon yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi.

10 µl DNaz1 stok solüsyonu ile 70 µl RDD (sindirim) tamponu bir eppendorf içine pipetlenip alt üst edilerek karıştırıldı ve DNaz1 inkübasyon miksi elde edildi. 14.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildikten sonra 80 µl DNaz1 inkübasyon miksi, kolona pipetlendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

350 µl RW1 (yıkama) tamponu pipetlendi. 14.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü çıkarıldı ve kolon yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi. 500 µl RPE tamponu pipetlendi. 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü çıkarıldı ve kolon yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi. 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

Kolon, bir eppendorfun içine yerleştirildi. Kolona 30 µl Rnaz içermeyen steril su pipetlendi. 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen izolattan 1 µl kullanılarak, nanodrop spektrofotometrede ng/µl cinsinden RNA konsantrasyonu ölçüldü.

Direct-zol RNA MiniPrep Plus kiti ile RNA izolasyonu:

200 µl tam kan örneği ile 600 µl trizol karıştırıldı. Alt üst edilip 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Mikrofüj cihazında 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant iki ayrı eppendorfa aktarıldı. Üzerlerine hacimleri miktarınca absolü etanol eklendi. İki eppendorf da sırayla alt üst edilerek 2 ml koleksiyon tüpü içerisindeki kolona pipetlendikten sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü çıkarıldı ve kolon yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi. 400 µl RNA yıkama tamponu pipetlenip 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü çıkarıldı ve kolon yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi.

RNaz içermeyen bir eppendorfta 5 µl DNaz1 ile 75 µl DNA sindirim tamponu karıştırıldı. Bu karışım kolon matriksine pipetlendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

400 µl RNA ön-yıkama tamponu pipetlenip 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu basamak 2 kez tekrarlandı. Koleksiyon tüpü çıkarıldı ve kolon yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi. 700 µl RNA yıkama tamponu eklendi. 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon eppendorf içine yerleştirildi. Kolon matriksine 50 µl DNaz/RNaz içermeyen steril su pipetlendi. 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen izolattan 1 µl kullanılarak, nanodrop spektrofotometrede ng/µl cinsinden RNA konsantrasyonu ölçüldü.

cDNA sentezi

Esası:

Bu yöntemde tek zincirli olan RNA'dan ters transkripsiyon ile cDNA elde edilir. İlk olarak RNA 70°C'de denatüre edilir. Hemen sonrasında buz üstüne konularak primerlerin hibridizasyonuna olanak sağlanır. Ters transkripsiyon için gerekli komponentler eklendikten sonra 42°C'de 1 saat inkübasyon esnasında ters transkripsiyon reaksiyonu zincir boyunca devam eder. Elde edilen cDNA, ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonunda (RT-PCR) kullanılır.

Yapılışı:

Advantage RT-PCR kiti kullanıldı. Tüm deney buz üstünde gerçekleştirildi. Kit içerisinde bulunan tüm tüpler mikrofüj cihazında 15 saniye santrifüj edildi.

Mikrosantrifüj tüpüne 12,5 µl RNA izolatu pipetlendi. Üzerine 1 µl oligo(dT)₁₈ primeri pipetlendi. Isıtıcıda 70°C’de 2 dakika ısıtılıp buz üstünde hızlıca soğutuldu. Üzerine 4 µl 5x reaksiyon tamponu, 1 µl dNTP kompleksi (10 mM), 0,5 µl rekombinan RNaz inhibitörü ve 1 µl MMLV-ters transkriptaz pipetlendikten sonra karışım pipetle çekilip-bırakılarak yeniden süspansiyon haline getirildi.

Thermocycler cihazında 42°C’de 1 saat ve 94°C’de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 14.000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi. Üzerine 80 µl DEPC’li steril su pipetlendi. 5 saniye vortekslendi. 14.000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi.

cDNA PCR

Advantage RT-PCR kiti kullanıldı. Tüm deney buz üstünde gerçekleştirildi.

Mikrosantrifüj tüpüne 10 µl cDNA (1:50), 1 µl dNTP kompleksi (10 mM), 2 µl premiks G3PDH primerleri, 5 µl 10x PCR tamponu, 1 µl Taq DNA polimeraz ve 31 µl steril su pipetlenerek karıştırıldı. Son hacim 50 µl oldu.

Thermocycler cihazında 30 siklüs boyunca 94°C’de 45 saniye, 60°C’de 45 saniye ve 72°C’de 2 dakika inkübasyon tekrarlandı. Sonrasında 72°C’de 7 dakika inkübe edildi ve inkübasyon bitiminde 4°C’de saklandı.

Daha sonra etidyum bromür içeren %2’lik agaroz jel elektroforezinde örnekler 1 saat 80 V’ta yürütüldü ve sonrasında Bio-Rad ChemiDoc Touch görüntüleme cihazında bantlar görüntülendi.

DNA dizi analizi

QiaGen DNA izolasyon kiti ve kit protokolü uygulanarak 200 µl EDTA’lı tam kandan DNA izolasyonu yapıldı. Nanodrop spektrofotmetre ile konsantrasyonları ölçüldü. DNA dizi analizi için izole edilmiş DNA örnekleri Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’na gönderildi. *ARSA* geni ve *SUMF1* genini kodlayan tüm eksonların ve *PSAP* geninin Sap-B’yi kodlayan 6, 7 ve 8. eksonlarının amplifikasyonu gerçekleştirildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ARSA geninin 8, *SUMF1* geninin 9 ve *sapozin B* geninin 3 eksonunu çoğaltmak için kullanılan primer dizileri ve bu eksonların PCR ile amplifikasyonu için

kullanılan erime sıcaklıkları (T_m) *Tablo 3.1.*'de gösterilmektedir. Primerler ana stok 100 μ M, çalışmalarda kullanılacak ara stok 10 μ M olacak şekilde seyreltildi. Hem ana stok hem ara stok primerler -20 °C'de saklandı. Tüm PCR reaksiyonları 10 μ l *Promega* 2x miks, 6 μ l dH₂O, 2 μ l DNA, 1 μ l “*forward primer*” ve 1 μ l “*reverse primer*” kullanılarak yapıldı.

Applied Biosystems Veriti 96 Well Fast Thermal Cycler cihazında sadece bağlanma sıcaklıkları farklı olmak üzere PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. En iyi sonuç alınan PCR reaksiyon koşulları *Tablo 3.2.*'de gösterilmiştir.



Tablo 3. 1. ARSA, SUMF1 ve PSAP genlerine ait primer dizileri ve erime sıcaklıkları (T_m)

“Forward Primer”	“Reverse Primer”	T_m
ARSA1F: 5'- CTG CTG GAG CCA AGT AGC CC-3'	ARSA1R: 5'-TGC AAT CCA TTG GGA GGA AA-3'	58°C
ARSA2F: 5'- GAC TCT GTG ACT TGT CCC GC-3'	ARSA2R: 5'- GCT GAG GGC CCG GGT GGT TC-3'	58°C
ARSA3F: 5'- ACC TGC CAG CCC AGC CCT CA-3'	ARSA3R: 5'- TTG GGC CAA GAT CAC TTA C-3'	65°C
ARSA4F: 5'- CTA ACT CCA GTC TTT GCC CC-3'	ARSA4R: 5'- GCC GGA GCA CCC AGC TG-3'	58°C
ARSA5F: 5'- GCT CAT GAG CGC CTC CTG TG-3'	ARSA5R: 5'- GGG TTC CAA GGA GAG GGC CTG CGG ACT GA-3'	58°C
ARSA6F: 5'- CTT GAT GGC GAA CTG AGT GAC-3'	ARSA6R: 5'- AAG GAT CTG GGA TCA GGG GT-3'	58°C
ARSA7F: 5'- CAC GTC CAG GGC CTC CCA CC-3'	ARSA7R: 5'- GGG GTC AGC AGG TTC GGG GG-3'	65°C
ARSA8AF: 5'- TTG CCC TGT GCA CAG AAT TG-3'	ARSA8AR: 5'- CTG TTT CAG GGC TTG CAG CAC-3'	59°C
ARSA8BF: 5'- GAA ACA GCT TCA GCT GCT CA-3'	ARSA8BR: 5'- GCC ATC ACA TGC CCA GGC CA-3'	59°C
ARSAPD1F: 5'- TTG ATG GCG AAC TGA GTG AC-3'	ARSAPD1R: 5'- CAG TGC AGG AGG CAC TGA GG-3'	58°C
ARSAPD2F: 5'- GGT TTG TGC CTG ATA ACT TA-3	ARSAPD2R: 5'- TTC CTC ATT CGT ACC ACA GG-3'	59°C
SUMF1-1F: 5'- GCTCAAAATCTGCCCTTT-3'	SUMF1-1R: 5'- CTACTCCAACCCGTCAG-3'	60°C
SUMF1-2F: 5'- CAGGTACACCTTGGCTGTGA-3'	SUMF1-2R: 5'- TCTGCCACAGAATGCAGTAAA-3'	60°C
SUMF1-3F: 5'- AGAGAAAAGGGCACACATGC-3'	SUMF1-3R: 5'- CACCCAAACCCCTTTTCAATG-3'	60°C
SUMF1-4F: 5'- CATTGAGATTTTTCATGT-3'	SUMF1-4R: 5'- TTGTCAACTGGGGAAAGAGG-3'	60°C
SUMF1-5F: 5'- CCAGCTCCTGCTTCTTGTTC-3'	SUMF1-5R: 5'- GACCAACATATTGTCAGGCAAA-3'	60°C
SUMF1-6F: 5'- CAAAACCTGTGCTGTTTGA-3'	SUMF1-6R: 5'- GAAGGGAACACCCGTGTGAGT-3'	60°C
SUMF1-7F: 5'- TCITGCTGCATTCTGGCACT-3'	SUMF1-7R: 5'- AGAGGACAGATGCCACCAATT-3'	60°C
SUMF1-8F: 5'- AGCTGGTTGGATCAAAAGTCG-3'	SUMF1-8R: 5'- TGGGGTTAGGTAGGCATTGTG-3'	60°C
SUMF1-9F: 5'- GTTGTGGGAAGCACTGTCT-3'	SUMF1-9R: 5'- ATGCACCACACCATATAAAGCA-3'	60°C
PSAP6F: 5'- TGAGGGCTTAAGTGATGCTGCC-3'	PSAP6R: 5'- TTCCCAGAAAACAGTCTCTAG-3'	58°C
PSAP7F: 5'- CTTGCTTGATAGTCACCAAGTT-3'	PSAP7R: 5'- CTGGGATCAAGATGCTTTCAG-3'	60°C
PSAP8F: 5'- GCACTGCTTCAGACACGA-3'	PSAP8R: 5'- AGGCACTGCAAAAGTCACC-3'	60°C

Tablo 3. 2. PCR koşulları

Sıcaklık	Süre
95°C	1dk
95°C	45sn
58-65°C	35sn
72°C	45sn
72°C	5 dk
4°C	∞

PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

PCR ürünleri %2 agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Elektroforezde uygun uzunlukta ve tek bant elde edilen PCR ürünleri *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* ile pürifiye edildi. Pürifikasyon üç basamakta gerçekleştirildi. İlk basamak olan bağlanma basamağında; PCR ürününün üzerine 40 µl *NTI* tamponu karıştırılarak mini kolonların üzerine eklendi ve sonrasında 1 dakika boyunca 11,000 g’de santrifüj edildi. Yıkama için; santrifüj sonrasında mini kolonların üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek 11.000 g’de 1 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Sonrasında mini kolonların toplama tüpünde biriken yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı ve herhangi bir solüsyon eklenmeden yıkama solüsyonun içerisindeki alkolün uzaklaşması amacıyla 11.000 g’de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Son basamak olan elüsyon için önce mini kolonların içindeki PCR ürünlerinin bağlı olduğu membran yeni bir 1.5 ml’lik ependorf tüpe aktarıldı. Membran üzerine 20 µl NE tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi. Sonrasında 11.000 g’de 1 dakika süresince santrifüj işlemi gerçekleştirilerek ependorf tüpün içerisinde saflaştırılmış PCR ürünleri elde edildi.

Dizi Analizi

Pürifiye edilmiş PCR ürünleri uygun primerler ve *Big Dye Terminator 3.0* kiti kullanılarak DNA dizileme reaksiyonu gerçekleştirildi. Dizileme için 4 µl dH₂O, 2 µl *Big Dye* tamponu, 2 µl *Big Dye* enzimi, 1 µl primer ve 1 µl pürifiye PCR ürünü kullanılarak gerçekleştirildi. *Sanger* dizileme *Thermal Cycler* cihazında 96°C’de 1 dk,

sonra 25 siklus boyunca 96°C’de 10 sn, 50°C’de 0.05 sn ve 60°C’de 4 dk süresince gerçekleştirildi.

DNA Dizileme Ürünlerinin Pürifikasyonu

DNA dizileme reaksiyonu sonrası örnekler *Zymo Research ZR DNA sequencing clean up* sekans pürifikasyon kiti kullanılarak saflaştırıldı. Bunun için 20 µl sekans reaksiyonu ürünü ile 240 µl sekans bağlama solüsyonu karıştırıldı ve pürifikasyon kolonlarının üzerine eklendi. 14.000 g’de 30 sn santrifüj ile PCR ürünlerinin kolonlara tutunması sağlandı. Ardından, 300µl membran yıkama solüsyonu eklenerek 14.000 g’de 30 sn santrifüj ile kolona bağlı olan sekans reaksiyonu ürünleri yıkandı. 20 µl steril su eklenerek 14.000 gde 30 sn santrifüj sonrası pürifiye sekans reaksiyonu ürünleri elde edildi. Pürifiye edilmiş sekans ürünlerinin kapiller elektroforezi *ABI Prism 3500 Genetic Analyzer* cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

Kapiller elektroforez sonrası sonuçlar öncelikle *Seqscape* programı ile değerlendirildi. Sonrasında *Codon Code Aligner* programı ile saptanan değişiklikler *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/>), *MutationTaster* ([www. Mutationtaster.org](http://www.Mutationtaster.org)) ve *EXAC* (exac.broadinstitute.org), veritabanları kullanılarak değerlendirildi. Bu çalışmada, ARSA ve SUMF1 genleri için sırasıyla ENST00000547307.1 ve ENST00000272902.5 numaraları ile ensembl veritabanında kayıtlı diziler referans alındı.

3.4.7. Plazma anti-MOG IgG ve anti-sülfatid IgM ve anti-sülfatid IgG analizleri

Hasta ve kontrol gruplarından izole edilen plazma örneklerinde hücreye dayalı yöntem (cell-based assay) ile anti-MOG tayin edildi. ELISA yöntemi ile de anti-sülfatid antikorları tayin edildi.

Hücreye dayalı yöntem (cell-based assay) ile anti-MOG IgG tayini

Esası:

Bu yöntemde bir plazmide, miyelin oligodendrosit glikoproteinini (MOG) kodlayan DNA dizisi yerleştirilir. Bu plazmid daha sonra EU-90 hücrelerine transfekte edilir. Bu hücreler klasik indirek immünfloresan yöntemi ile antikor tespiti için substrat görevi görür. Örneklerdeki özgül antikorlar, substratta karşılık gelen antijenlere bağlanır. Sonrasında bağlı antikorlar floresan işaretli sekonder antikorlarla tespit edilir. İmmünfloresan mikroskopla floresan ışığa gözlenir.

Yapılışı:

Euroimmun anti-MOG IgG kiti kullanıldı. Eppendorf tüpüne 10 µl plazma örneği ile 90 µl örnek tamponu pipetlendi (1/10 dilüsyon) ve vorteksle 15 saniye karıştırıldı. Bunun 30 µl'si slaytlardaki örnek uygulama yerlerine pipetlendi. İlk 2 sıraya ise negatif ve pozitif kontroller pipetlendi. Üzerleri slaytlarla kapatılıp, karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Slaytlar yıkama tamponuyla bir kez hızlı yıkamanın ardından yıkama tamponuyla doldurulmuş iki ayrı kapta 2x5 dakika inkübe edildi.

Yeni bir reaktif tepsisinin her alanına 25 µl FITC işaretli keçi anti-insan IgG konjugatı pipetlendi. Slaytlar kaptan çıkarılıp arka yüzeyleri silindikten sonra konjugatların üzerine kapatıldı. Karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Slaytlar yıkama tamponuyla bir kez hızlı yıkamanın ardından yıkama tamponuyla doldurulmuş iki ayrı kapta 2x5 dakika inkübe edildi.

Yeni bir reaktif tepsisinin üzerine 5 adet lamel yerleştirildi. Her bir alana birer damla (~ 10 µl) PBS tamponlu (pH: 8,4) gliserol damlatıldı. Slaytlar kaptan çıkarılıp arka yüzeyleri silindikten sonra lamellerin üzerine yerleştirildi.

Slaytlar immünfloresan mikroskopunda görüntülendi.

Sandviç ELISA yöntemi ile anti-sülfatid IgM antikorunun analizi

Esası:

Bu yöntemde çift antikorlu sandviç tekniği kullanılır. Bu teknik, test edilen antijenin ikiden fazla değerliği bulunduğu için kaplanmış antijeni ve saptanan antijeni aynı anda tanıyabilmesi esasına dayanır. Önceden kaplanmış olan antijen insan anti-

sülfatid IgM antijenidir. Örnekler ve antijen ELISA plakasının kuyucuklarına pipetlenir ve PBS ile yıkanır. Sonra avidin-peroksidaz konjugatları pipetlenir ve PBS ile yıkanır. Renklendirme için TMB substratı kullanılır. TMB, peroksidazın katalitik aktivitesi ile mavi renge döner. Sonrasında asit etkisiyle sarıya döner. Renk derinliği, test ettiğimiz antikör miktarı ile orantılıdır.

Yapılışı:

25x yıkama tamponu 1x olacak şekilde seyreltildi. Sıcak su banyosunda 37°C’de 10 dakika inkübe edilerek çözüldü.

20 ng/ml standart elde etmek için insan anti-sülfatid IgM liyofilize standart örneğinin üzerine 1 ml standart dilüenti pipetlendi; oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon esnasında çözüldü. Bu standarttan seri dilüsyonlarla 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 ve 0,3125 ng/ml derişimli standartlar hazırlandı.

100 µl kör, standartlar ve plazma örnekleri ELISA plakasının kuyucuklarına pipetlendi. Etüvde 37°C’de 90 dakika inkübe edildi. Bu sırada insan anti-sülfatid IgM antikoru 1/100 oranında seyreltildi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Kuyucuklara 350 µl yıkama tamponu pipetlendi; 30 saniye plaka karıştırıcıda karıştırıldı. Plaka ters çevrilerek boşaltıldı ve kurutuldu. Bu yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı. Tüm kuyucuklara 100 µl 1/100 oranında seyreltilmiş insan anti-sülfatid IgM antikoru pipetlendi. Etüvde 37°C’de 60 dakika inkübe edildi. Enzim konjugatı 1/100 oranında seyreltildi; oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Kuyucuklara 350 µl yıkama tamponu pipetlendi; 30 saniye plaka karıştırıcıda karıştırıldı. Plaka ters çevrilerek boşaltıldı ve kurutuldu. Bu yıkama basamağı 3 kez tekrarlandı. Kör dışındaki tüm kuyucuklara 100 µl enzim konjugatı pipetlendi. Etüvde 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. A ve B renk reaktifleri 9/1 oranında karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Kuyucuklara 350 µl yıkama tamponu pipetlendi; 30 saniye plaka karıştırıcıda karıştırıldı. Plaka ters çevrilerek boşaltıldı ve kurutuldu. Bu yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı.

Tüm kuyucuklara 100 µl renk reaktifi karışımı pipetlendi. Etüvde 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. Tüm kuyucuklara 100 µl C renk reaktifi pipetlendi. Plaka karıştırıcıda 30 saniye karıştırıldı.

10 dakika içinde Spectramax cihazında 450 nm’de optik dansite (OD) değerleri ölçüldü.

Sandviç ELISA yöntemi ile anti-sülfatid IgG antikorunun analizi

Yapılışı:

20x yıkama solüsyonu 20 kat seyreltildi. ELISA plakası kuyucuklarına sırasıyla 0,25-0,5-1-2-4 ve 8 ng/ml konsantrasyonlarındaki standartlardan ve plazma örneklerinden 50 µl pipetlendi. Kör kuyucuğu boş bırakıldı. Kör kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara 100 µl HRP-konjugatı pipetlendi. 37°C’de 60 dakika inkübe edildi.

Kuyucuklara 350 µl yıkama tamponu pipetlendi; 30 saniye plaka karıştırıcıda karıştırıldı. Plaka ters çevrilerek boşaltıldı ve kurutuldu. Yıkama işlemi 4 kez tekrarlandı.

Tüm kuyucuklara 50 µl kromojen A ve 50 µl kromojen B pipetlendi. 1 dakika ELISA karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra, 37°C’de 15 dakika inkübe edildi. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu pipetlendi. 5 dakika içinde SpectraMax cihazında 450 nm’de OD değerleri ölçüldü.

3.4.8. İstatistiksel analiz

Tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama ve standart sapma ya da ortanca ile en küçük - en büyük değerler kullanıldı. Kutu çizgi grafikleri ile gruplar arasında anti-sülfatid IgG ve IgM değerlerinin dağılımı gösterildi. Gruplar arasında anti-sülfatid IgG ve IgM değerlerinin farklı olup olmadığı varyans analizi ve Kruskal Wallis yöntemi ile araştırıldı. Varyans analizi ile gruplar arası farklılık bulunması durumunda çoklu karşılaştırma yöntemlerinden en küçük önemli farklılık yöntemi kullanılarak, Kruskal Wallis testi ile farklılık bulunması durumunda da ikişerli karşılaştırma yöntemi kullanılarak farklı olan gruplar saptandı. Karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi olarak 0.05 değeri alındı.

4. BULGULAR

MLD şüphesiyle gelen hastalar 1'den 29'a kadar numaralandırıldı. Bu hastaların aile bireyleri de hasta numaralarının yanına 'A: Anne, B: Baba, K: Kardeş, Ç: Çocuk, E: Eş, M: Amca, H: Hala' harfleri ile ifade edildi.

4.1. Lizozomal Enzim Analizi Sonuçları

MLD şüphesiyle gelen 29 hastanın ve 34 aile bireyinin plazma ve lökositlerde çalışılan lizozomal enzim aktivitelerine ait sonuçları *Tablo 4. 1.*'de gösterilmektedir. Parantez içindeki değerler normal aralıkları ifade etmektedir. Referans aralıklarının altında kalan değerler koyu yazılmıştır.

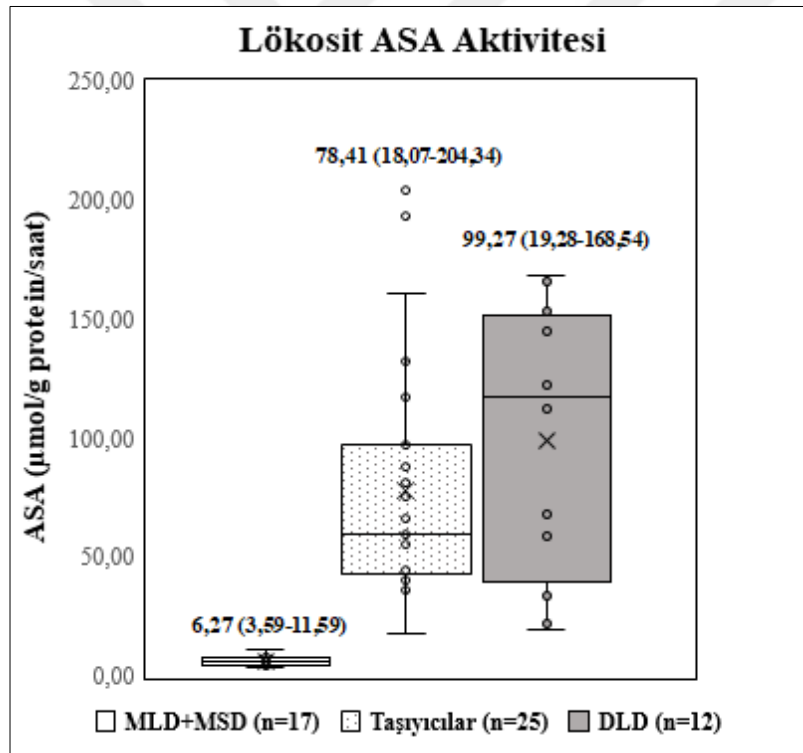
Tablo 4. 1. Plazma (µmol/L/sa) ve lökosit (µmol/g protein/sa) örneklerinde lizozomal enzim aktiviteleri

Bireyler	Plazma Çitotriozidaz (4-120)	Plazma β-mannozidaz (150-1.500)	Plazma Total β-hexozaminidaz (600-3500)	Plazma β-hexozaminidaz A (50-200)	Aritisülfataz A (50-250)	α-mannozidaz (100-800)	α-galaktozidaz (10-50)	α-fukozidaz (50-200)	Galaktosebrosidaz (0,4-4,0)	β-glukuronidaz (100-800)	β-glukozidaz (1-5)	β-galaktozidaz (100-400)
1	36,80	406,00	1520,00	128,25	5,91	258,16	32,32	98,50	1,68	145,94	1,92	163,72
2	79,20	288,00	1001,20	90,40	6,18	434,15	39,51	116,36	1,68	555,88	3,38	262,61
3	103,20	242,80	1001,40	72,85	4,47	225,98	29,33	100,00	1,68	85,77	1,70	163,71
4	17,00	292,00	671,20	56,60	7,30	292,47	32,36	113,14	1,99	326,97	2,69	209,86
4A	15,80	224,00	743,20	67,60	56,01	302,43	38,50	99,00	2,05	494,95	3,03	241,93
4B	26,40	206,00	683,20	56,60	97,87	426,20	49,63	124,73	1,51	646,16	3,92	242,69
5	39,40	364,00	974,00	92,35	5,05	459,35	56,93	123,62	5,04	532,32	3,37	239,67
5A	15,80	252,00	818,00	69,85	116,98	596,76	64,98	159,48	4,95	681,61	4,40	344,33
5B	13,80	234,00	974,00	79,85	47,32	328,30	41,13	132,21	4,09	481,53	2,96	177,07
6	257,80	523,60	2061,20	143,75	6,15	613,92	45,60	149,60	1,59	571,01	3,84	146,48
6A	5,40	243,60	1060,00	97,20	193,14	541,49	69,26	138,00	2,30	891,31	4,69	220,57
6B	35,00	407,60	1877,60	151,00	161,07	717,03	52,80	167,41	2,66	651,27	4,30	291,69
7	21,20	361,60	1541,20	118,25	8,35	262,70	32,63	115,99	2,27	268,73	3,43	278,46
8	8,60	409,60	1381,20	103,25	4,33	146,55	19,33	93,46	1,68	188,95	2,42	193,74
9	38,20	423,20	939,20	81,75	3,59	371,97	36,33	110,57		582,96	1,78	183,72
9A	28,60	292,00	920,40	87,80	41,39	412,15	35,93	96,83	2,84	506,21	3,17	177,28
9B	62,80	262,00	760,40	74,30	46,38	282,60	37,40		2,78	534,70		
9K	11,80	264,00	820,00	73,00	57,17	338,70	36,00	70,30		669,90	3,13	237,58
10	20,00	330,40	940,00	71,00	4,91	299,95				312,24		124,56
10A	10,40	198,00	700,80	62,50	56,97	299,80	36,50	104,00		510,70	2,40	
10B	28,40	180,00	740,80	67,00	18,07		41,30		3,80	531,10		

Bireyler	Plazma Çitotriozidaz (4-120)	Plazma β-mannozidaz (150-1.500)	Plazma Total β-heksozaminidaz (600-3500)	Plazma β-heksozaminidaz A (50-200)	Aritsülfataz A (50-250)	α-mannozidaz (100-800)	α-galaktozidaz (10-50)	α-fukozidaz (50-200)	Galaktoserebrozidaz (0,4-4,0)	β-glukuronidaz (100-800)	β-glukozidaz (1-5)	β-galaktozidaz (100-400)
10K	8,00	234,00	940,00	94,00	93,31	496,90	48,00	143,00		355,64	2,69	209,70
11	18,80	270,40	860,00	61,00	7,74	376,48		97,20	1,35	248,66		94,50
11A	14,00	234,00	780,80	70,00	97,24	383,40	41,50	109,80		213,40		
11B	21,80	258,00	1020,80	74,50	75,79	642,90	45,00	124,90		472,90	3,50	
11K	5,60	270,00	820,80	61,00	144,59	369,90	28,70	89,80		348,40		
12	4,80	324,40	1020,00	67,00	11,59	285,30				259,74		135,22
13	68,00	288,40	1000,00	76,00	5,60	234,20	27,20		0,72	192,69		
13A	16,40	174,00	720,80	53,50	66,79	534,00	45,20	94,60		405,20	3,05	235,70
13B	26,00	306,00	1000,80	71,50	40,04	272,00	40,20	91,90		248,90	3,03	222,90
14	31,40	234,20	1340,80	118,00	5,32	428,48	45,94	108,44		437,76	3,61	192,83
14Ç1	13,60	266,20	1600,80	137,50	59,71	503,20	37,86	97,82	1,62	450,58	3,45	175,58
14Ç2	29,00	274,20	1320,80	118,00	40,33	235,38	28,88	77,62	1,44	321,30	2,62	136,46
15	30,80	330,40	1440,00	115,00	8,50	478,48				233,57		256,50
15Ç1	15,80	321,60	1041,60	92,30	36,24	223,94	33,84	89,35		373,00	1,75	186,00
15Ç2	26,10	459,60	1201,60	102,80	88,22	658,88	46,46	191,44		747,20	2,88	301,56
16	18,40	205,20	1199,20	78,75	4,35	408,20	20,60	92,36		536,25	2,80	244,92
16A	25,60	256,00	1080,40	89,30	35,94		20,40		0,31			
16B	27,40	238,00	1300,40	117,80	44,97	596,96	40,81	88,20	2,16	757,50	3,29	179,09
16K	25,60	279,20	952,20	89,25	49,30	482,32	41,32	91,72		496,30	2,53	211,25
17	18,42	210,00	620,00	67,00	7,19	782,40	49,20	163,60	2,71	424,40	4,20	214,00
17A	18,00	282,00	780,00	73,00	55,68	495,10	57,70	157,00		453,50	4,10	237,30
18	11,68	268,58	1211,17	107,96	21,74	293,82	26,38	80,33	0,92	207,05	2,69	162,85
18B	29,20	285,20	1139,20	99,75	39,80							

Bireyler	Plazma Çitotrioidaz (4-120)	Plazma β-mannozidaz (150-1.500)	Plazma Total β-heksosaminidaz (600-3500)	Plazma β-heksosaminidaz A (50-200)	Arilsülfataz A (50-250)	α-mannozidaz (100-800)	α-galaktozidaz (10-50)	α-fukozidaz (50-200)	Galaktoserebrosidaz (0,4-4,0)	β-glukuronidaz (100-800)	β-glukozidaz (1-5)	β-galaktozidaz (100-400)
19					19,28	256,00	32,60		0,61	189,60		132,70
19A					61,36	356,60	63,00	93,30		309,30	3,10	178,90
19B					77,14	429,70	70,00	118,70		281,60		200,80
20	9,60	304,80	900,80	73,00	33,45	705,95	49,27	177,16		550,31	5,29	281,04
20A	7,60	270,00	1040,00	73,00	89,00	438,00	27,47	121,80		356,90	3,10	183,10
20B	27,80	258,00	1140,00	80,50	101,19	487,00	49,60	155,00		576,00	4,80	228,30
20K	6,40	216,00	980,00	70,00	146,49	419,00	45,20	135,00		409,20	4,20	219,00
21	14,80	277,80	757,00	63,70	112,51	262,56	26,38	80,33	0,69	285,51	3,56	194,06
22	6,40	270,40	800,80	55,00	153,31	636,64	47,20	148,26		497,70	3,96	263,37
22A	12,80	222,40	900,80	61,00	174,07	629,27	43,93	125,24		520,79	4,44	189,69
22B	11,60	246,40	980,80	79,00	154,37	589,17	45,56	161,59		626,47	4,66	345,02
23	27,13	264,58	1449,81	111,30	165,58	406,71	42,22	106,27	1,65	311,57	2,77	204,38
24	22,74	237,45	1171,76	107,96	168,54	530,90	34,14	136,12	2,21	331,28	2,91	272,54
25	22,40	133,60	599,20	50,25	122,32	495,30	56,64	116,90		397,00	5,20	209,00
25B	22,40	152,00	1220,00	91,00	138,26	320,40	27,17	111,70		620,80	3,80	264,00
26	14,00	252,00	1198,00	95,35	122,67	515,20	59,66	31,77	9,30	460,08	3,14	306,97
27	16,40	236,00	956,00	84,85	144,76	659,20	69,94	92,91	9,15	501,94	3,71	272,69
28	34,40	204,00	1.500,00	106,00	67,98	563,40	32,50	81,90		792,50	5,30	
29	18,00	318,00	2500,00	131,50	59,09	298,17	48,10	103,70		638,00		228,70

MLD tanısı alan 16 hasta ile MSD tanısı alan 1 hasta ve bu hastaların taşıyıcı olan 25 aile bireyi ile MLD şüphesiyle gelen ancak MLD tanısı almayan 12 diğer lökodistrofi hastasının lökosit ASA enzim aktivite sonuçları, MLD-MSD grubu, taşıyıcı grup ve diğer lökodistrofiler (DLD) grubu arasında karşılaştırıldı (Şekil 4. 1.). Kruskal Vallis analizi ile 3 grup arasında ASA değerleri arasında farklılık olduğu saptandı ($P<0,001$). Gruplar arasındaki fark “multiple comparison test” (çoklu karşılaştırma testi) ile analiz edildi. MLD-MSD grubu ile taşıyıcı grubu ve MLD-MSD grubu ile DLD grubu arasında anlamlı farklılık bulundu ($P<0,001$). Taşıyıcı ve DLD grubu arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($P=0,475$). Taşıyıcıların bazılarında ASA aktivitesi sınırda düşük saptandı (Tablo 4. 1.).



Şekil 4. 1. ASA aktivitesi sonuçları

4.2. Yalancı Eksiklik Analizi Sonuçları

4.2.1. DNA izolasyonu sonuçları

200 µl EDTA'lı tam kan örneğinden yapılan DNA izolasyonunda 24,76 ile 194,41 ng/µl arasında değişen konsantrasyonlarda DNA elde edildi (*Tablo 4. 2.*). Kit kitapçığında (QIAamp DNA mini and blood mini handbook) ortalama 116,8 ng/µl DNA izole edilebildiği belirtilmiştir. İzole edilen DNA, PCR ve DNA dizi analizi için yeterli oldu. 23 ve 24 numaralı hastaların DNA izolasyonu ise H.Ü.T.F. Hastanesi DNA Bankası'nda yapıldı.

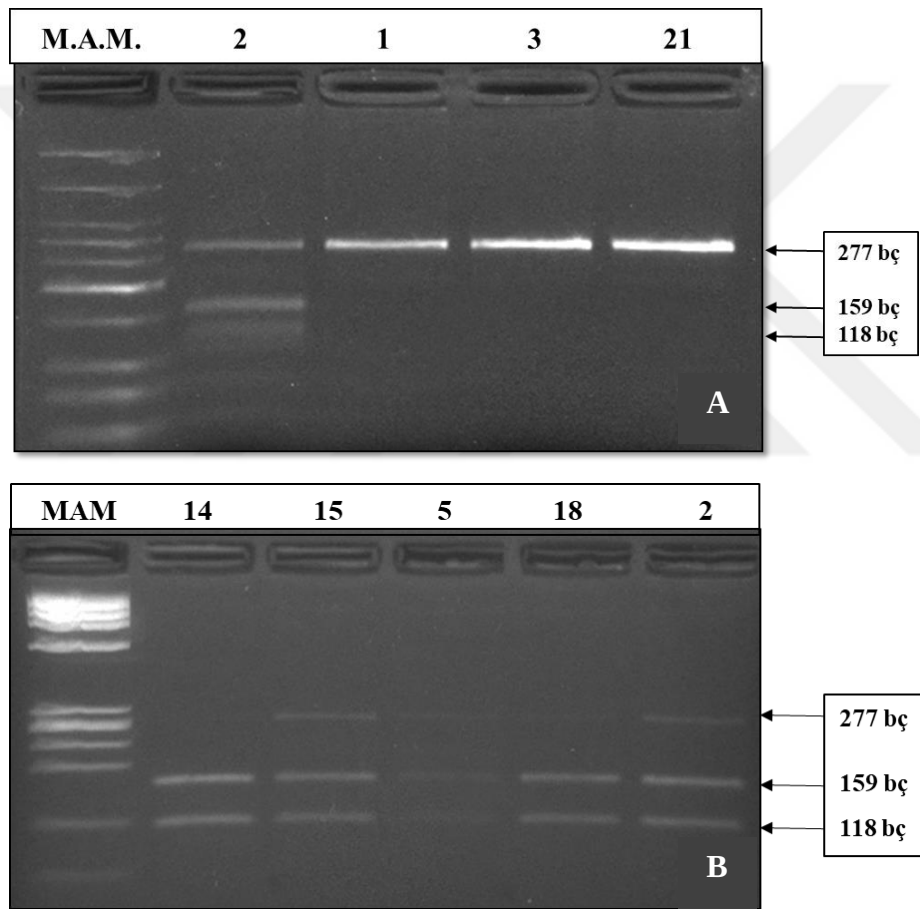
Tablo 4. 2. Hastalar ve aile bireylerinin DNA izolasyonu ile elde edilen DNA konsantrasyonları

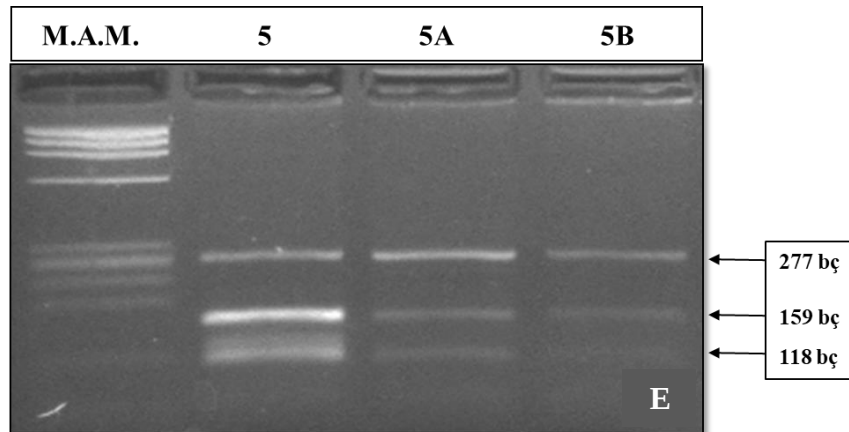
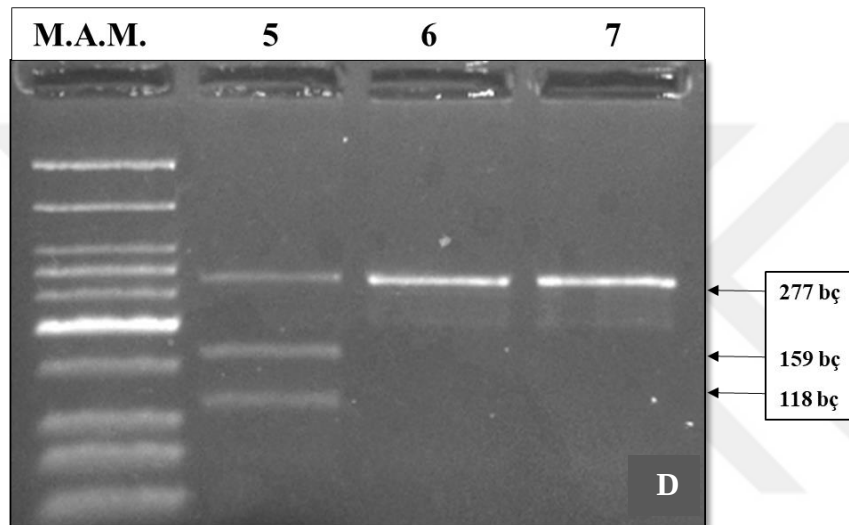
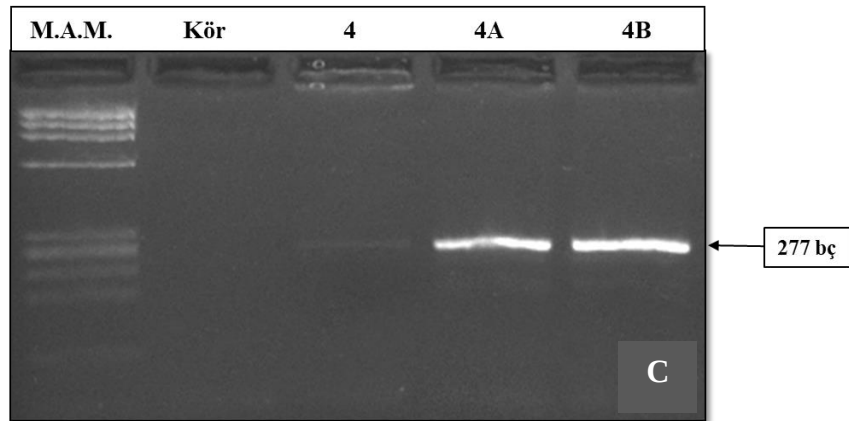
Bireyler	dsDNA (ng/µl)	A260	260/280	260/230
1	131,41	2,63	1,58	1,24
2	113,81	2,28	1,82	1,63
3	194,41	3,89	1,81	1,97
4	80,37	1,61	1,72	1,57
4A	131,99	2,64	1,86	1,52
4B	73,96	1,48	1,77	1,38
5	105,55	2,11	1,80	1,29
5A	24,76	0,50	2,12	0,96
5B	77,51	1,55	1,91	1,52
6	124,86	2,50	1,86	1,53
6A	29,39	0,59	1,84	0,77
6B	174,78	3,50	1,85	1,60
7	161,39	3,23	1,80	1,80
8	230,92	4,62	1,84	1,87
9	228,54	4,57	1,85	1,80
9A	93,56	1,87	1,83	1,54
9B	61,42	1,23	1,76	1,47
9K	100,88	2,02	1,86	1,76
10	113,67	2,27	1,84	1,66
10A	131,32	2,63	1,83	1,57
10B	147,20	2,94	1,83	1,76
10K	135,29	2,71	1,89	1,80
11	147,37	2,95	1,75	1,17
11A	115,88	2,32	1,84	1,69
11B	105,62	2,11	1,82	1,64
11K	67,31	1,35	1,76	1,51
12	78,37	1,57	1,78	1,56
13	57,92	1,16	1,78	1,69
13A	109,24	2,18	1,78	1,69
13B	74,92	1,50	1,85	1,59
14	75,48	1,51	1,79	1,41
14Ç1	47,50	0,95	1,49	1,17
14Ç2	95,53	1,91	1,67	1,56
14A	76,51	1,53	1,79	1,52

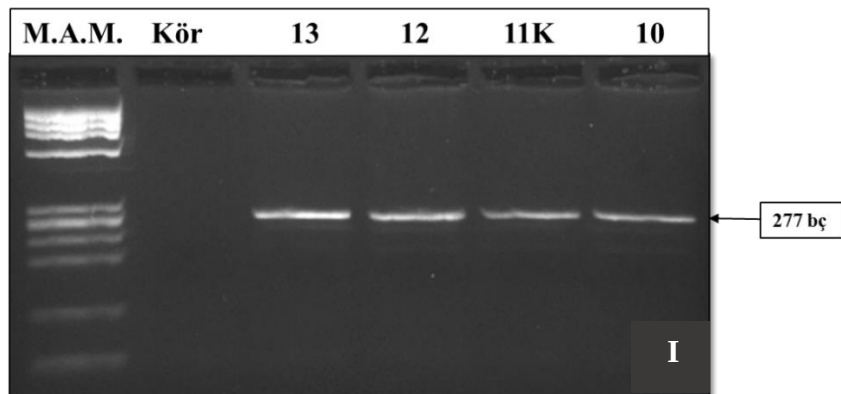
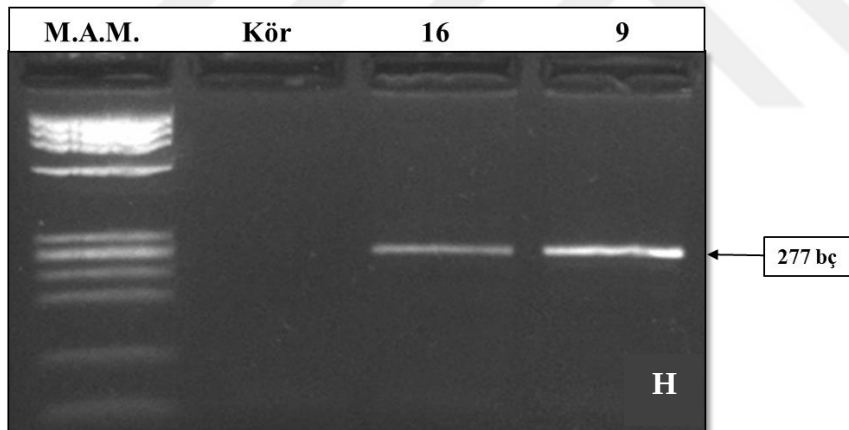
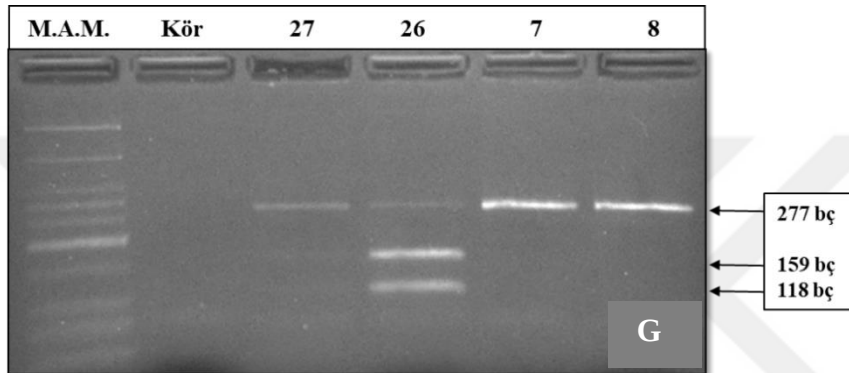
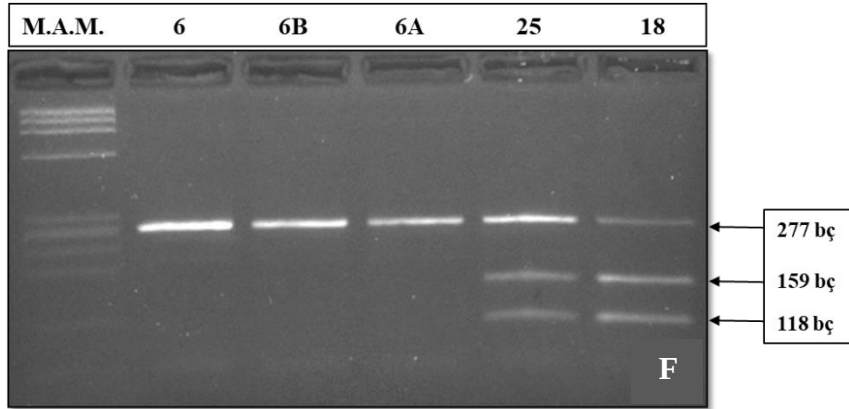
Bireyler	dsDNA (ng/μl)	A260	260/280	260/230
14B	74,18	1,48	1,86	1,54
14K	74,01	1,48	1,86	1,32
14E	87,11	1,74	1,81	1,39
14M	55,46	1,11	1,80	1,22
14H	91,15	1,82	1,81	1,29
15	92,61	1,85	1,81	1,79
15Ç1	59,81	1,20	1,86	1,50
15Ç2	141,55	2,83	1,82	1,79
16	87,48	1,75	1,89	1,46
16A	128,52	2,57	1,53	0,48
16B	115,09	2,30	1,74	1,00
16K	63,36	1,27	1,53	0,71
17	47,96	0,96	1,82	1,29
17A	76,10	1,52	1,82	1,48
18	95,25	1,91	1,73	1,47
18B	73,96	1,48	1,92	1,48
19	44,34	0,89	1,78	0,91
19A	65,40	1,31	1,82	1,37
19B	62,85	1,26	0,92	0,16
20	101,33	2,03	1,80	1,68
20A	112,36	2,25	1,82	1,57
20B	112,79	2,26	1,87	1,77
20K	89,76	1,80	1,80	1,51
21	93,36	1,87	1,52	1,12
22	116,96	2,34	1,86	1,76
22A	150,30	3,01	1,83	1,75
22B	91,36	1,83	1,84	1,59
23	377,54	7,55	1,75	1,68
24	535,30	10,71	1,76	1,75
25	153,33	3,07	1,79	1,61
25B	67,06	1,34	1,83	1,48
26	64,71	1,29	1,70	0,92
27	71,20	1,42	1,79	1,31
28	55,50	1,11	1,85	1,37
29	30,74	0,61	1,74	1,29

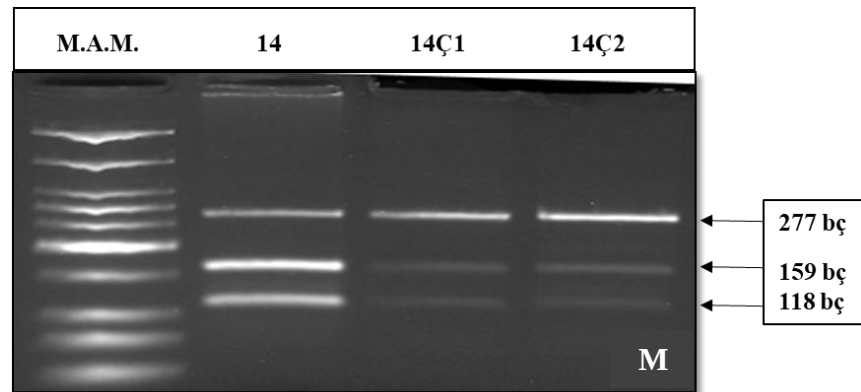
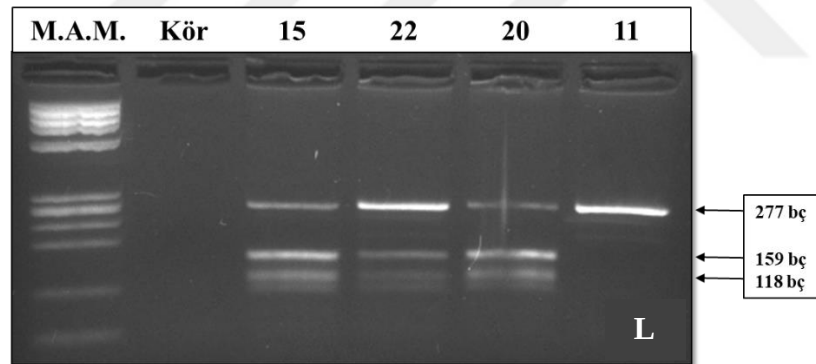
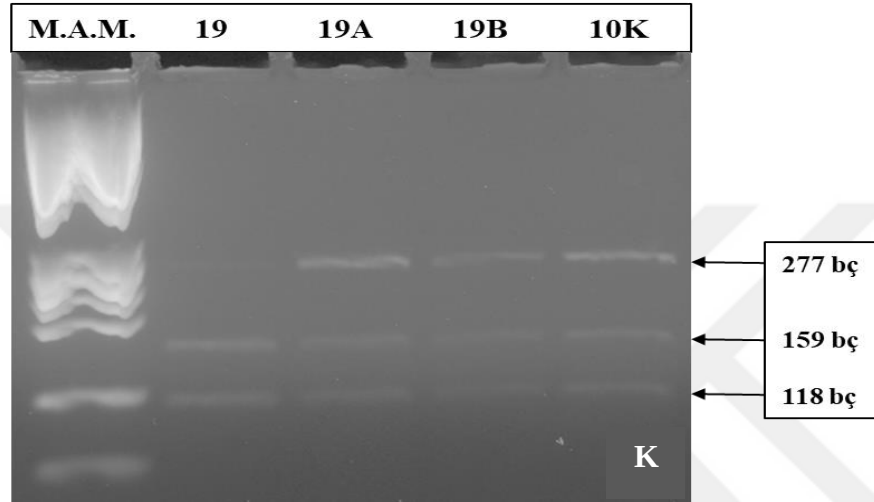
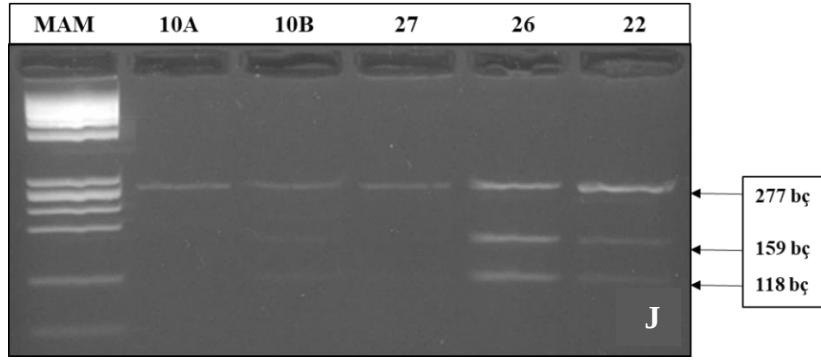
4.2.2. ARSA geninin PCR-kesim enzimi analizi

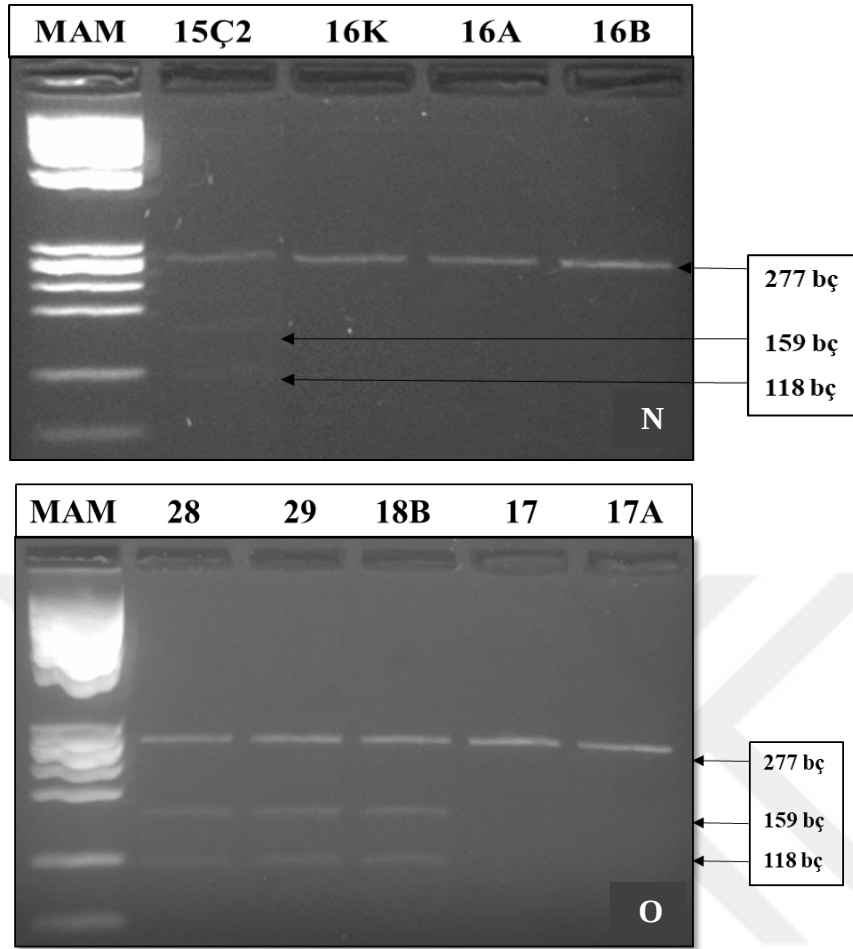
MLD şüphesiyle gelen 29 hasta ve bu hastaların 23 aile bireyinin olmak üzere toplam 52 bireyin, ARSA geninin 6. eksonunda N-glikozilasyon bozukluğu (N350S) mutasyon analizi yapıldı. MLD şüphesiyle gelen 29 hastanın sekizinde homozigot, dördünde heterozigot mutasyon saptandı. MLD tanısı alan 16 hastanın dördünde (2, 5, 14 ve 15 numaralı hastalar) homozigot mutasyon belirlendi. Bu dört hastanın ikisi geç bebeklik MLD, diğer ikisi ise erişkin MLD tanısı aldı. 13 aile bireyinde heterozigot mutasyon tespit edildi (Şekil 4. 2.).







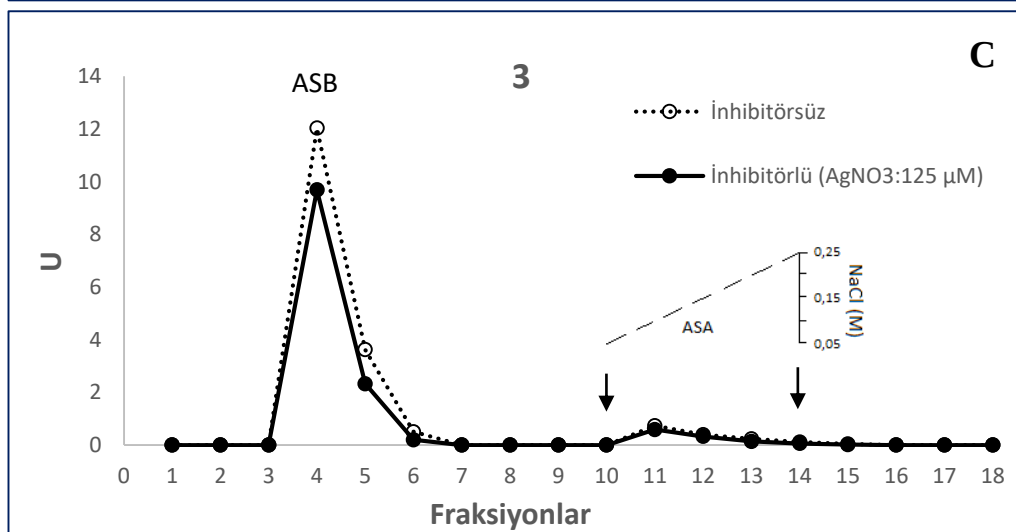
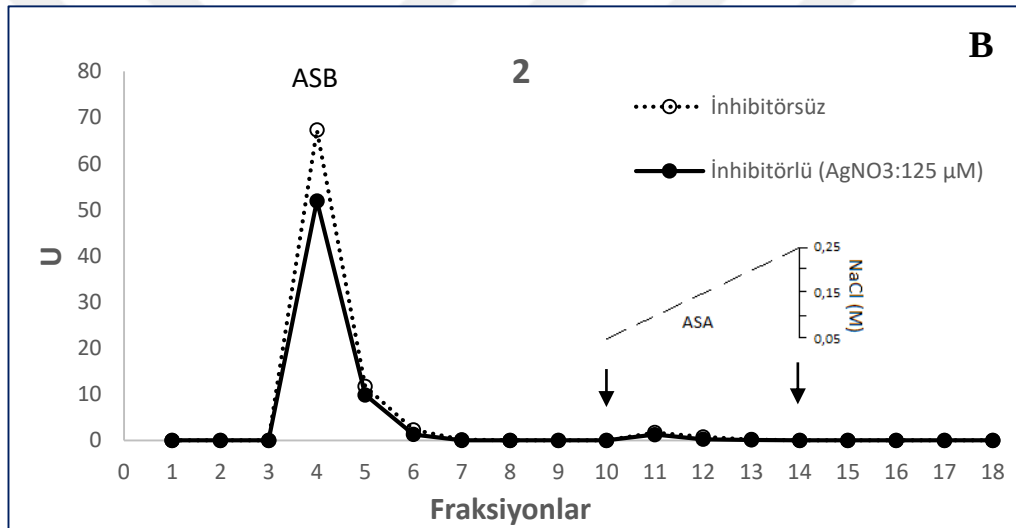
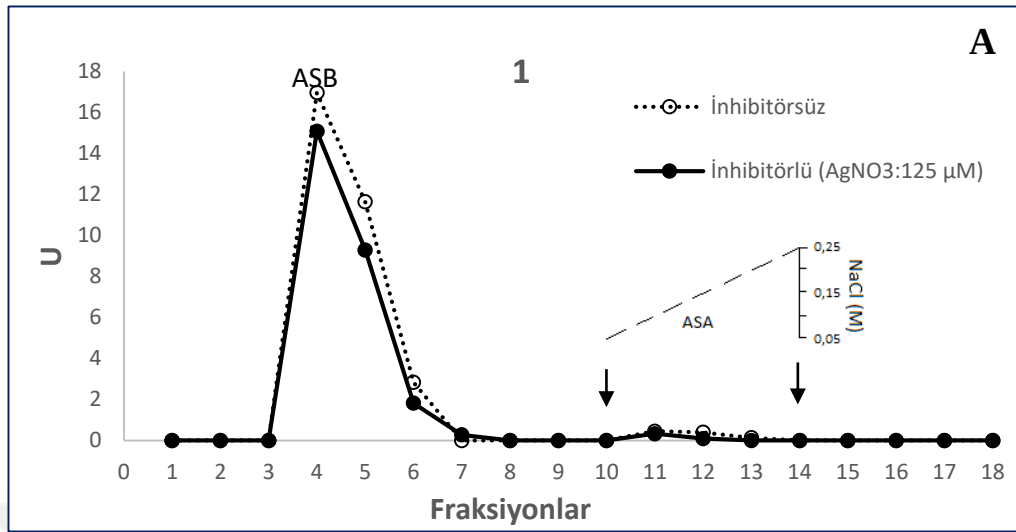


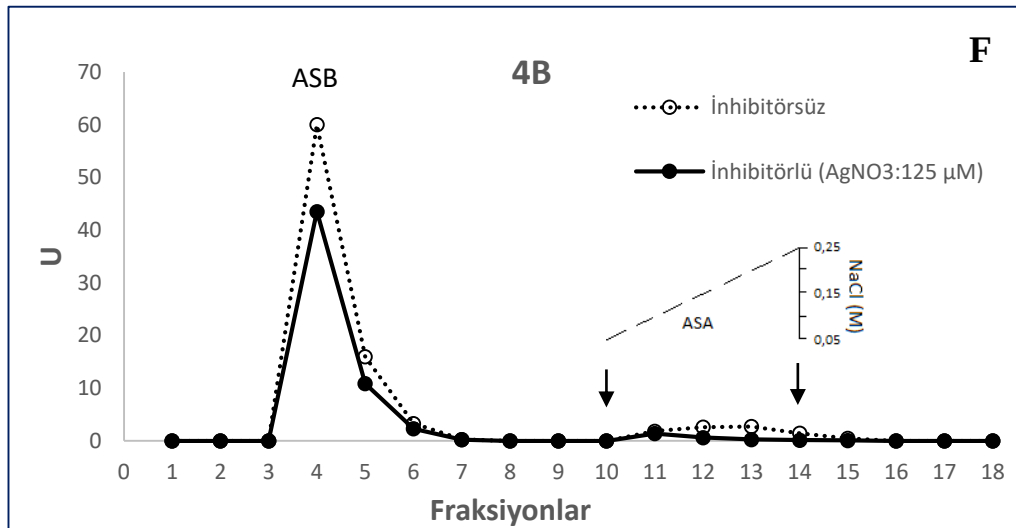
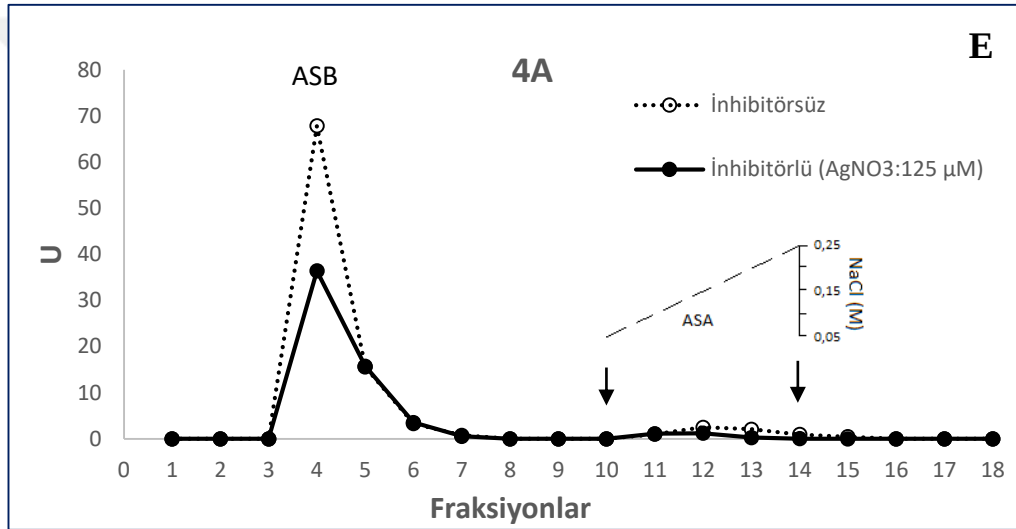
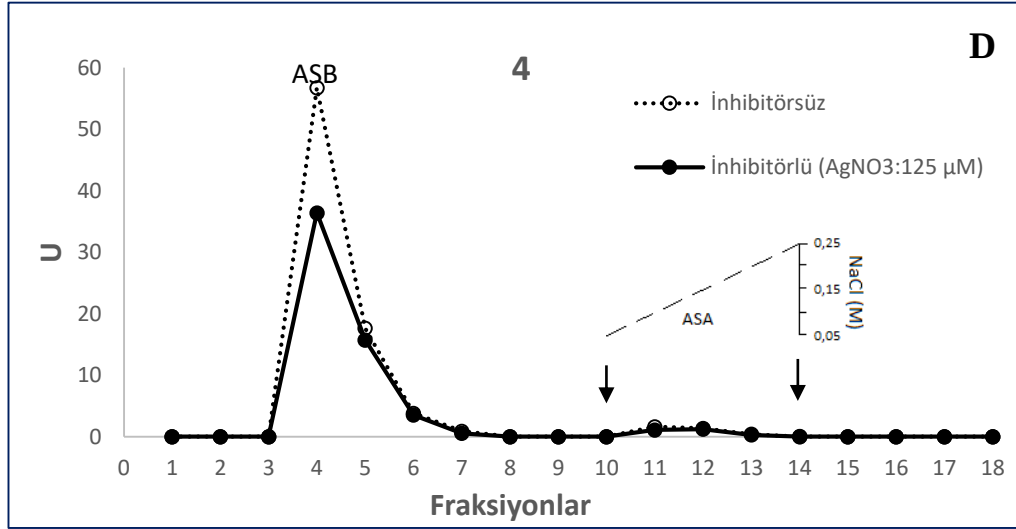


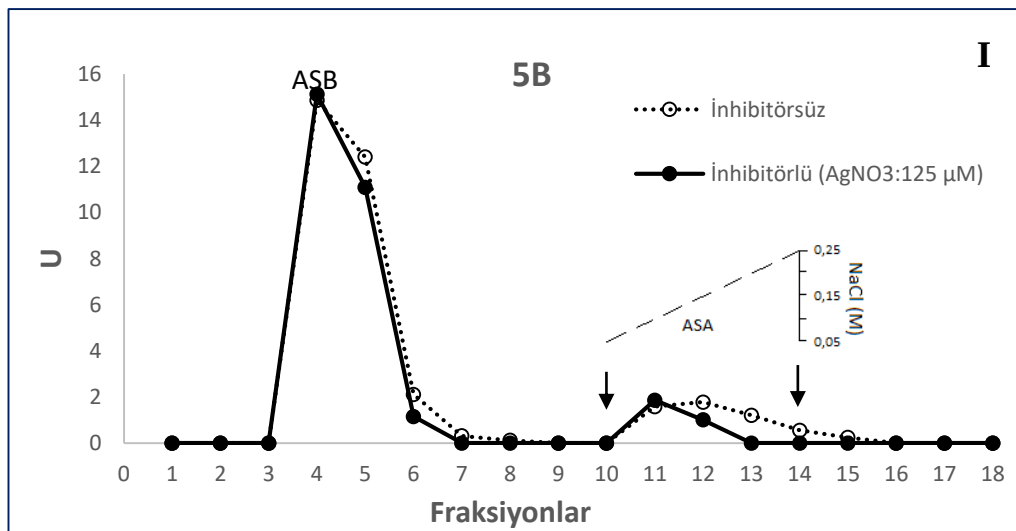
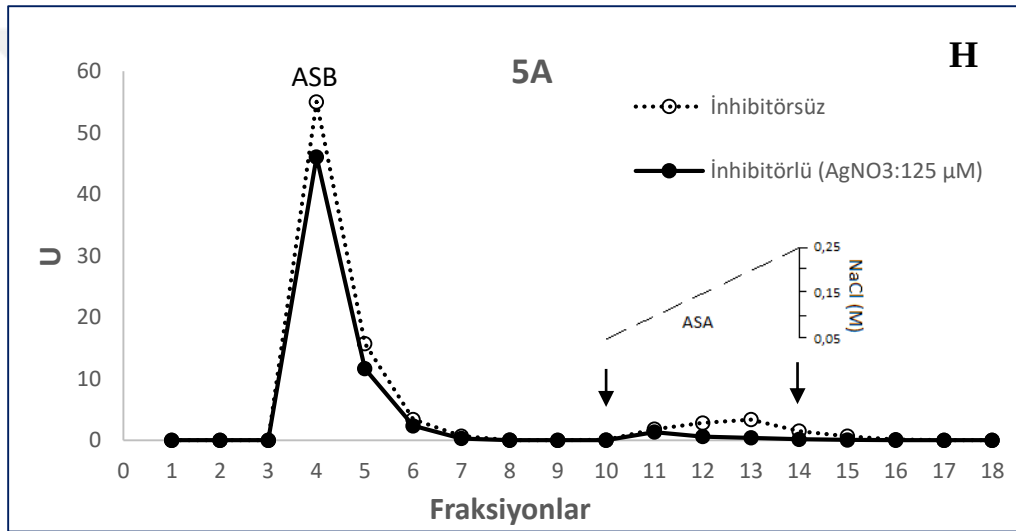
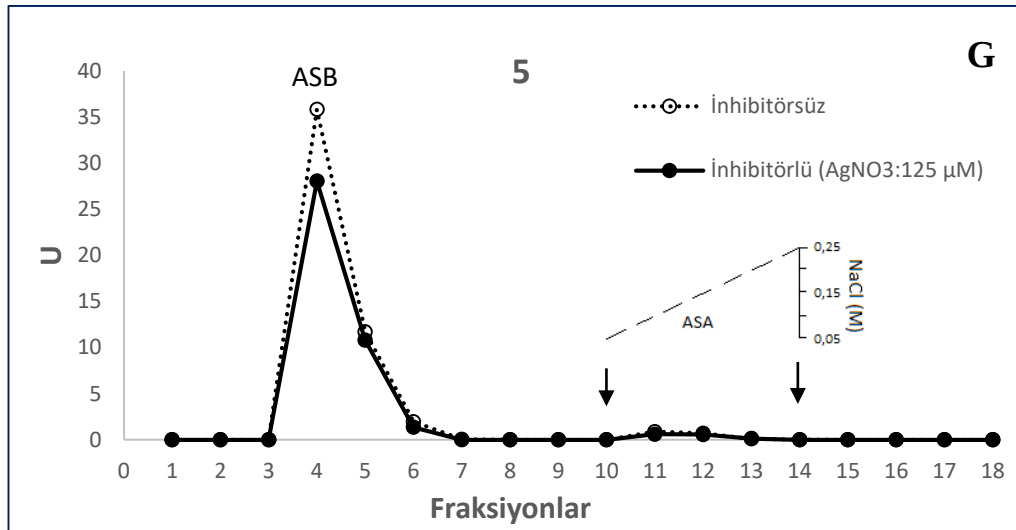
Şekil 4. 2. A-O: ARSA geninin 6. eksonunun PCR ürünü kullanılarak, BsrI kesim enzimi ile N-glikozilasyon mutasyonunun (N350S) analizi sonrası yapılan %3'lük NuSieve agaroz jel elektroforezi görüntüsü. MAM: Moleküler ağırlık markırı

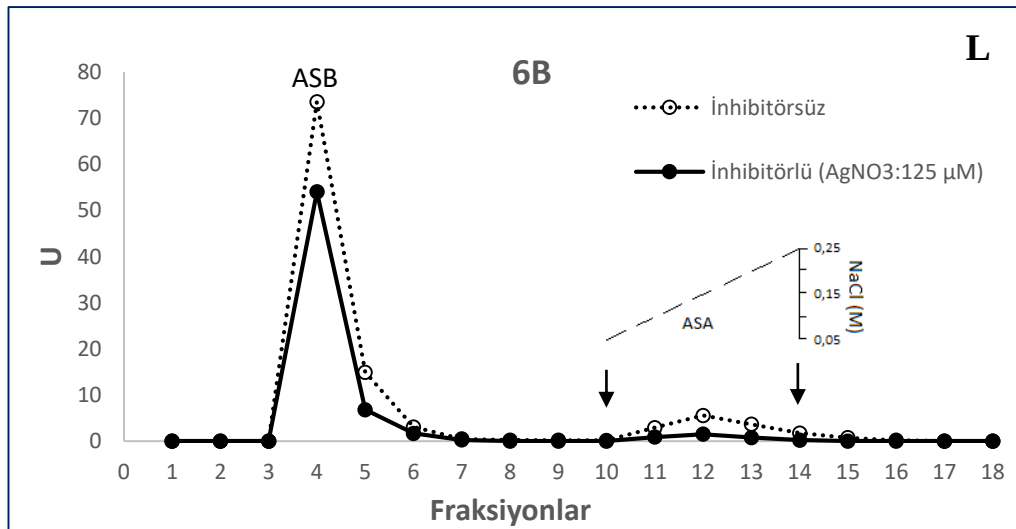
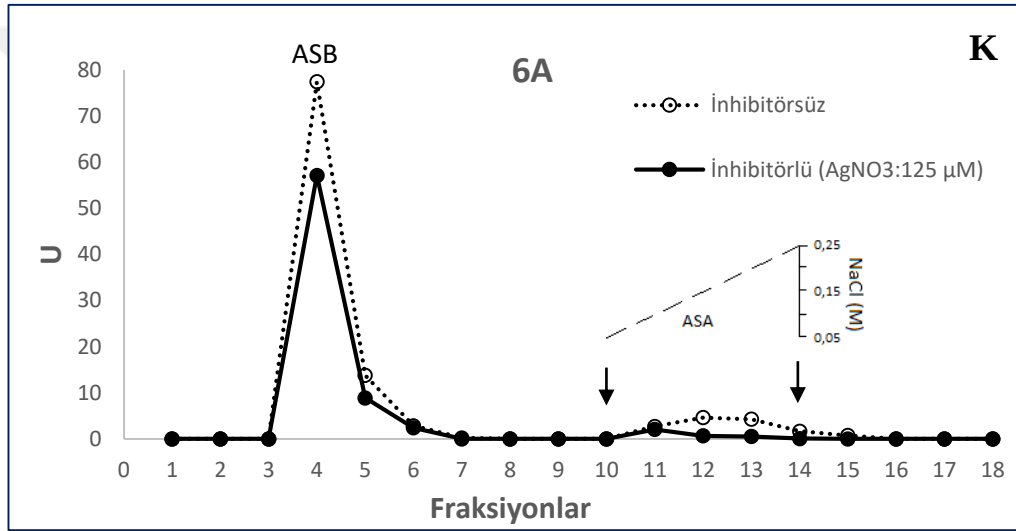
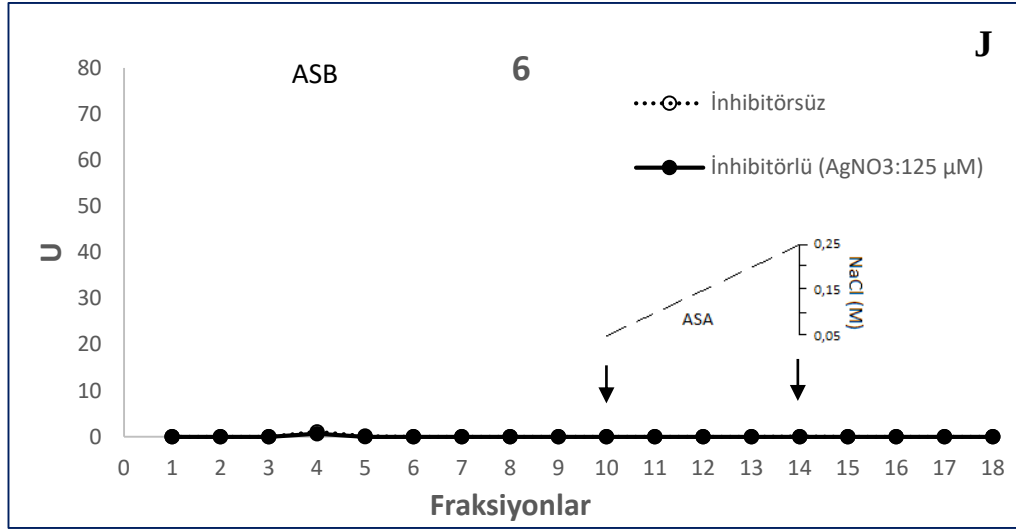
4.3. DEAE-selüloz iyon değiştirici kromatografi ile ayrıştırılan ASA ve ASB izoenzimlerinin aktivite tayini sonuçları

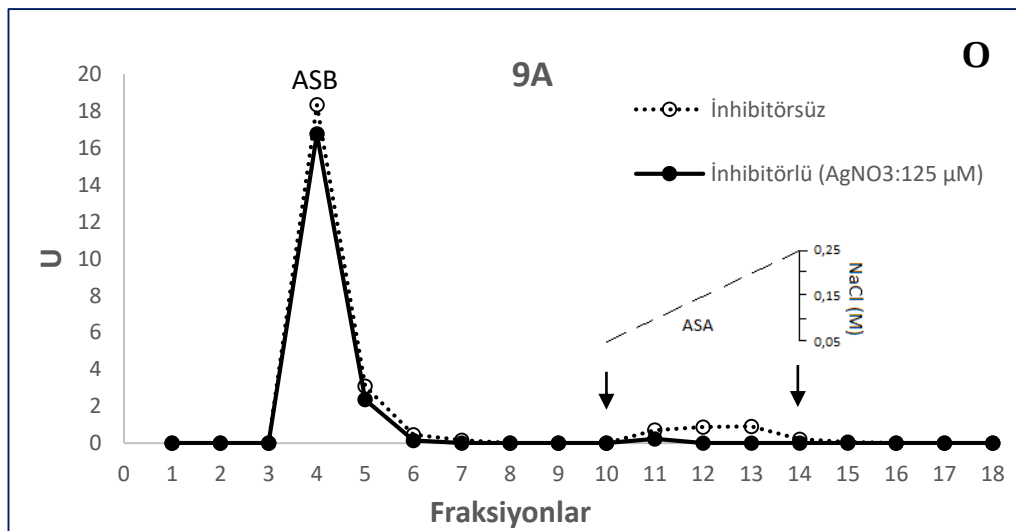
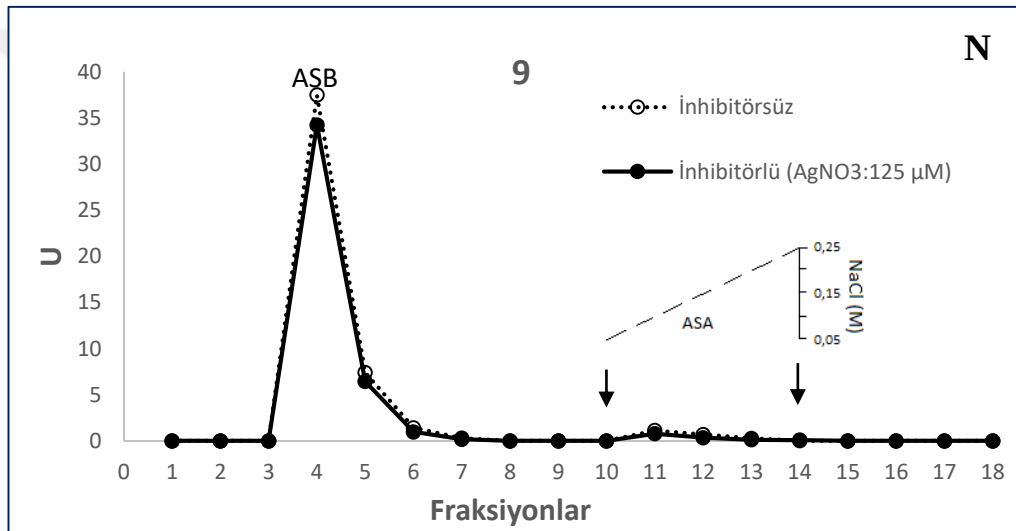
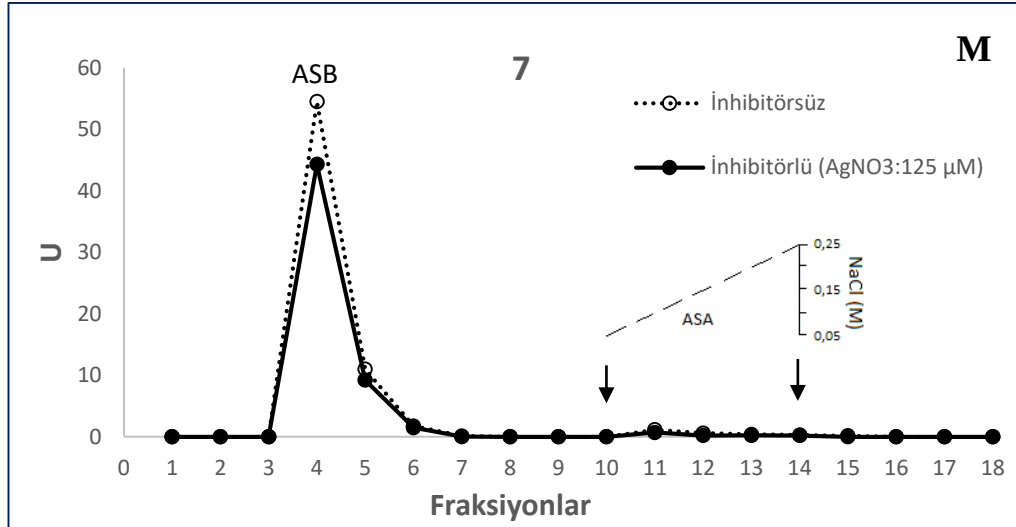
MLD şüphesiyle gelen 18 hastanın ve bu hastaların 15 aile bireyinin olmak üzere toplam 33 bireyin iyon değiştirici kromatografi sonrası ASA ve ASB izoenzimlerinin inhibitörlü ($125 \mu\text{M}$ AgNO_3) ve inhibitörsüz florometrik aktivite tayini yapıldı. İnhibitörsüz izoenzim aktivite grafiklerinde 20 bireyin 0,10 M, 5 bireyin 0,15 M ve 7 bireyin 0,20 M tuz konsantrasyonlarında ASA pikleri görüldü (Şekil 4. 3.).

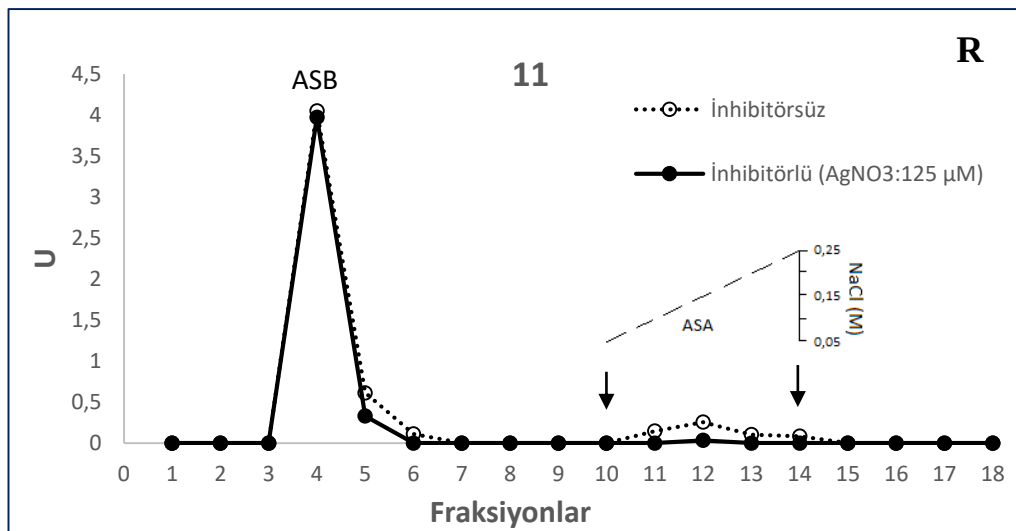
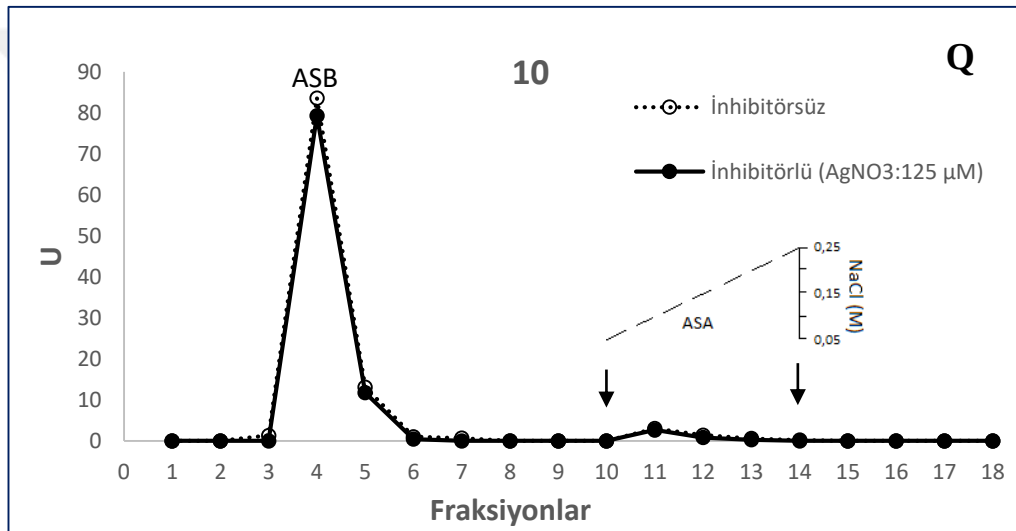
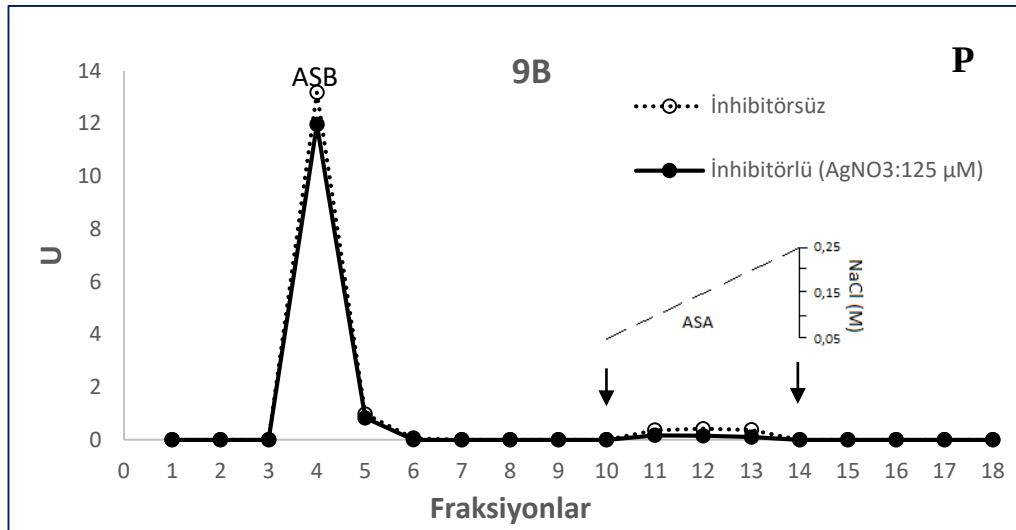


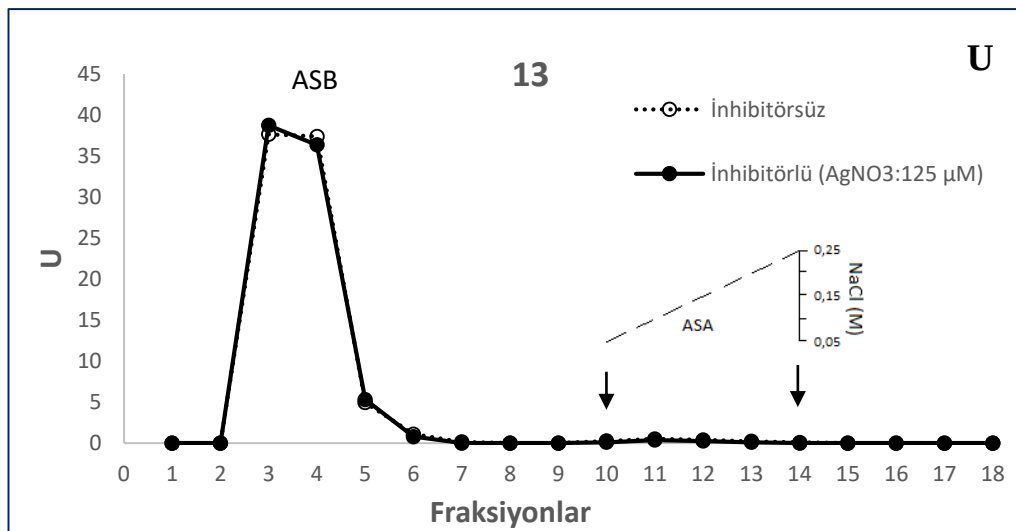
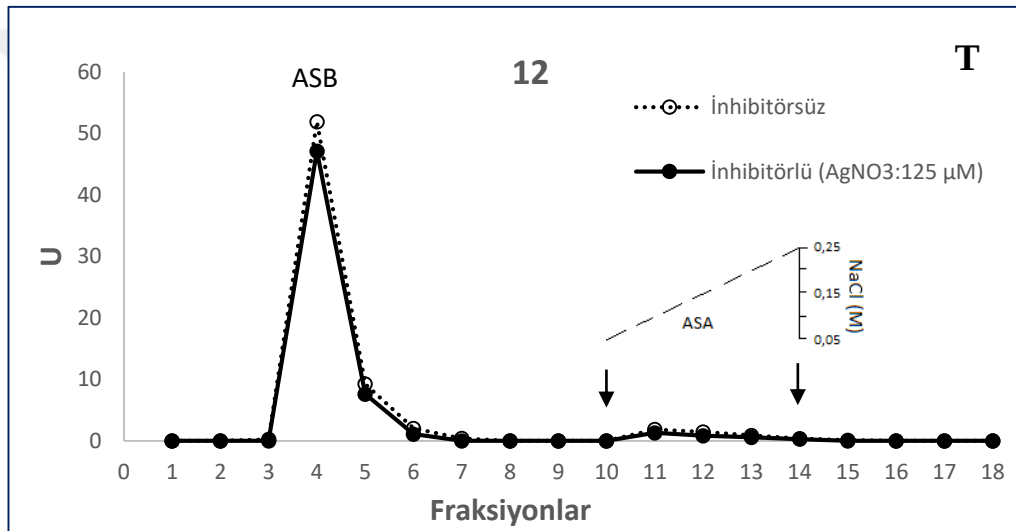
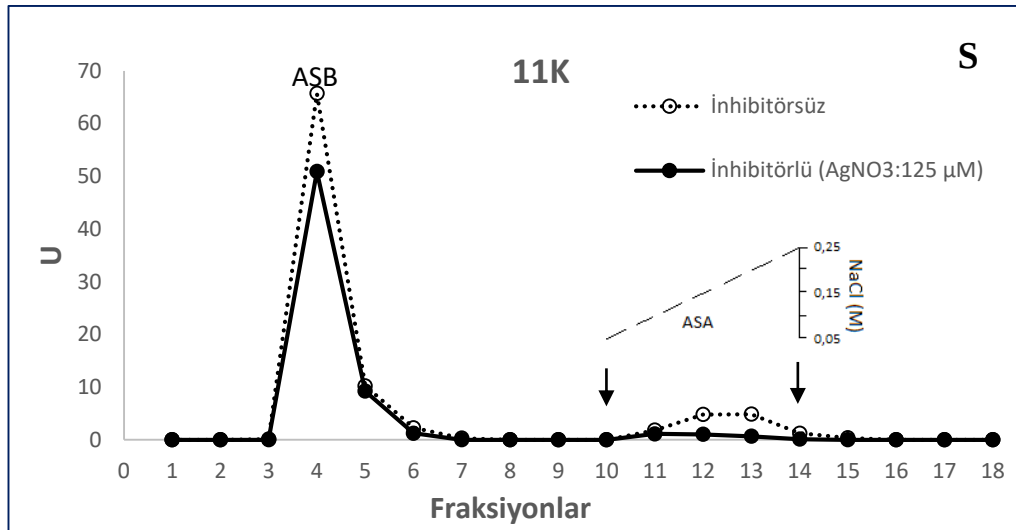


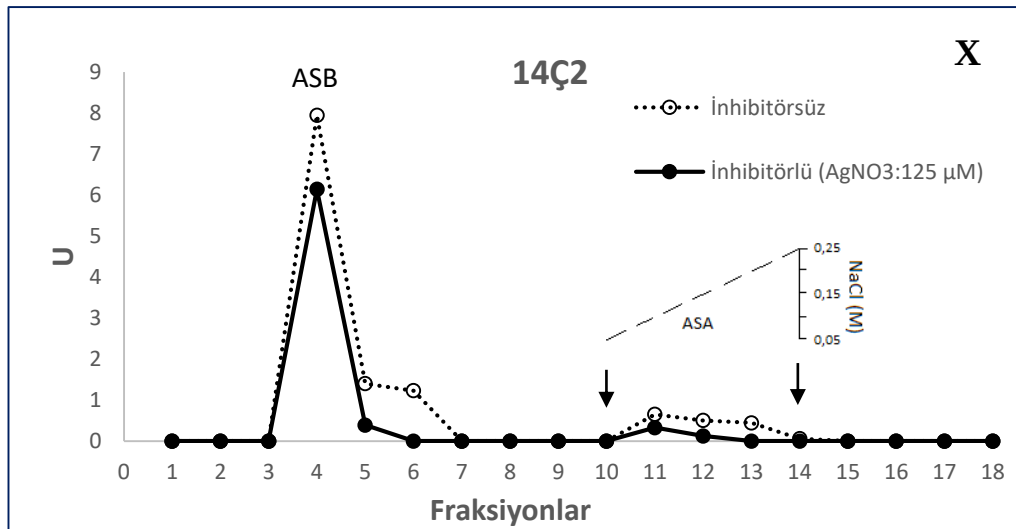
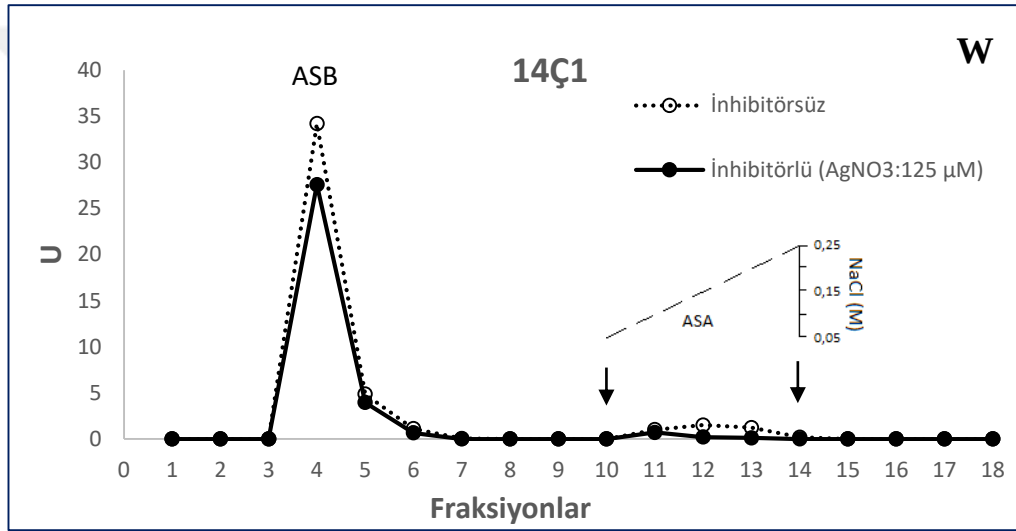
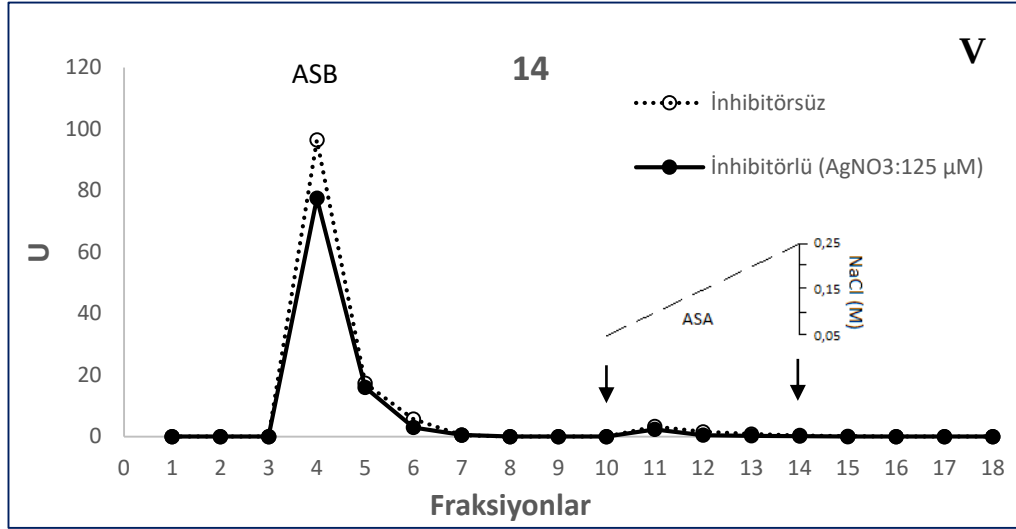


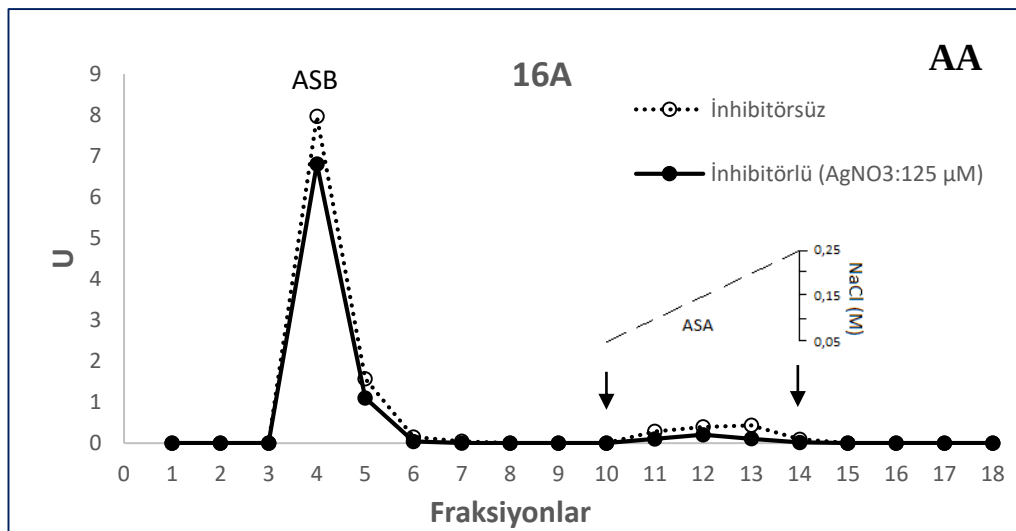
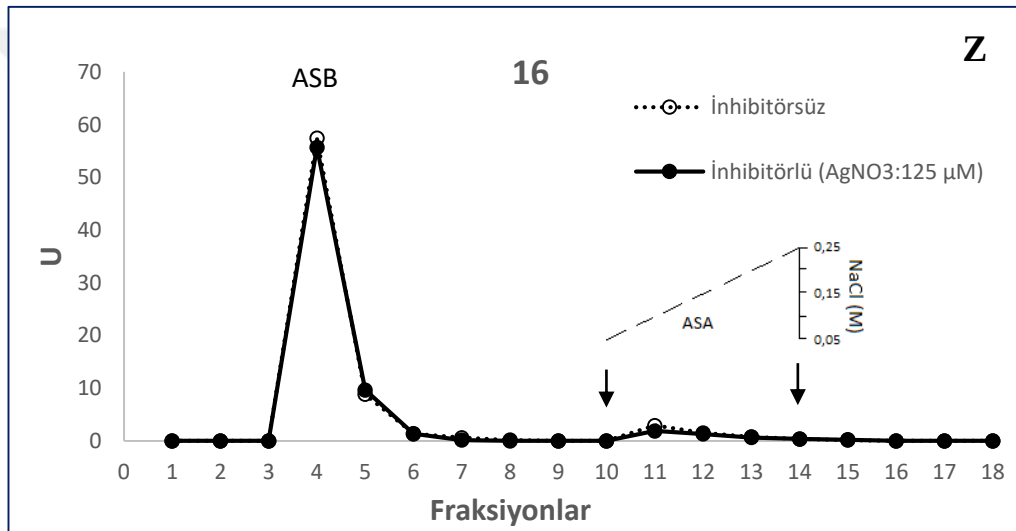
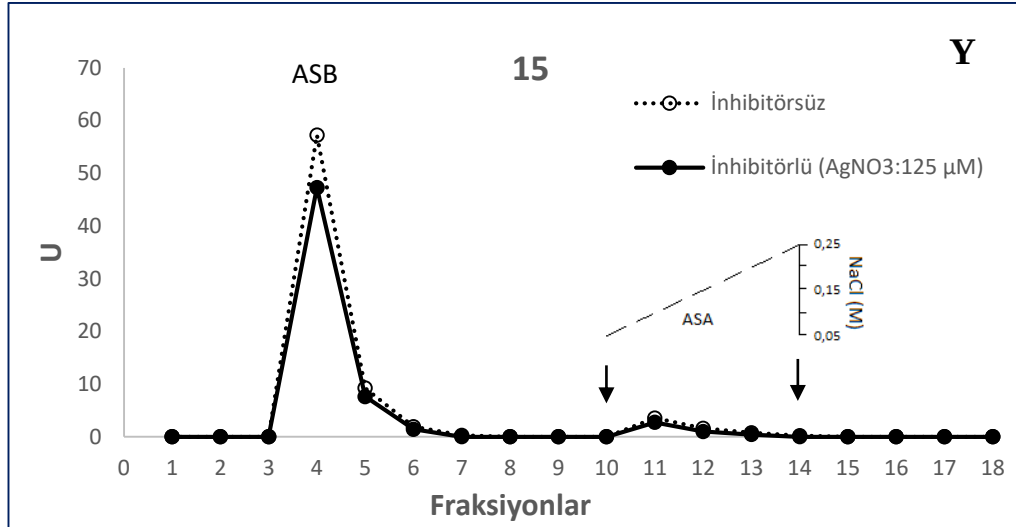


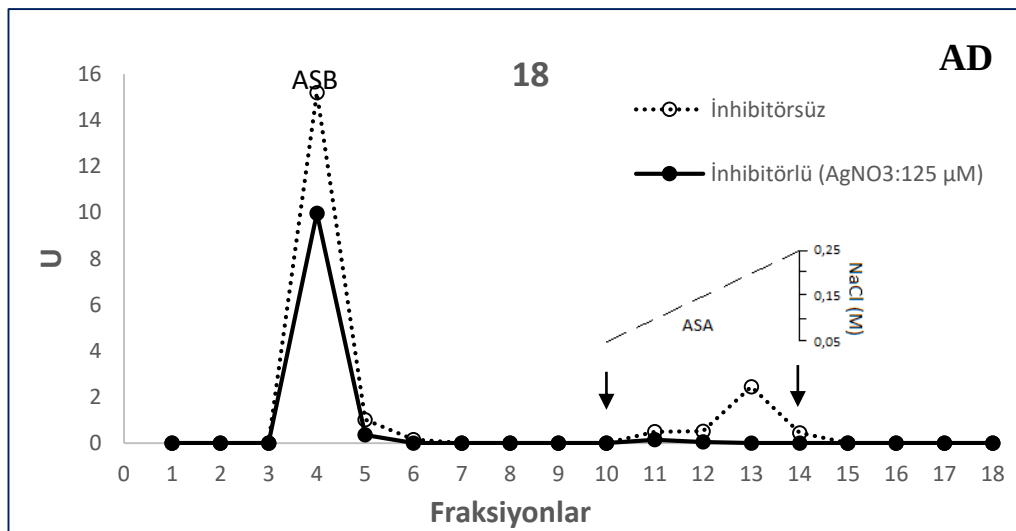
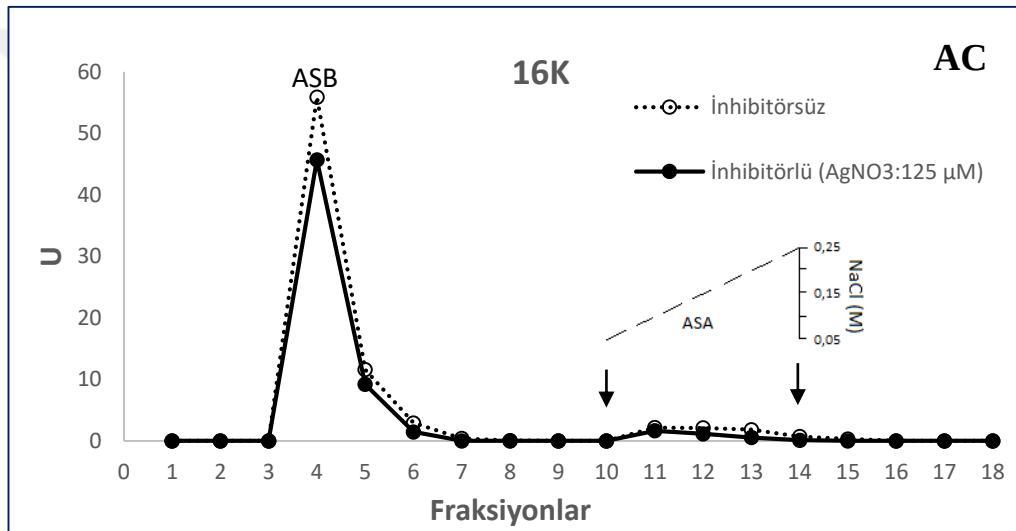
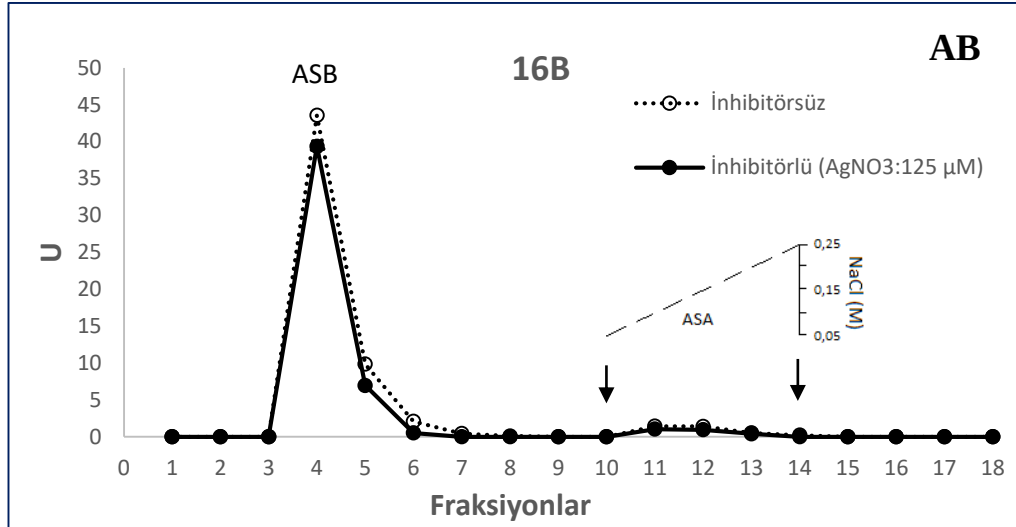


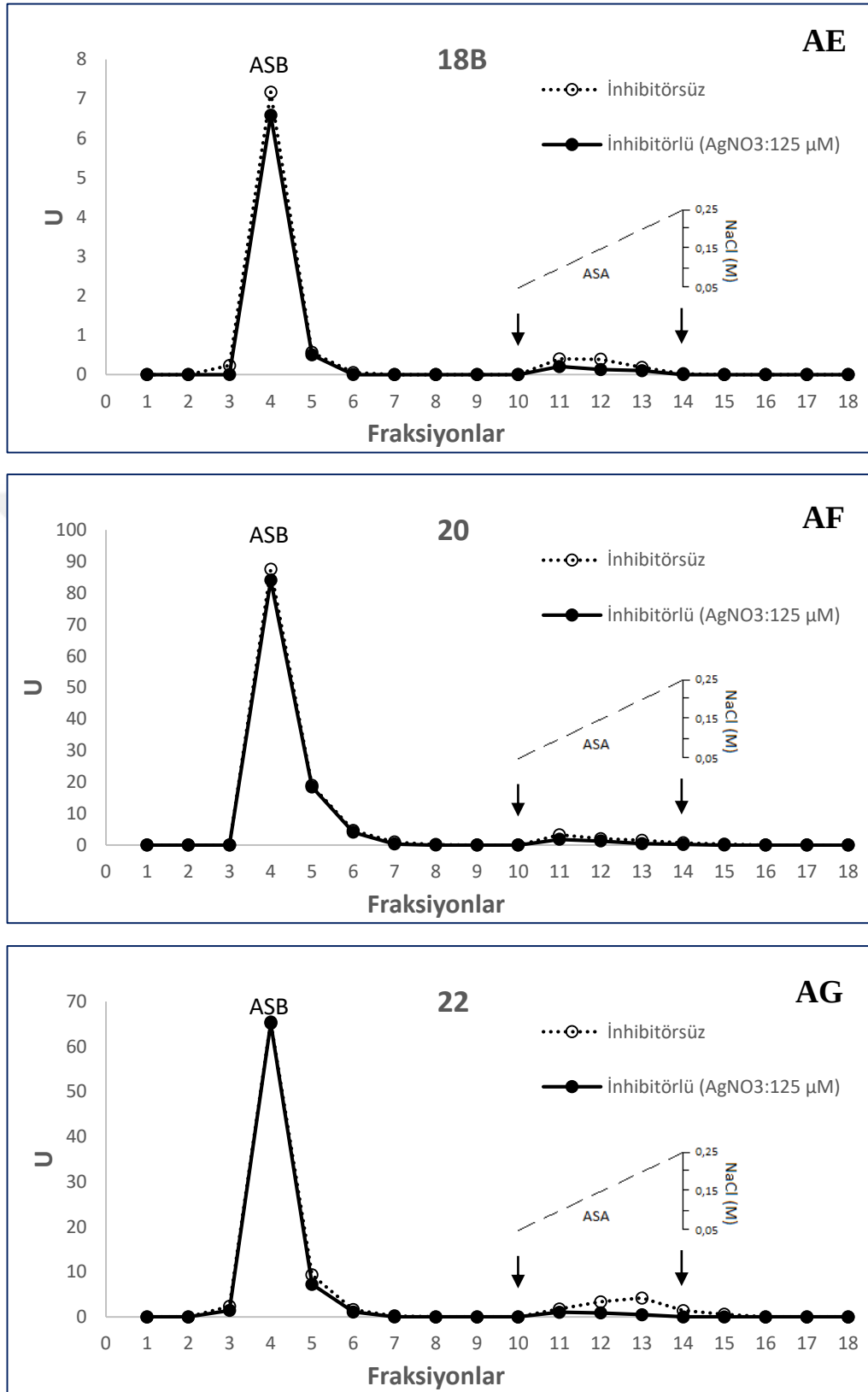








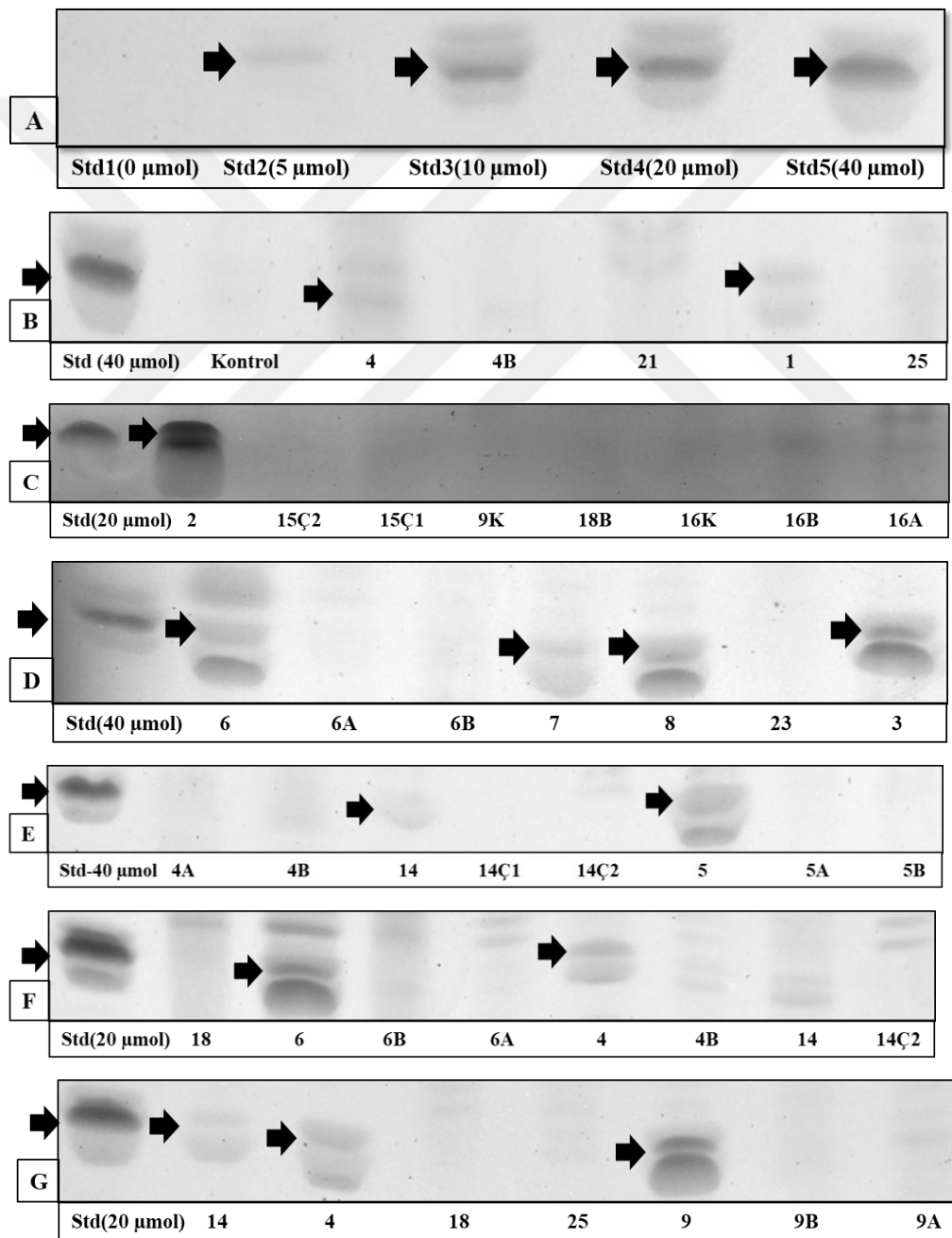


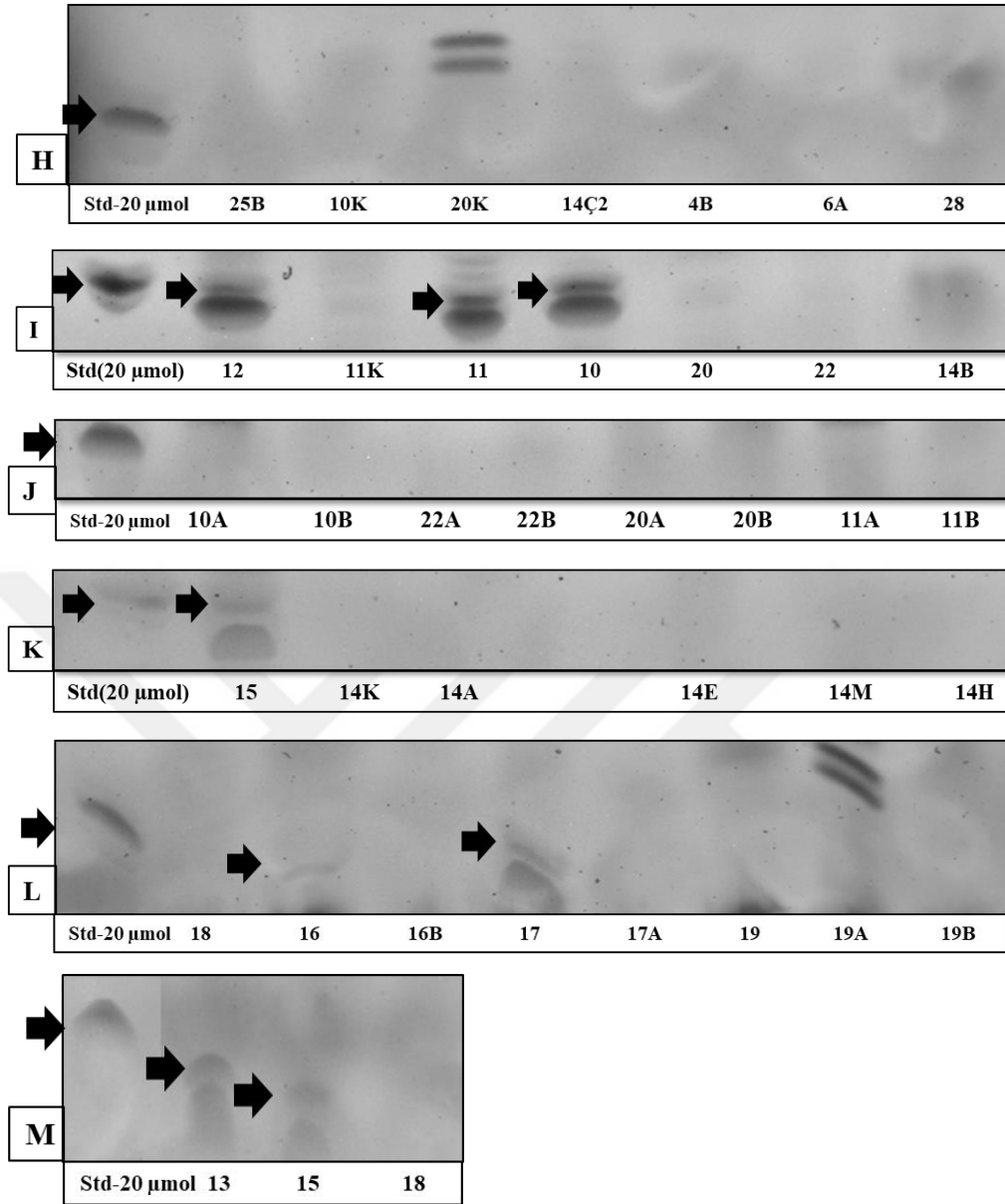


Şekil 4. 3. A-Z ve AA-AG: İyon değiştirici kromatografi sonrası ASA ve ASB izoenzimlerinin inhibitörlü (125 µM AgNO₃) ve inhibitörsüz florometrik aktivite tayini grafikleri

4.4. İnce tabaka kromatografisi ile idrarda sülfatid analizi sonuçları

MLD şüphesiyle gelen 29 hastadan, idrar örneği alınabilen 26'sının ve bu hastaların aile bireylerinden 38'inin olmak üzere toplam 64 bireyin ince tabaka kromatografisiyle idrarda sülfatid tayini yapıldı. MLD şüphesiyle gelen 26 hastanın on yedisinde sülfatid pozitif bulundu. İdrarında sülfatid saptanan 17 hastanın on altısı MLD tanısı alırken biri ise MSD (6 numaralı hasta) tanısı aldı. Aile bireylerinde sülfatid saptanmadı (Şekil 4. 4.).



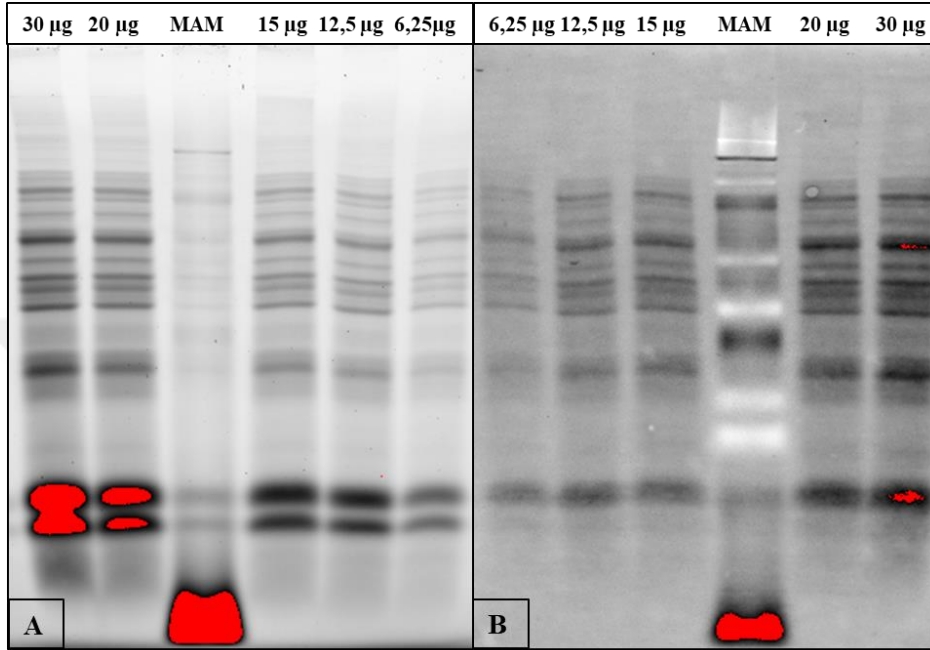


Şekil 4. 4. A-M: İnce tabaka kromatografisi ile idrarda sülfatid analizi. Std: C18-sülfatid

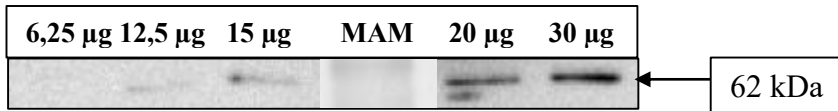
4.5. Western blot yöntemi ile arilsülfataz A ve sapozin B protein analizi sonuçları

Western blot analizi için en uygun protein konsantrasyonunu belirlemek için ilk aşamada kontrol örneği ile farklı protein konsantrasyonlarında ASA ve sap-B protein analizi yapıldı (Şekil 4. 5., 4. 6. ve 4. 7.). Sapozin B eksikliği saptanan hasta

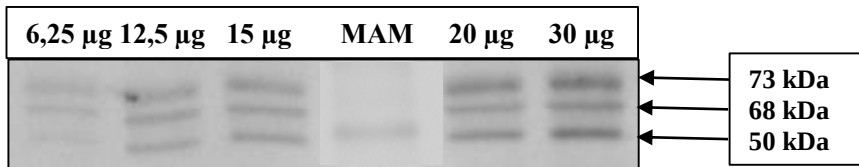
olmadığı için Metakromatik lökodistrofi hastalarında mutasyonun proteine etkisini araştırmak üzere ASA proteinini için western blot yapıldı. Sonrasında ise membranlara “stripping-reprobing” uygulandı ve “housekeeping” proteinlerden biri olan β -aktin protein analizi yapıldı (Şekil 4. 8.).



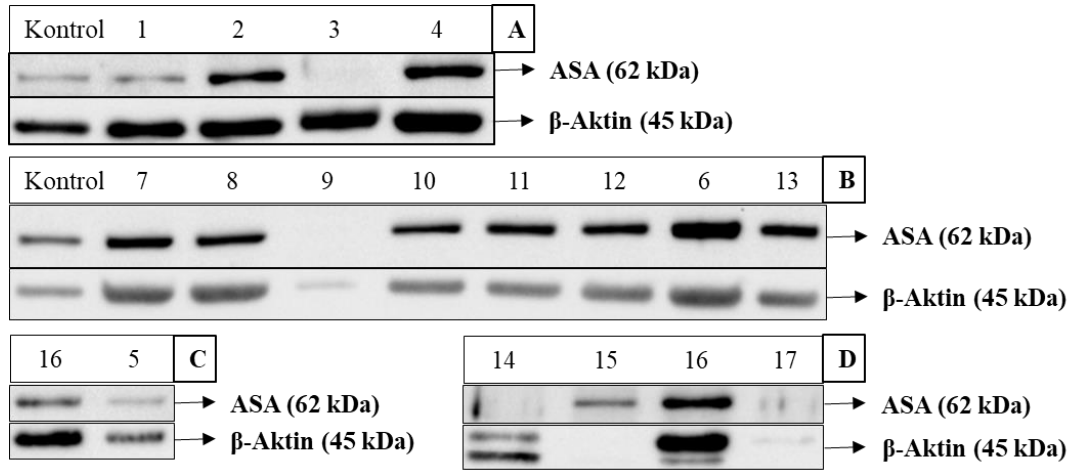
Şekil 4. 5. Farklı protein konsantrasyonlarında hazırlanan kontrol örneğinde protein elektroforezi. A: Nitroselüloz membrana transfer öncesi jelin görüntüsü, B: Transfer sonrası membran görüntüsü



Şekil 4. 6. Farklı protein konsantrasyonlarında hazırlanan kontrol örneğinde, ASA proteininin Western blot analizi



Şekil 4. 7. Farklı protein konsantrasyonlarında hazırlanan kontrol örneğinde ASA proteininin analizi sonrasında “stripping – reprobing” yapılarak Sapozin B proteininin Western blot analizi



Şekil 4. 8. A-D: 16 MLD ve 1 MSD hastasının ASA ve β -aktin proteinlerinin Western blot analizi

16 MLD ve 1 MSD hastasında ASA protein analizi yapıldı. 12 hastada güçlü protein bantları saptandı. 3 hastada (3, 9 ve 14 numaralı hastalar) protein bandı saptanamazken, 1 hastada (1 numaralı hasta) zayıf protein bantları tespit edildi. 17 numaralı hastada ise β -aktin bandı saptanamadığı için ASA proteinin varlığı ya da yokluğu konusunda karar verilemedi (Şekil 4. 8.).

4.6. ASA ve sapozin B genlerinde mutasyon analizi sonuçları

4.6.1. RNA konsantrasyon sonuçları

200 μ l EDTA'lı tam kan ile yapılan RNA izolasyonunda 6,59 ile 83,79 ng/ μ l konsantrasyonlarında RNA elde edildi (Tablo 4. 3.)

Tablo 4. 3. Hastalar ve aile bireylerinin RNA izolasyonu ile elde edilen RNA konsantrasyonları

Bireyler	RNA (ng/ μ l)	A ₂₆₀	260/230	260/280
1	40,59	1,01	3,31	2,11
2	14,09	0,35	0,61	1,62
3	26,56	0,66	0,88	1,91
4	20,48	0,51	1,68	1,60
5	23,83	0,60	1,84	2,12
6	10,62	0,27	0,04	2,02
6A	10,23	0,26	1,56	1,84
6B	42,27	1,06	1,09	1,98
7	18,43	0,46	0,78	1,49
8	13,09	0,33	0,47	2,02
9	46,76	1,17	0,37	1,41
9A	83,79	2,09	0,42	1,26
9B	11,44	0,29	0,83	2,00
10	13,03	0,33	1,12	2,01
11	10,01	0,25	0,68	1,46
11K	7,29	0,18	1,30	2,28
12	16,37	0,41	0,52	2,02
13	16,46	0,41	1,25	2,08
14	29,82	0,75	0,66	1,71
16	24,00	0,60	0,53	1,18
16A	15,00	0,38	1,12	1,88
16B	11,84	0,30	0,49	1,76
16K	29,69	0,74	0,57	1,42
17	21,38	0,53	1,01	1,88
18	32,92	0,82	0,64	1,24
19	6,59	0,16	0,33	1,73
21	27,71	0,69	0,92	1,97
22	10,12	0,25	0,21	2,18
25	17,26	0,43	1,97	1,99
25B	10,39	0,26	1,18	1,81

4.6.2. DNA dizi analizi sonuçları

Çocuk ve erişkin MLD hastaları ve diğer lökodistrofi grubundaki hastaların DNA dizi analizi sonuçları *Tablo 4. 4.*'te özetlenmiştir. MLD hastalarında ARSA geninde ekson 2, 3, 4, 5 ve 7'de hastalığa neden olan toplam 11 mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonlardan 3 tanesi “compound” heterozigot olarak bulunmaktadır. Dört MLD hastasında, 4 de diğer lökodistrofi grubundaki hastada ARSA geninde yalancı eksiklik mutasyonu homozigot düzeyde, diğer lökodistrofi grubundaki 5 hastada ise heterozigot düzeyde saptanmıştır. MLD grubunda 5 hastada ASA geni ekson 7'de p.Thr391Ser polimorfizm mutasyonu homozigot düzeyde, diğer lökodistrofiler grubunda 3 hastada homozigot, 3 hastada heterozigot düzeyde saptanmıştır. MSD tanısı alan hastanın SUMF1 geninde homozigot mutasyonu ile birlikte ARSA geni ekson 7'de p.Thr391Ser mutasyonu heterozigot olarak saptanmıştır.

Tablo 4. 4. MLD şüphesiyle gelen hastalarda ARSA ve SUMF1 genlerinin dizi analizi ile tespit edilen mutasyon ve polimorfizmler

Hasta No	Tipi	ARSA Ekson 3	ARSA Ekson 4	ARSA Ekson 5	ARSA Ekson 7	ARSA Ekson 6 (yalancı eks.) p.Asn350Ser	ARSA Ekson 7 (polimorfizm) p.Thr391Ser	SUMF1
1	Geç infantil MLD	c.634G>Cp.Ala212 Pro (HOM)						
2	Geç infantil MLD			c.887G>A, p.Gly296Asp (HOM)		c.1049 A>G p.Asn350Ser PDA1 (HOM)		
3	Geç infantil MLD	c.577 delT, p.Trp193Glyfs Ter5 (HOM)				c.1049 A>G p.Asn350Ser PDA1 (HOM)	c.1172 C>G p.Thr391Ser (HOM)	
4	Geç infantil MLD		c.821 C>T, p.Thr274Met (HOM)					
5	Geç infantil MLD			c.926G>A, p.Gly309Asp (HOM)		c.1049A>G p.Asn350Ser PDA1 (HOM)		
6	MSD						c.1172 C>G p.Thr391Ser (HET)	c.1045 C>T p.Arg349Trp (HOM)
7	Geç infantil MLD	c.634 G>C, p.Ala212Pro (HOM)		c.954G>T, p.Trp318Cys (compound HET)				
8	Geç infantil MLD (asemptomatik)	c.634 G>C, p.Ala212Pro (HET)		c.954 G>T, p.Trp318Cys (compound HET)				
9	Geç infantil MLD			c.925 G>A, p.Gly309Ser (HOM)			c.1172 C>G p.Thr391Ser (HOM)	

Hasta No	Tipi	ARSA Ekson 3	ARSA Ekson 4	ARSA Ekson 5	ARSA Ekson 7	ARSA Ekson 6 (yalancı eks.) p.Asn350Ser	ARSA Ekson 7 (polimorfizm) p.Thr391Ser	SUMF1
10	Geç infantil MLD			c.925 G>A, p.Gly309Ser (HOM)				
11	Geç infantil MLD			c.925 G>A, p.Gly309Ser (HOM)			c.1172 C>G p.Thr391Ser (HOM)	
12	Geç infantil MLD (asemptomatik)			c.925 G>A, p.Gly309Ser (HOM)			c.1172 C>G p.Thr391Ser (HOM)	
13	Geç infantil MLD	Ekson 2-intron 2 splice bölgesi, c.465+1G>A (HOM)						
14	Erişkin MLD			c.896 G>T, p.Arg299Leu (HOM)				
15	Erişkin MLD			c.896 G>T, p.Arg299Leu (HOM)		c.1049 A>G p.Asn350Ser PDA1 (HOM)		
16	Jüvenil tipi MLD				AC>GG c.1171 A>G, c.1172 C>G, ACT>GGT p.Thr391Gly (HOM)		c.1172 C>G p.Thr391Ser (HOM)	
17	Erişkin MLD	c.542 T>G p.Ile 181Ser (HET)		c.954G>T p.Trp318Cys (HET)				
18	Erişkin lökodistrofi					c.1049 A>G p.Asn350Ser PDA1 (HOM)		

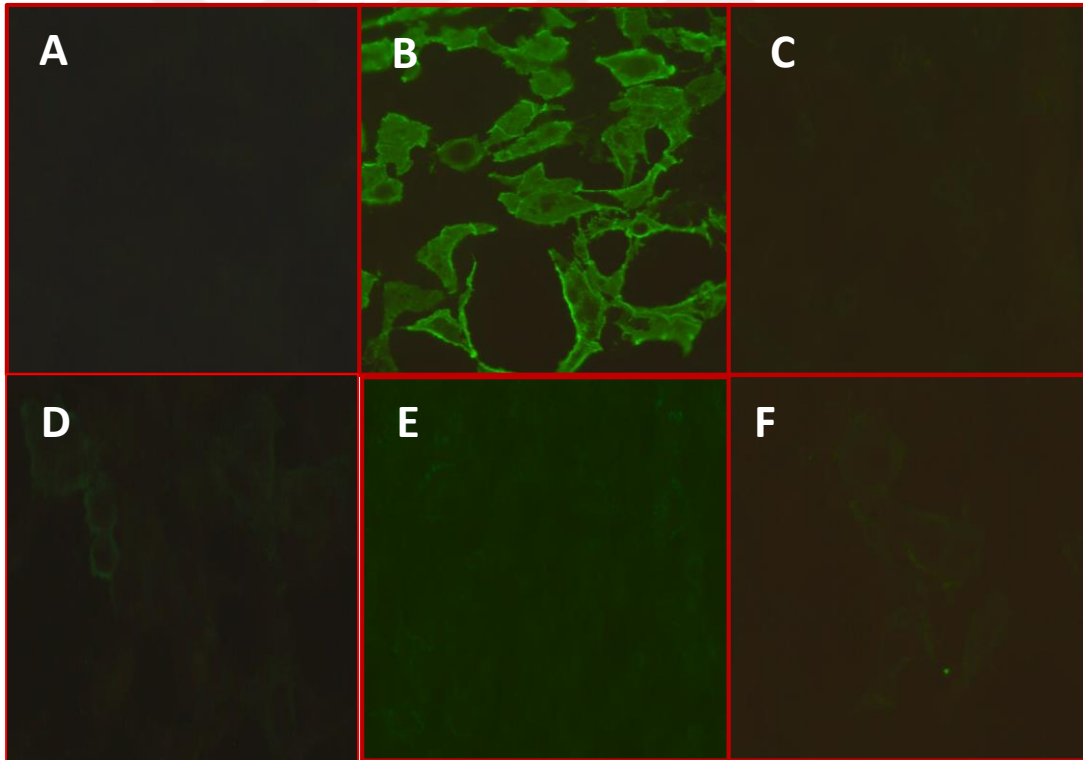
Hasta No	Tipi	ARSA Ekson 3	ARSA Ekson 4	ARSA Ekson 5	ARSA Ekson 7	ARSA Ekson 6 (yalancı eks.) p.Asn350Ser	ARSA Ekson 7 (polimorfizm) p.Thr391Ser	SUMF1
19	Erişkin lökodistrofi					c.1049 A>G p.Asn350Ser PDA1 (HOM)		
20	Çocuk lökodistrofi					c.1049 A>G p.Asn350Ser PDA1 (HOM) PDA2 (+)		
21	Çocuk lökodistrofi						c.1172 C>G p.Thr391Ser (HET)	
22	Çocuk lökodistrofi					c.1049 A>G p.Asn350Ser PDA1 (HET)	c.1172 C>G p.Thr391Ser (HOM)	
23	Erişkin lökodistrofi						c.1172 C>G p.Thr391Ser (HET)	
24	Erişkin lökodistrofi							
25	Erişkin lökodistrofi					c.1049 A>G p.Asn350Ser PDA1 (HET)	c.1172 C>G p.Thr391Ser (HET)	
26	Erişkin lökodistrofi					c.1049 A>G p.Asn350Ser PDA1 (HOM)	c.1172 C>G p.Thr391Ser (HOM)	
27	Erişkin lökodistrofi					c.1049 A>G p.Asn350Ser PDA1 (HET)	c.1172 C>G p.Thr391Ser (HOM)	

Hasta No	Tipi	ARSA Ekson 3	ARSA Ekson 4	ARSA Ekson 5	ARSA Ekson 7	ARSA Ekson 6 (yalancı eks.) p.Asn350Ser	ARSA Ekson 7 (polimorfizm) p.Thr391Ser	SUMF1
28	Erişkin lökodistrofi					c.1049 A>G p.Asn350Ser PDA1 (HET)		
29	Erişkin lökodistrofi					c.1049 A>G p.Asn350Ser PDA1 (HET)		

4.7. Plazma anti-MOG IgG, anti-sülfatid IgM ve anti-sülfatid IgG analizlerinin sonuçları

4.7.1. Hücreye dayalı yöntem (cell-based assay) ile anti-MOG IgG analizi sonuçları

MLD şüphesiyle gelen 28 hasta ile bu hastaların 34 aile bireyi, 20 demiyelinizan bulgulara sahip hastalıkları bulunan kontrol grubu ve 11 demiyelinizan bulguları olmayan kontrol grubu olmak üzere toplam 94 bireyde, hücreye dayalı yöntemle plazma anti-MOG IgG tayini yapıldı. 3 ve 22 nolu hastalarda anti-MOG IgG şüpheli (+) bulundu. Demiyelinizan kontrol grubundan bir MS hastasında anti-MOG IgG (+), bir diğer MS hastasında ise şüpheli (+) bulundu. Diğer tüm bireylerde anti-MOG IgG (-) bulundu (Şekil 4. 9.).



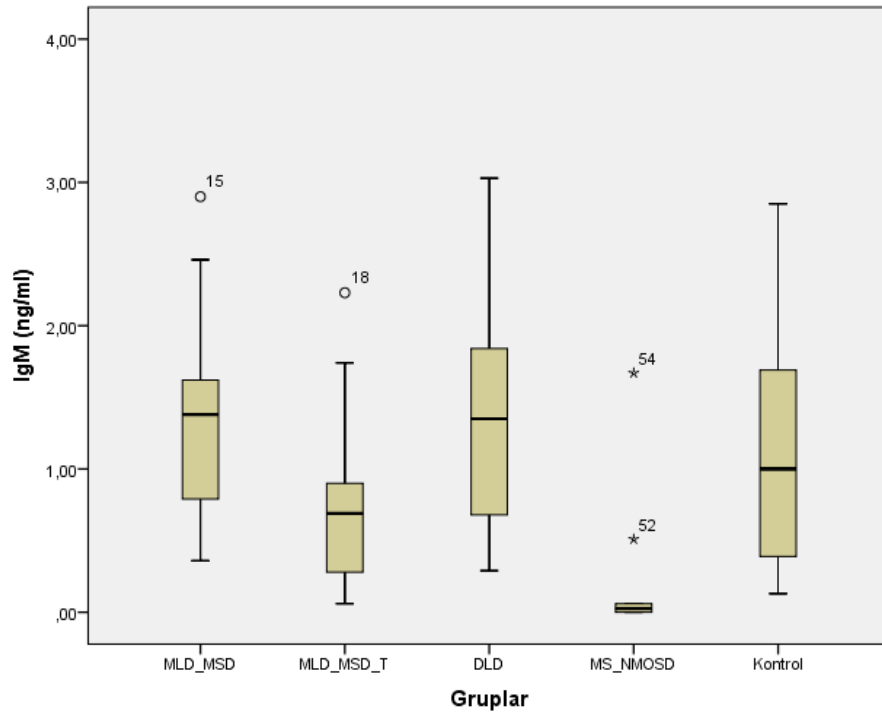
Şekil 4. 9. Hücreye dayalı yöntemle anti-MOG IgG tayini immünfloresan mikroskobu görüntüsü. A: Negatif kontrol, B: Pozitif kontrol, C: 3 nolu hasta (zayıf pozitif), D: 22 nolu hasta (zayıf pozitif), E: Demiyelinizan kontrol grubu hastası (zayıf pozitif), F: Demiyelinizan kontrol grubu hastası (pozitif)

4.7.2. ELISA yöntemi ile anti-sülfatid IgM antikor analizi sonuçları

On dört MLD ve 1 MSD hastası ilk grubu oluşturdu. Bu hastaların mutasyon taşıyıcısı olan 21 aile bireyi 2. grupta yer aldı. MLD şüphesiyle gelen, fakat MLD veya MSD tanısı almayan 11 hasta ile 4 ALD (adrenolökodistrofi) hastası 3. grubu oluşturdu. 4. grupta 8 MS ve 2 NMOSD (nöromiyelitis optika spektrumu hastalığı) hastası yer aldı. 5. grupta ise MLD şüphesiyle gelen hastaların mutasyon taşıyıcılığı bulunmayan 7 aile bireyi ve 2 sağlıklı kontrol ile birlikte 6 epilepsi, 1 disleksi, 1 menenjit, 1 psödotümör serebri ve 1 DMD (Duschenne musküler distrofi) hastası yer aldı (Tablo 4. 5.). Toplamda 80 bireyin anti-sülfatid IgM antikor analizi edildi. Grupların istatistik yöntemlerle karşılaştırılması sonucunda elde edilen bilgiler Şekil 4. 10 ve Tablo 4. 6.'da gösterilmiştir.

Tablo 4. 5. Anti-sülfatid IgM analiz grupları

Grup No	Gruplar
1	MLD-MSD
2	MLD-MSD-Taşıyıcı
3	Diğer Lökodistrofiler
4	MS-NMOSD
5	Kontrol



Şekil 4. 100. Anti-sülfatid IgM analiz grupları

Tablo 4. 6. Anti-sülfatid IgM analiz gruplarının karşılaştırılması

<i>Anti-sülfatid IgM (p değerleri)</i>	<i>MLD-MSD-T</i>	<i>DLD</i>	<i>MS-NMOSD</i>	<i>Kontrol</i>
MLD-MSD	0,011*	0,894	0,001*	0,259
MLD-MSD-T		0,017*	0,025*	0,142
DLD			0,001*	0,323
MS-NMOSD				0,001*

- MLD-MSD grubunun anti-sülfatid IgM sonucu, taşıyıcı grubuna göre anlamlı yüksek bulundu.
- MLD-MSD grubunun anti-sülfatid IgM sonucu, MS-NMOSD grubuna göre anlamlı yüksek bulundu.
- Taşıyıcı grubunun anti-sülfatid IgM sonucu, DLD grubuna göre anlamlı düşük bulundu.
- Taşıyıcı grubunun anti-sülfatid IgM sonucu, MS-NMOSD grubuna göre anlamlı yüksek bulundu.
- DLD grubunun anti-sülfatid IgM sonucu, MS-NMOSD grubuna göre anlamlı yüksek bulundu.

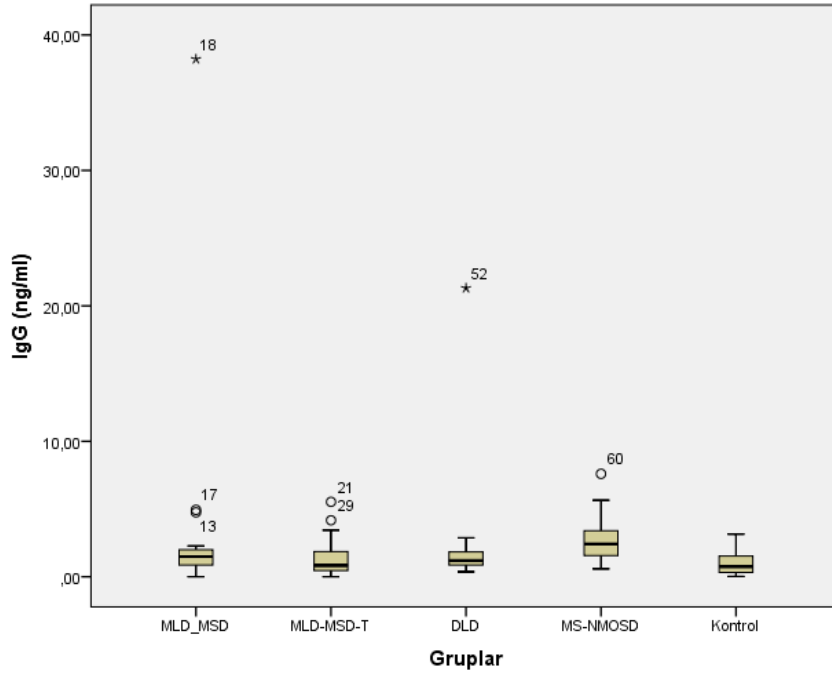
- Kontrol grubunun anti-sülfatid IgM sonucu, MS-NMOSD grubuna göre anlamlı yüksek bulundu.

4.7.2. ELISA yöntemi ile anti-sülfatid IgG antikor analizi sonuçları

On altı MLD ve 2 MSD hastası ilk grubu oluşturdu. Bu hastaların mutasyon taşıyıcısı olan 25 aile bireyi 2. grupta yer aldı. MLD şüphesiyle gelen, fakat MLD veya MSD tanısı almayan 11 hasta ile 4 ALD hastası 3. grubu oluşturdu. 4. grupta 13 MS ve 2 NMOSD hastası yer aldı. 5. grupta ise MLD şüphesiyle gelen hastaların mutasyon taşıyıcılığı bulunmayan 15 aile bireyi ve 10 sağlıklı kontrol ile birlikte 6 epilepsi, 1 disleksi, 1 menenjit, 1 psödotümör serebri, 1 DMD hastası ve parkinsonizm bulguları olan 2 hasta yer aldı (*Tablo 4. 7.*). Toplamda 110 bireyin anti-sülfatid IgG antikor analizi edildi. Grupların istatistik yöntemlerle karşılaştırılması sonucunda elde edilen bilgiler *Şekil 4.11* ve *Tablo 4.8.*'de gösterilmiştir.

Tablo 4. 7. Anti-sülfatid IgG analiz grupları

Grup No	Gruplar
1	MLD-MSD
2	MLD-MSD-Taşıyıcı
3	Diğer Lökodistrofiler
4	MS-NMOSD
5	Kontrol



Şekil 4. 111. Anti-sülfatid IgG analiz grupları

Tablo 4. 8. Anti-sülfatid IgG analiz gruplarının karşılaştırılması

Anti-sülfatid IgG (p değerleri)	MLD-MSD-T	DLD	MS-NMOSD	Kontrol
MLD-MSD	0,210	0,911	0,063	0,021*
MLD-MSD-T		0,287	0,002*	0,289
DLD			0,059	0,042*
MS-NMOSD				0,001*

- MLD-MSD grubunun anti-sülfatid IgG sonucu, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu.
- DLD grubunun anti-sülfatid IgG sonucu, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu.
- MS-NMOSD grubunun anti-sülfatid IgG sonucu, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu.
- Taşıyıcı grubun anti-sülfatid IgG sonucu, MS-NMOSD grubuna göre anlamlı düşük bulundu.

5. TARTIŞMA

Sfingolipidozlar içinde ülkemizde sık görülen MLD [1], lizozomal bir enzim olan arilsülfataz A veya bu enzimin aktivatör proteini olan sapozin B eksikliği sonucu oluşur. Biriken sülfatid özellikle oligodendrosit ve Shwann hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna, miyelin yapısının bozulmasına, demiyelinizasyon ve nörodejenerasyona neden olur. Klinik çeşitlilik ve laboratuvar tanısında yaygın olarak ASA enzim tayininin kullanılması bu hastalık grubunda MLD tiplerinin tanımlanması için yeterli değildir [5]. Bu nedenle, bu çalışmada klinik açıdan MLD şüphesi olan hastalarda hastalığın tiplerinin tanımlanması ve moleküler mekanizmalarının belirlenmesi amacıyla, lökositlerde ASA'nın da içinde bulunduğu 12 farklı lizozomal enzimin analizi, arilsülfataz izoenzimlerinin iyon değiştirici kromatografi ile ayrılarak inhibitör varlığı ve yokluğunda analizi, PCR-kesim enzimi ile ASA yalancı eksiklik analizi, ince tabaka kromatografisi ile idrarda sülfatid analizi ve Western blot ile protein analizi yapıldı. Hastalığa neden olan mutasyonlar DNA dizi analizi (ARSA, Sapozin B ve MSD için) ile belirlendi. Klinik fenotipler arasındaki farklılıklarda inflamasyonun rolü, anti-MOG ve anti-sülfatid analizleri ile değerlendirildi. İnflamasyonun rolünün değerlendirilmesinde yaşla uyumlu diğer nörodejeneratif hastalıklara sahip kontrol grubu (MS, ALD) ile nörodejeneratif hastalık bulgusu olmayan kontrol grubu (sağlıklı kontrol, diğer hastalıklara sahip takipte kontrol) çalışmaya dahil edildi. MLD'nin geç infantil, juvenil ve erişkin tipleri tanımlandı. Bir erişkin hastanın aile ağacı çıkarıldı ve aile bireylerinin tüm analizleri yapıldı. Bazı hastaların anne-babası ve kardeşi/kardeşleri analiz edildi. Bir hasta MSD tanısı aldı ve ileri analizleri yapıldı. MLD şüphesi ile analiz edilen ve tüm testleri normal çıkan hastaların diğer lökodistrofi grubu içinde olabileceğine karar verildi. Lökodistrofiler ilk olarak ve çoğunlukla santral sinir sisteminin beyaz cevherini etkileyen büyük bir grup nörolojik hastalıklardır.

5.1. ASA enzim analizi ve yalancı eksikliği

MLD şüphesi ile 29 hasta ve ailelerine ait 40 örnek analiz edildi. 29 hastanın 20'sinde ASA enzim düzeyi düşük bulundu, bu hastalardan birinde izoenzimlerden ASB ve başka bir sülfataz eksik bulundu ve bu hastaya MSD tanısı konuldu. Tanı, SUMF1 geninde hastalığa neden olan mutasyonun tanımlanmasıyla doğrulandı. Kalan 19 hastanın 16'sında hastalığa neden olan mutasyonlar belirlendi (*Tablo 4. 4.*). Diğer 3 hastanın ARSA geninin eksonlarında mutasyon saptanamadı. Bu hastalar için daha ileri analizler planlandı. ASA eksikliği olan ve diğer testleriyle birlikte MLD tanısı alan hastaların 3'ü erişkin tip, 12'si geç infantil tip, 1'i juvenil tip hastalardır. Erişkin tiplerde ASA düzeyi 5,32-8,50 $\mu\text{mol/g}$ protein/saat, geç infantil tip hastalarda 3,59-11,59 $\mu\text{mol/g}$ protein/saat arasında, 1 juvenil tipi hastamızda ise 4,35 $\mu\text{mol/g}$ protein/saat düzeyinde bulundu. Hastalık semptomları geç infantil tip hastalarda 2,5 yaşından önce, juvenil tipinde 6 yaşında, erişkin tip hastalarımızda 17 yaşından sonra ortaya çıkmıştır. ASA enzim analizi, lökodistrofi hastaları içinde MLD hastalığını tanımlamak için altın standart olma değerini korumaktadır. Çalışmamızda ASA enzim analizi hasta grubu (MLD-MSD) ve taşıyıcı grubunu, hasta grubu ile diğer lökodistrofiler grubunu istatistiksel olarak yüksek anlamlılıkta birbirinden ayırmaktadır (*Şekil 4.1.*). ASA aktivite tayini taşıyıcıları tanımlamakta kullanışlı bir test olmamakla birlikte bu çalışmada mutasyon analizi ile taşıyıcı olduğu belirlenmiş olan bireylerin bir kısmında ASA enzim aktivitesi sınırda düşük bulunmuştur. Bu sonuç, enzim aktivite sonucunun normal değer altındaki sınırda düşük bulunan değerlerinde bireylerin taşıyıcılık açısından değerlendirmelerinin yapılması gerektiğini göstermektedir. ASA enzim analizi, hastalardan alınan periferik kandan izole edilen lökositlerde sentetik kolorimetrik substrat p-nitrokatekol sülfat kullanılarak tayin edilmiştir. ASA enzimi için çeşitli biyolojik örnekler kullanılabilir. Çünkü ASA tüm çekirdekli hücrelerde sentezlenen bir proteindir. Bu çalışmada ASA aktivite tayini için en yaygın kullanılan ve en güvenilir sonucu veren periferik kandaki lökositler kullanılmıştır. Tayinde kullanılan kolorimetrik substrat, enzimin afinitesinin yüksek olduğu substrattır [5]. Bu substratı arilsülfatazın yaygın bulunan bir diğer izoenzimi olan arilsülfataz B de hidroliz etmektedir. Çalışmamızda Baum'un yüksek NaCl konsantrasyonunda arilsülfataz B'nin inhibisyonu esasına dayanan yöntemi

ASA tayini için kullanılmıştır. Ayrıca enzim analizi, DEAE selüloz iyon değiştirici kromatografi ile arilsülfataz izoenzimlerini fiziksel özelliklerine göre fraksiyonlarına ayırdıktan sonra, florometrik substrat 4-MU sülfat kullanılarak, ASA inhibitörü olan gümüş nitrat varlığı ve yokluğunda da yapılmıştır. Enzim düzeyi düşük çıkan 20 hastanın 16'sında MLD tanısı kesinleşmiştir. Bu nedenle, MLD tanısını doğrulamak ve tiplerini belirlemek için diğer analizlerin de mutlaka yapılması gerekmektedir.

Bu çalışma kapsamında 2 geç infantil tip hastanın presemptomatik kardeşi ASA ve idrarda sülfatid tayini ile MLD tanısı aldı ve tanı diğer analizler ve DNA dizi analizi ile doğrulandı. Tedavi yöntemlerinin klinik uygulamalarının yapılmaya başlandığı MLD hastalığında, gen tedavisi ve enzimi yerine koyma tedavileri, özellikle klinik belirtileri ortaya çıkmamış hastalar için çok değerlidir. Bu projede presemptomatik safhada tanımlanan hastaların henüz klinik belirtiler ortaya çıkmadan yeni tedavi yöntemlerinden yararlanması mümkün olabilecektir.

Enzim aktivitesi normalden düşük çıkan tüm hastalar ve aile bireylerinde enzim eksikliğinin patojenik mutasyon sonucu olan gerçek bir eksiklik olduğuna karar vermek üzere PCR-kesim enzimi analizi ile yalancı eksiklik analizi yapıldı. Yalancı eksiklik (Pd) analizi sonucunda MLD tanısı alan hastaların %25'inde (4/16) sık görülen Pd alleli, homozigot düzeyde saptandı. Bu hastalarda Pd mutasyonu, hastalığa neden olan mutasyonla birlikteydi. Hastalarda Pd mutasyonunun homozigot düzeyde normal popülasyona göre daha yüksek oranda görülmesi ve hastalığa neden olan mutasyon ile ilişkisi henüz açıklanamamaktadır. Avrupa toplumlarında normal popülasyonda homozigot düzeyde %1-2 oranında, heterozigot düzeyde %10-20 oranında Pd mutasyonu görülmektedir. Heterozigotluk oranının bu kadar yüksek olması seçici bir avantajının olduğunu düşündürmektedir. Ancak bu konu ile ilgili bir açıklama henüz bulunmamaktadır. Homozigot Pd ve ASA mutasyonu taşıyan hastaların anne ve babalarında heterozigot düzeyde Pd ve ASA mutasyonu saptanmıştır. Klinik bulguya rastlanmayan bu ebeveynlerin bir kısmında enzim aktivitesi normal düzeyin altında bulunurken, idrarda sülfatid saptanmamıştır. Türkiye'den yapılan bir diğer çalışmada Pd mutasyonu 18 hastadan sadece 1'inde homozigot, 1'inde de heterozigot düzeyde saptanmıştır [23].

Bir MLD hastasında homozigot Pd mutasyonunun yanısıra, ekson 7’de homozigot c.1172C>G p.Thr391Ser mutasyonu saptanmıştır. MLD grubunda diğer 3 hastada da ekson 7’de homozigot c.1172C>G p.Thr391Ser mutasyonu saptanmıştır. Bu polimorfizm daha önceki çalışmamızda tanımlanan hastalarda da hastalığa neden olan mutasyonla, Pd mutasyonu olmaksızın birlikte görülmüştür [52]. Bu nedenle c.1172C>G p.Thr391Ser polimorfik mutasyonunun hastalığa yatkınlık yapabileceği düşünülmüştür.

5.2. DEAE-selüloz iyon değiştirici kromatografi ile ASA ve ASB izoenzimlerinin fiziksel özelliklerine göre ayrımı

Hastalar ve ailelerinden elde edilen lökositler DEAE-selüloz kromatografi ile fraksiyonlara ayrılmış ve özellikleri değerlendirilmiştir. DEAE-selüloz zayıf anyon değiştiricidir. ASB proteini pozitif yüklere bağlanmayıp kolondan ayrılırken, ASA negatif yükleri ile pozitif kolondaki pozitif yüklere bağlanarak tutunur ve kolondan çıkabilmesi için ASA’nın kolonda bağlı olduğu pozitif yükten ayrılmasını sağlayacak tuz solüsyonuna ihtiyaç vardır. Bu çalışmada yapılan analizlerde ASA enzimi 0,10-0,20 M NaCl konsantrasyonlarında kolondan elde edilmiştir. Fraksiyonlarda florojenik substrat olan 4-MU sülfat kullanılarak tayin edilen enzim aktivitesinde, ASA enzim aktivitesinin 125 µM gümüş nitrat varlığında %70-90’ın üzerinde inhibe olduğu görülmüştür. İnhibitörlü ASA tayininde hastalarda saptanan enzim aktivitesinin minör anyonik arilsülfataza ait olduğu [48] veya enzimin mutasyon nedeniyle inhibitöre duyarsız hale geldiği düşünülmüştür. Minör arilsülfatazlar, ASA’dan çok ASB’ye benzemektedirler [53]. Ancak yükleri açısından ASB’den farklılık gösterirler. Bu da minör arilsülfataz pikinin hastalar ve ailelerinde neden tuz ile indiğini ve gümüş nitrata daha az duyarlı olduğunu açıklamaktadır. Minör arilsülfataz, doğal substrat olan sülfatidi (serebrozid sülfat) hidroliz edemez. İnhibitörsüz ve inhibitörlü enzim tayinlerinde elde edilen aktivitelerle çizilen grafiklerde ASA ve ASB eğrileri birbiri ile örtüşmüştür. Bu durum, DEAE-selüloz kromatografisi ile izoenzimlerin ayrıştığını gösterirken, aktivite sonuçları da izoenzimlerin birbirleri ile karışmadıklarını göstermektedir. Hastaların çoğunda ASA 0,10 M NaCl konsantrasyonunda maksimum

düzeyde kolondan ayrılmıştır. ASA enziminin gümüş nitrata duyarlı olduğu ve gümüş nitrat varlığında inhibe olduğu saptanmıştır [46].

MSD tanısı alan 6 numaralı hastada hem ASB hem de ASA aktiviteleri eksik bulunmuştur (*Şekil 4. 3. J*). Bu hastanın anne ve babasında ASB ve ASA pikleri saptanmış (*Şekil 4. 3. K, L*), babada ASA 0,10-0,15 M tuz konsantrasyonunda plato yapar şekilde elde edilmiştir. Bu izoenzim paterni, 9 numaralı geç infantil tip hastanın anne ve babasında (*Şekil 4. 3. O, P*), 14 numaralı erişkin tip hastanın kızında (*Şekil 4. 3. X*) ve MLD tanısı almayan diğer lökodistrofiler grubunda değerlendirilen 22 numaralı çocuk hastada (*Şekil 4. 3. AG*) da saptanmıştır. Bu bireylerde sık görülen Pd mutasyonu varlığı ve/veya Thr391Ser polimorfizmi ile ilişkili olarak enzimin davranışında değişiklik ortaya çıkmış olabilir.

5.3. İnce tabaka kromatografisi ile idrarda sülfatid analizi

MLD hastalığında, ASA veya sapozin B eksikliğinde sülfatid hidroliz edilemeyip hücreler ve dokularda birikir. Sülfatid, en fazla santral ve periferik sinir sistemindeki miyelin yapısında ve böbrekte bulunur. Ayrıca salgı epitelinin fazla olduğu solunum epiteli, gastrik mukoza, safra kesesi ve uterus endometriumunda, vücut sıvılarından serum, idrar ve BOS'ta da bulunur [5]. Buna ek olarak, memelilerde çeşitli 3-O-sulfogalaktozil içeren glikosfingolipitler tanımlanmıştır. Laktozilseramid 3-sülfat, böbrek ve idrarda bulunur. Bu sülfatlı lipit, karaciğerin esas sülfatlı glikolipitidir ve insan beyinde bulunmaz. İnsan böbreğinde sülfoglobotetraazilseramid de bulunmaktadır. Sülfatlı glikosfingolipitlerde doku ve lipit türüne bağlı olarak yağ asiti rezidüsü değişmektedir. Erişkin beyindeki sülfatidin %20-25'inde serebronik (C24h:0), oksinervonik (C24h:1) ve 22- ve 23-karbonlu doymuş yağ asitleri bulunur. Fetal ve immatür beyinde orta zincirli yağ asitleri (C16n:0, C18n:0 ve C18n:1) çoğunluktadır. Erişkin beyindeki sülfatidlerdeki en önemli nonhidroksi yağ asiti nervonik asit (C24n:1) ve lignoserik asit iken (C24n:0), fetal ve immatür beyinde orta zincirli yağ asitleri (C16n:0, C18n:0 ve C18n:1) çoğunluktadır. Erişkin beyninin karakteristik paterninin gelişmesi, miyelinizasyonla başa baş gider. İnsan beyni örneklerinde sülfatidlere odaklanmış kütle spektrometrik lipit incelemesi, hidroksillenmiş sülfatidlerin gri cevherden çok beyaz cevherde

bulunduğunu göstermiştir. Spinal kord sülfatidleri beyindeki beyaz cevherde bulunan yağ asitleri ile aynı paterne sahiptirler. Bununla birlikte periferik sinirin sülfatidleri, önemli oranda fazla doymuş yağ asitleri içerirler. Bu da sıkı paketlenmiş miyelin kılıfının oluşmasına yardımcı olur.

Çalışmamızda ince tabaka kromatografisi ile sülfatid analizi [54] sonucunda hastaların 17 tanesinin idrarında C18-sülfatid saptandı. Bazı hastalarda ve aile bireylerinde standart sülfatid bandının üstünde ve altında ek bantlar görüldü (*Şekil 4. 4.*). Bu farklılık, glikosfingolipitlerin yağ asiti içeriğindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. İdrarda kaba sülfatid fraksiyonu, çok sayıda farklı türler içerir. Farklılığı sağlayan, en yaygın görülen sülfatid olan sülfatlanmış galaktozilseramid, yağ asiti zincirinin uzunluğunun ve bazen de sfingozin bazının farklılığının sonucudur. Uzun doymuş yağ asiti zincirine sahip olan sülfatidler, ince tabaka kromatografisinde kullanılan çözücü sisteminde daha kısa zincirli yağ asitine sahip olan daha az hidrofobik sülfatidlerden daha hızlı yürümektedir. Sülfatid standardı hizasında gördüğümüz bant C18 yağ asiti içeren, altındaki bant ise, sülfatidin daha kısa yağ asiti zinciri içeren formunu göstermektedir. Bu bantların altındaki bant, seramid triheksozit bandıdır. Standartların çok altında olan bantlar muhtemelen klasik sülfatidler değil, daha çok glikosifingolipitler veya SM3 (sülfatlı laktozilseramid) gibi daha yüksek glikosifingolipitler olabilir. C18-sülfatid standardının üzerinde gördüğümüz bant, böbrek dokusundan kaynaklanan oldukça hidrofobik çok uzun yağ asiti zincirine sahip bir sülfatid türünü temsil edebilir. Bu bantların tam doğasını tanımlamak oldukça zordur ve bunun için farklı MS analizlerine ihtiyaç vardır. Bir çalışmada, tandem-MS kullanılarak kurutulmuş idrar lekelerinde yapılan analizle 21 hastada C22:0, C22:0-OH, C24:0, C24:1-OH ve C24:0-OH sülfatidlerin normale göre hastayı ayırt ettirici sülfatidler olduğu gösterilmiştir [55].

Hastalardan alınan idrar dilüe olduğu zaman kromatogramda bantlar silik çıkmaktadır (Dr. Asuman Özkara'nın Dr. David Wenger ile değerlendirmesi). Bu nedenle daha derişik olan sabah idrarından 20 ml alınarak, ekstraksiyonlar için kullanılmıştır. Glikosfingolipitleri görünür kılmak için şeker kısımlarını boyayan orsinol kullanılmıştır. Orsinol ile şeker içeren bileşikler mor renk alırken, diğerleri yeşilimsi-sarımsı boyanmaları nedeniyle ayırt edilebildiler. (*Dr. Wenger*).

Bir başka önemli sorun da, özellikle erişkin kişilerin idrarlarında bulunan tuzların glikosfingolipitlerin ince tabaka kromatografisinde yürüme hızını ve lekelerin görünümünü etkilemeleridir. Test edilecek bileşiklerin aynı saflıkta hazırlanarak uygulanması bu nedenle önem kazanmaktadır (Dr. Asuman Özkara'nın Prof. Konrad Sandhoff ile değerlendirmesi). İdrardan, tuzdan arındırılmış kısmi saflaştırılmış bir asidik glikosfingolipit fraksiyonunun hazırlanması, ince tabaka kromatografisinde standart ve örneklerin yürüme paternindeki farklılıkları ortadan kaldıracaktır. Analizlerde örneklerden tuzların uzaklaştırılmasına ve standart bir protokol uygulanmasına özen gösterilmiş, tuzlar mekanik yolla uzaklaştırılmıştır.

Sülfatid analizi yapılan idrar örneklerinde kreatinin miktarları analiz edildi. Her kromatografi tabakasında standardın yoğunluğuna bağlı olarak sülfatid bantlarının yoğunluğu kantifiye edildi ve kreatinin miktarına oranlanarak standardize edildi. Ancak semikantitatif yöntemin sülfatid miktarını ifade etmek açısından kullanışlı olmadığına karar verildi. Çeşitli çalışmalarda idrarı, kreatinin konsantrasyonuna veya kontrol lizozomal enzime göre kromatograma uygulamanın başarılı sonuçlar vermediği bildirilmiştir [54].

İdrarda sülfatid sadece klasik MLD, MSD ve sapozin B eksikliğinde değil, aynı zamanda MLD-hastalığına neden olan mutasyon açısından taşıyıcı olan kişilerde veya hastalığa neden olan mutasyon olmaksızın homozigot düzeyde Pd mutasyonuna sahip kişilerde veya MLD-hastalığına neden olan mutasyon ve Pd mutasyonu açısından birleşik heterozigot olan kişilerde de saptanabilir [54, 56]. Bu çalışmada, MLD mutasyonu/Pd mutasyonu açısından birleşik heterozigot olan ebeveynlerde ve aile bireylerinde idrarda sülfatid saptanmadı. MLD hastaları ve MSD hastasında güçlü sülfatid bantları saptandı. Güçlü sülfatid bandı saptanan örneklerde, kesin olarak MLD veya MSD hastalığı düşünülmelidir. Ekstraksiyonlar için sülfatidin derişik olduğu sabah idrarı kullanılmalıdır. Bu çalışmada da MLD hastaları ve MSD hastasında güçlü sülfatid bantları görüldü (*Şekil 4. 4. A-M*). ASA enzim düzeyi normal olan ve klinik bulguları MLD'ye benzeyen vakalarda idrarda sülfatid analizi, MLD tiplerinden sapozin B eksikliği hakkında bilgi vermesi bakımından çok değerlidir. Bizim çalışmamızda ASA düzeyi normal olan vakalarda idrarda sülfatid analizi yapılmış, şüpheli sülfatid bandı görülenlerde sapozin B geninin DNA dizi analizi yapılmış, ancak sapozin B geni normal bulunmuştur. Tekrarlayan idrar sülfatid analizlerinde bu

hastalarda idarda sülfatid saptanmamıştır. Bu çalışmada analiz edilen vakalar içinde çok nadir görülen sapozin B eksikliği görülmemiştir. Ancak yine çok nadir bir hastalık olan ve literatürde sınırlı sayıda tanımlanmış vaka yayınlanmış olan MSD tanısı, çalışmamızda bulunan bir hastaya konulmuştur.

5.4. Hastalığa neden olan mutasyonların genotip-fenotip ilişkisi

Bu çalışmada ARSA, sapozin B ve SUMF1 geninin DNA dizi analizi yapılmıştır. ARSA geninin analizi tüm hastalarda, SUMF1 geninin analizi 2 hastada, sapozin B geninin analizi ise 1 hastada yapıldı. MLD ve MSD hastalığına neden olan mutasyonlar *Tablo 4.4'te* gösterilmiştir. MLD hastalığına neden olan ve ARSA geninin ekson 2/ekson 3 kesim bölgesi, ekson 3, ekson 4, ekson 5 ve ekson 7'sinde bulunan toplam 11 mutasyon, ekson 6'da ASA yalancı eksiklik mutasyonu ve ekson 7'de bir polimorfizm tanımlanmıştır. Bu mutasyonlardan 3 tanesi birleşik heterozigot halde hastalığa neden olmaktadır. SUMF1 geninde MSD hastalığına neden olan bir mutasyon tanımlanmış, sapozin B dizi analizi normal bulunmuştur.

MLD hastalığına neden olduğu saptanan bu mutasyonlar arilsülfataz A proteininin ikincil yapısında 3 farklı bölgede yoğunlaşmıştır: Majör beta-tabakayı da içeren tüm sülfatazlarda korunmuş bölgede, minör beta-tabakada ve bağlantı bölgelerinde [57]. Geç infantil tip MLD hastalığına neden olan mutasyonlar, enzimin tüm sülfatazlarda korunmuş olan bölgesinde yer almaktadır. Minör beta-tabaka bölgesinde yer alan mutasyon ise, juvenil tipi hastalığa neden olmuştur. Korunmuş bölgenin dışında bağlantı bölgesinde ve D alfa sarmalda değişikliğe neden olan mutasyonlar ise, geç infantil tipte hastalığa neden olmuşlardır.

Hasta lökositlerinde yapılan Western blot analizinde, üç hastada ASA proteini hiç saptanmazken, bir hastada az miktarda saptandı (*Şekil 4.8.*). ASA proteininin saptanamadığı veya az miktarda saptandığı hastalarda, mutasyonun proteinde önemli yapı bozukluğuna neden olduğu, proteinin tam veya kısmen yıkılmasına yol açtığı düşünüldü. Western blot analizi ile diğer hastalarda belirgin ASA protein bantları gözlemlendi (*Şekil 4. 8.*). Bu sonuç, enzim aktivitesinin düşük saptandığı bu hastalarda enzimin yıkılmadığını ancak mutasyon nedeniyle fonksiyonsuz olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, fonksiyonsuz proteinleri kurtarmaya yönelik ilaç adayı moleküllerin geliştirilmesinde kullanılabilir.

Hastalarda saptanan mutasyonlardan Trp318Cys daha önce ilk kez geç infantil tip MLD'ye sahip bir Türk hastada homozigot düzeyde tanımlanmış ve in vitro mutagenez çalışması ile mutasyonun aktivite eksikliğine neden olduğu, ancak enzimin hücrede az miktarda var olduğu gösterilmiştir [52, 58]. Bu çalışmada Trp318Cys mutasyonu, farklı hastalarda Gly309Ser ve Ile181Ser mutasyonları ile birleşik heterozigot olarak saptanmıştır. Gly309Ser mutasyonu ile birleşik heterozigot olduğu hasta ve presemptomatik kardeşi geç infantil tip fenotip gösterirken, Ile181Ser mutasyonu ile birleşik heterozigot bulunduğu hasta erişkin tip fenotipe neden olmaktadır. Ile181Ser mutasyonu MLD hastalığına neden olan yaygın görülen 3 mutasyondan biridir [59]. Gly309Ser mutasyonu için fonksiyon çalışması yapılmış, mutasyonun enzim aktivitesini çok azalttığı ve mutant enzimin lizozoma ulaştığı, ancak dayanıklılığının azalmış olduğu gösterilmiştir [59]. Bu çalışmada ARSA geni Ekson 5 c.925G>A, p.Gly309Ser mutasyonu 3 geç infantil tip MLD'ye sahip hastada homozigot düzeyde tanımlanmıştır. Bu hastalardan 2'si Doğu Anadolu Bölgesi'nde birbirine yakın farklı şehirlerde yaşayan akrabalar. Diğer hasta da Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan bir şehirde yaşamaktadır. Diğer sık görülen mutasyonlardan ekson 2/ekson 3 kesim bölgesinde bulunan c.465+1G>A mutasyonu [59] bu çalışmada geç infantil fenotip gösteren bir diğer hastada saptanmıştır. c.465+1G>A mutasyonu literatürde bildirilmiş tüm MLD mutasyonlarının %19,7'sini oluşturmaktadır.

ARSA Ekson 3'te c.634G>C, p.Ala212Pro mutasyonu daha önce İtalya'da bir grup tarafından bir hastada, ayrılma bölgesi mutasyonu ile birlikte birleşik heterozigot olarak tanımlanmış ve ekspresyon çalışması ile enzim aktivitesinde önemli eksikliğe neden olduğu gösterilmiştir [60, 61]. Bizim çalışmamızda da Ala212Pro değişimi geç infantil tip MLD'ye neden oldu, enzim aktivitesi düşüktü ve protein saptanamadı. Bu mutasyon, enzimde korunmuş bölgenin dışındaki α -sarmal yapısında değişikliğe neden olmaktadır.

ARSA Ekson 3'te c.577delT, p.Trp193GlyfsTer5 mutasyonu [60, 61], delesyon nedeniyle çerçeve kaymasına ve 5 amino asit sonra proteinde dur kodonuna ve protein sentezinin erken sonlanmasına neden olmaktadır. Geç infantil tip MLD olan bir hastamız, bu mutasyonu homozigot olarak taşımaktadır. Beraberindeki diğer mutasyon henüz belirlenememiştir. ASA enziminde önemli aktivite eksikliği yaptığı

ve lökositlerde ASA proteininin olmadığı saptanmıştır. p.Trp193GlyfsTer5 mutasyonu daha önce bir başka mutasyonla “compound” heterozigot olarak saptanmıştır ve juvenil tip MLD hastalığına neden olmaktadır [62]. Homozigot olarak ilk kez bu çalışma ile tanımlanmıştır ve geç infantile tip MLD hastalığına neden olmaktadır.

ARSA ekson 4’te c.821C>T, p.Thr274Met mutasyonu Lübnan’lı hastalarda tanımlanmıştır ve geç infantil tip MLD hastalığına neden olmaktadır [63]. Bizim çalışmamızda da aynı mutasyon, geç infantil tip hastalarımızdan birinde tanımlanmıştır ve bu hasta ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nden gelmektedir. Değişen amino asit, sülfatazların korunmuş bölgesinde 11 numaralı anti paralel beta tabakalı yapıda yer almaktadır.

ARSA Ekson 5’te c.887G>A, p.Gly296Asp ve Ekson 5’te c.926G>A, p.Gly309Asp mutasyonları ilk kez bu çalışma ile tanımlanmışlardır. Her ikisi de geç infantil tip MLD hastalığına neden olmaktadır. Bu mutasyonlardan ilki, iki sistein amino asiti arasındaki bağlantı bölgesinde, diğeri ise F sarmal yapısında değişikliğe neden olmaktadır. Her iki mutasyon da proteinin korunmuş bölgesi içinde yer almaktadır. Mutasyon nedeniyle proteinde gerçekleşen Gly→Asp değişiminin sağladığı karboksil grubu proteinin doğru katlanmasında bozukluğa neden olabilir. Bu nedenle mutasyonlar, proteinde önemli fonksiyon bozukluğuna ve şiddetli klinik fenotipe neden olmuşlardır.

ARSA Ekson 5’te c.896G>T, p.Arg299Leu mutasyonu ilk kez homozigot düzeyde bu çalışmada tanımlanmıştır ve erişkin tip MLD hastalığına neden olmaktadır. Mutasyon, korunmuş bölgede iki sistein amino asiti arasındaki bağlantı kısmında yer almaktadır. Mutasyon, enzimde aktivite eksikliğine ve proteinin tamamen yıkılmasına neden olmaktadır. 14 numaralı hasta, bu mutasyonun yanısıra N-glikozilasyon bozukluğuna neden olan yalancı eksiklik mutasyonunu da homozigot düzeyde taşımaktadır. Bu durum erişkin hastada, neden enzim aktivitesinin geç infantil tipte olduğu kadar düşük olduğunu ve mutant proteinin dayanıklılığının azalarak tamamen yıkıldığını açıklamaktadır. Erişkin hastanın aile ağacı çıkarılmış ve aynı mutasyonu taşıyan erişkin kız kardeşi de (15 numaralı hasta) MLD tanısı almıştır. Ailedeki taşıyıcılar belirlenmiştir.

ARSA geni Ekson 7'de AC>GG c.1171 A>G, c.1172C>G, ACT>GGT p.Thr391Gly mutasyonu juvenil tipi MLD'ye neden olmaktadır ve daha önce bir Türk hastada tanımlanmıştır [64]. 391. amino asit olan treonin polimorfiktir. Bazı kişilerde treonin yerine serin bulunabilmektedir. Bu hastada polimorfik amino asit kodonunda bir diğer baz değişimi, kodonu glisin amino asitini kodlar hale getirmiştir.

SUMF1 geninde ekson 9'da MSD'ye neden olan c.1045C>T mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyon proteinde p.Arg349Trp değişimine neden olmaktadır ve ilk kez Türk toplumunda rapor edilmiştir. FGE'nin stabilitesini ve katalitik aktivitesini bozduğu ve homozigot şeklinin her zaman şiddetli klinik fenotipe neden olduğu belirtilmiştir [65, 66]. Bu mutasyon ayrıca Fransa'da bir hastada bir başka mutasyonla birlikte birleşik heterozigot olarak tanımlanmıştır. Geç infantil tip MSD'ye ve ciddi klinik fenotipe neden olduğu rapor edilmiştir. Aktif merkezin yakınlarında protein katlanmasını bozduğu düşünülmüştür. 6 numaralı hastada bu mutasyon homozigot düzeyde saptanmıştır ve şiddetli klinik fenotipe neden olmaktadır. ARSA geninde mutasyon saptanmaması, ASA enzimi ve ASB enziminin defektif olması, idrarda güçlü sülfatid varlığı MSD hastalığını düşündürmüştü ve SUMF1 geninin analizi ile hastalığa neden olan mutasyon belirlenmiştir. Bu hastada ASA proteinini yıkılmamakta, hücrede fonksiyonsuz olarak bulunmaktadır.

MLD hastaları ve MSD hastasının anne ve babaları hastalığa neden olan mutasyon açısından taşıyıcıdırlar. Otozomal resesif kalıtılan bu hastalıklarda hastalığa neden olan mutasyonun belirlenmesinde aile çalışması bu nedenle gerekli ve değerlidir.

5.5. İnflamasyonun patogenezdaki rolü

Sülfatidler miyelin tabakasının önemli bileşenleridir. Miyelin tabakasının dış zarında yerleşirler ve muhtemelen proteolipit protein ve MAL proteinine güçlü iyonik ilişkilerle bağlı olarak bulunurlar. Sülfatidlerin oligodendrositlerin farklılaşmasındaki, miyelinin devamlılığındaki ve akso-gliyal bağlantıların oluşumundaki rolü önemlidir, ancak bu rolü tam olarak açıklanmamıştır. Sülfatid oligodendrosit farklılaşmasının inhibitörüdür. Artmış sülfatid oligodendrosit farklılaşmasını geciktirirken, azalmış sülfatid oligodendrosit öncüllerin

differentiasyasyonunu hızlandırır. Kültürü yapılmış oligodendrosit öncüllere sülfatid antikorunun eklenmesi aynı etkiyi oluşturur ancak galaktozilseramide karşı geliştirilmiş antikorların eklenmesi aynı etkiyi yaratmaz. Sülfatid oligodendrosit sayısını da etkiler. Sülfatidden yoksun fare beyinde oligodendrositlerin sayısı artar [5]. Schwann hücrelerinde sülfatidin ekstraselüler matriks ile etkileşiminin miyelizasyon için önemli olduğu gösterilmiştir. Hayvan deneyleri ile sülfatidin miyelinin yapımından çok devamlılığının sağlanmasında rolü olduğu sonucuna varılmıştır. Sülfatid, Ranvier düğümünün doğru düzenlenmesinde de önemli role sahiptir. Aksonal rejenerasyonda rol oynar. Erken dönemde düzeyi düştüğü için Alzheimer hastalığında bir biyobelirteç gibi kullanılır. İnsidental Parkinson hastalığında da düzeyi düşer. Sülfatid ayrıca pankreasta Langerhans adacıklarında beta hücrelerinde insülin yapımına yardımcı olur. Proinsulinin doğru katlanmasını, salgılanan insülinin monomerleşmesini sağlar. Miyelinizasyon sırasında sentezi en fazladır, erişkinde sentez yavaşlar. Anti-sülfatid antikorları HIV, MS ve diyabetik nöropatilerde ve periferik nöropatilerde gösterildi. Böylece sülfatide karşı gelişen otoantikorların otoimmün hastalıkların patogeneğinde rolü olduğu anlaşıldı [67-70].

MOG, santral sinir sisteminde miyelin tabakasında ve oligodendrositlerin yüzeyinde sentezlenen bir glikoproteindir. MOG'a karşı gelişen otoantikorların saptanması, özellikle çocukluk çağında kazanılmış demiyelinizan hastalıkların tanısında önemlidir. Aynı zamanda erişkin demiyelinizan hastalıkların tanısı için de önemlidir. Bazı MS ve nöromiyelitis optika vakalarında antikor oluşumunun arttığı rapor edilmiştir [71-73].

Lizozomal depo hastalıklarında enzim defekti nedeniyle yıkılamayan ve hücrede biriken maddeler inflamasyona neden olurlar. Nöroinflamasyon nörodejenerasyona ve demiyelinizasyona yol açar. MLD hastalığında ve diğer lizozomal depo hastalıklarında enzimin kalan aktivitesi ve hastalığa neden olan mutasyonun yanısıra hastalar arası klinik şiddet farklılığında inflamasyonun rolü olduğu düşünülmektedir [74-76].

MLD'nin fare modelinde simvastatin ile antiinflamatuvar tedavi sonucunda nöroinflamasyonun ve santral sinir sistemi bulgularının iyileştiği gösterilmiştir [77]. Bu nedenle, çalışmamızda inflamasyonun demiyelinizasyondaki etkisi, biriken madde

sülfatide ve oligodendrosit zarındaki antijenik MOG proteinine karşı gelişebilecek antikorların analizi ile değerlendirilmiştir. Anti-sülfatid ve anti-MOG analizi ile hastalardaki klinik fenotipin farklılaşmasında immün aktivasyonun rolü incelendi. Anti-sülfatid IgG analizi sonuçlarında hasta, taşıyıcı, diğer lökodistrofiler (DLD), MS-NMOSD ve kontrol grupları topluca değerlendirildiğinde gruplar arası fark anlamlı bulundu. Bu anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğu ayrı ayrı grupların karşılaştırılması ile değerlendirildi. MLD+MSD tanısı almış grupta anti-sülfatid IgG antikor düzeyleri kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. Ancak MS+NMOSD grubunda taşıyıcı ve kontrol grubuyla arasındaki fark çok anlamlı bulundu. Diğer lökodistrofilerle kontrol grubu arasında da çok zayıf bir anlamlılık saptandı. MLD tanısı almayan ancak diğer lökodistrofiler grubunda düşünülen bir hastada anti-sülfatid IgG aynı gruptaki diğer hastalardan çok yüksek bulundu (*Şekil 4. 11*). Aynı hastada immunfloresan yöntemle anti-MOG şüpheli pozitif bulundu (*Şekil 4. 9. D*). Bu hastadaki demiyelinizasyon bulgularında immün aktivasyonun rolü olabileceği düşünüldü. MLD hasta grubunda 3 numaralı geç infantil tip hastada anti-MOG şüpheli pozitif bulundu (*Şekil 4. 9. C*). Bu hastada aynı zamanda anti-sülfatid düzeyi de diğer hastalara göre daha yüksekti. Anti-MOG düzeyi MS+NMOSD grubunda bir hastada pozitif bulunurken, bir başka hastada zayıf pozitif bulundu (*Şekil 4. 9. E, F*).

Hastalarda akut atağı değerlendirmek üzere anti-sülfatid IgM analizi de yapıldı. Tüm gruplar arasındaki fark anlamlı bulundu. Gruplar tek tek karşılaştırıldığında MLD+MSD grubu ile MS+NMOSD ve MLD+MSD grubu ile MLD taşıyıcı grubu arasında anlamlı fark bulundu. Diğer lökodistrofilerle MS+NMOSD grubu ve taşıyıcı grubu arasında anlamlı fark bulundu. Kontrol grubu ve MS+NMOSD grubu arasında anlamlı fark bulundu (*Şekil 4. 10*). Önceki çalışmalarda demiyelinizan nöropatilerde IgM'nin değeri bildirilmişti. Ancak nöropati yapan çeşitli hastalıklarda yükselmesinin, spesifik bir gösterge olarak kullanılması konusu tartışmalara neden olmuştu [67]. Gaucher hastalığının nöronal formunda da IgM, demiyelinizan nöropati ile ilişkili bulunmuştur [78]. Çalışmamızda, 3 numaralı geç infantil tip MLD hastasında hem anti-sulfatid IgM diğer hastalara göre daha yüksek, hem de anti-MOG şüpheli pozitif çıkmıştır. Bu hastada homozigot düzeyde saptanan delesyon mutasyonu çerçeve kaymasına ve 5 amino asit sonrasında dur kodonuna neden olarak proteinin erken

sonlanmasına neden olmaktadır. Literatürde birleşik heterozigot olarak tanımlanmış olan bu mutasyon geç infantil tipe ve şiddetli klinik fenotipe neden olmaktadır [67-70]. MSD tanısı alan 6 numaralı hastanın değeri de diğer hastalara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu hastada birden fazla sülfatazda eksiklik olması inflamasyonun daha şiddetli olmasına neden olmuş olabilir. Bu sonuçlar MLD ve diğer lökodistrofi hastalarında demiyelinizasyon açısından klinik fenotipteki farklılığı değerlendirmede anti-sülfatid IgM, MS+NMOSD hastalarında anti-sülfatid IgG, MSD hastalarında ise her iki antikorun da bilgi verici olabileceğini düşündürmektedir. Anti-MOG IgG analizi lökodistrofilerde de immün aktivasyonu değerlendirmede MS ve NMOSD’de kullanıldığı gibi faydalı olacaktır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada MLD hastalığı şüphesi ile başvuran hastalar hastalığın tüm tiplerini tanımlamak için gerekli analizlerle değerlendirilmiş ve MLD tipleri belirlenmiş, hastalığa neden olan mutasyonlar ve mutasyonun protein üzerine etkisi saptanmış, klinik şiddette inflamasyonun rolü, antikor oluşumları üzerinden değerlendirilmiştir. Toplumumuzda MLD hastalığının tiplerinin tanımlanması ve moleküler mekanizmalarının belirlenmesi literatürde hastalık hakkındaki bilgilerin genişlemesini sağlayacaktır. Sonuçların bir kısmı 2018 yılında 2 yurtdışı ve 1 uluslararası katılımlı ulusal kongrede sözlü ve poster olarak sunulmuş, 2019 yılında da 3 yurtdışı kongrede sunulmak üzere kabul edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmanın sonuçları ile tanımlanan hastaların, MLD hastalığının kullanılmakta olan hematopoetik kök hücre tedavisi (HSCT), geliştirilmekte olan gen tedavisi ve intratekal enzim tedavisinden faydalanması mümkün kılınmıştır. Kurulan analiz yöntemleri ile özellikle erken aşamada ve presemptomatik dönemlerde tanımlanan hastalar yeni tedavi olanaklarından yararlanmaya aday hastalardır. Bu çalışma kapsamında 2 hastanın kardeşi HSCT için kurduğumuz kapsamlı testlerle değerlendirilmiş ve 1 hastaya kardeşinden HSCT yapılmıştır. Diğer hasta da bu tedavi için değerlendirilmektedir. Bu çalışmanın sonuçları aynı zamanda otozomal resesif geçiş gösteren nadir hastalıklarda aile çalışmalarının değerini bir kez daha vurgulamaktadır. Çalışma kapsamında olan ve MLD tanısı almayan diğer hastalar diğer lökodistrofiler açısından araştırılacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Özkara, H.A. and Topçu, M., *Sphingolipidoses in Turkey*. Brain and Development, 2004. **26**(6): p. 363-366.
2. Kolodny, E.H. and Moser, H., *Sulfatide lipidosis: metachromatic leukodystrophy*. Metabolic basis of inherited disease/[edited by] John B. Stanbury...[et al.], 1983.
3. Gieselmann, V., et al., *Arylsulfatase A pseudodeficiency: loss of a polyadenylation signal and N-glycosylation site*. Proc Natl Acad Sci USA, 1989. **86**(23): p. 9436-40.
4. Thudichum, J., *A treatise on the chemical constitution of the brain*, Bailliere, London. Tindall and Cox, 1884.
5. Gieselmann, V. and Ingeborg, K.-M., *Metachromatic Leukodystrophy*, in *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, A.L. Beaudet, et al., Editors. 2014, The McGraw-Hill Companies, Inc.: New York, NY.
6. Crawford, M.d.A., *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Journal of Clinical Pathology, 1983. **36**(8): p. 961-961.
7. Eckhardt, M., *The Role and Metabolism of Sulfatide in the Nervous System*. Molecular Neurobiology, 2008. **37**(2): p. 93-103.
8. Kikkawa, Y., et al., *Regional distribution of sulfatide in human kidney, and anti-sulfatide antibodies in sera from patients with nephritis detected by TLC immunostaining*. Nihon Jinzo Gakkai Shi, 1991. **33**(7): p. 635-42.
9. Yaghootfam, A., et al., *Cerebroside sulfotransferase forms homodimers in living cells*. Biochemistry, 2007. **46**(32): p. 9260-9.
10. Norton, W.T. and Poduslo, S.E., *Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation*. J Neurochem, 1973. **21**(4): p. 759-73.
11. Ebadi, M. and Chweh, A., *Inhibition by arylsulphatase A of Na-independent [3H]-GABA and [3H]-muscimol binding to bovine cerebellar synaptic membranes*. Neuropharmacology, 1980. **19**(11): p. 1105-11.
12. Lingwood, D., et al., *Regulation of fish gill Na(+)-K(+)-ATPase by selective sulfatide-enriched raft partitioning during seawater adaptation*. J Biol Chem, 2005. **280**(44): p. 36545-50.
13. van den Berg, L.H., et al., *The gp120 glycoprotein of HIV-1 binds to sulfatide and to the myelin associated glycoprotein*. J Neurosci Res, 1992. **33**(4): p. 513-8.
14. Ishizuka, I., et al., *Isolation and characterization of a novel sulfoglycolipid, 'seminolipid,' from boar testis and spermatozoa*. J Biochem, 1973. **73**(1): p. 77-87.
15. Kornblatt, M.J., et al., *Studies on the structure and formation during spermatogenesis of the sulfoglycerogalactolipid of rat testis*. Can J Biochem, 1974. **52**(8): p. 689-97.
16. Zeng, Y., et al., *Endosomes and lysosomes play distinct roles in sulfatide-induced neuroblastoma apoptosis: potential mechanisms contributing to abnormal sulfatide metabolism in related neuronal diseases*. Biochem J, 2008. **410**(1): p. 81-92.
17. Draper, R.K., et al., *Purification, molecular weight, amino acid, and subunit composition of arylsulfatase A from human liver*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1976. **177**(2): p. 525-538.

18. Vagedes, P., et al., *Driving forces of protein association: the dimer-octamer equilibrium in arylsulfatase A*. Biophys J, 2002. **83**(6): p. 3066-78.
19. Dierks, T., et al., *Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997. **94**(22): p. 11963-8.
20. Ghosh, D., *Three-dimensional structures of sulfatases*. Methods in Enzymology, 2005. **400**: p. 273-293.
21. Stumpf, D.A., et al., *Mucopolysaccharidosis type vi (maroteaux-lamy syndrome): I. sulfatase b deficiency in tissues*. American Journal of Diseases of Children, 1973. **126**(6): p. 747-755.
22. Coleman, J.E., *Structure and mechanism of alkaline phosphatase*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1992. **21**: p. 441-83.
23. Emre, S., et al., *Arylsulfatase A pseudodeficiency incidence in Turkey*. Turk J Pediatr, 2000. **42**(2): p. 115-7.
24. Kishimoto, Y., et al., *Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics*. J Lipid Res, 1992. **33**(9): p. 1255-67.
25. Yamashita, K., et al., *Characteristics of asparagine-linked sugar chains of sphingolipid activator protein 1 purified from normal human liver and GM1 gangliosidosis (type 1) liver*. Biochemistry, 1990. **29**(12): p. 3030-3039.
26. Ahn, V.E., et al., *Crystal structure of saposin B reveals a dimeric shell for lipid binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 38-43.
27. Vogel, A., et al., *Glycosphingolipid specificity of the human sulfatide activator protein*. Eur J Biochem, 1991. **200**(2): p. 591-7.
28. Sandhoff, K., et al., *Sphingolipid Activator Proteins*, in *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, A.L. Beaudet, et al., Editors. 2014, The McGraw-Hill Companies, Inc.: New York, NY.
29. Benson, P.F. and Fensom, A.H., *Genetic biochemical disorders*. 1985: Oxford University Press, USA.
30. Barth, M.L., et al., *The arylsulphatase A gene and molecular genetics of metachromatic leukodystrophy*. Journal of Medical Genetics, 1994. **31**(9): p. 663.
31. Luzi, P., et al., *Sixteen novel mutations in the arylsulfatase A gene causing metachromatic leukodystrophy*. Gene, 2013. **530**(2): p. 323-8.
32. Baum, H., et al., *The assay of arylsulphatases A and B in human urine*. Clin Chim Acta, 1959. **4**(3): p. 453-5.
33. Bayleran, J., et al., *Synthesis of 4-methylumbelliferyl-beta-D-N-acetylglucosamine-6-sulfate and its use in classification of GM2 gangliosidosis genotypes*. Clin Chim Acta, 1984. **143**(2): p. 73-89.
34. Cooper, A., et al., *Human β -mannosidase deficiency: Biochemical findings in plasma, fibroblasts, white cells and urine*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 1988. **11**(1): p. 17-29.
35. Desnick, R.J., et al., *Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes*. J Lab Clin Med, 1973. **81**(2): p. 157-71.
36. Hollak, C.E., et al., *Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease*. J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 1288-92.
37. Milunsky, A., *Genetic metabolic disease. Early diagnosis and prenatal analysis*. American Journal of Human Genetics, 1981. **33**(2): p. 319-321.

38. Peters, S.P., et al., *A microassay for Gaucher's disease*. Clin Chim Acta, 1975. **60**(3): p. 391-6.
39. Wiederschain, G., et al., *Characterization of 6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl-beta-D- galactopyranoside as fluorogenic substrate of galactocerebrosidase for the diagnosis of Krabbe disease*. Clin Chim Acta, 1992. **205**(1-2): p. 87-96.
40. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
41. Gibbs, R.A., *DNA amplification by the polymerase chain reaction*. Anal Chem, 1990. **62**(13): p. 1202-14.
42. Gort, L., et al., *Identification of 12 novel mutations and two new polymorphisms in the arylsulfatase A gene: haplotype and genotype-phenotype correlation studies in Spanish metachromatic leukodystrophy patients*. Hum Mutat, 1999. **14**(3): p. 240-8.
43. Lee, P.Y., et al., *Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments*. Journal of Visualized Experiments : JoVE, 2012(62): p. 3923.
44. Roberts, R.J., *Restriction endonucleases*. CRC Crit Rev Biochem, 1976. **4**(2): p. 123-64.
45. Chang, P.L., et al., *Differential assay of arylsulfatase A and B activities: a sensitive method for cultured human cells*. Anal Biochem, 1981. **117**(2): p. 382-9.
46. Liorioli, L., et al., *Critical issues for the proper diagnosis of Metachromatic Leukodystrophy*. Gene, 2014. **537**(2): p. 348-51.
47. Martino, S., et al., *Expression and purification of a human, soluble Arylsulfatase A for Metachromatic Leukodystrophy enzyme replacement therapy*. J Biotechnol, 2005. **117**(3): p. 243-51.
48. Fluharty, A.L., et al., *Arylsulfatase B deficiency in Maroteaux-Lamy syndrome cultured fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 1974. **59**(2): p. 455-61.
49. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
50. Blau, N., et al., *Laboratory guide to the methods in biochemical genetics*. 2008: Springer.
51. *Amersham ECL western blotting detection reagents and analysis system*, G.E. Healthcare, Editor. 2006: UK.
52. Önder, E., et al., *Identification of two novel arylsulfatase A mutations with a polymorphism as a cause of metachromatic leukodystrophy*. Neurological Research, 2009. **31**(1): p. 60-66.
53. Stevens, R.L., et al., *Arylsulfatases of human tissue studies on a form of arylsulfatase B found predominantly in brain*. Biochimica et Biophysica Acta -Enzymology, 1977. **481**(2): p. 549-560.
54. Rafi, M.A., et al., *Disease-causing mutations in cis with the common arylsulfatase A pseudodeficiency allele compound the difficulties in accurately identifying patients and carriers of metachromatic leukodystrophy*. Molecular Genetics Metabolism, 2003. **79**(2): p. 83-90.
55. Kuchař, L., et al., *Direct tandem mass spectrometric profiling of sulfatides in dry urinary samples for screening of metachromatic leukodystrophy*. Clinica Chimica Acta, 2013. **425**: p. 153-159.

56. Lugowska, A., et al., *Elevated sulfatide excretion in compound heterozygotes of metachromatic leukodystrophy and ASA-pseudodeficiency allele*. Clinical Biochemistry, 1997. **30**(4): p. 325-331.
57. Lukatela, G., et al., *Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis*. Biochemistry, 1998. **37**(11): p. 3654-64.
58. Özkan, A. and Özkara, H.A., *Metachromatic leukodystrophy: Biochemical characterization of two (p.307Glu→Lys, p.318Trp→Cys) arylsulfatase A mutations*. Intractable & rare diseases research, 2016. **5**(4): p. 280-283.
59. Kreysing, J., et al., *High residual arylsulfatase A (ARSA) activity in a patient with late-infantile metachromatic leukodystrophy*. American Journal of Human Genetics, 1993. **53**(2): p. 339-346.
60. Biffi, A., et al., *Metachromatic leukodystrophy - mutation analysis provides further evidence of genotype-phenotype correlation*. Clin Genet, 2008. **74**(4): p. 349-57.
61. Cesani, M., et al., *Characterization of new arylsulfatase A gene mutations reinforces genotype-phenotype correlation in metachromatic leukodystrophy*. Hum Mutat, 2009. **30**(10): p. E936-45.
62. Cesani, M., et al., *Mutation Update of ARSA and PSAP Genes Causing Metachromatic Leukodystrophy*. Hum Mutat, 2016. **37**(1): p. 16-27.
63. Harvey, J.S., et al., *An arylsulfatase A (ARSA) missense mutation (T274M) causing late-infantile metachromatic leukodystrophy*. Hum Mutat, 1993. **2**(4): p. 261-7.
64. Anlar, B., et al., *Atypical clinical course in juvenile metachromatic leukodystrophy involving novel arylsulfatase A gene mutations*. Dev Med Child Neurol, 2006. **48**(5): p. 383-7.
65. Sabourdy, F., et al., *Natural disease history and characterisation of SUMF1 molecular defects in ten unrelated patients with multiple sulfatase deficiency*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2015. **10**(1): p. 31.
66. Schlotawa, L., et al., *Molecular analysis of SUMF1 mutations: stability and residual activity of mutant formylglycine-generating enzyme determine disease severity in multiple sulfatase deficiency*. Hum Mutat, 2008. **29**(1): p. 205.
67. Carpo, M., et al., *Anti-sulfatide IgM antibodies in peripheral neuropathy*. J Neurol Sci, 2000. **176**(2): p. 144-50.
68. Andersson, K., et al., *Patients with insulin-dependent diabetes but not those with non-insulin-dependent diabetes have anti-sulfatide antibodies as determined with a new ELISA assay*. Autoimmunity, 2002. **35**(7): p. 463-8.
69. Ilyas, A.A., et al., *Antibodies to sulfatide in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2003. **139**(1-2): p. 76-80.
70. Lopate, G., et al., *Anti-sulfatide antibodies in HIV-infected individuals with sensory neuropathy*. Neurology, 2005. **64**(9): p. 1632-4.
71. Weber, M.S., et al., *Defining distinct features of anti-MOG antibody associated central nervous system demyelination*. Ther Adv Neurol Disord, 2018. **11**: p. 1756286418762083.
72. Ramanathan, S., et al., *Anti-MOG antibody: The history, clinical phenotype, and pathogenicity of a serum biomarker for demyelination*. Autoimmun Rev, 2016. **15**(4): p. 307-24.

73. Pröbstel, A.-K., et al., *Anti-MOG antibodies are present in a subgroup of patients with a neuromyelitis optica phenotype*. Journal of Neuroinflammation, 2015. **12**(1): p. 46.
74. Bosch, M.E. and Kielian, T., *Neuroinflammatory paradigms in lysosomal storage diseases*. Front Neurosci, 2015. **9**: p. 417.
75. Rigante, D., et al., *Overview of immune abnormalities in lysosomal storage disorders*. Immunol Lett, 2017. **188**: p. 79-85.
76. Barrette, B., et al., *Molecular triggers of neuroinflammation in mouse models of demyelinating diseases*. Biol Chem, 2013. **394**(12): p. 1571-81.
77. Stein, A., et al., *Anti-inflammatory Therapy With Simvastatin Improves Neuroinflammation and CNS Function in a Mouse Model of Metachromatic Leukodystrophy*. Mol Ther, 2015. **23**(7): p. 1160-1168.
78. McAlarney, T., et al., *Antisulfatide antibody and neuropathy in a patient with Gaucher's disease*. Neurology, 1995. **45**(8): p. 1622-3.



8. EKLER

EK 1. Çözeltiler

1- Lizis tamponu:

155 mM NH_4Cl , 10 mM NaHCO_3 ve 100 μM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) distile suda çözüldü. 4°C’de gece boyunca manyetik karıştırıcıda bırakıldı. 6 N HCl ile pH: 7,4’e ayarlandı.

2- %0,9 salin çözeltisi:

45 g NaCl, 5 litre distile suda çözüldü.

3- 5xTBE tamponu:

54 gram Tris bazı, 27,5 gram borik asit ve 3722,4 mg EDTA tartılıp karıştırıldı. 900 ml deiyonize suda çözüldü. Birkaç damla HCl damlatılarak pH: 8’e ayarlandıktan sonra hacim deiyonize suyla 1 litreye tamamlandı.

4- %2’lik agaroz jel:

0,8 gram agaroz tartılıp 40 ml 1xTBE tamponuyla karıştırıldı.

5- %3’lük NuSieve agaroz jel:

1,2 gram Nusieve agaroz tartılıp 40 ml 0,5xTBE tamponuyla karıştırıldı.

6- Kloroform/metanol (2:1, v/v):

50 ml kloroform ile 25 ml metanol karıştırıldı.

7- Kloroform/metanol/su (144:56:7, v/v/v, hareketli faz):

144 ml kloroform, 56 ml metanol ve 7 ml distile su karıştırıldı.

8- 1 $\mu\text{mol/ml}$ C18-sülfatid standart solüsyonu:

0,8 mg C18-sülfatid standardı tartılıp 1 ml kloroform/metanol (2:1, v/v) çözeltisinde çözüldü.

9- Orsinol çözeltisi:

200 mg orsinol, 88,6 ml distile suda çözüldükten sonra 11,4 ml H_2SO_4 eklenerek son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

10- TBS tamponu (pH:7,8):

1,21 g Tris bazı (10 mM) ve 8,76 g NaCl tartılıp karıştırıldıktan sonra 900 ml distile suda çözüldü. 5 N HCl ile pH: 7,8'e ayarlandı. Son hacim distile suyla 1 litreye tamamlandı.

11- 2x Transfer tamponu (pH:8,3):

6,06 g Tris bazı (50 mM) ve 28,8 g glisin tartılıp karıştırıldıktan sonra hacmi distile suyla 1 litreye tamamlandı.

12- Yıkama tamponu (TBS-T):

1 litre TBS tamponu (pH: 7,8) ve 1 ml Tween-20 karıştırıldı.

13- 4x Laemmli örnek yükleme tamponu:

250 μ l Tris-HCl (1 M, pH:6,8), 1 ml gliserol, 400 μ l SDS (%20, w/v), 40 μ l bromfenol mavisi (%1, w/v) ve 100 μ l β -merkaptoetanol karıştırılıp steril suyla 2 ml'ye tamamlandı.

14- Bloklama solüsyonu (%5 yağsız süt tozu):

5 g yağsız süt tozu 100 ml TBS-T tamponunda çözüldü.

15- Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yürütme tamponu (pH: 8,5):

3,03 g Tris bazı, 14,4 g glisin ve 1 g SDS tartılıp steril suyla 1 litreye tamamlandı.

16- Arturo'nun protein saflaştırma lizis tamponu:

1 M stok Tris-HCl (10 mM, pH: 7,4) tamponundan 1 ml, 1,75 g NaCl (300 mM), 58 mg EDTA (2 mM) ve 0,5 ml triton-X-100 (%0,5) karıştırılıp steril suyla 100 ml'ye tamamlandı.

17- Stripping tamponu:

20 ml %10 SDS, 12,5 ml 0,5 M Tris-HCl tamponu ve 0,8 ml β -merkaptöetanol karıştırılıp steril suyla 100 ml'ye tamamlandı.

18- PBS-T yıkama tamponu (pH:7,2):

10,2 g katı PBS ile 2 ml Tween-20 karıştırılıp steril suyla hacmi 1 litreye tamamlandı.



EK 2. Çalışmadan Hazırlanan Yazılı ve Sözlü Sunumlar

- 1) 14th Annual World Symposium, 5-9 Şubat 2018, San Diego, A.B.D., yazılı bildiri: Targeting metachromatic leukodystrophy: Subtyping of patients with laboratory diagnosis and diagnosing presymptomatic cases. Faruk Pekköl, Can Ebru Kurt, Bahadır Konuşkan, Sevim Erdem Özdamar, Ersin Tan, Banu Anlar, Meral Topçu, Hatice Asuman Özkara
- 2) The 15th Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, 11-16 Şubat 2018, Galveston, Teksas, A.B.D., sözlü ve yazılı bildiri: Urinary sulfoglycolipids: Experience with urinary sulfatides by thin layer chromatography in metachromatic leukodystrophy. Faruk Pekköl, Hatice Asuman Özkara
- 3) 6. Uluslararası Katılımlı Lizozomal Hastalıklar Kongresi, 11-15 Nisan 2018, Antalya, sözlü bildiri: Metakromatik lökodistrofi hastalığının doğru ve erken tanısında önemli laboratuvar testleri. Faruk Pekköl, Can Ebru Bekircan-Kurt, Bahadır Konuşkan, Sevim Erdem Özdamar, Ersin Tan, Banu Anlar, Meral Topçu, Hatice Asuman Özkara
- 4) 44. FEBS kongresi, 6-11 Temmuz 2019, Polonya/Krakov, yazılı bildiri: Laboratory diagnosis of MLD requires more than ASA assay. Faruk Pekköl, Can Ebru Bekircan Kurt, Bahadır Konuşkan, Sevim Erdem Özdamar, Ersin Tan, Nurten Akarsu, Banu Anlar, Meral Topçu, Hatice Asuman Özkara
- 5) SSIEM, 3-6 Eylül 2019, Rotterdam, Hollanda, yazılı bildiri: Evaluation of the role of anti-sulfatide and anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) antibodies in demyelinating leukodystrophies. Faruk Pekköl, Nesibe Gevher Eroğlu-Ertuğrul, Can Ebru Bekircan Kurt, Sevim Erdem Özdamar, Ersin Tan, Bahadır Konuşkan, Nurten Akarsu, Ergun Karaağaoğlu, Meral Topçu, Banu Anlar, Hatice Asuman Özkara
- 6) The 13th European Paediatric Neurology Society (EPNS) Congress, 17-21 Eylül 2019, Atina, Yunanistan, yazılı bildiri: Leukodystrophy and differential diagnosis of arylsulfatase deficiency. Nesibe Gevher Ertuğrul, Faruk Pekköl, Bahadır Konuşkan, Barış Kuşkonmaz, Duygu Uçkan Çetinkaya, Meral Topçu, Hatice Asuman Özkara, Banu Anlar