

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**SPORADİK AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ (ALS)**  
**TANISI ALAN OLGULARDA C9ORF72, SOD1,**  
**TARDBP, FUS VE UBQLN2 GEN MUTASYONLARININ**  
**ARAŞTIRILMASI**

Vildan ÇİFTÇİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2017-ANTALYA

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**SPORADİK AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ (ALS)**  
**TANISI ALAN OLGULARDA C9ORF72, SOD1,**  
**TARDBP, FUS VE UBQLN2 GEN MUTASYONLARININ**  
**ARAŞTIRILMASI**

Vildan ÇİFTÇİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2015-1155 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu alışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : **Prof.Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM**  
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof.Dr.İbrahim KESER  
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç.Dr.Türker BİLGİN  
Namık Kemal Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN  
Enstitü Müdürü

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Vildan ÇİFTÇİ

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

İmza

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında güçlü desteğini her daim hissettiren, öneri ve katkılarını özveri ve sabırla benimle paylaşarak bana yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Prof.Dr.Sibel BERKER KARAÜZÜM'e,

Tez çalışmam için gerekli olguları sağlayan, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren saygıdeğer hocam Prof.Dr.Hilmi UYSAL'a,

Pipet tutmayı ilk kez kendisinden öğrendiğim ve diğer deneysel aşamalarımnda yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Doç.Dr.Türker BİLGİN'e,

Bilgi ve tecrübelerini paylaşarak yaptığı değerli katkılarından dolayı, çalışmama ışık tutan, Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı bölüm başkanımız saygıdeğer hocam Prof.Dr.İbrahim KESER'e,

Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nın tüm saygıdeğer öğretim üyelerine, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi sorumlusu saygıdeğer hocam Doç.Dr.Özden ALTIOK CLARK'a ve sayın Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana yol gösteren asistan arkadaşım Asef MOBALLEGH ve Dr.Yunus ARIKAN'a,

Yardımsızlığı ve güleryüzüyle her zaman yanımda olduklarını hissettiren canım arkadaşım Dr.Ceren HANGÜL ve Tuğba KARAMAN'a

Tez çalışmamın şekilsel düzenlenmesinde benden yardım ve önerilerini esirgemeyen asistan arkadaşım Hakan AKKURT'a,

Beni büyük özverilerle bu günlere getiren canım annem ve babam Hamide ve Hakkı SANCAKTAROĞLU'na,

Tez çalışmam süresince anlayış ve desteklerini her zaman hissettiğim canım ablam Handan'a, kardeşim İsa Burak'a ve tezimi yazarken "kaydetmeyi unuttum mu ?" diye endişelenirken "anne kaydetmiş misin? Kalbim küt küt attı bak "diyerek heyecanımı paylaşan en değerli varlığım, biricik kızım Ecrin'ime sonsuz TEŞEKKÜR'lerimi sunarım.

## ÖZET

**Amaç:** Sporadik ALS tanısı alan olgularda literatürde en sık gözlenen *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *UBQLN2* genlerinde mutasyon olup olmadığının ve belirlenen mutasyonun sıklığının saptanması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Sporadik ALS tanısı alan 10 olgunun periferik kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. *C9orf72* geni hekzanükleotid tekrar sayısı artışı fragman analizi yöntemi ile çalışılmıştır. *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *UBQLN2* genlerinin tüm kodlayan dizileri DNA dizi analizi yöntemiyle taranmıştır.

**Bulgular:** 10 olgunun 2'sinde *C9orf72* geninin birinci intronunda (% 20 oranında) heterozigot formda c.-45+162\_-45+163insGGGGCC değişimi; *SOD1* geninin birinci intronunda 4 olguda (% 40 oranında) heterozigot formda c.72+133C>T değişimi; *TARDBP* geninin beşinci intronunda 6 olguda (% 60 oranında) homozigot formda c.714+67\_714+68insG değişimi tespit edilmiştir. *FUS* genine ait mutasyon taramasında 3.ekzonda 3 olguda (% 30 oranında) heterozigot formda c.147C>A; 4.ekzonda ise 5 olguda (% 50 oranında) heterozigot, 4 olguda homozigot formda c.288C>T olmak üzere 2 farklı genomik değişim belirlenmiştir. *UBQLN2* geninde herhangi bir genomik değişim tespit edilmemiştir.

**Sonuç:** 10 olgunun 2'sinde (% 20 oranında) belirlenen ve daha önce hastalıkla ilişkilendirilmiş olan *C9orf72* hekzanükleotid tekrar sayısı artışı bu genomik değişikliğin sporadik ALS'nin ortaya çıkmasında en belirgin genetik defekt olduğunu desteklemektedir.

Diğer taraftan *C9orf72* hekzanükleotid tekrar sayısı artışı gözlenen olgulardan birinde çalışma kapsamında diğer olgularda gözlenen genomik değişimlerin her birini içermesi, bu varyasyonların patojenik olmadığını desteklemektedir.

Bunun yanında 10 olgudan 9'unda *FUS* geninde varyasyon tanımlanmış olması bu genin oldukça polimorfik olduğunu kuvvetlendirmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** ALS, sporadik ALS, gen mutasyonu

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study is to determine existence and frequency of the mutation in *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* and *UBQLN2* genes which are most frequently observed in sporadic ALS diagnosed cases.

**Method:** Genomic DNA isolation was performed from peripheral blood samples of 10 patients with sporadic ALS. In these patients the *C9orf72* gene repeat number was checked by triplet-primer PCR method amplification. All sequences encoding the *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* and *UBQLN2* genes were screened by DNA sequencing.

**Results:** In 2 of 10 cases c.-45+162\_-45+163insGGGGCC change was detected in the first intron of *C9orf72* gene as 20 % heterozygous form; in 4 cases c.72+133 C>T change was detected at the first intron of *SOD1* gene as heterozygous form; in 6 cases c.714+67\_714+68insG change was detected in the fifth intron of *TARDBP* gene as % 60 homozygous form. In the *FUS* gene mutation screening revealed 2 different genomic changes as c.147C>A change in exon three with 30 % heterozygosity in 3 cases, also in exon four with % 50 heterozygosity in 5 cases and as c.288C>T change with homozygous form in 4 cases. Any genomic change could not have been detected in *UBQLN2* gene.

**Conclusion:** An increase in the recurrence rate of *C9orf72* hexanucleotide repeat number which is determined as 20 % (2 of 10 cases), suggests that this genomic variation is the most obvious genetic defect in the emergence of sporadic ALS.

On the other hand, having one case carrying the increase in *C9orf72* hexanucleotide repeat number with carrying genomic changes observed in other cases suggests that these variations are not pathogenic.

In addition, a variation in the *FUS* gene in 9 out of 10 cases strengthens that this gene is highly polymorphic.

**Key words:** ALS, sporadic ALS, gene mutation

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iii
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	vi
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	vii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	2
2.1. Etiyolojisi	2
2.2. Çevresel Faktörler	3
2.2.1. $\beta$ -N-metilamino-L-alanin	3
2.2.2. Ağır Metaller	3
2.3. Genetik Faktörler	4
2.4. ALS Hastalığına Neden Olan Genler	5
2.4.1. Majör Genler	5
2.4.2. Minör Genler	8
2.5. Epigenetik	9
2.6. Patogenez	10
2.6.1. Proteinde Yanlış Katlanma	10
2.6.2. Protein Degredasyon Sisteminin Bozulması	11
2.6.3. Otofaji Mekanizmasında Bozulmalar	12
2.7. Hücresel İşleyiş Mekanizmasında Bozulmalar	12
2.7.1. Aksonal Transport İşlev Bozukluğu	12
2.7.2. Hücre Gövdesindeki Trafik ve ER-Golgi Transportundaki Defektler	13
2.7.3. Oksidatif Stres	13
2.7.4. Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi	14
2.7.5. ALS Hastalığında Şaperon Proteinlerin Rolü	14
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	16



3.1.Periferal Kandan DNA İzolasyonu	16
3.1.1. Kullanılan Solüsyonlar	16
3.1.2. DNA İzolasyonu Basamakları	17
3.1.3. DNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü	18
3.2. <i>C9orf72</i> GGGGCC Hekzanükleotid Tekrar Dizilerinin PZR Amplifikasyonu	18
3.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	20
3.3.1. Elektroforezde Kullanılan Solüsyonlar	20
3.4. % 2'lik Agaroz Jel Çözeltilisinin Hazırlanması	20
3.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme Sistemi	20
3.6. <i>SOD1</i> , <i>TARDBP</i> , <i>FUS</i> ve <i>UBQLN2</i> Genlerinin Hedeflenen Ekzonlarının PZR Reaksiyonu	21
3.7. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması	24
3.7.1. PEG Pürifikasyonunun Basamakları	24
3.8. DNA Dizi Analizi Reaksiyonu	24
3.9. DNA Dizi Analizi İçin Sekans Sonrası Pürifikasyon	25
<b>4. BULGULAR</b>	26
4.1.Klinik Bulgular	26
4.2.Moleküler Genetik Analiz Sonuçları	29
<b>5. TARTIŞMA</b>	33
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	38
<b>KAYNAKLAR</b>	40
<b>EKLER</b>	54
<b>EK-1:</b> Aydınlatılmış Onam Formu	
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	57

## TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
3.1. <i>C9orf72</i> geni GGGGCC hekzanükleotid tekrarlarının çoğaltılması için kullanılan triplet PZR malzemeleri ve miktarları	19
3.2. <i>C9orf72</i> geni GGGGCC hekzanükleotid tekrarlarının çoğaltılması için uygulanan PZR koşulları	19
3.3. <i>SOD1</i> , <i>TARDBP</i> , <i>FUS</i> ve <i>UBQLN2</i> genlerinin hedeflenen ekzonlarının çoğaltılması için PZR reaksiyonunda kullanılan malzemeler ve miktarları	22
3.4. <i>C9orf72</i> geni GGGGCC hekzanükleotid tekrarları için DNA fragman analizinde ve <i>SOD1</i> , <i>TARDBP</i> , <i>FUS</i> ve <i>UBQLN2</i> genleri için yapılan DNA dizi analizinde kullanılan primer dizileri	23
3.5. DNA dizileme reaksiyonu için PZR içeriği	24
3.6. DNA dizileme reaksiyonu için PZR koşulları	25
4.1. Sporadik ALS olgularının klinik bulguları	27
4.2. Sporadik ALS olgularında gözlenen genomik değişiklikler	30

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. ALS ile ilişkilendirilen genler ve hücresel fonksiyonları	5
2.2. ALS patogenezinin genel gösterimi. ALS' de protein yanlış katlanmalarının motor nöronlar ve hücresel fonksiyonlar üzerindeki etkisi	11
2.3. Protein katlanmasında şaperon proteinlerin rolü	15
4.1. <i>FUS</i> geninin beşinci ekzonuna ait PZR jel elektroforezi görüntüsü	29
4.2. (a)c.-45+162_-45+163insGGGGCC mutasyonu gözlenen olgu (b)tekrar sayısı artışı mutasyonu taşımayan olgu	31
4.3. c.72+133 C>T heterozigot değişim	31
4.4. c.288C>T heterozigot değişim	32
4.5. c.288C>T homozigot değişim	32
4.6. c.147C>A heterozigot değişim (Revers görüntüsü)	32
4.7. c.714+67_714+68insG homozigot değişimi	32

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ALS</b>	: Amyotrofik Lateral Skleroz
<b>ALAD</b>	: Aminolevulinik Asit Dehidrataz
<b>AmAc</b>	: Amonyum Asetat
<b>AMPK</b>	: AMP Aktive Edici Protein Kinaz
<b>BMAA</b>	: $\beta$ -N-metilamino-L- alanin
<b>CMA</b>	: Şaperon Aracılı Otofaji
<b>COPs</b>	: Kılıf Proteini Kompleksi
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<b>ER</b>	: Endoplazmik Retikulum
<b>ERAD</b>	: Endoplazmik Aracılı Parçalanma
<b>ERGIC</b>	: ER-Golgi Ara Kompartmanı
<b>fALS</b>	: Ailesel ALS
<b>FTD</b>	: Fronto Temporal Demans
<b>FUS</b>	: Fused in Sarcoma
<b>HDACs</b>	: Histon Deasetilazlar
<b>Hsps</b>	: Isı Şoku Proteinleri
<b>KAP3</b>	: Kinezin Bağlantılı Protein 3
<b>MTOR</b>	: Mammalian Target of Rapamycin Geni
<b>NES</b>	: Nüklear Export Sinyali
<b>NLS</b>	: Nüklear Lokalizasyon Dizisi
<b>PDI</b>	: Protein Disülfid İzomeraz

**PZR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**sALS** : Sporadik ALS

**SDS** : Sodyum Dodesil Sülfat

**SOD1** : Süperoksid Dismutaz 1

**TARDBP** : Tar-DNA Binding Protein

**TBE** : Tris Borat EDTA

**UBQLN2** : Ubiquilin 2

**UPS** : Ubiquitin Proteozom Sistemi

**WBL** : Lökosit Lizis Tamponu

## 1.GİRİŞ

Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), alt ve üst motor nöronların kaybı ile karakterize edilen ölümcül nörodejeneratif hastalıktır (Fil ve ark., 2017). ALS hastalığının ailesel ve sporadik olmak üzere iki formu vardır. % 90-95 oranında sporadik olarak ortaya çıkan ALS hastalığının tanısı, klinikte motor nöronların etkilenip etkilenmediğini belirlemede kullanılan elektromiyograf (EMG) yöntemi ile konulmaktadır. ALS hastalığının etkin bir tedavi yöntemi bulunmamasıyla birlikte, bir benzodiazepin ve güçlü glutamat alım aktivitesine sahip olan ve inaktif durumdaki sodyum kanallarını stabilize ederek hastaların hayatta kalma süresini bir süre uzatabilen tek ilaç Riluzole'dür (Dunlop ve ark., 2003; Song ve ark., 1997).

Çalışmamızda, Akdeniz Üniversitesi, Nöroloji Anabilim Dalı'nda sporadik ALS tanısı konularak takip edilen 10 olguda, bugüne kadar ALS ile ilgili yapılan çalışmalarda tanımlanmış olan ve içlerinde en sık gözlenen *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *UBQLN2* gen mutasyonlarının araştırılması hedeflenmiştir. Mutasyon tanımlandığı takdirde belirlenen mutasyon sıklığının saptanarak hastalığın başlangıç yaşı, klinik bulguları ve klinik seyri ile ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS); yetişkinlerde en yaygın görülen motor nöron hastalığıdır (Verma, 2012). İlk kez 1890 yılında Jean-Martin Charcot tarafından tanımlanan bu nörodejeneratif hastalıkta, alt ve üst motor nöronların kademeli şekilde artan dejenerasyonu sonucu kaslarda güçsüzlük, spastisite, atrofi ve felç klinik bulguları görülmektedir (Charcot JM, 1890). Klinik fenotip genellikle semptomların görülmeye başladığı bölgeye göre sınıflandırılmaktadır. Olguların yaklaşık % 65' ini içeren en yaygın formu kol ve bacaklarda güçsüzlük ve incelme ile ortaya çıkan klasik veya spinal formudur. Olguların % 30' unda hastalık dizorti (beyinde bir lezyona bağlı konuşma bozukluğu) veya disfaji (yutkunma zorluğu) ya da her ikisi birlikte, % 5' inde ise şiddetli solunum yetmezliği ile başlangıç göstermektedir (Zufiria ve ark., 2016). Hastalık, başlangıç anından, hastalığın seyri süresince tüm motor nöronlara yayılmaktadır. Hastalığın başlangıcını takiben genellikle 3 - 5 yıl içerisinde solunum kaslarını sinir sistemine bağlayan motor nöronların kaybı nedeniyle ölümle sonuçlanmaktadır, fakat yaklaşık % 35'inin 5 yıl veya daha uzun süre hayatta kalabildiği belirtilmiştir (Shaw ve ark., 2001). Uzun bir süre ALS, spesifik bir motor nöron hastalığı olarak bilinmesine rağmen, günümüzde ALS hastalarında Frontotemporal Demans (FTD) ve bulbar başlangıçlı hastalarda orta dereceli bilişsel bozuklukların yaygın olarak görüldüğü bilinmektedir (Ferrari ve ark., 2011). ALS olgularının yaklaşık % 90' ının etiyolojisi bilinmemekte ve bu olgular sporadik ALS (sALS) olarak değerlendirilmektedir; geriye kalan % 5-10' luk kısmı ise Mendelyen kalıtımı gösterilmiş genlerdeki mutasyonlarla ortaya çıktığı için ailesel ALS (familial ALS) olarak sınıflandırılmaktadır (Al-Chalabi ve Visscher, 2014; Guerreiro ve ark., 2015).

### 2.1. Etiyolojisi

ALS olgularının çoğunluğunu oluşturan sporadik formunda, nöronal dejenerasyona neden olan başlangıç mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ailesel ALS' de ise patogenez mutasyon içeren genlerin fonksiyonu ile ilişkilidir. Genetik ve çevresel faktörlerin ALS hastalığının etiyolojisine katkısını belirlemek üzere birçok çalışma yapılmıştır. Etkili olan çevresel faktörlerden bir kısmı aşağıda açıklanmaktadır.

## **2.2. Çevresel Faktörler**

Çevresel koşullara ilişkin yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar sonucu pestisit kontaminasyonu, sigara, alkol, kurşun, viral ve fungal enfeksiyonlar, fiziksel egzersiz ve elektromanyetik radyasyon gibi pek çok çevresel faktörün ALS patogeneğinde etkili olduğu belirtilmiştir (Armon, 2009; Ingre ve ark., 2015)

### **2.2.1. $\beta$ -N-metilamino-L-alanin**

ALS hastalığının parkinson ve demans ile bağlantısı ilk olarak, 1945 yılında Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Guam adasında yaşamış olan Chamorros populasyonunda tanımlanmıştır (Steele, 2005). 1967 yılında Vega ve Bell Chamorros halkının un yapmak için kullandığı cycad (*Cycas micronesica*) tohumlarında bir nörotoksin olan  $\beta$ -N-metilamino-L-alanin'i (BMAA) keşfetmişlerdir (A, 1967). Guamanian ALS hastalarına otopsi yapıldıktan sonra beyinde BMAA'nın yoğun olarak gözlenmesi sonucu motor nöron hastalığında BMAA'nın çevresel bir faktör olarak yer aldığı teorisi ortaya konmuştur (Murch ve ark., 2004).

### **2.2.2. Ağır Metaller**

Ağır metallerin toksik olabilecek kadar yüksek miktarlarının veya yetersiz düzeylerinin hastalıkları indüklediği bilinmektedir. Ağır metaller içerisinde en çok kurşun, cıva ve selenyum ile ilgili çalışma yapılmıştır (Sutedja ve ark., 2009; Johnson ve Atchison, 2009).

#### **Kurşun:**

ALS hastalarının serebrospinal sıvılarında ve kan örneklerinde yüksek oranda kurşun tespit edilmiştir. Aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD) enzimini kodlayan gendeki polimorfizmlerin ALS hastalarının kemiklerinde saptanan kurşunun kontrol grubuna göre daha fazla miktarda birikimine neden olarak ALS riskini artırdığı gözlenmiştir (Kamel ve ark., 2003).



**Cıva:**

Yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalar, cıva maruziyetinin ALS riskini artırdığını göstermiştir (Pamphlett ve Waley, 1998; Adams ve ark., 1983). Deney hayvanları ve hücre kültürü ile yapılan çalışmalar, cıvanın ALS patolojisindeki rolünü desteklemektedir. Oluşturulan fare modelleri cıvaya maruz bırakıldığında cıvanın alt ve üst motor nöronlarda biriktiği gözlenmiştir (Arvidson, 1992).

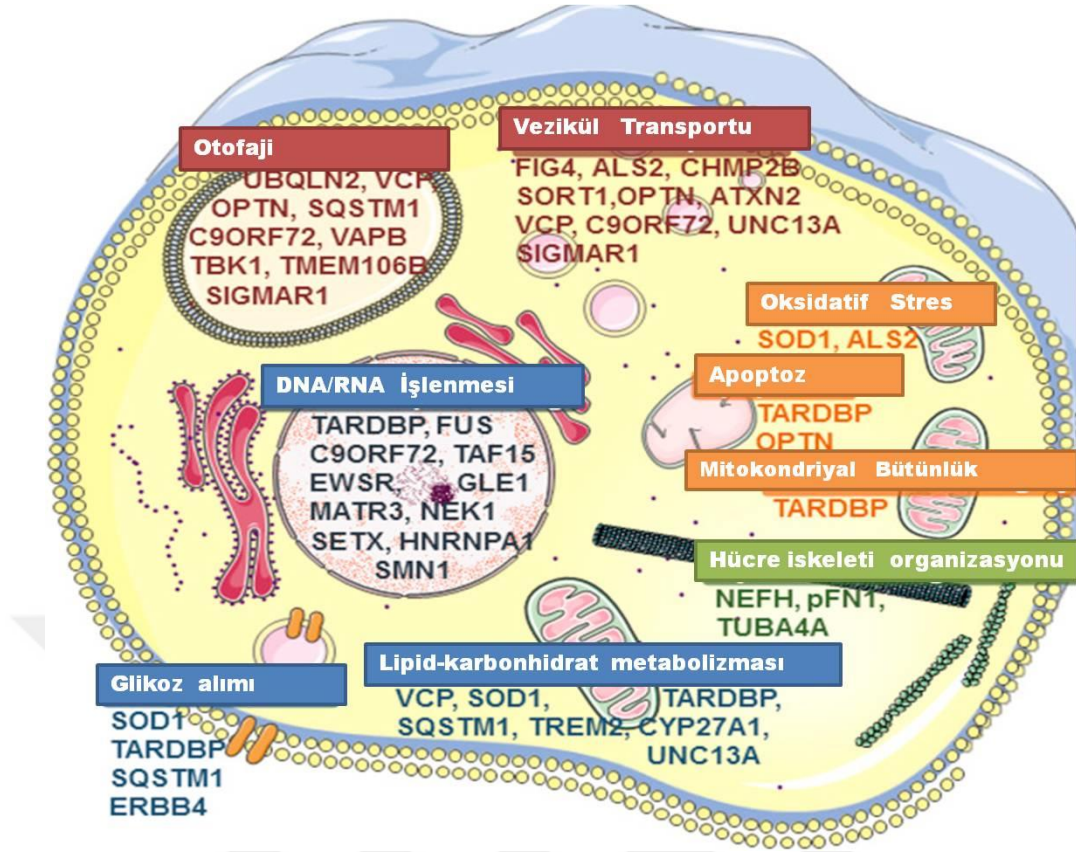
**Selenyum:**

Selenyumun ALS hastalığına etkisi ilk olarak selenyumca zengin bölgelerde yaşayan populasyonlarda ALS riskini arttırması sonucu belirlenmiştir (Kilness ve Hichberg, 1977; Vinceti ve ark., 1996). İtalya'da 11 yıl boyunca yüksek selenyum içeren su içen 5000' den fazla kişinin selenyuma maruz kalmayanlara göre ALS hastalığı için 7 kat daha fazla risk taşıdığı tespit edilmiştir (Vinceti ve ark., 1996).

Çevresel faktörlerin yanı sıra, Bileşik Krallık (UK) ve İsveç' de yapılan bir çalışmada monozigotik ikizlerin dizigotik ikizlerden daha yüksek risk taşıdığı, her ikisinin de kontrol grubuna göre ALS hastalığına daha yatkın olduğu gözlenmiştir (Al-Chalabi ve ark., 2010). Eşler dışındaki yakın akrabalarda da riskin artması genetik faktörlerin çevresel faktörlere göre önemli ölçüde etkili olduğunun göstergesidir (Gibson ve ark., 2014).

**2.3. Genetik Faktörler:**

Son yıllarda yapılan çalışmalarla genetik faktörlerin ALS hastalığının ortaya çıkmasında etkili olduğu belirlenmiştir. Hastalık etkeni olan genlerin otozomal dominant, otozomal resesif ve X kromozomuna bağlı dominant geçiş gösteren ailesel ALS'ye neden olduğu, yatkınlık genlerinin ise hastalığın sporadik formunun ortaya çıkma riskini artırdığı bilinmektedir (Millecamps ve ark., 2012). DNA/RNA işlenmesi, otofaji ve vezikül transportunda görev alan proteinleri kodlayan genler ile hücre iskeleti organizasyonu, lipid-karbonhidrat metabolizması, glikoz alımı, oksidatif stres, apoptoz ve mitokondri bütünlüğünden sorumlu proteini kodlayan genlerdeki mutasyonlar ALS hastalığı ile ilişkilendirilmektedir (Şekil 2.1) (Petrov, 2017).



Şekil 2.1. ALS ile ilişkilendirilen genler ve hücresel fonksiyonları (Petrov, 2017)

## 2.4. ALS Hastalığına Neden Olan Genler

### 2.4.1. Majör Genler

#### *Süperoksid Dismutaz 1 (SOD1)*

ALS'de 1993 yılında ilk tanımlanan gen, *SOD1* geni olup, ailesel ALS'li olguların % 20'sinde, sporadik olguların ise % 2'sinde *SOD1* geninde çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır (Taylor ve ark., 2016). Kromozomal lokalizasyonu 21q22.1 olan *SOD1* geninin ürünü Cu-Zn SOD1, 32 kDa moleküler ağırlığına sahip, homodimerik, 153 amino asitten oluşan iki alt ünitesi nonkovalent bağlı metalloenzimdir (Doucette ve ark., 2004). Her bir alt birim bir tane çinko ve bakır atomuna bağlanmaktadır. SOD1 enzimi, mitokondride oksidatif fosforilasyon sonucu üretilen süperoksid anyonlarının bakır atomunun oksidasyonu ile hidrojen perokside dönüştürülmesini katalizlemektedir. *SOD1* geninin beş ekzonunda 160'dan fazla farklı mutasyon tespit edilmiştir (Saccon ve ark., 2013). *SOD1* geninde görülen mutasyonların çoğunluğunu nokta mutasyonları oluşturmakla birlikte çeşitli delesyon, insersiyon ve kırılma mutasyonları da tanımlanmıştır (Saccon ve ark., 2013). Mutant SOD1 proteinleri normal SOD1 proteinlerine kıyasla, önemli ölçüde daha stabil olmayan yapıdadır ve monomerlerine çok daha kolay ayrışmaktadır (Hough ve ark., 2004).

SOD1 inklüzyonları böbrek ve karaciğerde de tespit edilmiştir, fakat hastalık üzerine olan etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir (Jonsson ve ark., 2008). Mutant SOD1 enziminin nörodejenerasyona neden olan mekanizmaları arasında aksonal ve hücrel transportta bozulmalar, ER stresi, kalsiyum homeostazisinin bozulması, ubiquitin–proteozom sistemi ve RNA fonksiyon bozuklukları, otofaji mekanizmasındaki düzensizlikler ve mitokondriyal hasarlar bulunmaktadır (Bunton-Stasyshyn ve ark., 2015).

### ***TAR–DNA Binding Protein (TARDBP)***

TDP-43 proteinini kodlayan 1p36.2’de lokalize olan *TARDBP* geninde yaklaşık 44 farklı mutasyon hem ailesel hem de sporadik ALS olgularında tanımlanmıştır. *TARDBP* gen mutasyonlarının % 5’i ailesel, % 1’inden daha azı ise sporadik ALS olgularında gözlenmiştir (Del Bo ve ark., 2009). TDP-43, RNA ve DNA’ya bağlanan ve diğer ribonükleer proteinlerle de etkileşime giren multifonksiyonel bir proteindir. TDP-43 proteini, RNA’nın kırılma, transport ve translasyonunu içeren RNA metabolizmasında görevlidir (Lee ve ark., 2015). Bu protein, iki RNA tanıma bölgesi, bir Nükleer Lokalizasyon Dizisi (NLS) ve bir Nükleer Export Sinyali (NES) içermektedir (Winton ve ark., 2008). Ayrıca, glikoz ve lipid metabolizmasında da önemli rol almaktadır (Stallings ve ark., 2013). Farelerde postnatal dönemde TDP-43 proteininin azalması veya olmayışı vücut yağ oranının önemli ölçüde azalmasını takiben hızlı bir şekilde ölüm ve *Tbc1d1* proteininin azalmasına neden olmuştur (Chiang ve ark., 2010). *Tbc1d1* proteini bir Rab- GTPase aktive edici protein olup, glukoz alımını, insülin duyarlılığını ve lipolizisi etkilemektedir (Hargett ve ark., 2015). Diğer taraftan merkezi sinir sisteminde yabancı tip ve A315T mutasyonu taşıyan TDP–43 proteininin aşırı ifade edilmesi sonucu yağ kütlelerinde artış ve obeziteye bağlı insülin direnci gözlenmiştir (Stallings ve ark., 2013). Yapılan son çalışmalar sonucu TDP-43’ün AMP aktive edici Protein Kinaz (AMPK) aktivasyonu ile ilişkili olduğu ve buna bağlı olarak egzersiz süresince kas hücrelerinin glukoz alımında görev alabileceği düşünülmektedir. A315T mutasyonu taşıyan farelerde motor nöronlarda AMPK aktivasyonunda azalma gözlenirken, spinal kordta yabancı tip TDP-43 proteininin aşırı ifade edilmesinin AMPK aktivasyonunu artırdığı gözlenmiştir (Perera ve ark., 2014; Liu ve ark., 2015).

### ***Fused in Sarcoma (FUS)***

16p11.2'de lokalize olan *FUS* gen ürünü olan FUS proteininin, önemli ölçüde TDP-43 proteinine yapısal ve fonksiyonel benzerlik gösterdiği bilinmektedir. Tüm ailesel olguların % 4-5'inde 46'dan fazla farklı mutasyon tanımlanmış olup, *FUS* mutasyonları sporadik olguların % 1'inden azında rapor edilmiştir (Deng ve ark., 2014). FUS proteini, N- terminalinde serin-tirozin-glutamin glisin (STQG)'ce zengin bölge, korunmuş RNA tanıma bölgesi, RanBP2 tipi zink finger ve çoklu C- terminal arjinin-glisin-glisin motifi içermektedir (Yang ve ark., 2010). N- terminal bölge glisin zengin bölgeyle birlikte FUS proteininin kümelenme özelliğini belirleyen prion benzeri domain içermektedir (Sun ve ark., 2011). ALS hastalığında gözlenen mutasyonların çoğunluğu C-terminal bölgesinde (515-524 amino asit) toplanmıştır (Drepper ve ark., 2011). *FUS* gen mutasyonuna sahip ALS hastalarının beyin ve spinal kord dokularından yapılan otopsi analizi sonucu nöronlarda ve gliyal hücrelerde hiperfosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar gerçekleşmediğinden, Fus proteinini içeren anormal sitoplazmik inklüzyonlar gözlenmiştir (Kwiatkowski ve ark., 2009).

### ***Ubiquilin 2 (UBQLN2)***

Ubiquitin protein ailesinin bir üyesi olan ubiquilin-2 proteini Xp11.23-Xp13.1 lokalize olan *UBQLN2* geni tarafından kodlanmakta ve X kromozomuna bağlı dominant kalıtım göstermektedir. *UBQLN2* geninde bugüne kadar 5 farklı mutasyon tanımlanmış olup, bu mutasyonlar tüm ALS olgularının % 1'inden daha azında görülmektedir. Son yapılan çalışmalarda, *UBQLN2* genindeki mutasyonların ALS ve FTD hastalığına neden olduğu ve doğrudan doğruya protein degradasyon mekanizması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Deng ve ark., 2011).

### ***C9orf72***

2011 yılında, ALS hastalığı bulunan ailelerde 9p21-22'de lokalize olan *C9orf72* geninde hekzanükleotid tekrar sayısı artışı tanımlanmıştır. Avrupa kökenli olguların 1/3'ünde ALS' nin bu gendeki tekrar sayısı artışları ile ortaya çıktığı bildirilmiştir (DeJesus-Hernandez ve ark., 2011). Finlandiya'da ailesel olguların % 46'sında, sporadik olguların % 21'inde, İspanya'da ailesel olguların % 27.1'inde, sporadik olguların ise % 3.2'sinde hekzanükleotid tekrar sayısı artışı belirlenmiştir

(Garcia-Redondo ve ark., 2013). Bu veriler, *C9orf72* genindeki tekrar sayısı artışının Avrupa orijinli toplumlarda görüldüğünü desteklemektedir (Smith, 2013). Ailesel ALS olgularının % 60–80' inden fazlasında *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *C9orf72* genlerinde mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyonların % 50'sinden *C9orf72* genindeki tekrar sayısı artışları sorumlu olup en yaygın genetik defekt olarak belirtilmiştir. Ayrıca, hastalık başlama yaşının *SOD1* ve *FUS* mutasyonlarını taşıyan bireylerle kıyaslandığında daha geç başlangıçlı olduğu (40 yaşından sonra) bildirilmiştir (Millecamps ve ark., 2012). *C9orf72* genindeki GGGGCC heksanükleotid tekrarı dizi artışı ailesel ALS olgularında % 40 oranında gözlenerek en yaygın nedenleri arasındadır ve sporadik ALS olgularında % 9 oranında görülmektedir. ALS hastaları arasında ve aynı bireyin farklı dokuları arasında tekrar sayısındaki artışın heterojen yapı gösterdiği ve *C9orf72* geninde tekrar sayısı artışı gözlenen bireylerde özellikle bulbar başlangıçlı ALS görülme oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Debray ve ark., 2013; Ratti ve ark., 2012). *C9orf72* geninde bu heksanükleotid tekrarlı dizi artışı sonucu gen ürünü proteinin miktarının azalması nedeniyle olduğu ve bu azalışın endositoz ve otofaji mekanizmalarında bozulmalara sebep olduğu belirtilmiştir (Farg ve ark., 2014). *C9orf72* geninde mutasyon taşıyan farelerle yapılan çalışmalar sonucu, bu genin ekspresyonunun makrofaj ve mikroglia hücrelerinde immün ve otoimmün cevabın düzenlenmesinde önemli rol aldığı tespit edilmiştir (Atanasio ve ark., 2016).

#### **2.4.2. Minör Genler**

Otofaji ve vezikül transportunda görev alan genlerden birisi olan *OPTN* genindeki mutasyonların çoğunlukla Japon ailelerinde dominant veya resesif kalıtım gösterdiği; *VCP*, *VAPB*, *SQSTM1*, *SORT1*, *UBQLN2* ve *FIG4* genlerindeki mutasyonların az sayıda ailesel olgularda gözleendiği ve sporadik olgularda ise sembolik olarak görüldüğü bildirilmiştir (Maruyama ve ark., 2010; Hocking ve ark., 2002).

#### **ALS Hastalığına Yatkınlığı Artıran Genler**

ALS hastalığının ortaya çıkmasında ağırlıklı olarak etkili olduğu bilinen hastalık yapıcı genlere ek olarak, diğer genler hastalık riskinin belirlenmesinde rol almaktadır. ALS hastalığının monogenik olarak ortaya çıkışında etkili olan genler sporadik formunda risk faktörü olarak, diğer nörodejeneratif hastalıkların fenotipinin

belirlenmesinde modölatör olarak rol almaktadır. Örneğin, *SQSTM1* genindeki mutasyonlar FTD hastalığının fenotipini etkilerken, *FUS* ve *TREM2* genindeki mutasyonlar ALS hastalığı için risk faktörü oluşturmaktadır (Deng ve ark., 2014; Cady ve ark., 2014).

## 2.5. Epigenetik

Epigenetik çalışmalar erken evredeki ALS hastalarına genetik yatkınlığın ve çevresel faktörlerin etkisi açısından yol gösterici olmaktadır. ALS hastalığının patofizyolojisinin şekillenmesinde görevli genlerin fonksiyonları epigenetik mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Bu epigenetik çalışmalar, histon modifikasyonları ve miRNA'lar aracılığı ile hastalığın patofizyolojisine yönelik fonksiyonların düzenlenmesi sağlanarak tedavi yaklaşımı oluşturulabileceği bildirilmiştir (Lazo-Gomez ve ark., 2013). ALS hastalarında hastalığın başlangıç yaşına bağlı olmaksızın kan ve nöral dokulardaki DNA metilasyon yüzdesinin arttığı gözlenmiş ve *C9orf72* gen metilasyon mekanizmasında değişiklikler belirlenmiştir (Tremolizzo ve ark., 2014; Xi ve ark., 2014). *FUS* proteininde meydana gelen yapısal değişiklikler histon konfigürasyon değişikliklerini indükleyerek Arjinin-N-metiltransferaz proteininde fonksiyon kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Tibshirani ve ark., 2015).

Histon kuyruklarındaki post-translasyonel modifikasyonlar histon deasetilazların görev aldığı deasetilasyon mekanizmaları ile gerçekleştirilmektedir. ALS hastalarında ve ALS hayvan modellerinde spinal kord ve beyin dokularında çeşitli histon deasetilazların aşırı ekspresyona uğradığı bildirilmiştir (Janssen ve ark., 2010).

Ailesel ve sporadik ALS sebebiyle kaybedilen ALS hastalarından yapılan otopsi analizleri sonucu spinal kordta miRNA-155'in aşırı ifade edildiği tespit edilmiştir (Koval ve ark., 2013). Ayrıca miRNA analizleri sonucu birtakım mRNA'ların hastalığın erken evresi ile ilişkili olduğu ve miRNA-338-3p'nin ALS hastalarının beyin hücrelerinde deregülasyona uğradığı bildirilmiştir (Shioya ve ark., 2010).

Protein agregat oluşumuna neden olan *TDP-43* ve *FUS* mutasyonlarının, bazı miRNA'ların bu agregatlardan ayrılmasına veya dolaylı olarak HDAC4 enziminin disrregülasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir (Freischmidt ve ark., 2015).

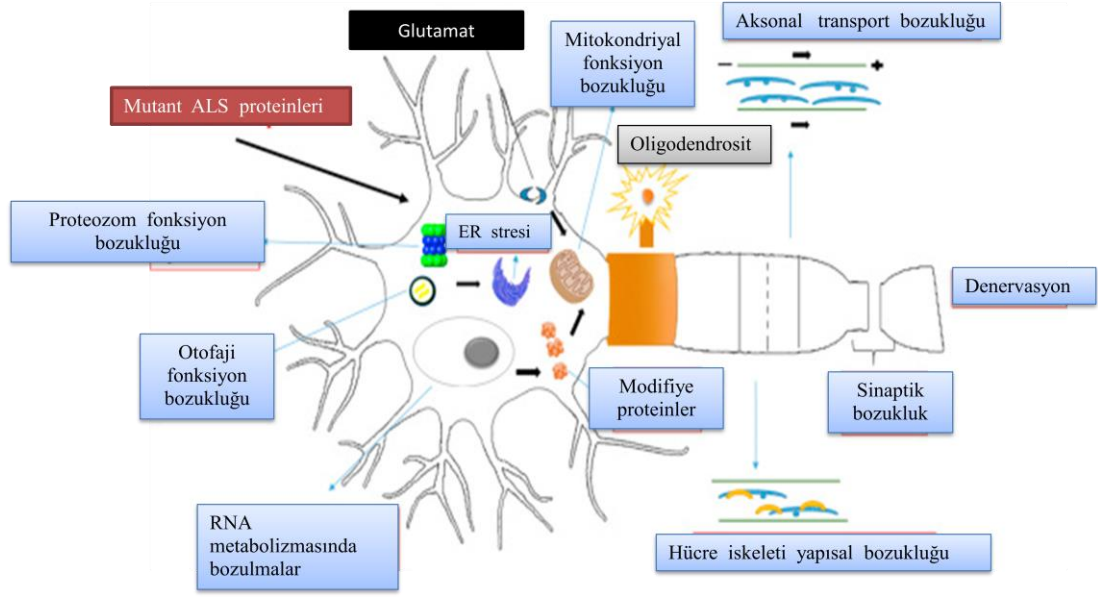
Uygulanan tedavilere ilişkin, ALS’de tespit edilen geri dönüşümlü epigenetik değişikliklerin farmakolojik gelişmeler açısından yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Son altı yılda, ALS hastalığı ile ilişkili Mendelyan kalıtım gösteren *TARDBP*, *C9orf72* ve diğer birtakım genlerin (*VCP*, *SigmaR1*, *OPTN*, *CHMP2B*) keşfedilmesiyle, motor nöronlarda meydana gelen enerji homeostazisindeki düzensizlikler, RNA metabolizmasındaki değişiklikler, otofaji ve eksojen toksinlere karşı duyarlılıkta fonksiyonel bozulmaların altında yatan mekanizmalar açısından bilgilendirici olduğu düşünülmektedir. Diğer çevresel ve henüz belirlenmemiş olan genetik faktörler, sporadik ALS olgularında nörodejeneratif kaskadın başlamasında etkili olan hassas eşik değeri belirlerken, ailesel ALS olgularında bu faktörlerin birlikte etkisi Mendelyan kalıtım penetransının, semptomların başlama yaşının ve hastalığın ilerleme hızının belirlenmesinde etkili olmaktadır.

## **2.6. Patogenez**

Motor nöron dejenerasyonu ile ilişkili olan RNA işleme mekanizmasındaki değişiklikler, protein metabolizma anomalileri, artmış oksidatif stres, aksonal transport ve sinaptik bozukluklar ile değişmiş motor nöron çevresini içeren tüm çeşitli hücresel bozulmalar ALS’nin ailesel ve sporadik formunda tanımlanmıştır (Robberecht ve Philips, 2013). Bunlar arasında protein metabolizmasındaki (proteostazis) bozulmaların özellikle önemli olduğu vurgulanmıştır. ALS hastalığında öngörülen patojenik mekanizmalar aşağıda verilmektedir:

### **2.6.1. Proteinde Yanlış Katlanma**

Protein yanlış katlanmalarının doğrudan patogeneze olan etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, protein degradasyonu ve hücresel yollardaki (akson ve somatik hücreler) fonksiyon bozuklukları, oksidatif stres, prion benzeri yanlış katlanmalar ve ER stresini içeren hipotezler öne sürülmektedir (Ravits ve ark., 2013). Buna bağlı olarak, yanlış katlanmış proteinlerin birikimine bağlı proteostazisin bozulması ALS hastalığının en temel özelliğidir. Yanlış katlanmış proteinlerin patojenik mekanizmalara yol açarak proteostaziste bozulmalara yol açtığı bilinmektedir (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** ALS patogenezinin genel gösterimi. ALS’ de protein yanlış katlanmalarının motor nöronlar ve hücresel fonksiyonlar üzerindeki etkisi (Parakh ve Atkin, 2016)

## 2.6.2. Protein Degredasyon Sisteminin Bozulması

### Ubiquitin Proteozom Sisteminde Fonksiyonel Bozulmalar

Hücre içerisinde yanlış katlanmış proteinler ubiquitin proteozom sistemini içeren hücresel Protein Kalite Kontrol (PQC) sistemi, Şaperon Aracılı Otofaji (CMA) ve makrotofaji mekanizmaları ile parçalanmaktadır (Ciechanover ve Kwon, 2015). Protein substratlarının ubiquitin proteozom sistemi ile parçalanabilmeleri için ubiquitin ile işaretlenmeleri gerekmektedir (Ciechanover, 2012). Tüm CMA substratları amino asit sekanslarında şaperon kompleksinin kurucu üyeleri tarafından (özellikle hsc70) tanınmalarını sağlayan bir pentapeptid motifi (KFERQ) içermektedir (Dice, 2007). Spesifik KFERQ sinyali taşıyan yanlış katlanmış proteinler lizozomlarda ısı şoku proteinlerini (Hsps) içeren CMA mekanizması ile parçalanmaktadır (Koga ve Cuervo, 2011). Ayrıca, Ubiquitin Proteozom Sistem’inden (UPS) ve CMA mekanizmasından kaçan daha büyük protein agregatları makrotofaji yoluyla degrid edilmektedir. Bu süreçte yanlış katlanan proteinler lizozomlarda parçalanmak üzere otofagozomlar şeklinde ayrılmaktadır (Johnston ve ark., 1998). Diğer nörodejeneratif hastalıklarda olduğu gibi ALS’ de etkilenen nöronlarda intrasellüler inklüzyonların fazla miktarda bulunması hücresel protein degradasyon mekanizmasının fonksiyonel olmadığına göstergesidir.



### 2.6.3. Otofaji Mekanizmasında Bozulmalar

Otofaji mekanizması hücrel stres koşulları süresince aktif olarak çalışmakta ve bazı durumlarda hücrenin canlı kalabilmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda, otofaji hücre ölümünü dolaylı veya direk olarak indüklemektedir. Yapılan çalışmalar sonucu otofajinin ALS için koruyucu veya zararlı olduğu konusunda çelişkiler bulunmaktadır. Trehaloz yöntemi ile indüklenen Mammalian Target of Rapamycin (*MTOR*) bağımsız otofajinin, 85. kodonda glisinine dönüşümünü sağlayan mutasyonu taşıyan *SOD1* geninin 12 kb genomik DNA fragmentinin fare embriyolarına mikroenjeksiyon yoluyla verilmesiyle oluşturulan transgenik fare modellerinde (*SOD1<sup>G85R</sup>*), *SOD1* proteininin artışı ve motor nöron kaybını önemli ölçüde azaltarak yaşam süresini uzatmış ve hastalığın ilerleyişini yavaşlatmıştır (Castillo ve ark., 2013). Otofaji indükleyici ajan olarak kullanılan methotrimoprazinin, primer fare nöronlarından mutant TDP-43'ün uzaklaştırılmasını sağladığı ve otofaji indüksiyonunun insan kök hücrelerinden elde edilen nöron ve astrositlerde hücrenin hayatta kalmasını artırdığı gözlenmiştir (Barmada ve ark., 2014). Yapılan bu çalışmalara göre otofajinin artması ALS için koruyucu olmaktadır.

### 2.7. Hücrel İşleyiş Mekanizmalarında Bozulmalar

Hücrel trafikte bozulmaların sinir hücresinin akson ve gövdesinde meydana gelen defektler sonucu ortaya çıktığı ALS hastalarında tespit edilmiştir.

#### 2.7.1. Aksonal Transport İşlev Bozukluğu

Aksonal transport sistemindeki bozulmalar hastalığın erken evrelerinde fazla miktarda mutant *SOD1<sup>G93A</sup>* proteinini aşırı ifade eden transgenik fare modellerinde gözlenmiştir (Bilsland ve ark., 2010). Nöronların içeri çekilmesi ve denervasyonu sonucu *SOD1<sup>G93A</sup>* farelerinde erken evrede aksonal bağlantı ve işlev bozukluğunun meydana geldiği görülmüştür (Fischer, 2004; Frey ve ark., 2000). Mutant *SOD1* agregatlarının moleküler motor proteini olan dynein ile etkileşime geçtiği ve motor nöronlarından elde edilen hücre kültürlerinde mikrotübüller boyunca akson transportunda ve fonksiyonunda bozulmalara neden olduğu bildirilmiştir (Ligon ve ark., 2005). Yanlış katlanmış *SOD1* agregatlarının Kinezin Bağlantılı Protein 3 (*KAP3*) ile de etkileşime geçtiği ve hücrel trafiği engellediği bildirilmiştir (Tateno ve ark., 2009). Ayrıca, mutant *SOD1* proteininin, nöronal kültürlerde, farelerin spinal

kord lizatlarında kinezin 1 aracılı MAP kinaz yolağını ve hızlı aksonal transportu inhibe eden nöronal p38'i aktive ettiği bildirilmiştir (Morfini ve ark., 2013).

### **2.7.2. Hücre Gövdesindeki Trafik ve ER-Golgi Transportundaki Defektler**

ALS'de akson trafiğinde bozulmaların yanında endoplazmik retikulum ve golgi organelleri arasındaki trafikte de defektlerin olduğuna dair kanıtlar ortaya çıkmaktadır. Bu durumun hastalar, hayvan modelleri ve hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda gözlenildiği üzere golgi organelinin fragmentasyonunun ALS'nin karakteristik özelliği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Sundaramoorthy ve ark., 2015). ER – Golgi salgı yolağı, protein ve lipidlerin ER ve golgi arasındaki transportu için elzemdir ve tüm endomembran sistemi için hayati önem taşımaktadır (Watson ve Stephens, 2005). ER'da yeni sentezlenen proteinler Kılıf Proteini Kompleksleri (COPs) ile birlikte kargo proteinlerine dönüştürülerek veziküller şeklinde paketlenmektedir (Barlowe ve ark., 1994). Bu proteinler, ardından ER-Golgi Ara Kompartımanı (ERGIC) aracılığı ile golgi organeline taşınmaktadır ve hücre fonksiyonlarına göre dağıtılmaktadırlar (Emr ve ark., 2009). Tüm proteinlerin üçte biri bu yolla ekstraselüler, transmembran ve aksonal lokalizasyonlarına gönderilmektedir (Barlowe ve Miller, 2013). Buna bağlı olarak, ER-Golgi transportundaki defektlerin nöronların canlılığını sürdürebilmesini olumsuz etkilediği düşünülmektedir.

### **2.7.3. Oksidatif Stres**

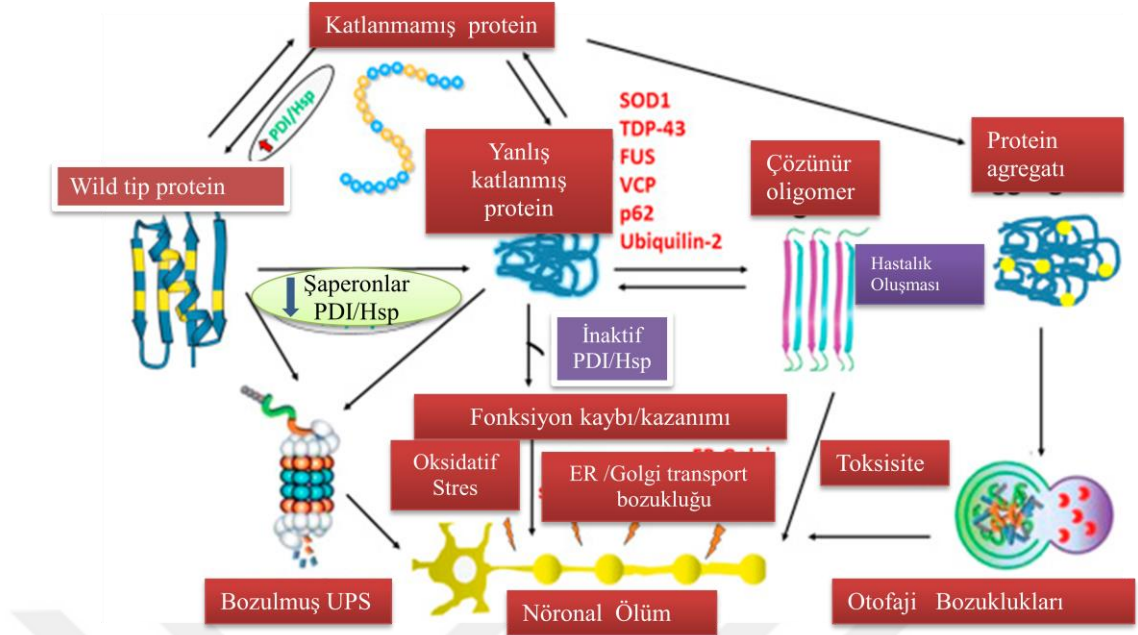
Nörodejeneratif hastalıklarda patojenik mekanizmalarla oksidatif stresin ilişkili olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stres sonucu, hücrelerde yanlış katlanmış ve agregat oluşturma eğiliminde olan, proteolizise dirençli çapraz kovalent bağ oluşturan modifiye proteinler üretilmektedir (Barber ve Shaw, 2010). ALS hastalarının kortekslerindeki antioksidan glutatyon molekülünün yokluğu veya azalması ile mutant SOD1<sup>G93A</sup> farelerinde bu redoks regülatörünün modülasyonunun mitokondriyal patolojiye yol açtığı belirlenmiştir (Weiduschat ve ark., 2014). In vitro çalışmalar, oksidatif stres altında yabancı tip SOD1 proteininin yanlış katlanma ve agregat oluşturma eğiliminin arttığını göstermektedir (Bosco ve ark., 2010). Ayrıca, sporadik ALS olgularında glutatyon molekülünün azalması sonucu TDP-43 proteinlerinin inklüzyon oluşturduğu belirtilmiştir (Iguchi ve ark., 2012).

#### **2.7.4.Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi**

ER lümeni, yüksek konsantrasyonda protein katlanmalarında görevli spesifik şaperon proteinleri ve enzimleri bulundurması nedeniyle, endoplazmik retikulum Protein Kaite Kontrol (PQC) sisteminde önemli rol almaktadır (Perri ve ark., 2015). ER içerisinde yanlış katlanmış proteinlerin birikerek ER stresini tetiklemesi sonucu yanlış katlanmış protein cevabı (UPR) sistemi aktive olmaktadır. Bu mekanizma ile ER içerisinde yanlış katlanmış proteinlerin birikiminin önlenmesi, ER içerisinde yer alan şaperon proteinlerin aktive edilerek protein yanlış katlanmalarının engellenmesi ve ER Aracılı Parçalanma (ERAD) sistemi ile yanlış katlanmış proteinlerin ortadan kaldırılması amaçlanmaktadır. Kısa süreli ER stresi UPR sistemi ile giderilir iken ALS hastalarında gözlenen uzun süreli kronik ER stresinin UPR sistemi ile çözülemediği için apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Urta ve ark., 2013).

#### **2.7.5. ALS Hastalığında Şaperon Proteinlerin Rolü**

ALS'de etkin bir tedavi yöntemi bulunmamakla birlikte terapötik stratejik yaklaşımlar önem kazanmaktadır. ER stresi süresince indüklenen Protein Disülfid İzomeraz (PDI) ailesinin üyesi olan şaperon proteinlerinin terapötik etkisi olabileceği öngörülmektedir. Moleküler şaperonlar ve bağlantılı oldukları şaperonlar proteinlerin fonksiyonel olgunlaşma basamakları olan katlanma, transport ve translokasyon olaylarında ve yanlış katlanmış protein ve peptidlerin uzaklaştırılmasında majör öneme sahiptir (Raj, 2015). Hsp40 ailesinin üyesi olan HSJ1a şaperon protein over-ekspresyonunun, SOD1<sup>G93A</sup> farelerinde motor nöronların hastalığın geç evrelerine kadar canlı kalabilmelerini sağladığı gözlenerek, ALS için terapötik strateji yaklaşımları sunduğu bildirilmiştir (Novoselov ve ark., 2013)(Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Protein katlanmasında şaperon proteinlerin rolü (Parakh ve Atkin, 2016).

Görüldüğü üzere, birçok genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı ALS’de, birincil hedefin genetik olduğu görülmektedir. Biz de bu çalışmamızda, ALS hastalarında majör rol oynayan 5 gendeki (*C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *UBQLN2*) mutasyonları taramayı ve bizim popülasyonumuzda görülen mutasyonları ortaya çıkarmayı amaçladık.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

*C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *UBQLN2* genlerinde mutasyon olup olmadığının belirlenmesini amaçlayan çalışma dahilinde, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı'nda sporadik ALS tanısı konularak takip edilen 10 olguya ayrıntılı bilgi verildikten sonra, aydınlatılmış onam formu dolduruldu. Bu olgularda hastalığın ailesel olmadığını ekarte edebilmek ve sporadik olguları seçebilmek için ayrıntılı aile öyküsü alındı ve pedigrî çizimleri yapıldı. Hastalardan periferik kan örneği alındıktan sonra genomik DNA izolasyonu için kullanılacak solüsyonlar hazırlanarak DNA izolasyonu yapıldı.

#### 3.1.Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Sporadik ALS tanısı alan 10 hastanın, K<sub>3</sub>EDTA (Venoject) içeren tüplere periferik kan örnekleri alındıktan sonra tuz ile çöktürme (salting-out) yöntemiyle genomik DNA izolasyonu yapıldı.

##### 3.1.1. Kullanılan Solüsyonlar

###### Eritrosit Lizis Tamponu İçeriği

155 Mm NH<sub>4</sub>Cl (Sigma)

10 Mm KHCO<sub>3</sub> (Sigma)

0.5 M EDTA (Sigma)

###### EDTA ( 0.5 M, pH = 7.4 )'nın Hazırlanması

18.61 g EDTA 100 ml bidistile su içerisinde çözülerek NaOH (Sigma) çözeltisi ile pH ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

1000 ml lizis tamponu hazırlamak için, 8.28 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub> ve 4 ml EDTA 1000 ml distile suda çözüldü. Solüsyonlar otoklavda steril edildikten sonra kullanılabileceği kadar +4°C'de saklandı.

###### Lökosit Lizis (WBL) Tamponu İçeriği

0.1 M NaCl (Merck)

0.5 M EDTA (Sigma)

### **WBL Tamponunun Hazırlanması**

23.4 g NaCl 100 ml distile suda çözülerek 0,1 M'lık NaCl elde edildi ve otoklavlandı. Stok NaCl solüsyonundan 2,5 ml ve stok EDTA solüsyonundan da 0,5 ml alınıp 100 ml'ye tamamlanarak final hacimde (100 ml) WBL tamponu hazırlandı.

### **%10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Solüsyonunun Hazırlanması**

10 g SDS (Q-Bio gene) tartılarak, 100 ml distile suda çözüldükten sonra 0.22 µm'lik filtreden (Costar) geçirilerek steril edildi.

### **Proteinaz K Solüsyonu**

100 mg proteinaz K (AppliChem GmbH) 10 ml distile suda çözüldü.

### **Amonyum Asetat (AmAc) Solüsyonu (9.5 M)**

36.613 g AmAc (Sigma) tartılarak, önce 15 ml steril distile su ile homojenizasyonu sağlandı ve daha sonra son hacim olan 50 ml'ye tamamlandı.

### **3.1.2. DNA İzolasyonu Basamakları**

1. EDTA'lı tüplere alınmış olan 10 ml kan 50 ml'lik dibi konik santrifüj tüpüne (falkon) aktarıldı.
2. Üzerine 30 ml eritrosit lizis tamponu ilave edilerek vortekslendi ve -20°C' de 20 dakika bekletildi.
3. -20 °C' den çıkarıldıktan sonra +4°C'de 1.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrasında tüplerin dibinde oluşan peleti kaldırmadan üzerindeki sıvı kısım uzaklaştırıldı.
5. Elle vurularak peletin homojenizasyonu sağlandı.
6. Pelet, eritrosit lizis tamponu ile 30 ml'ye tamamlandı ve vortekslendi.
7. +4°C'de 1.500 rpm'de 10 dakika santrifü edildi.
8. Santrifüj sonrasında falkonların dibinde oluşan peleti kaldırmadan üzerindeki sıvı kısım uzaklaştırıldı.
9. Üzerine 9,4 ml lökosit lizis tamponu (WBL) ve 100 µl Proteinaz K (10 mg/ml) eklenip vortekslendi. Aynı karışımın üzerine 500 µl Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ilave edildi.
10. Etüvde (37°C' de) gece boyu inkübe edildi.
11. Etüvden çıkarılıp yarım saat kadar oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.

12. Üzerine 3,7 ml amonyum asetat eklendi ve beyaz köpük oluşuncaya kadar elle vurularak karıştırıldı.
13. 25°C' de 5.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi.
14. Süpernetant temiz bir santrifüj tüpüne aktarıldı.
15. Üzerine 1 : 2 oranında % 96'lık soğuk etanol eklendi.
16. Yavaş yavaş alt üst edilerek karıştırıldı. DNA'nın görünür hale gelmesi sağlandı.
17. DNA 500 µl % 70'lik etanol içeren ependorf tüpe alındı.
18. 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
19. Etüvde kapağı açık halde 5 dakika bekletilerek alkol tamamen uzaklaştırıldı.
20. DNA yoğunluğuna göre 200-300 µl steril distile suda çözüldükten sonra +4°C'de saklandı.

### **3.1.3. DNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü**

İzole edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri spektrofotometre (Nanodrop 1000) ile belirlendi. Ölçüm için 2 µl genomik DNA örneği spektrofotometre cihazına yüklendi. Örneklerin 260 nm ve 280 nm dalga boylarında elde edilen ölçümlerinin oranı ile DNA'nın saflığı ve DNA'nın miktarı ng/ µl cinsinden belirlendi. PZR çalışmalarında kullanmak üzere DNA örnekleri 50 ng/ µl olacak şekilde sulandırıldı.

### **3.2. *C9orf72* GGGGCC Hekzanükleotid Tekrar Dizilerinin PZR Amplifikasyonu**

*C9orf72* geninin GGGGCC hekzanükleotid tekrar dizilerini içine alan gen bölgesi triplet-primer PZR yöntemiyle çoğaltıldı, floresan işaretli PZR ürünleri uygun DNA standartı eşliğinde kapiller elektrofezinde yürütüldü. *C9orf72* geni GGGGCC hekzanükleotid tekrarlarının çoğaltılması için PZR reaksiyonunda kullanılan malzemeleri ve miktarları tablo 3.1'de verilmektedir. *C9orf72* geni için PZR reaksiyonunda kullanılan primerler tablo 3.4'te verilmektedir.

**Tablo 3.1.** *C9orf72* geni GGGGCC hekzanükleotid tekrarlarının çoğaltılması için kullanılan triplet PZR malzemeleri ve miktarları

Malzeme Adı	Miktarı (µl) (1X)
10X Buffer	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5
dNTP (DeoksiNükleotidTrifosfat, 10 mM)	1
Primer-F/ Primer-R1/Primer-R2 (10 pM)	0,5
Betain	5
Taq polimeraz ( 5u/µl)	0,3
gDNA (50 ng/ µl)	3,5
dH <sub>2</sub> O (Distile Su)	11,7
<b>Toplam</b>	<b>25</b>

*C9orf72* geninin çoğaltılması için uygulanan triplet PZR koşulları tablo 3.2’de verilmiştir. PZR reaksiyonu Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda ABI 9700 PZR (Thermal Cycler) cihazında gerçekleştirildi.

**Tablo 3.2.** *C9orf72* geni GGGGCC hekzanükleotid tekrarlarının çoğaltılması için uygulanan PZR koşulları

Aşama	Gerçekleşen İşlem	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	Ön Denatürasyon	95 °C	10 dk	1 Döngü
2	Denatürasyon Primer Bağlanması Uzama	95 °C 53 °C 68 °C	35 sn 1 dk 2 dk	14 Döngü (0,5 ↓ ° C / Döngü)
3	Ön Denatürasyon Denatürasyon PrimerBağlanması Uzama	95 °C 95 °C 53 °C 68 °C	10 dk 35 sn 1 dk 2 dk	28 Döngü
4	Son Uzama	68 °C	10 dk	1 Döngü
5	Saklama	4 °C	∞	



### **3.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrez ile Görüntülenmesi**

#### **3.3.1. Elektrofrezde Kullanılan Solüsyonlar**

##### **10 X Tris-Borat-EDTA (TBE) Tamponu:**

0.089 M Trizma (Sigma)

0.089 M Borik Asit (Sigma)

0.002 M EDTA (Sigma)

10X TBE tamponu hazırlamak için, 54 g Tris-baz, 27.5 g borik asit ve 0.5 M EDTA (pH 7.4), son hacim 500 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü.

##### **1X TBE Tamponu:**

10X TBE ve bidistile sudan 1:9 oranında olacak şekilde dilüe edilerek hazırlandı.

##### **Etidiyum-Bromid (EtBr) Solüsyonu (10 mg/ml)**

10 mg EtBr (Sigma) 1 ml bidistile suda çözüldü ve aliminyum folyaya sarılarak oda sıcaklığında kullanıldı.

#### **3.4. % 2'lik Agaroz Jel Çözeltilisinin Hazırlanması**

% 2'lik agaroz jel çözeltilisini hazırlamak için; 2 g agaroz (Sigma) 100 ml 1X TBE tamponunda çözelti homojen oluncaya kadar kaynatıldı. 50 °C'ye kadar soğutulan çözeltiye, stok EtBr (10 mg/ml) çözeltilisinden 8 µl eklenerek karıştırıldı. Elektrofrez küvetine uygun taraklar yerleştirilerek, jel çözeltilisi küvete aktarıldı. Oda ısısında polimerleşen jel, taraklar çıkarıldıktan sonra PZR ürünlerini yüklemek üzere içerisinde 1X TBE bulunan elektrofrez tankına yerleştirildi. Her olgunun PZR ürünü 25 dakika boyunca 120 voltta, % 2'lik agaroz jel elektrofrezinde yürütüldü. Yürütme işlemi 10x15 cm'lik elektrofrez setinde (BioRad) gerçekleştirildi. Elektrofrez sonrası PZR ürünlerinin ortaya çıkardığı bant paternlerinin görüntüleme işlemi bilgisayar destekli yazılım programı (Syngene Transilluminator) aracılığı ile gerçekleştirildi.

#### **3.5. Agaroz Jel Elektrofrez ve Görüntüleme Sistemi**

Amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için örnekler % 2'lik jel elektrofrez ile yürütüldü. *C9orf72* geni GGGGCC tekrar sayısı artışını belirlemek üzere PZR ürününden 7'şer µl alınıp 6X yükleme tamponu (Fermentas) ile karıştırılarak, ürünler sırasıyla jelin kuyucuklarına yüklendi. PZR ürünlerinin niceliğini belirlemek için 50 bp markır (Invitrogen) kullanıldı.

*C9orf72* genine ait PZR ürünleri pürifiye edilmeden her bir olgu için, 2 µl PZR ürününe 15 µl formamid ve 0,3 µl size standart eklenip 16 kapıli ABİ 3130 XL dizileme cihazına yüklendi. Cihazdan elde edilen ham veriler Gene Mapper programında değerlendirildi.

### **3.6. *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *UBQLN2* Genlerinin Hedeflenen Ekzonlarının PZR Reaksiyonu**

*SOD1* geninin, ekzon-intron bağlantı bölgelerini içerecek şekilde hazırlanan primerlerle 5 ekzonunun PZR amplifikasyonu Corbett PZR cihazında gerçekleştirildi.

*FUS* geninin en sık mutasyon bildirilmiş olan 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14 ve 15 nolu ekzonları toplam 6 sekans bölgesi olacak şekilde kodlayan dizileri ve ekzon-intron bağlantı bölgeleri ilgili primerler ile ABİ 9700 PZR cihazında amplifiye edildi.

*TARDBP* geninin tüm kodlayan dizileri, ekzon-intron bağlantı bölgelerini içine alacak şekilde 5 bölge olarak Corbett PZR cihazında amplifiye edildi.

*UBQLN2* geni 4 sekans bölgesi olacak şekilde bölünerek Corbett PZR cihazında amplifiye edildi.

4 gen için hedeflenen ekzonların amplifikasyonunda uygulanan PZR reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve miktarları tablo 3.3'de verilmiştir.

**Tablo 3.3.** *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *UBQLN2* genlerinin hedeflenen ekzonlarının çoğaltılması için PZR reaksiyonunda kullanılan malzemeler ve miktarları

<b>Malzeme Adı</b>	<b>Miktarı (µl) (1X)</b>
10X Buffer	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5
dNTP (10 Mm)	1
İleri Primer (10 pmol)	1
Geri Primer (10 pmol)	1
Taq polimeraz (5 u/ µl)	0,3
Betain (5 M)	2,5
gDNA (50 ng/µl)	3
dH <sub>2</sub> O (Distile Su)	11,2
<b>Toplam</b>	<b>25</b>

**Tablo 3.4.** *C9orf72* geni GGGGCC heksanükleotid tekrarları için DNA fragman analizinde ve *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *UBQLN2* genleri için yapılan DNA dizi analizinde kullanılan primer dizileri (Primer dizaynında <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov.tr> internet sayfasından yararlanılmıştır).

Primer çifti no	Primer adı	Primer dizileri
1	C9ORF72	F- FAM- TGTA AACGACGGCCAGTCAAGGAGGGAAACAACCGCAGCC- R- CAGGAAACAGCTATGACCGGGCCCGCCCCGACCACGCCCCGGCCCCG GCCCCGG-
2	SOD1-e-1	F- GCGGAGGTCTGGCCTATAA-, R-CCC GGTGACTCAGCACTT-
3	SOD1-e-2	F- CCATCTCCCTTTTGAGGACA-, R-CGACAGAGCAAGACCCTTTC-
4	SOD1-e-3	F- CTCAGATGATCCAGCCACCT-, R-AAAAGCATTCAGCATTGG-
5	SOD1-e-4	F- GTGCAGCCCCATCTTTCTT-, R-GGATCTTTAGAAACCGCGACT-
6	SOD1-e-5	F- TTGCAACACCAAGAAAAAGC-, R-TTCACAGGCTTGAATGACAAA-
7	TARDBP-e-1	F- CCCTTACCTTCACCTCGTCA-, R-TCGTGGTCTTCCAAACTTGTC-
8	TARDBP-e-2	F- GAATTTGCACCAGAAAAGCA-, R-ATTGTGGCTGGGCATGGT-
9	TARDBP-e-3	F- CTGGCCCCATCTCTCTTTT-, R-TGCACTAAGGGCCAAAGACT-
10	TARDBP-e-4	F- TCACTGCTATCCAAGGCGAATG-, R-GTCTTGATCTCCTGACCTC -
11	TARDBP-e-5	F- TGCTTGTAATCTAAGTTTTGTTGC-, R- CCCACCATTCTATACCAACCA-
12	FUS-e-2-3	F- CTCCCAA ACTGCTGGGATTA-, RAGGCAGGAGAATCGTTTGAA-
13	FUS-e-4-5	F- CTCTTTCCTGGTGGCTTTTG-, R-AAAATGGGCTGCAGACAAAAG-
14	FUS-e-6	F- CCTGGCACTTGTCAAACCTT-, R-GCACTAGGGACTGGCTTCAG-
15	FUS-e-11-12	F- AGAAAGGCACGCTTCTCTTG-, R-TGGCTAAATCTGACCCCAAC-
16	FUS-e-13-14	F- GAGAAGCAAGCCGTTTGTGTC-, R-TCCACCTAGCCCTCAAAATG-
17	FUS-e-15	F- TAGGCTTGGAGAGGCTGGTA-, R-CCTTCTCCCCGAACACTGTA-
18	UBQLN2	F- GAACCGCAGTCTTCATCACA-, R-AAACGGGTTGCTATTTGTGG-
19	UBQLN2	F- CCACAAATAGCAACCCGTTT-, R-ATTGCCAGACCCACTACCAG-
20	UBQLN2	F- CTCCGTGGGGAGTAGTTCCT-, R-GAGTGAAGCTCGGAATCAGG-
21	UBQLN2	F- CTGATTCCGAGCTTCACTCC-, R-AGTAGGAGGGAGGGACTCCA-

### 3.7. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

*SOD1*, *TARDB*, *FUS* ve *UBQLN2* genlerinin hedeflenen ekzonlarına ait PZR ürünleri, reaksiyon sırasında kullanılmamış olan dNTP'leri ve primerleri uzaklaştırmak üzere manuel PEG pürifikasyon yöntemi ile saflaştırıldı.

#### 3.7.1. PEG Pürifikasyonunun Basamakları

1. PZR ürünlerinin üzerine 1:1 hacim PEG solüsyonu ilave edildi. Vorteksenerek oda sıcaklığında 15 dk bekletildi.
2. 13500 rpm'de oda sıcaklığında 15 dk santrifüj edilerek üstteki sıvı kısım atıldı.
3. 90 µl % 70'lik soğuk etanol eklenerek 13500 rpm'de oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edildi.
4. Üstteki sıvı kısım atıldı.
5. Alkolün uzaklaşmasını sağlamak üzere 15 dk oda sıcaklığında kurutularak, 20 µl distile suda çözüldü ve jelde kontrol edildi.

### 3.8. DNA Dizi Analizi Reaksiyonu

Dizi analizi reaksiyonları, tablo 3.5'de belirtilen reaksiyon içeriği hazırlandıktan sonra Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 marka PZR Cihazı ile aşağıda belirtilen DNA dizileme programına göre gerçekleştirildi.

**Tablo 3.5.** DNA dizileme reaksiyonu için PZR içeriği

Malzeme Adı	Miktarı (µl) (1X)
5 X Buffer	2
BigDye™v3.1	2
İleri veya Geri Primer (1 pmol / µl)	2
Pürifiye PCR ürünü	3
dH <sub>2</sub> O	1
<b>Toplam</b>	<b>10</b>

DNA dizileme amacıyla hazırlanan örnekler için PZR koşulları tablo 3.6'da verilmektedir.

**Tablo 3.6.** DNA dizileme reaksiyonu için PZR koşulları

Aşama	Gerçekleşen İşlem	Sıcaklık	Zaman
1	Ön Denatürasyon	95 °C	5 dk
2	Denatürasyon	95 °C	30 sn
3	Primer Bağlanması	55 °C	10 sn
4	Uzama	60 °C	4 dk
5	Son Uzama	72 °C	7 dk

25 Döngü

### 3.9. DNA Dizi Analizi İçin Sekans Sonrası Pürifikasyon

1. 1.5 ml santrifüj tüplerine 3 µl NaAc (Sodyum asetat 3 molar (M), pH 5.2),(Sigma) konuldu.
2. Üzerine 30 µl % 96 alkol eklendi.
3. PZR ürünleri tüplerin içindeki karışımın üzerine eklendi ve kısa süre vortekslendikten sonra buzun içinde 15 dk bekletildi.
4. 13500 rpm'de +4 °C'de 20 dk santrifüj edildi.
5. Peleti kaldırmadan süpernetant uzaklaştırıldı.
6. Üzerine % 70'lik 180 µl soğuk etanol eklendi ve 10 dk 13500 rpm'de +4°C'de santrifüj edildi.
7. Süpernetant uzaklaştırıldı.
8. 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek etanolün uzaklaşması sağlandı.
9. Her bir olgunun pürifiye PZR ürünü 20 µl formamidle çözüldükten sonra ABI 3130 XL DNA dizileme ve genotipleme cihazına yüklendi. Cihazdan elde edilen ham veriler ABI Sequence Analysis v3.1 programında değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Klinik Bulgular

Çalışmamız kapsamında, Akdeniz Üniversitesi, Nöroloji polikliniğinde kayıtlı, klinik olarak sporadik ALS tanısı alan 10 olgu çalışıldı. Olguların 4'ü kadın ve 6'sı erkek bireylerden oluşmaktadır. Olgularda semptomların başlangıç yaş ortalaması 57 olup, en erken 41, en geç 79 yaşında ortaya çıktığı görülmektedir. Hastaların demografik ve klinik bulguları Tablo 4.1'de verilmektedir.



**Tablo 4.1.** Sporadik ALS olgularının klinik bulguları

Sıra No	Çalışmaya dahil edilen olgular	Cinsiyet Yaş	Semptomların Başlama Yaşı	Bulbar Bölge		Üst Ekstremité		Alt Ekstremité		Aksiyal Kaslar	Olguda Gözlenen Genomik Değişim(ler)
				UMN	LMN	UMN	LMN	UMN	LMN		
1	Y.D	E/52	49	Brisk jaw jerk	-	Hiperrefleksi Parmak fleksiyonu	Atrofi ve güçsüzlük Fasikülasyon	Hiperrefleksi Babinski refleksi	Fasikülasyon	Toraks Kas Fasikülasyonu	<i>SOD1</i> : c.72+133C>T <i>FUS</i> : c.288C>T (Ekzon 4) <i>TARDBP</i> :c.714+67_714+68insG
2	H.M	K/69	67	Brisk jaw jerk	-	Hiperrefleksi Hoffman's Sign Spastisite	Atrofi ve güçsüzlük Fasikülasyon	Hiperfleksi Babinski refleksi Spastisite	-	-	<i>FUS</i> : c.288C>T (Ekzon 4)
3	N.Ç	K/64	62	-	-	Hiperrefleksi Hoffman's Sign	Atrofi ve güçsüzlük	Hiperrefleksi	Atrofi ve güçsüzlük	-	<i>FUS</i> : c.288C>T (Ekzon 4) <i>TARDBP</i> :c.714+67_714+68insG
4	E.Ö	K/81	79	+	-	-	-	-	-	-	<i>FUS</i> :c.288C>T (Ekzon 4)
5	G.A	K/70	68	-	-	Hiperrefleksi Hoffman's Sign	-	Hiperrefleksi Babinski refleksi Spastisite	-	-	<i>SOD1</i> :c.72+133C>T <i>FUS</i> :c.288C>T(Ekzon 4) <i>FUS</i> :c.147C>A(Ekzon 3) <i>TARDBP</i> :c.714+67_714+68insG <i>C9orf72</i> : c.-45+162_-45+163insGGGGCC



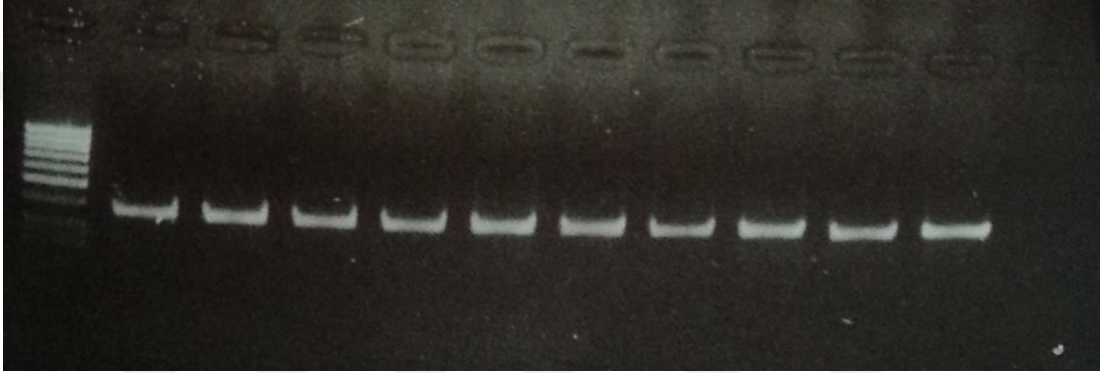
**Tablo 4.1. devam** Sporadik ALS olgularının klinik bulguları

Sıra No	Çalışmaya dahil edilen olgular	Cinsiyet Yaş	Semptomların Başlama Yaşı	Bulbar Bölge		Üst Ekstremité		Alt Ekstremité		Aksiyal Kaslar	Olguda Gözlenen Genomik Değişim(ler)
				UMN	LMN	UMN	LMN	UMN	LMN		
6	H.G	E/58	51	-	-	Hoffman's Sign	Atrofi ve güçsüzlük Fasikülasyon Hiporefleksi	Hiperrefleksi Babinski refleksi	-	-	<i>SOD1</i> : c.72+133C>T <i>FUS</i> :c.288C>T (Ekzon 4)
7	Ö.K	E/63	61	Brisk jaw jerk	Weak orbicularis oris	Hiperrefleksi	Atrofi ve güçsüzlük	Hiperrefleksi Babinski refleksi Spastisite	-	-	<i>FUS</i> :c.288C>T (Ekzon4) <i>FUS</i> :c.147C>A (Ekzon3) <i>TARDBP</i> : c.714+67_714+68insG
8	C.A	E/46	41	-	-	Hiperrefleksi Parmak fleksiyonu	Atrofi ve güçsüzlük	- Atrofi ve güçsüzlük Fasikülasyon Hiporefleksi	Toraks Kas Fasikülasyonu	-	<i>SOD1</i> : c.72+133C>T <i>FUS</i> :c.147C>A (Ekzon3) <i>TARDBP</i> : c.714+67_714+68insG
9	H.B	E/47	42	+	-	+	-	+	-	-	<i>FUS</i> :c.288C>T (Ekzon 4) <i>TARDBP</i> : c.714+67_714+68insG
10	S.U	E/54	50	-	-	+	+	-	-	-	<i>FUS</i> : c.288C>T (Ekzon4) <i>C9orf72</i> : c.-45+162_- 45+163insGGGCC

UMN: Üst Motor Nöron LMN: Alt Motor Nöron

#### 4.2. Moleküler Genetik Analiz Sonuçları

10 sporadik ALS olgunun *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *UBQLN2* genlerinin tüm kodlayan bölgeleri dizi analizi yöntemiyle ve *C9orf72* geninin birinci intronunda bulunan GGGGCC hekzanükleotid tekrar sayısı artışı fragment analizi yöntemiyle çalışılmıştır. PZR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra 50 bp DNA standart eşliğinde yürütülen, *FUS* geninin 375 bp uzunluğundaki beşinci ekzonuna ait elektroforez jel görüntüsü örnek olarak şekil.4.1’de verilmektedir. Bu genlere ait genomik değişiklikler tablo 4.2’de gösterilmiştir.

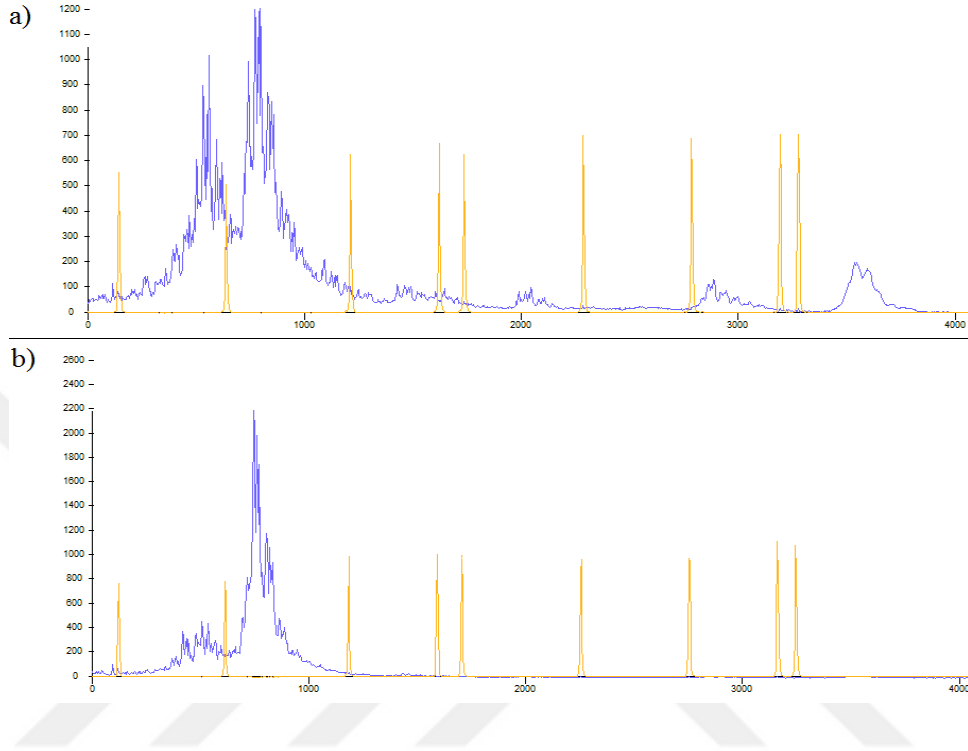


Şekil 4.1. *FUS* geninin beşinci ekzonuna ait PZR jel elektroforezi görüntüsü

**Tablo 4.2.** Çalışmamızda 10 sporadik ALS olgusunda *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *C9orf72* genlerinde gözlenen polimorfizm ve mutasyonlar

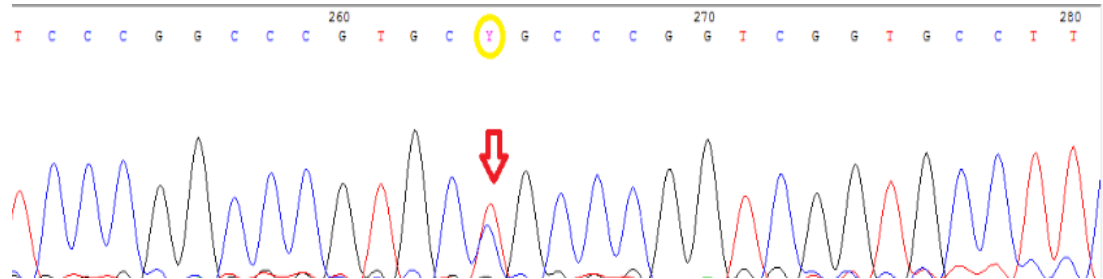
Gözlenen Genomik Değişiklik	Gen	Ekzon / İntron	Gözlenen Olgu(lar)	Homozigot / Heterozigot
NC_000021.8:g.33032287C>T NG_008689.1:g.5353C>T NM_000454.4:c.72+133C>T	<i>SOD1</i>	İntron 1	Y.D G.A H.G C.A	Heterozigot Heterozigot Heterozigot Heterozigot
NC_000016.10:g.31183958C>T NG_012889.2:g.8827 C>T NM_001170634.1:c.288C>T	<i>FUS</i>	Ekzon 4	G.A H.M H.B Ö.K E.Ö H.G N.Ç S.U Y.D	Heterozigot Heterozigot Heterozigot Heterozigot Heterozigot Homozigot Homozigot Homozigot Homozigot
NC_000016.10:g.31182621C>A NG_012889.2:g.7490C>A NM_001170634.1:c.147C>A	<i>FUS</i>	Ekzon 3	G.A Ö.K C.A	Heterozigot Heterozigot Heterozigot
NC_000001.10:g.11080723_11080724 insG NG_008734.1:g.13045_13046insG NM_007375.3:c.714+67_714+68insG	<i>TARDBP</i>	İntron 5	C.A G.A H.B N.Ç Ö.K Y. D	Homozigot Homozigot Homozigot Homozigot Homozigot Homozigot
NC_000009.11:g.27573544_27573545 insGGCCCC NG_031977.1:g.5320_5321insGGGGCC NM_001256054.1:c.-45+162_-45+163insGGGGCC	<i>C9ORF72</i>	İntron 1	S.U G. A	Heterozigot Heterozigot

*C9orf72* geninin DNA fragman analizi ile incelenmesi sonucunda, birinci intronunda 10 olgudan 2'sinde heterozigot formda, NCBI'da daha önce tanımlanmış ve rs74180757 numarası verilmiş olan GGGGCC tekrar sayısı artışı belirlenmiştir. *C9orf72* geninde tespit edilen genomik değişime ait şekil 4.2'de verilmektedir.



**Şekil 4.2.** (a) c.-45+162\_-45+163insGGGGCC mutasyonu gözlenen olgu (b) tekrar sayısı artışı mutasyonu taşımayan olgu

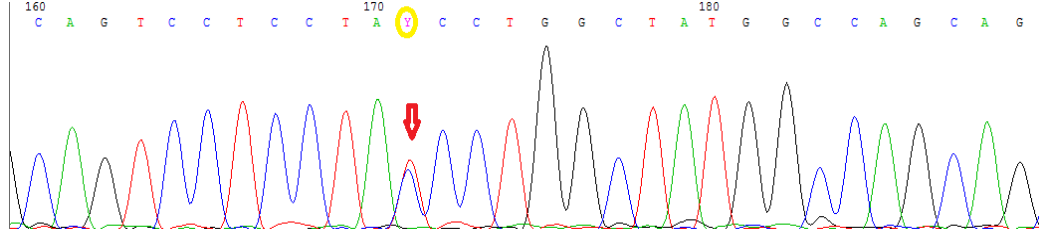
DNA dizi analizinde 5 farklı bölgeye ayrılarak incelenen *SOD1* geninin birinci intronunda belirlenen ve NCBI'da daha önce tanımlanmış ve rs17881180 numarası verilmiş olan c.72+133C>T değişimi heterozigot formda olmak üzere 4 olguda tespit edilmiştir. *SOD1* geninin birinci intronunda gözlenen bu değişime ait görsel, şekil 4.3'de verilmektedir.



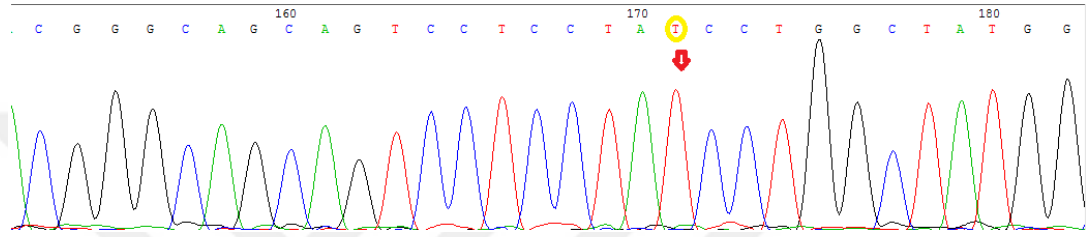
**Şekil 4.3.** c.72+133C>T heterozigot değişim

*FUS* genine ait mutasyon taramasında 2 farklı genomik değişim belirlenmiştir. Bunlardan birincisi, 4.ekzonda yer alan ve protein düzeyinde amino asit değişimine

neden olmayan ve NCBI’da daha önce rs1052352 numarası ile belirlenmiş olan c.288C>T değişimidir. Bu değişim 5 olguda heterozigot, 4 olguda ise homozigot formda saptanmıştır. Bu değişime ait görseller, şekil 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.

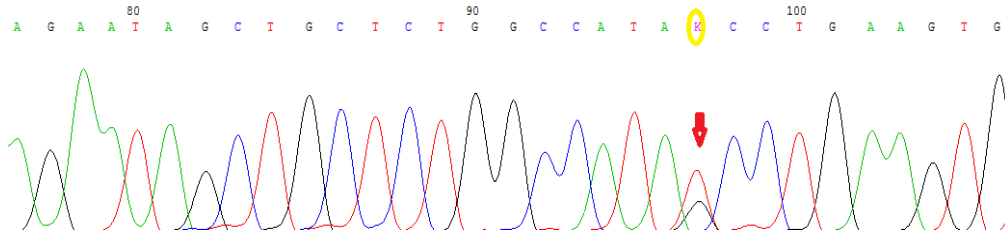


Şekil 4.4. c.288C>T heterozigot değişim



Şekil 4.5. c.288C>T homozigot değişim

*FUS* genine ait ikinci değişiklik 3.ekzonda bulunan ve protein düzeyinde amino asit değişimine neden olmayan ve NCBI’da rs741810 numarası ile tanımlanmış olan c.147C>A değişimidir. Bu genomik değişiklik 3 olguda da heterozigot formda tespit edilmiştir. Bu değişime ait görsel, şekil 4.6’de verilmiştir.



Şekil 4.6. c.147C>A heterozigot değişim (Revers görüntüsü)

*TARDBP* genine ait mutasyon taramasında, beşinci intronda homozigot formda 6 olguda, rs143130606 numarası ile daha önce NCBI’da tanımlanmış olan c.714+67\_714+68insG değişimi tespit edilmiştir. Bu değişikliğe ait görsel, şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. c.714+67\_714+68insG homozigot değişimi

## 5. TARTIŞMA

ALS, dünya çapında en sık görülen üçüncü motor nöron hastalığıdır (Boillee ve ark., 2006). Sporadik ALS'nin kadınlara göre erkeklerde daha sık, ancak bulbar başlangıçlı olduğunda ise kadınlarda erkeklerden daha sık görüldüğü bilinmektedir (Andersen ve ark., 1997; Andersen ve Al-Chalabi, 2011). Çalışmamıza dahil edilen 10 sporadik ALS olgunun 6'sının erkek ve bulbar başlangıçlı 2 olgunun 2'sinin de kadın olması bu bilgiyi desteklemektedir.

Hem ailesel hem de sporadik ALS olgularında yapılan genetik analizler sonucunda en çok *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *UBQLN2* genlerinde mutasyon belirlenmiştir.

*C9orf72* geninin birinci intronundaki GGGGCC (G4C2) hekzanükleotid tekrar sayısındaki artışlar ALS'nin en yaygın nedeni olarak gösterilmektedir (Cooper-Knock ve ark., 2014; Bunton-Stasyshyn ve ark., 2015). G4C2 tekrar sayısı artışının neden olduğu patojenik mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte, *C9orf72* proteininin fonksiyon kaybına ve RNA toksisitesine yol açabileceği düşünülmektedir (DeJesus-Hernandez ve ark., 2011). Southern blot analizi ile belirlenebilen tekrar sayısı artışı büyüklüğünün sağlıklı bireylerde 20, hasta bireylerde ise 30 ve üzerine çıktığı bilinmektedir (Renton, 2011). 2011 yılında Renton ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Finlandiya popülasyonunda, 402 ALS olgusundan 113'ünde (52 ailesel ALS olgusunda % 46.4, 61 sporadik ALS olgusunda % 21 oranında ) ve 478 kontrol grubundan ise 2'sinde % 0.4 oranında hekzanükleotid tekrar sayısı artışı tespit edilmiştir (Renton ve ark., 2011). Özoğuz ve arkadaşları tarafından Türkiye'deki ALS genetiğinin ve yeni mutasyonların araştırılmasına yönelik yapılan bir çalışmada, 361 sporadik olgunun 11'inde % 3.1 oranında hekzanükleotid tekrar sayısı artışı gözlenmiştir (Ozoguz ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda ise, *C9orf72* geninde 10 olgunun 2'sinde % 20 oranında hekznükleotid tekrar sayısı artışı tespit edilmiştir. Bizim bulgumuz sALS'nin ortaya çıkışında en etkin genetik defektin tekrar dizisi artışı olduğunu desteklemektedir. Diğer taraftan biz çalışmamızda 10 olguda analiz gerçekleştirirken, Özoğuz ve arkadaşlarının Türk popülasyonuna ait yaptığı çalışmada, sporadik olgu sayısı 361 gibi çok yüksek bir sayı iken tekrar sayısı artış oranı % 3.1 olarak bildirilmiştir. 2017 yılında, Nordin ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği, Avrupa, ABD ve Japonya ülkelerinin katıldığı, İsveç'te yapılan çok

uluslu bir çalışmada, *C9orf72* geninde heksanükleotid tekrarlarının bulunduğu bölgenin downstreamindeki sekans varyantlarının fragman analizi üzerindeki etkileri ALS ve FTD hastaları ile kontrol grubunda araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, Avrupa ve ABD'deki 6508 ALS ve FTD hastaları ile kontrol grubunda % 10.7 oranında heksanükleotid tekrar sayısında artış gözlenirken, Japonya'dan çalışmaya dahil edilen 273 hasta ve 200 kontrol grubunda tekrar sayısı artışı mutasyonu tespit edilememiştir (Nordin ve ark., 2017). Ayrıca, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda 2016 yılında tamamlanan TÜBİTAK projesinde de 14 ailesel ALS ve 8 sporadik olguda tekrar sayısı artışı gözlenmemiştir. Bu sonuçlar arasındaki heterojenite, tekrar sayısının belirlenmesinde uygulanan yöntemin sorgulanmasına yol açmıştır. G4C2 tekrar sayısındaki artışın belirlenmesinde kullanılan en yaygın yöntem uygun maliyetli ve hızlı sonuç alınabilen repeat-primed PCR yöntemi olup, G4C2 tekrar sayısı artışına sahip allelin testere dışı görüntüsü ile saptandığı bir yöntemdir. Southern blot yöntemi ise, metodolojik kısıtlamaları olduğu bilinen repeat-primed PCR yöntemine göre daha güvenilirdir ve bu yöntemle G4C2 tekrar sayısının miktarsal olarak ne kadar arttığı saptanabilmektedir. 2013-2014 yılları arasında, laboratuvarların G4C2 tekrar sayısı artışını belirlemedeki duyarlılığını ve özgüllüğünü test etmek amacıyla yapılan bir çalışmada, 78 DNA örneği 14 ayrı laboratuvarında repeat-primed PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Sadece 5 laboratuvar % 100 duyarlılık ve hassasiyetle G4C2 tekrar sayısı artışını belirleyebilmiştir (Akimoto, 2017). ALS olgularının % 3'ünde tekrar dizisinin downstreaminde in/del varyasyonları belirlemişlerdir. Bu delesyon ya da insersiyon varyantlarının fragment analizindeki testere dışı görüntüsünü bozarak yanlış negatif sonuca sebep olabileceğini vurgulamışlardır. Buradan yola çıkarak *C9orf72* tekrar sayısı artışı gözlenmeyen olgularda in/del varyasyonlarının değerlendirilmesi gerektiği düşüncesindeyiz. Bu varyasyonların varlığı kliniği etkilemezken, varyasyon olmaksızın tekrar dizisi artışının hastalığın erken başlangıçlı ve kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu vurgulanmaktadır.

Bu çalışmada, *C9orf72* heksanükleotid tekrar sayısı artışı belirlenen 2 olguda hastalık geç başlangıçlıdır. Bu da olgularda indel varyantlarının araştırılmasını kaçınılmaz kılmaktadır.

ALS ile ilişkilendirilmiş diğerk bir gen olan *SOD1* geninde 166 mutasyonun, 147'sini missense mutasyonları, 19'unu *SOD1* polipeptidinin uzunluğunda değişikliğe yol açan nonsense ve delesyon mutasyonları oluşturmaktadır. Bunlara ek olarak, patolojik olmadığı düşünölen 8 sessiz mutasyon ve 9 intronik varyant tanımlanmıştır (Andersen ve ark., 2003). *SOD1* genindeki patojenik varyantların yaklaşık % 20'sinin ailesel ALS ve % 1'nin sporadik ALS olguları ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (DW., 2009). 2009 yılında yapılan bir çalışmada, ailesel ALS olgularında, *SOD1* geninin dördüncü intronunda, heterozigot formda gözlenen c.358 – 304C >G değişiminin 43 bp'lik psödoekzon oluşumuna ve 7 yeni amino asit ile ardından bir stop kodonu eklenmesine neden olduğu belirtilmiştir. Bu kriptik ekzonun ailesel ALS olgularında kosegregasyon gösterdiği belirtilerek patojenik olabileceği düşünülmektedir (Valdmanis ve ark., 2009).

Yenidoğan döneminde ölümlle sonuçlanan metabolik hastalıklardan metilmalonik asidemi ya da propionik asidemide intronik mutasyonlarla ortaya çıkan psödoekzonların antisense oligonökleotidlerle susturulabileceği gösterilmiş olup, bu çalışma intronik varyantların hem patolojik hem de tedavi açısından önem kazandığını göstermektedir (Rincon ve ark., 2007).

Daha önce literatürde bildirilen hastalık etkeni ile ilişkilendirilmiş *SOD1* gen mutasyonları tanımlanmış olup, bu çalışmamızda sporadik ALS olgularımızın 4'ünde % 40 oranında *SOD1* geninin birinci intronunda gözlenen c.72+133 C>T değişimi rs17881180 numarası ile NCBI'da daha önce tanımlanmış olup Avrupa sıklığı % 6 olarak bildirilmektedir. Aynı varyantın daha önceki, bölümümüzde yürütölen TÜBİTAK projesindeki 2 ailesel ve 2 sporadik olguda da belirlenmiş olması, bu varyantın Türk toplumunda çok daha yüksek sıklıkla bulunduğunu göstermekte ve henüz bu varyantın klinik önemi bilinmediğinden Türk toplumunda sağlıklı kontrol grubunda bu varyantın sıklığının araştırılması gerektiği ortaya çıkmaktadır.

ALS ve FTD hastalarında nöronal sitoplazmik TDP-43 inklüzyonlarının tespit edilmesi üzerine yapılan çalışmalar sonucu, *TARDBP* geninde 30 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlardan bir tanesi hariç diğerklerinin genin 6. ekzonunda yer aldığı bilinmektedir. Kirby ve ekibinin kuzey İngiltere popülasyonunda, 37 ailesel ALS ve 407 sporadik ALS olgusu ile yaptığı bir çalışmada, 2'si ailesel ALS, 2'si sporadik ALS olgularında olmak üzere ekzon 6'da 4 farklı mutasyon, 3 sporadik



ALS olgusunda 1, 3 ve 4 numaralı intronlar ile 2 sporadik ALS olgusunda 5' UTR bölgesinde yeni polimorfizmler tespit edilmesi sonucunda, *TARDBP* mutasyonlarının sıklığı ailesel ALS olgularında % 5, sporadik ALS olgularında % 0.4 oranında tespit edilmiştir (Kirby ve ark., 2010). Tsai ve ekibinin 2011 yılında yaptığı bir diğer çalışmada, *TARDBP* genindeki mutasyonların % 4-6 oranında ailesel ALS olgularında, % 0-2 oranında sporadik ALS olgularında görüldüğü bildirilmiştir (Tsai ve ark., 2011). Görüldüğü gibi, *TARDBP* geninde patolojik mutasyon sıklığı sporadik ALS'de oldukça nadir olup, bizim çalışmamızda da patolojik mutasyon belirlenmemiştir. Ancak, 6 olguda % 60 oranında *TARDBP* geninin beşinci intronunda guanin nükleotidinin insersiyonu gözlenmiştir ve bu varyant NCBI'da rs143130606 numarası ile bildirilmiştir. Bu varyantın patolojik olup olmadığının henüz belli olmaması ile birlikte, TDP-43 proteininin glisin zengin bölgesinin sentezinden sorumlu olduğu bilinen ekzon 6'da meydana gelen p.M337V mutasyonunun tavuk embriyosunda uzuv ve kuyruk oluşumunda bozulmalara neden olduğu gözlemlendiğinden (Sreedharan ve ark., 2008), 5. intronda Guanin nükleotidinin insersiyonunu bulunduran olgularımızın hepsinde ALS'nin kol ve bacak başlangıçlı olmaları ve 6. ekzona komşuluğu nedeniyle bu varyantı önemli kıldığımızı düşünmekteyiz.

ALS olgularında *TARDBP* geninde tanımlanan mutasyonların bildirilmesinden sonra, benzer fonksiyonlara sahip olduğu bilinen *FUS* genine yoğunlaşmıştır. *FUS* mutasyonlarının % 4-6 oranında ailesel ALS, % 0.7-1.8 oranında sporadik ALS olgularında görüldüğü bilinmektedir (Millecamps ve ark., 2010). *FUS* geninde şimdiye kadar 3, 5, 6, 14 ve 15 nolu ekzonlarda 42 mutasyon tanımlanmıştır. Bu ekzonlarda mutasyon taşıyan bireylerde tipik ALS fenotipi gözlenmesinin yanı sıra bilişsel bozukluğun da geliştiği bildirilmiştir (Kwiatkowski ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda ekzon 3'te genomik değişim belirlediğimiz 3 olgudan 1'inde bilişsel bozukluk gözlenmektedir.

Çalışmamızda, *FUS* geninin üçüncü ekzonunda 3 olguda % 30 oranında c.147 C>A genomik değişimi heterozigot; dördüncü ekzonda belirlenen c.288C>T değişimi 5 olguda % 50 oranında heterozigot, 4 olguda ise % 40 oranında homozigot formda gözlenmiştir. *FUS* geninin 4. ekzonunda belirlediğimiz c.288C>T değişiminin 10 olgudan 9'unda gözlenmesi, *FUS* geninin oldukça polimorfik bir gen olduğunu

desteklemektedir. Ayrıca 4.ekzonda gözlenen c.288C>T genomik değişiminin aynı zamanda ALS'de en yaygın mutasyon olarak belirtilen *C9orf72* heksanükleotid tekrar sayısı artışı gözlediğimiz iki olguda da belirlenmiş olması, bu değişimin patojenik olmayan bir varyant olduğunu göstermekle birlikte, hastalığın klinik şiddeti, olgunun yaşı ve tutulum bölgesinin göz önünde bulundurulması gerektiğini düşünmekteyiz.

2009 yılında Kwiatkowski ve ekibi tarafından, *FUS* geninde 10 tanesi ekzon 15, 2 tanesi ekzon 5 ve 1 tanesi ekzon 6'da olmak üzere 13 farklı varyantın ailesel ALS olgularında gözlenmesi sonucu ekzon 15 hot-spot bölge olarak değerlendirilmektedir (Kwiatkowski ve ark., 2009). Çalışmamız kapsamındaki 10 sporadik ALS olgusunda *FUS* geninin 15. ekzonunda genomik değişimin gözlenmemesi bu ekzonun ailesel ALS'de hot-spot bölge olarak değerlendirildiği literatür bilgisiyle örtüşmektedir.

Ubiquitin benzeri proteini kodlayan *Ubiquilin 2* genindeki X kromozomuna bağlı dominant kalıtım gösteren mutasyonların ALS hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. 2011 yılında yapılan bir çalışmada, 23 sporadik ALS, 12 ailesel ALS ve 5 FTD olgusu ile 6 kontrol grubunun spinal kord örnekleri incelendiğinde, tüm ALS olgularında immünreaktif ubiquilin 2 inklüzyonları tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Deng ve ark., 2011). Özoğuz ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 116 ailesel ALS olgusunda % 2.4 oranında; 361 sporadik olguda % 0.6 oranında *Ubiquilin 2* geninde genomik değişiklik saptadıkları bildirilmiştir (Ozoguz ve ark., 2015).

Çalışmamızda, *Ubiquilin 2* geninde ALS ilişkili mutasyonların sıklıkla gözlendiği PXX domainini içeren sekans bölgesinde patojenik ya da patojenik olmayan herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu sonucun çalışma kapsamına aldığımız sınırlı olgu sayısından ve genin korunmuş olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, incelenen olgu sayısının az olmasına karşın bulgularımızın literatürü desteklediği, sporadik ALS olgularında etkili olabilen 5 gendeki mutasyon tarama sonuçlarının toplumumuz açısından önemli veriler ortaya koyduğunu düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, ailesel ve sporadik ALS olgularının aynı klinik bulguları taşıması ve ailesel ALS olgularında gözlenen birçok mutasyonun sporadik ALS olgularında da gözlenmesinden yola çıkılarak sporadik ALS tanısı alan olgularda *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *UBQLN2* gen mutasyonlarının sıklığı aydınlatılmaya çalışılmıştır.

*C9orf72* geninin birinci intronunda NCBI'da rs74180757 numarası ile tanımlanan patolojik GGGGCC heksanükleotid tekrar sayısı artışı 10 olgunun 2'sinde (% 20 oranında) heterozigot formda tespit edilmiştir.

*SOD1* geninin birinci intronunda gözlediğimiz NCBI'da rs17881180 numarası ile tanımlanan c.72+133C>T intronik varyantı, 4 olguda (% 40 oranında), heterozigot olarak belirlenmiştir.

*FUS* geninin üçüncü ekzonunda gözlenen ve NCBI'da rs741810 numarası ile tanımlanan c.147C>A genomik değişimini 3 olguda (% 30 oranında) heterozigot formda tespit edilmiştir. Aynı genin dördüncü ekzonunda gözlenen ve NCBI'da rs1052352 numarası ile tanımlanan c.288C>T değişimi 5 olguda (% 50 oranında) heterozigot, 4 olguda ise (% 40 oranında) homozigot formda gözlenmiştir. c.147C>A (p.Gly49=) ve c.288C>T (p.Tyr96=) tek nükleotid değişimlerinin amino asit değişimine neden olmadığı bilinmektedir.

*TARDBP* geninin beşinci intronunda 6 olguda (% 60 oranında) homozigot formda gözlediğimiz c.714+67\_714+68insG değişimi NCBI'da rs143130606 numarası ile tanımlanmaktadır.

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda 2016 yılında tamamlanan ve "Ailesel Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS)'lu olgularda *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *UBQLN2* Gen Mutasyonlarının Araştırılması" başlıklı TÜBİTAK projesinde 14 ailesel ve 8 sporadik olguda *C9orf72* geninde GGGGCC heksanükleotid tekrar sayısı artışı saptanamamıştır. Yaptığımız literatür taramasında, *C9orf72* geninin birinci intronunun downstream bölgesindeki sekans varyantlarının heksanükleotid tekrar sayısı artışını gösteren piklerin değerlendirilmesinde yanlış negatif sonuçlara yol açabileceği bildirilmiştir. *C9orf72* geninin downstream bölgesindeki indel varyasyonlarının yeni nesil dizileme yöntemi ile araştırılması ve NCBI'da klinik

önemi henüz ortaya konulmamış olan varyantların olgu sayısı artırılarak mutlaka kontrol grubu ile çalışılması önerilmektedir. Sporadik ALS'de en önemli genetik defekt *C9orf72* genindeki hekzanükleotid tekrar sayısı artışıdır. Ancak bu artışın belirlenmesi teknik güçlükler barındırmaktadır. İlişkilendirilmiş diğer genlerde ALS ilişkili genetik bulgu saptanmamıştır. Sporadik ALS'de oranı düşük olan bu mutasyonların olgu sayısı düşüklüğü nedeniyle saptanmamış olabileceğini düşünmekteyiz. Klinik önemi bilinmeyen *SOD1* ve *TARDBP* intronik değişimlerinin yatkınlıkla ilişkili olabileceği düşünüldüğünden detaylı olarak irdelenmelidir. Diğer toplumlardaki sıklıklarıyla birlikte istatistiki değerlendirme yapılarak Türk toplumunun normal popülasyon sıklığının araştırılabileceği düşüncesindeyiz. Sporadik ALS'li olgular *C9orf72* açısından valide bir yöntemle taranmalıdır. Sporadik ALS açısından klinik olarak iyi tanımlanmış olgular tüm genom sekanslamaya alınmalıdır. (DNA analizleri dışında inklüzyon ve proteolizisi hedefleyen sitolojik analiz yöntemleri avantajlı olabilir. Non-spesifik olması sorundur). *TARDBP* genindeki değişimler ekstremitte tutulum ilişkisi açısından irdelenebilir.

## KAYNAKLAR

A V. a-amino-b-methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry*. 1967 6: 759-762.

Adams C. R., Ziegler D. K. ve Lin J. T. Mercury intoxication simulating amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA*. 1983 Aug 05;250: 642-643.

Akimoto C. A blinded international study on the reliability of genetic testing for GGGGCC-repeat expansions in *C9orf72* reveals marked differences in results among 14 laboratories. 2017

Al-Chalabi A., Fang F., Hanby M. F., Leigh P. N., Shaw C. E., Ye W. ve Rijsdijk F. An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010 Dec;81: 1324-1326.

Al-Chalabi A. ve Visscher P. M. Motor neuron disease: Common genetic variants and the heritability of ALS. *Nat Rev Neurol*. 2014 Oct;10: 549-550.

Andersen P. M., Nilsson P., Keranen M. L., Forsgren L., Hagglund J., Karlsborg M., Ronnevi L. O., Gredal O. ve Marklund S. L. Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia. *Brain*. 1997 Oct;120 ( Pt 10): 1723-1737.

Andersen P. M., Sims K. B., Xin W. W., Kiely R., O'Neill G., Ravits J., Pioro E., Harati Y., Brower R. D., Levine J. S., Heinicke H. U., Seltzer W., Boss M. ve Brown R. H., Jr. Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2003 Jun;4: 62-73.

Andersen P. M. ve Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol*. 2011 Oct 11;7: 603-615.

Armon C. Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. *Neurology*. 2009 Nov 17;73: 1693-1698.

Arvidson B. Inorganic mercury is transported from muscular nerve terminals to spinal and brainstem motoneurons. *Muscle Nerve*. 1992 Oct;15: 1089-1094.

Atanasio A., Decman V., White D., Ramos M., Ikiz B., Lee H. C., Siao C. J., Brydges S., LaRosa E., Bai Y., Fury W., Burfeind P., Zamfirova R., Warshaw G., Orenco J., Oyejide A., Fralish M., Auerbach W., Poueymirou W., Freudenberg J., Gong G., Zambrowicz B., Valenzuela D., Yancopoulos G., Murphy A., Thurston G. ve Lai K. M. C9orf72 ablation causes immune dysregulation characterized by leukocyte expansion, autoantibody production, and glomerulonephropathy in mice. *Sci Rep.* 2016 Mar 16;6: 23204.

Barber S. C. ve Shaw P. J. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med.* 2010 Mar 01;48: 629-641.

Barlowe C., Orci L., Yeung T., Hosobuchi M., Hamamoto S., Salama N., Rexach M. F., Ravazzola M., Amherdt M. ve Schekman R. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 1994 Jun 17;77: 895-907.

Barlowe C. K. ve Miller E. A. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics.* 2013 Feb;193: 383-410.

Barmada S. J., Serio A., Arjun A., Bilican B., Daub A., Ando D. M., Tsvetkov A., Pleiss M., Li X., Peisach D., Shaw C., Chandran S. ve Finkbeiner S. Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models. *Nat Chem Biol.* 2014 Aug;10: 677-685.

Bilsland L. G., Sahai E., Kelly G., Golding M., Greensmith L. ve Schiavo G. Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 23;107: 20523-20528.

Boillee S., Vande Velde C. ve Cleveland D. W. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron.* 2006 Oct 05;52: 39-59.

Bosco D. A., Morfini G., Karabacak N. M., Song Y., Gros-Louis F., Pasinelli P., Goolsby H., Fontaine B. A., Lemay N., McKenna-Yasek D., Frosch M. P., Agar J. N., Julien J. P., Brady S. T. ve Brown R. H., Jr. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci.* 2010 Nov;13: 1396-1403.

Bunton-Stasyshyn R. K., Saccon R. A., Fratta P. ve Fisher E. M. SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes. *Neuroscientist*. 2015 Oct;21: 519-529.

Cady J., Koval E. D., Benitez B. A., Zaidman C., Jockel-Balsarotti J., Allred P., Baloh R. H., Ravits J., Simpson E., Appel S. H., Pestronk A., Goate A. M., Miller T. M., Cruchaga C. ve Harms M. B. TREM2 variant p.R47H as a risk factor for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol*. 2014 Apr;71: 449-453.

Castillo K., Nassif M., Valenzuela V., Rojas F., Matus S., Mercado G., Court F. A., van Zundert B. ve Hetz C. Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons. *Autophagy*. 2013 Sep;9: 1308-1320.

Charcot JM. Lecons sur les maladies due systeme nerveux. Bureau du Progres Medical. 1890 3:

Chiang P. M., Ling J., Jeong Y. H., Price D. L., Aja S. M. ve Wong P. C. Deletion of TDP-43 down-regulates Tbc1d1, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 14;107: 16320-16324.

Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Neurodegener Dis*. 2012 10: 7-22.

Ciechanover A. ve Kwon Y. T. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp Mol Med*. 2015 Mar 13;47: e147.

Cooper-Knock J., Shaw P. J. ve Kirby J. The widening spectrum of C9ORF72-related disease; genotype/phenotype correlations and potential modifiers of clinical phenotype. *Acta Neuropathol*. 2014 Mar;127: 333-345.

Debray S., Race V., Crabbe V., Herdewyn S., Matthijs G., Goris A., Dubois B., Thijs V., Robberecht W. ve Van Damme P. Frequency of C9orf72 repeat expansions in amyotrophic lateral sclerosis: a Belgian cohort study. *Neurobiol Aging*. 2013 Dec;34: 2890 e2897-2890 e2812.

DeJesus-Hernandez M., Mackenzie I. R., Boeve B. F., Boxer A. L., Baker M., Rutherford N. J., Nicholson A. M., Finch N. A., Flynn H., Adamson J., Kouri N., Wojtas A., Sengdy P., Hsiung G. Y., Karydas A., Seeley W. W., Josephs K. A., Coppola G., Geschwind D. H., Wszolek Z. K., Feldman H., Knopman D. S., Petersen R. C., Miller B. L., Dickson D. W., Boylan K. B., Graff-Radford N. R. ve Rademakers R. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011 Oct 20;72: 245-256.

Del Bo R., Ghezzi S., Corti S., Pandolfo M., Ranieri M., Santoro D., Ghione I., Prella A., Orsetti V., Mancuso M., Soraru G., Briani C., Angelini C., Siciliano G., Bresolin N. ve Comi G. P. TARDBP (TDP-43) sequence analysis in patients with familial and sporadic ALS: identification of two novel mutations. *Eur J Neurol*. 2009 Jun;16: 727-732.

Deng H., Gao K. ve Jankovic J. The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol*. 2014 Jun;10: 337-348.

Deng H. X., Chen W., Hong S. T., Boycott K. M., Gorrie G. H., Siddique N., Yang Y., Fecto F., Shi Y., Zhai H., Jiang H., Hirano M., Rampersaud E., Jansen G. H., Donkervoort S., Bigio E. H., Brooks B. R., Ajroud K., Sufit R. L., Haines J. L., Mugnaini E., Pericak-Vance M. A. ve Siddique T. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*. 2011 Aug 21;477: 211-215.

Dice J. F. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*. 2007 Jul-Aug;3: 295-299.

Doucette P. A., Whitson L. J., Cao X., Schirf V., Demeler B., Valentine J. S., Hansen J. C. ve Hart P. J. Dissociation of human copper-zinc superoxide dismutase dimers using chaotrope and reductant. Insights into the molecular basis for dimer stability. *J Biol Chem*. 2004 Dec 24;279: 54558-54566.

Drepper C., Herrmann T., Wessig C., Beck M. ve Sendtner M. C-terminal FUS/TLS mutations in familial and sporadic ALS in Germany. *Neurobiol Aging*. 2011 Mar;32: 548 e541-544.



Dunlop J., Beal McIlvain H., She Y. ve Howland D. S. Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase mutant rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 2003 Mar 01;23: 1688-1696.

DW. C. Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell.* 2009 136:

Emr S., Glick B. S., Linstedt A. D., Lippincott-Schwartz J., Luini A., Malhotra V., Marsh B. J., Nakano A., Pfeffer S. R., Rabouille C., Rothman J. E., Warren G. ve Wieland F. T. Journeys through the Golgi--taking stock in a new era. *J Cell Biol.* 2009 Nov 16;187: 449-453.

Farg M. A., Sundaramoorthy V., Sultana J. M., Yang S., Atkinson R. A., Levina V., Halloran M. A., Gleeson P. A., Blair I. P., Soo K. Y., King A. E. ve Atkin J. D. C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet.* 2014 Jul 01;23: 3579-3595.

Ferrari R., Kapogiannis D., Huey E. D. ve Momeni P. FTD and ALS: a tale of two diseases. *Curr Alzheimer Res.* 2011 May;8: 273-294.

Fil D., DeLoach A., Yadav S., Alkam D., MacNicol M., Singh A., Compadre C. M., Goellner J. J., O'Brien C. A., Fahmi T., Basnakian A. G., Calingasan N. Y., Klessner J. L., Beal F. M., Peters O. M., Metterville J., Brown R. H., Jr., Ling K. K. Y., Rigo F., Ozdinler P. H. ve Kiaei M. Mutant Profilin1 transgenic mice recapitulate cardinal features of motor neuron disease. *Hum Mol Genet.* 2017 Feb 15;26: 686-701.

Fischer. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy:evidence in mice and man. 2004

Freischmidt A., Wieland T., Richter B., Ruf W., Schaeffer V., Muller K., Marroquin N., Nordin F., Hubers A., Weydt P., Pinto S., Press R., Millecamps S., Molko N., Bernard E., Desnuelle C., Soriani M. H., Dorst J., Graf E., Nordstrom U., Feiler M. S., Putz S., Boeckers T. M., Meyer T., Winkler A. S., Winkelmann J., de Carvalho M., Thal D. R., Otto M., Brannstrom T., Volk A. E., Kursula P., Danzer K. M., Lichtner P., Dikic I., Meitinger T., Ludolph A. C., Strom T. M., Andersen P. M. ve Weishaupt J. H. Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci.* 2015 May;18: 631-636.

Frey D., Schneider C., Xu L., Borg J., Spooren W. ve Caroni P. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci.* 2000 Apr 01;20: 2534-2542.

Garcia-Redondo A., Dols-Icardo O., Rojas-Garcia R., Esteban-Perez J., Cordero-Vazquez P., Munoz-Blanco J. L., Catalina I., Gonzalez-Munoz M., Varona L., Sarasola E., Povedano M., Sevilla T., Guerrero A., Pardo J., Lopez de Munain A., Marquez-Infante C., de Rivera F. J., Pastor P., Jerico I., de Arcaya A. A., Mora J. S., Clarimon J., Group C. O. S. S., Gonzalo-Martinez J. F., Juarez-Rufian A., Atencia G., Jimenez-Bautista R., Moran Y., Mascias J., Hernandez-Barral M., Kapetanovic S., Garcia-Barcina M., Alcalá C., Vela A., Ramirez-Ramos C., Galan L., Perez-Tur J., Quintans B., Sobrido M. J., Fernandez-Torron R., Poza J. J., Gorostidi A., Paradas C., Villoslada P., Larrode P., Capablo J. L., Pascual-Calvet J., Goni M., Morgado Y., Guitart M., Moreno-Laguna S., Rueda A., Martin-Estefania C., Cemillan C., Blesa R. ve Lleo A. Analysis of the C9orf72 gene in patients with amyotrophic lateral sclerosis in Spain and different populations worldwide. *Hum Mutat.* 2013 Jan;34: 79-82.

Gibson S. B., Figueroa K. P., Bromberg M. B., Pulst S. M. ve Cannon-Albright L. Familial clustering of ALS in a population-based resource. *Neurology.* 2014 Jan 07;82: 17-22.

Guerreiro R., Bras J. ve Hardy J. SnapShot: Genetics of ALS and FTD. *Cell.* 2015 Feb 12;160: 798 e791.

Hargett S. R., Walker N. N., Hussain S. S., Hoehn K. L. ve Keller S. R. Deletion of the Rab GAP Tbc1d1 modifies glucose, lipid, and energy homeostasis in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015 Aug 01;309: E233-245.

Hocking L. J., Lucas G. J., Daroszewska A., Mangion J., Olavesen M., Cundy T., Nicholson G. C., Ward L., Bennett S. T., Wuyts W., Van Hul W. ve Ralston S. H. Domain-specific mutations in sequestosome 1 (SQSTM1) cause familial and sporadic Paget's disease. *Hum Mol Genet.* 2002 Oct 15;11: 2735-2739.

Hough M. A., Grossmann J. G., Antonyuk S. V., Strange R. W., Doucette P. A., Rodriguez J. A., Whitson L. J., Hart P. J., Hayward L. J., Valentine J. S. ve Hasnain

S. S. Dimer destabilization in superoxide dismutase may result in disease-causing properties: structures of motor neuron disease mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 20;101: 5976-5981.

Iguchi Y., Katsuno M., Takagi S., Ishigaki S., Niwa J., Hasegawa M., Tanaka F. ve Sobue G. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis*. 2012 Mar;45: 862-870.

Ingre C., Roos P. M., Piehl F., Kamel F. ve Fang F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Epidemiol*. 2015 7: 181-193.

Janssen C., Schmalbach S., Boeselt S., Sarlette A., Dengler R. ve Petri S. Differential histone deacetylase mRNA expression patterns in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010 Jun;69: 573-581.

Johnson F. O. ve Atchison W. D. The role of environmental mercury, lead and pesticide exposure in development of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology*. 2009 Sep;30: 761-765.

Johnston J. A., Ward C. L. ve Kopito R. R. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*. 1998 Dec 28;143: 1883-1898.

Jonsson P. A., Bergemalm D., Andersen P. M., Gredal O., Brannstrom T. ve Marklund S. L. Inclusions of amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase in ventral horns, liver, and kidney. *Ann Neurol*. 2008 May;63: 671-675.

Kamel F., Umbach D. M., Lehman T. A., Park L. P., Munsat T. L., Shefner J. M., Sandler D. P., Hu H. ve Taylor J. A. Amyotrophic lateral sclerosis, lead, and genetic susceptibility: polymorphisms in the delta-aminolevulinic acid dehydratase and vitamin D receptor genes. *Environ Health Perspect*. 2003 Aug;111: 1335-1339.

Kilness A. W. ve Hichberg F. H. Amyotrophic lateral sclerosis in a high selenium environment. *JAMA*. 1977 Jun 27;237: 2843-2844.

Kirby J., Goodall E. F., Smith W., Highley J. R., Masanzu R., Hartley J. A., Hibberd R., Hollinger H. C., Wharton S. B., Morrison K. E., Ince P. G., McDermott C. J. ve

Shaw P. J. Broad clinical phenotypes associated with TAR-DNA binding protein (TARDBP) mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics*. 2010 May;11: 217-225.

Koga H. ve Cuervo A. M. Chaperone-mediated autophagy dysfunction in the pathogenesis of neurodegeneration. *Neurobiol Dis*. 2011 Jul;43: 29-37.

Koval E. D., Shaner C., Zhang P., du Maine X., Fischer K., Tay J., Chau B. N., Wu G. F. ve Miller T. M. Method for widespread microRNA-155 inhibition prolongs survival in ALS-model mice. *Hum Mol Genet*. 2013 Oct 15;22: 4127-4135.

Kwiatkowski T. J., Jr., Bosco D. A., Leclerc A. L., Tamrazian E., Vanderburg C. R., Russ C., Davis A., Gilchrist J., Kasarskis E. J., Munsat T., Valdmanis P., Rouleau G. A., Hosler B. A., Cortelli P., de Jong P. J., Yoshinaga Y., Haines J. L., Pericak-Vance M. A., Yan J., Ticozzi N., Siddique T., McKenna-Yasek D., Sapp P. C., Horvitz H. R., Landers J. E. ve Brown R. H., Jr. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2009 Feb 27;323: 1205-1208.

Lazo-Gomez R., Ramirez-Jarquín U. N., Tovar Y. R. L. B. ve Tapia R. Histone deacetylases and their role in motor neuron degeneration. *Front Cell Neurosci*. 2013 Dec 05;7: 243.

Lee J. Y., Kawaguchi Y., Li M., Kapur M., Choi S. J., Kim H. J., Park S. Y., Zhu H. ve Yao T. P. Uncoupling of Protein Aggregation and Neurodegeneration in a Mouse Amyotrophic Lateral Sclerosis Model. *Neurodegener Dis*. 2015 15: 339-349.

Ligon L. A., LaMonte B. H., Wallace K. E., Weber N., Kalb R. G. ve Holzbaur E. L. Mutant superoxide dismutase disrupts cytoplasmic dynein in motor neurons. *Neuroreport*. 2005 Apr 25;16: 533-536.

Liu Y. J., Ju T. C., Chen H. M., Jang Y. S., Lee L. M., Lai H. L., Tai H. C., Fang J. M., Lin Y. L., Tu P. H. ve Chern Y. Activation of AMP-activated protein kinase  $\alpha$ 1 mediates mislocalization of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2015 Feb 01;24: 787-801.

Maruyama H., Morino H., Ito H., Izumi Y., Kato H., Watanabe Y., Kinoshita Y., Kamada M., Nodera H., Suzuki H., Komure O., Matsuura S., Kobatake K., Morimoto N., Abe K., Suzuki N., Aoki M., Kawata A., Hirai T., Kato T., Ogasawara K., Hirano A., Takumi T., Kusaka H., Hagiwara K., Kaji R. ve Kawakami H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 2010 May 13;465: 223-226.

Millecamps S., Salachas F., Cazeneuve C., Gordon P., Bricka B., Camuzat A., Guillot-Noel L., Russaouen O., Bruneteau G., Pradat P. F., Le Forestier N., Vandenberghe N., Danel-Brunaud V., Guy N., Thauvin-Robinet C., Lacomblez L., Couratier P., Hannequin D., Seilhean D., Le Ber I., Corcia P., Camu W., Brice A., Rouleau G., LeGuern E. ve Meininger V. SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet*. 2010 Aug;47: 554-560.

Millecamps S., Boillee S., Le Ber I., Seilhean D., Teyssou E., Giraudeau M., Moigneu C., Vandenberghe N., Danel-Brunaud V., Corcia P., Pradat P. F., Le Forestier N., Lacomblez L., Bruneteau G., Camu W., Brice A., Cazeneuve C., Leguern E., Meininger V. ve Salachas F. Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in C9ORF72 and patients with mutations in other ALS-related genes. *J Med Genet*. 2012 Apr;49: 258-263.

Morfini G. A., Bosco D. A., Brown H., Gatto R., Kaminska A., Song Y., Molla L., Baker L., Marangoni M. N., Berth S., Tavassoli E., Bagnato C., Tiwari A., Hayward L. J., Pigino G. F., Watterson D. M., Huang C. F., Banker G., Brown R. H., Jr. ve Brady S. T. Inhibition of fast axonal transport by pathogenic SOD1 involves activation of p38 MAP kinase. *PLoS One*. 2013 8: e65235.

Murch S. J., Cox P. A., Banack S. A., Steele J. C. ve Sacks O. W. Occurrence of beta-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol Scand*. 2004 Oct;110: 267-269.

Nordin A., Akimoto C., Wuolikainen A., Alstermark H., Forsberg K., Baumann P., Pinto S., de Carvalho M., Hubers A., Nordin F., Ludolph A. C., Weishaupt J. H., Meyer T., Grehl T., Schweikert K., Weber M., Burkhardt C., Neuwirth C., Holmoy T., Morita M., Tysnes O. B., Benatar M., Wu J., Lange D. J., Bisgard C., Asgari N.,

Tarvainen I., Brannstrom T. ve Andersen P. M. Sequence variations in C9orf72 downstream of the hexanucleotide repeat region and its effect on repeat-primed PCR interpretation: a large multinational screening study. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2017 May;18: 256-264.

Novoselov S. S., Mustill W. J., Gray A. L., Dick J. R., Kanuga N., Kalmar B., Greensmith L. ve Cheetham M. E. Molecular chaperone mediated late-stage neuroprotection in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.* 2013 8: e73944.

Ozoguz A., Uyan O., Birdal G., Iskender C., Kartal E., Lahut S., Omur O., Agim Z. S., Eken A. G., Sen N. E., Kavak P., Saygi C., Sapp P. C., Keagle P., Parman Y., Tan E., Koc F., Deymeer F., Oflazer P., Hanagasi H., Gurvit H., Bilgic B., Durmus H., Ertas M., Kotan D., Akalin M. A., Gulluoglu H., Zarifoglu M., Aysal F., Dosoglu N., Bilguvar K., Gunel M., Keskin O., Akgun T., Ozcelik H., Landers J. E., Brown R. H. ve Basak A. N. The distinct genetic pattern of ALS in Turkey and novel mutations. *Neurobiol Aging.* 2015 Apr;36: 1764 e1769-1718.

Pamphlett R. ve Waley P. Mercury in human spinal motor neurons. *Acta Neuropathol.* 1998 Nov;96: 515-519.

Parakh S. ve Atkin J. D. Protein folding alterations in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* 2016 Oct 01;1648: 633-649.

Perera N. D., Sheean R. K., Scott J. W., Kemp B. E., Horne M. K. ve Turner B. J. Mutant TDP-43 deregulates AMPK activation by PP2A in ALS models. *PLoS One.* 2014 9: e95549.

Perri E. R., Thomas C. J., Parakh S., Spencer D. M. ve Atkin J. D. The Unfolded Protein Response and the Role of Protein Disulfide Isomerase in Neurodegeneration. *Front Cell Dev Biol.* 2015 3: 80.

Petrov D. ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment? 2017

Raj K. Protein misfolding and aggregation in neurodegenerative disorders: focus on chaperone mediated protein folding machinery. 2015

Ratti A., Corrado L., Castellotti B., Del Bo R., Fogh I., Cereda C., Tiloca C., D'Ascenzo C., Bagarotti A., Pensato V., Ranieri M., Gagliardi S., Calini D., Mazzini L., Taroni F., Corti S., Ceroni M., Oggioni G. D., Lin K., Powell J. F., Soraru G., Ticozzi N., Comi G. P., D'Alfonso S., Gellera C., Silani V. ve Consortium S. C9ORF72 repeat expansion in a large Italian ALS cohort: evidence of a founder effect. *Neurobiol Aging*. 2012 Oct;33: 2528 e2527-2514.

Ravits J., Appel S., Baloh R. H., Barohn R., Brooks B. R., Elman L., Floeter M. K., Henderson C., Lomen-Hoerth C., Macklis J. D., McCluskey L., Mitsumoto H., Przedborski S., Rothstein J., Trojanowski J. Q., van den Berg L. H. ve Ringel S. Deciphering amyotrophic lateral sclerosis: what phenotype, neuropathology and genetics are telling us about pathogenesis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2013 May;14 Suppl 1: 5-18.

Renton A. E. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. 2011

Renton A. E., Majounie E., Waite A., Simon-Sanchez J., Rollinson S., Gibbs J. R., Schymick J. C., Laaksovirta H., van Swieten J. C., Myllykangas L., Kalimo H., Paetau A., Abramzon Y., Remes A. M., Kaganovich A., Scholz S. W., Duckworth J., Ding J., Harmer D. W., Hernandez D. G., Johnson J. O., Mok K., Ryten M., Trabzuni D., Guerreiro R. J., Orrell R. W., Neal J., Murray A., Pearson J., Jansen I. E., Sondervan D., Seelaar H., Blake D., Young K., Halliwell N., Callister J. B., Toulson G., Richardson A., Gerhard A., Snowden J., Mann D., Neary D., Nalls M. A., Peuralinna T., Jansson L., Isoviita V. M., Kaivorinne A. L., Holtta-Vuori M., Ikonen E., Sulkava R., Benatar M., Wu J., Chio A., Restagno G., Borghero G., Sabatelli M., Consortium I., Heckerman D., Rogaeva E., Zinman L., Rothstein J. D., Sendtner M., Drepper C., Eichler E. E., Alkan C., Abdullaev Z., Pack S. D., Dutra A., Pak E., Hardy J., Singleton A., Williams N. M., Heutink P., Pickering-Brown S., Morris H. R., Tienari P. J. ve Traynor B. J. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. 2011 Oct 20;72: 257-268.

Rincon A., Aguado C., Desviat L. R., Sanchez-Alcudia R., Ugarte M. ve Perez B. Propionic and methylmalonic acidemia: antisense therapeutics for intronic variations

causing aberrantly spliced messenger RNA. *Am J Hum Genet.* 2007 Dec;81: 1262-1270.

Robberecht W. ve Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci.* 2013 Apr;14: 248-264.

Saccon R. A., Bunton-Stasyshyn R. K., Fisher E. M. ve Fratta P. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain.* 2013 Aug;136: 2342-2358.

Shaw C. E., al-Chalabi A. ve Leigh N. Progress in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2001 Jan;1: 69-76.

Shioya M., Obayashi S., Tabunoki H., Arima K., Saito Y., Ishida T. ve Satoh J. Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neurone navigator 3. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2010 Jun;36: 320-330.

Smith B. C9ORF72 expansion mutation is a common cause of ALS+/ FTD in Europe and has a single founder. *Hum Genet.* 2013 21: 102-108.

Song J. H., Huang C. S., Nagata K., Yeh J. Z. ve Narahashi T. Differential action of riluzole on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 Aug;282: 707-714.

Sreedharan J., Blair I. P., Tripathi V. B., Hu X., Vance C., Rogelj B., Ackerley S., Durnall J. C., Williams K. L., Buratti E., Baralle F., de Belleruche J., Mitchell J. D., Leigh P. N., Al-Chalabi A., Miller C. C., Nicholson G. ve Shaw C. E. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 2008 Mar 21;319: 1668-1672.

Stallings N. R., Puttappathi K., Dowling K. J., Luther C. M., Burns D. K., Davis K. ve Elliott J. L. TDP-43, an ALS linked protein, regulates fat deposition and glucose homeostasis. *PLoS One.* 2013 8: e71793.

Steele J. C. Parkinsonism-dementia complex of Guam. *Mov Disord.* 2005 Aug;20 Suppl 12: S99-S107.



Sun Z., Diaz Z., Fang X., Hart M. P., Chesi A., Shorter J. ve Gitler A. D. Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS. *PLoS Biol.* 2011 Apr;9: e1000614.

Sundaramoorthy V., Sultana J. M. ve Atkin J. D. Golgi fragmentation in amyotrophic lateral sclerosis, an overview of possible triggers and consequences. *Front Neurosci.* 2015 9: 400.

Sutedja N. A., Fischer K., Veldink J. H., van der Heijden G. J., Kromhout H., Heederik D., Huisman M. H., Wokke J. J. ve van den Berg L. H. What we truly know about occupation as a risk factor for ALS: a critical and systematic review. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009 Oct-Dec;10: 295-301.

Tateno M., Kato S., Sakurai T., Nukina N., Takahashi R. ve Araki T. Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3. *Hum Mol Genet.* 2009 Mar 01;18: 942-955.

Taylor J. P., Brown R. H., Jr. ve Cleveland D. W. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature.* 2016 Nov 10;539: 197-206.

Tibshirani M., Tradewell M. L., Mattina K. R., Minotti S., Yang W., Zhou H., Strong M. J., Hayward L. J. ve Durham H. D. Cytoplasmic sequestration of FUS/TLS associated with ALS alters histone marks through loss of nuclear protein arginine methyltransferase 1. *Hum Mol Genet.* 2015 Feb 01;24: 773-786.

Tremolizzo L., Messina P., Conti E., Sala G., Cecchi M., Airoidi L., Pastorelli R., Pupillo E., Bandettini Di Poggio M., Filosto M., Lunetta C., Agliardi C., Guerini F., Mandrioli J., Calvo A., Beghi E., Ferrarese C. ve Consortium E. Whole-blood global DNA methylation is increased in amyotrophic lateral sclerosis independently of age of onset. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014 Mar;15: 98-105.

Tsai C. P., Soong B. W., Lin K. P., Tu P. H., Lin J. L. ve Lee Y. C. FUS, TARDBP, and SOD1 mutations in a Taiwanese cohort with familial ALS. *Neurobiol Aging.* 2011 Mar;32: 553 e513-521.

Urrea H., Dufey E., Lisbona F., Rojas-Rivera D. ve Hetz C. When ER stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1833: 3507-3517.

Valdmanis P. N., Belzil V. V., Lee J., Dion P. A., St-Onge J., Hince P., Funalot B., Couratier P., Clavelou P., Camu W. ve Rouleau G. A. A mutation that creates a pseudoexon in SOD1 causes familial ALS. *Ann Hum Genet.* 2009 Nov;73: 652-657.

Verma A. RNA Quality Control and Protein Aggregates in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Muscle Nerve.* 2012

Vinceti M., Guidetti D., Pinotti M., Rovesti S., Merlin M., Vescovi L., Bergomi M. ve Vivoli G. Amyotrophic lateral sclerosis after long-term exposure to drinking water with high selenium content. *Epidemiology.* 1996 Sep;7: 529-532.

Watson P. ve Stephens D. J. ER-to-Golgi transport: form and formation of vesicular and tubular carriers. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jul 10;1744: 304-315.

Weiduschat N., Mao X., Hupf J., Armstrong N., Kang G., Lange D. J., Mitsumoto H. ve Shungu D. C. Motor cortex glutathione deficit in ALS measured in vivo with the J-editing technique. *Neurosci Lett.* 2014 Jun 06;570: 102-107.

Winton M. J., Igaz L. M., Wong M. M., Kwong L. K., Trojanowski J. Q. ve Lee V. M. Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J Biol Chem.* 2008 May 09;283: 13302-13309.

Xi Z., Rainero I., Rubino E., Pinessi L., Bruni A. C., Maletta R. G., Nacmias B., Sorbi S., Galimberti D., Surace E. I., Zheng Y., Moreno D., Sato C., Liang Y., Zhou Y., Robertson J., Zinman L., Tartaglia M. C., St George-Hyslop P. ve Rogaeva E. Hypermethylation of the CpG-island near the C9orf72 G(4)C(2)-repeat expansion in FTLD patients. *Hum Mol Genet.* 2014 Nov 01;23: 5630-5637.

Yang S., Warraich S. T., Nicholson G. A. ve Blair I. P. Fused in sarcoma/translocated in liposarcoma: a multifunctional DNA/RNA binding protein. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Sep;42: 1408-1411.

Zufiria M., Gil-Bea F. J., Fernandez-Torron R., Poza J. J., Munoz-Blanco J. L., Rojas-Garcia R., Riancho J. ve de Munain A. L. ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Prog Neurobiol.* 2016 Jul;142: 104-129.

## EKLER

### EK-1:

#### Aydınlatılmış Onam Formu

Katılımcı / Gönüllünün Protokol Numarası:

#### 1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

##### a.Araştırmanın Adı:

Sporadik Amyotrofik Lateral Skleroz ( ALS ) tanısı alan olgularda C9ORF72, SOD1, TARDBP, FUS ve UBQLN2 Gen Mutasyonlarının Araştırılması

##### b.Araştırmanın İçeriği:

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı 'nda sporadik ALS tanısı alan hastaların kan örneklerinden literatürde önemi vurgulanmış olan ALS ile ilişkilendirilmiş genlerin DNA dizi analizi ve fragment analizi yöntemleri kullanılarak değişime uğrayıp uğramadığının belirlenmesidir.

##### c.Araştırmanın Amacı:

Sporadik Amyotrofik Lateral Skleroz ( ALS ) olgularında C9ORF72, SOD1, TARDBP, FUS ve UBQLN2 gen mutasyonlarının taranmasıyla belirlenen DNA dizi farklılıkları olguların klinik bulgularıyla birlikte değerlendirilerek hastalıkla ilişkileri ve genotip-fenotip ilişkisi tespit edilecektir. ALS genetiğinin daha iyi anlaşılması ve literatüre katkı sağlaması amaçlanmaktadır.

Ayrıca ALS hastalığının genetik çalışmaları Türkiye'de tek merkez olan Boğaziçi Üniversitesi Nörodejenerasyon Araştırma Laboratuvar'ında Prof.Dr.Nazlı Başak ve ekibi tarafından çalışılmaktadır. Tez araştırmamın bir diğer amacı yapılan çalışmalara katkı sağlamaktır.

##### d.Araştırmanın Nedeni:

( ) Bilimsel araştırma

( X ) Tez çalışması

##### e.Araştırmanın Öngörülen Süresi:

##### f.Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı:

##### g.Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler:

-Örneklerden DNA izolasyonu

- Araştırılacak genlere özgül tasarlanan primerlerle ilgili genlerin amplifikasyonu (PCR yöntemi ile)
- Amplifiye edilen bölgelerin DNA dizi ve fragment analizi

**Yukarıda açıklanan araştırma sırasında uygulanacak olan işlemlerin bana aşağıda belirtilen riskleri ve rahatsızlıkları getirebileceğinin bilincindeyim:**

**Araştırmada çalışılan olgudan kan alınması esnasında sinek ısırığı kadar bir acı hissedilmesi dışında herhangi bir risk ve zararı yoktur.**

3. Gönüllüler/Katılımcılar İçin Araştırmadan Beklenen Yarar:  
Türkiye’de bugüne kadar ALS ile ilgili 2015 yılında Boğaziçi grubunun çalışmasından başka bir uluslar arası kaynağın olmaması nedeniyle bu araştırmalara ve literatüre katkı sağlamak amaçlanmıştır.

4. Araştırma Konusundaki Soruların Cevaplandırılması:  
**Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile haklarım konusunda bilgi almak için aşağıda belirtilen kişiyle bağlantı kurmam yeterli olacaktır.**

**Adı- Soyadı: Prof.Dr.Sibel Berker Karaüzüm** **Telefon :249 69 71**  
**Araş.Gör. Vildan Çiftçi** **0541 784 96 62**

5. Zararların Karşlanması:  
**Araştırma kapsamında sadece kan alınmasına bağlı küçük hematoma ve ekimoz görülebilir ve bu durum basit bir tıbbi müdahale ile giderilebilmektedir.**

6. Araştırma Giderleri:  
**Araştırma kapsamındaki bütün işlemler için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.**

7. Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma:

**a.Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.**

**b.Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.**

**c.Sorumlu araştırmacıya haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.**

8. Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle ya da araştırma prosedürüne bağlı olarak onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

9. Gizlilik:

**Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.**

10. Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye / katılımcıya verilmesi gereken bilgileri gösteren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

**Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.**

**Gönüllünün / katılımcının Adı- Soyadı:**

**Yaş ve Cinsiyeti:**

**İmzası:**

**Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):**

.....  
.....

**Tarih:**

**Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;**

**Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:**

**İmzası:**

**Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):**

.....  
.....

**Tarih:**

**Açıklamaları Yapan Araştırmacının**

**Adı- Soyadı: Prof.Dr.Sibel Berker Karaüzüm**

**İmzası:**

**Tarih:**

**Adı- Soyadı: Araş.Gör.Vildan Çiftçi**

**İmzası:**

**Tarih:**

**Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin**

**Adı- Soyadı: Prof.Dr.Hilmi Uysal**

**İmzası:**

**Görevi: Klinik Danışmanlık**

**Tarih:**

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Vildan	<b>Uyruğu</b>	TC
<b>Soyadı</b>	Çiftçi	<b>Tel no</b>	0541 784 96 62
<b>Doğum tarihi</b>	15.03.1990	<b>e-posta</b>	vildanciftci90@yahoo.com

### Eğitim Bilgileri

	<b>Mezun olduğu kurum</b>	<b>Mezuniyet yılı</b>
<b>Lise</b>	Zonguldak Atatürk Anadolu Lisesi	2008
<b>Lisans</b>	Akdeniz Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2013
<b>Yüksek Lisans</b>	Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi Genetik Programı	
<b>Doktora</b>		

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (yıl-yıl)</b>
<b>Biyolog</b>	Özel Antalya Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi	2 yıl

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Sınav türü</b>	<b>Puanı</b>
<b>İngilizce</b>	Yükseköğretim Kurumları Yabancı Dil Sınavı (YÖKDİL)	71,250

### Proje Deneyimi

<b>Proje Adı</b>	<b>Destekleyen kurum</b>	<b>Süre (Yıl-Yıl)</b>
Sporadik Amyotrofik Lateral Skleroz(ALS) Tanısı Alan Olgularda C9orf72, SOD1, TARDBP, FUS ve UBQLN2 Gen Mutasyonlarının Araştırılması	Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi(BAP)	İki (2) Yıl

### Burslar-Ödüller:

### Yayınlar ve Bildiriler:

The first published *Alpha-globin* gene variant in Turkey: Hb Fontainebleau