

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**PARKİNSON HASTALIĞI TANISI ALAN HASTALARDA
PARKİNSON HASTALIĞINDAN SORUMLU OLDUĞU
BİLDİRİLEN SNCA VE LRRK2 GENLERİNDEKİ A30P VE
G2019S MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. Hüseyin ASLAN

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

ESKİŞEHİR

2010

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**PARKİNSON HASTALIĞI TANISI ALAN HASTALARDA
PARKİNSON HASTALIĞINDAN SORUMLU OLDUĞU
BİLDİRİLEN SNCA VE LRRK2 GENLERİNDEKİ A30P VE
G2019S MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. Hüseyin ASLAN

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŐMANI
Doç. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU**

**ESKİŞEHİR
2010**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Hüseyin ASLAN'a ait "Parkinson Hastalığı tanısı alan hastalarda Parkinson Hastalığından sorumlu olduğu bildirilen SNCA ve LRRK2 genlerindeki A30P ve G2019S mutasyonlarının araştırılması" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 25.11.2010

Jüri Başkanı

Prof.Dr. Sevilhan ARTAN

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı



Üye

Doç.Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı



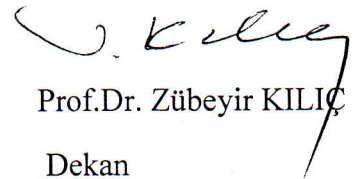
Üye

Doç.Dr. Serhat ÖZKAN

Nöroloji Anabilim Dalı



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun 02.12.2010 Tarih ve 44/01 Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.


Prof.Dr. Zübeyir KILIÇ
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın hocalarım Prof.Dr. Sevilhan ARTAN'a, Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU'na, Yrd. Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR'e, Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS'a, Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR'e; ayrıca tezimde bana yardımcı olan Nöroloji Anabilim Dalından Doç.Dr. Serhat ÖZKAN'a yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

ÖZET

Aslan, H. Parkinson hastalığı tanısı alan hastalarda Parkinson hastalığından sorumlu olduğu bildirilen SNCA ve LRRK2 genlerindeki A30P ve G2019S mutasyonlarının araştırılması. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir,2010. Parkinson Hastalığı, Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Son yıllarda genetik formlarının ve patojenik mutasyonların tanımlanması ile Parkinson Hastalığının etiyopatogenezine ilişkin bilgiler artmıştır. Parkinson hastalığında tanımlanan ilk gen SNCA genidir ve ilk nokta mutasyonlar da bu gende tanımlanmıştır. LRRK2 geni G2019S mutasyonu da Parkinson Hastalığında en sık gözlenen nokta mutasyondur. Çalışmamıza sporadik Parkinson Hastalığı tanısı almış 83 olgu dahil edilmiştir. Parkinson Hastalığından sorumlu olduğu bilinen SNCA genindeki A30P ve LRRK2 genindeki G2019S mutasyonlarının Eskişehir bölgesinde tanı alan olgulardaki sıklığının belirlenmesi, tanısal amaçlı kullanılabilirliği ve ayrıca elde edilen veriler ile moleküler etiyolojisi belirlenmiş olan olgulara hastalığı ve mutasyonu ile ilgili genetik danışmanın verilmesi amaçlanmıştır. Sekans analizi ile A30P mutasyonunun bulunduğu SNCA geni ekzon 2 ve G2019S mutasyonunun bulunduğu LRRK2 geni ekzon 41 genomik bölgeleri incelenmiş ve hastalarda herhangi bir nokta mutasyon ya da polimorfizm saptanmamıştır. Çalışmamızda Eskişehir bölgesinde sporadik Parkinson Hastalığı tanısı alan olgularda A30P ve G2019S mutasyonlarının sık görülmediği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Parkinson Hastalığı, SNCA, LRRK2, A30P, G2019S

ABSTRACT

Aslan, H. Investigation of A30P and G2019S mutations in the SNCA and LRRK2 genes in the patients with Parkinson's disease. Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Medical Genetics, Eskişehir,2010. Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer disease. Recently understanding genetic forms and pathogenic mutations has been providing growing knowledges about etiopathogenesis of Parkinson's disease. SNCA was the first gene with mutations causing Parkinson's disease. LRRK' gene G2019S mutation is the most common mutation causing Parkinson's disease. In our study we investigate 83 patients with sporadic Parkinson's disease. Aims of our study are to identify the frequency of the SNCA A30P and LRRK2 G2019S mutations in Parkinson's disease patients from the Eskişehir region of Turkey, diagnostic utility of these mutations and to confer genetic counselling to the mutation carrier patients. SNCA exon 2 and LRRK2 exon 41 was investigated with direct sequencing method. Neither any point mutation or polymorphism was detected in the SNCA exon 2 or LRRK2 exon 41 from the patients. Our findings suggest that the SNCA A30P and LRRK2 G2019S mutations are not frequent in Turkish patients with Parkinson's disease.

Key Words: Parkinson's disease, SNCA, LRRK2, A30P, G2019S

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Parkinson Hastalığının Tarihçesi	3
2.2. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi	3
2.3. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri	4
2.3.1. Tremor	5
2.3.2. Rijidite	5
2.3.3. Bradikinezi	5
2.3.4. Postural İnstabilite	6
2.4. Parkinson Hastalığının Patogenezi	6
2.4.1. Anormal Protein Akümülyasyonu	8
2.4.2. Oksidatif Stres	9

	Sayfa
2.4.3. Mitokondriyal Disfonksiyon	10
2.4.4. Übikütün Proteozom Protein Degradasyon Sistemi	11
2.5. Parkinson Hastalığının Genetiği	12
2.5.1. PARK1 (α -sinüklein, SNCA)	13
2.5.2. PARK4 (SNCA)	15
2.5.3. PARK2 (Parkin)	16
2.5.4. PARK3	17
2.5.5. PARK5 (UCHL-1)	18
2.5.6. PARK6 (PINK1)	18
2.5.7. PARK7 (DJ-1)	18
2.5.8. PARK8 (Dardarin, LRRK2)	19
2.5.9. PARK9 (ATP13A2)	22
2.5.10. PH ile İlişkili Diğer Genler	22
2.6. DNA Dizileme Yöntemi	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Hasta Grubu	26
3.2. Gereçler	26
3.2.1. Kullanılan Aletler	26
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	27
3.3. Yöntemler	28

	Sayfa
3.3.1. Qiagen® Ekstraksiyon Kiti ile Periferik Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi	28
3.3.2. PARK1 Ekzon 2'nin PCR ile Amplifikasyonu	29
3.3.3. PARK8 Ekzon 41'in PCR ile Amplifikasyonu	30
3.3.4. PCR Ürünlerinin Pürifiye Edilmesi	31
3.3.5. PCR Ürünlerinin Dizi Analizi İçin Hazırlanması Amacıyla Döngü Dizileme	32
3.3.6. Döngü Dizileme Ürünlerinin Pürifiye Edilmesi	32
3.3.7. Ürünleri Dizi Analizi İçin Cihaza Yüklenmesi	33
3.3.8. Sonuçların Analizi	33
4. BULGULAR	34
4.1. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik Özellikleri	34
4.2. SNCA Geni Ekzon 2 Genomik Dizisinin İncelenmesi	35
4.3. LRRK2 Geni Ekzon 41 Genomik Dizisinin İncelenmesi	37
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin Trifosfat
BG	Bazal Gangliyon
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Baz çifti
DA	Dopamin
ddNTP	Dideoksiribonükleik asit trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleik asit trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
Hz	Hertz
kb	Kilobaz
LRRK2	Leucine-Rich Repeat Kinase 2 geni
MAO-B	Monoamin Oksidaz B enzimi
MAPKKK	Mitojenaktif Protein Kinaz Kinaz Kinaz
Mb	Megabaz
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrojenmonooksit sentaz enzimi
OD	Otozomal Dominant
ODPH	Otozomal Dominant Parkinson Hastalığı
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OR	Otozomal Resesif

ORPH	Otozomal Resesif Parkinson Hastalığı
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PH	Parkinson Hastalığı
RFLP	Restruction Fragment Lenght Polymorphism
SNCA	Sinüklein alfa geni
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SNPc	Substantiya nigra pars kompakta
SOD	Süperoksit dismutaz enzimi
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
UPDRSIII	Unified Parkinson's Disease Rating Scale-III
ÜPPDS	Übikütib Proteozom Protein Degredasyon Sistemi
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Parkinson Hastalığından sorumlu tutulan genlerin oluşturdukları patolojiler ve birbirleriyle şematik ilişkisi	8
2.2. Kalıtsal PH'nın sıklığı	14
2.3. LRRK2 geninde tanımlanmış mutasyonlar ve bu mutasyonların protein üzerinde etki ettiği fonksiyonel bölgeler	21
4.1. SNCA ekzon 2 genomik dizilerin PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü	36
4.2. 4886 protokol numaralı olgunun SNCA ekzon 2 genomik bölgesinin bir kısmına ait yabancı tip sekans analizi görüntüsü	37
4.3. 5574 protokol numaralı olgunun SNCA ekzon 2 genomik bölgesinin bir kısmına ait yabancı tip sekans analizi görüntüsü	38
4.4. LRRK2 ekzon 41 ve SNCA ekzon 2 genomik dizilerin PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü	39
4.5. 4834 protokol numaralı olgunun LRRK2 ekzon 41 genomik bölgesinin bir kısmına ait yabancı tip sekans analizi görüntüsü	40
4.6. 5371 protokol numaralı olgunun LRRK2 ekzon 41 genomik bölgesinin bir kısmına ait yabancı tip sekans analizi görüntüsü	40

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. Parkinson Hastalığından sorumlu tutulan genler ve özellikleri	24
4.1. Hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı	35
4.2. Olguların hastalık başlangıç yaşına göre dağılımı	36
5.1. G2019S mutasyonunun farklı toplumlardaki sıklığı	45

1. GİRİŞ

Alzheimer Hastalığından sonra en sık gözlenen nörodejeneratif hastalık olan Parkinson Hastalığı (PH) primer olarak nigrostriatal dopaminerjik yetersizlik sonucu ortaya çıkan rijidite, tremor, bradikinezi ve postural instabilite ile karakterize idiyopatik, progresif bir hastalıktır (1). Bu major bulgulara ek olarak birçok motor, kognitif, duyuşal ve otonomik bulgular da eşlik etmektedir. PH'nın diğerk Parkinson sendromlarından ayrılması her zaman kolay değıldir ve ayırıcı tanıda zorluklarla da karşılaşılabilmektedir (2). Parkinsonizmin en sık görülen formu ilk kez 1817'de James Parkinson tarafından tanımlanan ve nörodejeneratif bir hastalık olan idiyopatik PH'dır (3).

En sık görülen hareket bozukluğı olan PH'dan sorumlu bölge, motor kontrolde bazal ganglion (BG) sistemine dahil olarak kabul edilen substantiya nigra pars kompaktadır (SNPc). BG, hareketin kavşak bölümü olarak belirtilebilir. Dolayısıyla bu bölgede meydana gelen harabiyet hareket bozukluklarına neden olmaktadır. İnsanlarda SNPc'de yaklaşık 450.000 dopaminerjik nöron bulunmaktadır. PH'da Lewy cisimciğı oluşumu, akson içindeki nöroflamentlerin fonksiyonu bozmakta ve dopaminerjik işleve sahip SNPc'den striatuma uzanan aksonal bağlantıya hasar vermektedir. Kısaca hastalığın tüm klinik bulguları bu düzenin bozulması sonucu oluşur (4,5).

PH'ya hayat boyu yakalanma riski kadınlarda %1,3 iken erkeklerde %2 olarak bildirilmektedir (6). Hastalığın prevalansı yaşlara göre incelendiğinde, 65 yaşta tüm popülasyonun yaklaşık %1'inin etkilendiğı, bu oranın 85 yaşta ise yaklaşık %4-5'e yükseldiğı gözlenmektedir (7). Klinik olarak tanımlanmasından bu yana neredeyse iki yüzyıl kadar zaman geçmiş olmasına rağmen PH'nın etiyojisi halen net olarak aydınlatılabilmiş değıldir. Günümüze kadar PH ile ilgili elde edilen veriler, hastalığın oluşmasında tek bir nedenin değıl multifaktöriyel bir etiyojiiyi işaret etmektedir. Belli çevresel faktörlere karşı genetik yatkınlığı olan bireylerde, maruz kalınan çevresel faktörlerin kliniğı ortaya çıkardığı düşünülebilir. Yaşla birlikte hastalığın prevalansındaki artış etiyojide sadece genetik ve çevresel faktörlerin değıl aynı zamanda beyin yaşlanmasının da etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte bazı olgularda genetik faktörlerin tek başına

hastalığın etiyolojisinde etkili olduğu da gösterilmiştir (8,9). Günümüzde OMIM veri bankasında ve literatürde PH ile ilişkili 10'dan fazla genetik lokus bildirilmiş ve bunlardan altı tanesi hastalıktan kesin olarak sorumlu tutulmuştur.

PH'nın kesin tanısı ölüm sonrasında beyin biyopsi örneklerinde Lewy cisimciğinin bulunmasıyla konulmaktadır. Klinik olarak hastalığın tanısı için Hoehn-Yahr Ölçeği ve Birleşik Parkinson Hastalığı Değerlendirme Ölçeği III (*Unified Parkinson's Disease Rating Scale-III* (UPDRSIII)), Londra Beyin Bankası Tanı Kriterleri gibi tanı sorgulamaları kullanılmaktadır (10). Teşhis koyabilmeyi kesinleştiren net moleküler tanı yöntemi yoktur (11). PH'nın moleküler etiyolojisinden sorumlu tutulan dört farklı mekanizma öne sürülmüştür. Bunlar mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, protein agregasyonu ve übikülin proteozom protein degradasyon sistemi (ÜPPDS) disfonksiyonudur. PH'nın etiyolojisinde sorumlu tutulan genlerin nöron hasarına sebep olan bu patolojik mekanizmalar üzerinden hastalığa yol açtığı belirtilmiştir. PH'dan sorumlu olan SNCA geni hem protein agregasyonu hem de mitokondriyal disfonksiyon, LRRK2 geni de übikülin sistem disfonksiyonu üzerinden nöron hasarına ve PH'ya neden olmaktadır (12).

Çalışmamızda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Hareket Bozukluğu Polikliniğine başvuran Londra Beyin Bankası tanı kriterlerine göre PH tanısı alan 83 olgunun periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. SNCA geninde A30P mutasyonu, LRRK2 genindeki G2019S mutasyonunun bulunduğu genomik bölgeler, spesifik olarak tasarlanan primerler yardımıyla klasik PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonrası döngü dizileme reaksiyonları yapılan örneklerin otomatik kapiller jel elektroforez cihazı ile sekans analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen genomik diziler NCBI gen bankası ile karşılaştırılmıştır.

PH'dan sorumlu olduğu bilinen SNCA genindeki A30P ve LRRK2 genindeki G2019S mutasyonlarının Eskişehir bölgesinde tanı alan olgulardaki sıklığının belirlenmesi, tanısal amaçlı kullanılabilirliği ve ayrıca elde edilen veriler ile moleküler etiyolojisi belirlenmiş olan olgulara hastalığı ve mutasyonu ile ilgili genetik danışmanın verilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığının Tarihçesi

Antik Hint literatüründe Ayurvedik tıpta (İ.Ö. 4500–1000) tremor ve akineziyi tanımlayan kampavata terimiyle belirtilen PH, ilk olarak 1817 yılında İngiliz hekim James Parkinson tarafından ‘*shaking palsy* (titrek felç)’ adıyla tanımlamıştır. Dr. James Parkinson hastalarda gözlemlediği; istirahat tremoru, hafif kambur postür, ayaklarını sürüyerek yürüme, arkaya düşme eğilimi gösterme belirtilerini ‘*An Essay on the Shaking Palsy*’ isimli makalede rapor etmiştir. Ancak orijinal hastalığın tanımını ise rijidite, mikrografi ve duysal değişiklikleri de ekleyen Fransız hekim Jean Marie Charcot yapmıştır ve hastalığa onu ilk tarif eden kişinin adını vermiştir (3,13).

2.2. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi

PH, Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Özellikle son yıllarda genetik formlarının ve patojenik mutasyonların tanımlanması ile PH’nın etiopatogenezine ilişkin bilgiler artmıştır. Epidemiyolojik çalışmalar ise sadece hastalığın sıklığını belirlemek ile kalmamış aynı zamanda analitik yöntemlerin yardımıyla belli risk faktörlerini de belirleyebilmiştir. PH için tanısal testin olmaması, kesin tanı için postmortem incelemenin gerekmesi, ileri yaş hastalığı olması ve uzun bir preklinik dönem varlığı hastalığın epidemiyolojisinde bazı pratik zorluklar oluşturmaktadır (14).

PH, dünyanın her yerinde, tüm ırklarda ve her türlü sosyoekonomik koşulda ve meslekte görülen, hafifçe erkek predominansına sahip bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda aynı yaştaki erkelerde 1,2–1,5 kat daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (15). Hastalık tipik olarak orta ve ileri yaşın hastalığı olup, ortalama 50–60 yaşlarında başlar ve yaklaşık 10–20 yıllık bir süreçte progresif olarak ilerler (16). Hastaların %5-10’unda semptomlar 40 yaşından önce başlamakta ve erken başlangıçlı Parkinson hastalığı olarak tanımlanmaktadır. 20 yaşından önce başlayan olgularda ise juvenil Parkinson hastalığı adını alır (17).

Hastalığın prevalansı 65–90 yaşları arasında artmaktadır. Tüm popülasyonun %0,3’ünü etkilemekle beraber, 65 yaşında görülme sıklığı %1’e, 85 yaşında görülme

sıklığı %4-5'e çıkar (17). ABD'de 2007 yılında yayınlanan Ulusal Yaşam İstatistik Raporuna göre mortalite sebepleri arasında 14. sırada yer almaktadır (18). Hastalığın prevalans değerleri değişkenlik göstermekle birlikte yapılan çalışmalarda 80,6–187/100.000 olarak bildirilmiştir (19). Eskişehir'de yapılan bir çalışmada ise prevalans değeri 111/100.000 olarak bulunmuştur (20). Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilse de genel olarak PH'nın yıllık insidansının 4,5–21/100.000 arasında değiştiği bilinmektedir (16,21).

PH genel olarak siyah ırkta ve sarı ırkta daha az gözlenirken en sık beyaz ırkta görülmektedir. Coğrafik farklılıklar, çevresel nedenler (kuyu suyu, endüstriyel kimyasallar, herbisit ve pestisitler, ağır metaller) ve kırsal kesimde yaşamının da PH ile pozitif yönde ilişkili olduğunu bildiren yayınlar bulunmaktadır (22). Diyetin hastalık etiopatogenezindeki yerini belirlemek amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Bunların çoğu yetersiz antioksidan alımı üzerine kuruludur. Bu çalışmaların sonuçları birbirinden farklı olmakla beraber, Hollanda'da yapılan bir çalışmada Parkinson hastalarında, kontrollerle karşılaştırıldığında E vitamini alımının daha düşük olduğu saptanmıştır (23). Bununla birlikte birçok prevalans çalışmasında kafein ve sigara tüketimiyle PH gelişmesi ters orantılı olarak ilişkilendirilmiştir. Deneysel modellerde de sigara içmenin PH'dan koruyucu etkisini gösteren bulgular elde edilmiştir. Kafeinin adenosin reseptör antagonisti gibi, tütünün ise MAO-B enziminin düzeyini azaltarak etki ettiği sanılmaktadır (14).

Özetlemek gerekirse demografik olarak erkek cinsiyet, kafa travması, duygusal stres, ileri yaş, beyaz ırk, ailede PH öyküsünün olması, kişisel özellik (utangaçlık, riskten kaçınma); çevresel olarak ise pestisitler, karbon monoksit, kuyu suyu, kırsal kesimde yaşam, endüstriyel ajanlar, metaller (mangan, civa, demir) PH için risk faktörlerini oluşturur (14, 24).

2.3. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri

PH, SNPC'deki dopaminerjik nöronlarda kayıp ile seyreden nörodejeneratif bir hastalıktır. Temel olarak hareket bozukluğu hastalığı olmasına rağmen sıklıkla psikotik, affektif ve kognitif bozuklukların da eşlik etmesi sebebiyle nöropsikiyatrik bir hastalık olarak da kabul edilmektedir. Patolojik olarak substantiya nigradaki pigmentli nöronlarda kayıp ve bazen buna eşlik eden Lewy cisimciği ile

karakterizedir. PH'nın istirahat tremoru, rijidite, bradikinezi ve postural reflekslerde bozulmayla karakterize dört ana bulgusu vardır. Belirtiler sinsi ve asimetrik olarak başlayıp yavaş yavaş ilerler. Zamanla hastalık vücudun diğer yarısına da geçer. Her hastada semptom ve bulgu kombinasyonları farklıdır (25,26).

2.3.1. Tremor

İstirahat tremoru, PH'nın en iyi tanımlanan ve en spesifik bulgusudur. Çoğu hastada en sık başvuru nedenidir. Olguların %50-75'inde ilk motor semptom olarak tremor ortaya çıkar (26). Genellikle üst ekstremitelerden birinde başlar ve zaman içinde aynı taraf alt ekstremiteye ve daha sonra karşı vücut yarısına yayılır. PH'da klasik 4-6 Hz istirahat tremoru yanında olguların %40-60'ında daha hızlı frekanslı (5-8 Hz) postural-kinetik tremor tabloya eşlik eder (27). Tremor stres ile, mental aktivite sırasında (örneğin aritmetik bir işlem yaparken), yürürken, diğer ekstremitenin motor hareketi sırasında artar. O ekstremitenin harekete başlamasıyla ve uyku sırasında kaybolur (28).

2.3.2. Rijidite

Agonist ve antagonist kasların aynı anda çalışması sonucu gelişen tonus artışıdır. Tremor ile birlikte PH'nın pozitif belirtilerini oluştururlar. El bileğini hareket ettiren kaslarda rijidite varsa dişli çark belirtisi alınır. PH olgularının %89-99'unda görülür. Rijiditenin derecesi değişkendir ve genellikle tremor gibi unilaterale başlar ve daha sonra karşı tarafa yayılabilir (28). Hafif olgularda rijiditeyi ortaya çıkarmak ancak karşı ekstremiteye tekrarlayıcı hareketler yaptırmakla mümkün olabilir. Hastalar rijiditeyi ekstremitelerde, boyunda ve bazen sırt kaslarında sertlik veya kasılma şeklinde tanımlayabilirler (29).

2.3.3. Bradikinezi

Hareketlerde yavaşlama anlamına gelen bradikinezi, PH'nın özürüllük yaratan en temel belirtisidir. 'Londra Beyin Bankası Tanı Kriterleri'ne göre PH tanısı için bradikinezi varlığı şarttır (30). Bradikinezinin sebebi globus pallidustaki inhibitör dopaminerjik uyarıların azalması sonucu talamusun ventrolateral nükleusundaki nöronların inhibisyonunda artış ve motor korteksteki nöronların

stimulusundaki kayıptır (27). Bradikinezi sıklıkla hareketin başlatılmasında gecikme, hareketin amplitüdünün küçülmesi, bir hareketten diğerine geçememe, aynı anda iki hareketi yapamama, hareket fakirliği (hipokinezi) ve hareket edememe (akinezi) anlamında da kullanılır. Bradikinezi de diğer Parkinson bulguları gibi hastanın emosyonel durumu ile ilişkilidir. Bu durumun en önemli görüntüsü paradoksal hiperkinezi (paradoksal kinezi) fenomenidir (29).

2.3.4. Postural İnstabilite

Postural instabilite, ayakta veya otururken normalde otomatik olarak devreye giren, alınan vücut pozisyonunun devamını sağlayan postural reflekslerin kaybı sonucu gelişen denge bozukluğudur. Sıklıkla hastalığın geç evrelerinde ortaya çıkar. PH'nın en az spesifik ancak en fazla özüllülük yaratan kardinal bulgusudur. PH'daki düşmelerin en sık nedenlerinden birisidir. Olguların gövdeleri genellikle öne doğru eğik, çeneleri göğüslerine değmek üzeredir. Dirsekler ve dizler yarı fleksiyon durumundadır. Postural instabilitesi olan olgularda, özellikle gövdede fleksiyon postürü varlığında, 'festination' şeklinde giderek hızlanan bir yürüyüş ortaya çıkar. Bu arada hasta adeta düşmemek için ağırlık merkezini yakalamaya çalışır şekilde yürür ve durmakta güçlük çeker (28). PH'da dopaminerjik tedaviye en dirençli bulgudur (31).

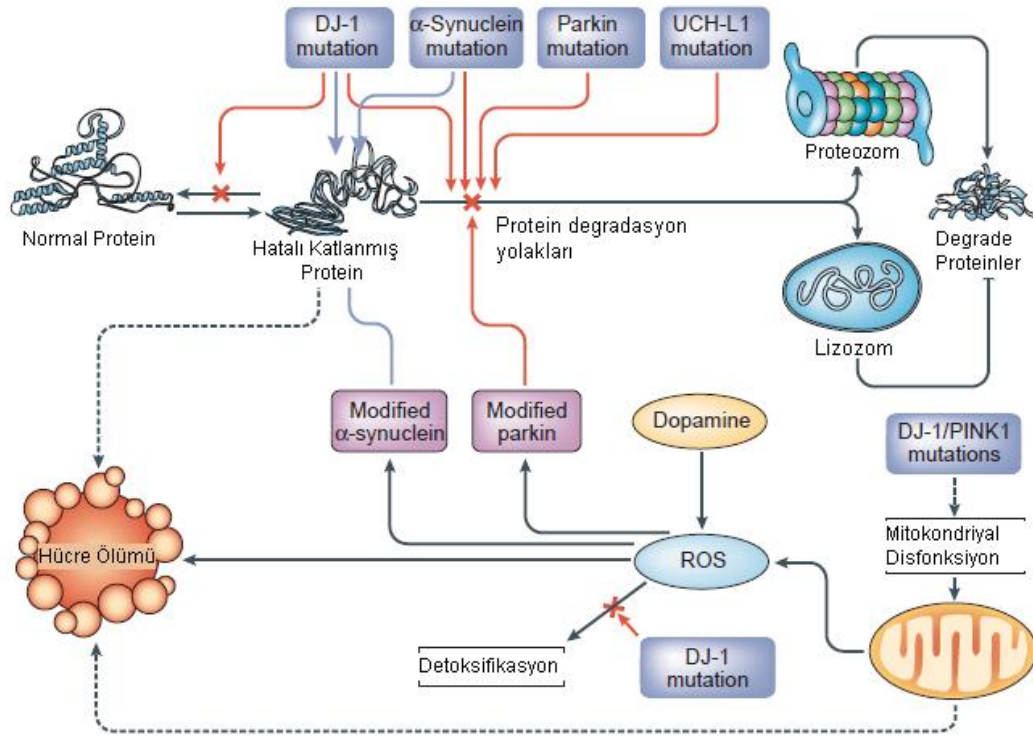
Bu dört kardinal bulgunun yanında Parkinson hastalarında; psikiyatrik bozukluklar (demans, bradifreni, vizyospasyal defisitler, depresyon, anksiyete, uyku bozukluğu, delüzyon, halüsinasyon gibi), otonomik bozukluklar (ortostatik hipotansiyon, konstipasyon, aşırı terleme, anormal termoregülasyon, üriner problemler gibi), duysal semptomlar (ağrı, paresteziler gibi), kraniofasial bozukluklar (maske yüz, göz kırpmının azalması, bulanık görme, olfaktör bozukluklar, disfazi, siyalore gibi), mikrografi ve kilo kaybı gözlenebilir (32).

2.4. Parkinson Hastalığının Patogenezi

Önceden de belirtildiği gibi PH, nörodejeneratif hastalıklar içerisinde Alzheimer hastalığından sonra ikinci sıklıkta yer almasıyla ve ayrıca yaşam süresinin artmasına paralel olarak sıklığının yükselmesiyle toplum sağlığı açısından giderek önem kazanmaktadır. Hastalığın yavaş fakat beklenen progresyonu, nöral ölüme yol

açan patogenetik mekanizmaların aydınlatılmasını gerekli kılar. Nispeten nadir olsa da yakın zamanda bulunan monogenik PH formlarına yol açan gen mutasyonları bu amaca doğrudan ulaşmaya imkan tanımıştır. Bu konuda sporadik PH beyinlerinden elde edilen biyokimyasal verilere dayalı önceki bildiklerimizi yeni bilgiler katarak da desteklemiştir. Buna göre, patolojik α -sinüklein agregasyonu ve protein yıkım yollarındaki bozukluklar, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon patogenetik mekanizmaların temelini oluşturur. Bu mekanizmalar ile birlikte daha az bilinen bozulmuş kinaz aktivitesi gibi mekanizmalar, büyük olasılıkla belli noktalarda kesişen intraselüler yolakları oluşturarak devreye giren nöroinflamatuvar süreçlerin de etkisi ile sonunda apoptozis ve muhtemelen otofaji ile gerçekleştirilen hücre ölümüne yol açmaktadır. Tüm bu bilgiler doğrultusunda beklentiler, gelecekte daha etkin moleküler temelli tedavi protokollerinin gelişmesidir (12).

Sinir sistemi oldukça kompleks biyokimyasal, fizyolojik ve anatomik özelliklere sahiptir. Sinir sisteminin en küçük birimleri olan nöronlar arası iletişim elektriksel veya kimyasal haberci moleküller tarafından sağlanmaktadır. Bu iletişimin düzenli bir şekilde sürdürülebilmesi için beyinde enerji ihtiyacının karşılanması gereklidir (33). Beyin bu enerji ihtiyacını yalnızca oksidatif metabolizmadan elde eder ve vücuttaki oksijenin büyük bölümünü kullanır. Enerji ihtiyacının karşılandığı oksidatif fosforilasyon esnasında mitokondrilerdeki elektron transport zincirinden yüksek enerjili elektronların kaçışı serbest radikallerin oluşumunu sağlar. Beyin dokusu, total vücut ağırlığının %2'sini oluşturmasına rağmen total vücut oksijeninin %20'sini kullanır. Bu durum beyin serbest radikallere oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte lipid peroksidasyon reaksiyonlarında serbest radikallerin başlıca substratları olan doymamış yağ asitleri beyin hücre zarlarında büyük oranda bulunmaktadır. Hemen hemen hiç katalaz enzimi içermemesi, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri ile glutatyon ve E vitamini düzeylerinin de sınırlı olması sebebiyle beyin dokusunun savunma mekanizması oldukça zayıftır, hasara uğramaya uygundur. Aynı zamanda bazı serbest radikallerin oluşmasını sağlayan metaller (örneğin demir) beyin spesifik bölgelerinde birikebilir. Aksonlar boyunca bu hasarın onarımı ancak sınırlı bir şekilde gerçekleştirilebilir. Böylelikle serbest radikal oluşumu çok daha yüksek iken onarım diğer dokulara göre daha azdır (34,35).



Şekil 2.1. Parkinson Hastalığından sorumlu tutulan genlerin oluşturdukları patolojiler ve birbirleriyle şematik ilişkisi. Vila ve ark. (55)'ndan alınmıştır.

2.4.1. Anormal Protein Akümüasyonu

Dopaminerjik (DA) nöronların myelinsiz veya zayıf myelinli aksonları striatumda masif terminal arborizasyon gösterir (bir akson yaklaşık 150.000 sinaptik bağlantı yapar). Bu anatomik yapı nedeniyle DA nöronlar, enerji deprivasyonundan ve hücre içi trafik bozukluklarından çok etkilenirler (36). Bu nedenle dejeneratif değişiklikler öncelikle presinaptik terminalleri etkiler, dolayısı ile patolojik bulgulardan önce muhtemelen klinik belirtilerin bir kısmından sorumlu olan fonksiyonel yetersizlik bulguları saptanır (37).

DA sentez edildikten sonra transportu ve metabolizmasının regülasyonunda görev alan proteinlerdeki bir işlev bozukluğu, normalde parçalanarak kataliz edilmesi gereken bu proteinlerin yolak içinde bazı noktalarda parçalanamaması ve agregatlar olarak birikmesine neden olur. 140 aminoasit uzunluğunda olan α -sinüklein proteininin, hem nöron hem glialarda önemli oranda ifade edilen, ağırlıklı olarak presinaptik yerleşimli, sinaptik veziküllerle ilişkili, dolayısı ile nörotransmitter

salınımı, geri alınımı ve hücre içi veziküler transportta görevli olduğu düşünülmektedir (38). α -sinüklein sentez kusuru veya yanlış katlanması birikimine, bu durum da hücre içi DA artışı sebebiyle oksidatif strese yol açar. Bu birikim zamanla hücre içi işlev bozukluğuna ve bir tür toksik etki sonucu hücrenin ölümüne sebep olur (39). Örneğin α -sinüklein proteinini kodlayan SNCA genindeki nokta mutasyonlar veya birikime neden olacak kadar fazla üretimi (overekspresyonu) hücrede toksik rol oynar (40). Şekil 2-1’de görüldüğü gibi SNCA, Parkin ve UCHL-1 genleri patogeneizde birlikte etkileşim halindedirler. Herhangi biri veya birkaçının birlikte etkileşimi sonucu anormal protein oluşumu ve nöronal hasar meydana gelir.

Ayrıca in vitro çalışmalar doğal olarak kıvrılmamış ve çözünür halde bulunan α -sinüklein monomerlerinin çeşitli ısı, pH değişiklikleri, ortamındaki ferrik demir gibi metaller, histon, tau, tübülün gibi molekülerin varlığında β -levhaları halinde agreve olabildiğini göstermektedir. Bu bulgular, gerek ailevi gerekse idiyopatik PH’da ve diğer sinükleinopatilerde farklı faktörler farklı ağırlıkta geçerli olsa da, α -sinüklein immüno-boyamasının gözlemlendiği her hücrede agregasyon sürecinin dejeneratif süreçle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (12,38,41).

2.4.2. Oksidatif Stres

Mitokondriler, endoplazmik retikulum ve çekirdek membranında yer alan serbest radikaller aracılığı ile oluşan oksidatif stres, PH’da nörodejenerasyon oluşumu ve ilerleme sürecinde önemli rol oynamaktadır. PH’da özellikle DA nöronları etkilediği düşünülen ve serbest radikal artışıyla ilişkilendirilen oksidatif stresin rolü; demir içeriği ve demir bağlayıcı proteinlerdeki değişimler, manganez-süperoksit dismutaz (Mn-SOD) seviyelerindeki artış, antioksidatif görevli redükte glutatyonun azalması ve oksidatif harabiyeti gösteren lipid peroksidasyon ürünleri, DNA harabiyeti, artmış protein oksidasyonu gibi delillere dayandırılmıştır (42,43).

Mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon ile moleküler oksijenin suya redüksiyonu sırasında reaktif oksijen ürünleri olarak tanımlanan süperoksit radikali, hidrojenperoksit, hidroksil radikali oluşur. Serbest radikal üretimi ile artmış kalsiyum akımı, nitrojenmonooksit sentaz (NOS) aktivasyonu, amiloidbeta-peptid ve enzimlerde yaşa bağlı fonksiyon kaybı gerçekleşir. Ancak mevcut veriler reaktif oksijen ürünlerinden daha çok reaktif nitrojen ürünlerinin patogenetik süreçlerde

daha belirleyici olduğunu düşündürmektedir. Muhtemelen glial kaynaklı nitrik oksit (NO) ve nöronda oluşan süperoksit etkileşimi ile ortaya çıkan peroksinitritin nitrozatif stresin ana kaynağı olduğu, α -sinüklein agregasyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir (42,43). Şekil 2-1’de görüldüğü üzere birer antioksidan olarak çalışan PINK1 ve DJ-1 genleri nöroprotektif rollerini kaybettiklerinde hücreyi oksidatif stresin etkilerine açık bırakarak nöron hasarına sebep olurlar.

2.4.3. Mitokondriyal Disfonksiyon

Mitokondriyal disfonksiyon oksidatif stresle bağlantılı olarak nöron ölümündeki olası mekanizmalar arasında üzerinde en fazla durulan ana kategori olagelmıştır. Bu konuda temel biyokimyasal bulgu hastaların bir kısmında platelet, kas ve substantiya nigra / frontal korteks mitokondrilerinde %25–35 oranında tespit edilen Kompleks-I eksikliği olmuş, sistemik özelliği genetik veya çevresel nedenlerle açıklanmaya çalışılmıştır (44).

Mitokondri, enerji akışının yönlendirildiği ve ATP’nin elde edildiği organel olarak tüm vücut hücrelerinde olduğu gibi nöronlarda da önemli bir yer tutmaktadır. Glukozun indirgenme yolunda enzimlerle katalizlenen ilk kimyasal yolak olan glikoliz, sitozolde gerçekleşir. Aerobik solunumda sonraki adım olan ATP sentezi ise mitokondrilerde oluşur (TCA siklusu / elektron transport zinciri). TCA siklusunda oluşan elektronlar $\text{NADH}+\text{H}^+$ ile FADH_2 ’de toplanır ve mitokondri iç zarında yer alan enzimler üzerinden elektrokimyasal gradiyent oluştururlar. Bu enzim sisteminde bulunan NADH dehidrogenaz (Kompleks-I) ve süksinat dehidrogenaz (Kompleks-II) elektron transport zincirinde başlangıç yolunu oluşturur. Elektronlar bu sisteme flavin mononükleotidler ve Kompleks-I ve II’nin demir sülfür merkezlerinde giriş yaparak ubikinona (Koenzim Q) taşınırlar. Koenzim Q’dan da Kompleks-III’e transfer olan elektronlar, bakır içeren ve enzim olan sitokrom c oksidaza (Kompleks-IV) geçerler. Son olarak da elektronlar oksijen molekülüne aktarılarak, ATP sentazdan (Kompleks-V) bir molekül ATP’nin sentezini gerçekleştirirler. Bir molekül glukozdan toplam 32 ATP enerji elde edilirken bunun iki ATP’si sitozolde glukozun piruvata oksidasyonu ile, geri kalan 30 ATP de mitokondri içerisinde ve iç mitokondri zarında proton konsantrasyon gradiyenti kullanılarak elde edilir (42,45,46).

Kompleks-I eksikliğine nedensel önem verilerek mitokondriyal DNA (mtDNA) tarafından kodlanan subünitlerin ifadesini etkileyebilecek polimorfizmler ve delesyonlar üzerinde yapılan çalışmalar, çelişkili sonuçlar gösterse de, bazı polimorfizmlerin hastalık riskini artırıcı veya azaltıcı yönde etkisi olabileceğini düşündürmüştür. Diğer taraftan, yaşlanma ile beraber mtDNA'da meydana gelen hasarlar, hastaların beyinlerinde daha sık görülmesi ve bunun genellikle sitokrom oksidaz aktivitesinde azalma ile birlikte olması, daha çok artmış serbest radikal harabiyeti ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bu veriler mitokondriyi halen PH için bilinen risk faktörleri arasında başta telaffuz edilen faktör olarak göstermektedir (47). Şekil 2-1'de görüldüğü gibi ilgili genlerinden herhangi birinde veya birkaçında oluşan genomik değişim, Kompleks-I işlevinin bozulmasına ve mitokondriyal disfonksiyona neden olur.

2.4.4. Übikütün Proteozom Protein Degradasyon Sistemi (ÜPPDS)

Protein yıkımı ökaryotik hücrelerde asidik ortamda yapılan lizozomal yol ve übikütün-proteozom yıkım yolu olmak üzere başlıca iki yol ile yapılır. Katlanmamış formda ve küçük olan proteinler proteozomlar tarafından yıkılabilirken, büyük proteinler ATP bağımlı bir süreçle übikütilenerek yıkıma uğrarlar. 76 aminoasitten oluşan übikütün polipeptidi parçalanması gereken proteini amino grubunu bağlayarak işaretler. İşaretlenmiş proteine başka übikütünler de eklenerek multiübikütün zinciri oluşturulup proteozom tarafından yıkılır. Hem übikütün bağlanması hem de proteozom işlevi için ATP'ye ihtiyaç vardır (48).

Übikütilenme işlemi birkaç adımda gerçekleşir. İlk olarak übikütün, übikütün aktifleştirici enzim (E1: aktivasyon) tarafından aktifleştirilir. Bu işlem için ATP gereklidir. Ardından übikütün konjuge edici enzime (E2: konjugasyon) aktarılır. Bazı durumlarda übikütün doğrudan E2'den hedef proteine aktarılırken bazen de übikütün ligaz (E3: ligasyon) olarak adlandırılan PARK2 (Parkin) ve PARK5 (UCHL-1) genleri tarafından ifade edilen üçüncü bir enzime aktarılarak hedef proteine iletilir. Bu hedef proteine başka proteinler de eklenir ve çok sayıda übikütün ihtiva eden bu protein, ATP varlığında proteozomlar tarafından yıkılır (49).

İmmünohistokimyasal çalışmalar ile SNCA ve übikütünün Lewy cisimciklerinin majör komponentleri olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple SNCA gen

mutasyonuna sahip hastalarda substantiya nigra'da Lewy cisimciği bulunur. İçeriğinde ise mutant α -sinüklein, küçük übikütilenmiş agregatlar, son dönemlerde bulunan mikrogliyal aktivasyonun kanıtı olan otofajik sellüler dejenerasyon artıklarının olduğu bildirilmiştir. Bu defektler lizozomal ve proteozomal sistemin birikmiş artıklarıdır. Atılmayan ve biriken bu sellüler çöpün toksik etkisi sonucu hücre ölümü gerçekleşir (50). Ancak, Parkin mutasyonlarının keşfi Parkin'in ÜPPDS'deki übikütilin-E3 ligaz işlevi nedeniyle PH patogenezinde yeni bir açılım sağladığı için önemlidir. Yukarıda bahsedildiği şekilde ÜPPDS tarafından yeterince veya uygun zamanda parçalanamayan özellikle yanlış katlanmış defektif proteinlerin hücreye stres oluşturduğu (endoplazmik retikulum stresi) düşünülmüş, hatta ilk olarak α -sinüklein Parkin substratı olmamasına rağmen onunla ilişkili sinfilin-1 gibi proteinler üzerinden PH'daki patolojik agregasyonla bağlantı kurulmuştur (51,52). SNCA proteini (PARK1-PARK4), übikütilin-E3 ligaz (UCHL-1), LRRK2 (PARK8, Dardarin) ve DJ-1 übikütilin-proteozomal yolda anormal protein birikiminden sorumlu genlerdir.

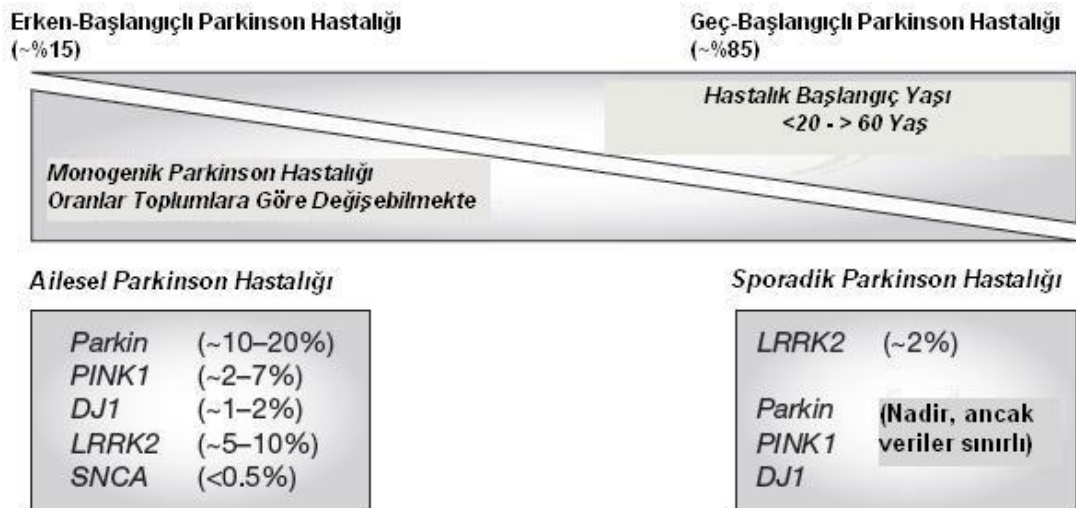
2.5. Parkinson Hastalığının Genetiği

Tanımlanmasından bu yana yaklaşık iki yüzyıl geçmiş olmasına rağmen PH'nın etiyojisi halen genlerin, çevrenin ve beyin yaşlanmasının oluşturduğu kompleks bir bulmacaya benzemektedir. Ama yine de etiyojisi genel olarak ailesel ve sporadik PH şeklinde iki gruba ayrılabilir. Ancak ailesel PH tanımlamasının her zaman genetik etiyojisi karşılık gelmediği ve aile üyelerinin uzun süre aynı çevresel etkenlere maruz kaldıkları için hastalığa yakalanmış olabilecekleri de belirtilmektedir. Bu nedenle bazı yazarlar tarafından 'İdiyopatik PH' tanımı gündeme getirilmiş, bu tanım da 'Ailesel İdiyopatik PH' ve 'Sporadik İdiyopatik PH' şeklinde ikiye ayrılmıştır. Sporadik gruptaki olası etiyojiler ise; viral enfeksiyonlar (İnfluenza A, von Economo ensefaliti), tekrarlayan kafa travmaları veya bazı toksinler (rotenon, MPTP) gibi çok çeşitli olabilir (53).

PH olgularının, %85'i sporadik, %10-15'i ailesel özellik göstermekte iken %5'lik kısmı da tek gene bağlı (Mendel tipi kalıtım gösteren) bozukluklardan kaynaklanmaktadır (54). Görüldüğü gibi tüm hasta popülasyon içinde genetik geçişli PH'nın oranı çok düşüktür. Ancak genetik geçişli PH'nın klinik ve patolojik

özelliklerinin diğer olgularla çok benzer, genellikle de aynı olması sebebiyle sorumlu genlerin ve kodladıkları proteinlerin işlevlerinin belirlenmesi, moleküler patolojinin net olarak aydınlatılması açısından çok önemlidir (Şekil 2.2).

Genetik geçişli PH, otozomal dominant PH (ODPH) ve otozomal resesif PH (ORPH) olmak üzere iki gruba ayrılır. ODPH geç başlangıçlıdır (ortalama başlangıç 52 yaş), ORPH'de ise başlangıç yaşı 45'ten düşüktür. Bu gruba dahil edilen juvenil PH'nın başlangıç yaşı ise 21'in altındadır (55). Şimdiye kadar PH'nın genetik ile ilişkisini araştırmaya yönelik farklı yöntemlerin ve farklı hasta gruplarının kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda PH ile ilişkili en azından 13 lokus ve 9 gen tanımlanmış, tanımlanan genlerden 6 tanesinin ilişkisi kesinleşmiştir. Tüm PH olgularının yaklaşık %5-10'u, bildirilen bu genlerden birinde mutasyon taşımaktadır (56).



Şekil 2.2. Kalıtsal PH'nın sıklığı. Klein ve ark. (74)'dan alınmıştır.

2.5.1. PARK1 (α -sinüklein, SNCA)

Polymeropoulos ve ark. tarafından 1996 yılında İtalyan kökenli geniş bir ailedeki ODPH olgularının incelenmesiyle tanımlanan bu lokus ve gen, genetik geçişli PH'da bulunan ilk gendir (57). Bu gen üzerindeki üç nokta mutasyon ODPH olan olguların büyük bir kısmından sorumludur: A30P, A53T ve E46K (58). Belirtilen bu nokta mutasyonların yanı sıra α -sinüklein geninin duplikasyon ve triplikasyonu (PARK4) sonucu ortaya çıkan patolojiler de tanımlanmıştır (59).

Kromozomal olarak 4q21’de bulunan SNCA geni, 140 aminoasit içeren ve presinaptik bir protein olan α -sinüklein proteinini kodlar. Beyinde yaygın olarak sentezlenen α -sinüklein proteininin intrasellüler görevi tam olarak bilinmemekle birlikte, nörotransmitter taşıyan veziküllerin aksonlar boyunca iletilmesinde rol oynadığı sanılmaktadır (60). Veziküllere bağlı durumda iken α -heliks yapısı kazanan proteinin serbest halde belirgin bir konformasyonu yoktur. Alfa-sinüklein proteininin hücre zarına bağlanarak fosfolipaz D aktivitesini modüle ettiği ve bu yolla sinaptik veziküllerin salınımını düzenlediği düşünülmektedir. Bu gende bulunan mutasyonların proteinin veziküllere bağlanma kapasitesini azalttığı gösterilmiştir (58). Yapılan in vitro çalışmalar ile α -sinüklein geninde şimdiye kadar bulunmuş mutasyonların, proteinin α -heliks yapısını bozduğu ve ona β -tabaka konformasyonu kazandırdığı kanıtlanmıştır. β -tabaka yapısının da agregat oluşturmaya çok yatkın olduğu bilinmektedir (60,61).

Hayvan modellerinde SNCA geninin inaktif hale getirilmesi ile yapılan çalışmalar inaktivasyonun hayvanlarda bir bozukluğa yol açmadığını göstermiş, bu da otozomal dominant geçiş göstermesi kriteri ile birlikte düşünüldüğünde ‘kazanılmış toksik işlev’ varsayımını ortaya çıkarmıştır. Bu varsayımına göre SNCA genindeki mutasyonlar proteini işlevsiz hale getirmemekte, tersine ona yeni ve toksik bir işlev kazandırmaktadır (62). Hem yabanıl hem de mutant α -sinüklein, Lewy cisimciklerinde görülen amiloid fibriler yapıları ve nonfibriler oligomer yapıları oluşturabilmektedir. A53T mutasyonu taşıyan α -sinüklein proteini protofibril oluşumunu tetiklemekte ve mutasyon sebebi ile β -tabaka konformasyonu kazanan bu protein sinaptik veziküllerin zarlarının parçalanmasına neden olabilmektedir. Yabanıl tipte olsa bile ekspresyonu arttığında da β -tabakalanma gösterdiği tespit edilen α -sinüklein proteini, vezikülü parçalayarak içindeki dopaminin hücre içine sızmasına ve oksidatif stres oluşturarak toksisiteye neden olmaktadır (63). İn vitro çalışmalar Lewy cisimciği oluşuna yol açan fibriler formasyonun A53T mutasyonu varlığında A30P mutasyonuna göre çok daha hızlı oluştuğunu göstermiştir (9).

İndüklenebilir PC12 hücrelerinin kullanıldığı, hücrelerin sırasıyla yabanıl ve mutant (A30P ve A53T) SNCA geni ile transfekte edildiği çalışmalarda ise mutant α -sinükleini ifade eden hücrelerde direk bir toksisite gözlemlenmediği ancak proteozom aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu hücreler toksik olmayan

konsantrasyonlarda proteozom inhibitörleri ile muamele edildiğinde ise hücrelerin apoptotik hücre ölümüne karşı duyarlılıklarının arttığı bulunmuştur (63). Ayrıca RT-PCR ile yapılan çalışmalarda A53T mutasyonu taşıyan alelin, hastalarda yabancı allele göre daha düşük seviyede ekspresse edildiğini ortaya çıkarmış, bu durum da patogeneizde haployetersizlik (*haploinsufficiency*) varsayımını güçlendirmiştir (55).

A53T mutasyonu taşıyan bireylerde gözlenen ortak klinik bulgular; levodopa tedavisine iyi cevap vermesi, genç yaşlarda ortaya çıkması, oldukça hızlı klinik seyir izlemesi, daha az sıklıkta tremor gözlenmesi ve daha yüksek demans prevelansı olarak belirtilmektedir (64, 65). Ayrıca A53T mutasyonu taşıyan Avustralyalı Yunan ailede gözlenen santral hipoventilasyon, üriner inkontinans ve myoklonus da ilave klinik bulgular olarak tanımlanabilir (66). A53T mutasyonu taşıyan olgulardaki daha hafif tremor, hızlı klinik kötüleşme, demans ile ilişkisi, eşlik eden myoklonus ve hiperventilasyon gibi klinik bulgular kısmen erken başlangıçlı form ile yakın olsa da; A30P mutasyonu taşıyan olguların klinik bulgularının sporadik PH ile benzer özellikte olduğu gözlenmiştir (66, 67).

2.5.2. PARK4 (SNCA)

PARK1 lokusunda bulunan SNCA geni kopya sayısı artışları, önceleri PH'dan sorumlu dördüncü bölge olan PARK4 olarak belirtilmiş, ilerleyen zamanlarda SNCA gen multiplikasyonları şeklinde adlandırılarak PH etiolojisindeki yerini almıştır. SNCA multiplikasyonları ilk olarak 2003'te Singleton ve ark. ve 2004'te Chartier-Harlin ve ark. tarafından SNCA geninin alellerinden biri veya her ikisinde amplifikasyon olarak bildirilmiştir (68). SNCA lokusunu içeren duplikasyonlar ve triplikasyonlar SNCA geninin aşırı ekspresyonunun toksik olduğunu akla getirmektedir. Zaten yapılan çalışmalar genin kopya sayısındaki artışların SNCA proteini agregasyon patolojisine neden olduğunu göstermiştir. OD geçiş gösterdiği belirtilen bu patolojiler eğer duplikasyon ise idiyopatik PH şeklinde ortaya çıkmakta, triplikasyon ise klasik PH semptomlarına demans ve halüsinasyonlar gibi bazı atipik durumlar eşlik etmekte ve başlangıç yaşı daha erken olup hastalık daha hızlı ilerlemektedir. Hastalık şiddeti ile gen dozaj etkisi arasında da korelasyon olduğu bildirilmektedir (59).

Parkinsonizm ve SNCA multiplikasyonlarının araştırıldığı bir çalışmada SNCA geni dozaj artışının sporadik Parkinson hastalarında da sık olarak bulunduğu bunun da alellerden birinde meydana gelen segmental duplikasyon sebebiyle veya aleller arası rekombinasyon esnasında gelişen dengesiz ‘crossing-over’ sebebiyle oluştuğu bildirilmiştir (69). SNCA multiplikasyonlarının probantlara göre daha yaşlı ve SPECT ile yapılan görüntüleme tetkikleri normal sonuçlanan asemptomatik taşıyıcılarda da gözlenmesi; bu genomik değişikliği yaşa bağımlı veya inkomplet penetrans gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (40).

2.5.3. PARK2 (Parkin)

Parkin geni ilk defa 1998 yılında Japonya’da juvenil başlangıçlı otozomal resesif geçiş gösteren ailesel PH (ORJPH) olgularında gerçekleştirilen bağlantı analizi ve pozisyonel klonlama yöntemleri vasıtasıyla tanımlanmıştır (70). Bu gen yaklaşık 1.5 megabazlık (Mb) bir bölgeyi kaplar ve 12 kodlayıcı ekzonu bulunmaktadır. Şimdiye kadar Parkin geninde 65’ten fazla nokta mutasyon ve 90’dan fazla gen içi değişiklikler (delesyon, duplikasyon, insersiyon) tanımlanmıştır (71,72). Parkin geni tarafından kodlanan Parkin proteininde 465 aminoasit bulunur. Proteinin moleküler yapısına baktığımızda C-terminalinde RING-finger (*‘really interesting new gene’* kelimelerinin baş harfleri RING olarak kullanılmaktadır) motifi içeren iki bölge ve bunların arasındaki IBR (*in-between region*) bölgesi ile N-terminalinde übikütin benzeri bir bölge (UBL) bulunmaktadır. Parkin proteininin işlevine yönelik çalışmalar bu proteinin ÜPPDS’de görevli bir E3 ligaz olduğunu göstermiştir ve übikütin ile işaretlenmiş proteinlerin yıkımında kilit bir rol oynamaktadır. Ayrıca Parkin’deki RING-finger bölgeleri ile IBR bölgesi übikütin konjuge edici enzim E2 ile etkileşim için uygun bir arayüz oluşturmaktadır (73).

Parkin genine bağlı PH, OR geçiş gösterir. Bu durum Parkin mutasyonlarının işlev kaybına neden olduğunu düşündürmüştür. Yapılan çalışmalar da Parkin allellerinden birisi sağlam olan kişilerde PH gelişmediğini, ancak taşıyıcı statüsünde olduklarını göstermiştir. Mutasyonlara bağlı olarak Parkinin E3 ligaz aktivitesinin kaybı substrat proteinlerin übikütin ile işaretlenememesine ve dolayısıyla da proteozom tarafından tanınıp yıkılamamasına yol açmaktadır. Yıkılamayan bu substrat proteinler de hücrede birikmekte ve toksik etkiye neden olmaktadır. Parkinin

bilinen en önemli iki substratı α -sinüklein ve siklin-E proteinleridir. Gerek SNCA mutasyonlarına gerekse ÜPPDS bozukluğuna bağlı olarak yıkılamayan ve intrasellüler agregat oluşturan α -sinüklein proteini oksidatif stres yaratarak toksisiteye neden olmaktadır. Diğer önemli substrat olan siklin-E ise nöronların hayatta kalması için kilit öneme sahip bir proteindir. Siklin-E'nin yıkılamaması hücreyi apoptoza götürmektedir. Bu bulguyu destekler nitelikte, Parkine bağlı PH olgularının orta beyinlerinde siklin-E seviyesi artmış olarak bulunmuştur (55, 63, 73,).

SNCA geninden sonra ikinci olarak tespit edilen familial PH'ya yol açan OR geçişli Parkin mutasyonları, ülkelere göre değişmekle beraber genel olarak 40 yaş altında erken başlangıçlı PH olgularının %10-20'sinden (pozitif aile hikayesi varlığında oran %50'ye ulaşabilir) sorumlu olmasıyla klinik yönden önemlidir (74,75). Ortalama olarak otuzlu yaşlarda Parkin geninde mutasyon taşıyan olgularda klinik bulgular kendini göstermeye başlamaktadır. Ancak hastalığın başlangıç yaşında 7 ila 64 yaş arasında çok fazla interfamiliyal ve intrafamiliyal değişkenlik bulunduğu da bilinmelidir (76). Tipik klinik bulgular arasında erken yaşta başlangıç, yavaş progresyon, levadopaya çabuk cevap, levadopa ile indüklenen diskineziye yatkınlık, alt ekstremitte distonileri, diurnal fluktuasyon, uykudan yarar sağlama ve hiperrefleksi bulunmaktadır (70,77).

Parkin geni boyunca saptanan 100'den fazla mutasyonun incelendiğinde bu gen üzerinde herhangi bir *hot-spot* bölge bulunmadığı düşünülmektedir. Ayrıca gen üzerindeki farklı mutasyonlara bağlı olarak klinik özelliklerde major bir farklılık da gözlenmemiştir (77).

2.5.4. PARK3

PARK3 lokusu, 1998 yılında OD kalıtım gösteren 6 ailenin incelenmesi sonucunda tanımlanmış ve kromozomal olarak 2p13'te yerleştiği belirtilmiştir. Ailelerdeki olgularda hastalığın başlangıç yaşının 37 ila 89 yaş arasında değiştiği gözlenmiştir. Levadopaya tipik cevap ve demansın gözlendiği bu bireylerin postmortem analizlerinde substantiya nigrada dopaminerjik nöron dejenerasyonu ve Lewy cisimciği tespit edildi. Yapılan gözlemler bu gendeki penetransın da %40'ın altında olduğunu ortaya çıkarmıştır (78).

2.5.5. PARK5 (UCHL-1)

İlk olarak 1998 yılında OD kalıtım gösteren Alman bir ailede tanımlanmıştır. Kromozomal lokusu 4p14 olarak tespit edilmiştir. Başlangıç yaşı ortalama olarak 50'dir. Şimdiye kadar başka bir ailede Übikütün C-terminal hidrolaz 1 (UCHL-1) geninde mutasyon bildirilmemiştir (79). UCHL-1 büyük oranda beyinde ifade edilen bir gendir ve ürünü übikütün polimerlerini hidroliz yoluyla monomerik forma geri dönüştüren bir enzimdir. Bu nedenle ÜPPDS'de önemli bir görevi vardır. UCHL-1 geninde bugüne kadar bir nokta mutasyon (I93M) ve bir de koruyucu polimorfizm (S18Y) tespit edilmiştir. I93M mutasyonu ODPH'ya neden olmakta, koruyucu polimorfizm ise sporadik PH riskini azaltmaktadır (55).

2.5.6. PARK6 (PINK1)

İlk kez 2004 yılında OR özelliğe sahip erken başlangıçlı PH bulguları olan bir ailede tanımlanmıştır. Kromozomal lokusu 1p36-37 olarak tespit edilmiştir (80). PINK-1 (PTEN tarafından indüklenen kinaz 1) geni yaklaşık 18.06 kilobazlık (kb) bir alanı kaplamakta ve 8 kodlayıcı ekzon içermektedir. Bu gen 581 aminoasitten oluşan ve yaygın olarak ifade edilen bir protein kodlamaktadır. Şimdiye kadar PINK1 geni üzerinde 46 adet nokta mutasyon, 9 adet de gen içi değişiklik (delesyon, insersiyon) bildirilmiştir (71,72). Mutasyonları oksidatif stres, enerji metabolizması ve mitokondri disfonksiyonuna yol açmaktadır (81).

PINK1 geninde mutasyon taşıyan olgularda hastalığın başlangıç yaşı ortalama 41'dir. Başlangıç yaşı dışında diğer klinik özellikler tipik PH şeklindedir. Uykudan yarar sağlarlar ve erken distonileri de yoktur. Bu iki özellik PINK1 geni mutant olguları ORJPH grubundan ayırmaktadır. Levadopaya cevapları iyi ve uzun sürelidir (81). Aile hikayesi olan ve erken başlangıçlı PH olgularındaki PINK1 geninin mutasyon sıklığı, etnik farklılıklar göstermekle beraber %1-8 arasında değişmektedir. Klinikte Parkin gibi prezante olan ancak ona göre daha nadir gözlenen PINK1 mutasyonları heterozigot formda da PH için risk faktörüdür (12).

2.5.7. PARK7 (DJ-1)

Parkin genindeki mutasyonlar erken başlangıçlı ORPH'nın büyük kısmından sorumludur. Ancak yapılan bağlantı analizleri başka genlerdeki mutasyonların da

erken başlangıçlı ORPH'ya neden olabileceğini göstererek genetik heterojenitenin varlığını ortaya çıkarmıştır. Bu genlerden birisi de DJ-1 genidir. DJ-1 gen mutasyonları ilk kez 2001 yılında Hollandalı 4 hastada tanımlanmıştır (82). Kromozomal lokalizasyonu 1p36 olan DJ-1 geninin toplam büyüklüğü 23.63 kb'dir ve 7 adet kodlayıcı ekzon içermektedir. Şimdiye kadar bu gen üzerinde 10 adet nokta mutasyon ve 7 adet gen içi değişiklik bildirilmiştir (71,72). Bu mutasyonların hepsi erken başlangıçlı ORPH'ye neden olmaktadır. Mutasyonlar genin her yanına dağılım göstermekte fakat aynı fenotipe neden olmaktadır (83).

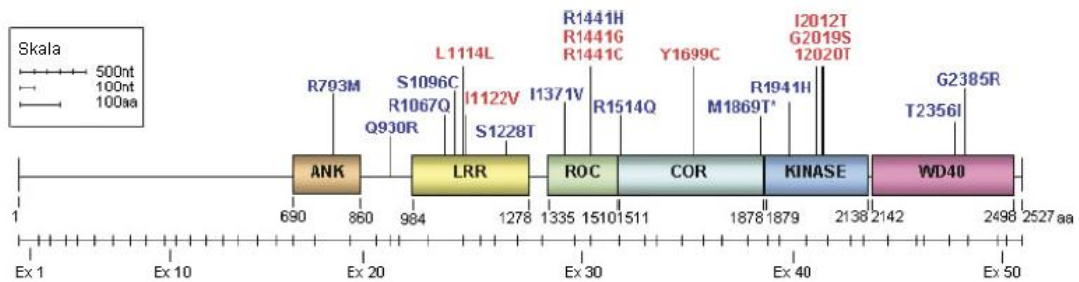
Homodimerik bir protein olan DJ-1 proteininin fonksiyonu çok iyi bilinmemektedir ancak fonksiyon kaybı halinde oksidatif stres, enerji metabolizması bozukluğu ve mitokondriyal disfonksiyona neden olmaktadır. Tanımlanan mutasyonlardan biri olan L166P mutasyonu, proteinin katlanmasını etkileyerek homodimer oluşmasını önler. Bu şekilde yanlış katlanarak stabilitesi düşen mutant DJ-1, protein yıkım sisteminden kurtularak sitotoksik etki oluşturur. Ayrıca bu mutasyon normalde sitozolde bulunması gereken proteinin lokalizasyonunu değiştirerek mitokondride birikim göstermesine sebep olur. DJ-1 geninde tanımlanan E64D ve M26I mutasyonları da ilgili proteinin stabilitesi azalmakta ancak L166P mutasyonu taşıyan mutant DJ-1 kadar şiddetli düşürmemektedir. L166P mutasyonu taşıyan DJ-1 proteini en kötü prognozu vermektedir (84).

DJ-1 geninde mutasyon taşıyan olguların, Parkin mutasyonu taşıyan hastalara benzer şekilde erken başlangıçlı PH grubu ile benzer fenotipe sahip olduğu, erken başlangıçlı distonilerinin bulunduğu ve levadopa tedavisine iyi cevap verdikleri saptanmıştır. Bazı bireyler belirgin psikoza sahiptir. Ayrıca blefarospazmın DJ-1'e özgü bir klinik özellik olabileceği öne sürülmüş ancak birkaç Parkin mutasyonu taşıyan hastada da bu bulgu saptanmıştır (85).

2.5.8. PARK8 (LRRK2, Dardarin)

PARK8 lokusunun ilk olarak 2002 yılında, Japon bir ailede yapılan bağlantı analizleri ile 12q11.2-q13.1 bölgesinde yer aldığı bildirilmiştir. Takip eden yıllarda bu lokusta yerleşen genin LRRK2 geni olduğu, mutasyonlarının da OD kalıtım paterni ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir (86, 87). Yaklaşık 150 kb uzunluğunda olan LRRK2 geni, 51 adet kodlayıcı ekzona sahiptir. Bu gen içerisinde şimdiye kadar

40'tan fazla nokta mutasyon bildirilmiş (Şekil 2.3) ancak delesyon, insersiyon gibi gen içi değişiklikler saptanmamıştır (71, 72). LRRK2 geni, ROCO ailesine ait, özgün RAS GTPaz süper-ailesinden, 2527 aminoasit büyüklüğünde, oldukça korunmuş bir yapıya sahip pek çok farklı işlevsel bölgesi olan GTP-binding serin-treonin kinaz isimli proteini kodlar. Beyinde yaygın olarak ifade edilen bu protein, genelde golgi, sinaptik vezikül ve plazma membranında, az oranda da mitokondri dış membranında lokalizedir (88). Proteinin işlevi tam olarak bilinmemektedir. Ancak üzerinde bazı domainlerin protein-protein etkileşimine girmesi, serin-treonin kinaz aktivitesi gösteren Mitojenaktif Protein Kinaz Kinaz Kinaz (MAPKKK) domaininin normaldeki dimer formunda zayıf olan otofosforilasyon ve fosforilasyon aktivitesinin tanımlanan çoğu mutasyonda artmış olarak bulunması, artmış kinaz aktivitesinin patogeneze sorumlu olduğunu düşündürmektedir (88, 89). Bunun yanında LRRK2 geninin tirozin kinaz aktivitesi, şaperon fonksiyonlu proteinler ile ilişkili fosforilasyon gibi farklı ve daha az bilinen işlevlerinin de olduğu belirtilmektedir. Ancak mekanizmanın niteliği ne olursa olsun temel sorunun artmış fosforilasyon özelliğine bağlı olabileceği, dolayısı ile farmakolojik tedavi yaklaşımlarına imkan verebileceği ümit edilmektedir (12).



Şekil 2.3. LRRK2 geninde tanımlanmış mutasyonlar ve bu mutasyonların protein üzerinde etki ettiği fonksiyonel bölgeler. Tan ve ark.'dan (88)

PARK8 geni ile ilgili bir diğer ilginç özellik de fenotipik farklılıkların yanında patolojinin de pleomorfik olmasıdır. Bu gende mutasyon taşıyan olgular tipik PH bulguları taşısa da patogeneze Lewy cisimciği patolojisi, tau patolojisi, intrasellüler inklüzyonsuz nöronal kaybın bulunması LRRK2 geninin heterojen bir

hastalık sebebi olabileceğini düşündürmektedir. Buradan hareketle LRRK2 üzerinden formüle edilecek moleküler mekanizmaların sadece PH için değil diğer nörodejeneratif olaylar için de anlamlı olacağı beklenebilir (12, 89).

Eskiden çok nadir olduğu ifade edilen ailevi formların toplumlara göre değişmekle beraber PH'da %10'a kadar ulaşabilen bir oranda görüldüğü bildirilmektedir. PARK8 örneğinde bu oran bazı toplumlarda çok daha yüksek değerlere ulaşabilmektedir. Genel olarak bakıldığında bu gendeki mutasyonların ailesel ODPH'nin en az %10'undan, sporadik PH'nın da %3,6'sından sorumlu olduğu bildirilmektedir (90). Tanımlanmış olan 40'tan fazla nokta mutasyonun çoğunun patojenitesi, azalmış penetrans ve fenokopiden dolayı ve ayrıca geç başlangıçlı olan ve parental genotipleri bilinmeyen olguların segregasyon analizlerinin yapılamaması nedeniyle tam olarak aydınlatılamamıştır. Patojenitesi tam olarak tanımlanan mutasyonları çoğu, foksiyonel olarak önemli bölgelerde (örneğin MAPKKK domaini gibi) kümelenmiştir (91).

LRRK2 geni üzerinde en iyi bilinen ve en sık gözlenen G2019S mutasyonunun Avrupa'da familial PH olgularında %2–5, sporadiklerde de %1–2 gibi bir sıklıkta gözlenmesi genetik test seçimini kolaylaştırmaktadır (91). Bu mutasyonun prevalansı etnik kökene göre değişmektedir. Asya, Güney Afrika ve Polonya, Yunanistan ve Almanya gibi Avrupa ülkelerinde çok nadir gözlenirken; Kuzey Afrika'da familial ve sporadik PH'da %30–40, Aşkenazi Yahudilerinde de %10–30 oranında gözlenmektedir. G2019S mutasyonu taşıyıcılarında sadece üç farklı haplotip bulunmuştur. Haplotip 1 olarak anılan yaygın 193 kb'lik genomik bölge, Avrupalı, Kuzey ve Güney Afrikalı PH olguları ve Aşkenazi Yahudilerinin %95'i tarafından paylaşılmaktadır. Bu mutasyon (G2019S haplotip 1) büyük olasılıkla Kuzey Afrikalı ve Avrupalılardan binlerce yıl önce Aşkenazi Yahudilerinde ortaya çıkmıştır. İkinci ve nadir gözlenen haplotip de Avrupa kökenli toplumda sadece beş ailede bulunmuştur. Üçüncü haplotip ise özellikle Japon taşıyıcılarda gözlenen haplotiptir ve aynı zamanda bir Türk olguda da saptanmıştır (56).

LRRK2 geni üzerinde tanımlanan mutasyonlar ile ilgili asıl sorun, bu mutasyonların penetransı ve bununla bağlantılı olarak da klinikte ve genetik danışmadaki etkinliğidir. G2019S mutasyonunun penetransı ile ilgili yapılan

ilk araştırmada bu mutasyonun penetransının 50 yaşında %17, 70 yaşında da %85 olduğu saptanmıştır (92). Fakat tekrarlayan raporlarda ise örnek sayısına ve çalışma dizaynına bağlı olarak bu oranların değiştiği gözlenmiştir. Kuzey Amerika'dan Avrupa'ya kadar 21 merkezi içeren uluslararası LRRK2 Konsorsiyumu'nun verilerine göre yaşa bağımlı G2019S mutasyonunun penetransı 59 yaşında %28, 69 yaşında %51 ve 79 yaşında %74'tür. Bu veriler cinsiyete göre değişmemekte ancak etnik kökene bağlı olarak farklılıklar gözlenmektedir (91). Tüm bu bilgiler ışığında genel olarak G2019S mutasyonu taşıyan PH olgularına bakıldığında hastalığın ortalama başlangıç yaşı 51'dir. Klinik bulgular tipik PH ile uyumludur. Levadopaya cevap ve prognoz iyidir. Olguların çoğu tek taraflı el ve ayak tremoru ile hastalığa yakalanır. Kognitif kayıp yoktur (93).

2.5.9. PARK9 (ATP13A2)

OR ailevi PH formuna neden olan ATP13A2 geni 1180 aminoasit uzunluğundaki lizozomal tip 5 ATPaz proteinini kodlamaktadır. Normal protein lizozomlar tarafından tutulurken, mutant protein endoplazmik retikulum tarafından tutulur ve proteozomlarca degrade edilir. Dolayısı ile mutasyonların lizozomal disfonksiyona yol açtığı düşünölmektedir. Parkinsonizm yanında demans ve piramidal tutulumla daha karmaşık bir klinikle prezente olan OR ailevi PH formuna (PARK9, Kufor-Rakeb Sendromu) neden olur (94). Juvenil başlangıçlıdır, maske yüz, rijidite ve bradikinezi vardır ancak tremor bulunmaz. Klasik PH'dan farklı olarak spasite, supranökleer gözü yukarı dikme parezisi ve demans semptomlara eşlik eder. Bu formda hastalık hızlı ilerler, levadopaya cevap vardır ancak uzun süre kullanımda artan spasite, tepe doz diskinezisi ve kognitif kayıp oluşur (95).

2.5.10. PH ile İlişkili Diğer Genler

Yukarıda bahsedilen genler ve lokuslar dışında PH ile ilişkili olduğu düşünölen birçok aday gen bulunmaktadır. Bu aday genlerin hastalıkla ilişkisini gösterebilmek için birçok çalışma yapılmakta ve son dönemlerde yayımlanmaktadır.

PH ile ilişkilendirilen genlerden birisi 6 ekzona sahip olan 60.88 kb uzunlukta GCH1 (GTP Cyclohidrolase 1) genidir (71, 72). İlk olarak levadopa tedavisine duyarlı OD distonili dört aile üyesinde bu gende dört farklı mutasyon saptanmıştır.

Takip eden çalışmalarda birçok ülkede ve ailede dopa responsif distonili olgularda GCH1 geninde birçok mutasyon tespit edilmiştir (96).

PH ile ilişkilendirilen diğer genler olan PARK10, PARK11 (GIGYF2), PARK12, PARK13 (OmiHtrA2), SNCAIP (Synphillin), NR4A2 (Nurr1) genleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Belirtilen lokuslardan PARK13'ün kalıtım paterni bilinmezken PARK10 ve PARK 11 OD kalıtım, PARK12 de X'e bağlı kalıtım özelliği göstermektedir (97).

Tablo 2.1. Parkinson Hastalığından sorumlu tutulan genler ve özellikleri (ND: nigral Dejenerasyon)

Lokus	Kalıtım Paterni	Başlangıç Yaşı	Patoloji	Kromozom Pozisyon	Gen
PARK1	Dominant	40'lı yaşlar	N.D.(+) Lewy C. (+)	4q21	SNCA
PARK2	Resesif	20–40	N.D.(+) Lewy C. (-)	6q25	Parkin
PARK3	Dominant	60'lı Yaşlar	N.D.(+) Lewy C. (-)	2p13	?
PARK4	Dominant	30'lu yaşlar	N.D.(+) Lewy C. (+)	4q21	SNCA (Dup./ Trip.)
PARK5	Dominant	~ 50	Rapor edilmemiş	4p14	UCHL-1
PARK6	Resesif	30–40	Rapor edilmemiş	1p35–37	PINK1
PARK7	Resesif	30–40	Rapor edilmemiş	1p38	DJ-1
PARK8	Dominant	~ 60	α -sinüklein ve Tau patolojisi	12 cen	LRRK2
PARK9	Resesif	20–40	Rapor edilmemiş	1p36	ATP13A2
PARK10	Dominant(?)	50–60	Rapor edilmemiş	1p32	?
PARK11	Dominant(?)	Geç dönem	Rapor edilmemiş	2q34	?
PARK12	X'e Bağlı	Geç dönem	Rapor edilmemiş	Xq21	?
PARK13	Dominant(?)	Geç dönem	Rapor edilmemiş	2p12	HTRA2

2.6. DNA Dizileme Yöntemi

'*Human Genom Project*' (insan genom projesi) ile insan genomunun tümünün baz dizisinin çıkarılması hedeflenmiştir. %99 oranında tamamlanan çalışma ile DNA dizileme teknolojileri de oldukça geliştirilmiştir. Temel olarak DNA dizileme yöntemi için iki teknik vardır: Bunlar Maxim-Gilbert ve Sanger yöntemleridir.

Maxim-Gilbert Yöntemi: Floresan veya başka bir yöntemle işaretlenmiş bir DNA bölgesi belli bir baza spesifik kimyasal reaksiyonlarla parçalanarak fragmanlara ayrılır. Her spesifik reaksiyon için ayrı bir kuyu kullanılarak poliakrilamid jelde yürütülür ve görüntülenerek baz dizisi belirlenir.

Sanger Yöntemi: İn-vitro ortamda DNA sentezi sırasında sentez işlemi durdurucu ddNTP molekülerinin ortama eklenmesi ile sentezin durdurulması amaçlanır. ddNTP'ler, DNA sentezi sırasında replikasyon zincirinin uzaması için bağ sağlayan 3' oksijen molekülüne sahip değildir. İşaretli primerler ve ddNTP'ler varlığında DNA dizisi 4 farklı reaksiyon yapılarak (her reaksiyon için bir ddNTP) poliakrilamid jelde veya her ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) farklı floresan boya ile işaretlenerek otomatik kapiller elektroforez sistemlerinde bütün baz dizisi elde edilebilir.

DNA dizileme yöntemi dört aşamadan oluşur:

1. PCR: Dizileme yapacağımız genomik bölgenin sınırlandırılmasını ve çoğaltılmasını sağlar. Dizi spesifik primerler, DNA polimeraz enzimi ve serbest nükleotidler varlığında in-vitro ortamda dizilenecek bölge sınırlandırılır ve milyonlarca kez çoğaltılır.
2. Pürifikasyon: PCR sonrası ortamda bazı artık ürünler (primer artıkları, dNTP artıkları ve enzim) bulunabilir. Bunlar sonraki aşamalar için problem oluşturabileceğinden ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlemde düşük moleküler ağırlıklı primer ve nükleotidleri uzaklaştırmak için ticari olarak üretilmiş basit bir spin-kolon sistemi kullanılabilir gibi alkol serileri de kullanılabilir. İşlem sonunda saf halde çift sarmallı PCR ürünü elde edilir.

3. Döngü Dizileme: Durdurucu nükleotidlerin (ddNTP) eklenmesi için yapılan asimetrik bir PCR'dir. Normal PCR'den farklı olarak tek bir primer ve ddNTP'ler ortama eklenir ve rutin denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları ile floresan işaretli ddNTP'lerin bağlanması sağlanır. Böylece otomatik dizi analiz sisteminin okuması için hazır fragmanlar oluşturulur.
4. Döngü dizileme ürünlerinin pürifikasyonu ve otomatik dizi analiz sistemine yüklenmesi: Döngü dizileme sonrası ortamda bazı artıklar bulunmaktadır. Otomatik dizi analiz sisteminin problemsiz olarak çalışabilmesi için bu artıkların temizlenmesi gerekmektedir. Bu işlem için standart olarak sodyum asetat-alkol serisi yöntemi kullanılabilir. Ancak daha hızlı ve verimli sonuç verebilen ticari olarak üretilmiş, sefadeks içeren spin-kolonları kullanmak da mümkündür. Bu temizleme işleminin ardından ürünler otomatik dizi analiz cihazına yüklenerek floresan işaretli fragmanların bir kamera yardımı ile okunması ve bir program ile analizi sonucu DNA dizisi elde edilir (98).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hasta Grubu

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Hareket Bozukluğu Polikliniğine 2004–2010 yılları arasında Londra Beyin Bankası tanı kriterlerine göre sporadik PH tanısı almış 83 hastaya ait periferik kan örnekleri dahil edilmiştir. Ailevi PH öyküsü olan olgular çalışmaya dahil edilmemiştir. Hastalardan alınan periferik kan örnekleri EDTA'lı tüp içerisine alınarak laboratuvarımıza ulaştırılmıştır.

Çalışmamız Temmuz 2010 - Ekim 2010 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. PH tanısı alan olguların periferik kan hücrelerinden elde DNA örneklerinde, PARK1 geninin A30P mutasyonunun bulunduğu 2. ekzonu, PARK8 geninin de G2019S mutasyonunun bulunduğu 41. ekzonu DNA dizileme yöntemi ile incelenmiştir.

Çalışmamız için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 06.07.2010 Tarih ve 2010/120 sayılı onay alınmıştır.

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan Aletler

Elektroforez için güç kaynağı (EKR)

Elektroforez aleti (Consort E844)

Hassas terazi (Setra)

Pipet takımı (Gilson)

Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)

Mikrosantrifüj (Sigma)

PCR aleti (thermal cycler) (PE GenAmp PCR System 9700)

Su Banyosu (Nüve)

Vorteks (Heidolph)

Mezür (100'lük ve 1000'lik)

Beher (250'lik ve 500'lük)

Deep-Freeze (Arçelik)
Mikrodalga fırın (Arçelik)
Buzdolabı (Arçelik)
Falkon Tüpü (50'lik)
Ependorf tüpü (1,5 ml'lik)
PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)
Toplama tüpü (QIAGEN)
Spin kolonu (QIAGEN)
Mini soğutucu
Spektrofotometre (NanoDrop)
Otomatik kapiller elektroforez cihazı (ABI 310)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Agaroz (Scjarlou)
Borik asit (Sigma)
dNTP seti (Promega)
EDTA (Sigma)
Etanol (%95) (Tekel)
Etidyum Bromid (Sigma)
10XPCR buffer (Bioron)
Moleküler Weight Marker (Fermantas)
Taq DNA polimeraz (Biotools)
6X Jel yükleme tamponu (Sigma)
DNA Ekstrasyon Kiti (Qiagen QIAmp DNA Mini Kit)
Performans Optimize Edici Polimer 6 (POP6 TM) (ABI)
Proteinaz K (QIAGEN)
Distile su

3.3. Yöntemler

3.3.1. Qiagen® Ekstraksiyon Kiti ile Periferik Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi

Periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesinde Qiagen® Ekstraksiyon Kiti kullanılmıştır. DNA izolasyonu için üretici firmanın önerdiği protokol aynen uygulanmıştır.

- Su banyosunun ısısı 56°C ye getirilmiştir.
- Kan örnekleri ve diğer malzemeler oda sıcaklığına getirilmiştir.
- 1,5 ml ependorf tüp strafora konulup üzerine protokol numarası yazılmıştır.
- 20 µl Qiagen proteaz (proteinaz K) ependorf tüpünün dibine konmuştur.
- 200 µl hasta kan örneği ependorf tüpüne eklenmiştir.
- Buffer AL çalkalanıp karıştırıldıktan sonra ependorf tüpüne 200 µl eklenmiştir.
- Bu karışım 15 sn. vortekslenmiştir.
- 56°C de 10 dk. inkübe edilmiştir.
- Çok kısa süreli santrifüj edilmiştir.
- %96-100'lük etanolden 200 µl örneğe eklenip 15 sn. vortekslenmiştir.
- Filtreli tüpün kapağına protokol numarası yazılmıştır.
- Ependorf tüpündeki karışım dikkatlice filtreli tüpe aktarılmıştır.
- 8000 devir/dk'da 1 dk santrifüjlenmiştir.
- Filtreli tüp yeni toplama tüpüne konulup, filtratlı tüp atılmıştır. (Filtreli tüp tamamen boşalmadığı zaman tam devirde tekrar santrifüjlenmiştir)
- 500 µl Buffer AW1 dikkatlice filtreli tüpe konulmuştur. 8000 devir/dk'da 1 dk süreyle santrifüjlenmiştir.
- Filtreli tüp ikinci yeni toplama tüpüne konulup filtratlı tüp atılmıştır.

- Filtreli tüpe 500 µl Buffer AW2 konulmuştur.
- 14.000 devir/dk'da 3 dk santrifüj edilip filtratlı tüp atılmıştır.
- Filtreli tüp yeni ependorf tüplerine aktarılıp tam devirde 1 dk santrifüjlenmiş, ependorf tüpü atılmıştır.
- Filtreli tüp yeni ependorf tüpüne aktarılıp üzerine 200 µl Buffer AE eklenmiştir.
- Oda sıcaklığında 5 dk bekletilip 8000 devir/dk'da 1 dk santrifüjlenmiştir.
- Filtreli tüp atılıp DNA içeren sıvı ependorf tüpü içinde -20°C ye kaldırılmıştır.

3.3.2. PARK1 Ekzon 2'nin PCR ile Amplifikasyonu

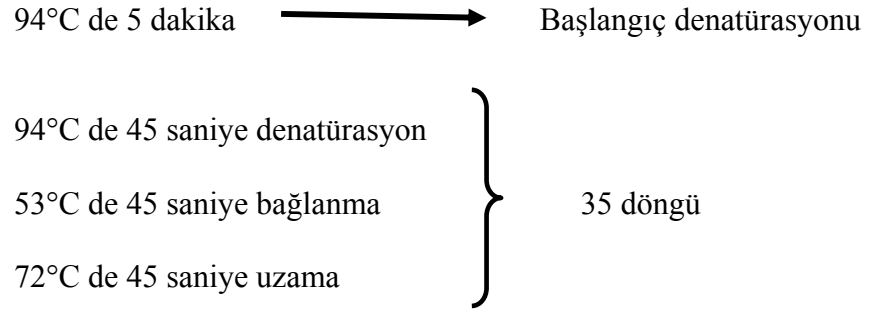
PARK1 geni ekzon 2 genomik bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri:

Primer F: 5'AAGTGTATTTTATGTTTTCC'3

Primer R: 5'AACTGACATTTGGGGTTTACC'3

PCR miksi:

ddH ₂ O	28,9 µl
10xPCR buffer	5 µl
dNTP miks (10mM)	0,4 µl
primer F (1 µM)	4 µl
primer R (1 µM)	4 µl
Taq pol (5 u/ µl)	0,2 µl
MgCl (50mM)	2,5 µl
DNA	5 µl
	+ -----
	50 µl

PCR şartları:

En sonunda 72°C de 5 dakika tutularak ürünün arttırılması sağlanmıştır.

3.3.3. PARK8 Ekzon 41'in PCR ile Amplifikasyonu

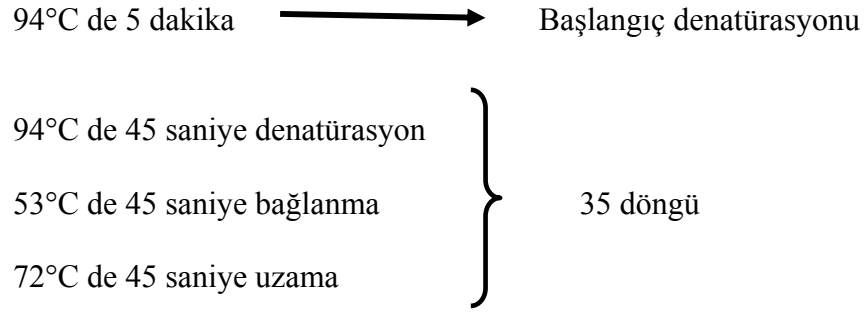
PARK8 geni ekzon 41 genomik bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri:

Primer F: 5'TTTTGATGCTTGACATAGTGGAC'3

Primer R: 5'CACATCTGAGGTCAGTGGTTATC'3

PCR miksi:

ddH ₂ O	28,9 µl
10xPCR buffer	5 µl
dNTP miks (10mM)	0.4 µl
primer F (1 µM)	4 µl
primer R (1 µM)	4 µl
Taq pol (5 u/ µl)	0,2 µl
MgCl (50mM)	2,5 µl
DNA	5 µl
	+ -----
	50 µl

PCR şartları:

En sonunda 72°C de 5 dakika tutularak ürünün arttırılması sağlanmıştır.

3.3.4. PCR Ürünlerinin Pürifiye Edilmesi

PCR ürünleri, Qiagen QiaQuick PCR Purification kiti kullanılarak PCR reaksiyonu artıklarından temizlenmiştir. Kısaca;

- PCR ürünü ependorf tüpe alınmıştır.
- PCR ürününün üzerine miktarının 5 katı buffer PB eklenmiştir. (40 µl PCR ürünü için 200 µl buffer PB eklenmiştir.)
- Pipetaj yapılarak filtrelü tüplere aktarılmıştır.
- 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve süzüntü dökülmüştür.
- Filtrelü tüp tekrar toplama tüpüne yerleştirilerek üzerine 750 µl buffer PE eklenmiştir.
- 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama yapılmıştır.
- Süzüntü dökülmüş, filtrelü tüp toplama tüpüne yerleştirilmiş ve bir kere daha 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Süzüntü, toplama tüpü ile birlikte atılarak filtrelü tüp temiz bir ependorf tüpüne yerleştirilmiştir.

- Filtreli tüpe buffer EB eklenerek PCR ürününün filtreden ependorf tüpüne süzülmesi için önce 1 dakika oda sıcaklığında beklenmiş ve sonra 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
- Elde edilen ürün hemen döngü dizileme işlemine sokulacaksa +4°C de veya uzun süre için -20°C de saklanmıştır.

3.3.5. PCR Ürünlerinin Dizi Analizi İçin Hazırlanması Amacıyla Döngü Dizileme

Döngü dizileme Applied Biosystem Big Dye Terminator V 3.1 kiti ile gerçekleştirilmiştir. Protokol ve döngü dizileme programı aşağıdaki gibidir.

5x döngü dizileme buffer	2 µl	
Big Dye terminator (V 3.1)	4 µl	
Primer F/R (1 µM)	3.2 µl	
Pürifiye edilmiş PCR ürünü	10.8 µl	
		+ -----
		20 µl
96°C de 10 saniye denatürasyon	}	29 döngü
50°C de 5 saniye bağlanma		
60°C de 4 dakika uzama		

3.3.6. Döngü Dizileme Ürünlerinin Pürifiye Edilmesi

Döngü dizileme sonrası artıklardan arındırmak için Qiagen firmasının Dye-Ex kiti kullanılmıştır. Kısaca;

- Kitte bulunan filtreli tüpler vorteks yapılmış, alt emniyet kapakları kırılmış ve üst kapakları 45° açılmıştır.

-Filtreli tüpler toplama tüplerine yerleştirilerek 3,000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapılmıştır.

-Toplama tüpü süzüntü ile birlikte atılmış ve filtreli tüp ependorf tüpüne yerleştirilmiştir.

-Döngü dizileme ürünlerinin hepsi filtreli tüpe aktarılmıştır.

-4,000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiştir.

-Filtreli tüp atılmış ve ependorf tüpü döngü dizileme ürünleri ile saklanmıştır.

3.3.7. Ürünlerin Dizi Analizi İçin Cihaza Yüklenmesi

Döngü dizileme ürünleri, ABI 310 otomatik kapiller jel elektroforez cihazına yüklemek için tüplere aktarılmıştır. Tüplerin kapakları kapatılarak traye dizilmiştir. ABI 310 cihazında örnekler için yeni bir örnek listesi oluşturulmuş ve dye/primer set olarak KB_310-BDT-V3.1.rapid36 seçilmiştir. Cihaza yükleme listesinde module olarak Seq.POP6.Rapid.E.md4 seçilerek kapiller elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.3.8. Sonuçların Analizi

Cihazda Sequencing Analysis V 5.1 analiz programı ile analiz edilen sonuçların dizi dosyaları NCBI web sitesinin database ile karşılaştırmak için BLAST yapılmıştır.

4. BULGULAR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Hareket Bozukluğu Polikliniği'nde klinik olarak Londra Beyin Bankası tanı kriterlerine göre sporadik PH tanısı almış 83 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Moleküler analizler (periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu, PCR, sekans analizi) Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Olguların yaşları, cinsiyetleri, hastalık başlangıç zamanları hasta dosyalarından temin edilmiştir.

4.1. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik Özellikleri

Çalışma grubumuza dahil edilen hastaların 43'ü erkek, 40'ı kadındır (Tablo 4.1). Hastaların yaş ortalaması $63,4 \pm 9,2$ yıl olarak hesaplanmıştır. Hastalık başlangıç yaşı $57,9 \pm 9,4$ yıl olan olguların tümü 45 yaş üzerindedir (49-69 yaş arası). Ayrıca olguların UPDRSIII (on) skorları $34,5 \pm 11,3$ ve Hoehn Yahr değerleri de $2,3 \pm 0,7$ olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.1. Hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı

Cinsiyet	N	%
Kadın	40	48,2
Erkek	43	51,8
Toplam	83	100,0

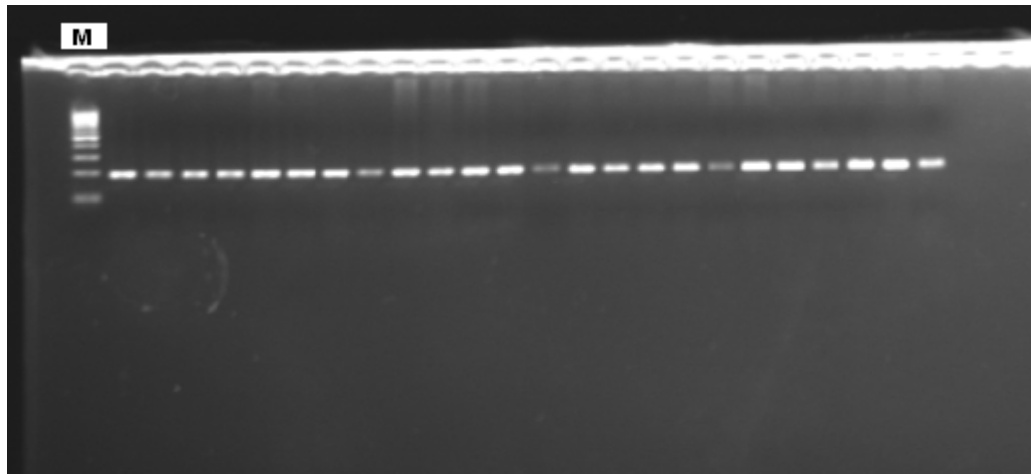
Tablo 4.2'de görüldüğü üzere olguların hastalık başlangıç yaşları ortalama $57,9 \pm 9,4$ yıl'dır. Hastaların %9,6'sı (n=8) erken başlangıçlı 50 yaş altı grubu, %90,4'ü (n=75) geç başlangıçlı 50 yaş üstü grubu oluşturmaktadır.

Tablo 4.2. Olguların hastalık başlangıç yaşına göre dağılımı

Klinik Tanı Yaşı	N	%
Erken Başlangıçlı <50	8	9,6
Geç Başlangıçlı \geq 50	75	90,4
Toplam	83	100,0

4.2. SNCA Geni Ekzon 2 Genomik Dizisinin İncelenmesi

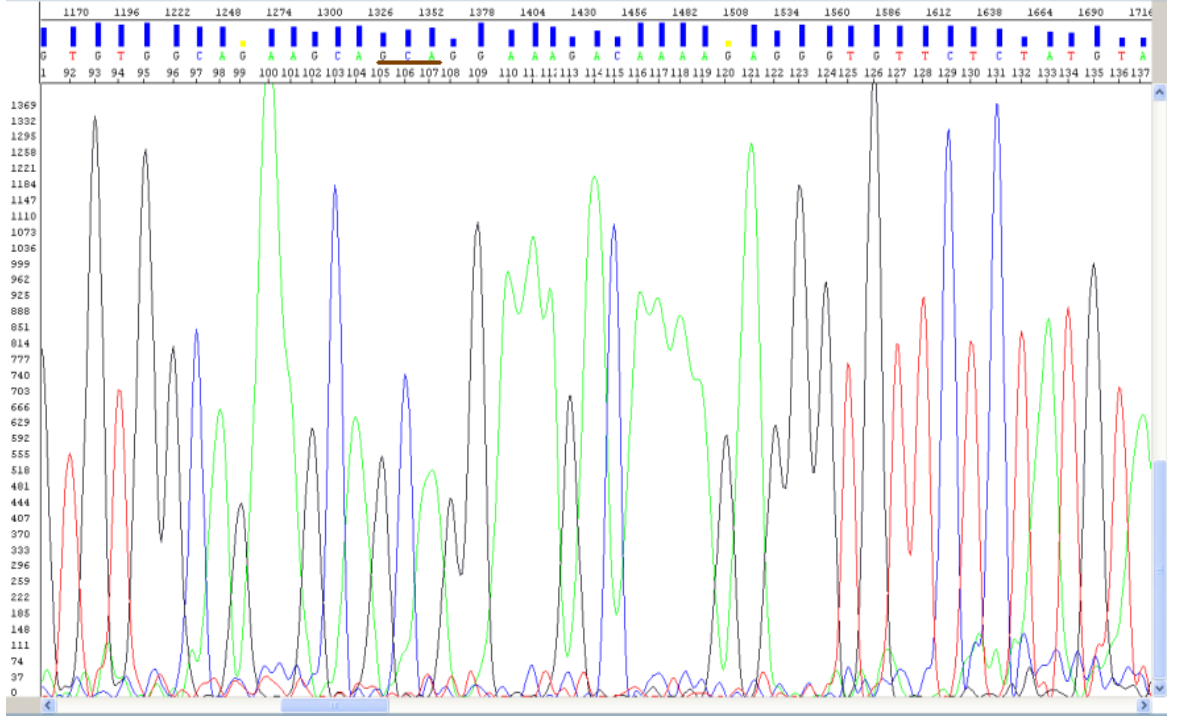
PH tanısı alan 83 olgunun DNA izolasyonu periferik kan örneklerinden gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrası DNA miktarı ve kalitesi Nanodrop spektrofotometre ile yapıldı. FastPCR programı kullanılarak dizayn edilen primerler ile toplamda 192 bp'lik genomik bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası jel elektroforezde bant kalitesi iyi olan örnekler sekans analizine alındı, bant kalitesi düşük olan örnekler için ise PCR işlemi tekrarlandı (Şekil 4.1).



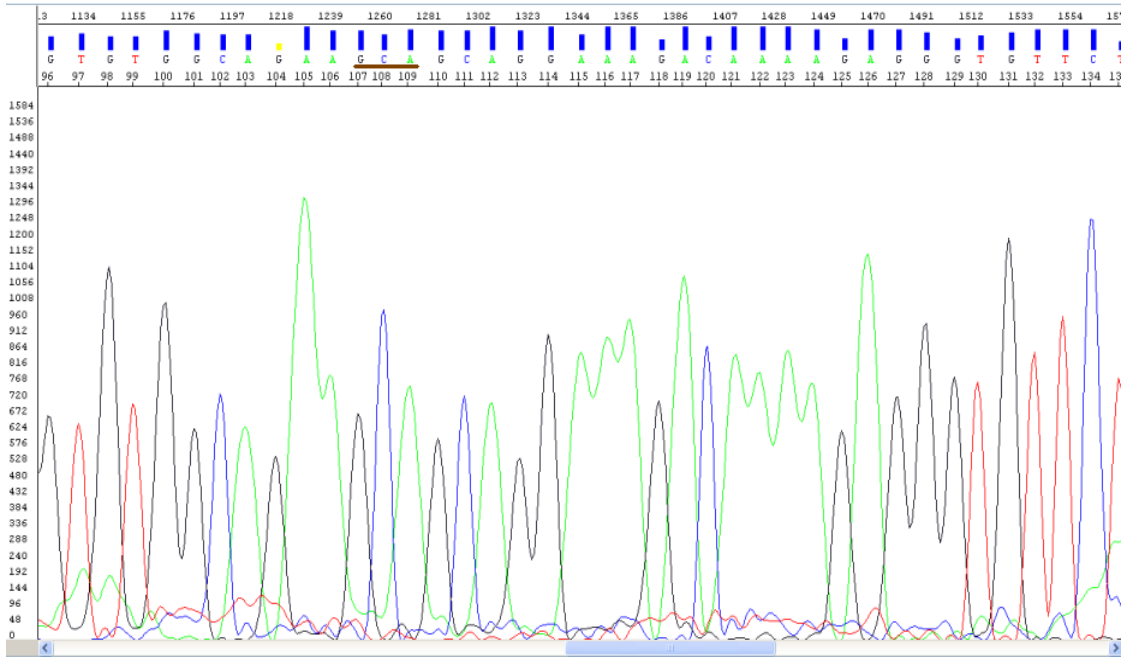
Şekil 4.1. SNCA ekzon 2 genomik dizilerin PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü. M: Marker (100 bp).

PCR sonrası elde edilen PCR ürünleri pürifikasyon, döngü dizileme ve DyeEx işlemlerinden geçirilerek SNCA geni ekzon 2 genomik bölgesinin sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Sekans analizi sonuçları NCBI insan genomik dizisi veri tabanı ile karşılaştırılmış ve PH tanısı alan olguların periferik kan örneklerinde

herhangi bir polimorfizm veya mutasyon saptanmamıştır. Şekil 4.2 ve şekil 4.3'te farklı hastalara ait dizi analizi görüntüsü örnek olarak gösterilmiştir.



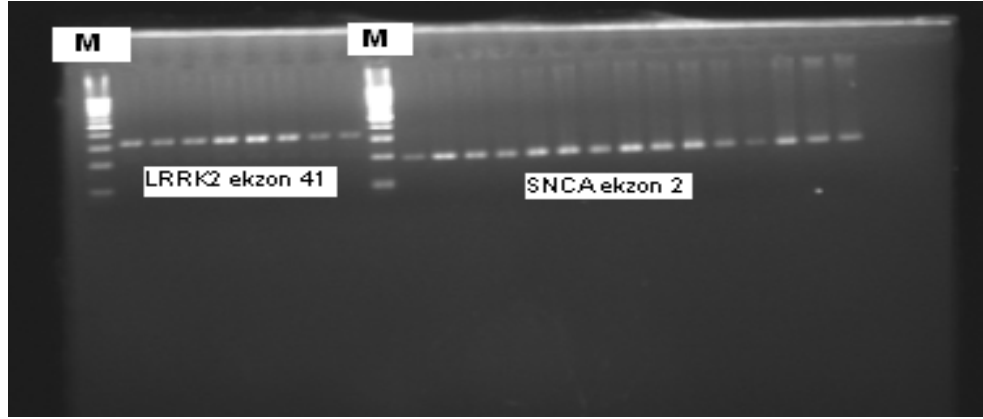
Şekil 4.2. 4886 protokol numaralı olgunun SNCA ekzon 2 genomik bölgesinin bir kısmına ait yabancı tip sekans analizi görüntüsü. Üstte kahverengi çizgi ile belirtilen dizi A30P mutasyon bölgesi.



Şekil 4.3. 5574 protokol numaralı olgunun SNCA ekzon 2 genomik bölgesinin bir kısmına ait yabancı tip sekans analizi görüntüsü. Üstte kahverengi çizgi ile belirtilen dizi A30P mutasyon bölgesi.

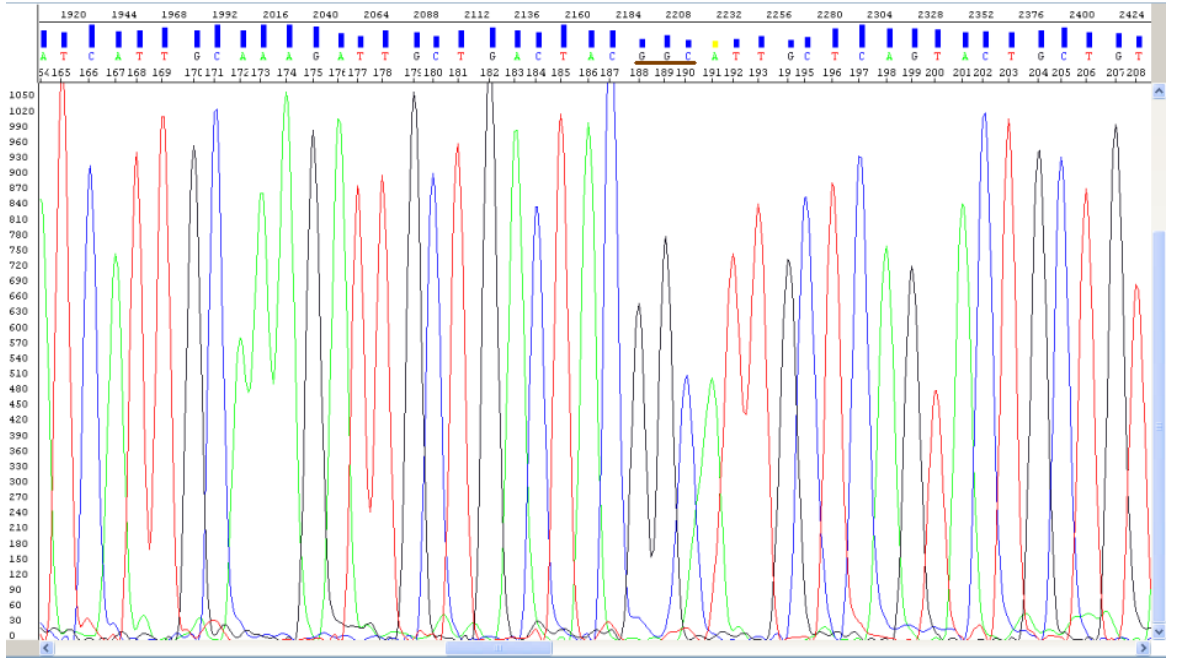
4.3. LRRK2 Geni Ekzon 41 Genomik Dizisinin İncelenmesi

PH tanısı alan 83 olgunun DNA izolasyonu periferik kan örneklerinden gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrası DNA miktarı ve kalitesi Nanodrop spektrofotometre ile yapıldı. FastPCR programı kullanılarak dizayn edilen primerler ile toplamda 329 bp'lık genomik bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası jel elektroforezde bant kalitesi iyi olan örnekler sekans analizine alındı, bant kalitesi düşük olan örnekler için ise PCR işlemi tekrarlandı (Şekil 4.4).

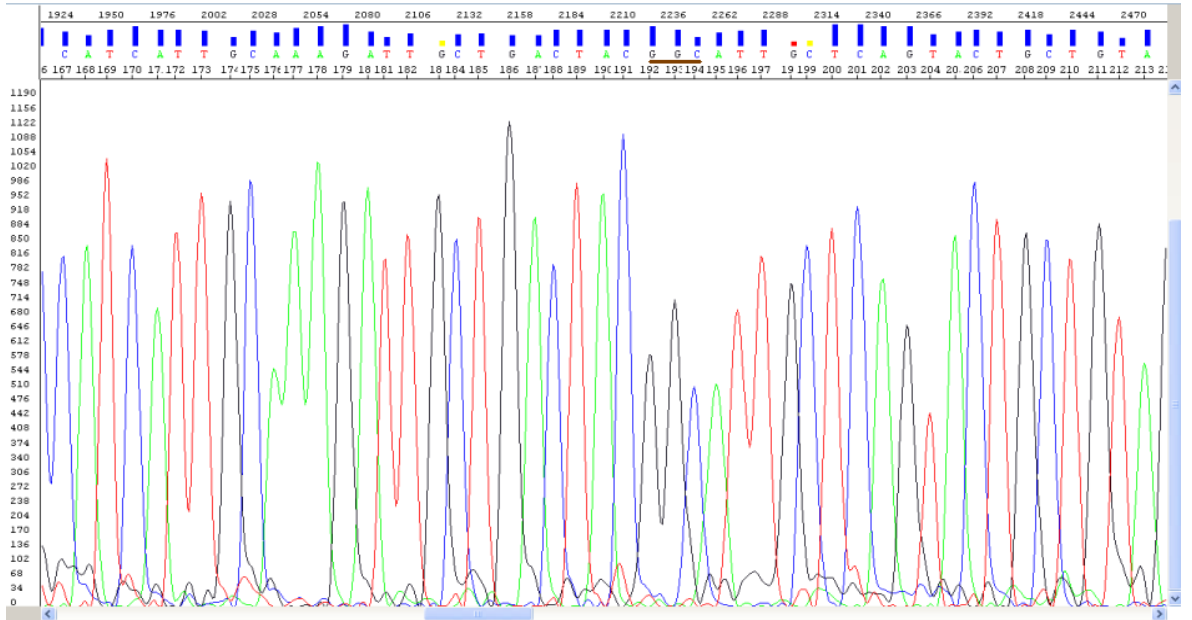


Şekil 4.4. LRRK2 ekzon 41 ve SNCA ekzon 2 genomik dizilerin PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü. M: Marker (100bp).

PCR sonrası elde edilen PCR ürünleri pürifikasyon, döngü dizileme ve DyeEx işlemlerinden geçirilerek LRRK2 geni ekzon 41 genomik bölgesinin sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Sekans analizi sonuçları NCBI insan genomik dizisi veri tabanı ile karşılaştırılmış ve PH tanısı alan olguların periferik kan örneklerinde herhangi bir polimorfizm veya mutasyon saptanmamıştır. Şekil 4.5 ve şekil 4.6'da farklı hastalara ait dizi analizi görüntüsü örnek olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.5. 4834 protokol numaralı olgunun LRRK2 ekzon 41 genomik bölgesinin bir kısmına ait yabancı tip sekans analizi görüntüsü. Üstte kahverengi çizgi ile belirtilen dizi G2019S mutasyon bölgesi.



Şekil 4.6. 5371 protokol numaralı olgunun LRRK2 ekzon 41 genomik bölgesinin bir kısmına ait yabancı tip sekans analizi görüntüsü. Üstte kahverengi çizgi ile belirtilen dizi G2019S mutasyon bölgesi.

5. TARTIŞMA

PH, Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen progressif nörodejeneratif bir hastalıktır. Görülme sıklığı toplumlara göre farklılık göstermekle birlikte 65 yaşta tüm popülasyonun yaklaşık %1'inin, 85 yaşta ise yaklaşık %4-5'inin hastalıktan etkilendiği bildirilmektedir. Yaşa göre prevalansın değiştiği bu hastalığa hayat boyu yakalanma riski kadınlarda %1,3 iken erkeklerde %2'dir (6,7). Bu sıklıkta gözlenen PH'nın tedavisi için yapılan harcamalar, ülkelerin sağlık giderlerine de yükler getirmektedir. PH'nın tanısına yönelik çeşitli tanı kriterlerinin kullanılmasına rağmen teşhis koymayı kesinleştiren net moleküler tanı yöntemi yoktur. PH tanısı alan olguların klinik farklılıklar göstermesi, tedaviye cevaplarının farklı olması, patolojik bulguların kimi hastalarda benzer olmaması farklı moleküler yolların patogeneizde etkili olduğunu düşündürmektedir. Bugün için genel olarak kabul edilen patogenetik mekanizmalar; anormal protein akümüasyonu, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve ÜPPDS olarak özetlenebilir. PH'dan sorumlu olarak gösterilen genler üzerinde yapılan çalışmalar nörodejenerasyon ile ilişkili bu patogenetik mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlamakta ve aynı zamanda hastalığın etkin bir şekilde tedavi edilebilmesi için yeni terapötik hedefler sunmaktadır.

PH'da familyal agregasyon gözlenmesi, açık bir şekilde mendeliyen kalıtım paterninin gözlendiği ailelerin tespit edilmesi ve genetik assosiasyon çalışmaları hastalığın etiolojisinde genetik faktörlerin önemli rol oynadığını düşündürmüştür. Bugüne kadar PH'nın genetik ile ilişkisini araştırmaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır ve genetik anormalliklerin hastalığın etiyopatogenezinde majör rol oynadığına dair bulgular gün geçtikçe artmaktadır. PH'nın genetik etiolojisinin araştırılmasına yönelik farklı yöntemlerin ve farklı hasta gruplarının kullanıldığı birçok çalışmanın bulguları doğrultusunda günümüzde PH ile ilişkili en azından 13 lokus ve 9 gen tanımlanmıştır. Tanımlanan bu 9 genden 6 tanesinin kesin hastalık sebebi olduğu belirtilmektedir. Tüm PH olgularının yaklaşık %5-10'unun tanımlanan bu genlerden birinde mutasyon taşıdığı bildirilmektedir (56).

Çalışmamıza Londra Beyin Bankası tanı kriterlerine göre PH tanısı alan 83 olgu dahil edilmiştir. Olguların klinik takip ve tedavileri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Hareket Bozukluğu Polikliniği

tarafından yapılmaktadır. Çalışmamızda asıl amacımız PH'dan sorumlu olduğu kesin olarak bildirilen PARK1 (SNCA) ve PARK8 (LRRK2) genlerinde tanımlanmış olan sırasıyla A30P ve G2019S mutasyonlarını araştırmaktır. A30P mutasyonu SNCA geninin ikinci ekzonunda bulunmaktadır. SNCA geninin ikinci ekzonu 146 bp uzunluğundadır ve araştırmamızda bu genomik bölge sekans analizi ile incelenmiştir. G2019S mutasyonu da LRRK2 geninin kırk birinci ekzonunda yer almaktadır. LRRK2 geninin kırk birinci ekzonu da 161 bp uzunluğundadır ve yine bu genomik bölgenin de tamamı sekans analizi ile incelenmiştir. Her iki ekzonun tamamının da dizilenmesi ile tanımlanan mutasyon bölgeleri dışında başka bir mutasyon veya polimorfizmin olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamıza dahil edilen 83 olgunun DNA örneklerinde gerçekleştirilen analizler sonucunda hiçbir hastada belirtilen mutasyonlar saptanmamıştır. Aynı zamanda analizi gerçekleştirilen genomik bölgelerde başka bir mutasyon veya polimorfizm de tespit edilmemiştir. Ülkemizde her iki mutasyonun da beraber araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Sadece G2019S mutasyonunun araştırıldığı bir çalışma bulunmaktadır. Bulgularımız ülkemizde ve diğer toplumlarda gerçekleştirilen benzer çalışmaların bulguları eşliğinde tartışılacaktır.

Kesin olarak PH ile ilişkilendirilen genlerden olan LRRK2 genindeki mutasyonlar, PH'nın en sık gözlenen genetik sebebidir. Bu gende en sık gözlenen mutasyon G2019S mutasyonudur. İlk olarak 2002 yılında Funayama ve ark. tarafından otozomal dominant kalıtımın gözlendiği Japon bir ailede gerçekleştirilen bağlantı analizleri ile bu genin lokusu 12q11.2-q13.1 olarak belirlenmiş ve bu lokus PH'dan sorumlu yeni bir bölge, PARK8 olarak adlandırılmıştır (86). 2004 yılında Zimprich ve ark. tarafından otozomal dominant kalıtım paterni ile uyumlu 21 Parkinson ailesinde yapılan bağlantı analizi sonucunda, PARK8 lokusu açısından 10 aile pozitif olarak değerlendirilmiş ve bu lokusun hastalığın etiyolojisinde daha sık etken olabileceği belirtilmiştir. Zimprich ve ark.'nın takip eden çalışmaları sonucunda bu lokusta yerleşen LRRK2 genindeki mutasyonlar tanımlanmış ve PH'nın etiyolojinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (87,99).

Yaklaşık 150 kb uzunluğunda olan ve 51 adet kodlayıcı ekzonu bulunan LRRK2 geninde şimdiye kadar 40'tan fazla nokta mutasyon bildirilmiş ancak delesyon, insersiyon gibi gen içi değişiklikler saptanmamıştır. LRRK2 gen

mutasyonları genel olarak ailesel vakaların %10'undan, sporadik vakaların da %3,6'sından sorumlu tutulmaktadır. Fakat bu oranlar toplumlara göre çok büyük farklılıklar göstermektedir. Bu gen üzerinde en sık gözlenen ve en iyi bilinen mutasyon G2019S mutasyonudur. G2019S mutasyonu Avrupa'da ailesel PH'da %2–3, sporadik PH'da ise %1–2 oranında görülmektedir (91). Özellikle Uzak Doğu ülkelerinde çok nadir gözlenen bu mutasyon Polonya, Yunanistan ve Almanya gibi Avrupa ülkelerinde de nispeten seyrek olarak tespit edilmektedir. Ancak Aşkenazi Yahudilerinde %10–30 ve özellikle de Kuzey Afrika'da familial ve sporadik olgular beraber değerlendirildiğinde %30–40 gibi bir sıklıkta görülmektedir (56). Irklar arasında gözlenen bu büyük farklılık nedeniyle Türk toplumunda görülme sıklığını araştırmak çalışmamızın amacını oluşturmuştur.

Tiziana ve ark. LRRK2 geni G2019S mutasyonunun sıklığını İtalyan hastalarda belirlemek amacıyla 98 PH tanısı alan olguyu çalışmalarına dahil etmişlerdir. 98 hastanın 12 tanesinde (%12) otozomal dominant kalıtım paterni ile uyumlu aile hikayesi mevcut iken geri kalan 86 olgu da (%88) sporadik PH olarak belirtilmiştir. Araştırmaları sonucunda ailesel olguların hiçbirinde G2019S mutasyonu saptanmazken sporadik vakalardan sadece 1 bayan olguda mutasyon saptanmıştır (%1.2). Sonuçta G2019S mutasyonu İtalyan popülasyonda PH için anlamlı bir etken olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca bu mutasyonun saptanabilmesi için yapılacak olan moleküler analizlerin, genetik danışma açısından önemini ve gerekliliğini belirtmişlerdir (100). Çalışmamıza dahil edilen hastaların tamamı sporadik olgulardı. Hiçbir hastada bu mutasyonun saptanmaması Türk popülasyonda G2019S mutasyonunu saptamaya yönelik yapılacak moleküler analizlerin genetik danışmada önemli olacağı sonucuna ulaşmamızı engellemiştir.

İsrail'de Orr-Urtreger ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 472 sporadik PH tanısı alan olgu değerlendirilmiştir. Hastalardan 344'ü her iki ebeveyn tarafından, 14'ü sadece bir ebeveyn tarafından Aşkenazi kökenli iken 114 olgu da non-Aşkenazi kökenli olarak saptanmıştır. Aşkenazi kökenli hastalarda G2019S mutasyon sıklığı %14,8 olarak saptanırken non-Aşkenazi kökenli olgularda ise sıklık %2,7 olarak bulunmuştur (106). Sonuçta G2019S mutasyonunun, bizim çalışmamızdan farklı olarak, Aşkenazi Yahudilerinde PH'nın sık görülen bir nedeni olduğunu ortaya koymuştur.

Bras ve ark.'nın Portekiz popülasyonunda gerçekleştirdikleri çalışmada toplam 128 olgu incelenmiştir. 26 olguda aile hikayesi mevcut iken 102 olgu sporadik olarak değerlendirilmiştir. Klinik tanıda Londra Beyin Bankası tanı kriterlerinin kullanıldığı belirtilmiştir. Hastaların tamamında LRRK2 geninin tüm ekzonları incelenmiş ancak G2019S mutasyonu dışında başka bir mutasyon saptanmamıştır. G2019S mutasyonu 5 sporadik olguda ve iki ailede saptanmıştır. Toplamda 11 hastanın bu mutasyonu taşıdığı tespit edilmiş ve oran %9 olarak bulunmuştur. İki ailedeki sekonder olgular çıkarıldığında probandlardaki mutasyon prevalansı 7/124 (%6) olarak belirlenmiştir. Yine Portekiz popülasyonunda yapılan başka bir çalışmada 107 sporadik ve 31 ailesel PH tanısı alan olgu incelenmiş ve toplamda 9 hastada (%6,52) G2019S mutasyonu saptanmıştır. Mutasyon tespit edilen olgulardan 4'ü sporadik (4/107 - %3,74), 5'i de ailesel (5/31 - %16,1) PH olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak tipik PH kliniği ile prezente olan Portekizli hastalarda G2019S mutasyonu oldukça sık gözlenmektedir (101). Çalışmamız göstermiştir ki Türk popülasyonu G2019S mutasyonu sıklığı açısından Portekiz popülasyonu ile benzerlik göstermemektedir.

İspanya'da 302 PH tanısı almış (94 ailesel, 208 sporadik) olgunun dahil edildiği bir çalışmada G2019S mutasyon sıklığı %4,3 olarak bulunmuştur. Ailesel ve sporadik olgular ayrı ayrı değerlendirildiğinde bu mutasyonun ailesel olgularda görülme sıklığı %6,4 iken sporadiklerde de %3,4 olarak tespit edilmiştir (103). Rusya'da 291 sporadik, 13 ailesel PH tanısı alan olgunun incelendiği bir çalışmada G2019S mutasyonu sporadik vakalarda %0,7 (2/291) sıklıkta saptanırken ailesel vakalarda ise %7,7 (1/13) olarak bulunmuştur (104). Brezilya'da gerçekleştirilen 154 olgunun araştırıldığı bir çalışmada da G2019S mutasyon sıklığı yaklaşık %2 olarak belirlenmiştir. Tüm bu çalışmalar doğrultusunda bizim araştırmamız göstermektedir ki Türk toplumunda G2019S mutasyon sıklığı diğer toplumlarla uyumlu değildir.

Uzak doğuda Fung ve ark. tarafından Tayvan popülasyonunda gerçekleştirilen bir çalışmada G2019S mutasyonunun sporadik PH tanısı alan olgularda gözlenmemiştir. Bu mutasyonun Avrupa'daki sıklığı da Avrupa veya Kuzey Afrika merkezli bir founder etki ile olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Yine aynı popülasyonda yürütülen başka bir çalışmada LRRK2 geninde farklı bir mutasyon olan G2385R mutasyonunun sıklığı araştırılmıştır. Sporadik PH tanısı alan 305

olgunun dahil edildiği çalışmada G2385R mutasyonu hastaların 27'sinde (%9) saptanmıştır. Benzer bulguların Çinli popülasyonda da saptanması, uzak doğuda G2019S mutasyonundan önce G2385R mutasyonunun çok daha sık olarak gözlemlendiğini ortaya koymuştur (102). Çalışmamız G2019S mutasyonunun sıklığı açısından Tayvan ve Çin popülasyonları ile benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla Türk popülasyonunun bahsi geçen Avrupa veya Kuzey Afrika kökenli founder etkiden etkilenmediğini düşündürmüştür.

Tablo 5.1. G2019S mutasyonunun farklı toplumlardaki sıklığı

Yazar-Yıl (ref.)	Bölge	Tüm PH Olguları		Ailesel PH Olguları		Sporadik PH Olguları	
		Hasta Sayısı	G2019S Taşıyıcısı (%)	Hasta Sayısı	G2019S Taşıyıcısı (%)	Hasta Sayısı	G2019S Taşıyıcısı (%)
Bras ve ark. 2005 ⁽¹⁰¹⁾	Portekiz	124	7 (%5.6)	22	2 (%9.1)	102	5 (%5.9)
Gaig ve ark. 2006 ⁽¹⁰³⁾	İspanya	302	13 (%4.3)	94	6 (%6.4)	208	7 (%3.4)
Lesage ve ark. 2006 ⁽¹⁰⁵⁾	Kuzey Afrika	76	30 (%39)	27	10 (%37)	49	20 (%41)
Orr ve ark. 2007 ⁽¹⁰⁶⁾	Aşkenazi	344	51 (%14.8)	96	25 (%26)	246	26 (%10.6)
Tiziana ve ark. 2007 ⁽¹⁰⁰⁾	İtalya	98	1 (%1.02)	12	0	86	1 (%1.2)
Kay ve ark. 2006 ⁽⁹¹⁾	ABD	1425	18 (%1.3)	329	10 (%3)	1096	8 (%0.7)
Aasly ve ark. 2005 ⁽¹⁰⁷⁾	Norveç	433	7 (%1.6)	65	6 (%9.2)	368	1 (%0.27)
Xiromerisiou ve ark. 2007 ⁽¹⁰⁸⁾	Yunanistan	290	1 (%0.34)	55	0	235	1 (%0.42)

Tablo 5.1. G2019S mutasyonunun farklı toplumlardaki sıklığı (Devamı)

Yazar-Yıl (ref.)	Bölge	Tüm PH Olguları		Ailesel PH Olguları		Sporadik PH Olguları	
		Hasta Sayısı	G2019S Taşıyıcısı (%)	Hasta Sayısı	G2019S Taşıyıcısı (%)	Hasta Sayısı	G2019S Taşıyıcısı (%)
Zabetian ve ark. 2006 ⁽⁹¹⁾	Japonya	586	2 (0.34)	32	0	554	2 (%0.36)
Punia ve ark. 2006 ⁽¹⁰⁹⁾	Hindistan	778	1 (%0.13)	60	0	718	1 (%0.14)
Bialecka ve ark. 2005 ⁽¹¹⁰⁾	Polonya	174	0	21	0	153	0
Burgunder ve ark. 2008 ⁽¹¹¹⁾	İsviçre	73	0	0	0	73	0
Pimentel ve ark. 2008 ⁽¹¹²⁾	Brezilya	154	3 (%2)	23	2 (%8.7)	131	1 (%0.8)
Illarioshkin ve ark. 2007 ⁽¹⁰⁴⁾	Rusya	304	3 (%0.98)	13	1 (%7.7)	291	2 (%0.7)
Çalışmamız 2010	Türkiye	83	0	0	0	83	0

Tablo 5.1’de farklı toplumlarda G2019S mutasyonu sıklığını belirlemek için gerçekleştirilen çalışmaların özeti sunulmaktadır. G2019S mutasyonu özellikle Kuzey Afrika ve Aşkenazi Yahudilerinde çok sık olarak gözlenirken Portekiz, İspanya ve Brezilya gibi ülkelerde de nispeten sık olarak saptanmaktadır. Yunanistan, Polonya ve İsviçre gibi Avrupa ülkelerinde ise çok az olarak G2019S mutasyonuna rastlanmaktadır. Japonya, Çin, Hindistan gibi Uzak Doğu ülkelerinde çok fazla sayıda hasta grubu ile çalışmalar yapılmasına rağmen G2019S mutasyonu çok nadir olarak saptanmıştır.

G2019S mutasyonu taşıyan PH olgularında 3 farklı haplotipin bulunduğu belirtilmektedir. Haplotip 1 en sık gözlenen formdur. Avrupalı Amerikalılarda, Kuzey Afrikalılarda ve Aşkenazi Yahudilerinde yaygın olarak gözlenmektedir. Haplotip 2 az gözlenen formdur ve özellikle batı Avrupa G2019S mutasyonu taşıyan olguların paylaştığı haplotiptir. Haplotip 3 ise farklı bir haplotipi temsil etmektedir ve Japon popülasyonunda tespit edilmiştir. Şimdiye kadar sadece bir Türk olguda G2019S mutasyonu saptanmıştır ve bu hastanın da Japon hastalara benzer şekilde haplotip 3'ü taşıdığı belirlenmiştir. 52'si familial (32 OD, 20 OR kalıtım) 26'sı sporadik toplamda 78 Türk PH olgusunun dahil edildiği çalışmada LRRK2 geni 41. ekzon dizilenmiş ve ailesel olgularda sadece birinde G2019S mutasyonu saptanırken sporadik olgularda bu mutasyon bulunamamıştır (113). Türk hasta grubunda gerçekleştirilen bu çalışmada özellikle ailesel olgular araştırılırken sporadik olgu sayısı az tutulmuştur. Bizim çalışmamıza ise ailesel olgular dahil edilmemiştir. Mutasyon taşıyan bireyin haplotip 3'ü taşıması, Uzak Doğu ülkelerinde de LRRK2 geninde G2019S mutasyonundan önce farklı mutasyonların daha sık gözlenmesi (özellikle G2385R mutasyonu), Türk toplumunda da Uzak Doğu ülkelerine benzer şekilde diğer mutasyonların daha sık gözlenebileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda incelediğimiz bir diğer gen olan SNCA geni kromozomal olarak 4q21'de yerleşmekte ve 140 aminoasit uzunluğunda α -sinüklein proteinini kodlamaktadır. Bu gen genetik geçişli PH'da bulunan ilk gendir. Bu gen üzerinde tanımlanan ilk mutasyon olan A53T mutasyonu 1997 yılında Polymeropoulos ve ark. tarafından otozomal dominant kalıtım paterninin gözlendiği İtalyan ve Yunanlı ailelerde tespit edilmiştir (57). Şimdiye kadar bu gen üzerinde üç adet nokta mutasyon saptanmıştır: A30P, A53T ve E46K. Nokta mutasyonların yanı sıra genin kopya sayısı artışları (duplikasyon, triplikasyon) sonucu da PH'nın geliştiği bildirilmektedir.

A53T mutasyonu taşıyan olgulardaki klinik bulgular kısmen erken başlangıçlı form ile yakın olsa da; A30P mutasyonu taşıyan olguların klinik bulgularının sporadik PH ile benzer özellikte olduğu belirtilmektedir. A30P mutasyonu ilk olarak 1998 yılında Kruger ve ark. tarafından tanımlanmıştır. 192 sporadik ve 7 ailesel PH olgularının incelendiği çalışmada hastalarda öncelikle RFLP yöntemiyle A53T mutasyonu araştırılmış ancak hiçbir hastada bu mutasyon saptanmamıştır. Daha

sonra bu olgularda SNCA geninin kodlayıcı ekzonları SSCP ve sekans analizi ile incelendiğinde ailesel olguların birinde A30P mutasyonu saptanmıştır. Sonuçta PH'nın patogeneğinde A30P mutasyonunun da katkısı olabileceği belirtilmiştir (67).

Xiromerisiou ve ark. 235 sporadik, 55 ailesel PH olgularında SNCA ve LRRK2 genlerini incelemiştir. Her iki genin tüm ekzonları sekans analizi ile incelenmiş ayrıca SNCA geninde kuantitatif dupleks PCR yöntemiyle de dozaj değişiklikleri araştırılmıştır. Olguların hiçbirinde SNCA geninde genomik değişiklik saptanmadığını bildirmişlerdir (108). Anh ve ark. 906 Koreli sporadik Parkinson hastasında SNCA gen multiplikasyonlarını araştırmışlar ve sadece 3 olguda (%0,3) SNCA gen duplikasyonu saptamışlardır. Duplikasyon saptanan olgular tekrar değerlendirildiğinde bir olguda aile hikayesi pozitif olarak saptanmış ve sporadik olgulardaki oran 2/907 (%0,23) olarak düzeltilmiştir (40). Sonuçta sporadik PH olgularında nokta mutasyondan ziyade gen dozaj değişikliklerinin daha sık gözlemlendiği belirtilmiştir. Çalışmamızda incelenen hiçbir sporadik olguda SNCA geninde nokta mutasyon saptanmaması literatür ile uyumludur.

Ross ve ark. 4q21 bölgesinde multiplikasyon saptanan beş ailede SNP mikroarray tekniği ile SNCA geni multiplikasyonlarını araştırmışlardır. Her ailedeki multiplikasyonların de novo olarak oluştuğunu bildirmişler ve bunun da allellerden birinde meydana gelen segmental duplikasyon veya alleller arası dengesiz 'crossing-over' sebebiyle oluştuğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda sporadik PH ile ilişkilendirilen SNCA varyantlarının (duplikasyon, triplikasyon) da bu olgularda sık olarak gözlenebileceği şeklinde yorumlamışlardır (69).

Çalışmamız ve literatür bulguları beraber değerlendirildiğinde SNCA geninde tespit edilen A30P gibi nokta mutasyonların sporadik PH'da sık gözlenen bulgular olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Literatür bilgilerine bakıldığında SNCA geninde tanımlanmış olan A30P gibi nokta mutasyonların özellikle ailesel PH'da bildirildiği gözlenmiştir. Yapılan araştırmalarda sporadik olgularda bu nokta mutasyonlar saptanmamıştır. Çalışmamızda da değerlendirilen hiçbir olguda SNCA geninde nokta mutasyon tespit edilmemiştir. Dolayısıyla sporadik PH olgularında SNCA geni için öncelikle multiplikasyonların araştırılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Londra beyin Bankası tanı kriterlerine göre sporadik PH tanısı alan 83 olgunun SNCA ve LRRK2 genlerinin sırasıyla 2. ve 41. ekzonları DNA dizileme yöntemi ile incelenmiştir. Araştırmamızdaki asıl amacımız, SNCA geninde tanımlanmış olan A30P ve LRRK2 geninde tanımlanmış olan G2019S mutasyonlarının Eskişehir bölgesinde tanı alan olgulardaki sıklığının belirlenmesi, tanısal amaçlı kullanılabilirliği ve ayrıca elde edilen veriler ile moleküler etiyojisi belirlenmiş olan olgulara hastalığı ve mutasyonu ile ilgili genetik danışmanın verilmesidir. Çalışmada DNA dizileme yönteminin kullanılması sadece yukarıda bahsedilen mutasyonların incelenmesini değil aynı zamanda ilgili ekzonların tamamının genomik dizisinin araştırılmasını da olanaklı hale getirmiştir.

PH olgularının kan örneklerinde SNCA ekzon 2 ve LRRK2 ekzon 41 genomik dizilerinde araştırmaya sonucunda herhangi bir polimorfizm veya nokta mutasyonu saptanmamıştır.

G2019S mutasyonu LRRK2 geni ekzon 41 genomik bölgesinde bulunduğu için bu bölge DNA dizileme yöntemi ile incelenmiştir. Bu mutasyon birçok toplumda araştırılmış ve Aşkenazi Yahudileri gibi bazı toplumlarda yüksek sıklıkta gözleendiği belirlenmiştir. Ayrıca G2019S mutasyonu sporadik PH ile benzer klinik tablo göstermektedir. Bu sebeplerden dolayı G2019S mutasyonu araştırma grubumuzu oluşturan sporadik PH olgularında çalışılmıştır ancak hiçbir olguda saptanmamıştır. Dolayısıyla sporadik PH tanısı alan Türk olgularda G2019S mutasyonunun sık gözlenen bir mutasyon olmadığı sonucuna varılmıştır.

Şimdiye kadar G2019S mutasyonu ile ilgili Türk olgularda sadece bir adet çalışma yapılmış ve ailesel PH olgularından bir tanesinde G2019S mutasyonu saptanmıştır. Bu bireyin de G2019S mutasyonu açısından bildirilen haplotiplerden özellikle uzak doğu ülkelerinde gözlenen haplotip 3'ü taşıdığı bildirilmiştir.

Literatür bilgilerine bakıldığında uzak doğuda sporadik PH tanısı alan olgularda G2019S mutasyonunun çok nadir gözleendiği bildirilmektedir. Bu bilgi doğrultusunda çalışmamız Türk olguların uzak doğudaki olgularla benzer özellik gösterdiğini düşündürmüştür. Ayrıca Uzak Doğuda sporadik PH tanısı alan olgularda G2019S mutasyonundan önce LRRK2 geninde farklı nokta mutasyonların (özellikle

G2385R mutasyonu) çok daha sık gözlenmesi, Türk olgularda da G2385R mutasyonu gibi Uzak Doğuda sık gözlenen mutasyonlar üzerinde durulması gerektiğini düşündürmüştür.

A30P mutasyonu SNCA geni ekzon 2 genomik bölgesinde bulunduğu için bu bölge DNA dizileme yöntemiyle incelenmiştir. Bu mutasyon sporadik PH kliniği ile benzer klinik tablo gösterdiğinden dolayı araştırma grubumuzu oluşturan sporadik PH olgularında çalışılmıştır. Ancak hiçbir olguda bu mutasyon saptanmamıştır. Literatür bilgileri incelendiğinde SNCA geninde tanımlanmış olan A30P gibi nokta mutasyonlar, ailesel PH'da saptanmıştır. Sporadik PH olgularında gerçekleştirilen benzer çalışmalarda da bu mutasyon saptanmamıştır.

Sporadik PH olgularında SNCA genine yönelik yapılan araştırmalar değerlendirildiğinde bu hastalarda nokta mutasyon değil SNCA geni multiplikasyonlarının (duplikasyon, triplikasyon) nispeten sık olarak bulunduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda da hiçbir hastada nokta mutasyon saptanmaması sporadik PH olgularında SNCA geni nokta mutasyonlarından önce bu gendeki multiplikasyonların araştırılmasının daha uygun olacağını düşündürmüştür.

KAYNAKLAR

1. Bodis-Wolner I. Neuropsychological and perceptual defects in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2003;9(2):83-89.
2. Kütükçü Y. Parkinson hastalığının ayırıcı tanısı. *Türkiye klinikleri J Neurol-Special Topics*. 2008;1(4):35-45.
3. Adams RD, Victor M, Ropper AH. *Principles of Neurology*. 6 th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 1997:1067-1068.
4. Guyton AC, Gökhan N, Çavuşoğlu H. Beyin sapı ve bazal gangliyonların motor fonksiyonları (Çeviri). İstanbul: Merck Yayıncılık; 1987:888-905.
5. Fearnley JM, Less AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*. 1991;114(5):2283-2301.
6. Elbaz A, Bower JH, Maraganore DM. Parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol*. 2002;55:25-31.
7. Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann NY Acad Sc*. 2003;991:1-14.
8. Özkan S. Parkinson hastalığının etiyolojisi. *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics*. 2008;1(4):6-14.
9. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Accelerated invitro fibril formation by a mutant a-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature Medicine*. 1998;4:1318-1320.
10. Litva I, Bhatia KP, Burn DJ, Goetz CG, Lang AE, McKeith I, Quinn N, Sethi KD, Shults C, Wenning GK. Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders. *Movement Disorders Society Scientific Issues*. 2003;18(5)467-486.
11. Doğu O. Temel bilimler: Epidemiyoloji ve etiyoloji hakkında öğrettikleri. *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics*. 2008;1(4):1-5.
12. Elibol B. Parkinson hastalığından patogenez: Nöron kaybı mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics*. 2008;1(4):15-22.

13. Duvasion RC. History of Parkinsonism. *Pharmacology and Therapeutics*. 1937;32:1-17.
14. Korell M, Taner CM. Epidemiology of Parkinson's Disease: An Overview. In: Edabi M, Pfeiffer RF, editörs. *Parkinson's Disease*. New York: CRC Pres; 2005. p.39-50.
15. Adler C, Ahlhog JE. Current Clinical Practice. *Parkinson's Disease and Movement Disorders*. New Jersey: 2000. p93-113.
16. Rajput AH, Birdi S. Epidemiology of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 1997;3:175-186.
17. Farrer MJ. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet*. 2006;7(4):306-318.
18. Arialdi M, 21-8-2007, 'National Final Statistics Reports' Deaths: Final Data for 2004, USA Government, Vol 55, No 19.
19. Harada H, Nishikawa S, Takahaski K. Epidemiology of Parkinson's disease in Japanese city. *Arch Neurol*. 1983;40:151-154.
20. Torun Ş, Uysal M, Gücüyener D, Özdemir G. Parkinson's Disease in Eskisehir, Turkey. *Eur J*. 1995; 2(1):44-45.
21. Taner CM, Hubble JP, Chan P. Epidemiology and genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1997:137-152.
22. Pienaar IS, Daniels WM, Gotz J. Neuroproteomics as a promising tool in Parkinson's disease research. *J Neural Transm*. 2008;115(10):1413-1430.
23. de Rijk MC, Breteler MMB, den Breeijen JH. Dietary antioxidants and Parkinson disease: the Rotterdam Study. *Arch Neurol*. 1997;54:762-765.
24. Brighina L, Frigerio R, Schneider NK, Lesnick TG, de AM, Cunningham JM, Farrer MJ, Lincoln SJ, Checkoway H, Rocca WA, Maraganore DM. Alpha-synuclein, pesticides, and Parkinson disease: a case control study. *Neurology*. 2008;70(16 Pt 2):1461-1469.

25. Weintraub D, Stern MB. Psychiatric complications in Parkinson disease. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2005;13(10):844-851.
26. Rajput AH. Clinical features of tremor in extrapyramidal syndromes. In: Findley LJ, Koller WC, editörs. *Handbook of tremor Disorders*. New York: Marcel Dekker Inc; 1995. s. 275-291.
27. Gilroy J. 'Movement Disorders' *Basic Neurology*. USA: The McGraw-Hill Companies; 2000.
28. Çakmur R. Parkinson hastalığının epidemiyolojisi ve klinik özellikleri. *Türkiye Klinikleri Nöroloji Dergisi*. 2008;15-17.
29. Fahn S. Parkinsonism. In: Rowland LP, editör. *Merrit's Textbook of Neurology*. 9th ed. Baltimore: Md. Lipincott Williams & Wilkins; 1995. p. 713-730.
30. Alan E, Guttmacher M, Collins FS. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *The New England J of Med*. 2003;348:1356-1364.
31. Apaydın H. Alfa-Sinüklein hastalıkları. *Parkinson Hastalığı ve Hareket Bozukları dergisi*. 1999;2(1):23-30.
32. Stacky M. Managing late complications of Parkinson's disease. *Medical Clinics of North America*. 1999;83(2):469-480.
33. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 2006;97(6):1634-1658.
34. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurol Sci*. 1985;1:22-26.
35. Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Med Bull*. 1993;49:577-587.
36. Sulzer D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *TINS*. 2007;30:244-50.
37. Kramer ML, Schulz-Schaeffer WJ. Presynaptic α -synuclein aggregates, not Lewy bodies, cause neurodegeneration in dementia with Lewy bodies. *J Neurosci*. 2007;27(6):1405-10.

38. Tofaris GK, Spillantini MG. Physiological and pathological properties of alpha-synuclein. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(2):194-201.
39. Di NM, Shah IM, Steward DA. Molecular pathways and genetic aspects of Parkinson's disease: from bench to bedside. *2007;7(12):1693-1729.*
40. Ahn TB, Kim SY, Kim JY, Park SS, Lee DS, Min HJ, Kim YK, Kim SE, Kim JM, Kim HJ, Cho J, Jeon BS. Alpha-Synuclein gene duplication is present in sporadic Parkinson disease. *2008;70(1):43-49.*
41. Cookson MR, van der Brug M. Cell systems and toxic mechanism(s) of α -synuclein. *Exp Neurol.* 2008;209:5-11.
42. Shapira AH. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Death and Differentiation.* 2007;14(7):1261-1266.
43. Thomas B, Beal MF. Parkinson' disease. *Hum Mol Genet.* 2007;16:183-94.
44. Shapira AH. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology. AAN.* 2006;66:10-23.
45. Passarge E, Wirth J, Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö. Mitokondride, genetik olarak denetlenen enerji iletim işlemleri(Çeviri). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2000:116-117.
46. Beal M.F. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Acta.* 1998;1366:211-223.
47. Fukae J, Mizuno Y, Hattori N. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Mitochondria.* 2007;7:58-62.
48. Toft M, Farrer M. Genetics of Parkinson's disease. In Galvez-Jimenez, editör. *The scientific basis for the treatment of Parkinson's disease.* 2nd ed. New York: Taylor & Francis Group; 2005. p.121-9.
49. Lim KL, Tan JM. Role of the Ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. *BMC Biochemistry.* 2007;8:11-13.
50. Shapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2008;7(1):97-109.

51. McNaught KS, Olanow CW. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;53(13):73-84.
52. Olanow CW, McNaught KP. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006;21:1806-23
53. Calne DB. Parkinson's disease is not one disease. *Park Rel Disord*. 2001;7:3-7.
54. Cordato DJ, Chan DKY. Genetics and Parkinson's disease. *Clin Neurosci*. 2004;11(2):119-123.
55. Vila M, Przedborski S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nature Med*. 2004;10:58-62.
56. Suzanne L, Alexis B. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Gen*. 2009;18:48-59.
57. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di IG, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997;276(5321):2045-2047.
58. Vila M, Przedborski S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nature Med*. 2004;10:58-62.
59. Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizonu Y, Hattori N. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2006;59(2):298-309.
60. Goedert M. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and α -synucleinopathies. *Philosophical Transactions of Royal Society*. 1999;354:1101-1118.
61. Murray IVJ, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Synucleinopathies: a pathological and molecular review. *Clin Neurosci Res*. 2001;1:445-455.

62. Ozansoy M, Başak AN. Parkinson hastalığının genetiği ve nörodejenerasyonun moleküler biyolojisi. *Parkinson Hast Hareket Boz Der.* 2004;7(2):109-120.
63. Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, Rao RK, Wanner T, Tanzi RE, Sawa A, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. Inducible expression of mutant α -synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Gen.* 2001;10:919-926.
64. Mouradian MM. Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology.* 2002;58:179-185.
65. Burke RE. α -Synuclein and Parkin: coming together of pieces in puzzle of Parkinson's disease. *Lancet.* 2001;358:1567-1568.
66. Spira PJ, Sharpe DM, Halliday G, Cavanagh J, Nicholson GA. Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr α -synuclein mutation. *Ann Neurol.* 2001;49:313-319.
67. Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schöls L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene coding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 1998;18:106-108.
68. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecqu C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Deste A. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. 2004;364(9440):1167-1169.
69. Ross OA, Braithwaite AT, Skipper LM, Kachergus J, Hulihan MM, Middleton FA, Nishioka K, Fuchs J, Gasser T, Maraganore DM, Adler CH, Larvor L, Chartier-Harlin MC, Nilsson C, Langstrom JW, Gwinn K, Hattori N, Farrer MJ. Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism. *Ann Neurol.* 2008;63(6):743-750.
70. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura M, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. 1998;392(6676):605-608.

71. Stenson PD.2008.The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff[online].<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> html [01/10/2010].
72. Frézal J. 20/10/2010. Genatlas Université René Descartes - Paris. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/html> [21/10/2010].
73. Zhang Y, Gao J, Chung KKK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM.Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein.Proc. Natl. Acad. Sci.2000;97:13354-13359.
74. Klein C, Schlossmacher MG.The genetics of Parkinson disease: implications for neurological care.Nature Med.2006;3:136-146.
75. Hattori N, Machida Y, Sato S, Noda K, Iijima-kitami M, Kubo S. Molecular mechanisms of nigral neurodegeneration in Park2 and regulation of parkin protein by other proteins.J Neural Trans.2006;70:205-8.
76. Tan LC, Tanner CM, Chen R, Chan P, Farrer M, Hardy J, Langston JW.Marked variation in clinical presentation and age of onset in a family with a heterozygous parkin mutation.Mov Disord.2003;18(7): 758-63.
77. van de Warrenburg BPC, Lammens M, Lucking CB.Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. Neurology.2001;56:555–557.
78. Gasser T.Genetics of Parkinson’s disease.J Neurol.2001;248:833–840.
79. Leroy E, Boyer R, Auburger G.The ubiquitin pathway in Parkinson’s disease. Nature.1998;395:451– 452.
80. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del TD, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deler T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW.Hereditary early-onset Parkinson’s disease caused by mutations in PINK1.2004;304(5674):1158-1160.

81. Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V, Romito L, Albanese A, Dallapiccola B, Bentivoglio AR. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol*. 2004;56(3):336-341.
82. van Duijin CM, Dekker MC, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJ, Testers L, Breedveld GJ, Horstink M, Sandkuijl LA, van Swieten JC, Oostra BA, Heutink P. Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *2001;69(3):629-634*.
83. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joesse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijin CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *2003;299(5604):256-259*.
84. Moore DJ, Zhang L, Troceno J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, Dawson TM, Dawson VL. Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *2005;14(1):71-84*.
85. Pal PK, Wszolek ZK. Hereditary Parkinsonism. In: Edabi M, Pfeiffer RF, editors. *Parkinson's Disease*. New York: CRC Press; 2005;14:139-158.
86. Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. A new locus for Parkinson's disease (Park8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol*. 2002;51:296-301.
87. Zimprich A, Muller-Mysok B, Farrer M, Leitner P, Sharma M, Hulihan M, Lockhart P, Strongosky A, Kachergus J, Calne DB, Stoessl J, Uitti RJ, Pfeiffer RF, Trenkwalder C, Homann N, Ott E, Wenzel K, Asmus F, Hardy J, Wszolek Z, Gasser T. The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. *2004;74(1):11-19*.
88. Lu YW, Tan EK. Molecular biology changes associated with LRRK2 mutations in Parkinson's disease. *J Neurosci Res*. 2008;86:1895-901.

89. Taylor JP, Mata IF, Farrer MJ. LRRK2: a common pathway for parkinsonism, pathogenesis and prevention? *TRENDS Mol Med*. 2006;12:76-82.
90. Paisan-Ruiz C, Nath P, Washecka N, Gibbs JR, Singleton AB. Comprehensive analysis of LRRK2 in publicly available Parkinson's disease cases and neurologically normal controls. *Hum Mutat*. 2008;29:485-490.
91. Healy DG, Falchi M, O'sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case control study. *Lancet Neurol*. 2008;7:583-590.
92. Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, Gibson JM, Ross OA, Lynch T, Wiley J. Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am J Hum Genet*. 2005;76:672-680.
93. Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, Lopez de MA, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de SR, Lees A, Marti-Masso JF, Perez-Tur J, Wood NW, Singleton AB. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004;44(4):595-600.
94. Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Dampshire D, Cid LP. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*. 2006;38:1184-91.
95. Vilarino-Guell C, Soto AI, Lincoln SJ, Yahmed SB, Kefi M, Heckman MG, Hulihan MM, Chai H, Diehl NN, Amouri R, Rajput A, Mash DC, Dickson DW, Middleton LT, Gibson RA, Hentati F, Farrer, M.J. ATP13A2 variability in Parkinson disease. *Hum Mutat*. 2008;30(3):406-410.
96. Inagaki H, Ohye T, Suzuki T, Segawa M, Nomura Y, Nagatsu T, Ichinose H. Decrease in GTP cyclohydrolase I gene expression caused by inactivation of one allele in hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;260(3):747-751.

97. Biskup S, Gerlach M, Kupsch A, Reichmann H, Riederer P, Vieregge P, Wüllner U, Gasser T. Genes associated with Parkinson syndrome. *J Neurol.* 2008;255(5):8-17.
98. McPherson MJ, Moller SG. PCR. 2nd ed. Bodmin, Cornwall, UK: Taylor & Francis Group, MPG BOOKS Limited. 2006.
99. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Müller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004;44:601-607.
100. Tiziana S, Franca C, Guisepe C, Simone R, Monica U, Alessandro M, Maria A, M, Francesca M, Alessandra R, Francesca A. Frequency of the LRRK2 G2019S mutation in Italian patients affected by Parkinson's disease. *J Hum Genet.* 2007;52:201-204.
101. Bras JM, Guerreiro RJ, Ribeiro MH, Januario C, Morgadinho A, Oliveira CR, Cunha L, Hardy J, Singleton A. G2019S Dardarin Substitution Is a Common Cause of Parkinson's Disease in a Portuguese Cohort. *Mov Disord.* 2005;20:1653-1655.
102. Fung HC, Chen CM, Hardy J, Singleton A. B, Wu YR. A common genetic factor for Parkinson disease in ethnic Chinese population in Taiwan. *BMC Neurology.* 2006;6:47.
103. Gaig C, Ezquerra M, Marti MJ, Muñoz E, Valldeoriola F, Tolosa E. LRRK2 Mutations in Spanish Patients With Parkinson Disease. *Arch Neurol.* 2006;63:377-382.
104. Illarioshkin SN, Shadrina MI, Slominsky PA, Bepalova EV, Zagorovskaya TB, Bagyeva GK, Markova ED, Limborska SA, Ivanova-Smolenskaya IA. A common leucine-rich repeat kinase 2 gene mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia. *Eur J Neurol.* 2007;14:413-417.

105. Lesage S, Dürr A, Tazir M, Lohmann E, Leutenegger AL, Janin S, Pollak P, Brice A. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N Engl J Med.* 2006;354:424-425.
106. Orr-Urtreger A, Shifrin C, Rozovski U, Rosner S, Bercovich D, Gurevich T, Yagev-More H, Bar-Shira A, Giladi N. The LRRK2 G2019S mutation in Ashkenazi Jews with Parkinson disease. *Neurology.* 2007;69:1595-1602.
107. Aasly JO, Toft M, Fernandez-Mata I, Kachergus J, Hulihan M, White LR, Farrer M. Clinical features of LRRK2-associated Parkinson's disease in central Norway. *Ann Neurol.* 2005;57:762-765.
108. Xiromerisiou G, Hadjigeorgiou GM, Gourbali V, Johnson J, Papakonstantinou I, Papadimitriou A, Singleton AB. Screening for SNCA and LRRK2 mutations in Greek sporadic and autosomal dominant Parkinson's disease: identification of two novel LRRK2 variants. *Eur J Neurol.* 2007;14:7-11.
109. Punia S, Behari M, Govindappa ST, Swaminath PV, Jayaram S, Goyal V, Muthane UB, Juyal RC, Thelma BK. Absence/rarity of commonly reported LRRK2 mutations in Indian Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 2006;409:83-88.
110. Bialecka M, Hui S, Klodowska-Duda G, Opala G, Tan EK, Drozdziak M. Analysis of LRRK2 G2019S and I2020T mutations in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2005;390:1-3.
111. Burgunder JM, Tan EK, Wirthmüller U, Jung HH. LRRK2 mutations are not frequent in Swiss patients with Parkinson's disease. *Schweizer Archiv für Neurologie und Psychiatrie.* 2008;159:412-418.
112. Pimentel MM, Moura KC, Abdalla CB, Pereira JS, de Rosso AL, Nicaretta DH, Campos M Jr, de Almeida RM, dos Santos JM, Bastos IC, Mendes MF, Maultasch H, Costa FH, Werneck AL, Santos-Rebouças CB. A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil. *Neurosci Lett* 2008;433:17-21.

113. Pirkevi C, Lesage S, Condroyer C, Tomiyama H, Hattori N, Ertan S, Brice A, Basak AN. A LRRK2 G2019S mutation carrier from Turkey shares the Japanese haplotype. *Neurogenetics*. 2009;10:271–273.