

Friedreich Ataksi'sinin Moleküler Temeli: Türk Hastalarda DNA Analizi ve Tanı / Molecular Basis of Friedreich Ataxia: DNA Analysis and Diagnosis in Turkish Patients

Caroline Pirkevi,¹ A. Nazlı Başak²

¹Suna ve Inan Kırac Vakfı, Nörodejenerasyon Araştırma Laboratuvarı

²Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

ABSTRACT

Molecular Basis of Friedreich Ataxia: DNA Analysis and Diagnosis in Turkish Patients

Friedreich Ataxia (FA) is an autosomal recessive neurodegenerative disease with onset in childhood, followed by an uninterrupted course that terminates with death in the latest fifth decade of life. FA's estimated carrier prevalence is about one in 110, and it affects about one in 50,000 people, making it the most common inherited ataxia in the Caucasian population. The FRDA gene was mapped to the 9q13-21.1 region in 1996. The encoded protein of 210 amino acids, called frataxin, localizes to mitochondria, and plays a crucial role in iron sulfur cluster biosynthesis. FA is due to a deficiency in frataxin, caused predominantly, by a GAA triplet-repeat expansion within the first intron of the FRDA gene. The decrease in frataxin transcription and expression leads to a decrease in iron sulfur cluster-containing proteins, causing production of free radicals. In the framework of a project on neurodegenerative disorders conducted at Boğaziçi University, Molecular Biology and Genetics Department, a reliable and reproducible polymerase chain reaction protocol has been optimized in our laboratory; applying this method, 153 Turkish individuals, patients and their families, have been screened for a GAA triplet-repeat expansion. Among them, 38 were found to be homozygous for the expansion, and 46 were heterozygote carriers. Since

1996, year of elucidation of the genetic cause of Friedreich Ataxia, serious advances have been made in understanding its pathogenesis. There is every reason to expect that effective strategies will be developed in the near future to overcome the consequences of reduced frataxin expression.

ÖZET

Friedreich Ataksi'si (FA) otozomal resesif geçiş gösteren nörodejeneratif bir hastalıktır; çocukluk çağında başlar, kesintisiz ilerler ve en geç 50'li yaşlarda ölümlerle sonuçlanır. Hastalık geninin görülme sıklığı, yani taşıyıcılık, 110 kişide birdir; bu da FA'yı en sık rastlanan kalıtsal ataksi yapar; hastalık beyaz ırkta 50,000 kişide bir görülür. FRDA geni 1996'da 9q13-21.1 bölgesine haritalanmış, ve kodladığı 210 aminoasitlik proteine frataksin adı verilmiştir. Mitokondride bulunan bu proteinin, demir-kükürt komplekslerinin biyosentezinde kritik bir görev üstlendiği bilinmektedir. FRDA geninin birinci intronundaki GAA tekrar dizisinin patojenik ekspansiyonu frataksin proteinin eksikliğine yol açar ki, bu da FA'nın başlıca nedenidir. Frataksin transkripsiyon ve ekspresyonundaki azalma, demir-kükürt komplekslerini barındıran proteinlerin azalması ile sonuçlanır, bu da serbest radikal oluşumunu tetikler. Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yürüttüğümüz nörodejeneratif hastalıklar projesi çerçevesinde, laboratuvarımızda FA için özgün, güvenilir

Yazışma Adresi/Address for Correspondence:

A. Nazlı Başak

²Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

34342 Bebek İstanbul

basak@boun.edu.tr

Dergiyeye Ulaşma Tarihi/Received: 23.11.2005

Kesin Kabul Tarihi/Accepted: 24.11.2005

ve tekrarlanabilir bir polimeraz zincir reaksiyonu kuruldu ve optimize edildi. Bu yöntem kullanılarak FA klinik tanısı almış hasta ve yakınlarından oluşan 153 kişilik bir popülasyonda GAA tekrar dizileri ekspansiyonuna bakıldı. Tarama sonucu, 38 bireyin GAA ekspansiyonu için homozigot, 46 bireyin de heterozigot olduğu tanımlandı. Friedreich Ataksi'sine neden olan GAA ekspansiyonunun ilk açıklandığı 1996'dan beri, hastalık patogenezinin anlaşılmasında önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Yakın gelecekte, frataksin ekspresyonundaki eksikliği kompanse edecek yararlı stratejilerin geliştirilmesi umulmaktadır.

1. Friedreich Ataksi'sinin Moleküler Temeli

1.1. Friedreich Ataksi'sinde Klinik Bulgular

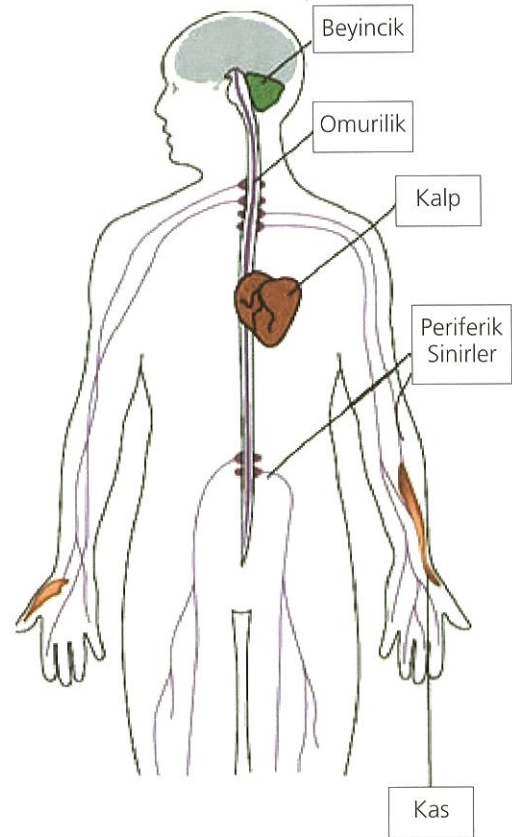
Friedreich Ataksi'si (FA) ilk olarak, 1863 yılında, Alman doktor Nicholas Friedreich tarafından tanımlandı. FA otozomal resesif geçiş gösteren nörodejeneratif bir hastalıktır ve en sık görülen ataksi çeşididir. Hastalığın Avrupalılarda görülme sıklığı 1/50000, taşıyıcılık oranı ise 1/110'dur.⁽¹⁾ FA'ya Afrika ve Asya toplumlarında çok ender rastlanır. Friedreich Ataksi'sine özgün patolojik bulgular ana duyuşal nöronların dorsal kök gangliyondaki erken kaybıdır. Bunu takiben posterior kolonlarda, spinoserebellar ve piramidal yollarda nöron kaybı gözlenir. Beyincik, pons, medulla ve afferent görme yolları da etkilenebilirler (Resim 1.1).

FA'da progresif ataksi, propriosepsiyonda azalma, aşağı ekstremitelerde refleks eksikliği, optik atrofi, nistagmus, sensorinöral işitme kaybı, dizartri gibi nörolojik semptomların yanında, hastaların %70'inde hipertrofik kardiyomyopatiye de rastlanır (Resim 1.2). Şeker intoleransı hastaların %20'sinde, geç başlangıçlı şeker hastalığı ise %10'unda gözlemlenir; ayrıca skolioz ve pes kavus da FA'ya özgü bulgulardır.⁽²⁾

FA genellikle çocukluk ya da buluş çağında başlar; ortalama başlangıç yaşı 15'tir; hastaların %80'inde başlangıç 20 yaşından evveldir. Hastalık seyri yavaştır, yürüme yeteneğinin kaybedilmesi hastalık başlangıcından yaklaşık 15 sene sonradır; bu durumdaki hastalar tekerlekli sandalyeye mahkumdurlar. Ortalama yaşam süresi hastalık başlangıcından itibaren 36 yıldır. Hastaların büyük çoğunluğu kardiyopülmoner komplikasyonlardan kaybedilirler.⁽³⁾

FA farklı klinik bulgularla kendini gösteren nörolojik

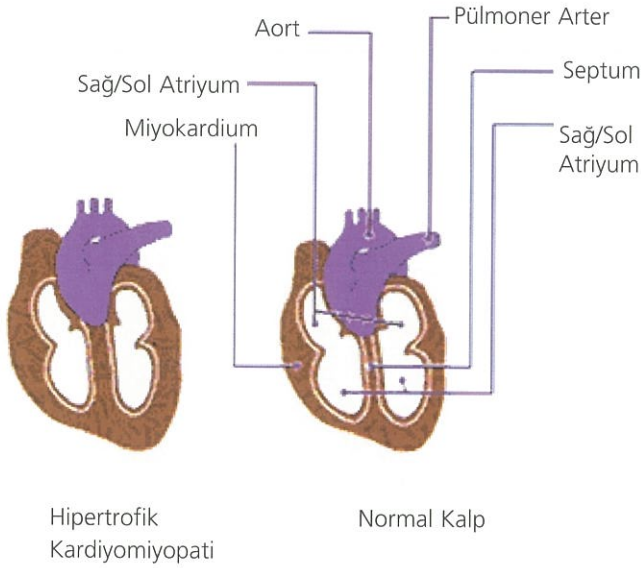
bir hastalıktır. Aileler arası çeşitlilik görüldüğü gibi, aynı ailenin değişik bireylerinde bile farklı hastalık seyri gözlemlenebilir. FA'nın iki atipik çeşidi vardır: Geç Başlangıçlı Friedreich Ataksi (*Late Onset Friedreich Ataxia, LOFA*) ve Reflekslerin Korunduğu Friedreich Ataksi (*Friedreich Ataxia with Retained Reflexes, FARR*).



Resim 1.1. FA, hem kalbi, hem de sinir sisteminin kas ve koordinasyonunu kontrol eden bölgeleri etkiler [4].

1.2. FA'da Genetik Çalışmalar

1988 yılında, FA'da mutasyona uğrayan genin 9. kromozomda olduğu saptanmış, bu gen daha sonra bağlantı analizi ile 9q13-21.1 bölgesine haritalanmıştır. Başlangıçta X25 diye adlandırılan gen, Campuzano ve ark. (1996) [5] tarafından FRDA geni olarak tanımlanmış ve yedi ekzonu olduğu bulunmuştur: 1-5a, 5b ve 6. FRDA geni, genomik DNA üzerinde 95 kb'lik bir bölgeyi kapsar. Gen anlatımı sentromerden telomere doğrudur. Majör transkript olarak bilinen, ve muhtemelen işlevsel olan tek mRNA 1.3 kb uzunluğunda olup, ilk beş ekzonu (1-5a) içerir.



Resim 1.2. Hipertrofik kardiyomyopati: Kalp duvarı kalınlaştıkça, kalp kası büyür. Bu büyüme, başlıca pompalama odaları olan ventriküllerin iç hacmini küçültür, içeri daha az kan gider. Eğer kalınlaşan duvar, ventrikülleri ayıran bölge olan septumu da kapsarsa, kalpten vücuda kan pompalanması bozulur.⁽⁴⁾

Bu bölge 210 aminoasitlik frataksin proteinini kodlar.

FRDA geninin 1. ekzonu metile olmayan ve nadir rastlanan restriksiyon enzimi kesim bölgeleri barındıran bir CpG adası içermektedir. Alternatif kırılma mekanizması ile ekzon 5a'nın yerine ekzon 5b okunduğunda, 171 aminoasitlik bir protein kodlanır; bu proteinin ne tür bir işlevi olduğu halen bilinmemektedir. Ekzon 6 protein kodlamaz.

Frataksin proteininin bazı bölgeleri türler-arası benzerlikler gösterir. Bu homoloji, özellikle *C. elegans* ve *S. cerevisiae* de ekzon 4 ve 5a'daki 141.-167. amino asitler için geçerlidir.⁽⁶⁾

1.2.1 FA'ya Artmış GAA Triplet Tekrarları (Ekspansiyon) Neden Olur

Hastaların %98'inde FA'ya neden olan mutasyon, FRDA geninin 1. intronundaki GAA triplet tekrardır. Bu mutasyon transkripsiyon mekanizmasında bozukluğa yol açar ve mitokondriyal bir protein olan frataksinin işlev kaybına neden olur. GAA dizisi aşırı polimorfiktir: sağlıklı kromozomlarda 30'dan az, mutant kromozomlarda ise 66-1700 GAA tripleti

bulunabilir. İki uzamış alelden daha kısa olanının GAA tekrar sayısı ile klinik bulgular (hastalık başlangıç yaşı, kardiyomyopati şiddeti ve skolyoz olup olmaması) arasında ters orantı olduğu saptanmıştır. Ancak, GAA ekspansiyonunun her zaman hastalık başlangıç yaşı ile ters orantılı olmadığı gözlenmiştir, dolayısıyla başka faktörler de fenotipi etkilemektedir; bunlar, ekspansiyondaki somatik mozaizm (triplet tekrar sayısının değişkenliği), modifiye edici genler ve çevre faktörleridir. Bu faktörler göz önüne alındığında ortaya çıkan tablo daha karmaşık, ama muhtemelen hastalığın gerçek patolojik mekanizmasına daha yakındır. FRDA geninde, GAA triplet tekrarı dışında, bir dizi nokta mutasyonu tanımlanmış olmasına rağmen, her iki alelinde de nokta mutasyonu taşıyan hastaya hiç rastlanmamıştır. Bu hastalar GAA için homozigot olmak yerine GAA ve bir nokta mutasyonu için karışık heterozigot olarak anılırlar (Tablo 1.1).⁽⁷⁾

1.2.2 GAA Ekspansiyonunun Olası Kökeni

Indo-Avrupa toplumları incelendiğinde, kromozomların yaklaşık dağılımı aşağıdaki gibidir:

- %85'inde 8-11 triplet (küçük normal alleller: KN),
- %15'inde 12-29 triplet (büyük normal alleller: BN),
- <%1'inde 30-65 triplet (premutasyon allelleri: PM),
- <%0.5'inde 66-1700 triplet (ekspansiyona uğramış alleller:E).

Hastalığa neden olan ekspansiyonların, 30-65 arasındaki premutasyon allellerinin hiper-ekspansiyonu sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Alu dizileri DNA'mızda en sık rastlanan tekrarlardır, insan genomunda bir milyon Alu dizisi bulunur. GAA triplet tekrarları Alu dizilerinin içindedirler. Alu tekrarları, transkripsiyon düzeyinde, genomumuzun en aktif bölgeleridir. Alu dizilerinin eşit olmayan rekombinasyona (unequal recombination) yol açtığı düşünülmektedir. Bu mekanizmanın, gen duplikasyonlarını hızlandırarak ender olarak hastalığa neden olabilmekle birlikte, evrim sürecine olumlu katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir.⁽²⁵⁾

Tablo 1.1. GAA ekspansiyonu birikteliğinde FA'ya neden olan nokta mutasyonları⁽⁸⁾

Ekzon/Intron	Mutasyon	Nükleotidin Yeri	Nükleotid Değişikliği	Frataksin üzerindeki olası etkisi	Referans
Ekzon 1	M1L	1	ATG→CTG	translasyon inisiyasyonunda bozulma	[9]
Ekzon 1	M1T	2	ATG→ACG	translasyon inisiyasyonunda bozulma	[9]
Ekzon 1	2delT	2	ATG→A-G	translasyon inisiyasyonunda bozulma	[10]
Ekzon 1	M1I	3	ATG→ATT	translasyon inisiyasyonunda bozulma	[11], [12]
Ekzon 1	M1I	3	ATG→ATA	translasyon inisiyasyonunda bozulma	[13]
Ekzon 1	118delC	118	C delesyonu	translasyonun erken sonlanması	[14]
Ekzon 1	158delC	158	C delesyonu	translasyonun erken sonlanması	[9]
Ekzon 1	158insC	158	C insersiyonu	translasyonun erken sonlanması	[9]
Intron 1	Kırılma donörü	+5	G→C	kırılmada bozukluk	[15]
Ekzon 2	202GTCA →TTG	202-205	GTCA →TTG	translasyonun erken sonlanması	[16]
Ekzon 3	297insT	297	T insersiyonu	translasyonun erken sonlanması	[14]
Ekzon 3	L106X	317	TTA→TGA	translasyonun erken sonlanması	[5]
Ekzon 3	L106S	317	TTA→TCA	aminoasit değişimi	[17]
Ekzon 3	317delT	317	T delesyonu	translasyonun erken sonlanması	[16]
Ekzon 3	340del13	340-352	13bazlık delesyon	translasyonun erken sonlanması	[16]
Ekzon 3	D122Y	364	GAC→TAC	Aminoasit değişimi	[9]
Intron 3	Kırılma donörü	384+1	AG→GG	Hatalı kırılma	[18]
Intron 3	Kırılma akseptörü	-2	AG→GG	Ekzon 4'ün hatalı kırılması sonucu çerçeve kayması	[5]

Tablo 1.1. GAA ekspansiyonu birlikteliğinde FA'ya neden olan nokta mutasyonları⁽⁸⁾ (devamı)

Ekzon 4	G130V¹	389	GGN→GTN	Aminoasit değişimi; hatalı işleme	[19] [20]
Ekzon 4	Q148R	443	CAG→CGG	Aminoasit değişimi	[21]
Ekzon 4	I154F¹	460	ATCÆTTC	Aminoasit değişimi; hatalı işleme	[5] [20]
Ekzon 4	W155X	465	TGG→TAG	Translasyonun erken sonlanması	[14]
Ekzon 4	L156P	467	CTA→CCA	Aminoasit değişimi	[9]
Intron 4	Kırılma donörü	482+3	+3 del A	Ekzon 4'ün hatalı kırılması sonucu çerçeve kayması	[9]
Ekzon 5a	R165C¹	493	CGT→TGT	Aminoasit değişimi	[22] [15]
Ekzon 5a	R165P	494	CGT→CCT	Aminoasit değişimi	[23]
Ekzon 5a	W173G	517	TGG→GGG	Aminoasit değişimi	[9]
Ekzon 5a	L182F	544	CTC→TTC	Aminoasit değişimi	[22]
Ekzon 5a	L182H	545	CTC→CAC	Aminoasit değişimi	[9]
Ekzon 5a	H183R	548	CAT→CGT	Aminoasit değişimi	[9]
Ekzon 5a	L198R	593	CTG→CGG	Aminoasit değişimi	[24]

¹Sık rastlanan mutasyonlar siyah olarak gösterilmiştir

Clark ve ark., 2004 yılında tüm insan genom dizisini kullanarak triplet ekspansiyonlarını incelemiştir⁽²⁶⁾. Bu çalışma, GAA triplet tekrarlarının, diğer triplet tekrarlarına göre (TAA; CAA; GGA; GCA; GTA; GAC; GAT; GGC; GTG), çok farklı türde bir ekspansiyona uğramış olduklarını göstermiştir. Diğer iki NAA tekrarının da Alu dizilerinin içinde bulunması ilginçtir. Bu sebepten, bunların ortak evrim süreçleri olduğu düşünülebilir (yaş, genomik dağılım, ve belki de aynı mutajen etkilere maruz kalmaları). TAA ve CAA tekrarlarının uzunlukları her zaman 20 tripletle kesin bir şekilde sınırlıdır; buna karşılık, GAA ve GGA 20 tekrarı aşan ekspansiyonlara uğrarlar. Uzama oranındaki bu farklılık, FA'ya neden olan GAA tekrarlarının instabilitesini yansıtır. GAA tekrarlarının uzama yatkınlığının, tripletteki adenin zenginliğinden değil, GAA ekspansiyonunun

B-DNA'dan ziyade, üçlü heliks tipi (tripleks) yapılar oluşturmasından ve bu triplekslerin polipürin-

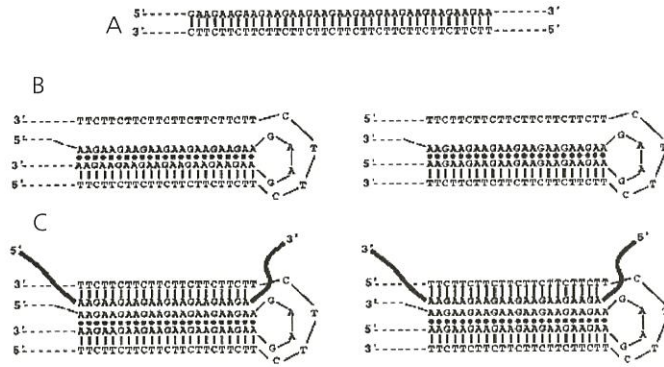
polipirimidin doğasından kaynaklandığını düşünebiliriz (Resim 1.3).

Clark ve ark., 2900 mb ve %41 GC'den oluşan insan genomunda GAA-triplet tekrarlarının uzunluğunun altı triplettten fazla olmasının tesadüfen mümkün olamayacağını da hesaplamıştır. Friedreich Ataksi'si GAA tekrarlarının ekspansiyonu sonucu oluşan tek nörodejeneratif hastalıktır.

1.2.3 Frataksinin Yapısı ve Ekspresyon Şeması

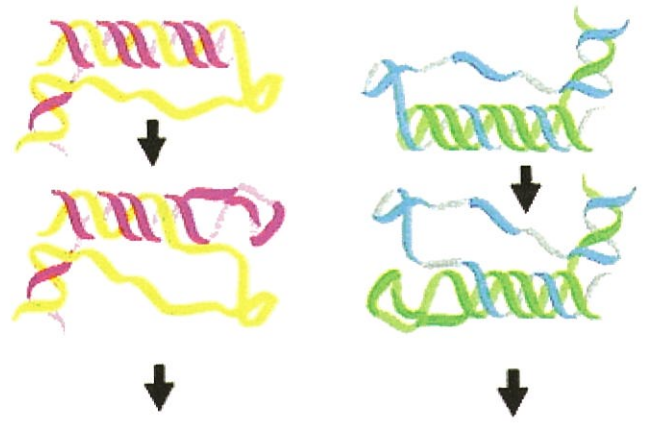
FRDA geninin ürünü olan frataksin proteini evrim sürecinde korunmuş olup, memelilerde, omurgasızlarda, mayada ve bitkilerde homologları bulunur. Frataksinin işlevi bilinen diğer proteinlerle benzerliği yoktur. Amino asit dizisi frataksinin, ufak, kolay çözünür ve transmembran bölgesi olmayan bir protein olduğuna işaret etmektedir. Frataksin amino terminal dizisi, proteinin mitokondri matriksine hedeflendiğini göstermektedir. Bu hedef dizisi, frataksin

mitokondriye ulaşınca, MPP enzimi (Mitochondrial Processing Peptidase) tarafından kesilir.⁽²⁰⁾⁽²⁷⁾



Resim 1.3. GAA triplet tekrar dizilerinin oluşturduğu olası B-DNA dışı yapılar. Okunabilirlik açısından, FA allellerinin büyük GAA-triplet tekrar sayısı ufaltılmıştır.⁽³⁰⁾ A: Pürin- pirimidin dizisi düz bir dupleks olarak gösterilmiştir; dikey çizgiler normal Watson-Crick baz çiftlerine işaret etmektedir. B: Eğer 5' ya da 3' bölgesinin pürin bakımından zengin kolu eşinden ayrılır ve de anti-paralel bir yönelim gösterirse, intramoleküler pürin/pürin/pirimidin tripleksi oluşur. C: Intramoleküler tripleks, GAA içeren FRDA pre-mRNA'sının (kalın çizgi) oluşumundan sonra gösterilmiştir. Bu pre-mRNA, yukarıda gösterilen tek kollu B-DNA olmayan yapıyla, Watson-Crick bağı sayesinde çift oluşturabilir (dikey çizgi), bu da tripleksi daha da sağlamlaştırır.

Transkripsiyonun elongasyon aşamasında, ekspansiyona uğramış GAA triplet tekrarları normalden farklı DNA yapıları oluşturabilir (Resim 1.3). Üçlü sarmallar (tripleks) fizyolojik ortamlarda da görülür, bu triplekslerden ikisi bir araya gelince "yapışkan DNA" (sticky DNA) olarak bilinen yeni bir DNA yapısı ortaya çıkar, bu intramoleküler yapı ancak GAA triplet tekrar dizisi yeterince uzun olunca gerçekteşir (Resim 1.4).^{(28) (29)} "Yapışkan DNA" transkripsiyonu in vivo ve in vitro ortamda inhibe eder; bu mekanizma, FA'daki frataksin yokluğunu açıklayabilir. Frataksin ekspresyon düzeyinin mitokondriden zengin hücrelerde, (örneğin kardiyomiyosit ve nöronlar) daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Fakat nöronlar arasında açıklanamayan farklılıklar mevcuttur; primer duyu nöronları frataksini daha çok sentezlerler.



Resim 1.4. İki tripleksin birleşerek "yapışkan DNA" oluşturması.⁽³¹⁾

1.2.4 Mitokondri ve Oksidatif Fosforilasyon

Mitokondriler küçük organeller olmalarına karşın, önemli hücresel işlevleri vardır; metabolizmanın başlıca yollarında rol oynarlar, örneğin: amino asit sentezi, yağ asitlerinin oksidasyonu, steroid metabolizması ve apoptoz. Mitokondrinin anahtar işlevi oksidatif fosforilasyonu gerçekteşirerek ATP üretmektir. Nöronlar bu enerji içeren moleküle ve ATP'yi üreten oksidatif enerji metabolizmasına çok bağımlıdırlar. Mitokondrideki bir bozukluğun hücre için tahrip edici sonuçları olur: ATP eksikliği, kalsiyum homeostazını koruyamama ve reaktif oksijen türevlerinin oluşumu gibi.

Mitokondriler 2 µm uzunluğunda, 0.5 µm çapında oval görünümlü organellerdir. Bir iç, bir de dış olmak üzere, iki zarla kaplıdırlar; dolayısıyla, intermembran bölgesi ve mitokondri matriksi olmak üzere iki bölümden oluşurlar. Oksidatif fosforilasyon mitokondrinin iç zarında olurken, sitrik asit döngüsü ve yağ asitlerinin oksidasyonu gibi bir çok reaksiyon mitokondri matriksinde olur.

Solunum zinciri dört kompleksten oluşur: üç proton pompası elektronları indirgenmiş NADH'dan O₂ molekülüne aktarırlar. Bu proteinler, NADH-Q oksidoreduktaz, Q-sitokrom c oksidoreduktaz ve sitokrom c oksidazdır; bunlar sırasıyla, kompleks I, III, ve IV olarak da bilinirler. Transmembran komplekslerdeki elektron akımı, protonların mitokondrinin iç zarından

içeri taşınmasını sağlar. Süksinat-Q reduktaz (kompleks II) proton pompalamaz; sitrik asit döngüsüne bağlıdır. Kompleks I, II, ve III demir-kükürt proteinleridir.⁽³²⁾ Bunlara hem içermeyen demir proteinleri de denir.

1.2.4.1 Demir-Kükürt Kompleksleri

Demir-kükürt proteinlerinde bulunan Demir-Kükürt Kompleksleri (DKK) indirgeme tipi biyolojik reaksiyonlarda önemli rol oynarlar. DKK'lardaki Fe iyonları Fe²⁺ (indirgenmiş) ve Fe³⁺ (okside) halleri arasında gidip gelirler. FA hastalarının kalplerinde demir birikimi gözlenmiştir. Ayrıca, bu hastalardan elde edilen kalp biyopsilerinde de DKK barındıran solunum kompleksleri I, II, ve III'ün eksikliği gösterilmiştir. FA'nın ilk patolojik özelliği olan ana duyu nöronları kaybının yaşandığı dorsal kök gangliyonda da akonitaz aktivitesinin düştüğü saptanmıştır.

Sitrik asit döngüsünde sitrati izositrata izomerize eden akonitaz da bir demir-kükürt proteinidir. Akonitazda bulunan DKK değişkendir, bundan dolayı bir çok demir iyonu, hücrede demir eksikliği olduğu zaman, bu enzimden kopabilir. Akonitazın hücredeki demir düzeyine duyarlı olması gen anlatımının demire bağlı regülasyonunu sağlar.

Demir, bir taraftan esansiyel bir elementtir: hemoglobin ve sitokrom gibi önemli proteinlerin sentezinde kullanılır; diğer taraftan da serbest radikal reaksiyonlarını tetikleyerek proteinlere, lipidlere ve nükleik asitlere zarar verebilir. Dolayısıyla, demir fazlalığı hücre için çok tehlikeli olabilir. Bunu önlemek için hücredeki demir miktarını kontrol eden etkin bir mekanizma geliştirilmiştir (Resim 1.5).

Transferin, demiri serumda taşıyan nakliye proteindir. Transferin reseptörü, hücre zarı üzerinde bulunur ve demiri bağlamış transferinin serumdan hücre içine geçmesini sağlar. Ferritin ise hücre içinde demiri sağlar. Yirmi dört ferritin polipeptidi yaklaşık 2400 Fe atomunu barındıran küresel bir kabuk oluşturur (bir amino asite bir demir atomu düşer). Ferritin mRNA'sı demire duyarlı bir bölge içerir (*Iron Response Element, IRE*). Bu bölgeye bağlanması halinde gen anlatımının başlamasını engelleyen başka bir protein bulunur (*IRE-*

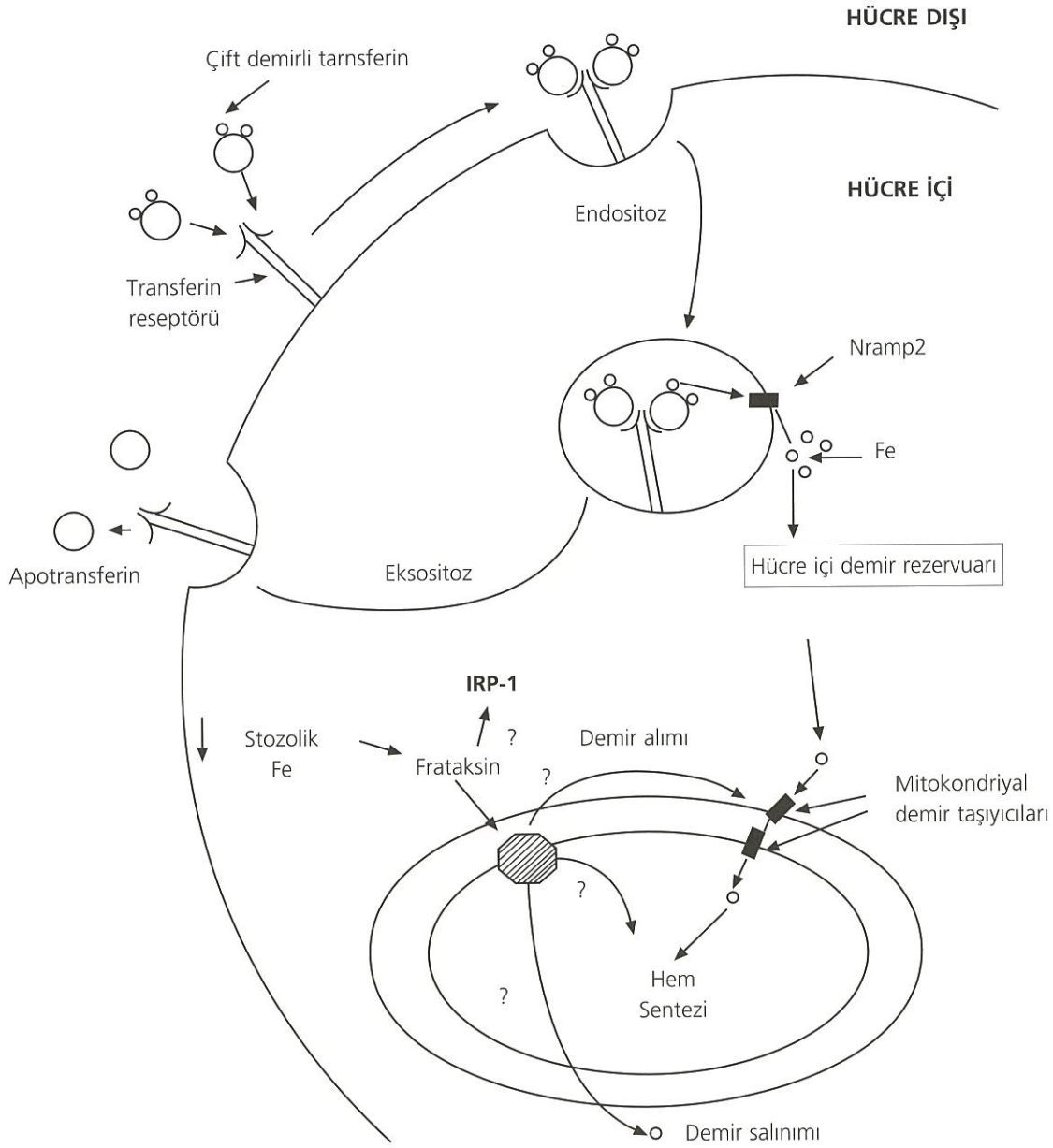
Binding Protein, IRE-BP). Demir düzeyi yükseldiğinde, IRE-BP demiri 4Fe-4S kümesini oluşturacak şekilde bağlar, bu da mRNA'ya bağlanmasını engeller. Yani ortamda demir bulunduğu zaman, ferritin mRNA'sı IRE-BP'den ayrılır ve ferritin üretir. Böylece ferritin de fazla demiri bağlar. IRE-BP'nin saflaştırılması, akonitaz ile amino asit düzeyinde %30 benzerliği olduğunu göstermiştir; IRE-BP demire duyarlı sitozolik bir akonitazdır. Demir düzeyi, kendi metabolizmasında kullanılan proteinlerin gen anlatımını kontrol altında tutar. FA hastalarında gözlemlenen sitozolik akonitaz aktivitesinin düşüşü, belki de bu bireylerde sitozolik demirin azaldığını gösterir; çünkü sitozolik akonitaz DKK'sını kaybettiği için demirin az olduğu durumlarda IRE'ye bağlanma özelliğini yitirir.⁽³³⁾

1.2.5 Maya Frataksin Homoloğu (YFH1)

Frataksinin işlevi tam olarak bilinmese de, mayada yapılan çalışmalar varsayımlar üretmekte yardımcı olmuştur. Maya frataksin homoloğu YFH1 (*Yeast Frataxin Homolog1*) delesyonu ($\Delta yfh1$) mitokondride demir birikimine neden olurken, sitozolik demirde azalma yaşanır. Ayrıca, bu hücreler oksidatif strese daha hassas olurlar. YFH1 proteininin demir taşıyıcısı olma olasılığı düşüktür, çünkü transmembran bölgesi yoktur. $\Delta yfh1$ hücrelerinde mitokondri DNA'sının kaybedilmesi de ikinci bir özelliktir. Çekirdek DNA'sında bulunan histon proteinlerinin mitokondri DNA'sında bulunmaması mitokondriyal DNA'yı serbest radikallere karşı dayanıksız kılar.

Park ve ark., 2003 yılında, frataksinin Fe²⁺ 'nın Fe³⁺ 'ya oksidasyonunda katalitik bir işlevi olduğunu öne sürmüş, hatta frataksinin, bir şaperon protein gibi, Fe²⁺ 'yı diğer proteinlere götürüp DKK ve hem biyosentezini sağladığını söylemiştir.⁽³⁴⁾ Frataksin, Fe²⁺ ve O₂ bulunan bir ortamda polimerize olur; frataksin polimeri de Fe³⁺ 'nın birikmesine neden olur.

Bu kabuksu yapı ami no asit başına bir demir atomunu depolayan ferritini anımsatır. Mayada, YFH1 proteini DKK'ların sentezlenmesinde de görevli olabilir. $\Delta yfh1$ hücrelerinde, mitokondriyal demir düzeyi düşük tutulduğunda, akonitaz aktivitesinin normal hücrelere kıyasla %50 azaldığı görülmüştür.



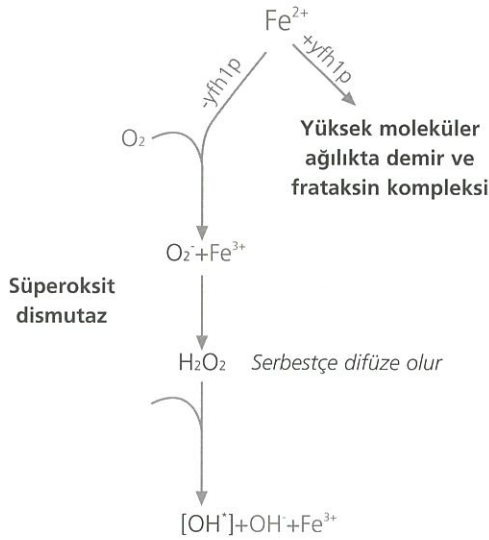
Resim 1.5. Serumda bulunan transferrin, hücre zarındaki transferrin reseptörüne bağlanır ve endositoz vezikülü tarafından hücre içine alınır. Endozomal pH'nın düşmesiyle demir transferrinden ayrılır ve Nramp 2'den hücre içine geçer. Böylece demir hücre içi demir rezervuarına geçer. Bu demir de zarındaki nakliye proteinleri ile birlikte mitokondriye girer. Mitokondriye ulaşıp olan demir, hem sentezinde kullanılabilir. Frataksinin demir metabolizmasında IRP1 (Iron Regulatory Protein 1) aracılığının etkisi olabilir.⁽³³⁾

Bu sonuç, demir toksisitesinin DKK'ların sentezlenememesinden kaynaklandığını gösterir. Dolayısıyla demir birikimi doğrudan hastalıkla bağdaştırılmamalıdır. DKK içeren proteinlerin yeteri kadar sentezlenememesi, mitokondride demir birikimine yol açar ki, bu da toksisiteyi beraberinde getirir. Friedreich Ataksi'si genomik DNA'daki bir mutasyonun neden olduğu mitokondriyal bir hastalıktır.

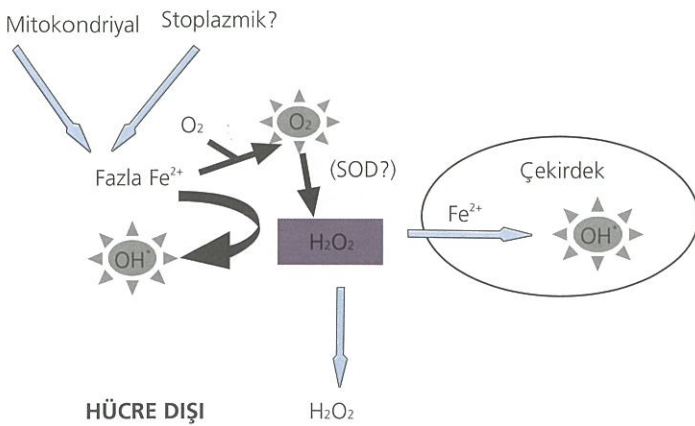
1.2.5.1 Friedreich Ataksi'sinde Antioksidan Savunmasının Bozulması

Mitokondriler, solunum zincirinden eksilen elektronlar ve oksijen metabolizmasındaki aktif rolleri sebebiyle oksidatif hasara son derece duyarlıdır. Demir yüklü mitokondride Fenton reaksiyonunun oluşması çok olasıdır (Resim 1.6 ve 1.7). Frataksin eksikliği doğrudan demir birikimiyle sonuçlanır; biriken demir Fenton

reaksiyonunun oluşması çok olasıdır (Resim 1.6 ve 1.7). Frataksin eksikliği doğrudan demir birikimiyle sonuçlanır; biriken demir Fenton reaksiyonu ile hidroksil (OH.) radikallerinin oluşumuna neden olur; $\Delta yfh1$ mayada mitokondri DNA'sı ve DKP kaybına yol açan oksidatif stres başlar.



Resim 1.6. yfh1p proteininden yoksun mayada, fazla demir ve oksijen birleşerek süperoksit radikalleri (O_2^-) oluşturur. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ise süperoksidi, hücre içinde kolaylıkla dağılılabilen H_2O_2 'ye dönüştürebilir. ⁽³⁵⁾



Resim 1.7. H_2O_2 'nin verebileceği hasara örnek: H_2O_2 hücre zarlarını geçerek, hücre dışına ve çekirdeğe ulaşabilir, nükleer DNA'ya zarar verebilir. Frataksinin, fazla demiri ortamdan alarak, demirin hücre içindeki hasarını önlediği düşünülmektedir. ⁽³⁵⁾

Moleküler oksijen ideal bir elektron akseptörüdür; fakat, oksijenin kısmi olarak indirgenmesi tehlikeli ürünlere yol açabilir:



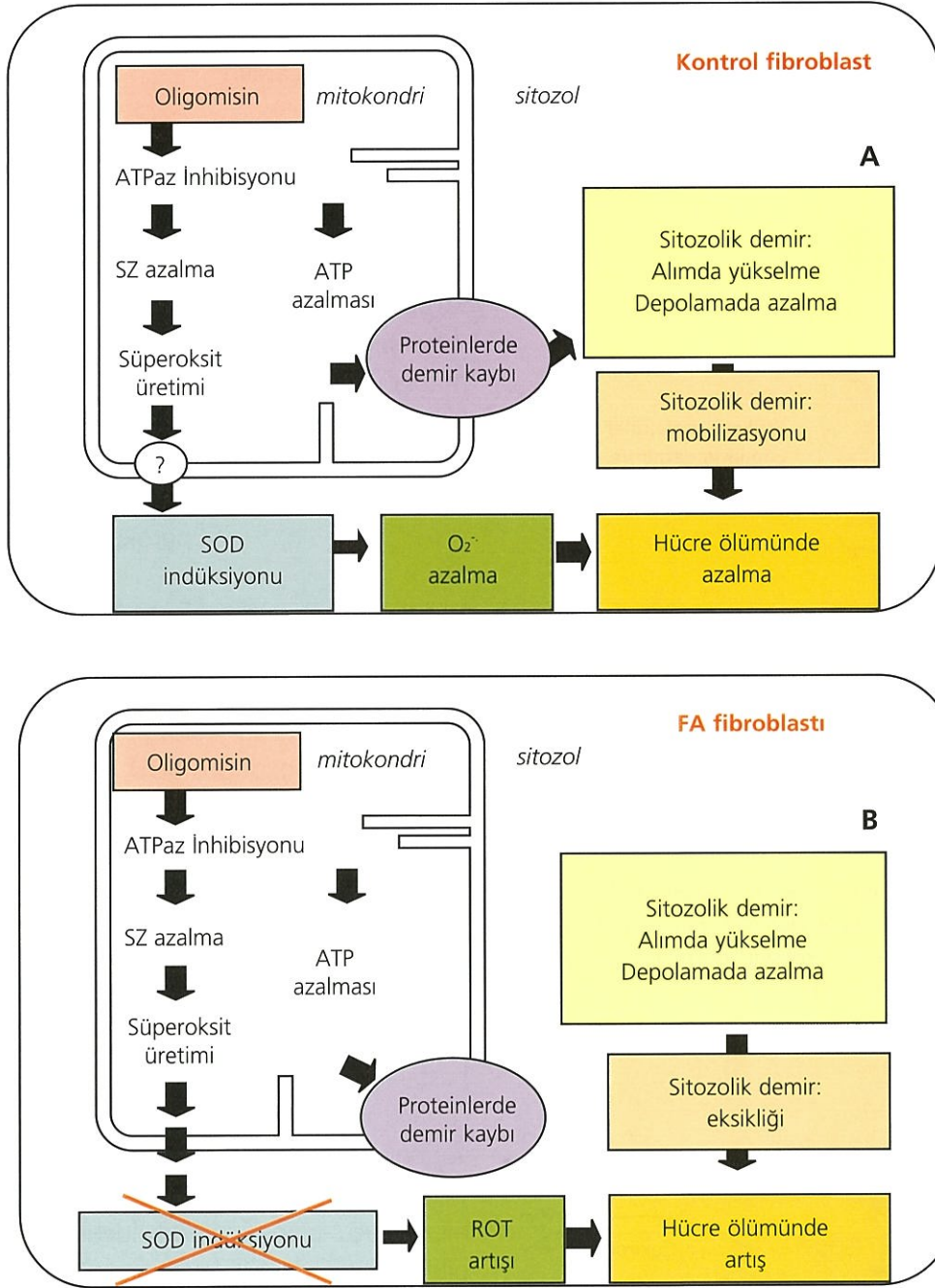
O_2 'nin toksik türevleri SOD gibi koruyucu enzimler tarafından ortamdan çekilir. Tüm aerobik organizmaların SOD genleri vardır. Bu enzimin mitokondriyal ve sitozolik olmak üzere iki çeşidi bulunur. İki enzim de aynı reaksiyonu gerçekleştirir:



FA fibroblastlarında, kontrol hücrelere kıyasla, SOD genleri indüklenmezler. Frataksinin, SOD sinyal yolağındaki işlevi hala anlaşılammış olsa da, frataksin eksikliğinin ya da yokluğunun erken antioksidan savunmasını bozduğu, SOD enzimini indüklemediği, bunun sonucunda da oksidatif stresi ve dolayısıyla hücre ölümünü arttırdığı kesin olarak bilinmektedir (Resim 1.8).

In vitro çalışmalar, kardiomyosit kültürlerinde, kalp hipertrofisini açıklayan, süperoksit oluşumunu göstermiştir. Schulz ve ark. 2000 yılında, FA hastalarında, DNA üzerindeki oksidatif hasarın bir sonucu olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozinin idrardaki yoğunluğunun artmış olduğunu göstermiştir. ⁽³⁶⁾ Aynı yıl, Emond ve ark. plazmada, lipid peroksidasyonunun bir sonucu olan, malondialdehidin artmış olduğunu bildirmiştir. ⁽³⁷⁾ Hücredeki en yoğun antioksidan olan glutationun ise FA hastalarından alınan kanlarda düşük düzeyde olduğu bilinmektedir.

Dolayısıyla, AVED olarak bilinen Friedreich-benzeri Vitamin E Yetmezliği (*Ataxia Friedreich-like with selective Vitamin E Deficiency*) sendromunun FA hastalarındaki nörolojik tabloya benzemesi tutarsız değildir. AVED daha çok kuzey Afrikada yaygındır; bu ataksinin bağlı olduğu gen 8. kromozomdadır. Güçlü bir antioksidan olan vitamin E bu kalıtsal ataksiyi yavaşlatmaya, hatta etkisiz hale getirmeye yeterlidir.



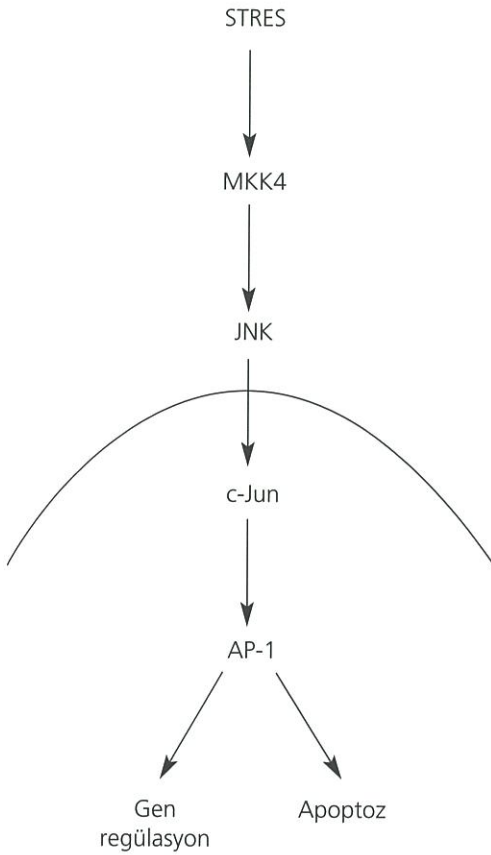
Resim 1.8. Oligomisine bağlı oksidatif stresin, kontrol (A) ve FA fibroblastlarındaki (B) etkisi. A: Kontrol fibroblastlarda, oligomisininin tetiklediği ATPaz inhibisyonu, SOD indüksiyonuna ve sitozolik demir mobilizasyonuna neden olur. B: FA fibroblastlarında ise, SOD indüksiyonu ve sitozolik demir alımı bozulur, ve hücre ölümü gerçekleşir (SZ: Solunum Zinciri; ROT: Reaktif Oksijen Türevleri).⁽³⁶⁾

1.2.6 Friedreich Ataksi'sinde Stres Kinaz Yolağının Tanımı

İnsan frataksin proteinini aşırı sentezleyen hücrelerde düşük reaktif oksijen türevleri düzeyi ve yüksek glutation peroksidaz aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Retinoik asitle tetiklenmiş nörojenez sırasında da frataksinden yoksun hücrelerin apoptoza daha yatkın

olduğu gözlemlenmiştir. Pianese ve ark., 2002 yılında, reaktif oksijen türevlerinin bir çok sinyal yolağını tetikleyebileceğini önermiş, bunlar arasında c-Jun N-terminal kinaz (JNK) yolağını incelemiştir.⁽³⁹⁾ JNK, MAP kinazlarının bir alt grubudur. MAP kinaz sinyal yolağı, hücre dışından gelen sinyalleri kuvvetlendirerek nakleder, ve hücreyi çevresine uyarlar.

JNK altgrubu, redoks stresi, ozmotik stres ve ışın ile tetiklendiği için stres ile aktive olan protein kinaz olarak da bilinir. Bu sinyal yolağında, JNK, c-Jun'u fosforile ederek transkripsiyon faktörlerini aktive eden protein, AP-1'i etkin hale getirir (Resim 1.9).



Resim 1.9. JNK sinyal yolunun şematik anlatımı.⁽³⁹⁾

FA fibroblastları üzerinde yapılan deneylerde, stres uyarısından sonra, JNK ve c-Jun fosforilasyonlarının, kontrollara göre, artmış olduğu saptanmıştır. FA fibroblastlarında ve sadece FRDA geninde bozukluk olan fetus hücrelerinde, bu artmış stres yolu görülebilir; yani, JNK yolundaki sinyal artışı, hastalık patogenezinde çok erken meydana gelir.

JNK'ya bağlı apoptotik sinyal yolu bazı "hayatta kalma" mekanizmalarıyla hafifletilebilse de (NF-İB, Akt/PKB ve ERK), frataksin eksikliği, demiri, Fenton reaksiyonuna yönlendirebilir ve stres yolunu tetikleyebilir. Bu da frataksin eksikliğinin zaten hassas olan dengeyi apoptotik yolağa doğru çekmesine

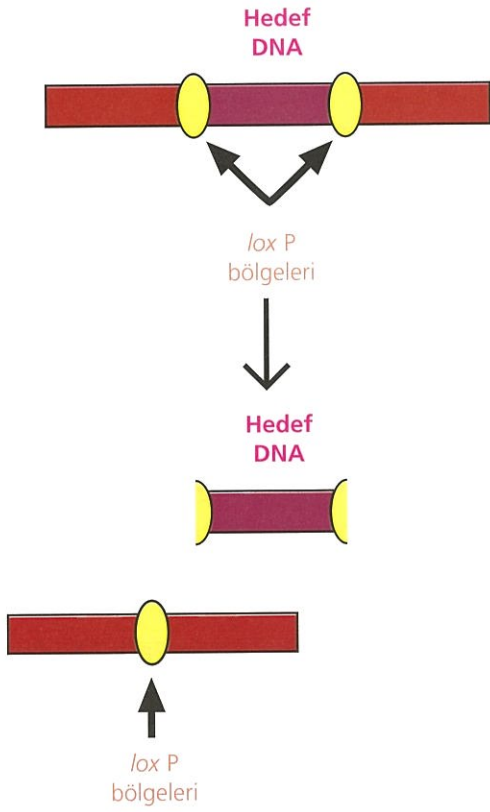
neden olur. Dorsal kök gangliyondaki nöron kaybı da kısmen de olsa bu şekilde açıklanabilir.

JNK sinyal yolağında bozukluğun, tek başına kalp sorunlarını açıklamaya yettiği düşünülmektedir. Hastaların yarısının bu nedenle kaybedildiği ve %75'nin de anormal ekokardiogramı olduğu unutulmamalıdır. Hastalardan alınan fibroblastlarda kaspaz-9'un yüksek aktivasyonu söz konusudur. JNK, strese bağlı olarak, sitokrom-c'nin mitokondriden çıkışını sağlar; sitokrom-c de kaspaz-9'u tetikler. JNK aktivitesinin frataksini aşırı sentezleyen fare modellerinde düşmesi, ve frataksinden yoksun olan hücrelerde de artması, frataksinin, JNK üzerinde doğrudan bir etkisi olduğunun göstergesidir.

1.2.7 Friedrich Ataksi'sinde Fare Modelleri

Michel Koenig'in laboratuvarında yapılan araştırmalar FA için fare modelleri geliştirmeyi sağlamıştır.⁽⁴⁰⁾ Fare embriyolarında, frataksin ekspresyonu, nöroepiteliumda 10.5. embriyonik günde (E10.5) başlar, en yüksek seviyesine E14.5'te erişir ve doğumdan sonraki dönemde bu düzeyi korur. Homolog rekombinasyon, asemptomatik heterozigot fareler ve letal homozigotlar üretir. Son modelde, FRDA geni inaktivasyonunun, demir birikimi olmaksızın, E7'de erken embriyonik ölümle sonuçlandığı görülmüştür; yani hücre ölümü demir birikimden bağımsızdır ve frataksin embriyonik gelişimde çok büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, insandaki FA fenotipinin de, letal olan frataksin yokluğundan değil, daha hafif bir fenotipe neden olan frataksin eksikliğinden meydana geldiği gösterilmiştir.⁽⁴⁰⁾

Bu laboratuvar sonraları, bakteriofaj P1'in Cre-lox sistemini kullanarak, iki kondisyonel "knock-out" fare modeli üretmiştir. Cre rekombinasyona neden olan bir rekombinazdır (*Causes Recombination*), ve aynı yönde olan iki lox dizisi arasında rekombinasyonu sağlar, dolayısıyla aradaki dizi kesilir. Gen hedefleme sayesinde, lox dizileri istenilen gene yerleştirilip "site-directed" rekombinasyon sağlanabilir (Resim 1.10).



Resim 1.10. Cre-lox rekombinasyonu: A: Sarı ovaler ile gösterilmiş bir çift lox P bölgesi morla çizilmiş ve delesyona uğrayacak hedef DNA'nın her iki tarafındadır. B: Cre enzimi hedef DNA'yı kestikten sonra, sadece bir lox bölgesi kalır, ve kalan iki DNA parçası kırılır.⁽⁴¹⁾

Frataksinin, bu yöntemle, özgün olarak, ya iskelet ve kalp kasında, ya da nöronal dokularda sentezi durdurulmuştur. Bunun için, sırasıyla, *Muscle Creatine Kinase* promotörüne bağlı olarak Cre üreten fareler (MCK mutantları), ya da *Neuron Specific Enolase* promotörü olan (NSE mutantları) kullanılmıştır.

İki model de hayatta kalabilme özelliğine sahiptir, ve ana duysal nöronların kaybı, kalp hipertrofisi, solunum zincir kompleksleri I ve III'te ve akonitazda bozulma gibi FA'nın bazı klinik ve patolojik özelliklerini gösterirler. Bu modellerden elde edilen en önemli bulgu Fe-S enzimlerindeki bozulmanın demir birikiminden önce gerçekleştiğidir. Bu da, bir kez daha demir birikiminin FA'nın sebebi değil de sonucu olduğunu göstermektedir. SOD enzim düzeyinin, bu modellerde, çok düşük olduğu da gözlenmiştir.

2004 yılında yine Koenig ve ark.⁽⁴⁰⁾, tamoksifen ile indüklenmiş rekombinazı fare prion proteini promotörü kontrolü altında kullanarak, nörona özel iki kondisyonel "knock-out" fare modeli üretmiştir. İki tür de bu yapıyı sinir sisteminde eksprese ederler, aralarındaki fark Br mutant (Br: brain) farelerin yapıyı tüm sinir sisteminde, Cb mutantlarının (Cb: cerebellum) ise sadece hipokampus ve beyincikte eksprese etmeleridir. Bu fareler, FA'nın en belirgin özelliklerini gösterirler: yavaş ilerleyen serebellar ve duysal ataksi, propriosepsiyonun kademeli kaybı ve motor işlevlerinin korunması. Cb tipi fareler Br'ye oranla daha ağır nörolojik bulgular gösterir; örneğin, yürüme yeteneğini bir yaşında kaybeder. Daha da önemlisi, bu çalışma, dorsal kök gangliyon nöronlarında beliren dejeneratif mekanizmanın apoptotik değil, otofajik olduğuna işaret etmektedir; hasara uğramış sitozolik proteinler ve organeller ortamdan çekilirler. Bu mekanizma, FA hastalarında, hem dorsal kök gangliyon nöronlarında, hem de kardiyomiyositlerde görüldüğü için, frataksin eksikliğinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

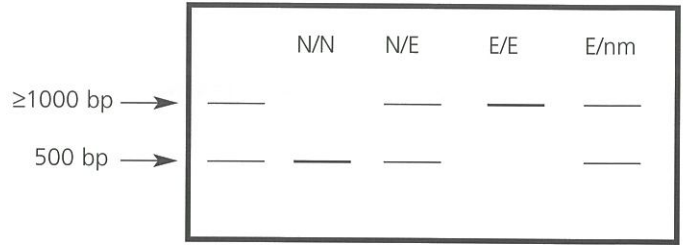
Son olarak, yukarıdaki dört mutant farede, frataksin eksikliği, hasara uğramış mitokondri birikimiyle sonuçlanır. Dolayısıyla, Friedreich Ataksi'si genomik DNA'daki bir mutasyonun neden olduğu mitokondriyal bir hastalık olarak tanımlanabilir. Ayrıca, bu kondisyonel mutant farelerin FA hastalarıyla fenotip benzerliği göstermesi, bu hayvanlar üzerinde terapiye yönelik yeni moleküllerin incelenmesine olanak sağlamaktadır.

2. FA'da Moleküler Tanı

2.1. Kullanılan Yöntem: Long Range PCR [42]

Friedreich Ataksi'sinin moleküler tanısı, diğer triplet tekrarı hastalıklarında olduğu gibi, PCR ürününün doğrudan %1.5'lik agaroz gelinde görüntülenmesinden oluşur. Sağlıklı bireylerde, Tablo 2.1'de verilen primerler kullanıldığında elde edilen PCR ürünü 500 bp uzunluğunda tek DNA bandı olarak görülürken, heterozigot taşıyıcıda, bir normal alel (500 bp), bir de uzamış alelden (≥ 1000 bp) oluşan iki bant görülür. GAA ekspansiyonu için homozigot olan FA hastalarında ise ≥ 1000 bp'de tek bant görülür

(Resim 2.1). Ekspansiyonun içerdiği GAA triplet tekrarlarının tanı sayısı Southern blot analizi ile kesin olarak tanımlanır; ama rutin tanı için Southern blot yöntemini kullanmak pahalı ve komplike olduğu için genelde gerekmez.



Tablo 2.1. PCR'de Kullanılan Oligonükleotid Primer Çifti

Primer Adı	Primer Dizisi
GAA-104F [42]	F-5' GGCTTAAACTTCCCACACGTGTT
GAA-629R [42]	R-5' AGGACCATCATGGCCACACTT

Resim 2.1. Hipotetik bir FRDA geni ve olası tanı sonuçları (N:Normal; E: Ekspansiyona uğramış; nm: nokta mutasyonu). N/N: sağlıklı; N/E: FA taşıyıcısı; E/E: FA homozigotu (hasta); E/nm: FA bileşik heterozigotu (hasta). Hasta olan bireyin PCR sonucunda taşıyıcı gibi gözükmesi, onun bir alelinde GAA ekspansiyonu, diğer alelinde de nokta mutasyonu taşıdığına işaret eder, çünkü uygulanan PCR yöntemi sadece GAA ekspansiyonunu tanımlar.

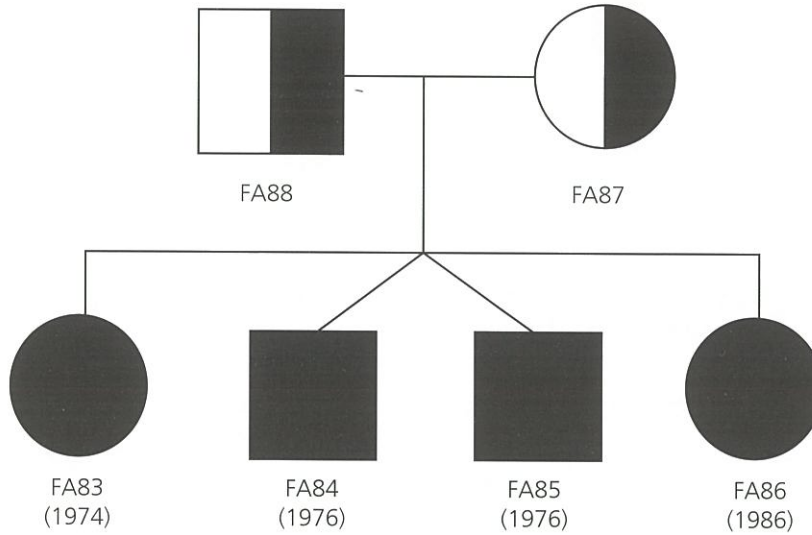
2.2.Uygulama- Örnekler

Aile 1:

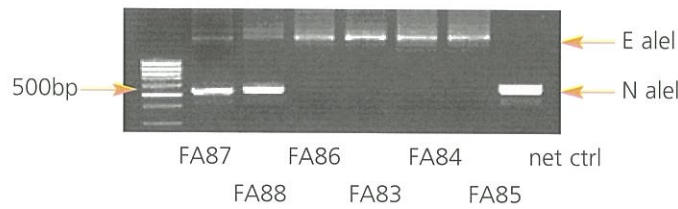
Soyağacında, ikisi ikiz dört çocuklu bir aile görülüyor

(parantez içinde doğum yılları). Ebeveynler FA87 ve FA88, taşıyıcı, dört çocuklarının hepsi, FRDA genine özgü GAA ekspansiyonu için homozigottur (Resim 2.2).

a.



b.

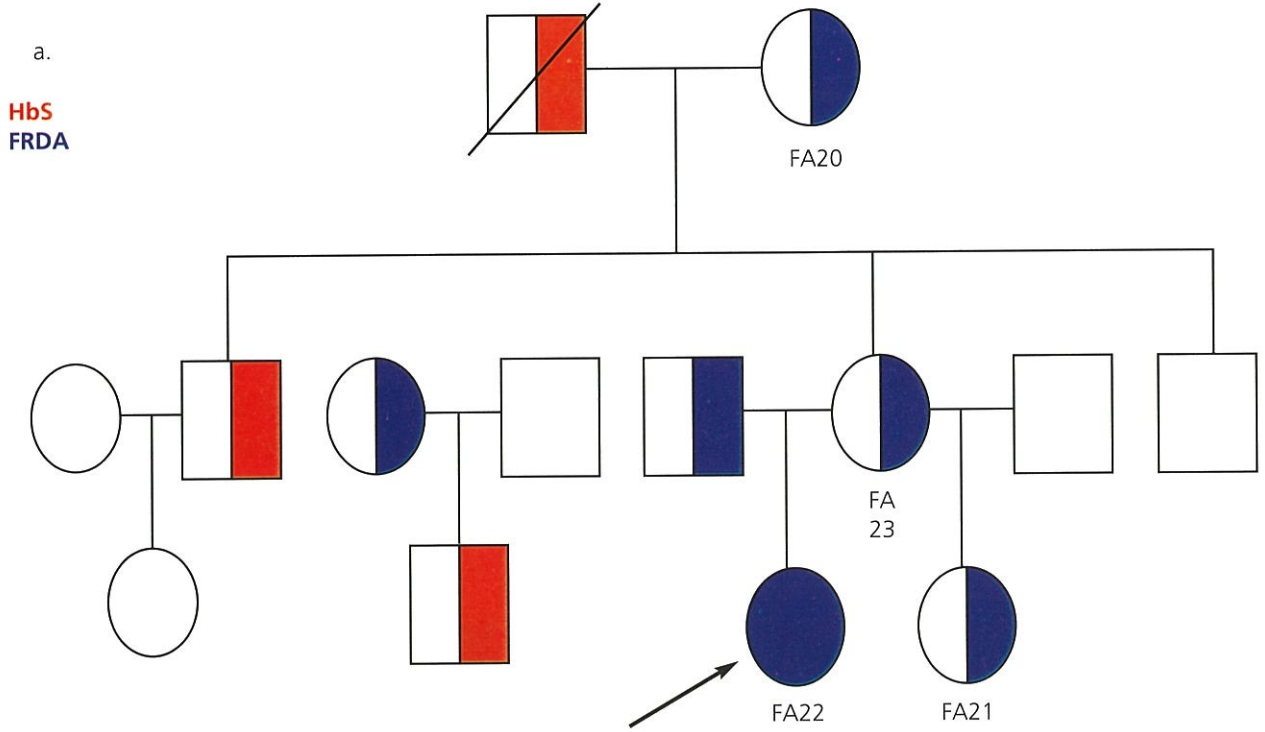


Resim 2.2. a: Ailenin soyağacı **b:** Agaroz geli sonuçları (neg ctrl: negatif kontrol).

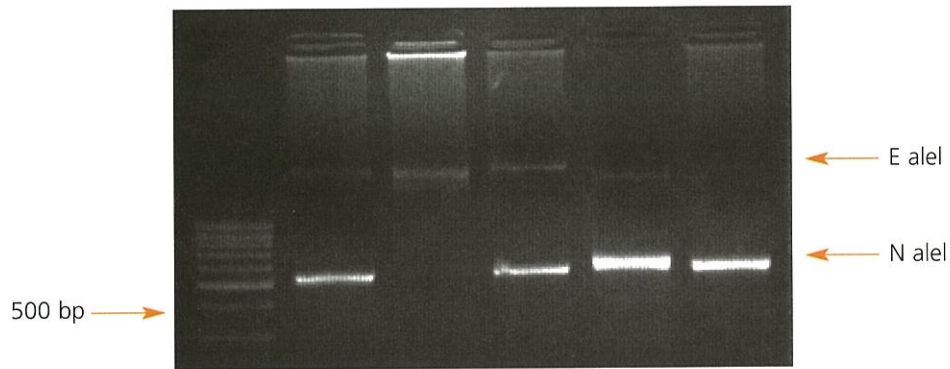
Aile 2:

Burada hem FA hem HbS (orak hücreli anemi) geni taşıyan bir aile görüyoruz. Aile ağacındaki FA20, FA21 ve FA23, GAA ekspansiyonu için heterozigot,

FA22 (indeks olgu) ise homozigottur. Ailenin bazı bireyleri orak hücreli anemi taşıyıcısıdır (kırmızı) (Resim 2.3).



b.

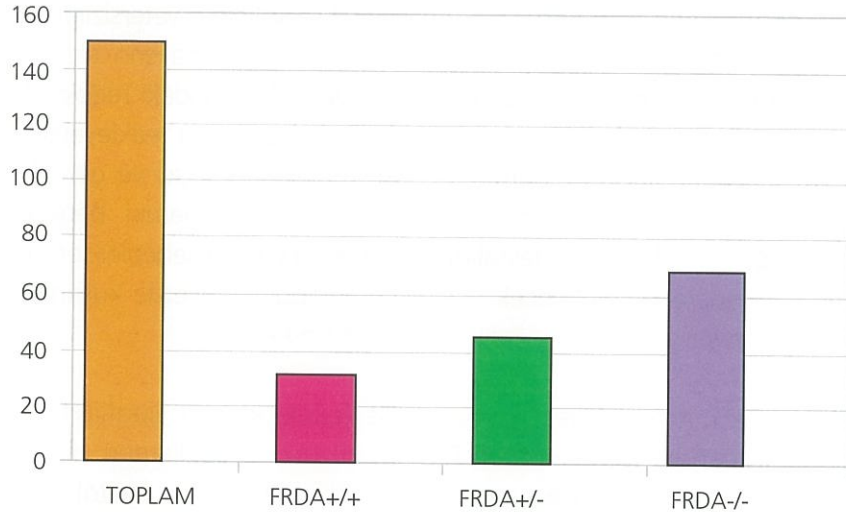


Resim 2.3. a. Ailenin soyağacı b. Agaroz gel resmi (neg ctrl: negatif kontrol).

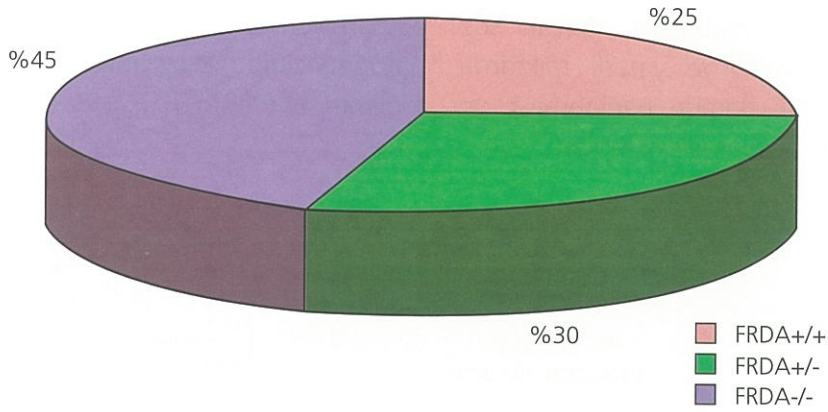
2.3. Sonuçlar

Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde son iki yılda, 77 aileden 153 birey, GAA triplet tekrarı ekspansiyonu açısından incelendi.

Sonuçlar, 38 bireyin GAA ekspansiyonu için homozigot, 46'sının taşıyıcı olduğunu gösterdi; 66 bireyde ise GAA tekrar sayısının normal aralıkta olduğu saptandı (Resim 2.4 ve 2.5).



Resim 2.4. Histogramda, çalışma çerçevesinde incelenen bireylerin sayısı ve dağılımı görülmüyor. FRDA+/+, GAA ekspansiyonu için homozigot bireyleri (FRDA hastaları), FRDA+/- heterozigotları ve FRDA-/- sağlıklı bireyleri simgeliyor.



Resim 2.5. Çalışma çerçevesinde incelenen toplumun dağılımı (FRDA+/+, GAA ekspansiyonu için homozigot, FRDA+/- heterozigot, ve FRDA-/- sağlıklı bireylerdir).

3. Friedreich Ataksi'sinde Olası Terapiler ve Gelecekte Beklentiler

Friedreich Ataksi'nin, serbest radikallerin birikimi hücre üzerindeki olumsuz etkileri dolayısıyla oluştuğunu kabul edersek, bunların antioksidanlar ile ortamdan alınması (detoksifikasyon) faydalı olabilir:

- Koenzim Q10'un (400mg/gün) ve E vitamininin hem nörolojik hem de ekokardiyografik tetkiklerde iyileşme sağladığı gözlemlenmiştir. E vitamini mitokondri zarlarında serbest radikalleri bağlar ve ortamdan çeker .

- Lipofilik bir antioksidan olan idebenon, genelde inme sonucu oluşan hasarlarda kullanılan bir benzokinondur. Idebenon aynı zamanda kan beyin bariyerini aşması ile tanınan bir moleküldür. Idebenonun (5-10 mg/gün) lipid peroksidasyonunu engellediği, mitokondriyal işlevleri tetiklediği, ve kardiyak hipertrofide miyokardiyal enerji durumunu düzelttiği gösterilmiştir. Bir yıl süren, plasebo kontrollü insan deneylerinde, ilacın önemli bir yan etkisinin olmadığı ve kardiyomiyopati üzerinde az da olsa ilerleyici bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu da

hasara uğramış mitokondrilerin kalp kası hücrelerinde yenilenebildiğinin bir göstergesidir. Ancak, ldebenonun nörolojik tablo üzerinde hiç bir iyileşme etkisi gösterilememiştir.⁽⁴³⁾ Bunun nedeni oksidatif stresi azaltan ilaçların, demiri ortamdaki çekemediği için, hastalığın seyri üzerinde etkili olmadığıdır. Dolayısıyla, hastalığın nörolojik bulguları üzerinde etkili olabilecek başka ilaçlara gereksinim vardır.

- Mitokinin selektif olarak mitokondriye hedeflenmiş bir antioksidandır. Mitokinin'un FA fibroblastlarının ölümünü engellemekte, ldebenon'dan 800 defa daha etkili olduğu gösterilmiştir. Mitokinin bu sebepten ümit vaat eden bir molekül olma özelliğini taşımaktadır ve halen insan üzerinde denenmektedir.⁽⁴⁴⁾

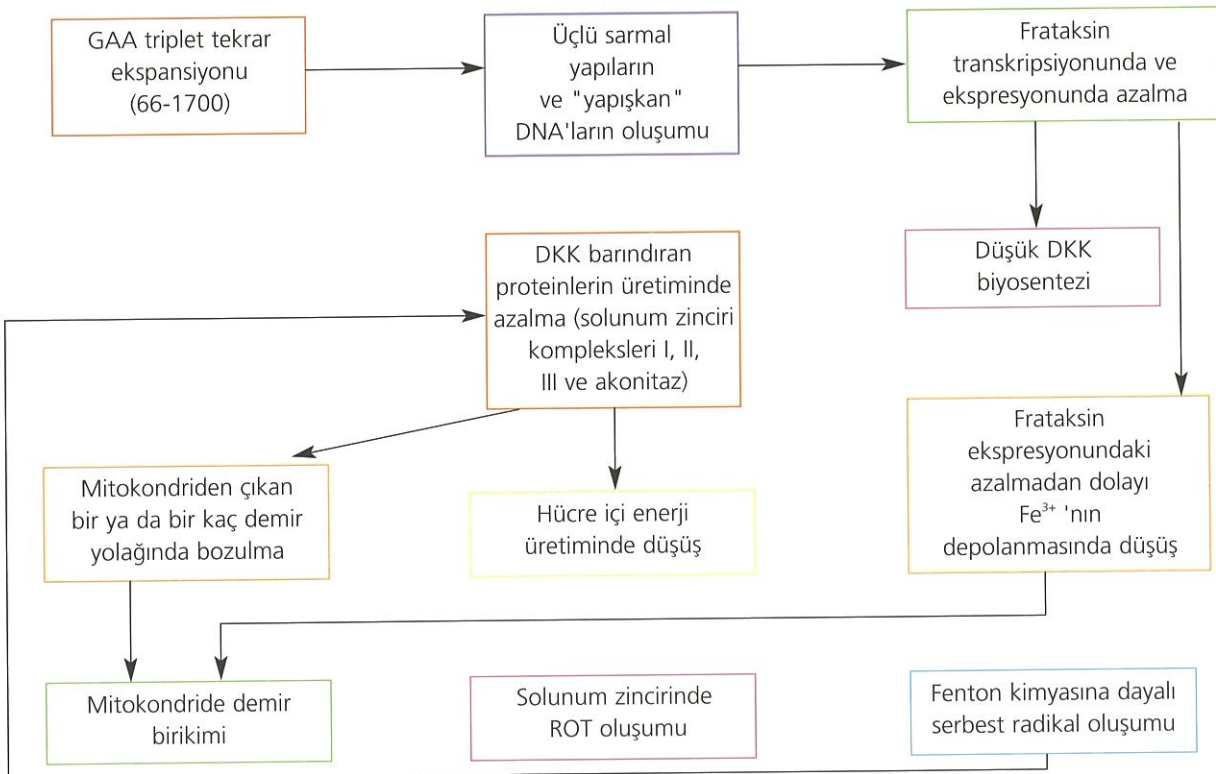
Metal seçiciliğinin yetersizliği, Zn^{2+} gibi, fizyolojik olarak önemli diğer metallerin eksikliğine yol açabilir; ayrıca, Fe^{2+} ve Fe^{3+} arasındaki redoks döngüyü bozarak serbest radikal oluşumunu tetikleyebilir. Önemli başka bir unsur ise molekülün seçici ve geri dönüşümlü olarak sadece mitokondrideki demiri bağlayarak sitozole bırakması gerekliliğidir. Bu sebeplerden dolayı, transfüzyona bağlı hemoglobinopatilerde kullanılan Desferrioksamin FA'da kullanılamaz.

Desferrioksamin'in lipofilitesi, moleküler ağırlığı ve iyonizasyonu lipidlerden oluşan zarları aşmaya yeterli değildir, dolayısıyla mitokondriye ulaşmasına büyük engel oluşturmaktadır. Ayrıca, Desferrioksamin demiri geri dönüşümsüz bağlar. FA tedavisinde Desferrioksamin kullanımı ağır ve genel demir yokluğu yaratacağından anemi FA fenotipini ağırlaştırabilir.

FA patolojisi mitokondrideki demir birikimiyle ilişkilendirildiği için demir bağlayıcıları Friedreich Ataksi'si tedavisinde etkili olabilirler. Ancak söz konusu molekülün, mitokondriye yeterli miktarda hedeflenmesi, seçici olarak demire bağlanması, ve zarlardan kolayca geçebilmesi gerekmektedir.

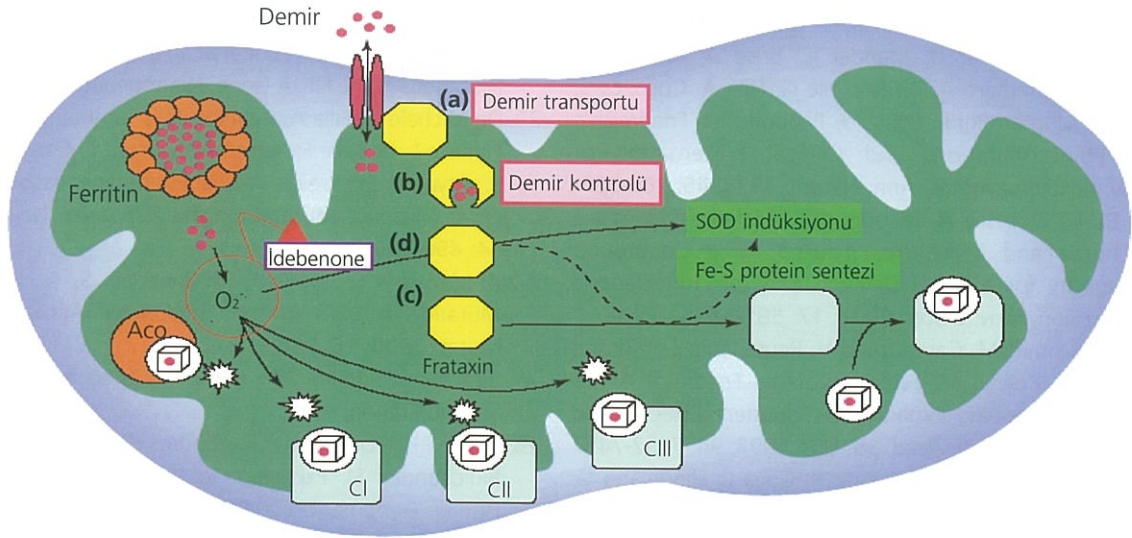
3.1 Friedreich Ataksi'ye Güncel Bakış

Friedreich Ataksi'sine neden olan GAA ekspansiyonunun ilk açıklandığı 1996'dan beri, hastalık patogenezinin anlaşılmasında önemli ilerlemeler sağlanmıştır (Resim 3.1).



Resim 3.1. FA'ya neden olabilecek karmaşık mekanizmanın şematik görüntüsü (ROT: Reaktif Oksijen Türevleri; DKK: Demir Kükürt Kompleksleri).

Frataksinin fizyolojik rolünün açıklanması için varsayımlar öne sürülmektedir (Resim 3.2).



Resim 3.2. Frataksinin mitokondrideki olası işlevleri:

- (a) Frataksinin mitokondrideki demir transportundan sorumlu olabilir.
- (b) Frataksinin mitokondrinin demir gereksinimini kontrol eder.
- (c) Frataksinin demir-kükürt komplekslerinin birleşmesine yol açabilir.
- (d) Frataksinin serbest radikallerden korunmada etkin bir rol üstlenebilir. (aco: akonitaz).⁽⁴⁴⁾

Friedreich Ataksi'si alanında yapılan araştırmalar, son on yılda büyük ilerleme kaydetmiştir, dolayısıyla frataksinin ekspresyonundaki eksikliği kompanse edecek daha yararlı stratejilerin geliştirilmesi çok muhtemeldir. Farelerde, normal frataksinin üretiminin sadece %25-35 seviyesinde olmasının FA fenotipi ile sonuçlanması çok önemli bir bulgudur. Bu sonuç göstermektedir ki, FA hastalarında, frataksinin düzeyinin beş-on kat artması tedaviye yeterli olabilir. Hemin ve butirik asidin FRDA gen ekspresyonunu arttırdıkları bilinmektedir. Doku ve gelişme özgünlüğünü sağlayan FRDA gen ekspresyonu regülatörlerinin, frataksinin indükleyici moleküllerin bulunmasını sağlayarak merkezi sinir sisteminde etkili olmaları umulmaktadır.

Teşekkür: Boğaziçi Üniversitesi Araştırma Fonu (03B107), DPT ve Suna ve Inan Kıraç Vakfı'na çalışmaya katkılarından dolayı teşekkürü borç biliriz. Esra Soydan'a tanılardaki mükemmel yardımı için candan teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Koenig M, Mandel JL. Deciphering the Cause of Friedreich Ataxia. *Current Opinion in Neurobiology* 1997; 7: 689-694
2. Delatycki MB, Williamson R, Forrest SM. Friedreich Ataxia: an Overview. *J. Med. Genet.* 2000; 37: 1-8
3. Voncken M, Ioannou P, Delatycki MB. Friedreich Ataxia? Update on Pathogenesis and Possible Therapies. *Neurogenetics* 2004; 5: 1-8
4. Muscular Dystrophy Association, 2005; Facts About Friedreich's Ataxia. <http://www.mdausa.org/publications/fa-fried-qa.html>
5. Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Canizares J, Koutnikova H, Bidichandini SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, De Michele G, Filla A, De Frutos R, Palau F, Patel PI, Di Donato S, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M. Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion. *Science* 1996; 271: 1423-1427
6. Pandolfo M. Frataxin Deficiency and Mitochondrial Dysfunction. *Mitochondrion* 2002; 2: 87-93
7. Zuehlke CH, Dalski A, Habeck M, Straube K, Hedrich K, Hoeltzenbein M, Konstanzer A, Hellenbroich Y, Schwinger E. Extension of the Mutation Spectrum in Friedreich's Ataxia: Detection of an Exon Deletion and Novel Missense Mutations. *European Journal of Human Genetics* 2004; 12 (11): 979-982

8. Bidichandini SI, Ashizawa T. Point Mutations Seen in Individuals who are Compound Heterozygous. *GeneReviews* 2004; <http://www.genetests.org>
9. Cossée M, Durr A, Schmitt M, Dahl N, Trouillas P, Allinson P, Kostrzewa M, Nivelon-Chevallier A, Gustavson KH, Kohlschütter A, Müller U, Mandel JL, Brice A, Koenig M, Cavalcanti F, Tammara A, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Labuda M, Montermini L, Poirier J, Pandolfo M. Friedreich's Ataxia: Point Mutations and Clinical Presentation of Compound Heterozygotes. *Ann. Neurol.* 1999; 45: 200-206
10. Zhu D, Burke C, Leslie A, Nicholson GA. Friedreich's Ataxia with Chorea and Myoclonus Caused by a Compound Heterozygosity for a Novel Deletion and the Trinucleotide GAA Expansion. *Mov. Disord* 2002; 17: 585-589
11. Cossée M, Schmitt M, Campuzano V, Reutenauer L, Moutou C, Mandel JL, Koenig M. Evolution of the Friedreich Ataxia Trinucleotide Repeat Expansion: Founder Effects and Premutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 7452-7457
12. Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindelang C, Jiralerspong S, Trottier Y, Kish SJ, Faucheux B, Trouillas P, Authier FJ, Durr A, Mandel JL, Vescovi A, Pandolfo M, Koenig M. Frataxin is Reduced in Friedreich Ataxia Patients and is Associated with Mitochondrial Membranes. *Hum. Mol. Genet.* 1997; 6: 1771-1780
13. Potter NT, Miller CA, Anderson JJ. Mutation Detection in an Equivocal Case of Friedreich's Ataxia. *Pediatr. Neurol.* 2000; 22: 413-415
14. De Castro M, Garcia-Planells J, Monros E, Canizares J, Vazquez-Manrique R, Vilchez JJ, Urtasun M, Lucas M, Navarro G, Izquierdo G, Molto MD, Palau F. Genotype and Phenotype Analysis of Friedreich's Ataxia Compound Heterozygous Patients. *Hum. Genet.* 2000; 106: 86-92
15. McCormack ML, Guttmann RP, Schumann M, Farmer JM, Stolle CA, Campuzano V, Koenig M, Lynch DR. Frataxin Point Mutations in Two Patients with Friedreich's Ataxia and Unusual Clinical Features. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2000; 68: 661-664
16. Pook M, Al-Mahdawi SAH, Thomas NH, Appleton R, Norman A, Mountford R, Chamberlain S. Identification of Three Novel Frameshift Mutations in Patients with Friedreich's Ataxia. *J. Med. Genet.* 2000; 37: 38
17. Bartolo C, Mendell JR, Prior TW. Identification of a sense Mutation in a Friedreich's Ataxia Patient: Implications for Diagnosis and Carrier Studies. *Am. J. Med. Genet.* 1999; 79: 396-399
18. Doudney K, Pook M, Al-Mahdawi S, Carvajal J, Hillermann R, Chamberlain S. A Novel Splice Site Mutation (384+IG-A) in the Friedreich's Ataxia Gene. *Hum. Mutat.* 1998
19. Bidichandani SI, Ashizawa T, Patel PI. Atypical Friedreich Ataxia Caused by Compound Heterozygosity for a Novel Missense Mutation and the GAA Triplet-Repeat Expansion. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 60:1251-1256
20. Koutnikova H, Campuzano V, Koenig M. Maturation of Wild-Type and Mutated Frataxin by the Mitochondrial Processing Peptidase. *Human Molecular Genetics* 1998; 7 (9):1485-1489
21. McDaniel D, Woodley C, Langford L, Subromany S. A Novel Frataxin Mutation and Unusual Heterozygote Expansion Associated with a Very Late Onset Case of FA. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 73: 258 (A514)
22. Forrest SM, Knight M, Delatycki MB, Paris D, Williamson R, King J, Yeung L, Nassif N, Nicholson GA. The Correlation of Clinical Phenotype in Friedreich Ataxia with the Site of Point Mutations in the FRDA Gene. *Neurogenetics* 1998; 1: 253-257
23. De Michele G, Filla A, Cavalcanti F, Tammara A, Monticelli A, Pianese L, Di Salle F, Perreti A, Santoro L, Caruso G, Coccozza S. Atypical Friedreich Ataxia Phenotype Associated with a Novel Missense Mutation in the X25 gene. *Neurology* 2000; 54: 496-499
24. Al-Mahdawi S, Pook M, Chamberlain S. A Novel Missense Mutation (L198R) in the Friedreich's Ataxia Gene. *Hum. Mutat.* 2000; 16: 95
25. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics* 2001; Second Edition, Bios
26. Clark RM, Dalgliesh GL, Endres D, Gomez M, Taylor J, Bidichandini SI. Expansion of GAA Triplet Repeats in the Human Genome: Unique Origin of the FRDA Mutation at the Center of an Alu. *Genomics* 2004; 83: 373-383
27. Branda SS, Cavadini P, Adamec J, Kalousek F, Taroni F, Isaya G. Yeast and Human Frataxin Are Processed to Mature Form in Two Sequential Steps by the Mitochondrial Processing Peptidase. *The Journal of Biological Chemistry* 1999;274 (32): 22763-22769
28. Ohshima K, Montermini L, Wells RD, Pandolfo M. Inhibitory Effects of Expanded GAA/TTC Triplet Repeats from Intron I of the Friedreich Ataxia Gene on Transcription and Replication in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273 (23): 14588-14595
29. Patel PI, Isaya G. Friedreich Ataxia: from GAA Triplet-Repeat Expansion to Frataxin Deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 69: 15-24
30. Bidichandini SI, Ashizawa T, Patel PI. The GAA Triplet-Repeat Expansion in Friedreich Ataxia Interferes with Transcription and May Be Associated with an Unusual DNA Structure. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62: 111-121
31. Cavadini P, O'Neill HA, Benada O, Isaya G. Assembly and Iron-Binding Properties of Human Frataxin, the Protein Responsible in Friedreich Ataxia. *Human Molecular Genetics* 2002;11 (3): 217-227
32. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry* 2002; Fifth Edition, Freeman
33. Becker E, Richardson DR. Frataxin: its Role in Iron Metabolism and the Pathogenesis of Friedreich's Ataxia. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2001; 33:1-10
34. Park S, Gakh O, O'Neill HA, Mangravita A, Nichol H, Ferreira GC, Isaya G. Yeast Frataxin Sequentially Chaperones and Stores Iron by Coupling Protein Assembly with Iron Oxidation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 31340-31351
35. Karthikeyan G, Lewis LK, Resnick MA. The Mitochondrial Protein Frataxin Prevents Nuclear Damage. *Human Molecular Genetics*, 2002; 11 (11): 1351-1362
36. Schulz JB, Dehmer T, Schöls L. Oxidative Stress in Patients with Friedreich Ataxia. *Neurology* 2000; 55: 1719-1721

-
37. Emond M, Lepage G, Vanasse M, Pandolfo M, Increased Levels of Plasma Malondialdehyde in Friedreich Ataxia. *Neurology* 2000; 55: 1752-1753
 38. Chantrel-Groussard K, Geromel V, Puccio H, Koenig M, Munnich A, Rötig A, Rustin P. Disabled Early Recruitment of Antioxidant Defenses in Friedreich's Ataxia. *Human Molecular Genetics* 2001; 10 (19): 2061-2067
 39. Pianese L, Busino L, De Biase I, De Cristofaro T, Lo Casale MS, Giuliano P, Monticelli A, Turano M, Criscuolo C, Filla A, Varrone S, Coccozza S. Up-regulation of c-Jun N-terminal Kinase Pathway in Friedreich's Ataxia Cells. *Human Molecular Genetics* 2002; 11 (23): 2989-2996
 40. Department of Biology, Davidson College, 2005; Cre-lox Recombination, <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/genomics.html>
 41. Simon D, Seznec H, Gansmuller A, Carelle N, Weber P, Metzger D, Rustin P, Koenig M Puccio H. Friedreich Ataxia Mouse Models with Progressive Cerebellar and Sensory Ataxia Reveal Autophagic Neurodegeneration in Dorsal Root Ganglia. *The Journal of Neuroscience* 2004; 24 (8):1987-1995
 42. Filla A, De Michele G, Cavalcanti F, Pianese L, Monticelli A, Campanella G, Coccozza S. The Relationship between Trinucleotide (GAA) Repeat Length and Clinical Features in Friedreich Ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 59: 554-560
 43. Schöls L, Vorgerd M, Schillings M, Skipka G, Zange J. Idebenone in Patients with Friedreich Ataxia. *Neuroscience Letters* 2001; 306: 169-172
 44. Rötig A, Sidi D, Munnich A, Rustin P. Molecular Insights into Friedreich's Ataxia and Antioxidant-based Therapies. *Trends in Molecular Medicine*, 2002; 8 (5): 221-224