

Türk Popülasyonunda Süperoksit Dismutaz A (SOD A) Enziminin Polimorfizmi, Alel Sıklığı ve Aktivitesi

Doç. Dr. E. Ferda PERÇİN*, Öğr. Gör. Yavuz SİLİĞ**, Yrd. Doç. Dr. A. İsmihan GÖZE***, Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK*, Prof. Dr. Atilla ATALAY****

* Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Sivas

** Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Bilim Dalı, Sivas

*** Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Meslek Yüksek Okulu, Sivas

**** Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas

Özet

Türk popülasyonunun genetik yapısını belirlemek, adli kimliklendirme ve paternite tayininde kullanılmak üzere veri tabanı oluşturmak amacıyla yapılan bu çalışmada, eritrositlerde bulunan Cu-Zn süperoksit dismutaz (SOD A) enziminin fenotipleri, selüloz asetat elektroforez yöntemi ile belirlendi ve alel sıklıkları hesaplandı. Toplam 250 sağlıklı bireyde yapılan bu çalışmada bir bireyde, özellikle Kuzey Avrupa popülasyonlarında ve oldukça nadir görülen 2-1 fenotipi saptandı. Alel sıklıkları; SOD A*1 için 0.998 ± 0.0019 ve SOD A*2 için 0.002 ± 0.0019 olarak belirlendi. SOD A enzim sistemi Hardy-Weinberg yasasına uygun bulundu ($c^2 = 0.001$, $p > 0.05$). Türk popülasyonu için SOD A enzim aktivitesi 1608.56 ± 677.94 U/g Hb olarak saptandı. Araştırma, söz konusu enzimin Türk popülasyonu için polimorfizm ve alel sıklığını gösteren ilk veri olması nedeni ile sunuldu.

Anahtar Kelimeler: Süperoksit dismutaz, polimorfizm, enzim

Superoxide Dismutase A (SOD A) Enzyme Polymorphism, Allel Frequency and Activity in the Turkish Population

Summary

This study is intended to be a contribution to the determination of genetic structure of the Turkish population and creating a data-base for forensic individualisation and paternity tests. For this purpose Cu-Zn superoxide dismutase (SOD A) enzyme, an erythrocyte enzyme, phenotypes were determined by cellulose acetate electrophoresis; in this way, allele frequencies were calculated. Total 250 healthy individuals were investigated and in one sample showed 2-1 phenotype that is very rare and especially find in Caucasian population. It was determined that the allele frequencies of SOD A enzyme were SOD A*1 = 0.998 ± 0.0019 and SOD A*2 = 0.002 ± 0.0019 . The SOD A enzyme system was found to be in conformity with the Hardy-Weinberg law ($c^2 = 0.001$, $p > 0.05$). This result was presented due to first report of polymorphism and allele frequency of the this enzyme for Turkish population.

Key words: superoxide dismutase, polymorphism, enzyme

Giriş

Başlangıçta indofenol oksidaz olarak bilinen süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, organizmadaki oksijen toksitesine karşı tek enzimatik korunmadır. Bu enzim süperoksit radikallerinin (O_2^-) dismutasyonunu katalizleyerek, H_2O_2 oluşturur (1-2). İnsanlarda SOD enzimi (EC 1.15.1.1) kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre 2 sınıfta toplanır. Bakır ve çinko içeren SOD (Cu-Zn SOD; SOD1 ya da SOD A) çözünmüş veya sitoplazmik form olarak da bilinir ve eritrositlerde bulunur. Mangan içeren SOD (Mn SOD; SOD2 ya da SOD B) ise mitokondrial formdur, dolayısıyla eritrositlerde yoktur. SOD A geni kromozom 21'de (21q22.1) haritalanmış iken, SOD B geni 6.

kromozomda (6q25) lokalizedir (3,4). SOD A enziminin sentezi SOD A*1 ve SOD A*2 şeklinde iki alel tarafından kontrol edilir ve SOD A 1-1 , SOD A 2-1 ve SOD A 2-2 şeklinde belirlenen 3 fenotip oluşturur (5-7). SOD enziminin polimorfizmi ve alel sıklığı, çeşitli elektroforetik yöntemlerle incelenmiş; en yaygın fenotipin 1-1 olduğu saptanmış ve çok nadir olan 2-2 fenotipine Kuzey Avrupa ülkelerinde rastlanmıştır. Enzim genellikle monomorfik iken birkaç popülasyonda çok az da olsa polimorfik olabildiği saptanmıştır (Tablo 1) (5,7-16). Aile çalışmaları SOD A*2 alellerinin otozomal kodominant kalıtıldığını desteklemektedir (7). Son araştırmalar ailesel amiyotrofik lateral sklerozlu (ALS) ailelerde CuZn-SOD geninde 70 farklı mutasyon için heterozigosite olduğunu ve hastalarda enzim aktivitesinin yaklaşık %50 azaldığını göstermiştir (17, 18). Bunun ötesinde ailesel ALS mutasyonu taşıyıcılarında ALS'un klinik olarak başlamasından yıllar önce SOD1 enzim anormallığının saptanabileceği ileri sürülmektedir (19, 20). Bu araştırma, Türkiye'de enzime ait bir polimorfizim incelemesi ve alel sıklığına ait herhangi bir veri olmadığı için yapılmıştır. Burada sunulan sonuçlar, SOD A enzim polimorfizmi için Türkiye'ye ait ilk verilerdir ve değişik araştırmalar için kontrol grubu olarak kullanılabilir.

Tablo 1: SOD A Enzimi Alel Sıklıklarının Dünyadaki Dağılımı

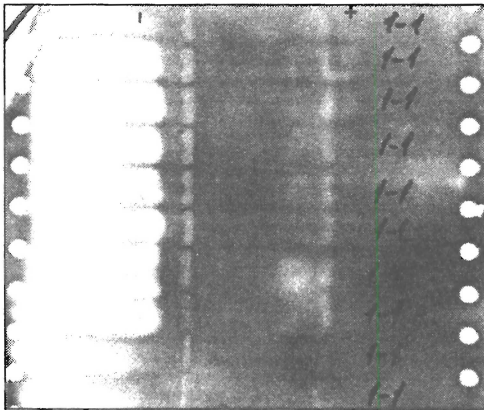
Populasyon	N	SOD A*1	SOD A*2	Kaynak
Kuzey Finlandiya	315	0,989	0,011	7
Finlandiya	406	0,990	0,010	7
Finlandiya	949	0,998	0,002	7
Finlandiya	272	0,976	0,024	7
Finlandiya (Kuzey Bölgesi)	127	0,976	0,024	7
Finlandiya (Güney Bölgesi)	143	0,997	0,003	7
Finlandiya (Güney Bölgesi)	136	0,993	0,007	7
Finlandiya	129	0,984	0,016	7
İsveç (Kuzey)	1710	0,975	0,025	7
İsveç (Kuzey)	2366	0,998	0,002	7
İsveç (Kuzey)	2045	0,990	0,010	7
İsveç	210	0,998	0,002	7
Orkney adaları	406	0,985	0,015	7
İngiltere	11237	0,9997	0,0003	7
Almanya	4100	0,9993	0,0007	7
İtalya	738	0,9993	0,0007	7
Irak	320	0,9969	0,0031	3
Filipinler	146	0,9966	0,0034	7
Japonya	5000	0,9999	0,0001	7
Kanada	175	0,9700	0,0300	7
Avustralya	10000	0,9998	0,0002	7
Orta Afrika Cumhuriyeti	92	0,9945	0,0055	7
Brezilya	1700	0,9997	0,0003	7
A.B.D (Beyaz Irk)	94	0,9890	0,0110	7
İran (Türkoman)	63	0,992	0,008	8
İran (Bandari)	114	0,995	0,004	8
Rusya	480	1.000	-	9

Materyal ve Metod

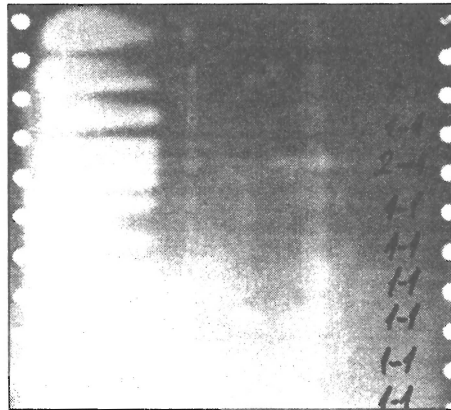
Araştırma için gerekli kan örnekleri, Türkiye'nin farklı yörelerinden gelmiş ve birbiriyle akrabalık ilişkisi bulunmayan 250 bireyden alındı. Yaş ortalaması 34 olan grupta cinsiyet ayrımı gözetilmedi. Sodyum sitratlı tüplere alınan 1.6 ml. kan örnekleri 3000 rpm'da 10 dak. santrifüj edildikten sonra 150 ml saponin eklenerek vortekslendi. Bu şekilde hemolize edilen kanlar -20°C 'de dondurularak saklandı. Uygulama sırasında 37°C 'de şok ısıtma uygulandı. SOD A enzim fenotiplerinin belirlenmesi için tank ve membran tamponu olarak 0.014 M fosfat tamponu (pH 6.25) kullanıldı. Selüloz asetat elektroforez, oda sıcaklığında 300V, 2-3.5 mA, 45 dak.'da, örnekler tankın anodik tarafına, pozisyon #7'de olacak şekilde uygulandı. Enzimin aktivite göstereceği reaksiyon jeli; 10 ml 0.075 M Tris-HCl tamponu içinde Thiazolyl blue (MTT) (5 mg) ve Phenazine methosulfate (PMS) (5 mg) çözülerek, aynı tamponun 15 mililitresi ile kaynatılıp 50°C 'ye kadar soğutulmuş olan 250 mg Agar ile karıştırılarak petri kaplarına dö-küldü. Petriler ışıktan korunmak için alüminyum folyo ile sarıldı. Elektroforez tamamlandıktan sonra selüloz asetat membran ters olarak reaksiyon jelinin üzerine yerleştirildi ve floresan ışık altında fenotipler belirginleşinceye kadar bekletildi. Fenotipler saptandıktan sonra allel sıklıkları hesaplandı. Alel sıklıklarının saptanması için $P = 2D + H / 2N$, $q = 1 - p$ formülü (SOD A*1= p ve SOD A*2= q) kullanıldı. Formüldeki D, Homozigot alel sayısını, H, heterozigot alel sayısını ve N, denek sayısını göstermektedir (17). SOD1 enzim aktivitesinin tayini için eritrositler, 140 mM NaCl, 40 mM fosfat pH: 7.4 ile 1000g'de santrifüj edilerek 3 kez yıkandı. Çökelti 2.7 mM EDTA, pH: 7.0, b-merkaptetanol ile hemoliz edildi. Bu hemolizatlar SOD aktivitesini tespit etmek için kullanıldı. Aynı örneklerin Hb seviyeleri ölçüldü (21,22).

Sonuçlar

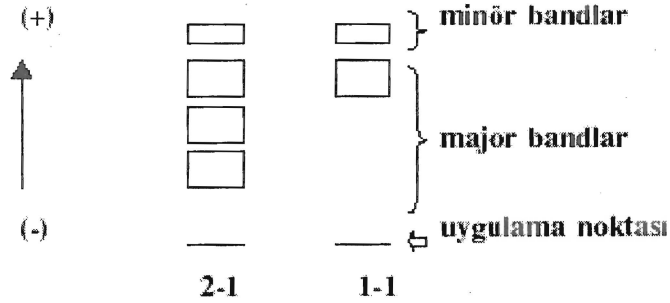
SOD A enzim fenotipleri Papiha ve Al-Agidi ile DeCroo ve ark. tarafından gösterilmiş olan örnekler referans alınarak değerlendirildi (5,7). Birbiriyle akrabalık ilişkisi olmayan 250 bireyden 249 tanesi SOD A 1-1 fenotipinin karakteristiği olan bir major bir minor band örneğine sahipti (Şekil 1). Bir birey ise SOD A 2-1 heterozigot fenotipinin karakteristiği olan üçlü band örneğini gösterdi (Şekil 2). Bu enzimin özellikle minör bantlarının fotoğraflanmasının güçlüğü nedeniyle saptadığımız fenotipler Şekil 3'de şematize edilerek de gösterildi. SOD A*1 alelinin sıklığı 0.998 ± 0.0019 ve SOD A*2 alelinin sıklığı 0.002 ± 0.0019 olarak hesaplandı. Taranan popülasyonda, kullanılan yöntem ile bilinen fenotipler dışında herhangi bir nadir fenotipe rastlanmadı. Gözlenen ve beklenen değerler Hardy-Weinberg dengesine uygunluk göstermekteydi ($c^2 = 0.001$, $p > 0.05$). Çok yüksek ve çok düşük SOD A enzim aktivitesine sahip olan 4 birey dışında değerlendirmeye alınan 246 bireye ait aktivite 1608.56 ± 677.94 U/g Hb olarak saptandı. Türk popülasyonunda SOD1 aktivitesinin dağılımı minimum 298.7958 iken maksimum değer 2706.553 olarak belirlendi (Şekil 4). 2-1 fenotipli bireyin aktivitesi ortalama değerler ile uyumlu idi.



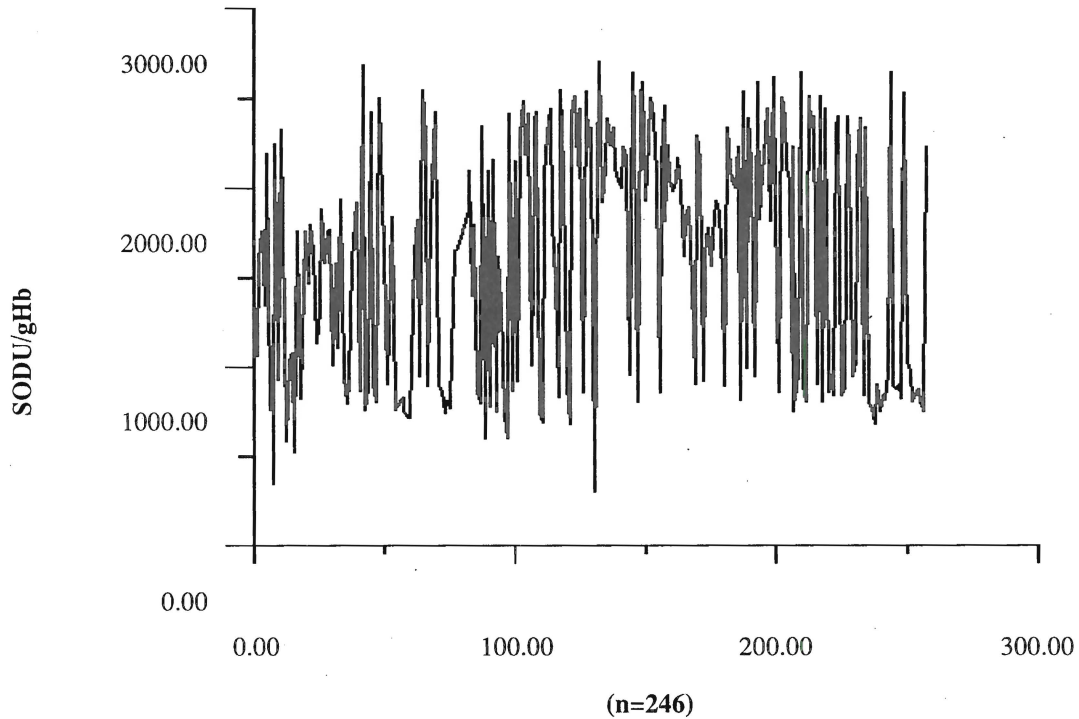
Şekil 1: SOD A enziminin yaygın olarak görülen 1-1 fenotipi



Şekil 2: SOD A enziminin nadir görülen 2-1 fenotipi



Şekil 3: Selüloz asetat elektroforezde SOD A fenotiplerine ait şematize edilmiş band örnekleri



Şekil 4: SOD A enziminin aktivite dağılımı

Tartışma

SOD A 2-2 fenotipi oldukça nadirdir ve özellikle Kuzey Avrupa populasyonlarında görülmektedir (Tablo 1). Bunun nedeni ile ilgili birkaç hipotez öne sürülmüştür ve diğer bazı populasyonlarda nadir de olsa saptanması bu mekanizmalar ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Bunlar arasında, aslında Viking'lerde bulunduğu ve onlar aracılığı ile başka populasyonlara yayıldığı görüşü de vardır. Tek bir varyantın oluşu da (A^*2) tek bir atasal mutasyon fikrini desteklemektedir (7). Biz de araştırmamız sonucunda çok nadir olan bu fenotipin Türk populasyonunda da bulunduğunu heterozigot bir birey nedeniyle saptadık. Sınır komşularımız olan İran ve Irak'ta yapılan araştırmalarda bu nadir fenotipe rastlanırken, Hindistan, Afganistan, Bengladeş, Kaşmir Vadisi ve Rusya'da varyasyon gözlenmemiştir (5,8-12,14). B kan grubunun atasal olarak Asya kökenli olması ve göçler sonucunda Avrupa'ya yayılması gibi, enzimdeki bu varyasyonunda Kuzey Avrupalı bir atadan Asya'ya yayıldığı ve coğrafi konumu nedeni ile de Türkiye'de de bulunduğu düşüncesindeyiz. Ancak bu oran, B kan grubunda, doğudan batıya göçlerin daha yoğun olma-

sı nedeni ile yüksek bulunurken; SOD enziminde, batıdan doğuya göçlerin azlığı nedeniyle azdır. Genellikle babalık tayini ya da kriminal olaylarda doğru tanıya ulaşmak amacıyla da kullanılan enzim polimorfizmi için, SOD A enzimi, monomorfik oluşu ya da sadece bir varyantının olması nedeni ile tercih edilen bir enzim değildir. Ancak Brezilya'da yapılan bir babalık tayininde 4180 kişi içinde sadece çocuğun ve baba adayının SOD A 2-2 fenotipine sahip olması, babalığın yüksek olasılıkla düşünülmesine yol açmıştır (16).

Günümüzde adli olayların aydınlatılmasında geleneksel olarak kullanılan yöntem olan, kan ve vücut sıvılarından kan grubu tayini, polimorfik enzim sistemleri ve hücrel antikorlardan yararlanma yerini, sonuçların %100'lük oranlarla kesin verilebildiği DNA parmakizi (DNA fingerprint) incelemesine bırakmıştır. Polimorfik enzim sistemleri fizikokimyasal koşullardan büyük ölçüde etkilendiğinden, aşırı nem, yüksek sıcaklık gibi doğal olmayan koşullarda kalan kan örnekleriyle ya da kurumuş kan lekeleriyle çalışmak çok sakıncalıdır ve mümkün olduğunca taze kan örnekleriyle çalışılması önerilir. Paternite tayinleri yapılırken taze kan elde etmek mümkün iken kriminal olaylarda böyle bir olanak genellikle yoktur. Polimorfik protein sistemleri ya da hücrel antikorların gösterdiği polimorfizme benzer şekilde, DNA polimorfizmlerinin kullanılmasıyla kurumuş kana kişilik kazandırılmaktadır. Bunlar arasından, DNA polimorfizminin en büyük avantajı kişiye özgü olması ve yapılan kişileştirmenin %100 doğrulukta olmasıdır (23).

SOD A enzim aktivitesinin ailesel ALS'lu hastalarda azalıp, sporadik ALS'lu hastalarda değişmediği ve ailesel olgularda bu azalmanın klinik bulguların ortaya çıkmasından yıllar önce saptanabileceğini gösteren araştırmalar vardır. Bu yönde ülkemizde de yapılacak araştırmalar için SOD A fenotiplerinin ve Türkiye ortalaması olarak bulduğumuz SOD A enzim aktivitesinin de bir kontrol grubu oluşturacağı inancındayız.

Teşekkür: Bu araştırma Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: T-85).

Kaynaklar

1. Kılıç K. Kanserde oksijen radikalleri ve süperoksit dismutaz. *Biyokimya Derg*, 1986; Cilt XI, 3: 59-76.
2. Kılıç K. Oksijen radikalleri: üretilmeleri fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Derg*, 1985; Cilt X, 2: 59-89.
3. Huret JL, Delabar JM, Marhens F, Aurias A, Nicole A, Berthier M, Tanzer J, Sinet PM. Down syndrome with duplication of a region of chromosome 21 containing the CuZn superoxide dismutase gene without detectable karyotypic abnormality. *Hum Genet*, 1987; 75: 251-257.
4. Church SL, Grant JW, Meese EU, Trent JM. Sublocalisation of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridisation and somatic cell hybrid mapping. *Genomics*, 1992; 14: 823-825.
5. Paphia SS, Al-Agidi SK. Esterase D and superoxide dismutase polymorphisms in Iraq. *Hum Hered*, 1976; 26: 394-400.
6. McKusick VA. *Mendelian Inheritance in Man*, 10th ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 1992: 611-613.
7. DeCroo S, Kamboh MI, Leppert M, Ferrell RE. Isoelectric focusing of superoxide dismutase: report of the unique SOD A*2 allele in a US white population. *Hum Hered*, 1988; 38: 1-7.
8. Akbari MT, Papiha SS, Roberts DF, Farhud DD. Serogenetic investigations of two populations of Iran. *Hum Hered*, 1984; 34: 371-377.
9. Nazarova AF. The genetic structure of populations of Chukotka Peninsula Eskimos and Chukchi based on the study of 13 loci of serum and erythrocyte proteins and enzymes. *Am J Phys Anthropol*, 1989; 79: 81-88.
10. Chahal SMS, Sidhu BK, Mahajan A. Biochemical variation in the Sunni Muslims of Pulwama district Jammu and Kashmir. *Hum Hered*, 1989; 39: 113-115.
11. Saha N. Blood genetic markers in Bengali Muslims of Bangladesh. *Hum Hered*, 1987; 37: 86-93.
12. Saha N, Goswami HK. Some blood genetic markers in the Korkus of Central India. *Hum Hered*, 1987; 37: 273-277.
13. Bayoumi RA, Saha N. Some blood genetic markers of the Nuba and Hawazma tribes of Western Sudan. *Am J Phys Anthropol*, 1987; 73: 379-388.
14. Papiha SS, Roberts DF. Genetic polymorphisms in Afghanistan. *Ann Hum Bio*, 1977; 4(3): 233-241.
15. Beretta M, Mazzetti P, Frosina G, Schiliro G, Russo A, Russo G, Barrai I. Population structure of Eastern Sicily. *Hum Hered*, 1986; 36: 379-387.
16. Weimer TA, Reiger TT, Salzano FM. Occurrence of a rare variant of superoxide dismutase in Brazil. *Hum Hered*, 1987; 37(1): 26-29.
17. Andersen PM, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keranen ML, Tarvainen I, Haltia T, Nilsson L, Binzer M, Forsgren L, Marklund SL. Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995 May;10(1):61-6.
18. Said Ahmed M, Hung WY, Zu JS, Hockberger P, Siddique T: Increased reactive oxygen species in familial amyotrophic lateral sclerosis with mutations in SOD1. *J Neurol Sci*, 2000;176(2):88-94.
19. Hirano M, Fujii J, Nagai Y, Sonobe M, Okamoto K, Araki H, Taniguchi N, Ueno S.: A new variant Cu/Zn superoxide dismutase (Val7-->Glu) deduced from lymphocyte mRNA sequences from Japanese patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994; 204(2): 572-7 (Abstract).
20. Robberecht W, Sapp P, Viaene MK, Rosen D, McKenna-Yasek D, Haines J, Horvitz R, Theys P, Brown R Jr: Cu/Zn superoxide dismutase activity in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 1994; 62(1): 384-387.
21. Podozasy JJ, Wei R. Reduction of Iodonitrotetrazolium Violet by Superoxide Radicals. *Biochem Biophys Res Comm*, 1988; 150: 1294-1301.

Perçin FE, SİLİĞ Y, Göze İ, Çolak A, Atalay A

22. Norbert W, Tietz NW. Measurement of Hemoglobin Concentration in Whole Blood and Plasma. Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. (Tietz N.W. edit) Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986: 1533-1536.
23. Atasoy S. Adli olayların aydınlatılmasında DNA parmakizi'nden yararlanılması.Adli Tıp Derg, 1989; 5: 215-219.

İletişim Adresi: Doç.Dr.E. Ferda PERÇİN
Cumhuriyet Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D
58140- SİVAS
Tel: 0 346 2191010 / 1069
Fax: 0 346 2191155
E-mail: ferdaep@yahoo.com