

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**PARKİNSON HASTALIĞI İLE İLİŞKİLENDİRİLMİŞ GENLERİN
DELESYON VE/VEYA AMPLİFİKASYONLARININ MULTİPLEX
LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)
YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dr. ATILLA KURTULUŞ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. M. HAMZA MÜSLÜMANOĞLU

MART, 2009

PDF Eraser Free

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**PARKİNSON HASTALIĞI İLE İLİŞKİLENDİRİLMİŞ GENLERİN
DELESYON VE/VEYA AMPLİFİKASYONLARININ MULTIPLEX
LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)
YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dr. ATILLA KURTULUŞ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. M. HAMZA MÜSLÜMANOĞLU

MART, 2009

KABUL VE ONAY SAYFASI

Atilla KURTULUŞ' un Doktora Tezi olarak hazırladığı "*Parkinson Hastalığı ile İlişkilendirilmiş Genlerin Delesyon ve/veya Amplifikasyonlarının Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemiyle İncelenmesi*" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

20.04.2009

Üye Prof. Dr. Sevilhan ARTAN

Üye Prof. Dr. Mustafa SOLAK

Üye Doç. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU (Danışman)

Üye Doç. Dr. Serhat ÖZKAN

Üye Yrd. Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24/04/2009 tarih ve 782/3634 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr.Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

KAPAK.....	i
İÇ KAPAK.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ÖZET	xiii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. PARKİNSON HASTALIĞI.....	4
2.1.1. Parkinson Hastalığı Tarihçesi.....	4
2.1.2. Parkinson Hastalığının Klinik Bulguları	4
2.1.2.1. Distal istirahat tremoru	5
2.1.2.2. Rijidite	5
2.1.2.3. Bradikinezi.....	5
2.1.2.4. Postural instabilite	5
2.1.3. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi.....	6
2.1.4. Parkinson Hastalığında Patojenik Mekanizmalar	8
2.1.4.1. Anormal protein birikimi	10
2.1.4.2. Oksidatif stres	10
2.1.4.3. Mitokondriyal disfonksiyon.....	11
2.1.4.4. Übikütin proteozomal sistem (UPS).....	12
2.2. PARKİNSON HASTALIĞI VE GENETİK	13
2.2.1. Ph ile İlişkisi Doğrulanmış Monojenik Genler	14
2.2.2. Ph ile İlişkili, Doğrulanmamış Monojenik Genler.....	22

2.3 MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) YÖNTEMİ	23
2.3.1 Parkinson Hastalığında MLPA Tekniğinin Kullanımı.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	30
3.1. GEREÇLER	30
3.1.1. Kullanılan Gereçler	30
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler:	31
3.2. YÖNTEMLER	32
3.2.1. Materyal Seçimi.....	32
3.2.2. Qiagen® Ekstraksiyon Kiti ile Kandan DNA Elde Etme Protokolü	32
3.2.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi.....	34
4. BULGULAR	38
4.1. ARAŞTIRMA GRUBU BİREYLERİNİN DEMOGRAFİK VE KLİNİK ÖZELLİKLERİ	38
4.2. ARAŞTIRMA GRUBU BİREYLERİ MLPA BULGULARI	39
4.2.1. <i>SNCA</i> (PARK1, PARK4) Prob Bölgesi Bulguları.....	41
4.2.2. <i>UCH-L1</i> (PARK5) Prob Bölgesi Bulguları.....	45
4.2.3. <i>Parkin</i> (PARK2) Prob Bölgesi Bulguları	45
4.2.4. <i>DJ-1</i> (PARK7) Prob Bölgesi Bulguları.....	49
4.2.5. <i>PINK1</i> (PARK6) Prob Bölgesi Bulguları.....	52
4.2.6. <i>GCHI</i> Prob Bölgesi Bulguları	53
4.2.7. <i>LRKK2</i> (PARK 8) Prob Bölgesi Bulguları	54
4.2.8. Hastaların Başlangıç Yaşlarına Göre Mutasyon Dağılım Bulguları.....	55
5. TARTIŞMA	59
5.1. Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileri ile Karşılaştırılması.....	59
5.1.1. <i>SNCA</i> (PARK1, PARK4) Prob Bölgeleri.....	59
5.1.2. <i>UCH-L1</i> (PARK5) Prob Bölgeleri.....	65
5.1.3. <i>Parkin</i> (PARK2) Prob Bölgeleri	66
5.1.4. <i>DJ-1</i> (PARK7) Prob Bölgeleri.....	74
5.1.5. <i>PINK1</i> (PARK6) Prob Bölgeleri.....	79
5.1.6. <i>GCHI</i> Prob Bölgeleri	84

5.1.7. <i>LRRK2</i> (PARK8) Prob Bölgeleri.....	85
5.1.8. Literatürde Ailesel Parkinson Hastalığı MLPA Analizi Çalışmaları.....	96
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	101
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	103
ÖZGEÇMİŞ.....	117

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Parkinson hastalığı genlerinin kodladıkları proteinlerin, oluşturdukları patolojilerle ve birbirleriyle şematik ilişkisi.....	9
Şekil 2.2 Parkinson Hastalığında α -sinüklein toksisitesi mekanizmaları.....	16
Şekil 2.3 MLPA Reaksiyonunun İşleyişi.....	25
Şekil 4.1 Bir kontrol bireyine ait MLPA Salsa P051 pik görüntüleri ve prob bölgeleri.....	40
Şekil 4.2 Bir kontrol bireyine ait MLPA Salsa P051 pik görüntüleri ve prob bölgeleri.....	40
Şekil 4.3 <i>SNCA</i> geninin 2. eksonunda A30P heterozigot mutasyonu saptanan hastaya ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgesi.....	42
Şekil 4.4 <i>Parkin (PARK2)</i> geninin 4. eksonunda saptanan delesyonlu hastaya ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgesi.....	46
Şekil 4.5 <i>TNFRSF9</i> geninde delesyon saptanan hastaya ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgesi.....	50
Şekil 4.6 <i>PINK1</i> geninin 8. eksonunda saptanan amplifikasyonlu hastaya ait örnek MLPA pik görüntüleri ve amplifikasyon görülen prob bölgesi.....	53
Şekil 4.7 <i>GCHI</i> geninin 2 ve 6. eksonunda delesyon saptanan hastaya ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri.....	54
Şekil 4.8 <i>LRRK2 (PARK8)</i> geninin 10. eksonunda amplifikasyon saptanan hastaya ait örnek MLPA pik görüntüleri ve amplifikasyon görülen prob bölgesi..	55
Şekil 5.1 (A) Ekzon pozisyonları. (B) LRRK domainleri ve mutasyon pozisyonlarının şematik diyagramı.....	92

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Salsa MLPA P051 Parkinson probmiks kiti prob bölgeleri.....	28
Tablo 2.2 Salsa MLPA P052B Parkinson probmiks kiti prob bölgeleri.....	29
Tablo 4.1 Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı.....	38
Tablo 4.2 Hastaların başlangıç yaşlarına göre dağılımı.....	39
Tablo 4.3 <i>SNCA</i> Delesyon ve Amplifikasyonları Dağılımı.....	42
Tablo 4.4 <i>SNCA</i> geninin 2. eksonunda A30P mutasyonu saptanan hastaya ait DiagenAnalyzer® programı örnek değerlendirme sonuçları.....	44
Tablo 4.5 <i>Parkin (PARK2)</i> Geni ve PARCG Gen Bölgesi Delesyon / Amplifikasyon dağılımı.....	46
Tablo 4.6 <i>Parkin (PARK2)</i> geninin 4. eksonunda delesyon saptanan örnek hastaya ait DiagenAnalyzer® programı değerlendirme sonuçları.....	48
Tablo 4.7 <i>DJ-1</i> Geni Delesyon / Amplifikasyon dağılımı.....	49
Tablo 4.8 <i>TNFRSF9</i> geninde delesyon saptanan hastaya ait DiagenAnalyzer® programı örnek değerlendirme sonuçları.....	51
Tablo 4.9 <i>PINK1</i> Geni Delesyon / Amplifikasyon dağılımı.....	52
Tablo 4.10 <i>GCH1</i> Geni Delesyon / Amplifikasyon dağılımı.....	53
Tablo 4.11 <i>LRRK2</i> Geni Delesyon / Amplifikasyon dağılımı.....	54
Tablo 4.12 Saptanan genomik değişikliklerin erken başlangıçlı (<50) hastalara göre dağılımı.....	55
Tablo 4.13 Saptanan genomik değişikliklerin geç başlangıçlı (≥50) hastalara göre dağılımı.....	56
Tablo 5.1 <i>SNCA</i> genomik değişimi saptanan hastalarımızın mutasyon dağılımı....	63
Tablo 5.2 <i>SNCA</i> geni literatür bilgileri.....	65
Tablo 5.3 <i>Parkin</i> genomik değişimi saptanan hastalarımızın mutasyon dağılımı....	73
Tablo 5.4 <i>Parkin</i> geni literatür bilgileri.....	74
Tablo 5.5 <i>DJ-1</i> genomik değişimi saptanan hastalarımızın mutasyon dağılımı....	78

TABLolar DİZİNİ (devam ediyor)

	Sayfa
Tablo 5.6 <i>DJ-1</i> geni literatür bilgileri.....	79
Tablo 5.7 <i>PINK1</i> genomik değişimi saptanan hastalarımızın mutasyon dağılımı...	83
Tablo 5.8 <i>PINK1</i> geni literatür bilgileri.....	84
Tablo 5.9 <i>LRRK2</i> genomik değişimi saptanan hastalarımızın mutasyon dağılımı...	94
Tablo 5.10 <i>LRRK2</i> geni literatür bilgileri.....	95
Tablo 5.11 Ailesel PH MLPA Analiz çalışmalarını literatür bilgileri.....	99

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
ATP	Adenozin Trifosfat
bç	Baz çifti
BG	Bazal Gangliyonlar
CAVI	Kaveolin 1 geni
CAV2	Kaveolin 2 geni
CGH	Comparative Genomic Hybridization
cM	Sentimorgan
CO₂	Karbondioksit
DA	Dopamin
DNA	Deoxyribonucleic acid
DJ-1	Nöroprotektif rol oynayan PARK7 geni
DQ	DNA Miktarı
E1	Übikütin Aktifleştirici Enzim
E2	Übikütin Konjuge Edici Enzim
E3	Übikütin Ligasyon Enzimi
EBPH	Erken Başlangıçlı Parkinson Hastalığı
FAM	N- (3- fluoranthyl) maleimide
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
GBPH	Geç Başlangıçlı Parkinson Hastalığı
GIGYF2	2q21.2 lokusuna yerleşik Parkinson Hastalığından sorumlu olduğu düşünülen gen
GTP	Guanozin Trifosfat
gr	Gram
LPA	MLPA kitinde kontrol probu olarak kullanılan Apolipoprotein A geni
LRRK2	Bir çeşit kinaz ifade eden PARK8 geni

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

Simgeler	Açıklama
MAO-B	Monoaminoksidaz-B
MAPKKK	Mitojenaktif Protein Kinaz Kinaz Kinaz
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MR	Magnetik Rezonans
mRNA	Messenger Ribo Nükleik Asit
mtDNA	Mitokondriyal DNA
ng	Nanogram
NOS	Nitrojenmonooksit Sentaz
NR4A2	Nurr1 Geni
OD	Otozomal Dominant
ODPH	Otozomal Dominant Parkinson Hastalığı
Omi/HTRA2	Mitokondriyal Serin-Proteaz Geni
OR	Otozomal Resesif
ORJPH	Otozomal Resesif Juvenil Başlangıçlı Parkinson Hastalığı
ORPH	Otozomal Resesif Parkinson Hastalığı
PARK10	1p32 lokusuna yerleşik Parkinson Hastalığından sorumlu olduğu düşünülen gen
PARK12	Xq21-q25 lokusuna yerleşik Parkinson Hastalığından sorumlu olduğu düşünülen gen
PACRG	<i>Parkin</i> geninin promotor bölgesinde yer alan regulasyon geni
Parkin	Bir çeşit ligaz ifade eden <i>PARK2</i> geni
PCR	Polymerase Chain Reaction
PH	Parkinson Hastalığı
PINK1	<i>PARK6</i> geninin ifade ettiği kinaz tip protein
POLG	DNA Polimeraz γ
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polimerase Chain Reaction
RFLP	Restruction Fragment Lenght Polymorphism

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

Simgeler	Açıklama
RNA	Ribo Nükleik Asit
RT-PCR	Realttime Polimerase Chain Reaction
SNCA	α -sinüklein, PARK1 ve PARK4 geninin ifade ettiği protein
SNCAIP	Synphillin Geni
SNPc	Substansiya Nigra Pars Compacta
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SPR	Sepiapterin Redüktaz Geni
SSCP	Single Strand Conformational Polymorphism
SOD	Super Oksit Dismutaz
UPDRSIII	Birleşik Parkinson Hastalığı Değerlendirme Ölçeği
UPS	Übikütün Proteozomal Sistem
UCH-L1	Übikütün karboksil-terminal esteraz L1 geni
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram

ÖZET

Parkinson Hastalığı ile ilişkilendirilmiş genlerin delesyon ve amplifikasyonları Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemiyle incelenmiştir.

Ailesel Parkinson Hastalığına sebep olan genlerde saptanan genomik değişimler sporadik Parkinson Hastalarında da görülmektedir. Literatürde Parkinson Hastalığından sorumlu olduğu bilinen SNCA, UCH-L1, DJ-1, Parkin, PINK1 ve LRRK2 genleri saptanmıştır.

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Hareket Bozukluğu Polikliniğine 2004–2008 yılları arasında Londra Beyin Bankası tanı kriterlerine göre sporadik Parkinson hastalığı tanısı almış 58 sporadik Parkinson hastasının kanlarından elde edilen DNA ile MLPA analizi yapılmıştır. Bu hastalarda Salsa MLPA P051 ve P052B kitleri ile çalışılmış, SNCA geninde 10 delesyon, 12 amplifikasyon, 14 heterozigot A30P, bir homozigot A30P nokta mutasyonu saptanmıştır. DJ-1 geninde 13 delesyon, dokuz amplifikasyon, Parkin geninde 16 delesyon, sekiz amplifikasyon, PINK1 geninde 14 delesyon, 21 amplifikasyon bulunmuştur. LRRK2 geninde dört delesyon, yedi amplifikasyon ve yedi G2019S homozigot nokta mutasyonu tesbit edilmiştir. UCH-L1 geninde ise herhangi bir delesyon veya amplifikasyon saptanmamıştır.

Literatürde DJ-1 ve PINK1 genlerinin amplifikasyonlarına rastlanmamış olmasına rağmen, MLPA analizi sonucumuza göre olgularımızda bu her iki gende de amplifikasyonlar tesbit edilmiştir.

Çalışmamız Türkiye’de sporadik Parkinson hastalarının MLPA analizi yöntemiyle incelendiği ilk araştırma olmuştur.

Anahtar Kelimeler: SNCA, Parkin, PINK1, DJ-1, LRRK2, UCH-L1, Genomik değişim, Parkinson Hastalığı, MLPA

SUMMARY

Deletions and amplifications of the genes related to Parkinson Disease are studied with Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) method.

Genomic rearrangements identified in genes which cause familial Parkinson Disease, are also seen in sporadic Parkinson Disease. In the literature, SNCA, UCH-L1, DJ-1, Parkin, PINK1 and LRRK2 genes were identified that known to be responsible of the Parkinson Disease.

MLPA analysis were conducted with extracted DNA from bloods of 58 sporadic Parkinson's Disease patients diagnosed in Eskisehir Osmangazi University Medical Faculty Neurology Department Movement Disorder Clinic, in accordance with London Brain Bank diagnosis criterias between 2004–2008. In those patients, Salsa MLPA P051 - P052B kits were applied in SNCA gene 10 deletions, 12 amplifications, 14 heterozigot A30P, one homozigot A30P point mutations were found. In DJ-1 gene 13 deletions, nine amplifications, in Parkin gene 16 deletions, eight amplifications, in PINK1 gene 14 deletions, 21 amplifications were found. In LRRK2 gene four deletions, seven amplifications and seven G2019S homozigot point mutations were identified. In UCH-L1 gene neither deletions nor amplifications were detected.

Eventhough in the literature, for DJ-1 and PINK1 genes no amplifications were found, according to results of our analysis of MLPA, amplifications in both of those genes were detected.

Our research has become the first one in Turkey that the sporadic Parkinson Disease patients were studied with MLPA analysis method.

Key Words: SNCA, Parkin, PINK1, DJ-1, LRRK2, UCH-L1, Genomic rearrangement, Parkinson's Disease, MLPA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH) en sık görülen hareket bozukluğu hastalığıdır. Hareket ise içinde primer motor korteks, premotor alan, destek motor alanı ve insan motor korteksindeki motor kontrolü sağlayan özelleşmiş alanı, korteksten medulla spinalise uzanan piramidal yolu, afferent ve efferent lifleri içeren sensori-motor yapıda, kaslara kadar uzanan kompleks bir fizyodinamik süreçtir. Anansefalik doğan çocuklarda meme emme, hoşa gitmeyen besinlerin ağızdan çıkarılması, parmakları emmek üzere ağza götürme hatta esneyip gerinme, baş ve göz hareketleriyle cisimleri izleyebilme gibi stereotipik hareketleri gösterebilmelerine sebep olan çoğu eylem beyin sapında entegre olabilmektedir. Fizyolojik olarak nükleus kaudatus, putamen ve globus pallidus bazal ganglionlar (BG) olarak kabul edilir. Ancak substansiya nigra, subtalamus ve talamuslarla, retiküler formasyon da bu yapılarla sıkı işbirliği halinde olduklarından motor kontrolde BG sistemine dahil olarak kabul edilirler. BG hareketin kavşak bölümü olarak nitelenebilir. Bu nedenle burada meydana gelen harabiyet, hareket bozukluklarına sebep olmaktadır. BG, hem motor denetim hem de duysal aktiviteler yönünden beyin korteksi ile de ortak görev yaparlar. Ancak BG'la korteksin motor alanları arasında olduğu gibi duysal alanlarla da işlevsel işbirliği vardır. Kas aktivitesi sırasında BG'da beyin korteksindeki motor alanlardan önce aksiyon potansiyelleri oluşmaktadır. BG'in aktivitesi motor korteksten değil, korteksin duysal alanları ve duysal asosiyatif alanlarından ya da talamus ve beyin sapının alt bölgelerinden gelen sinyallerle başlatılır. Bu nedenle BG vücuttaki, beyin sapı ve omurilikten kaynaklanan, istem dışı kas kontraksiyonlarından başka, hareketlerin hepsinde olmasa bile çoğunda temel rolü oynamaktadır. Yukarıda açıklandığı gibi BG normal motor kontrolde korteksle sıkı işbirliği içinde oldukları halde, korteks çıkarıldıktan sonra da birçok yönleri ile motor kontrolü yürütebilirler. Ancak motor faaliyet, beynin katkısı olmadan daha kaba ve amaçtan yoksun olur (52).

İnsanlarda, substansia nigra pars kompakta yaklaşık 450.000 dopaminerjik nöron içerir. PH'da nörofilament subünitlerinden Lewy cisimciği oluşumu, akson içindeki

nörofilamentlerin fonksiyonunu bozmakta ve dopaminerjik işleve sahip substansia nigra pars kompaktadan (SNPc) striatuma uzanan aksonal bağlantıya hasar vermektedir. Özetle, neredeyse hastalığın tüm klinik bulguları bu arkin bozulmasıyla oluşur (40).

PH'nın tedavisi planlanırken bazı tanı kriterleri ile PH teşhisi gerekmektedir, ancak halen PH şiddetinin ölçüldüğü *Hoehn-Yahr Evresi* ve *Birleşik Parkinson Hastalığı Değerlendirme Ölçeği* (UPDRSIII) , *Londra Beyin Bankası Klinik Tanı Kriterleri* gibi tanı sorgulamaları kullanılmasına rağmen ayırıcı tanıda bazı Parkinson hastalarının teşhisi atlanabilmektedir (81). Teşhis koyabilmeyi kesinleştiren net moleküler tanı yöntemi yoktur (32). Otopsiyle desteklenen beyin bankaları verilerine göre, tecrübeli kliniklerde bile PH tanısı alan vakaların yaklaşık %10-15'inin gerçekte parkinsonizmin başka formları olduklarını, hatta ölüm öncesi Parkinson tanısı almış vakaların % 24'üne yanlış tanı konulduğunu göstermektedir (61). Beyin bankalarında postmortem Lewy cisimciği varlığı ile kesin PH tanısını kişilere hayattayken koyabilmek, uzmanlaşmış klinikler için bile sorun teşkil etmektedir. Lewy cisimciğinin içeriğini incelemeye başlayan etyopatogenez araştırmaları bizi bugün hızla artmakta olan genomik etyoloji sahiline getirmiştir. PH'nın etyolojisinde yer alan çevresel faktörler, genetik faktörler, yaş ve coğrafik konum farklılıklarından hangisinin daha öncelikli olduğu tam olarak açıklığa kavuşturulmasa da son 10 yıl içindeki çalışmalar genetik faktörlerin ciddi sayıda etkili olduğunu düşündürmektedir. Bu yüzden de bilim adamları son dekatta PH için devrim sayılan bilgi yağmuruna tutulmuşlardır, PH'dan kesin sorumlu altı gen, muhtemel yedi lokus bu dönemde OMIM indeksine ve literatüre katılmıştır (38).

Çalışmamızdaki amacımız Türkiye'de yeni bir yöntem olan Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) ile şimdiye kadar PH ile ilişkilendirilmiş yedi ayrı genin 67 farklı bölgesindeki delesyonlar ve/veya amplifikasyonları araştırmaktır. MLPA yöntemi ilk olarak Schouten JP ve ark. tarafından tanımlanmıştır (130). MLPA'yı birden fazla gene dozaj analizi yapabilen basit bir yöntem olarak kısaca tanımlayabiliriz. Bu yöntem sayesinde PCR kullanılarak, tek reaksiyonda 50'ye yakın gen bölgesi incelenebilmektedir. İncelenecek gen bölgelerine özel hazırlanmış probalar

PDF Eraser Free

içeren bir karışım kullanılarak bu genlerde oluşmuş delesyon veya amplifikasyonlar saptanabilmektedir.

Çalışmamızda MLPA yönteminin PH genlerine spesifik dizayn edilmiş olan Salsa MLPA Probemix P051/P052B kitleri kullanılarak, PH ile ilişkilendirilmiş 67 farklı gen bölgesindeki delesyon veya amplifikasyonların incelenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler ile Türk popülasyonunda sporadik PH etyolojisinde yer alan genler ve bu genlerdeki değişimler ve klinik şiddetleri arasındaki ilişkiler incelenmiştir (161).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PARKİNSON HASTALIĞI

2.1.1. Parkinson Hastalığı Tarihçesi

PH ilk olarak İngiliz hekim James Parkinson tarafından “shaking palsy (titrek felç)” adıyla hastalarda gözlemlendiği; istirahat tremoru, hafif kambur postür, ayaklarını sürüyerek yürüme, arkaya düşme eğilimi gösterme belirtilerini tarif ederek 1817 yılında tanımlamıştır. Hastalık ilk kez endüstriyel devrim zamanında tanımlanmış olsa da, antik Hint literatüründe (İ.Ö.4500–1000) kampavata, yani tremor ve akineziyi tanımlayan açıklamalara rastlanmıştır (86). Fransız hekimi Jean Marie Charcot rijidite, mikrografi ve duysal değişiklikleri de ekleyerek orijinal hastalığın tanımını yapmış ve hastalığa onu ilk tarif eden kişinin adını vermiştir (35).

2.1.2. Parkinson Hastalığının Klinik Bulguları

PH temel olarak bir hareket bozukluğu hastalığı olmasına rağmen sıklıkla eşlik eden affektif, kognitif ve psikotik bozukluklar sebebiyle nöropsikiyatrik bir hastalık olarak kabul edilmektedir. PH klinik olarak; istirahat tremoru, dişli çark rijiditesi, bradikinezi ve postural reflekslerde bozulmayla giden, patolojik olarak substansiya nigradaki pigmentli nöronlarda kayıp ve bazen buna eşlik eden Lewy cisimciği ile karakterize kronik, tek yanlı başlayan, progresif bir bozukluktur (157). Dört ana klinik bulgusu vardır:

2.1.2.1. Distal istirahat tremoru

Bu hastaların %75-80'inde bulunur ve 4-6 Hz'lidir. Genellikle üst ekstremitelerden birinde başlar ve zaman içinde aynı taraf alt ekstremiteye ve daha sonra karşı vücut yarısına yayılır. Egzersiz sırasında artar, uyku ve anestezi esnasında kaybolur (47).

2.1.2.2. Rijidite

Hem agonist hem de antagonist kasların her ikisinin aynı anda çalışması sonucu gelişen tonus artışıdır. PH olgularının % 89-99'unda görülür. Tremor gibi tek taraflı başlar diğer tarafa yayılır (15).

2.1.2.3. Bradikinezi

Hareketlerde yavaşlama olmasıdır. Rijiditeyle ilişkili bir semptom değildir. Sebebi globus pallidustaki inhibitör dopaminerjik uyarıların azalması sonucu talamusun ventrolateral nükleusundaki nöronların inhibisyonunda artış ve nihayetinde motor korteksteki nöronların stimulusundaki kayıptır. Bradikinezi, hastaların tamamında vardır (47).

2.1.2.4. Postural instabilite

Postural reflekslerin kaybı sonucu gelişen denge bozukluğudur ve hastalık ilerlediğinde ortaya çıkar. Antigrafit mekanizmalarının ana merkezleri beyin sapındadır. Pontomedüller retiküler formasyon, postür ve

denge kontrolünü sağlayan önemli bir yapıdır. İstemli ve istemsiz postür kontrolü proprioepsiyon, görme, labirentin fonksiyonu ve temas aferentleri ile ayarlanır. Postür kontrolünde serebral korteks, serebellar çekirdekler, BG, pontomedüller, retiküloretiküler ve retikülospinal nöronlar önemli rol oynar. Burada özellikle pedunkulopontin nükleusun (PPN) rolü büyüktür. Substantia nigradan bulboPontin retiküler formasyona, özellikle PPN'a projeksiyon olduğu gösterilmiştir. Supraspinal yapılardan inen yollarla, dorsolateral sistem ve vestibülospinal, interstisyospinal, tektospinal yollardan oluşan ventromedial sistem ile postür kontrolü sağlanır. İleri evre sporadik PH olgularında postür kontrolünün bozulması ve denge bozukluğunun ortaya çıkmasının ortak anatomik yapıların, özellikle de PPN'nin hipofonksiyonu ve nörodejenerasyonuna bağlı olabileceği ileri sürülmüştür.

Bu dört ana bulgunun yanı sıra Parkinson hastalarında demans, bradifreni, viziyoaspasyal defisitler, depresyon, anksiyete, uyku bozukluğu, delüzyon, halüsinasyon gibi psikiyatrik bozukluklar, ortostatik hipotansiyon, konstipasyon, aşırı terleme, anormal termoregölasyon, üriner problemler gibi otonomik bozukluklar, kramp, ağrı ve pareteziler gibi duysal semptomlar, yürüyüş bozuklukları, maske yüz, göz kırpmasının azalması, akomodasyonda bozulmaya bağlı bulanık görme, olfaktor bozukluklar, disfazi, siyalore gibi kraniofasial bozukluklar, mikrografi ve kilo kaybı görülebilir (137).

2.1.3. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi

PH, Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Tüm etnik gruplarda görülür, hafif erkek predominansına sahiptir. Ülkemizde halen hastalığın prevalansı ve morbiditesi hakkında Sağlık Bakanlığı kaynaklı kesin sayısal

veri bulunmamaktadır ancak ABD’de 2007 yılında yayınlanan Ulusal Yaşam İstatistik Raporuna göre mortalite sebepleri arasında 14. sırada yer almaktadır (3). Her yıl 100.000 kişiden ortalama 16-19’una PH teşhisi konmaktadır. Tüm populasyonun %0,3’ünü etkilemekle birlikte, 65 yaşında görülme sıklığı %1 iken, 85 yaşında görülme sıklığı %4-5’e çıkar. Hastaların %5-10’unda semptomlar, 40 yaşın altında ortaya çıkmaktadır (38). Asimetrik ilerleyici bir hastalıktır ve semptomatik olarak istirahat tremoru, bradikinezi, rijidite ve postural dengesizlik ile karakterizedir. Ortalama klinik başlangıç yaşı 70’ler civarı olmasına rağmen erken başlangıçlı olan hastalarınki 50’li yaşlardan öncedir (153). Aynı yaş grubu kontrollerle karşılaştırıldığında, hastalık grubunda mortalite oranının 2-5 kat daha arttığı saptanmıştır. Hayat kalitesinde düşüşe neden olması da önemli diğer bir problemdir. Hastalığın insidansı 5-20/100.000, prevalansı Nijerya Ogbo-Ora’da 10/100.000 iken, Montevideo Uruguay’da 405/100.000’dir (71, 129). Ülkemizde sadece Eskişehir’de yapılan bir çalışma mevcuttur ve prevalans değeri 111/100.000 bulunmuştur (148). Kadın ve erkekler arasında önemli bir fark bulunmamakla birlikte aynı yaştaki erkeklerde 1,2-1,5 kat daha fazla görüldüğü bildirilmiştir. Genel olarak PH en sık beyaz ırkta, daha sonra sarı ırkta en az ise siyah ırkta görülmektedir. Coğrafik farklılıklar, çevresel nedenler (kuyu suyu, endüstriyel kimyasallar, herbisit ve pestisitler, ağır metaller) ve kırsal kesimde yaşamının da PH ile pozitif ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (116). Hastalığın doğrudan öldürücü özelliği yoktur. Motor fonksiyon bozukluğu, aspirasyon ve düşme gibi hastalığa bağlı sekonder sebep kökenli mortalite, aynı yaş ve cinsiyetteki populasyona nazaran 2-5 kat daha yüksektir. (83).

Sigara içiminin nörotoksin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)’i uyararak Monoamin Oksidaz-B (MAO-B) aktivitesini azalttığı, böylelikle nöroprotektif bir ajan gibi hareket ettiğini iddia eden hipotezler mevcut iken, dopaminerjik nörotransmisyonu düzenleyen adenosin A2 reseptörü üzerinde antagonist etki gösteren kahve alımı alışkanlığının da PH olma olasılığını azaltması BG’nın alışkanlıklarla ilgili bir beyin bölümü olduğu dikkate alındığında bu bölgenin harabiyetinin hastaların isteseler de alışkanlık kazanamadıkları hipoteziyle eşit ağırlıkta olduğu söylenebilir. Postmenapozal hormon kullanan kadınlarda PH riski artarken hormon kullanmayanlarda riskin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca nöroprotektif etkileri

sebebiyle non-steroid antienflamatuar ilaçların %45 risk azaltıcı etkileri de bildirilmiştir (71).

1917–1935 yılları arası geçirilen epidemik ensefalit sonrası sağ kalıp sekel oluşan vakalarda ve şiddetli kafa travması sonrası PH geliştiği bildirilmiştir. Bunun yanısıra erken veya orta yaşlarda hareketli bir hayat ve erken dönemde geçirilen kızamık hastalığının riski azalttığını bildiren ancak başka çalışmalarla desteklenmemiş birer yayın da mevcuttur (122, 123).

Özetle demografik olarak ilerlemiş yaş, erkek olmak, beyaz ırk, ailede PH öyküsünün olması, yaşam şekli, kafa travması, duygusal stres, kişisel özellik (utangaçlık, riskten kaçınma); çevresel olarak ise MPTP ve MPTP benzeri bileşikler, pestisitler, endüstriyel ajanlar, karbon monoksit, metaller (mangan, cıva, demir), kuyu suyu, çiftçilik, kırsal kesimde yaşam, iş (sağlık sektörü, eğitim, inşaat), ensefalit, Nocardia asteroides infeksiyonu PH için risk faktörlerini oluşturur. Metoklopramid ve petidin uygulanması sebebiyle de PH olan vakalar bildirilmiştir (12, 71).

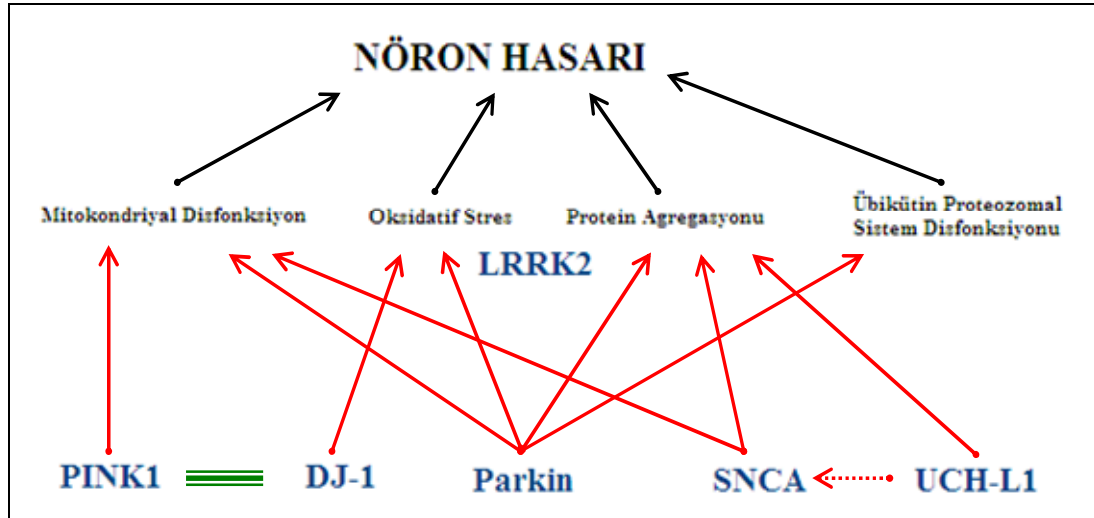
2.1.4. Parkinson Hastalığında Patojenik Mekanizmalar

En küçük birimi nöronlar olan sinir sistemi oldukça kompleks anatomik, biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Nöronlar arası iletişim, elektriksel ve/veya kimyasal haberci moleküller tarafından sağlanmaktadır. Bu iletişim sisteminin düzenlenebilmesi için beyinde enerji ihtiyacının karşılanması gereklidir (55).

Beyin hücre zarları büyük oranda doymamış yağ asitlerinden oluşur, bunlar lipid peroksidasyon reaksiyonlarında serbest radikallerin substratları olarak iş görürler. Nöronal oksidatif fosforilasyon esnasında mitokondriyal elektron transport zincirinden yüksek enerjili elektronların oluşumu serbest radikallere sebep olur. Beyin dokusu katalaz içermediğinden, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri ile glutatyon ve E vitamini düzeyleri de sınırlı olduğundan, zayıf bir savunma mekanizmasına sahiptir. Hasara uğramaya açıktır. Aksonlar boyunca bu hasarın onarımı

ancak sınırlı bir şekilde gerçekleştirilebilir. Bazı serbest radikallerin oluşmasını sağlayan metaller (örneğin demir) beyin spesifik bölgelerinde birikebilir (55). Böylelikle serbest radikal oluşumu daha yüksek iken, onarım diğer dokulara göre daha azdır. Oksijen kaynaklı serbest radikallerin, yoğun oksidatif solunum yapan sinir hücreleri arasında dejeneratif kimyasal modifikasyonlara neden olduğu ileri sürülmüştür (156). Beyin, kimyasal metabolizmanın yüksek olduğu bir organdır. Belirli bölgelerinde ortak özelliklere sahip nöron popülasyonlarının ölümü sonucunda nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkar (45). Nörodejeneratif hastalıklar, farklı klinik fenotiplere ve genetik etyolojiye sahip olduklarından heterojen özellik gösterirler. PH bu nörodejeneratif hastalıklar arasında önemli bir yer tutar.

PH'da BG'da hücre ölümü vardır ve bu hücre ölümüne sebep olan temel patojenik mekanizmalar özetle anormal protein işleme, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, Übikütin Proteozomal Sistem (UPS) kusurları olarak sayılabilir. Nöron hasarının gerçekleşmesi için çevre-gen etkileşiminin karmaşık bazı işlemler sonucu oluşması gerekmektedir. Kısaca bu mekanizmalara değinmek gerekirse:



Şekil 2.1. Parkinson hastalığı genlerinin kodladıkları proteinlerin, oluşturdukları patolojilerle ve birbirleriyle şematik ilişkisi. Tan ve ark.'dan (141)

2.1.4.1. Anormal protein birikimi

Dopamin (DA) sentez edildikten sonraki aksonlara taşınma, metabolizmasının regülasyonu da dahil tüm basamaklarda yer alan bütün enzim ve proteinlerin işlev bozukluğu, bu proteinlerin normalde parçalanarak kataliz gerçekleşmesi gerekirken bu yolak içinde bazı noktalarda parçalanamaması ve agregatlar olarak birikmesi sonucunu doğurur. Normalde α -sinüklein, DA'in sinaptik veziküllerden otooksidasyonunun başı çektiği oksidatif stres kaynağı ve serbest radikal ürünlerinin yeri olan sitozole salınımını düzenler. Böylelikle nöronun sitoplazmik DA miktarı azalınca oksidatif stresi de azalır. α -sinükleinin yapım kusuru veya yanlış katlanması ise birikimine, bu da hücre içi DA artışı sebebiyle oksidatif strese yol açar (29). Bu birikim zamanla hücre içi işlev bozukluğuna ve bir tür toksik etki sonucu hücrenin ölümüne sebep olur. Örneğin *SNCA* geni (*PARK1* ve *PARK4*) tarafından α -sinüklein üretiminde meydana gelen ifade kusurları veya birikecek kadar fazla üretimi hücrede toksik rol oynar (2). Otopsilerde Lewy cisimciklerini oluşturan agregatlarda bol miktarda bu gen ürününe rastlanmıştır (36). Şekil 2.1'de görüldüğü gibi *Parkin*, *SNCA* ve *UCH-L1* bu oluşumda birlikte etkileşim halindedirler. Herhangi biri veya birkaçının birlikte etkileşimi sonucu anormal protein oluşumu ve nöronal hasar meydana gelir.

2.1.4.2. Oksidatif stres

PH'da oksidatif stresin rolü olduğunun göstergesi; reaktif oksijen serbest radikallerinin, yüksek demir konsantrasyonu, azalmış glutatyon düzeyi ve artmış lipid peroksidasyonunun varlığıdır. Özellikle 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 artmış lipid peroksidaz ve anormal oksitlenmiş DNA bunun kanıtıdır ve bu bulgular sadece SNPC ile sınırlı değildir.

Mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon ile moleküler oksijenin suya redüksiyonu sırasında reaktif oksijen türleri olarak tanımlanan süperoksit radikal, hidrojenperoksit, hidroksil radikali oluşur. Serbest radikal üretimi ile artmış kalsiyum akımı, nitrojenmonooksit sentaz (NOS) aktivasyonu, amiloidbeta-peptid ve enzimlerde yaşa bağlı fonksiyon kaybı gerçekleşir. Şekil 2.1’de görüldüğü gibi birer antioksidan gibi çalışan *DJ-1* ve *Parkin* nöroprotektif rollerini kaybettiklerinde hücreyi oksidatif stresin etkilerine açık bırakarak nöron hasarına sebep olurlar (126).

2.1.4.3. Mitokondriyal disfonksiyon

Ökaryotik hücrelerde glukozun indirgenme yolunda enzimlerle katalizlenen ilk kimyasal reaksiyonlar sitozolde ortaya çıkar. Son adım olan ATP sentezi ise mitokondrilerde oluşur. Toplam 32 ATP enerji elde edilirken bunun iki ATP’si sitozolde glukozun piruvata oksidasyonu ile oluşurken, geri kalan 30 ATP mitokondri içerisinde ve iç mitokondri zarında proton konsantrasyon gradiyenti kullanılarak elde edilir. Mitokondrilerde ayrıca lipid peroksidasyon reaksiyonu yürütülerek yağ asitlerinden de enerji elde edilir. Ancak yağ asidinin hücrelerde depo edilmiş hali olan triaçilgliserolun 1 gr.’ından elde edilen enerji, glukozun 1 gr.’ından elde edilenden altı kat daha yüksektir. Bu enerji yollarında glukoz ve lipid tamamen CO₂’e indirgenir. Bu reaksiyonlarda elde edilen enerjinin bir kısmı ısıya dönüşürken, bir kısmı da organelden madde transportu için kullanılmak üzere ATP’ye dönüştürülür (113).

Yaşlanmayla birlikte mitokondriyal DNA’da (mtDNA) hasarlar meydana gelir. Şekil 2.1.’de görüldüğü gibi *PINK1*, *Parkin* ve *SNCA* genlerinden herhangi birinde veya birkaçında meydana gelen genomik değişim, doğrudan mitokondriyal Kompleks-I işlevlerinde bozulma meydana getirir. Artmış serbest radikallere karşı savunma, hızlı enerji ihtiyacını karşılama gibi görevleri olan mitokondriyi etkileyen genlerdeki ifade kusurları, hücresel düzeyde tahammülü aştığında nöron hasarı meydana gelir (126).

2.1.4.4. Übikütün proteozomal sistem (UPS)

Ökaryotik hücrelerde protein yıkımı iki yolla yapılır. Biri asidik ortamda yapılan lizozomal yol, diğeri ise übikütün-proteozom yıkım yoludur. Übikütün, 76 amino asitten oluşan bir polipeptittir. Amino grubunu bağlayarak parçalanması gereken proteini işaretleme görevi vardır. İşaretlenmiş proteine başka übikütünler de eklenerek multiübikütün zinciri oluşturulur ve bu agregat proteozom tarafından yıkılır. İş biten übikütünler yeniden kullanılmak üzere serbest kalırlar. Übikütünün bağlanması ve proteozom işlevi için ATP kullanılır. Proteinler katlanmamış formlarında ve küçük iseler proteozomlar tarafından übikütinden bağımsız bir şekilde proteozomal yolla yıkılabilirken, büyük proteinler ATP-bağımlı bir süreçle übikütünlenerek yıkıma uğratılırlar (43). Übikütünlenme birkaç adımda gerçekleşir. Önce übikütün, übikütün aktifleştirici enzime (E1=Aktivasyon) bağlanarak aktifleşir. Bu adımda ATP kullanılır. Sonra 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)* geni 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 kullanılarak proteozom tarafından parçalanır. Bu polimerik übikütün *PARK5 (UCH-L1)* enzimi tarafından polimerik formdan monomerik forma geri kazandırılır, böylelikle yeniden UPS döngüsüne katılır (80).

İmmunohistokimyasal çalışmalar *SNCA* ve übikütünün Lewy cisimciklerinin majör komponentleri olduğunu göstermiştir. Bu sebeple *SNCA* gen mutasyonlu Parkinson hastalarında substansiya nigra nöronlarında Lewy cisimciği bulunur. İçeriğinde ise mutant α -sinüklein, küçük übikütünlenmiş agregatlar, son dönemlerde bulunan mikrogliyal aktivasyonun kanıtı olan otofajik sellüler dejenerasyon artıkları vardır. Bu defektler lizozomal ve proteozomal sistemin birikmiş artıklarıdır. Hücre ölümüne, atılmayıp biriken bu sellüler çöpün toksik etkisi sebep olur. Şekil 2.1.'de görüldüğü gibi *SNCA* proteini (*PARK1-PARK4*), E3 Übikütün ligaz (*UCH-L1*), *LRRK2 (PARK8, Dardarin)* ve *DJ-1* übikütün-proteozomal yolakta anormal protein

birikiminden sorumlu genlerdir. SNPc'daki proteozom sisteminlerinde yapısal ve fonksiyonel bozukluklar bulunmuştur (127).

Nöron hasarı hücresele düzeyde her zaman apoptozisle sonuçlanır. Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen bu mekanizma fizyolojik bir süreç olarak meydana geldiği gibi; ileri yaş, virüsler, çevresel etmenler tarafından oluşturulan DNA hasarı sonucu doku yararına hücrelerin diğer hücreler için kendilerini feda etmeleri kavramını da içerir. Fizyolojik olarak yara iyileşmesinde, barsak hücrelerinin dönüşümünde, deri ve uterus içinde sürekli mitoz ve apoptozis yaşanmaktadır. Apoptozis ve normal hücre yapımının günde 1×10^{11} hücreyi bulduğu hesaplanmıştır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı yetişkin bir insanda 18–24 ayda vücut ağırlığı kadar bir kütlenin yeniden yapım ve yıkımı anlamına gelir. Bir çalışmada mitokondriyal Kompleks-I seviyesinde azalma bulunmuştur. Bu mitokondriyal yolla aktive edilen apoptozis mekanizmasını kanıtlamaktadır (102). Onkogen aktivasyonu, DNA hasarı veya hücre zarındaki reseptörlere sinyal moleküllerin bağlanması gibi nörodejenerasyon oluşturma gücüne sahip her süreç apoptozisi başlatabilir (103).

2.2. PARKİNSON HASTALIĞI VE GENETİK

Bugüne kadar PH'nın genetik ile ilişkisini araştırmaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda farklı yöntemler, farklı hasta grupları kullanılmıştır. PH epidemiyolojisinde tanısal test olmaması, kesin tanı için postmortem histopatolojik inceleme gerekmesi, hastalığın sinsi seyrederek klinik vermeden uzun dönem varlığı, ileri yaş hastalığı olması ve bildirim zorunluluğu olmaması sebebiyle elimizdeki bilgiler kısıtlıdır (32). Yapılan birçok araştırma sonucunda PH ile ilişkili doğrulanmış Mendeliyan kalıtım gösteren yedi gen tanımlanırken yine PH ile ilişkili olduğu düşünülüp henüz doğrulanmamış genler üzerinde de çalışmalar devam etmektedir (38).

2.2.1. Ph ile İlişkisi Doğrulanmış Monojenik Genler

2.2.1.1. *PARK1 (SNCA)*

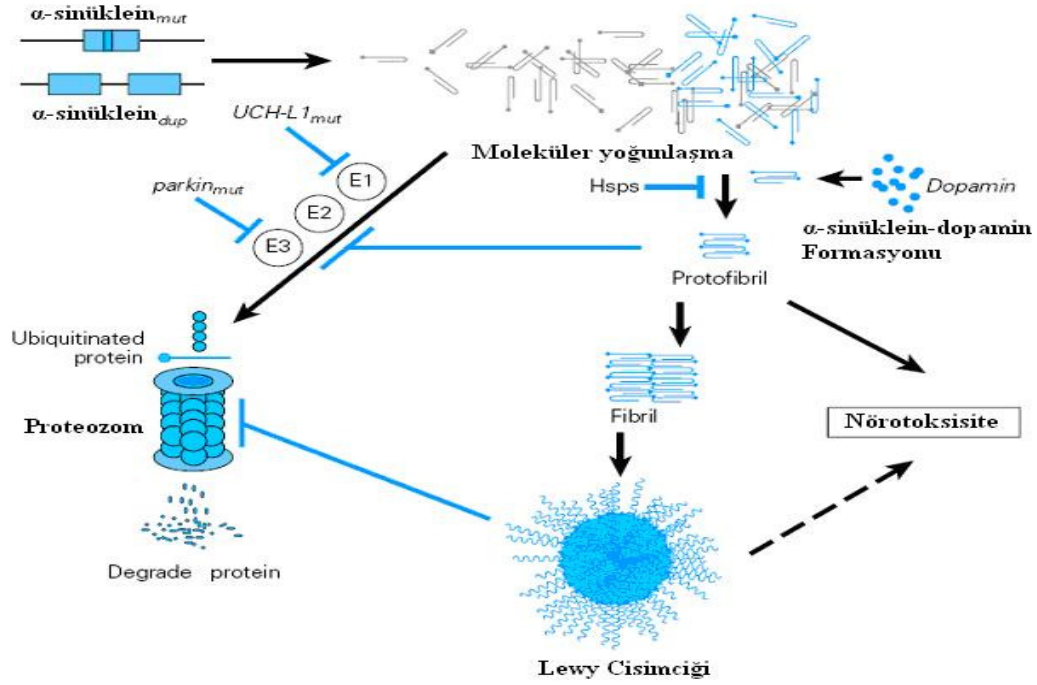
PARK1 (SNCA) geni, α -sinüklein protein agregasyonu patolojisine yol açar. *PARK1* ilk defa 1997'de Polymeropoulos ve ark. tarafından İtalyan kökenli bir ailedeki Otozomal Dominant Parkinson Hastalığı (ODPH) olgularının incelenmesiyle tanımlanmış bir lokustur ve genetik geçişli PH'da bulunan ilk gendir (118). Bu gen üzerindeki üç yanlış anlamlı nokta mutasyonu (A53T, A30P ve E46K) ODPH olan olguların büyük bir kısmından sorumludur (153, 167). Bu üç nokta mutasyonunun yanı sıra α -sinüklein geninin duplikasyon ve triplikasyonu (*PARK4*) sonucu ortaya çıkan patolojiler de tanımlanmıştır (99). Beyinde yaygın olarak ifade edilen α -sinüklein proteininin, nörotransmitter taşıyan veziküllerin aksonlar boyunca iletilmesinde rol oynadığı sanılmaktadır. Bu gende bulunan mutasyonların α -sinüklein proteininin veziküllere bağlanma kapasitesini azalttığı gösterilmiştir (153). Hayvan modeli çalışmaları *SNCA* geninin tamamen inaktif hale getirilmesinin hayvanlarda bir bozukluğa yol açmadığını göstermiş, bu da otozomal dominant geçiş göstermesi ile birlikte düşünüldüğünde "kazanılmış toksik işlev" varsayımını düşündürmüştür (102). Buna göre *SNCA* genindeki mutasyonlar α -sinüklein proteinini işlevsiz hale getirmemekte, tersine ona yeni ve toksik bir işlev kazandırmaktadır. Hem sağlam hem de mutant α -sinüklein proteini Lewy cisimciklerinde görülen amiloid fibriler yapıları ve fibriler olmayan oligomer yapıları oluşturabilmektedir. A53T mutasyonunu taşıyan α -sinüklein proteini protofibril oluşumunu tetiklemekte ve meydana gelen mutasyon sebebi ile α -heliks yapısı bozulduğu için β -tabaka konformasyonu kazanan bu protein protofibriller sinaptik veziküllerin zarlarının parçalanmasına sebep olabilmektedir. Yabani olsa bile konsantrasyonu arttığında da β -tabakalanma gösterdiği tespit edilen α -sinüklein, vezikülü parçalayarak içindeki dopaminin hücre içine sızmasına ve oksidatif stres yaratarak toksisiteye neden olmaktadır (143). Monomerik α -sinüklein, α -sinüklein protofibrilleri (oligomerler) ve α -sinüklein fibrilleri arasında farklılık vardır. Monomerik α -sinüklein veziküllere sıkıca bağlanır ve geçici olarak bu vezikülleri geçirgen hale getirir. α -sinüklein oligomerleri bu sebeple nigral nöronlar için

fibrillerden daha toksiktir. Bu da yabancı α -sinüklein üretiminin artmasına sebep olarak patoloji yaratan *SNCA* duplikasyonu ve triplikasyonu ile hastalığın şiddetinin artması arasındaki ilişkiyi açıklar. Şekil 2.2'de α -sinüklein proteininin nöron ölümüne gidiş mekanizması gösterilmektedir.

2.2.1.2. *PARK4 (SNCA)*

SNCA multiplikasyonları ilk defa 2003'te Singleton ve ark. ve 2004'de Chartier-Harlin ve ark. tarafından *SNCA* geninin allellerinden biri veya her ikisinde amplifiye olarak, duplikasyon veya triplikasyonlarla seyreden bir genomik multiplikasyon olduğu keşfedilmiştir (17). İlerleyen zamanda bu genomik değişimin *PARK1*'in komşu lokusunda gen dozaj artışı (duplikasyon /triplikasyon) olduğu anlaşılmış ve *SNCA* gen multiplikasyonları şeklinde adlandırılarak PH etyolojisindeki yerini almıştır. *SNCA* proteini agregasyon patolojisine yol açar. OD geçiş gösteren 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 korelasyon vardır (99).

Ross ve ark.'ın 2008 yılında FISH ve 250K Single Nucleotid Polymorphism (SNP) mikroarray tekniği kullandıkları yayınlarında Parkinsonizm ve *SNCA* multiplikasyonlarını beş ailede araştırmışlardır (121). Bu çalışma *SNCA* dozaj artışının (duplikasyon ve triplikasyonların) sporadik Parkinson Hastaları'nda da sık olarak bulunduğunu bunun da allellerden birinde meydana gelen segmental duplikasyon sebebiyle veya alleller arası rekombinasyon esnasında gelişen dengesiz "crossing-over" sebebiyle oluştuğunu bildirmişlerdir.



Şekil 2.2 Parkinson Hastalığında α -sinüklein toksisitesi mekanizmaları:

Bu modelde α -sinüklein düzeyleri (a) α -sinükleinin bir kopyasının duplikasyonu / triplikasyonu sonucu (b) *SNCA* geninde nokta mutasyonu sonucu sinükleinin aşırı birikimi sebebiyle veya (c) proteozomlarla sinükleinin normalde parçalanmasının azalmasına sebep olan *Parkin* ve *UCH-L1* genlerinde mutasyonlar sonucu artmıştır. Sinükleinin fazlası hasar görmüş olan ısı-şok proteinleriyle (Hsps) işlem görerek veya sinükleine bağlanan dopaminin etkisiyle protofibril formuna polimerize olur. Bu bire bir Lewy cisimcikleri formasyonu oluşumuna neden olur. Bu model hem protofibrilleri hem de Lewy cisimciklerini açıklamaktadır Ericksen ve ark.'dan (37).

2.2.1.3. *PARK8 (LRRK2, Dardarin)*

LRRK2 mutasyonları 2004'te Zimprich ve ark. tarafından tanımlanmıştır (169). OD olduğu bağlantı analizleriyle tespit edilen bu gen, 12q11.2-q13.1'de yer almaktadır. Bu bağlantı Kafkas-soyly olanlarda da tekrarlanmıştır (169). *LRRK2* hayli korunmuş yapısıyla multidomain GTP-binding serin-treonin kinaz'ı kodlar. Mutasyonu protein kinaz patolojisine yol açar. İlginçtir ki etkilenmiş bireyler tipik PH olsalar da Lewy cisimciği patolojisi, tau patolojisi, intrasellüler inklüzyonsuz nöronal kayıp da bulunması, bu genin heterojen bir hastalık sebebi olduğunu göstermektedir (96). Motor nöron hastalığının klinik belirtilerine sahip birkaç soy daha bulunmuştur. Çok yakın bir zaman diliminde İspanya'nın Bask bölgesinde, İngiltere'de, Batı Nebraska'da Alman ırklı bir Amerikan ailesinde de tanımlanmıştır. Bu gen *LRRK2* (Leusine-rich

repeat kinase-2) adlı bir protein kinazdır ve bu protein Bask dilinde titremeye karşılık gelen “dardarin” diye adlandırılmıştır (168). PH vakaları, bu genin azalmış penetransa sahip olduğunu da göstermektedir. Bu mutasyonların sporadik etkileri bölgesel olarak farklılık göstermektedir ve frekansının yüksek olduğu Kuzey Afrika’lılarda ve Aşkenazi Yahudilerinde bu gendeki mutasyonların geç başlangıçlı PH (GBPH) etyolojisinde, SNCA mutasyonlarından daha geniş bir yayılımı olduğunu düşündürmektedir (96). Hot spot bölge Mitojenaktif Protein Kinaz Kinaz Kinaz (MAPKKK) domaini üzerinde konformasyon değişikliğiyle kinaz aktivitesinin bozulmasına doğrudan sebep olan G2019S mutasyonunun 13.yy’dan beri belli bir coğrafi bölge (Avrupa ve Kuzey Afrika) merkezli yayılması founder etki ile de açıklanmaya çalışılmaktadır (67, 77). Prognozu iyidir. Düşük doz L-Dopa’ya iyi cevap verir. PH vakalarının çoğu tek taraflı el veya ayak tremoru ile hastalığa yakalanır. Kognitif kayıp yoktur. Varyantı 50’den fazladır ve bunların da 16’dan fazlası patojenik dominant yanlı anlamlı mutasyondur (105).

2.2.1.4. PARK2 (Parkin)

İlk defa Kitada ve ark. tarafından 1998 yılında ailesel otozomal resesif juvenil başlangıçlı Parkinson hastalığı (ORJPH) olgularında bağlantı analizi ve pozisyonel klonlama yöntemleri ile bulunan *Parkin* geni tanımlanmıştır (68). Her ne kadar erken başlangıçlı görülen PH sebebi olsa da 60 yaş üzeri görünen formlarına nadiren de olsa rastlanmıştır (4). Übikütin Proteozomal Sistem (UPS) patolojisine yol açar. Japonya’da prevalansı yüksek olan erken başlangıçlı Parkinson hastalarını tanımlamak için “günlük dalgalanmalarla kendini gösteren erken başlangıçlı paralizis ajitans” terimi kullanılmıştır. Bu hastalar tremor, bradikinezi, rijidite, L-Dopa tedavisine başlangıçta mükemmel cevap ve aile hikayelerinin olması ile karakterizedir. Bunlar otozomal resesif (OR) kalıtmı, başlangıçta distoni, gece ve gündüz uykularından yarar sağlayan, yavaş progresyon gösteren ve tedavi ile ilişkili komplikasyonları erken gelişen hastalardır. Araştırmacılar tarafından ORJPH olarak tanımlanmıştır. Nöropatolojisi klasik PH ile aynı değildir. Araştırmacılar, SNPc’da gliosis ve lokus seruleus’da nöronal kayıp bulunduğunu fakat Lewy cisimciği formasyonu bulunmadığını tespit etmişlerdir

(94). ORJPH 1998'de kromozom 6'ya bağlantılandırılmış ve *Parkin* geninde bir ekzonik delesyon bulunmuştur. Takiben bu mutasyonun birçok varyantı tanımlanmıştır. Gen dozaj değişimleri ve küçük sekans değişiklikleri içeren 100'den fazla mutasyon, (trunkasyon, resesif homozigot/bileşik heterozigot, yanlış anlamlı nokta mutasyonları, ekzon delesyon / duplikasyon / triplikasyonları) bulunmuştur (58). Beklenmedik bir olay da Parkinson hastalıklı Avrupalı ailelerin bireylerinde *Parkin* mutasyonlarının prevalansının yüksek olmasıdır. Bu Avrupa kökenli popülasyonlarda nokta mutasyonları ekzonik delesyonlardan daha siktir ve şiddetli klinik veren birçok hastada mutasyonlar homozigot olmaktan ziyade bileşik heterozigottur (1). Ek olarak Yunanistan Peleponnes'te küçük bir yerleşim yerinde altı aileden sekiz bireyde *SNCA* mutasyonları saptanmış ve bu yaygın bir founder etkiye bağlanmıştır (44). *Parkin*'e bağlı PH olgularındaki en belirgin özellik çok büyük bir kısmında Lewy cisimciklerinin bulunmamasıdır. *Parkin* proteininin UPS yolağında rol oynadığı ve *Parkin*'in bir E3-ligaz olduğu gösterilmiştir. *Parkin*, übikütün ile işaretlenmiş proteinlerin yıkımında bir E3 ligaz olarak kilit rol oynamaktadır. Ayrıca, *Parkin*'deki RING-finger bölgeleri ile übikütün konjüge edici enzim E2 etkileşim için uygun bir arayüz oluşturmaktadır (17). OR geçiş gösterdiği için *Parkin* mutasyonlarının bir alleli sağlam olan kişilerin Parkinson hastası olmadıkları ancak taşıyıcı oldukları gösterilmiştir. *Parkin*'in E3 ligaz aktivitesinin kaybı substrat proteinlerin übikütün ile işaretlenememesine ve böylece proteozomlar tarafından tanınıp yıkılamamasına ve böylelikle yıkılamayan proteinlerin hücrede birikerek toksik etkisine sebep olmaktadır. *Parkin*'in bilinen en önemli iki substratı α -sinüklein ve siklin-E proteinleridir. *SNCA* mutasyonlarının α -sinüklein proteininde α -heliks yapıyı bozarak katlanma kusuru meydana getirdiği ve bunun da agregat oluşumuna sebep olduğu ifade edilmiştir. Serbest halde iken belirgin bir konformasyonu bulunmayan α -sinüklein proteini hücre zarına bağlandığında α -heliks yapısı kazanır. α -sinüklein proteininin hücre zarına bağlanarak fosfolipaz D aktivitesini düzenlediği ve bu yolla sinaptik veziküllerin salınımını modüle ettiği düşünülmektedir. *SNCA* mutasyonlarının α -sinüklein proteininin veziküllere bağlanma kapasitesini azalttığı gösterilmiştir. *Parkin*'in ikinci önemli substratı siklin-E ise nöronların sağkalımı için kilit öneme sahip bir proteindir. Bu proteinin yıkılamaması hücreyi apoptozise götürmektedir. *Parkin*'e bağlı Parkinson hastalarının orta beyinlerinde

siklin-E seviyesi artmış olarak bulunmuştur (17). Bu hastalarda klasik PH bulgularına ek olarak, geriye doğru düşme eğilimi, hiperrefleksi ve ayakta distoni vardır. L-Dopa cevabı vardır ama diskinezi gelişir ve etkisi zamanla azalır. Topukta vibrasyon duyusu kaybı ve subjektif sensoryal duyu kayıpları sıktır. Uyku sonrası semptomlar azalır.

Saptanan 100'den fazla mutasyon incelendiğinde, *Parkin* geni boyunca sık rastlanmasına sebep olan herhangi bir hot spot bölge bulunmadığı ve bu gende founder etki olmadığı düşünülmektedir (4).

Parkin, *PINK1*'le aynı yolak üzerinde yer almaktadır. *PINK1* geni silinmiş drosophilalarda *Parkin* ifadesi artarak *PINK1*'in eksikliği kompanse edilebilmektedir (57).

Parkin geninin birinci intronuna kafa-kafaya bitişik olan ve promotor fonksiyon gördüğü sanılan *Parkin* co-regulated geninin (*PACRG*) de Übikütin-proteozomal işleve sahip olduğu düşünülmektedir ve bu gen hakkında çalışmalar 2003 yılından beri devam etmektedir (158).

2.2.1.5. *PARK6 (PINK1)*

2004 yılında Valente ve ark. tarafından kromozom 1p36-37 üzerindeki PARK 6 lokusunda yerleşimli yeni bir PH geni (PTEN induced kinaz-1)(*PINK1*) bulundu (150). Bu, İtalya'nın Marsala bölgesinde aynı soydan gelen bu erken başlangıçlı Parkinson hastalığı (EBPH) olguları OR özelliğe sahip olmasına rağmen *PARK2* lokusunda mutasyon bulunmayan yeni hasta grubuydu. *PARK6 (PINK1)* geni mitokondri yerleşimli bir proteini kodlar ve in-vitro modellerde oksidatif strese karşı koruyucu bir protein rolü üstlenen bir kinazdır, *DJ-1* geninin 25 cM sentromerik kısmına bağlantılandırılmıştır (153). Mutasyonları oksidatif stres, enerji metabolizması ve mitokondri disfonksiyonuna yol açmaktadır. Parkinson hastalarında mitokondriyal disyonksiyon ve oksidatif stres hipotezinin ortaya atılmasını sağlamıştır. *PINK1* ailesi 41 yaş civarı başlayan fakat tipik PH belirtileri gösteren bir gruptur. *PINK1* aileleri tipik EBPH fenotipine sahiptir, uykudan yarar sağlarlar ve erken

başlangıçlı distonileri de yoktur. Potansiyel olarak da *Parkin* ile *PINK1*'i birbirinden ayıran bir semptom, erken başlangıçlı distoni olabilir. Mayıs 2004'te *PINK1* mutasyonlarının ilk raporunu takiben İrlanda, Filipinler ve Japonya'da sekiz mutasyon daha tanımlanmıştır (151). Son çalışmalarla birlikte 40 küçük sekans değişikliği nadiren büyük delesyonlar da buna eklenmiştir (88). Yapılan araştırmalarda *PINK1* geninde multiplikasyona rastlanmamıştır. *PINK1*, *Parkin*'le aynı yolak üzerinde yer almaktadır (57).

2.2.1.6. *PARK7 (DJ-1)*

DJ-1 ilk kez 2001'de van Duijn ve ark. tarafından Hollanda'da izole bir bölgede yaşamakta olan dört hastada keşfedilmiştir (152). Bu hastaların *Parkin* mutasyonu taşıyan hastalara benzer şekilde EBPH olguları ile aynı fenotipe sahip olduğu, erken başlangıçlı distonilerinin bulunduğu ve L-Dopa tedavisine iyi cevap verdikleri saptanmıştır (107). Bazı bireyler belirgin psikoz'a sahiptir. Ailedeki hastalık geni kromozom 1p36'ya bağlantılandırılmıştır. Bonifati ve ark. tarafından İtalyan bir ailenin tüm bireyleri *PARK7* bağlantılı bulunmuş ve bu gen araştırmacılarca *DJ-1* olarak tanımlanmıştır (7). Blefarospazmın *PARK7*'ye özgü belirgin bir klinik özellik olabileceği ileri sürülürken, birkaç *Parkin* hastasında da Blefarospazm bulunmuştur (7). Üzerinde hepsi erken başlangıçlı ORPH'na sebep olan yanlış anlamlı, kesilme, intron-ekzon bağlantı bölgesini içeren, küçük ve büyük delesyonlardan oluşan birçok mutasyon tanımlanmıştır. Mutasyonlar genin her yanına dağılım göstermekte fakat aynı fenotipe neden olmaktadır. *DJ-1* bağlantılı PH çok nadir görülmektedir (9, 53, 59). *DJ-1* proteininin fonksiyonu çok iyi bilinmemektedir ancak fonksiyon kaybı halinde oksidatif stres, enerji metabolizması ve mitokondriyal disfonksiyona yol açmaktadır. *DJ-1* proteini homodimerik bir proteindir ve kemirgenlerde infertilite ile ilgili bir multi protein kompleksinin parçası olarak bulunmuş ve c-myc proteiniyle etkileşim yoluyla mRNA'ların stabilizasyonunda görev aldığı bildirilmiştir. Ayrıca *DJ-1* oksidatif stresi algılayıp, anti-oksidan olarak da davranabilmektedir. L166P mutasyonu taşıyan *DJ-1* proteini üzerindeki çalışmalar bu mutasyonun proteinin katlanmasını etkileyerek homodimer oluşturmasını önlediğini bu şekilde yanlış

katlanarak stabilitesi düşen mutant *DJ-1*'in protein yıkım sisteminden kurtularak sitotoksositeye neden olabildiğini göstermiştir (93). Ayrıca, bu mutasyon normalde hücre içinde sitozolde bulunması gereken bu proteinin lokalizasyonunu değiştirerek mitokondride yığılma göstermesine sebep olur. *DJ-1* geninde E64D ve M26I mutasyonu gelişirse bu proteinin stabilitesi azalmaktadır. L166P mutasyonunu taşıyan *DJ-1* proteini en kötü prognozu vermektedir ve normalde bulunduğu mitokondri yerine nükleusta yerleşim gösterdiği yayınlanmıştır. *DJ-1* mutasyonları erken başlangıçlı ORPH nedenleri arasında ikinci sıradadır (59). Yang ve ark.'nın 2009 yılında yayınladıklarına göre *DJ-1* EBPH olgularının %1-2'sini oluşturmaktadır (163). Yapılan son çalışmalarda birçok nokta mutasyonu ve büyük delesyonlar saptanmıştır (8). Bir E3 ligaz olarak görev yapan *Parkin* ile mutant *DJ-1* arasında etkileşim bulunmuştur (93).

2.2.1.7. *PARK9 (ATP13A2)*

Hastalık OR kalıttır. Prematür protein kesilmesine sebep olan üç farklı mutasyon bulunmuştur (120). Lizozomal tip 5 ATPaz, ATP13A2 geni tarafından kodlanmaktadır. ATP13A2, P tipi ATPaz üst-ailesine mensup olup, inorganik katyon ve diğer substratları hücre membranının diğer tarafına geçirmekten sorumludur. Yabancıl tip protein lizozomda, stabil olmayan kırık mutant tipi ise ER da tutulur ve proteozomlarca degrade edilir. Jüvenil başlangıçlıdır, maske yüz, rijidite ve bradikinezi vardır, tremor bulunmaz. Klasik PH'ından ayrı olarak spastisite, supranükleer gözü yukarı dikme parezisi, demans semptomlara eşlik eder. Hastalık hızlı ilerler. L-Dopa'dan yararlanır ama uzun süre kullanımda artan spastisite, tepe doz diskinezisi ve kognitif kayıp oluşur. PH'na ek olarak hastada yüz-boğaz-parmak mini myoklonus, görsel halüsinasyonlar ve okülogirik distonik spazmlar bulunabilir. Manyetik Rezonans görüntüleme globus pallidus atrofisi ve geç generalize beyin atrofisi gösterilir (154).

2.2.2. Ph ile İlişkili, Doğrulanmamış Monojenik Genler

Yukarıda bahsedildiği üzere PH ile ilişkisi kesin olan bu genlere ilaveten hastalığın etyolojisine yönelik yapılan araştırmalar neticesinde yine bu hastalıkla ilişkisi olduğu düşünülen ancak kanıtlanamamış bazı aday genlerin olduğu öngörülmektedir. Bu aday genlerin ilişkisini gösterebilmek için birçok çalışma yapılmakta ve son dönemlerde yayınlanmaktadır.

UPS içerisinde görev alan *UCH-L1*, Lowe ve ark. tarafından 1990 yılında keşfedilmiştir (84). *UCH-L1* geni ilk defa bir Alman ailesinde tanımlanmıştır ve PARK5 lokusu olarak bilinmektedir (160). Tek bir ailede bulunmuştur. Nöroendokrin sisteme, tümörlerine ve nöronlara yüksek derecede spesiflik gösteren ekspresyona sahiptir. *UCH-L1* varyantları kültürde PH oluşumuna etkili ve hidrolaz aktivitesiyle açıklanamayan α -sinüklein birikimine sebep olur. Ligaz ve hidrolaz aktivitesi proteozomal protein degradasyonunda etkili olabilir. *UCH-L1* büyük oranda beyinde eksprese edilen bir protein olup übikütün polimerlerini hidroliz yolu ile monomerik forma geri dönüştüren bir enzimdir. Bu sebeple UPS'de önemli bir rol oynar. Araştırmacılarca sporadik PH'nın patogeneğinde bu lokus aday gen olarak tanımlanmıştır (110).

GCHI (GTP CYCLOHYDROLASE I) 6 ekzonlu bir gendir (62). İlk defa dopa responsif otozomal dominant distonili dört aile üyesinde, *GCHI* geninde dört heterozigot mutasyon tanımlanmıştır (63). Sonraki çalışmalarla dopa responsif distoniye ait *GCHI* geni mutasyonları birçok ailede ve ülkede tespit edilmiştir. Kadınlarda erkeklere göre dört kat daha sık görülen bir mutasyondur. Japonyada ilerleyici ve günlük dalgalanma gösteren distonili hastalarda *GCHI*'in kodlanan bölgesinde ve splice alanında herhangi bir mutasyon olmamasına rağmen *GCHI* geninin mRNA'larında %40 azalma tespit edilmiştir. Bunun sebebinin allellerden birinin inaktif hale gelmesiyle olduğu anlaşılmıştır. *GCHI* geninin allellerinden birinde bilinmeyen bir bölgede de novo bir mutasyon meydana gelerek mRNA yapımının azalmasına, bu da hastalığın görülmesine sebep olmaktadır. (65)

PH ile ilişkilendirilen ancak doğrulanmamış diğer genler; PARK13 (Omi/HtrA2) (138); SNCAIP (SYNPHILLIN) (89); NR4A2 (Nurr1) (51); POLG (DNA Polimeraz γ) (24); PARK3 (SPR Sepiapterin Redüktaz) (133); PARK10 (60); PARK11 (GIGYF2) (119); X'e bağlı kalıtım gösteren PARK12 (109) üzerinde çalışmalar yoğun şekilde devam etmektedir.

Son dönemlerde PH teşhisinin erken yapılabilmesi için yeni strateji; genetik tanı testleri yapmak, koku alma kaybı ve REM uykusu bozukluğu gibi uyku düzenini bozan erken klinik bulgular üzerine yoğunlaşmıştır. İpucu yakalanan Parkinson hastalarının genetik testlerle teyidi büyük anlam ifade etmektedir (87).

2.3 MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION

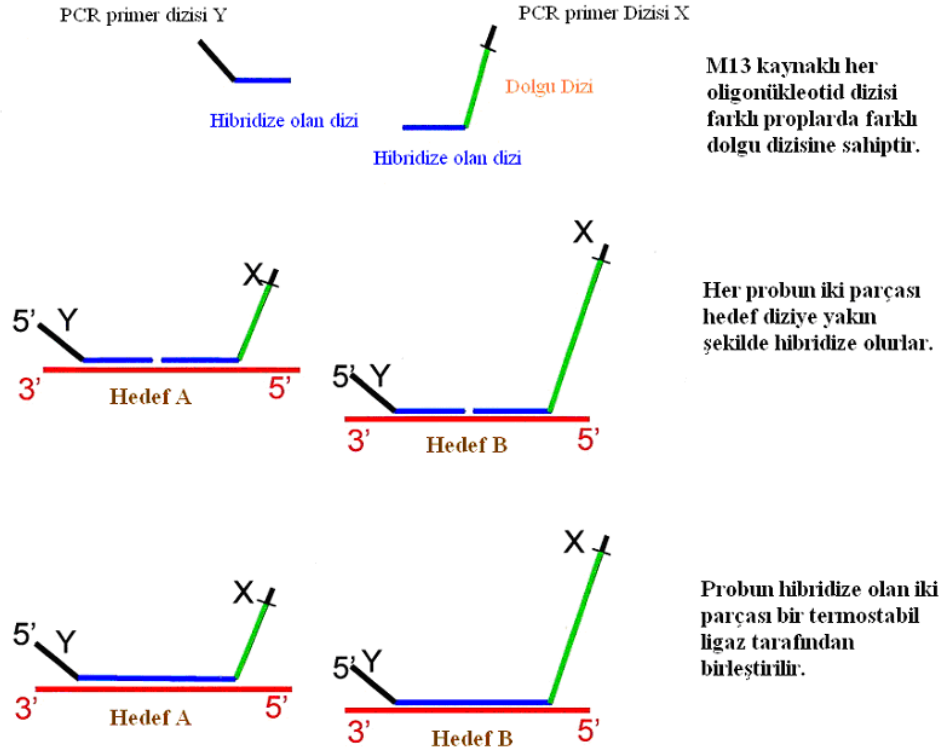
(MLPA) YÖNTEMİ

Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi 2002 yılında Schouten ve arkadaşları tarafından relatif kantitatif PCR yöntemi olarak tanımlanmıştır (130). Bir tek primer çifti kullanılarak oluşturulan amplifikasyon ürünleri bir dizileme cihazı ile işleme tabi tutularak ayrıştırılır. Oluşan fragmanlar 130-490 bp uzunluğundadır ve bu uzunluk jel paternine uygundur. Hangi genomik dizinin delesyon / amplifikasyon taşıdığı, elde edilen sonuçlar kontrol örnekleriyle karşılaştırılarak tespit edilir. MLPA reaksiyonunda sadece 20 ng insan DNA'sı 45 farklı dizinin amplifikasyonu için yeterlidir. Probların bağlanma bölgesindeki tek nükleotid değişimi bile görülebilmektedir. Diğer tekniklere göre daha hızlı, ucuz ve uygulanması kolaydır. Aynı anda 45 kadar spesifik dizi, bir multiplex PCR işleminden sonra eş zamanlı olarak değerlendirilebilmektedir. Gerekli ekipmanlar, pek çok moleküler laboratuvarında bulunabilmektedir. Her bir MLPA probu hedef diziye hibridize olduklarında birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid içerir. Bütün bağlanmış problemler 5' ve 3' uçlarında PCR ile sadece tek primer çifti kullanılarak aynı anda amplifiye olmaları için tanımlayıcı dizilere sahiptirler. Her prob, uzunlukları 130 ve 480 baz çifti arasında değişmek üzere birbirinden farklı uzunlukta amplifikasyon ürünü verir. Her MLPA probunun iki

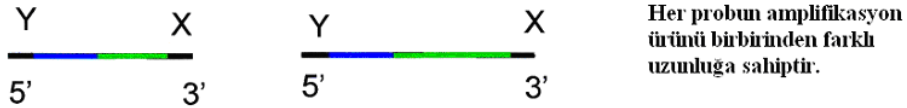
oligonükleotid parçasından bir tanesi sentetiktir ve 5' ucunda PCR ile amplifikasyon için sabit bir dizi ve 3' ucunda hedefe-spesifik dizi bulunur. Proben diğer oligonükleotidi 5' ucunda 25–43 nükleotid uzunluğunda ve ilk oligonükleotide komşu şekilde hedef diziyeye hibridize olan diziyi içerir, 3' ucunda ise PCR ile amplifikasyonda kullanılacak olan sabit dizi ve 19–370 nükleotid uzunluğunda dolgu dizisi bulunur. 80–440 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotidler kimyasal olarak sentezlenmiştir. Bu oligonükleotidlerin sentezi için M13 klonlarının tek zincirli DNA'sı kullanılmıştır. Farklı problemlerin birbirleri ile heterodupleks formasyonunu önlemek için problemlerin sadece uç kısımları ortak dizi içerir (130). Şekil 2.3'te şematik olarak MLPA reaksiyonu anlatılmıştır. Hibridizasyon ve ligasyon aşamalarından sonra PCR ile amplifikasyonda bütün problemler için tek çift primer kullanılmaktadır. Primerlerden bir tanesi FAM [N-(3-fluoranthyl) maleimide] ile işaretlenmiştir (135). Genomik DNA'da olduğu gibi mRNA araştırmalarında da kullanılabilir. MLPA analiz yönteminin sensitivitesi 0,95 ve spesifitesi 0,99'dur (161).

MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

- Denatüre genomik DNA 40 ayrı prob ile hibridize edilir.
- Her bir MLPA probu, biri sentetik, diğeri M13 kaynaklıdır.



Bütün prob ligasyon ürünleri tek bir primer çifti kullanılarak PCR ile amplifiye edilirler.



Amplifikasyon ürünleri elektroforez ile ayrıştırılır. Prop amplifikasyon ürünlerinin göreceli miktarları hedef dizinin göreceli doz miktarını belirler.

Şekil 2.3 MLPA Reaksiyonunun İşleyişi

"Schouten, J.P., ve ark. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Research, 2002; 30: e57." den alınmıştır (130).

2.3.1 Parkinson Hastalığında MLPA Tekniğinin Kullanımı

Çalışmamızda Türkiye’de yeni bir yöntem olan Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) tekniği ile şimdiye kadar PH ile ilişkilendirilmiş altı farklı gen için dizayn edilmiş 67 farklı prob bölgesindeki değişimler araştırılmıştır. MLPA tekniğinin sporadik PH olgularına yönelik kullanıldığı çalışmamız ilk olma özelliğindedir.

Çalışmamızda PH’na yönelik dizayn edilmiş mevcut kitler kullanıldığı için belli kromozom ve gen bölgeleri incelenebilmiştir. Bu prob bölgelerinin dizaynında üretici firma, bugüne kadar yapılan ve literatürde yayınlanarak PH ile ilişkilendirilmiş bölgeleri dikkate almışlardır. Kullanılan problemlerin lokalizasyonları ve gen isimleri Tablo 2.1 ve Tablo 2.2’de belirtilmiştir.

PH’da birçok genomik değişim tanımlanmıştır. Bunlar büyük delesyon, amplifikasyonlardan, spesifik genlerdeki nokta mutasyonlarına kadar değişmektedir. MLPA tekniği bu geniş dağılım içerisinde özellikle, tanımlanmış genomik değişimlere yönelik iki kit dizaynına sahiptir. Bu kitlerde Tablo 2.1 ve Tablo 2.2’de dağıtıldığı şekilde *SNCA* ekzon 1, 2, 3, 4, 5, 6, delesyon veya amplifikasyonuna özgü altı, A30P yabanıl tip allele ve A30P spesifik mutasyonuna özgü iki prob, *UCH-L1* ekzon 1-9 arası delesyon ve amplifikasyonlarına özgü dokuz prob, *PINK1* ekzon 1-8 arası amplifikasyon ve delesyonlara özgü sekiz prob, uzun bir gen olması sebebiyle *Parkin* 1-12. ekzon arası delesyon ve amplifikasyonlara özgü 23 prob, *Parkin* geninin birinci intronuna bitişik promotor bölgede lokalize olan *PACRG* ekzon 1’e özgü bir prob ile delesyon / amplifikasyon aranmaktadır (78). *DJ-1* geni 1-7 ekzon arası amplifikasyon / delesyonları saptamak için yedi prob, *DJ-1*’in 23 kb p-telomerik kısmında yer alan *TNFRSF9* genine ait amplifikasyon / delesyonları saptamaya yönelik bir prob da kitin içerisinde mevcuttur. *LRRK2* 51 ekzonlu bir gendir. Bu geni taramak üzere ekzon 1,2, 10, 15, 27, 41 ve 49’ ait gen bölgelerinde amplifikasyon / delesyonlara özgü birer prob, G2019S nokta mutasyonunu görmek amacıyla iki ayrı uzunlukta prob vardır.

PDF Eraser Free

Bu beş gene ilave olarak, *GCHI*, *TH*, *CAVI* ve *CAV2* genleri için ilave bazı proplar da probmix içine eklenmiştir. Caveolin genlerinden olan *CAVI* ve *CAV2* genleri, *Parkin* (*PARK2*) geni gibi frajil bir genomik bölgede bulunmaktadır. *GCHI* ve *TH* genleri de Dopa Responsif Distoni hastalığına özgüdür. PH'ndan sorumlu olmayan bu genlerle ilgili proplar, *Parkin* probleminin analizi için kontrol probu olarak ticari firma tarafından kit içerisine ilave edilmiştir.

Tablo 2.1 Salsa MLPA P051 Parkinson probmikis kiti prob bölgeleri

Uzunluk (bp)	Prob hedef bölge	Kromozomal pozisyon
64-70-76-82	DQ Kontrol prob	
94	Sentetik Kontrol prob.	2q14
130	<i>Kontrol prob 0797-L0463</i>	5q31
136	<i>PINK1</i> , prob 3695-L3590, ekzon 5	1p36.1
142	<i>PINK1</i> , prob 3691-L3106, ekzon 1	1p36.1
145	<i>SNCA</i> , prob 2166-L1661, Yabani A30P mutasyonu, DÜŞÜK	4q22
149	<i>SNCA</i> , prob 2166-L1662, A30P mutasyon spesifik	4q22
157	<i>SNCA</i> , prob 2168-L1665, ekzon 4	4q22
166	<i>PINK1</i> , prob 3692-L3107, ekzon 2	1p36.1
175	<i>SNCA</i> , prob 2169-L1666, ekzon 6	4q22
184	LPA, prob 4615-L3891	6q26
193	<i>LRRK2</i> , prob 4575-L4006 G2019S mutation specific	12q12
200	<i>PINK1</i> , prob 3693-L3108, ekzon 3 (202'de spesifik olmayan ek pik)	1p36.1
211	<i>PARK7</i> , prob 4617-L3893, ekzon 6	1p36
220	<i>PINK1</i> , prob 3694-L3109, ekzon 4	1p36.1
229	<i>PINK1</i> , prob 3698-L3154, ekzon 7	1p36.1
238	<i>PARK2</i> , prob 2178-L1676, ekzon 6	6q26
247	<i>SNCA</i> , prob 4616-L3892. ekzon 3	4q22
256	<i>PARK2</i> , prob 3203-L2564, ekzon 1	6q26
265	<i>PARK2</i> , prob 2179-L1677, ekzon 7	6q26
274	<i>Kontrol prob 1665-L1244</i>	11q13
283	<i>PARK2</i> , prob 2174-L1672, ekzon 2	6q26
292	<i>PARK2</i> , prob 2180-L1678, ekzon 8	6q26
301	<i>Kontrol prob 0895-L0483</i>	3p22
310	<i>PARK2</i> , prob 3205-L2566, ekzon 3	6q26
319	<i>PARK2</i> , prob 2181-L1679, ekzon 9	6q26
328	<i>PINK1</i> , prob 4095-L3152, ekzon 6	1p36.1
337	<i>PARK2</i> , prob 3363-L2747, ekzon 4	6q26
346	<i>PARK2</i> , prob 2182-L3127, ekzon 10	6q26
355	<i>Kontrol prob 1548-L0991</i>	5q22
364	<i>PARK2</i> , prob 2177-L1675, ekzon 5	6q26
373	<i>PARK2</i> , prob 2183-L1681, ekzon 11	6q26
382	<i>Kontrol prob 0584-L0149</i>	6p21.1
391	<i>PARK2</i> , prob 2184-L1682, ekzon 12	6q26
400	TNFRSF9, prob 2185-L1683	1p36
409	<i>PARK7</i> , prob 2187-L3592, ekzon 3	1p36
418	<i>Kontrol prob 1617-L1199</i>	13q12
427	<i>PARK7</i> , prob 3690-L3105, ekzon 1	1p36
436	<i>PARK7</i> , prob 2188-L1686, ekzon 5	1p36
445	<i>SNCA</i> , prob 4096-L3102, ekzon 1	4q22
454	<i>PARK7</i> , prob 2189-L2365, ekzon 7	1p36
463	<i>PINK1</i> , prob 3697-L3153, ekzon 8	1p36.1
478	<i>SNCA</i> , prob 3689-L3104, ekzon 5	4q22

Tablo 2.2 Salsa MLPA P052B Parkinson probmiks kiti prob bölgeleri

Uzunluk (bp)	Prob hedef bölge	Kromozomal pozisyon
64-70-76-82	DQ Kontrol prob	
94	Sentetik Kontrol prob	Chr. 2q14
130	<i>Kontrol prob 0797-L0463</i>	5q31
136	<i>PACRG</i> , prob 3204-L2565, ekzon 1	6q26
142	<i>CAV2</i> , prob 3357-L2741, ekzon 3	7q31
148	<i>UCH-L1</i> , prob 3680-L3095, ekzon 4	4p14
154	<i>PARK2</i> , prob 3366-L2750, ekzon 7	6q26
160	<i>UCH-L1</i> , prob 3679-L3094, ekzon 1	4p14
166	<i>LRRK2</i> , prob 4574-L4006. G2019S mutasyon spesifik	12q12
172	<i>PARK2</i> , prob 3361-L3999, ekzon 2	6q26
178	<i>UCH-L1</i> , prob 3681-L3096, ekzon 5	4p14
184	<i>LRRK2</i> prob 4277-L3681, ekzon 1	12q12
193	<i>Kontrol prob 1567-L1139</i>	22q12
202	<i>UCH-L1</i> , prob 2937-L1669, ekzon 9	4p14
208	<i>GCHI</i> , prob 4405-L3099, ekzon 3	14q22
214	<i>PARK2</i> , prob 3371-L3980, ekzon 12	6q26
220	<i>LRRK2</i> prob 4282-L3686, ekzon 41	12q12
	18 bp gap	
238	<i>PARK2</i> , prob 3365-L2749, ekzon 6	6q26
247	<i>Kontrol prob 1164-L0720.</i>	11q13
256	<i>GCHI</i> , prob 4618-L3894, ekzon 1	14q22
265	<i>PARK2</i> , prob 4613-L3889, ekzon 3	6q26
274	<i>LRRK2</i> prob 4281-L3685, ekzon 27	12q12
283	<i>GCHI</i> , prob 4404-L2610, ekzon 6	14q22
292	<i>PARK2</i> , prob 3367-L2751, ekzon 8	6q26
301	<i>Kontrol prob 3255-L2692.</i>	11p13
310	<i>GCHI</i> , prob 3683-L3098, ekzon 2	14q22
319	<i>GCHI</i> , prob 3685-L3100, ekzon 5	14q22
328	<i>LRRK2</i> prob 4283-L3687, ekzon 49	12q12
337	<i>PARK2</i> , prob 2176-L1674, ekzon 4	6q26
346	<i>PARK2</i> , prob 3369-L2753, ekzon 10	6q26
355	<i>Kontrol prob 4014-L3437.</i>	2q33
364	<i>PARK2</i> , prob 3364-L2748, ekzon 5	6q26
373	<i>LRRK2</i> prob 4278-L3682, ekzon 1	12q12
382	<i>Kontrol prob 2562-L2030</i>	6p25
391	<i>PARK2</i> , prob 4614-L3890, ekzon 11	18q11
400	<i>CAVI</i> , prob 3359-L2743	7q31
409	<i>Kontrol prob 0963-L0550</i>	2p14
418	<i>PARK2</i> , prob 3368-L2752, ekzon 9	6q26
427	<i>LRRK2</i> , prob 4279-L3683, ekzon 10	12q12
436	<i>Kontrol prob 2967-L2399</i>	7q31
445	<i>Kontrol prob 1799-L1362</i>	13q14
454	<i>SNCA</i> , prob 4092-L3103, ekzon 2	4q22
463	<i>LRRK2</i> , prob 4280-L3684, ekzon 15	12q12

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Gereçler

Spektrofotometre (Eppendorf)

Kapiller Elektforez Cihazı (ABI Prizm 310)

Spektrofotometre Küvetleri (Eppendorf)

Mikro Pipet takımı (Gilson)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Thermal cycler (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)

Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)

Elektforez aleti (Consort E844)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

Su banyosu (Nüve)

Vorteks (Heidolph)

Deep-freeze (Meraeus)

Buzdolabı (Arçelik)

Santrifüj tüpleri

Eppendorf Tüpü (1,5 ml lik)

PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)

Toplama tüpü (QIAGEN)

Spin kolonu (QIAGEN)

ABI 310 yükleme tüpleri (ABI)

ABI 310 47 cm Kapiller (ABI)

PDF Eraser Free

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler:

DNA Ekstraksiyon Kiti (Qiagen QIAmp DNA Mini Kit)

Salsa MLPA Parkinson Probe Mix (P051-P052B Parkinson- MRC Holland)

Performans Optimize Edici Polimer 4 (POP4 TM) (ABI)

10X EDTA lı Buffer (ABI)

Gene Scan 500 Rox Internal Size Standart (ABI)

Hi-Di Formamide (ABI)

Mineral Yağ (Roche)

Etanol (%95) (Tekel)

6X Jel yükleme tamponu (Sigma)

Agoroz (Sigma-Lot: 072K0059)

Etidyum Bromid (Sigma)

Proteinaz K (QIAGEN)

Distile Su

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Materyal Seçimi

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Hareket Bozukluğu Polikliniğine 2004-2008 yılları arasında Londra Beyin Bankası tanı kriterlerine göre sporadik PH tanısı almış 58 hasta dahil edilmiştir.

Sporadik 58 PH olgusunun periferik kan örneklerinden elde edilen DNA'lar, MLPA Parkinson P051/P052B kiti ile analiz edilerek sonuçları değerlendirilmiştir.

Çalışmamızın amaçlarına yönelik olarak, MLPA tekniği ile elde edilecek sonuçların karşılaştırılmasında farklı klinik yorumları önlemek amacıyla yalnızca tanı kriterlerine uyan hasta kanları çalışma için alınmıştır. Çalışmaya ailevi PH öyküsü bulunan hastalar dahil edilmemiştir. Çalışmamızda eksternal kontrol olarak kullanılan sağlıklı kontrol DNA örnekleri, yaşları 60-65 arası, ailelerinde ve kendilerinde nörodegeneratif hastalık öyküsü bulunmayan bireylerden seçilmiştir.

Çalışmamız için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 11.01.2008 tarih ve 2008/12 sayılı onay alınmıştır.

3.2.2. Qiagen® Ekstraksiyon Kiti ile Kandan DNA Elde Etme Protokolü

- Banyo ısısı 56°C ye getirilmiştir.
- Kan örnekleri ve diğer malzemeler oda sıcaklığına getirilmiştir.
- 1,5 ml ependorf tüp strafora konulup üzerine kan protokol numarası yazılmıştır.
- 20 µl Qiagen proteaz (proteinaz K) ependorf tüpünün dibine konmuştur.
- 200 µl hasta kan örneği ependorf tüpüne eklenmiştir.

PDF Eraser Free

- 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.
- Ependorftaki karışım filtreli tüpe dikkatlice aktarılmıştır.
- 8000 devir/dk. 1 dk. santrifüjlenmiştir.
- Filtreli tüp yeni toplama tüpüne konulup, filtratlı tüp atılmıştır. (Filtreli tüp tamamen boşalmadığında tam devirle yeniden santrifüjlenmiştir)
- 500 µl Buffer AW1 dikkatlice filtreli tüpe konulmuştur. 8000 devir/dk 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. 3 dk. santrifüj edilip, filtratlı tüp atılmıştır.
- Filtreli tüp ependorf tüplerine aktarılıp, tam devirde 1 dk. santrifüjlenmiş, ependorf tüpü atılmıştır.
- Filtreli tüp yeni ependorflara aktarılıp, üzerine 200 µl Buffer AE eklenmiştir.
- Oda sıcaklığında 5 dk. bekletilip, 8000 devir/dk. 1 dk. santrifüjlenmiştir.
- Filtreli tüp atılıp DNA içeren mayi ependorf içinde -20°C'ye kaldırılmıştır.

3.2.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi

3.2.3.1. DNA denatürasyonu ve SALSA P051/052 probmiksle hibridizasyonu

- Örneklerimizden elde ettiğimiz DNA dan 5 µl (20-250 ng DNA) alınmıştır.
- Alınan örnekler 200 µl'lik PCR strip tüplerine aktarılmıştır.
- 98 °C'de 5 dk. Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA nın denatürasyonu sağlanmıştır.
- Sonrasında örnekler 25 °C'ye soğutulmuştur.
- 25 °C'deki DNA örneğinin üzerine 1.5 µl SALSA Probe Mix (P126/ P127) ve 1.5 µl MLPA Buffer ilave edilip pipetaj ile homojenize edilmiştir.
- Sonraki aşamada buharlaşmayı önlemek için PCR strip tüplerinin üzerine 5 µl mineral yağ eklenmiştir.
- Daha sonra 95 °C'de 1 dk. inkübe edilip örnekler 60 °C'de 16 saat hibridizasyona bırakılmıştır.

3.2.3.2. Ligasyon reaksiyonu

- Hibridizasyon süresi bitiminde termal cycler cihazının ısısı 54 °C'ye indirilmiştir.
- Örnekler 54 °C'ye geldikten sonra strip tüplerden mineral yağ dikkatli şekilde pipet ile alınmıştır.
- Hibridizasyon ürününe 32 µl Ligaz-65 miks ilave edilmiştir.
- 54 °C'de 15 dk. inkübasyona bırakılmıştır.
- Daha sonra 98 °C'de 5 dk. bekletilerek ligaz inaktivasyonu sağlanmıştır.

3.2.3.3. PCR

- Ligasyon reaksiyonu ürününden 10 µl alınarak ayrı PCR strip tüplerine aktarılmıştır.
 - Daha sonra ligasyon ürünü konmuş her strip tüpüne sırasıyla:
 - 4 µl 10XSALSA PCR Buffer
 - 26 µl distile su
 - 10 µl Polimeraz miks,
- konularak PCR başlatılmıştır.

PDF Eraser Free

-PCR şartları:

Denatürasyon	30 sn. 95 °C	}	38 döngü
Annealing	30 sn. 60 °C		
Ekstansiyon	60 sn. 72 °C		
Final Ekstansiyon	20 dk. 72 °C		

3.2.3.4. ABI 310 cihazına yükleme

- PCR bitiminde elde edilen ürünlerden 3 µl alınarak ABI 310 cihazı yükleme tüplerine aktarılmıştır.

- Daha sonra üzerlerine:

- 0.5 µl internal size standart (Rox 500)

- 12 µl deiyonize formamid konularak pipetajla homojenize edilmiştir.

- Örnekler 94 °C de 4 dk. Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlanmıştır.

- Devamında örnekler buz üzerine alınmıştır.

- ABI 310 cihazında; 15 kV de 5 sn injeksiyon zamanı, 60 °C ve 15 kV' da 25 dk. yürütme zamanı, filtre C şartları sağlanmıştır.

- Daha sonrasında ABI cihazına yüklenilerek, Gene Mapper programında okutulmaya başlanmıştır.

- Her örneğe ait pik görüntüleri ve pik alanları elde edilmiştir.

3.2.3.5. Değerlendirme

Gene Mapper programında okutulan örneklerin pik alanları ve prob uzunlukları Excel dosyası formatında kaydedilmiştir. Spesifik olmayan nümerik amplifikasyon pik değerleri temizlenmiştir. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları kalmıştır. Problemlerin elde edilen boyut ve pik alanları verileri DiagenAnalyzer® programına aktarılmıştır. Sağlıklı bireylerden alınan veriler eksternal kontroller olarak programa kaydedilmiştir.

Her test dört eksternal sağlıklı kontrol bireylerine ait örneklerle çalışılmıştır. Eksternal kontrol olarak kullanılan sağlıklı kontrol DNA örnekleri, yaşları 60-65 arası, ailelerinde ve kendilerinde nörodejeneratif hastalık öyküsü bulunmayan bireylerden seçilmiştir. Relatif kantitatif PCR yöntemi olan MLPA ile değerlendirme yapılırken DiagenAnalyzer® programı, otomatik olarak internal kontrol ve eksternal kontrol pik değerleri ile her bir prob spesifik bölge için doz tayini yapmaktadır. Doz tayini bu program ile yapılmıştır.

Yöntem gereği olarak, program tarafından test edilen prob bölgesi için, doz oranı 0,7 ve 1,3 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgenin normal dozda olduğu, 0,5'den küçük değerlerde delesyon yani doz eksikliği olduğu, 1,8'den büyük değerler ise amplifikasyon yani doz fazlası olduğu belirlenmiştir. Saptanan değerler 0,5 ile 0,7 arasında veya 1,3 ile 1,8 arasında ise gri alan olarak tanımlanmış ve programın içerisinde bulunan doğrulama işlemi uygulanarak yeniden incelenmiştir. Gri alan olarak belirlenmiş değer aralıklarındaki bölgeler, DiagenAnalyzer® programında yer alan doğrulama bölümünde gerçek bir delesyon veya amplifikasyon olup olmadığı yönünde tekrar incelenmiştir. Burada elde edilen pik değerlerinin gerçek bir delesyon veya amplifikasyon olup olmadığı, bu pik değerinin elde edildiği hastanın sentetik prob büyüklüğü ile kontrollerin sentetik prob büyüklükleri karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Gri alan formülü uygulanmış bölgenin sonuçları, doz oranı 0,7 ve 1,3 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgenin normal dozda olduğu, $\leq 0,7$ değerlerinde bölgede kesin delesyon yani doz eksikliği olduğu, $\geq 1,3$ değerlerinde ise kesin amplifikasyon 1,3 ile yani doz fazlası olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalı Hareket Bozukluğu Polikliniği'nde, klinik olarak Londra Beyin Bankası tanı kriterlerine göre sporadik PH tanısı almış 58 olgu çalışmaya alındı. Bu hastalara ait kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Sağlıklı bireylerden alınan DNA örnekleri de kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Olguların yaşları, cinsiyetleri, hastalık başlangıç zamanları ve hastalık şiddetlerini gösteren UPDRSIII skorları hasta dosyalarından temin edildi.

4.1. ARAŞTIRMA GRUBU BİREYLERİNİN DEMOGRAFİK VE KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Çalışma grubumuza dahil edilen hastaların 30'u kadın, 28'i erkek olup, yaş ortalaması 64,8 olarak bulunmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş	n	%
<50	2	4,0
50-59	13	22,0
60-69	25	43,0
70>	18	31,0
Toplam	58	100,0

Çalışmamıza katılan hastaların yaş gruplarına göre dağılımı tablo 4.1'de görüldüğü gibidir. Tablo 4.2'de görüldüğü üzere hastaların başlangıç yaşları ortalama

57,1'dir. Hastaların %14'ü (n=8) erken başlangıçlı 50 yaş altı grubu, %86'sı (n=50) geç başlangıçlı 50 yaş üstü grubu oluşturmaktadır.

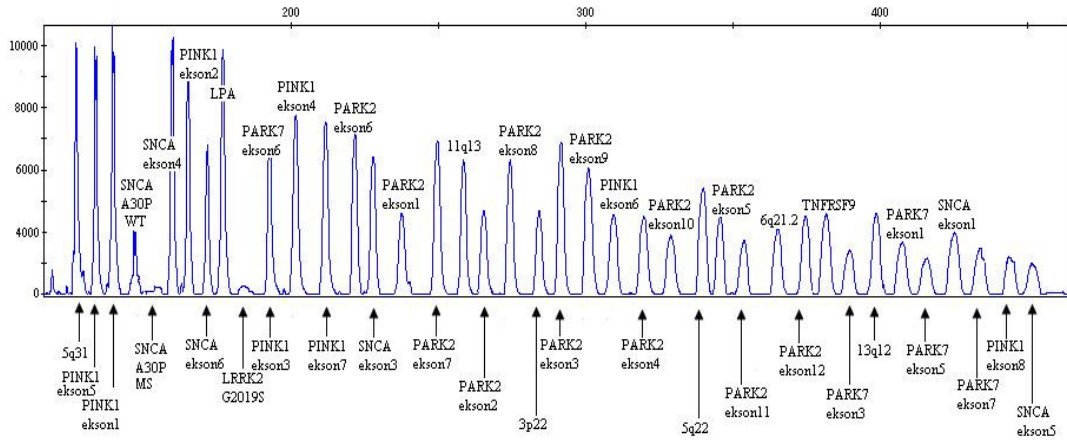
Tablo 4.2 Hastaların başlangıç yaşlarına göre dağılımı

Klinik Tanı	n	%
Erken Başlangıçlı <50	8	14,0
Geç Başlangıçlı ≥50	50	86,0
Toplam	58	100,0

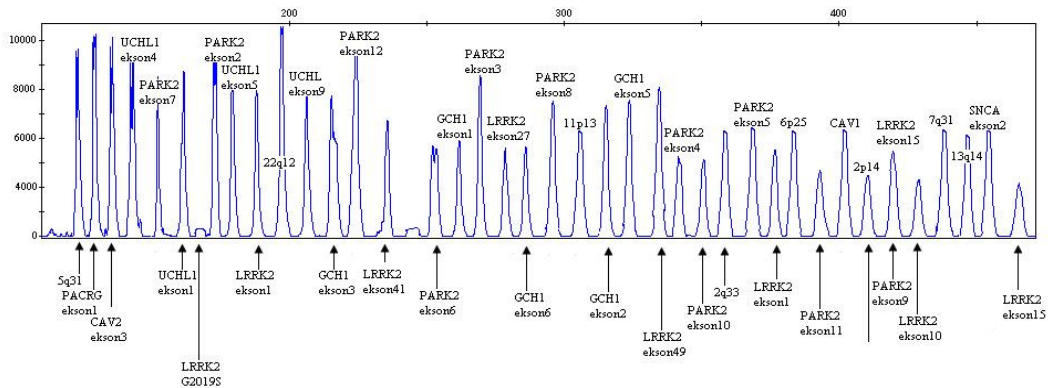
4.2. ARAŞTIRMA GRUBU BİREYLERİ MLPA BULGULARI

Çalışma grubuna alınan hastaların kan örneklerinden elde edilen DNA örneklerinde Salsa MLPA P051 ve P052B kiti kullanılarak MLPA yöntemi çalışıldı. Çalışmada ABI 310 cihazına yüklenen örnekler, Genemapper V.3.7 programı kullanılarak incelendi. Bu programda elde edilen piklerin büyüklükleri kontrol hastaları ile karşılaştırılmak üzere Excel makro tabanlı DiagenAnalyzer® programına aktarıldı. Genemapper programında elde edilen piklerin boyutu öncelikli olarak DNA miktarıyla orantılıdır. Kaliteli ve yeterli miktarda (50- 500 ng) DNA elde edilemeyen örneklerde pikler düşük ve non-spesifik olabilmektedir. MLPA yönteminde kullanılan DNA miktarının düzey tayini, prob piklerinin başlangıcında yer alan DQ (DNA Quantity) fragmanlarına göre yapıldı. Bu pikler 64, 70, 76, 82 bç uzunluğunda, ligasyon olmasa bile görülen piklerdir. Elde edilen prob piklerine göre bu kontrol piklerini karşılaştırarak DNA miktarı belirlenebilmektedir. Buna göre bu kontrol pikleri elde edilen prob piklerine göre büyükse DNA miktarının yeterli olmadığını göstermekte, eğer bu kontrol pikleri prob piklerinden küçük veya görünmüyor ise DNA miktarının yeterli olduğunu göstermektedir.

Her çalışmada sağlıklı, ailesinde veya kendisinde nörodejeneratif hastalık öyküsü bulunmayan dört bireyin periferik kanından elde edilen DNA örnekleri internal kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada kullandığımız kontrollerden birine ait pik görüntüleri ve piklerin karşılığı olan prob bölgeleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Bir kontrol bireyine ait MLPA Salsa P051 pik görüntüleri ve prob bölgeleri



Şekil 4.2 Bir kontrol bireyine ait MLPA Salsa P052B pik görüntüleri ve prob bölgeleri

Elde edilen piklerin bç uzunlukları Genemapper programında değişik boylarda pikler şeklinde görölmüştür. Bu pik alanları daha sonra Excel programına aktarılarak, non-spesifik pikler silinerek kaydedilmiştir. Daha sonra Excel formatına alınan pik alanları, yine Excel tabanlı çalışan DiagenAnalyzer® programında değerlendirmeye alınmıştır. Bu programda kontrol pikleri ile hasta pikleri karşılaştırılarak bir ortalama değer elde edilmiştir. Bu değer 0,7'nin altında ise delesyon yönünde, 1,3'ün üstünde veya eşitse amplifikasyon yönünde değerlendirilmiştir.

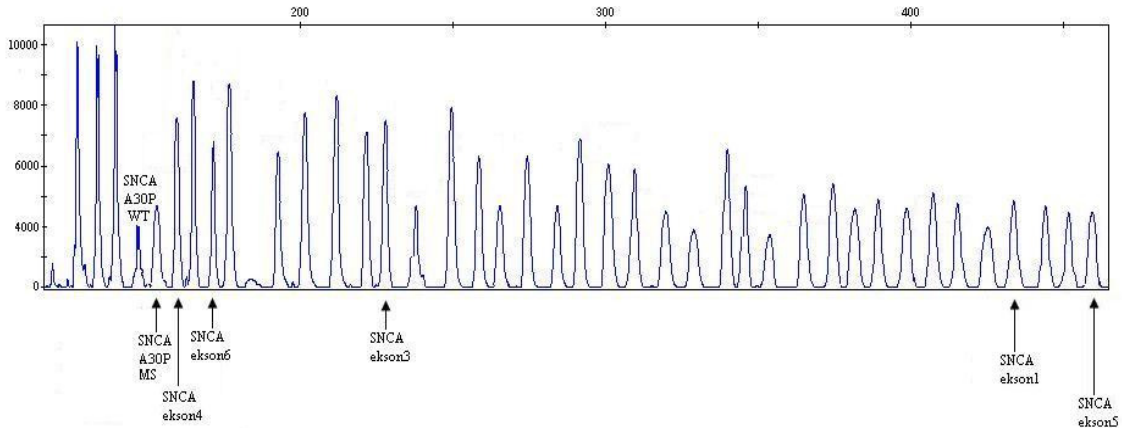
4.2.1. SNCA (PARK1, PARK4) Prob Bölgesi Bulguları

Çalışmaya alınan 58 hasta MLPA yönteminin Parkinson hastalarına spesifik dizayn edilmiş olan P051-P052B kitleri kullanılarak incelenmiştir. Tablo 4.3'de görüldüğü gibi SNCA (Park 1 ve Park 4) geni ekzon 1, ekzon 2 üç ayrı proba (Yabanıl, A30P mutasyonu spesifik ve dozaj analizi için birer proba), ekzon 3, ekzon 4, ekzon 5 ve ekzon 6 bölgelerine yönelik hazırlanmış prob bölgeleri olmak üzere altı ekzonu taramak amacıyla incelendiğinde, SNCA ekzon 1'de dört hastada delesyon, üç hastada amplifikasyon, SNCA ekzon 2'de birinci prob bölgesinde, bir hastada delesyon, SNCA ekzon 4 bölgesinde bir delesyon, SNCA ekzon 5 bölgesinde, üç hastada delesyon, sekiz hastada amplifikasyon, SNCA ekzon 6'da bir hastada delesyon bir hastada amplifikasyon saptanırken çalışmaya alınan hastalar içerisinde SNCA geni ekzon 3'e ait prob bölgesinde herhangi bir delesyon veya amplifikasyona rastlanmamıştır. SNCA genlerinde amplifikasyon bulunan hastalar sonuçta duplikasyon olarak değerlendirilirlerken, daha büyük sayıda amplifikasyonlara karşılık gelen triplikasyon veya multiplikasyonlar saptanmamıştır.

Tablo 4.3 SNCA Delesyon ve Amplifikasyonları Dağılımı

SNCA Prob Bölgeleri	Delesyon Saptanan Hasta Sayısı	Amplifikasyon Saptanan Hasta Sayısı
Ekzon 1	4	3
Ekzon 2 1.Prob bölgesi	1	--
Ekzon 3	--	--
Ekzon 4	1	--
Ekzon 5	3	8
Ekzon 6	1	1
Ekzon 2 A30P Mutasyon	15*	--
TOPLAM	25	12

SNCA ekzon 2 A30P mutasyon bölgesinde Tablo 4.3'te görüldüğü gibi, 15 hastada nokta mutasyonu saptanmıştır. (*) ile işaretlenmiş bu 15 hasta içerisinde birinde aynı zamanda yabancı allele yönelik pik alınmaması, bu hastanın mutasyonunun homozigot, diğer 14 hastanın da heterozigot genomik değişimini taşıdığını göstermiştir.



Şekil 4.3 SNCA geninin 2. ekzonunda A30P heterozigot mutasyonu saptanan hastaya ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgesi.

Şekil 4.3’de görüldüğü gibi prob bölgelerinin karşılık geldiği pikler belirtilmiştir. Bu piklere göre delesyonlu bölgeye ait pik düşmesi rahatlıkla görülebilmektedir. A30P WT (Yabani A30P alleli) prob bölgesi de MLPA panelinde mevcuttur. Bu proba ait pik normalde diğer piklere nazaran biraz düşük görünüm verir. Yabani allellerden birinin mutasyonu sebebiyle A30P yabani probu bu beklenen düşük değerden de düşük çıkarak doz kaybını göstermiştir. A30P mutasyonu saptanan ve görece düşük saptanan yabani A30P pik değeri her iki allelin de varlığını göstermiştir. Bu sebeple hasta heterozigot A30P mutasyonu olarak değerlendirilmiştir. Mutasyon saptanmayan hastalarda A30P probu pik vermemiş, A30P WT problemleri ise 0,7 ve 1,3 arası değerlerde saptanmıştır. Elde edilen piklerin alanları kontrollerin alanları ile karşılaştırılmak üzere DiagenAnalyzer® programında değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme Tablo 4.4’te verilmiştir.

Tablo 4.4 SNCA geninin 2. eksonunda heterozigot A30P mutasyonu saptanan hastaya ait DiagenAnalyzer® programı örnek değerlendirme sonuçları

Length	SALSA MLPA probe	Chr. Position	SONUC
92	Synthetic Control probe	2q14	1,149492
130	Control probe 0797-L0463	5q31	1,145121
136	PINK1, probe 3695-L3590, ekzon 5	1p36.1	1,093394
142	PINK1, probe 3691-L3106, ekzon 1	1p36.1	1,134505
145	SNCA, probe 2166-L1661, WT at A30P mutation, LOW	4q22	0,51655
149	SNCA, probe 2166-L1662, A30P mutation specific	4q22	1,496572
157	SNCA, probe 2168-L1665, ekzon 4	4q22	0,85936
166	PINK1, probe 3692-L3107, ekzon 2	1p36.1	0,967669
175	SNCA, probe 2169-L1666, ekzon 6	4q22	0,941608
184	LPA, probe 4615-L3891	6q26	1,006618
193	LRRK2 probe 4575-L4006 G2019S mutation specific	12q12	1,064411
200	PINK1, probe 3693-L3108, ekzon 3 (+aspecific peak at 202)	1p36.1	1,000826
211	PARK7, probe 4617-L3893, ekzon 6	1p36	0,926967
220	PINK1, probe 3694-L3109, ekzon 4	1p36.1	0,982951
229	PINK1, probe 3698-L3154, ekzon 7	1p36.1	0,957693
238	PARK2, probe 2178-L1676, ekzon 6	6q26	0,915923
247	SNCA probe 4616-L3892, ekzon 3	4q22	1,036612
256	PARK2, probe 3203-L2564, ekzon 1	6q26	0,997178
265	PARK2, probe 2179-L1677, ekzon 7	6q26	0,879216
274	Control probe 1665-L1244	11q13	1,066443
283	PARK2, probe 2174-L5093, ekzon 2	6q26	0,916581
292	PARK2, probe 2180-L5094, ekzon 8	6q26	0,981699
301	Control probe 0895-L0483	3p22	0,987339
310	PARK2, probe 3205-L2566, ekzon 3	6q26	1,066895
319	PARK2, probe 2181-L1679, ekzon 9	6q26	0,836856
328	PINK1 probe 5653-L5107, ekzon 6	1p36.1	1,028318
337	PARK2, probe 3363-L2747, ekzon 4	6q26	0,947759
346	PARK2, probe 2182-L3127, ekzon 10	6q26	0,954096
355	Control probe 1548-L0991	5q22	0,999758
364	PARK2, probe 2177-L1675, ekzon 5	6q26	0,802322
373	PARK2, probe 2183-L1681, ekzon 11	6q26	0,966725
382	Control probe 0584-L0149	6p21.1	0,866831
391	PARK2, probe 2184-L1682, ekzon 12	6q26	0,909519
400	TNFRSF9, probe 2185-L1683	1p36	0,993778
409	PARK7, probe 2187-L3592, ekzon 3	1p36	0,931078
418	Control probe 1617-L1199	13q12	0,947223
427	PARK7, probe 3690-L3105, ekzon 1	1p36	0,890697
436	PARK7, probe 2188-L1686, ekzon 5	1p36	1,018453
445	SNCA, probe 4096-L3102, ekzon 1	4q22	0,930273
454	PARK7, probe 2189-L2365, ekzon 7	1p36	0,874433
463	PINK1, probe 3697-L3153, ekzon 8	1p36.1	0,909788
478	SNCA, probe 3689-L3104, ekzon 5	4q22	0,85771

DiagenAnalyzer® programından elde edilen Tablo 4.4'te, örnek bir hastaya ait pik alanlarının değerlendirme sonucu yer almaktadır. Bu tabloya göre son sütunda yer alan değerler, hasta ile kontrollerin karşılaştırılması sonucu elde edilen oranları göstermektedir. Bu oranlar değerlendirilirken 0,5'in altı kesin delesyon (sarı bölgeler) ve 1,8'in üstünde yer alan değerler de kesin amplifikasyon yönünde değerlendirilmiştir. Bu tabloda *SNCA* A30P mutasyonu ve yabani tip genomik değişime spesifik iki ayrı probdaki delesyonların birlikte saptandığı gösterilmektedir. Tablo 4.4'te gösterilen bu hastada kırmızı ile gösterilen A30P mutasyon spesifik probda amplifikasyon, sarı ile gösterilen A30P WT spesifik probda delesyon görülmektedir. Hastamız saptanan heterozigot A30P mutasyonlu Parkinson hastasıdır. Mavi renk ile gösterilen bölgeler normal olarak değerlendirilmiş bölgelerdir.

4.2.2. *UCH-L1* (PARK5) Prob Bölgesi Bulguları

UCH-L1 geni ekzon 1, ekzon 4, ekzon 5 ve ekzon 9 bölgelerine yönelik hazırlanmış dört ekzon bölgesi incelendiğinde; prob bölgelerinde herhangi bir amplifikasyon veya delesyon saptanmamıştır.

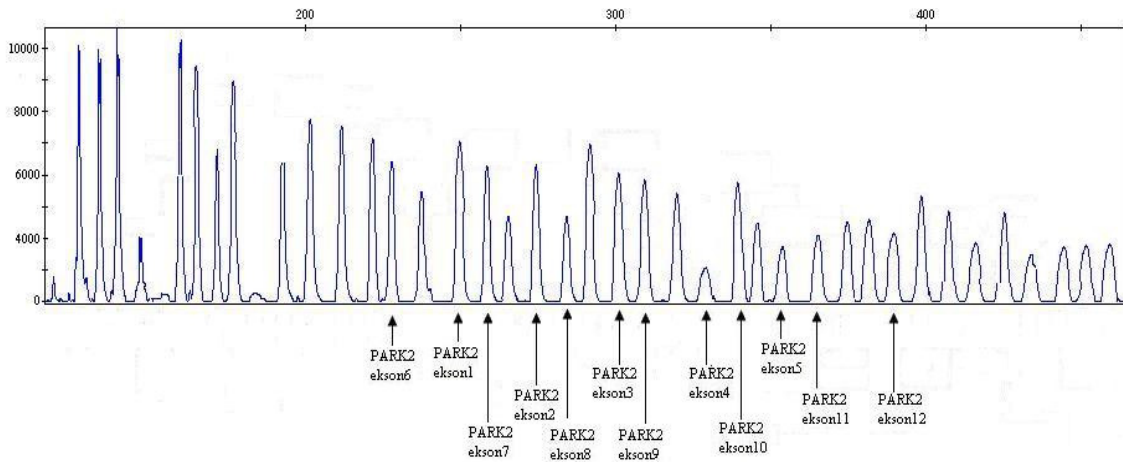
4.2.3. *Parkin* (PARK2) Prob Bölgesi Bulguları

Parkin geninde ekzon 1'den ekzon 12'ye kadar tüm ekzon bölgelerine yönelik hazırlanmış P051 ve P052B panelleriyle 12 ekzon bölgesi incelenmiştir. Tablo 4.5'te görüldüğü gibi *Parkin* ekzon 3'de bir hastada delesyon, ekzon 4'de bir hastada delesyon, ekzon 5'de dört hastada delesyon, ekzon 6'da bir hastada amplifikasyon; ekzon 8 de üç hastada delesyon, ekzon 9'da bir hastada delesyon, iki hastada amplifikasyon, ekzon 10'da bir hastada amplifikasyon, ekzon 11'de iki hastada delesyon, üç hastada amplifikasyon, ekzon 12'de dört hastada delesyon, bir hastada amplifikasyon tespit edildi. Çalışmaya alınan hastalar içerisinde *Parkin* geni ekzon 1, ekzon 2 ve ekzon 7'ye

ait prob bölgesinde herhangi bir amplifikasyon veya delesyona rastlanmamıştır. Ekzon 5 ve 12’de saptanan delesyonların nispeten daha yüksek olması dikkat çekicidir. *Parkin* geninin birinci intronuna bitişik promotor bölgede lokalize olan *PACRG* ekzon 1’de ise herhangi bir delesyon veya amplifikasyona rastlanmamıştır.

Tablo 4.5 *Parkin* (*PARK2*) Geni ve *PACRG* Gen Bölgesi Delesyon / Amplifikasyon dağılımı

<i>PARK2</i> Prob Bölgeleri	Delesyon Saptanan Hasta Sayısı	Amplifikasyon Saptanan Hasta Sayısı
Ekzon 1	--	--
Ekzon 2	--	--
Ekzon 3	1	--
Ekzon 4	1	--
Ekzon 5	4	--
Ekzon 6	--	1
Ekzon 7	--	--
Ekzon 8	3	--
Ekzon 9	1	2
Ekzon 10	--	1
Ekzon 11	2	3
Ekzon 12	4	1
<i>PACRG</i> Ekzon 1	--	--
TOPLAM	16	8



Şekil 4.4 *Parkin* (*PARK2*) geninin 4. ekzonunda saptanan delesyonlu hastaya ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülme bölgesi.

PDF Eraser Free

Şekil 4.4'de görüldüğü gibi, örnek *Parkin* ekzon 4'e ait pik alanı diğer pik alanlarından relatif olarak daha düşüktür ve bu Genemapper programından Excel verisi olarak alınarak internal ve eksternal kontrol problemleriyle program içindeki makro ile otomatik olarak oranlandırılarak sayısal olarak teyid edilmiştir. Tablo 4.6'da görüldüğü gibi bu orana göre 0,47979 olarak saptanan pik değeri delesyon olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.6 *Parkin (PARK2)* geninin 4. ekzonunda delesyon saptanan örnek hastaya ait DiagenAnalyzer® programı değerlendirme sonuçları

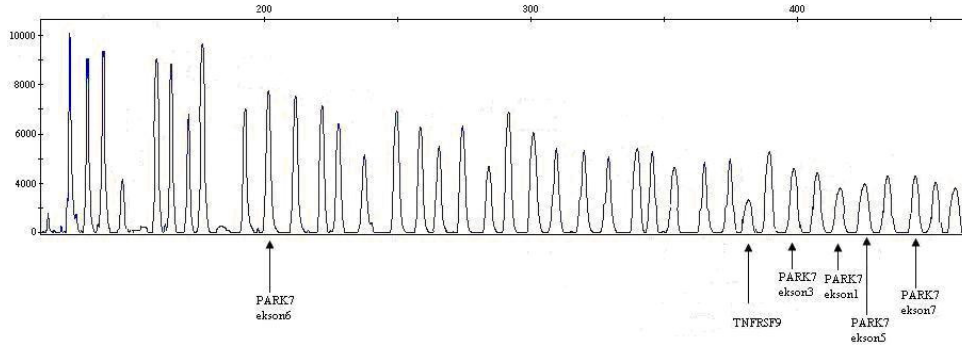
Length	SALSA MLPA probe	Chr. Position	SONUC
92	Synthetic Control probe	2q14	1,015193
130	<i>Control probe 0797-L0463</i>	5q31	0,93972
136	<i>PINK1</i> , probe 3695-L3590, ekzon 5	1p36.1	0,950538
142	<i>PINK1</i> , probe 3691-L3106, ekzon 1	1p36.1	1,058202
145	<i>SNCA</i> , probe 2166-L1661, WT at A30P mutation, LOW	4q22	0,834354
149	<i>SNCA</i> , probe 2166-L1662, A30P mutation specific	4q22	1,100129
157	<i>SNCA</i> , probe 2168-L1665, ekzon 4	4q22	0,879951
166	<i>PINK1</i> , probe 3692-L3107, ekzon 2	1p36.1	1,026159
175	<i>SNCA</i> , probe 2169-L1666, ekzon 6	4q22	0,99137
184	LPA, probe 4615-L3891	6q26	0,928546
193	<i>LRRK2</i> probe 4575-L4006 G2019S mutation specific	12q12	1,010058
200	<i>PINK1</i> , probe 3693-L3108, ekzon 3 (+aspecific peak at 202)	1p36.1	0,973221
211	PARK7, probe 4617-L3893, ekzon 6	1p36	0,916875
220	<i>PINK1</i> , probe 3694-L3109, ekzon 4	1p36.1	0,972348
229	<i>PINK1</i> , probe 3698-L3154, ekzon 7	1p36.1	0,917767
238	<i>PARK2</i> , probe 2178-L1676, ekzon 6	6q26	0,911222
247	<i>SNCA</i> probe 4616-L3892, ekzon 3	4q22	0,963
256	<i>PARK2</i> , probe 3203-L2564, ekzon 1	6q26	0,809709
265	<i>PARK2</i> , probe 2179-L1677, ekzon 7	6q26	0,962076
274	<i>Control probe 1665-L1244</i>	11q13	0,982503
283	<i>PARK2</i> , probe 2174-L5093, ekzon 2	6q26	0,921477
292	<i>PARK2</i> , probe 2180-L5094, ekzon 8	6q26	0,854883
301	<i>Control probe 0895-L0483</i>	3p22	0,961415
310	<i>PARK2</i> , probe 3205-L2566, ekzon 3	6q26	0,970835
319	<i>PARK2</i> , probe 2181-L1679, ekzon 9	6q26	0,971553
328	<i>PINK1</i> probe 5653-L5107, ekzon 6	1p36.1	1,09053
337	<i>PARK2</i>, probe 3363-L2747, ekzon 4	6q26	0,47979
346	<i>PARK2</i> , probe 2182-L3127, ekzon 10	6q26	1,04805
355	<i>Control probe 1548-L0991</i>	5q22	1,059017
364	<i>PARK2</i> , probe 2177-L1675, ekzon 5	6q26	0,901099
373	<i>PARK2</i> , probe 2183-L1681, ekzon 11	6q26	0,987474
382	<i>Control probe 0584-L0149</i>	6p21.1	1,044396
391	<i>PARK2</i> , probe 2184-L1682, ekzon 12	6q26	1,119603
400	TNFRSF9, probe 2185-L1683	1p36	1,158459
409	PARK7, probe 2187-L3592, ekzon 3	1p36	1,087322
418	<i>Control probe 1617-L1199</i>	13q12	1,001127
427	PARK7, probe 3690-L3105, ekzon 1	1p36	1,161096
436	PARK7, probe 2188-L1686, ekzon 5	1p36	1,138346
445	<i>SNCA</i> , probe 4096-L3102, ekzon 1	4q22	1,053244
454	PARK7, probe 2189-L2365, ekzon 7	1p36	1,03449
463	<i>PINK1</i> , probe 3697-L3153, ekzon 8	1p36.1	1,050849
478	<i>SNCA</i> , probe 3689-L3104, ekzon 5	4q22	1,048255

4.2.4. *DJ-1* (PARK7) Prob Bölgesi Bulguları

DJ-1 geni ekzon 1-7 bölgelerine yönelik olarak hazırlanmış yedi ekzon bölgesi incelenmiştir. Tablo 4.7’de görüldüğü üzere *DJ-1* ekzon 1’de beş hastada delesyon, beş hastada amplifikasyon, ekzon 3’de dört hastada delesyon, iki hastada amplifikasyon, ekzon 5’de üç hastada delesyon, iki hastada amplifikasyon, ekzon 7 de bir hastada delesyon saptandı. Çalışmaya alınan hastalar içerisinde *DJ-1* geni ekzon 2, ekzon 4 ve ekzon 6’ya ait prob bölgesinde herhangi bir amplifikasyon veya delesyona rastlanmamıştır. Ekzon 1’de saptanan delesyon ve amplifikasyonlar nisbeten daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 4.7 *DJ-1* Geni Delesyon / Amplifikasyon dağılımı

PARK7 Prob Bölgeleri	Delesyon Saptanan Hasta Sayısı	Amplifikasyon Saptanan Hasta Sayısı
Ekzon 1	5	5
Ekzon 2	--	--
Ekzon 3	4	2
Ekzon 4	--	--
Ekzon 5	3	2
Ekzon 6	--	--
Ekzon 7	1	--
TOPLAM	13	9



Şekil 4.5 *TNFRSF9* geninde delesyon saptanan hastaya ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgesi.

Ayrıca *DJ-1* genine ek olarak MLPA kitimizde *TNFRSF9* genine ait *PARK7* lokusunun 23 kb p-telomerik ucuna spesifik prob da bulunmaktadır. Bu konuda herhangi bir yayın olmamasına rağmen hücrel enflamasyon cevabı ile ilgili *TNFRSF9* genine yönelik hazırlanmış tek prob sonuçları incelendiğinde çalışmamızda altı hastamızda delesyon, dört hastamızda da amplifikasyon saptanmıştır. Şekil 4.5'te *TNFRSF9* geninde delesyon saptanan bir hastaya ait pik görüntüleri örnek olarak eklenmiştir. DiagenAnalyzer® değerlendirme sonuçları tablo 4.8'de sunulmuştur. Bu tabloda hastaya ait *TNFRSF9* geninde saptanan delesyon sarı renk ile gösterilmiştir.

Tablo 4.8 *TNFRSF9* geninde delesyon saptanan hastaya ait DiagenAnalyzer® programı örnek değerlendirme sonuçları

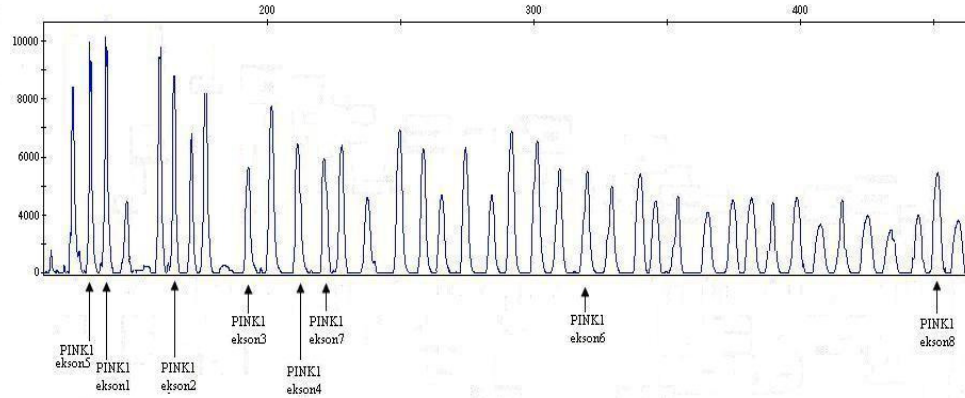
Length	SALSA MLPA probe	Chr. Position	SONUC
92	Synthetic Control probe	2q14	1,112
130	<i>Control probe 0797-L0463</i>	5q31	1,03972
136	<i>PINK1</i> , probe 3695-L3590, ekzon 5	1p36.1	0,97653
142	<i>PINK1</i> , probe 3691-L3106, ekzon 1	1p36.1	1,0158
145	<i>SNCA</i> , probe 2166-L1661, WT at A30P mutation, LOW	4q22	0,934354
149	<i>SNCA</i> , probe 2166-L1662, A30P mutation specific	4q22	1,010129
157	<i>SNCA</i> , probe 2168-L1665, ekzon 4	4q22	0,979501
166	<i>PINK1</i> , probe 3692-L3107, ekzon 2	1p36.1	9,726159
175	<i>SNCA</i> , probe 2169-L1666, ekzon 6	4q22	0,90137
184	LPA, probe 4615-L3891	6q26	0,928546
193	<i>LRRK2</i> probe 4575-L4006 G2019S mutation specific	12q12	1,01018
200	<i>PINK1</i> , probe 3693-L3108, ekzon 3 (+aspecific peak at 202)	1p36.1	0,88221
211	<i>PARK7</i> , probe 4617-L3893, ekzon 6	1p36	0,967875
220	<i>PINK1</i> , probe 3694-L3109, ekzon 4	1p36.1	0,979348
229	<i>PINK1</i> , probe 3698-L3154, ekzon 7	1p36.1	0,988767
238	<i>PARK2</i> , probe 2178-L1676, ekzon 6	6q26	0,91002
247	<i>SNCA</i> probe 4616-L3892, ekzon 3	4q22	0,9008
256	<i>PARK2</i> , probe 3203-L2564, ekzon 1	6q26	0,879709
265	<i>PARK2</i> , probe 2179-L1677, ekzon 7	6q26	0,992076
274	<i>Control probe 1665-L1244</i>	11q13	0,988403
283	<i>PARK2</i> , probe 2174-L5093, ekzon 2	6q26	0,921477
292	<i>PARK2</i> , probe 2180-L5094, ekzon 8	6q26	0,954883
301	<i>Control probe 0895-L0483</i>	3p22	0,961415
310	<i>PARK2</i> , probe 3205-L2566, ekzon 3	6q26	0,940835
319	<i>PARK2</i> , probe 2181-L1679, ekzon 9	6q26	0,988553
328	<i>PINK1</i> probe 5653-L5107, ekzon 6	1p36.1	1,01053
337	<i>PARK2</i> , probe 3363-L2747, ekzon 4	6q26	0,97879
346	<i>PARK2</i> , probe 2182-L3127, ekzon 10	6q26	1,04805
355	<i>Control probe 1548-L0991</i>	5q22	1,059017
364	<i>PARK2</i> , probe 2177-L1675, ekzon 5	6q26	0,901099
373	<i>PARK2</i> , probe 2183-L1681, ekzon 11	6q26	0,887474
382	<i>Control probe 0584-L0149</i>	6p21.1	1,14396
391	<i>PARK2</i> , probe 2184-L1682, ekzon 12	6q26	1,09603
400	TNFRSF9, probe 2185-L1683	1p36	0,498459
409	<i>PARK7</i> , probe 2187-L3592, ekzon 3	1p36	1,187322
418	<i>Control probe 1617-L1199</i>	13q12	1,101127
427	<i>PARK7</i> , probe 3690-L3105, ekzon 1	1p36	1,160106
436	<i>PARK7</i> , probe 2188-L1686, ekzon 5	1p36	1,038346
445	<i>SNCA</i> , probe 4096-L3102, ekzon 1	4q22	0,953244
454	<i>PARK7</i> , probe 2189-L2365, ekzon 7	1p36	1,04439
463	<i>PINK1</i> , probe 3697-L3153, ekzon 8	1p36.1	1,050849
478	<i>SNCA</i> , probe 3689-L3104, ekzon 5	4q22	1,108255

4.2.5. *PINK1* (PARK6) Prob Bölgesi Bulguları

PINK1 geninin 8 ekzonuna yönelik hazırlanmış problr incelenmiştir. Tablo 4.9’da görüldüğü üzere *PINK1* ekzon 1’de bir hastada delesyon, üç hastada amplifikasyon, ekzon 3’de üç hastada amplifikasyon, ekzon 4’de bir hastada delesyon, ekzon 5’de iki hastada delesyon, dört hastada amplifikasyon, ekzon 6’da iki hastada delesyon, iki hastada amplifikasyon, ekzon 7’de iki hastada delesyon, ekzon 8’de altı hastada delesyon, dokuz hastada amplifikasyon saptanmıştır. Çalışmaya alınan hastalar içerisinde *PINK1* geni ekzon 2’ye ait prob bölgesinde herhangi bir amplifikasyon veya delesyona rastlanmamıştır. Ekzon 8’de saptanan delesyon ve amplifikasyonların nisbeten daha yüksek olması dikkat çekmektedir.

Tablo 4.9 *PINK1* Geni Delesyon / Amplifikasyon dağılımı

<i>PINK1</i> Prob Bölgeleri	Delesyon Saptanan Hasta Sayısı	Amplifikasyon Saptanan Hasta Sayısı
Ekzon 1	1	3
Ekzon 2	--	--
Ekzon 3	--	3
Ekzon 4	1	--
Ekzon 5	2	4
Ekzon 6	2	2
Ekzon 7	2	--
Ekzon 8	6	9
TOPLAM	14	21



Şekil 4.6 *PINK1* geninin 8. ekzonunda saptanan amplifikasyonlu hastaya ait örnek MLPA pik görüntüleri ve amplifikasyon görülen prob bölgesi

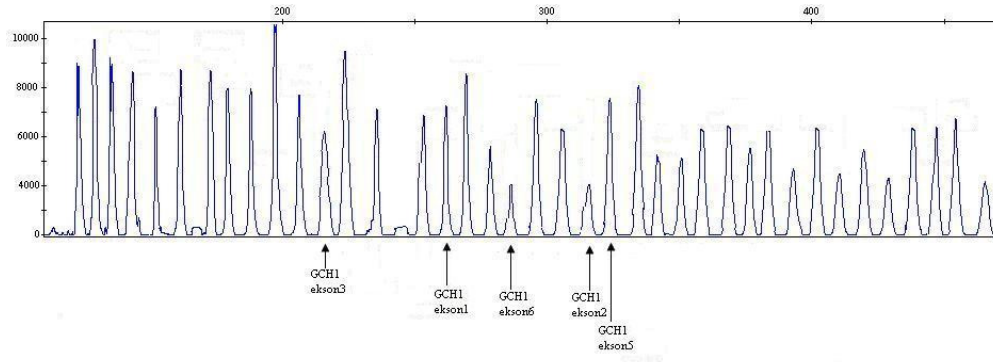
4.2.6. *GCHI* Prob Bölgesi Bulguları

GCHI geni ekzon 1, ekzon 2, ekzon 3, ekzon 5 ve ekzon 6 olmak üzere beş ekzon bölgesine yönelik hazırlanmış problemler incelendiğinde tablo 4.10’da görüldüğü üzere aynı hastada *GCHI* geni ekzon 2 ve ekzon 6’da birer delesyon saptandı. Çalışmaya alınan hastalar içerisinde *GCHI* geni ekzon 1, ekzon 3 ve ekzon 5’e yönelik hazırlanmış problemlerde herhangi bir delesyon veya amplifikasyona rastlanmamıştır.

Tablo 4.10 *GCHI* Geni Delesyon / Amplifikasyon dağılımı

<i>GCHI</i> Prob Bölgeleri	Delesyon Saptanan Hasta Sayısı	Amplifikasyon Saptanan Hasta Sayısı
Ekzon 1, 3 ve 5	--	--
Ekzon 2 ve 6	1	--
TOPLAM	1	--

Bu hastaya ait 2 ve 6. ekzonda saptanan MLPA pik görüntüleri ve delesyon saptanan prob bölgeleri Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7 *GCH1* geninin 2 ve 6. ekzonunda delesyon saptanan hastaya ait örnek MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgeleri.

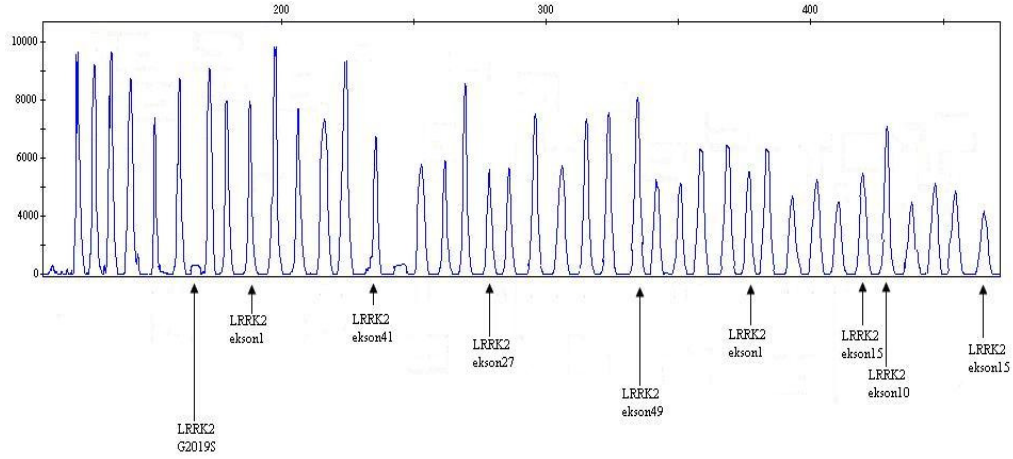
4.2.7. *LRRK2* (PARK 8) Prob Bölgesi Bulguları

LRRK2 geni için ekzon 1, ekzon 2, ekzon 10, ekzon 15, ekzon 27, ekzon 41, ekzon 41 G2019S mutasyonu ve ekzon 49 olmak üzere sekiz ekzon bölgesine yönelik olarak hazırlanmış problar incelenmiştir. Tablo 4.11’de görüldüğü üzere *LRRK2* ekzon 1’de iki hastada delesyon, ekzon 10’da bir hastada delesyon, üç hastada amplifikasyon, ekzon 15’de bir hastada delesyon, dört hastada amplifikasyon saptandı. Çalışmaya alınan hastalar içerisinde *LRRK2* geni ekzon 2, ekzon 27, ekzon 41 ve ekzon 49’a yönelik hazırlanmış problarda herhangi bir delesyon veya amplifikasyona rastlanmamıştır. Ancak ekzon 41’de G2019S bölgesinde yedi hastada nokta mutasyonu saptanmıştır.

Tablo 4.11 *LRRK2* Geni Delesyon / Amplifikasyon dağılımı

<i>LRRK2</i> Prob Bölgeleri	Delesyon Saptanan Hasta Sayısı	Amplifikasyon Saptanan Hasta Sayısı
Ekzon 1	2	--
Ekzon 2	--	--
Ekzon 10	1	3
Ekzon 15	1	4
Ekzon 27	--	--
Ekzon 41	--	--
Ekzon 41 G2019S Mutasyonu	7	--
Ekzon 49	--	--
TOPLAM	11	7

LRRK2 10. ekzonunda amplifikasyon saptanan bir hastamızın pik görüntüsü şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8 *LRRK2* (PARK8)geninin 10. ekzonunda amplifikasyon saptanan hastaya ait örnek MLPA pik görüntüleri ve amplifikasyon görülen prob bölgesi.

4.2.8. Hastaların Başlangıç Yaşlarına Göre Mutasyon Dağılım Bulguları

Tablo 4.12 Saptanan genomik değişikliklerin erken başlangıçlı (<50) hastalara göre dağılımı.

Protokol	Cinsiyet	Başlangıç Yaşı	Yaşı	UPDRSIII Skoru	SNCA A30P Mut	SNCA WT A30P	SNCA (PARK1-4)	UCH-L1 (PARK5)	PARKİN (PARK2)	DJ-1 (PARK7)	TNFRSF9	PINK1 (PARK6)	GCHI	LRRK2 G2019S Mut	LRRK2 (PARK8)
4787	K	38	43	12	(+)		-6							(+)	
4895	E	39	44	22	(+)	(-)					-			(+)	
5507	E	40	56	58	(+)				-12	-1-3	-	+1+5 -6-7-8			
5153	K	43	59	32											
4780	K	45	58	42											
4822	E	46	57	35											
4745	K	47	50	22					-11						-1
5087	K	49	52	18					-4+6						+15
Ortalama		43,4	52,4	30											

Sporadik EBPH olgularımızın cinsiyet dağılımı 3 erkek, 5 kadından oluşmaktadır. Ortalama PH başlangıç yaşı 43,4 olup, başlangıç yaşları 38–49 arasında; ortalama UPDRSIII skoru 30 olup 12–58 değerleri arasındadır. Olguların yaş ortalamaları 52,4 ve yaşları 43–59 arasındadır. EBPH olgularımızın bu değerleri tablo 4.12’de gösterilmiştir.

Tablo 4.13 Saptanan genomik değişikliklerin geç başlangıçlı (≥ 50) hastalara göre dağılımı

Protokol	Cinsiyet	Başlangıç Yaşı	Yaşı	UPDRSIII Skoru	SNCA A30P Mut	SNCA WT A30P	SNCA (PARK1-4)	UCH-L1 (PARK5)	PARKİN (PARK2)	DJ-1 (PARK7)	TNFRSF9	PINK1 (PARK6)	GCHI	LRRK2 G2019S Mut	LRRK2 (PARK8)
4834	K	50	55	10			+5					+8			
5082	E	50	55	32											
4774	K	51	67	48			-4		--5--8		-				
4846	E	51	62	42	(+)		-1-5		+6	-1-7	-	+3+5-8			
5154	E	51	62	42											
4789	K	52	63	42	(+)									(+)	
4924	K	52	63	42	(+)				-9			+1+5-7		(+)	
5371	K	52	56	12								-8			
5254	E	53	68	42											
4784	K	54	64	42	(+)					-1	-	+3			
4910	K	54	66	32			+1+5		+11		+	+8			+10+15
5076	E	54	61	42											
5086	E	54	57	19											+10+15
5253	K	54	64	42											
4911	E	55	58	12							+				
4872	E	56	61	24					+9						+15
5169	K	56	62	28											
5352	K	56	57	8											
4783	E	57	59	11	(+)										
4886	K	57	66	32			-1		-5-11	-1-3		-8		(+)	-10
4894	E	57	62	24								+1			
4778	E	58	69	24											
4875	E	58	63	24								-6			
5184	E	58	63	27								+5			
4798	K	59	70	34			+5			+1		+8			

Tablo 4.13 Saptanan genomik değişikliklerin geç başlangıçlı (≥ 50) hastalara göre dağılımı (**devam ediyor**)

Protokol	Cinsiyet	Başlangıç Yaşı	Yaşı	UPDRSII Skoru	SNCA A30P Mut	SNCA WT A30P	SNCA (PARK1-4)	UCH-L1 (PARK5)	PARKİN (PARK2)	DJ-1 (PARK7)	TNFRSF9	PINK1 (PARK6)	GCH1	LRRK2 G2019S Mut	LRRK2 (PARK8)
4823	E	59	68	34			+5					+8			+10
4785	K	60	65	48	(+)										
4833	E	60	71	42			+5			+1+5		-5+8			
5522	K	60	64	28			-1					-8	-2-6		
4736	K	61	73	34			+1+5		+11+12	+1+3+5	+	+8			
4779	K	61	77	42	(+)				+10+11			+6			
4843	K	61	64	14			+6					-1			
5077	E	62	66	28											
5394	K	62	71	48			-1-5		-12	-3-5	-	-8			
5506	K	62	69	18			-2-5		-8-12	-1-3-5	-	-4			
4752	E	63	65	11											
4818	K	63	77	38											-1-15
4817	K	64	67	18			+5			+1		+8			
5235	K	64	72	42											
4776	E	65	80	52	(+)				-3						
4788	E	65	70	32					-12					(+)	
4810	E	66	72	32	(+)										
4825	E	66	78	29	(+)							+6+8			
5505	E	66	70	21	(+)									(+)	
4874	K	68	72	24					+9		+				
5108	K	68	72	24											
5137	E	68	72	37						-5					
4786	E	70	75	32	(+)				-5			+3			
5083	K	70	79	44											
4737	E	73	76	18			+1+5			+1+3		-5+8			
Ortalama		59,3	66,8	30											

(+) işareti nokta mutasyonu varlığını, + işareti amplifikasyonu, - işareti delesyonunu göstermektedir. + veya - değerinin önündeki rakam ekzon numarasını ifade etmektedir. Örneğın +5, tablodaki genin ekzon 5 amplifikasyonu olduğunu; -1 tablodaki genin ekzon 1 delesyonu bulunduğunu ifade etmektedir.

Sporadik GBPH olgularımızın cinsiyet dağılımı 25 erkek, 25 kadından oluşmaktadır. Ortalama PH başlangıç yaşları 59,3 olup, başlangıç yaşları 50–73 arasında; ortalama UPDRSIII skoru 30 olup, 8–52 değerleri arasındadır. Olguların yaş ortalamaları 66,8 ve yaşları 55–80 arasındadır (Tablo 4.13).

Sporadik EBPH ve GBPH olgularımızın MLPA analizi yapılan genlere göre mutasyonlarının dağılımı ve klinik skor bilgileri tablo 4.12 ve 4.13’de gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

5.1. Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileri ile Karşılaştırılması

Klinik olarak sporadik PH tanısı almış hastalarla yapılan çalışmalarda OD olarak *SNCA* nokta mutasyonu 1997'de Polymeropoulos ve ark. (118), *SNCA* multiplikasyonları 2003'te Singleton ve ark. (134) ve Chartier-Harlin ve ark. (17), *LRRK2* mutasyonları 2004'te Zimprich ve ark. (169), OR formda olan *Parkin* mutasyonları 1998'de Kitada ve ark. (68), *DJ-1* mutasyonları 2001'te van Duijn ve ark. (152), *PINK1* mutasyonları da 2004'de Valente ve ark. (150) ve henüz tam kesinlikte olmasa bile araştırmacılar tarafından aday gen olarak tanımlanan *UCH-L1* mutasyonları Lowe ve ark. (84) tarafından keşfedilmişlerdir. Bu çalışmalarda bağlantı analizi, doğrudan dizileme, SNP, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), mikrosatellit tarama, semikantitatif RT-PCR gibi yöntemlerle ancak belli bölgeler ve belli genlere yönelik çalışmalar yapılabildiği için bizim uyguladığımız MLPA analizi tekniği ile çalışan araştırmacılar, PH ile ilişkilendirilmiş genlerin 67 ayrı bölgede genomik değişimlerini tarayarak ilişkilendirebilme imkanını bulmuşlardır.

5.1.1. *SNCA* (PARK1, PARK4) Prob Bölgeleri

PH genleri ile ilişkili birçok gen tanımlanmıştır. Bu genlerden birisi de *SNCA* genidir. *SNCA* geni altı ekzonlu, 117 Kb uzunluğunda ve 4q21'e lokalize olmuş bir genidir. Bu geni PH ile ilişkilendiren birçok çalışma yapılmıştır. 1997 yılında Polymeropoulos ve ark. PH öyküsü olan Yunan bir aileyle yaptıkları çalışmada, genin 4. ekzonunda yanlış anlamlı mutasyon bulunmasıyla *SNCA* genini sorumlu gen olarak tanımlamışlardır (118). 2008 yılında Ahn ve ark. kantitatif Real-Time PCR (qRT-

PCR) kullanarak, aile öyküsü olmayan 906 Koreli sporadik Parkinson hastası taramışlar, üç hastada (%0,3) duplikasyon bulmuşlardır (2). Araştırmacılar, çalışmaya dahil olan hastaların hiçbirinde delesyon saptamamışlardır. Bu çalışmada duplikasyon bulunan hastalardan biri yeniden değerlendirilmiş ve pozitif aile öyküsü olduğu görülmüştür. Araştırmacılarca bu hasta çıkarılarak değerlendirme yapılmış, bu oran % 0,23 olmuştur. Bu hastalarda penetrans %33-%50 arasında bulunmuştur (99). Ahn ve ark. bu penetrans farklılığının sebebinin henüz bilinmediğini, ancak şu anda saptanmamış olsa da henüz bilinmeyen bir genetik değiştirici veya çevresel tetikleyicilere yönelmesiyle, patogenezi hakkında öğrenilecek yeni bilgilerin bu durumu aydınlayabileceğini bildirmişlerdir. Bu yayınlara eş zamanlı olarak Brueggeman ve ark. tarafından yapılan bir diğer qRT-PCR çalışmasında, taradıkları 403 sporadik hasta arasından 38 yaşında ve iki yıllık PH vakası tespit edilmiş, bu hastanın penetransına dair aileye yönelik bir çalışmaları olmamıştır (14). Araştırmacılar bu yayında Ahn ve ark.'nın frekansına [0,23 (2/906)], yakın bir hasta oranı [0,25 (1/403)] bulmuşlardır. Tablo 5.1'de görüldüğü üzere MLPA çalışmamızda ise tüm hastaların UPDRSIII klinik skalasıyla hastalık şiddetleri ölçüldüğünde MLPA analizi yaptığımız PH olgularımız 11-58 arası skora sahiptir. PH olgularımızda saptadığımız klinik şiddet farklılıkları UPDRSIII değeriyle temsil edilmektedir ve bu durum Ahn ve ark.'nın *SNCA* duplikasyonu olan hastalar arasındaki penetrans farklılığı ile benzeşmektedir. Ahn ve ark. kendi hastalarına ilişkin herhangi bir klinik şiddet bilgisi yayınlamamışlardır. Tablo 5.2'de görüldüğü gibi MLPA analizimizde tespit edilen *SNCA* duplikasyonlu hastaların oranı %15,51 olup; Ahn ve ark.'nın, Brueggeman ve ark.'nın çalışmalarında saptadıklarından yüksek bulunmuştur. MLPA analizi sonucu *SNCA* duplikasyonu saptanan hastalarımızı Ahn ve ark.'larının çalışmalarında araştırılan ekzon 1, 3 ve 4 ile sınırlayarak karşılaştıracak olursak sadece 3 hastamızda (1. ekzonda) duplikasyon (%5) tespit edilmiştir (Tablo 5.1). Asya popülasyonunda *SNCA* genine ait penetrans farkı olduğu tespit eden araştırmacılar kimi hastalarda inkomplet penetrans sebebiyle sessiz seyreden OD bir mutasyon varlığının da bir tarama testi ile saptanmamışsa, hiçbir klinik belirti vermeden bulunabileceğini bildirmişlerdir. Bu sebeple güncel yayınlarda Asya popülasyonunda az rastlanan hastalık geninin daha

yüksek çıkmasının sürpriz olmayacağından bahsedilmektedir. Çalışmamızda Asya popülasyonuna göre daha yüksek oranda *SNCA* amplifikasyonu saptanmıştır.

Diğer bir çalışmada 2005 yılında Gispert ve ark. kantitatif RT-PCR yöntemi kullanarak gen dozaj analizi yapmışlardır (48). Bu çalışmada birbiriyle ilişkisiz Alman, Portekiz ve Yugoslav 190 ailesel Parkinson hastasının *SNCA* gen dozaj değişimlerini incelemişler ve *SNCA* geninde herhangi bir hastada gen dozaj değişimi saptamamışlardır. Bizim çalışmamızda ise *SNCA* geni A30P nokta mutasyonu da dahil olmak üzere taranmış ve sporadik PH olgularımızda *SNCA* geninde %50 oranında genomik değişiklik saptanmıştır. Tespit ettiğimiz oranlar Gispert ve ark.'nın çalışmalarında saptananlardan yüksek bulunmuştur.

Ailesel PH olan 66 Portekizli vakanın araştırıldığı bir çalışmada Bras ve ark. sekanslamada *SNCA* geninin tüm ekzonlarını, RT-PCR kullanarak yaptıkları dozaj analizinde de 1 ve 2. ekzonunu incelemişler ve herhangi bir genomik değişime rastlamamışlardır (27). Tablo 5.1'de görüldüğü üzere MLPA çalışmamızda ekzon 1'de amplifikasyon %5 (n=3), delesyon %6 (n=4), ekzon 2'de %1 delesyon (n=1) bulunarak Bras ve ark.'dan farklı saptanmıştır.

Xiromerisiou ve ark. Yunanistan'da 235 sporadik PH olgusu ile 235 kontrol bireyini doğrudan dizileme ve kantitatif RT-PCR yöntemleriyle yaptıkları *SNCA* gen taraması ve dozaj analizi sonucunda herhangi bir *SNCA* genomik değişimi ve dozaj değişimi saptamamışlardır (162). Xiromerisiou ve ark.'nın araştırmalarında herhangi bir genomik değişiklik saptanmazken, MLPA analizi çalışmamızda hastalarımızın %50'sinde tablo 5.1'de görülen *SNCA* genomik değişimleri saptanmış olup, 15 hastadan birinde homozigot *SNCA* A30P nokta mutasyonu saptanmıştır. Çalışmamız Xiromerisiou ve ark.'a göre yüksek bulunmuştur.

Ikeuchi ve ark. Japonya bir ailenin dört jenerasyonundan aldıkları donmuş beyin örnekleri üzerinde kantitatif RT-PCR ve immunblot analizi yapmışlardır (64). Hastalardan üçünde *SNCA* duplikasyonu, birinde triplikasyonu saptamışlardır. Triplikasyon olan hasta EBPH olgusu olup erken yaşta vefat etmiştir ve demans da dahil olmak üzere çok şiddetli semptomları mevcuttur. MLPA analizimiz sonucunda *SNCA*

genomik değişimi amplifikasyon olarak saptanan hastalarımızın hepsinde *SNCA* amplifikasyonları duplikasyondur ve hiçbirinde triplikasyon saptanmamıştır. Tablo 5.1’de görüldüğü gibi duplikasyon saptadığımız hasta oranı %15 (n=9), delesyon saptanan hasta oranı %12,06 (n=7) ve A30P mutasyonu saptanan hasta oranı %25,86 (n=15) bulunmuştur. Bu hastalardan duplikasyonlu olanların ortalama UPDRSIII skoru 26,22, delesyonlu hastalarda ortalama UPDRSIII skoru 32,57, A30P mutasyonu bulunan hastalarda ortalama UPDRSIII skoru 34,33 bulunmuştur. UPDRSIII skorlarının duplikasyonlu hastalara oranla delesyonlu hastalarda 1,24 kat, A30P mutasyonlu hastaların da 1,30 kat daha yüksek oranda skora sahip olduğu bulunurken; delesyonlu hastaların, A30P mutasyonlu PH olguları ile birbirine yakın skor ortalamalarına sahip oldukları görülmüştür. Çalışmamızda bir tanesi homozigot diğer 14’ü heterozigot A30P mutasyonuna sahip hastalarla, delesyonlu hastaların klinik şiddetinin birbirine benzer olduğu, ancak duplikasyonlu hastalarımızın bunlara nazaran daha hafif UPDRSIII skoru verdiği görülmüştür. Yani duplikasyonlu hasta grubumuzun kliniği diğer *SNCA* genomik değişimi saptanan hastalara göre daha hafiftir. Bu veriler değerlendirilirken ilginç bir sonuçla da karşılaşılmıştır. Tablo 5.1’de değerlendirildiğinde hastalarımızda A30P mutasyonu varsa, diğer genomik *SNCA* değişimleri yoktu; duplikasyon varsa delesyon veya A30P mutasyonu yoktu; delesyon varsa duplikasyon ve A30P mutasyonu yoktu. *SNCA* genomik değişimi taşıyan iki hasta bu duruma uymamıştır. Bulgularımız aynı gen üzerinde hem delesyon hem de duplikasyon meydana gelmediğini düşündürmüştür. Ayrıca *SNCA* ekzon 1 ve ekzon 5 çalışmamızda ayrı ayrı mutasyonların yığılma bölgesi olarak görülmüştür. Delesyonlu hastaların 3/5’inde hem ekzon 1 hem de ekzon 5 delesyonu vardır. Duplikasyonlu hastalara göz attığımızda 3/9’unda ekzon 1 ve 8/9’unda ekzon 5 amplifikasyonu tespit edilmiştir. Bu veriler ekzon 5’in hot spot bir bölge olduğunu düşündürmüştür. Beyer ve ark. otopsi sonucu alınan beyin dokularında saptadıkları α -sinüklein varyantları ile yaptıkları çalışmalarında *SNCA* ekzon 3 ve 5’de ayrı ayrı meydana gelen delesyonların normalde 140 amino asitlik α -sinüklein proteinin 112 ve 126 amino asitlik varyantlarının Lewy cisimleri oluşumunun sebeplerinden olduğunu yayınlamışlardır (6). Çalışmamızda saptanan *SNCA* mutasyonlarının ekzon 5’de yoğunlaşması literatürle uyumludur. Ancak Ikeuchi ve ark.’nca saptanan triplikasyonlu hasta saptanmamış, duplikasyonlu hasta yüksek oranda bulunmuştur. (Tablo 5.1)

Tablo 5.1 SNCA genomik değişimi saptanan hastalarımızın mutasyon dağılımı.

Protokol	Cinsiyet	Başlangıç	Yaşı	UPDRSIII	SNCA A30P Mut	SNCA WT A30P	SNCA (PARK1-4)	UCH-L1 (PARK5)	PARKIN (PARK2)	DJ-1 (PARK7)	TNFRSF9	PINK1 (PARK6)	GCHI	G2019S (PARK8)	LRRK2 (PARK8)
4736	K	61	73	34			+1+5		+11+12	+1+3+5	+	+8			
4737	E	73	76	18			+1+5			+1+3		-5+8			
4774	K	51	67	48			-4		--5--8		-				
4776	E	65	80	52	(+)				-3						
4779	K	61	77	42	(+)				+4+11			+6			
4783	E	57	59	11	(+)										
4784	K	54	64	30	(+)					-1	-	+3			
4785	K	60	65	48	(+)										
4786	E	70	75	32	(+)				-5			+6			
4787	K	38	43	12	(+)		-6							(+)	
4789	K	52	63	42	(+)									(+)	
4798	K	59	70	34			+5			-1		+8			
4810	E	66	72	32	(+)										
4817	K	64	67	18			+5			+1		+8			
4823	E	59	68	34			+5					+8			+10
4825	E	66	78	29	(+)							+6+8			
4833	E	60	71	42			+5			+1+5		-5+8			
4834	K	50	55	10			+5					+8			
4843	K	61	64	14			+6					-1			
4846	E	51	62	42	(+)		-1-5		+6	-1-7	-	+3+5-8			
4886	K	57	66	32			-1		-5-11	-1-3		-8		(+)	-10
4895	E	39	44	22	(+)	(-)					-			(+)	
4910	K	54	66	32			+1+5		+11		+	+8			+10+15
4924	K	52	63	42	(+)				-9			+1+5-7		(+)	
5394	K	62	71	48			-1-5		-12	-3-5	-	-8			
5505	E	66	70	21	(+)									(+)	
5506	K	62	69	18			-2-5		-8-12	-1-3-5	-	-4			
5507	E	40	56	58	(+)				-12	-1-3	-	+1+5 -6-7-8			
5522	K	60	64	28			-1					-8	-2-6		
Ortalama		58	66	31,9											

(+) işaretli nokta mutasyonu varlığını, + işaretli amplifikasyonu, - işaretli delesyonunu göstermektedir. + veya - değerinin önündeki rakam ekzon numarasını ifade etmektedir. Örneğin +5, tablodaki genin ekzon 5 amplifikasyonu olduğunu; -1 tablodaki genin ekzon 1 delesyonu bulunduğunu ifade etmektedir.

Tablo 5.2’de görüldüğü gibi çalışmamızda SNCA genomik değişimleri literatüre göre yüksek oranda saptanmıştır. Kontopoulos ve ark. ile Winkler ve ark. SNCA geninin

hastalarda farklı klinik şiddetlerde görülmesinin bu genin regülasyonunu etkileyen metilasyon gibi epigenetik değişikliklerin de bu genin ifadesinde rol oynadığını ve yeni araştırmalara ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir (70, 159). MLPA analizimiz belli bir bölgeye ait Türk PH olgularında yapılmış ilk çalışmadır. MLPA analizi Gen Bankası verileriyle kıyaslanarak bizlere hastalardaki genomik değişiklikler hakkında bilgi sunmaktadır. Verilerimiz Gen Bankasıyla karşılaştırılarak analiz edilmektedir. Bu analiz sonucunda tespit edilen genomik değişimler klinisyenlere ipucu vermektedir. Bu ipucu yeni çalışmalara basamak teşkil etmiştir. MLPA analiz verilerimize dayalı olarak yorumlarımızda yeni verileri destekleyecek sıhhatli verilere dayalı çalışmalarla bulanık görülen bazı etkileşimler açıklığa kavuşturulacaktır. Mesela verilerimiz doğrulandığı takdirde literatürde yalnızca birkaç ailede saptanırken Türk sporadik PH olgularımızda yüksek oranda saptanan *SNCA* genomik değişimleri genetik kayma, founder etki veya α -sinükleinin histon asetiltransferaz enzimine doğrudan bağlanarak epigenetik bir faktör olarak çalıştığını tespit eden araştırmacıların çalışmaları açısından da değerlendirilebilir (70, 159). Saptadığımız *SNCA* mutasyonlarıyla Parkinson hastalarımızın kliniklerine göz attığımızda bu hastalara ait klinik heterojeniteden söz edilebilir. Ancak hastalarımızın saptanan UPDRSIII değerleri arasındaki fark hastalığın penetrans değişkenliğinden, ilave genomik değişikliklerin etkisinden veya hastaların yaşları arasında fark bulunması sebebiyle her birinin hastalığın ayrı dönemlerinde bulunmuş olmalarından da kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Bu sebeple MLPA analizi yaptığımız sporadik PH olgularımızda UPDRSIII değerlerinin farklı olması, Ahn ve ark.'nın saptadığı hastalardaki penetransı aynı geni taşıyan hastalardaki klinik şiddet farkı olarak düşündüğümüzde ise literatürle uyumlu, duplikasyonlu hasta oranının yüksekliği sebebiyle literatürden farklı bulunmuştur. Sonuç olarak saptadığımız mevcut veriler gelecekteki araştırmaların *SNCA* multiplikasyonlarının penetransı ve fenotip üzerinde genetik, epigenetik ve çevresel risk faktörlerini tanımlamaya yönelik kullanılabileceğini düşündürmüştür.

Tablo 5.2 SNCA Geni Literatür Bilgileri

Araştırmacılar	Çalışma Tipi	Populasyon	Sıklığı (%)
Polimeropoulos ve ark. (118)	Tek Aile	Yunan	İlk Mutasyon
Ahn ve ark. (2)	Sporadik	Kore, (Amplifikasyon)	0,23
Brueggeman ve ark. (14)	Sporadik	Kanada (Amplifikasyon)	0,25
Gispert ve ark. (48)	Ailesel	Alman, Portekiz, Yugoslav	0
Bras ve ark. (27)	Ailesel	Portekiz	0
Xiromerisiou ve ark. (162)	Sporadik	Yunan	0
Ikeuchi ve ark. (64)	Ailesel	Japon	4 jenerasyon
MLPA çalışmamız	Sporadik	Türk	50,00
		Amplifikasyon	15,51
		Delesyon	12,06
		A30P	25,86

5.1.2. UCH-L1 (PARK5) Prob Bölgeleri

İlk defa Lowe ve ark. tarafından Lewy cismi bulunan sporadik PH olgularında *UCH-L1* daha sonra ODPH olan bir Alman ailesinde Wintermeyer ve ark. tarafından Ile93Met substitüsyon saptanmasıyla PH aday genleri arasında yerini almıştır (84, 160). Bu araştırmada 229 OD Alman PH olgusu ve 200 Alman sağlıklı kontrol örneği taranmıştır. 229 hastanın 36'sı ailesel ve 193'ü de sporadiktir. Bu hastalarda *Parkin* ve *SNCA* mutasyonu saptanmadığı Kruger ve ark. tarafından sonradan yapılan bir çalışma ile yayınlanmıştır (72, 73). Bu çalışmada hastalardan elde edilen DNA örnekleri ile RFLP, Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) ve doğrudan dizileme teknikleri kullanılmıştır. SSCP ve devamı olarak yapılan dizilemede *UCH-L1* Ekzon 3'de meydana gelen mutasyonun *UCH-L1*'in hidrolitik aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. UPS'de übikütlümenin son aşaması olan ligasyonun gerçekleşemediği, böylece toksik protein birikimi ve nörodejenerasyona sebep olduğu gözlenmiştir (50). Leroy ve ark. tarafından yapılan bağlantı analizi çalışmasında, ailesel PH öyküsü olan küçük bir Alman ailesinde, I93M yanlış anlamlı mutasyonu bulunmuştur (75). Ancak Lim ve ark. ODPH olgularında yaptıkları çalışmalarında *UCH-L1*'de meydana gelen I93M yanlış anlamlı mutasyon sebebiyle oluşan kısmi fonksiyon kaybının, invitro olarak übikütlü hidrolaz aktivitesinde kayba sebep olmadığını göstermişlerdir (79).

Görünürde *UCH-L1*'in halen bilinmeyen bir mekanizmayla PH yaptığı araştırmacılarca düşünülmektedir. Yaptığımız MLPA çalışmasında *UCH-L1* geni ekzon 1, ekzon 4, ekzon 5 ve ekzon 9 bölgelerine yönelik hazırlanmış dört ekzonu tarayan prob bölgelerinde herhangi bir amplifikasyon veya delesyon saptanmamıştır. Sadece bir Alman ailesinde bulunmuş ve diğer çalışmalarda doğrulanmamış bu mutasyonun çalışmamızda da saptanmamış olması literatürle uyumludur. MLPA'nın 2009 yılında güncellenmiş kitinde *ATP13A2*'ye ait prob bölgeleri konmuş, *UCH-L1* problemlerinden bir tanesi çıkartılarak kit içeriğinde değişiklik yapılmıştır. 2009 yılında Mellick ve ark. yayınlarında sadece bir Alman ailesinde bulunmuş *UCH-L1* mutasyonunu taramalarına dahil etmemişler, buna gerekçe olarak da bu mutasyonun saptanma sıklığının çok nadir olmasını göstermişlerdir (92). Araştırmacıların ilgi odağı *UCH-L1*'den *ATP13A2*'ye kaymaktadır (163). Sporadik PH olgularını taradığımız MLPA analiz çalışmamızda *UCH-L1* saptanmaması literatürle uyumludur.

5.1.3. *Parkin* (*PARK2*) Prob Bölgeleri

Genelde başlangıç yaşı 20–40 arası olan OR kalıtılan *Parkin* mutasyonları nadiren de olsa 10 yaş altı görülebildiği gibi 60 yaş üstü de görülebilmektedir (4). Distonik belirtiler, uykudan yararlanma, derin duyu kaybı, parestesi bu gende mutasyonu taşıyan PH olgularında sıklıkla görülür. Bu hastalar L-Dopa'ya çok iyi cevap verirler ancak hızla motor fluktuasyon geliştirirler. Bu genin mutasyonları EBPH'nda sporadik olarak %18, ailesel olarak %50 oranında görülmektedir (66). 12 ekzonlu *Parkin* genini incelemek üzere Hedrich ve ark. birbiriyle yakınlığı olmayan sporadik 379 PH vakasıyla yaptıkları haplotip analizi ve doğrudan dizileme çalışmasında ekzon 3, ekzon 4 veya her ikisinde olmak üzere iki noktada mutasyon, ek olarak sıklıkla ekzon 2 ve ekzon 7 de dikkat çeken genomik değişimler saptamışlardır. Toplam 38 mutasyon pozitif hasta ve 62 mutasyon negatif birey genotiplenmiş, allel frekansları değerlendirilmiş ve ortak haplotiplerde bağlantı dengesizlikleri bulunmuştur. Ekzon 7 de yer alan 942C>T'nin en sık nokta mutasyonu olduğunu, en sık ekzon delesyonunun ise 2. ekzonda meydana geldiğini ve ekzon 2 de saptanan bu mutasyonun

(255/256delA) hotspot nokta olarak düşünüldüğünü yayınlamışlardır (58). MLPA analizi yapılan PH olgularımızda ise ekzon 1 ve ekzon 2'de herhangi bir genomik değişim bulunmamıştır. Hedrich ve ark.'nın yaptıkları çalışmada sporadik EBPH olgularında *Parkin* mutasyonlu hasta frekansı %10 (n=38), MLPA çalışmamızda ise %37 (n=3) oranında tespit edilmiştir. Bu, Hedrich ve ark.'nın yaptıkları çalışmada tespit ettikleri mutasyonlu hasta sayısından yüksektir ve ayrı ekzon bölgelerini içermektedir. Literatürde ailesel EBPH vakalarının %50'sinin, sporadik EBPH vakalarının %18'inin *Parkin* mutasyonu olduğu bildirilmiştir. Bunun sebebi *Parkin* mutasyonunun bileşik heterozigot etkisinin yaygınlığı olduğu gibi incelediğimiz hasta popülasyonunda daha farklı bir ekzon bölgesinde founder etki de olabilir. Bunu Clarimon ve ark. biri Türk biri Brezilyalı birbiriyle akraba olmayan iki PH olgusunda saptanan homozigot ekzon 4 delesyonunu bağımsız mutasyonel olay veya antik bir founder etki olabileceği şeklinde yorumlamışlardır (20). MLPA analizi yapılan *Parkin* mutasyonlu hastalarımızda ise yığılma beş hastada ekzon 11, beş hastada ekzon 12'de saptanmış olup *Parkin* mutasyonlu hastalarımızın %30'unu teşkil etmektedir. Hedrich ve ark. ile benzer hasta grubuyla yaptığımız MLPA analiz çalışmamız hasta yaşları açısından da birbirine benzemektedir. MLPA analizi çalışmamızda saptadığımız EBPH olgularımızda üç *Parkin* mutasyonu saptanan hastamız mevcuttur. Bunlardan birisi 56 yaşında ve PH başlangıç yaşı 40 olup kliniği de oldukça şiddetli seyretmekte olan bir hastadır. Bu hastada *Parkin* 12 delesyonuna ek olarak *PINK1* ekzon 1 ve 5'te duplikasyon, ekzon 6, 7 ve 8'de delesyon ve *SNCA* A30P nokta mutasyonu da saptanmıştır. Bu hastanın önemi *Parkin* ve *PINK1* genlerinin her ikisinde meydana gelen mutasyonun mitokondriyal fonksiyon kaybına sebep olmasıdır ve bu da hastamızda klinik olarak çok belirgindir. *SNCA* A30P homozigot mutasyonunun meydana getirdiği katlanma kusuruna, *Parkin*'in (ekzon 12 delesyonu) übiküitinleme kaybı ve ek olarak oksidatif strese karşı koruyucu işlev gören *PINK1* (ekzon 1, 5 amplifikasyonu, 6, 7, 8 delesyonu) fonksiyon kaybı, bu hastadaki ağır tabloyu açıklar görünmektedir. Bu hastayla ilgili daha detaylı bilgiye ulaşmak amacıyla hastaya aile taraması yapmak gerekmektedir. Diğer iki *Parkin* mutasyonlu EBPH olgularımızda görünen önemli bir özellik yoktur. UPDRSIII skorları da 22 ve 18 bulunmuştur. Bu iki hastada *LRRK2* mutasyonu da ek olarak bulunmaktadır. Tablo 5.3'te bu hastalara ait saptanan mutasyonlar ve UPDRSIII

skorları gösterilmiştir. Tablo 5.4'te özetlendiği gibi sporadik EBPH oranı açısından verilerimiz literatüre göre yüksek saptanmıştır.

Clark ve ark. yapmış oldukları çalışmalarında semikantitatif multiplex PCR ile 50 yaş altı erken başlangıçlı hastaları incelemişlerdir. Bu çalışmada 101 hasta ve 105 sağlıklı kontrol bireyi incelemişler, bir homozigot, 11 heterozigot ve bir bileşik heterozigot *Parkin* mutasyonu tespit etmişlerdir. Bu 13 *Parkin* mutasyonlu hastanın frekansı 12,80 ve ağırlıklı olarak ekzon 2 ve 7'de yoğunlaşmıştır (21). Çalışmamızda sekiz EBPH olgusu taranmıştır. İncelenen hastalarımızın sadece üç tanesinde birer *Parkin* delesyonu saptanmıştır. Birisi yukarıda bahsi geçen ve şiddetli klinik bulgular veren, UPDRSIII skoru 58 olan hastadır. Bu Parkinson hastasında ek mutasyonlar da saptanmıştır. *Parkin* mutasyonlu hastalarımızın UPDRSIII skor ortalaması 35 olarak saptanmıştır. Hastalarımızın frekansı Clark ve ark.'nın bulduğu frekansa (%12.80) göre EBPH olgularımız (n=8) arasında %37 (n=3) yüksek bulunmuştur. Ve EBPH'larımızın hiçbirinde Clark ve ark.'nın yoğunlaşmış bölge olarak saptadıkları ekzon 2 ve 7'de *Parkin* mutasyonu saptanmamıştır.

İlginç bir çalışma da Okubadejo ve ark.'nın Nijeryalı 57 Sporadik PH ve 51 kontrol bireyi ile yaptıkları kohort (epidemiolojik bir incelemede istatistiki olarak ortak özellikler gösteren bireysel topluluk) çalışmasıdır. Bu çalışmada hiçbir hastada *Parkin* mutasyonuna rastlamadıklarını bildirmişlerdir (100). MLPA çalışmamız Nijeryalı hasta grubundan yüksek bulunmuştur.

Schlitter ve ark. 96 Norveç ve 95 Alman PH olgusunu ve 100 sağlıklı Alman ve 100 sağlıklı Norveç kontrol bireyini SSCP ve dizi analizi teknikleri ile taramışlardır (128). Bu hastalar GBPH vakaları olup Alman hasta grubunda %1,6 heterozigot yanlış anlamlı mutasyon (n=3), kontrol grubunda %0,3 yanlış anlamlı mutasyon (n=1), Norveçli hasta grubunda %0,5 (n=1) heterozigot yanlış anlamlı mutasyon tespit etmişlerdir. Ekzon 3, 4, 10 ve 11'de bulunan bu mutasyonlar iki Avrupa toplumunda iki farklı mutasyon insidensi anlamına gelmektedir. MLPA çalışmamızda GBPH grubumuzda (n=50) *Parkin* mutasyonlu hasta oranı %26 (n=13)'dir. Bu genelde araştırmacıların EBPH olguları için yayınladıkları orandan (%50) az, nadiren rastlanan GBPH'ları oranından (%18) yüksektir (139). MLPA analizi sonucunda *Parkin*

mutasyonlu sporadik GBPH olgularımız literatürde yayınlandığından yüksek saptanmıştır. MLPA analizi çalıştığımız hastalarda *Parkin* mutasyonlarının ekzon 11 ve 12'de yoğunlaşmış olduğu gözlenmiştir. Tablo 5.4'te görüldüğü gibi Nijerya'da hiç saptanmamış, Norveç'te düşük frekansta tespit edilmiş olan *Parkin* mutasyonu, Alman GBPH popülasyonunda bunlara nazaran daha yüksek bulunmuştur. Hattori ve ark. ise yaptıkları aile çalışmasında *Parkin* mutasyonu oranını %66 olarak saptamışlardır. MLPA çalışmamızda ise araştırmacının yayınladığından yüksek, Hattori ve ark.'ndan düşük saptanmıştır.

Doğu ve ark. tarafından *Parkin* geni hakkında yapılan tek Türk popülasyonu çalışması aynı soydan gelen EBPH'na sahip bir aile için yapılmıştır (33). 12 kardeş için yapılan bu çalışmada hastaların *Parkin* geninin tüm ekzonlarına doğrudan dizileme ve gen dozaj analizi yapılmıştır. Bu hastaların sadece üç tanesinde ekzon 4'te homozigot delesyon saptanmış ancak her birinin diğer 11 ekzonu normal çıkmıştır. MLPA araştırması yaptığımız sporadik PH olgularımızın yalnızca bir tanesinde ekzon 4'te *Parkin* delesyonu saptanmıştır. Bu hasta heterozigot olarak saptanmış olup, 6. ekzonda duplikasyonu da mevcuttur. Sadece bir ailedeki mutasyonların tarandığı bu çalışma ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 4. ekzondaki mutasyonların coğrafik dağılım farkı olabileceği de muhtemeldir. MLPA analizi yapılan hastalarımızın sporadik PH olgularından, Doğu ve ark.'nın hasta grubu ise tek bir aile taramasından elde edilmiş olduğundan farklı sonuçlar elde edilmesinin sebebi olabileceğini düşündürmüştür.

Mutasyonların etnik orijinini araştıran EBPH olgularıyla yapılmış bir çalışma da Djarmati ve ark. tarafından yayınlanmıştır (30). Sırp kökenli 75 hastanın *DJ-1* ve *Parkin* mutasyonlarını taramak için SSCP, DHPLC ve doğrudan dizileme, dozaj analizi için kantitatif PCR yöntemlerini kullandıkları çalışmalarında, EBPH olgularında %2,7 oranında (n=2) mutasyon bulmuşlardır. Tablo 5.4'te görüldüğü gibi Hattori ve ark. tarafından Japon hastalarda %66 olarak yayınlanan *Parkin* mutasyonlarının ve Chen ve ark.'nın yaptığı araştırmada Amerikan toplumunda %3'ün altında olarak dağılım farkı gösterebileceğini ortaya koymuştur (18). Sırp hastaların dikkat çeken bir özelliği de hastalardan birinin bileşik heterozigot, diğerinin de heterozigot *DJ-1* mutasyonu

birlikte olan heterozigot bir *Parkin* mutasyonu olmasıdır. Oksidatif fosforilasyon yolağında *DJ-1* ve *Parkin* geninin mitokondriyal fonksiyon kaybını birlikte şiddetlendirmeleri ve sonuçta klinik olarak PH'nın erken başlangıçlı karaktere sahip olmasını moleküler olarak açıklamaktadır.

Periquet ve arkadaşları EBPH'na sahip Avrupa kökenli 48 ailede haplotip analizi yapmışlardır (115). 14 hastanın birbirinden farklı mutasyon ve bir ailenin ise birden fazla mutasyon taşıdığı tespit edilmiştir. Yakın bir zamanda Shadrina ve ark. tarafından Moskova'da dokuz jüvenil başlangıçlı PH ve 64 EBPH olmak üzere iki hasta grubunda *Parkin* 1-12 arası tüm ekzonik değişimlerin tarandığı kantitatif RT-PCR çalışması yapılmıştır (132). Araştırmacılarca *Parkin* geni ekzon 2'de bir delesyon, ekzon 3'te altı delesyon, ekzon 4'te beş delesyon, ekzon 5'te iki delesyon, iki amplifikasyon, ekzon 6 ve 7'de birer delesyon olmak üzere hastaların %14'ünde (n=9) genomik değişim bulunmuştur. Bizim çalışmamızda EBPH olgularında üç hastada (%37) daha fazla mutasyon bulunmuştur. Her iki çalışma da benzer özellikler göstermektedir. Shadrina ve ark. kontrol DNA olarak beta globulin genini kullanmakta iken, MLPA yönteminde CAV, LPA ve kontrol problemleri çalışmamızın genomik kontrolünü sağlamaktadır. Üreten ticari firması tarafından MLPA yöntemi ile uygun prob hazırlandığında küçük delesyonlar ve hatta spesifik problemlerle belli nokta mutasyonlarının da gösterilebildiği iddia edilmektedir. Buna göre MLPA mutasyon spesifik ve büyük, küçük tüm genomik değişimleri gösterebilmektedir ancak kantitatif RT-PCR tekniği komşu ekzona devam eden büyük genomik delesyonları ve her iki kromozomda da yer alan iki delesyon farkını ayırdedebilme özelliğine sahip değildir. Çalışmamıza göre *Parkin* geninin farklı toplumlarda farklı frekansta genomik dağılım gösterdiğini destekleyen yeni bulgular saptanmıştır. MLPA çalışmamızda *Parkin* geni ekzon 5 ve 12 de saptanan delesyonların nisbeten daha yüksek olması dikkat çekicidir. Ancak araştırmacıların diğer yayınlarıyla kıyaslandığında çalışmamızda tespit edilen genomik değişikliklerin kısmen literatüre uygun olduğunu kısmen de kendine has bir grup olarak 5, 8 ve 12. ekzonda delesyon, 11 ve 9. ekzonda duplikasyonlar bulunması ile hasta grubumuza ait farklı bir genomik değişim göstermesidir. Hattori ve ark.'nın Japon aile çalışmasında ve Rus populasyonunda ekzon 5'te duplikasyon ve ekzon 5'te delesyon görülmüş olması 5. ekzonun genomik değişime yatkın frajil bölge olup olmadığını bize yansıtması

açısından önemlidir. Birçok araştırmacı da intron 1 ile 5 arasını (ekzon 2 ve 5) hot-spot bölge olarak tanımlamaktadır (25). Ayrıca Japon, Avrupa ve Kuzey Afrika toplumlarındaki EBPH'nda *Parkin* genine ait ekzon 3 ve 4'de 121 amino asitlik delesyon, ekzon 3'de homozigot, ekzon 3 ve 4'te bileşik homozigot delesyonlar yayınlanmıştır (95). Ayrıca bu mutasyonlar *Parkin* geninin diğer bölgelerinde ekzonik delesyonlar, yanlış anlamlı, anlamsız mutasyonlar ve multiplikasyonlardan oluşmaktadır (58). MLPA analizi ile saptadığımız *Parkin* gen mutasyonu oranı literatürde rastlanandan daha yüksek bulunmuştur ancak literatürle uyumu tartışmalıdır. Şu ana kadar araştırmacılar 100'ü aşkın *Parkin* mutasyonu saptamışlardır (13). Bu araştırmalar göstermiştir ki ister delesyon ister duplikasyon veya nokta mutasyonu olsun, *Parkin* mutasyonları tek başına PH etkenidir (108). Pal ve ark. aynı ailede görülen allelik heterojenite sebebiyle *Parkin* gen mutasyon sayısı daha yüksek olabileceğini yayınlamışlardır. Bu da araştırmacıların saptadıkları *Parkin* mutasyonlu hastaların frekansının daha yüksek olmasının beklendiğini göstermektedir (107).

Gasser ve ark. *Parkin* mutasyonlarının ya homozigot ya da bileşik heterozigot durumunda iken hastalık sebebi olmasının gerektiğini, ama buna ilave olarak bazı durumlarda heterozigot hastalarda da klinik yansımanın bulunmasının haplotip yetersizliği veya dominant-negatif etkiye bağlanabileceği yorumunun tartışmaya açık olduğunu yayınlamıştır (44). MLPA çalışmamızda saptadığımız *Parkin* mutasyonlu hastalarımızın UPDRSIII ortalaması 35'tir ve *Parkin* mutasyonlarının dağılımı ve hastalarda bulunma sayısından bağımsız olarak 18 ile 58 arasında değerlere sahiptir. MLPA çalışmamız *Parkin* mutasyonlarının klinik fenotipe yansıması üzerine yapılacak ek çalışmalar yapılmasına zemin oluşturmuştur.

Hakansson ve ark. İsveçte MLPA ve doğrudan dizi analizi yöntemiyle yapmış oldukları ve 63 erken başlangıçlı PH taradıkları çalışmalarında *Parkin* geni ekzon 3'te bir tane patojen heterozigot yanlış anlamlı mutasyon, 2 sessiz mutasyon bulmuşlardır (54). Çalışmamız Hakansson ve ark.'nın İsveç'li EBPH olgularında %4 olarak saptadıkları mutasyon oranına göre yüksek bulunmuştur.

Schroeder ve ark. (131) yeni geliştirdikleri bir yöntemle 31 EBPH olgusunun *Parkin*, *PINK1* ve *DJ-1* genlerine ait 27 kodlanan bölgede toplam 367.195 nükleotidlik bir tarama yapmışlardır. Bilinen EBPH gen mutasyonu bulunan dört kontrol hastasını da çalışmalarına pozitif kontrol olarak eklemiştirler. “High-Throughput Homogeneous Mass Cleave Assay” adı verilen yöntemleri dizileme yöntemine benzer şekilde lazerle spektrometrik okuma yapan bir cihazı kullanmışlardır. Çalışmalarında 31 EBPH olgusunda 410 sekans değişimi saptamışlardır. Ancak bunların sadece üç tanesi bilinen mutasyondur. Bir tanesi *Parkin* ekzon 7 homozigot nokta mutasyonu iken diğer ikisi heterozigot *Parkin* nokta mutasyonudur. Araştırmacılar kendi tekniklerinin tamamlayıcısı olarak MLPA ve dizilemenin gerekli olduğunu çünkü tekniklerinin büyük genomik değişimleri kaçırabileceğini bildirmişlerdir.

Üzerinde çalışılan EBPH vaka sayımız çok az olduğundan (n=8) daha geniş bir EBPH grubu ile farklı sonuç alınabilir. Tek bir hastanın istatistik oranı yaklaşık %12 değiştirdiği bu durum, çalıştığımız EBPH grubu için değerlendirildiğinde çalışılan EBPH sayısı artırılarak yeniden değerlendirilmesi uygun olacaktır. Literatürde GBPH olguları ile yapılmış *Parkin* mutasyon çalışması yoktur. OR kalıtılan *Parkin* mutasyonları homozigot değilse ancak bileşik heterozigot etki, haplotip yetersizliği veya dominant-negatif etki veya çevresel faktörlerle oluşan hastalık etkeni olmaktadır. Halen PH yolağında *Parkin* proteininin diğer gen ürünleriyle etkileşimi araştırılmaktadır.

West ve ark. *Parkin* geninin 204 bç geri promotor bölgesinde *Parkin* genine antisens bir yeni transkript bulmuşlardır (158). Bu yeni gene *Parkin* co-regulated gen (*PACRG*) adı verilmiştir. Deng ve ark. 112 erken başlangıçlı PH olgusuyla yaptıkları *PACRG* geninde üç nokta mutasyonuna rastlamışlar ve bunun patojenik bir etkisi olmadığını, bu sebeple EBPH için çok az bir risk içerdiğini yayınlamışlardır (26). Taylor ve ark. Lewy cisimcikleri ve gliyal sitoplazmik inklüzyonları içinde *PACRG* tespit edilmesi üzerine UPS’in *PACRG* ile regüle edildiğini ve PH patogenezinde rolü olduğunu iddia etmişler, ancak sağlıklı bireylerle PH vakalarının beyinlerinde dağılım farkı olmayan bu gen ürününün daha yeni çalışmalara açık olduğunu ifade etmişlerdir (145). Lesage ve ark. EBPH olan bir ailede ve izole bir vakada *PACRG* 1. ekzonda

delesyon saptamışlardır (78). Şüpheli bir gen olmasına rağmen bizim yaptığımız çalışmada *Parkin* geninin promotor bölümünde yer alan *PACRG* geni 1 ekzona ait

Tablo 5.3 *Parkin* genomik değişimi saptanan hastalarımızın mutasyon dağılımı.

Protokol	Cinsiyet	Başlangıç	Yaşı	UPDRSIII	SNCA A30P Mut	SNCA WT A30P	SNCA (PARK1-4)	UCH-L1 (PARK5)	PARKIN (PARK2)	DJ-1 (PARK7)	TNFRSF9	PINK1 (PARK6)	GCHI	G2019S (PARK8)	LRRK2 (PARK8)
4736	K	61	73	34			+1+5		+11+12	+1+3+5	+	+8			
4745	K	47	50	22					-11						-1
4774	K	51	67	48			-4		--5--8		-				
4776	E	65	80	52	(+)				-3						
4779	K	61	77	42	(+)				+10+11			+6			
4786	E	70	75	32	(+)				-5			+6			
4788	E	65	70	32					-12					(+)	
4872	E	56	61	24					+9						+15
4874	K	68	72	24					+9		+				
4886	K	57	66	32			-1		-5-11	-1-3		-8		(+)	-10
4910	K	54	66	32			+1+5		+11		+	+8			+10+15
4924	K	52	63	42	(+)				-9			+1+5-7		(+)	
5087	K	49	52	18					-4+6						+15
5394	K	62	71	48			-1-5		-12	-3-5	-	-8			
5506	K	62	69	18			-5		-8-12	-1-3-5	-	-4			
5507	E	40	56	58	(+)				-12	-1-3	-	+1+5 -6-7-8			
Ortalama		57,5	66,8	35											

(+) işareti nokta mutasyonu varlığını, + işareti amplifikasyonu, - işareti delesyonunu göstermektedir. + veya - değerinin önündeki rakam ekzon numarasını ifade etmektedir. Örneğin +5, tablodaki genin ekzon 5 amplifikasyonu olduğunu; -1 tablodaki genin ekzon 1 delesyonu bulunduğunu ifade etmektedir.

herhangi bir amplifikasyon veya delesyona rastlanmamıştır. Zaten çok nadir rastlanan bu genomik değişikliğin tarafımızca da bulunmaması literatürdeki bilgilerle uyumludur.

Tablo 5.4 Parkin Geni Literatür Bilgileri

Araştırmacılar	Çalışma Tipi	Populasyon	Sıklığı (%)	Ek Bilgi
Hedrich ve ark. (58)	Sporadik	Alman, EBPH	10,00	Ekzon 7 en sık
Clark ve ark. (21)	Sporadik	ABD, EBPH	12,80	Ekzon 2, 7 en sık
Okubadejo ve ark. (100)	Sporadik	Nijerya,	0	
Schlitter ve ark. (128)	Sporadik	Norveç, GBPH	0,50	Ekzon 3,4,10,11
		Alman, GBPH	1,60	Ekzon 3,4,10,11
Doğu ve ark. (33)	Ailesel	Türk, EBPH	Mut. tarama	Ekzon 4 en sık
Djarmati ve ark. (30)	Sporadik	Sırp, EBPH	2,70	
Hattori ve ark. (56)	Ailesel	Japon, EBPH	66,00	Ekzon en sık 5
Chen ve ark. (18)	Sporadik	ABD, EBPH	3,00	Ekzon 3
Periquet ve ark. (115)	Ailesel	Avrupa, EBPH	Mut. tarama	
Shadrina ve ark. (132)	Sporadik	Moskova, EBPH	14,00	Ekzon 3,4
Hakansson ve ark. (54)	Sporadik	İsveç EBPH	4,00	Ekzon 3
Schroeder ve ark. (131)	Sporadik	Alman, EBPH	10,00	Ekzon 7
MLPA Çalışmamız	Sporadik	Türk	27,00	Ekzon 5 ve 12
		Türk, EBPH	37,00	delesyonu, 9 ve 11
		Türk, GBPH	24,00	duplikasyonu

5.1.4. *DJ-1* (PARK7) Prob Bölgeleri

OR ve erken başlangıçlı olup PARK6 lokusundan 25 cM uzaklıkta bağlantılandırılan *DJ-1* geni, ilk defa van Duijn ve ark. tarafından Hollanda'da izole bir bölgede yaşamakta olan dört hastada keşfedilmiştir (152). Bonifati ve ark. tarafından RT-PCR yöntemiyle bakıldığında bu hastalarda *DJ-1* geni ekzon 1–5 arasında tam delesyon bulunmuştur (9). Araştırmacılar bu hastalarda *DJ-1* proteini üretilmediğini saptamışlardır. Bu protein üzerine yapılan incelemelerde *DJ-1*'in hücrel oksidatif stres ve asidik ortam gelişimine antioksidan cevap veren etkene karşı hidroksiperoksidaz-karşıtı bir protein gibi davrandığını keşfettiler. Yang ve ark. *SNCA*'nın yanlış katlanması, *SNCA* yıkımında UPS hatası gibi hücrel stres oluştuğunda *DJ-1* mutasyonları sebebiyle fonksiyon kaybı gelişmişse hastalarda kliniğin ağırlaştığını yayınlamışlardır (163). Çalışmamızda *DJ-1* ekzon 1'de beş hastada delesyon, beş hastada amplifikasyon; ekzon 3'de dört hastada delesyon, iki hastada amplifikasyon, ekzon 5'de üç hastada delesyon, iki hastada amplifikasyon ve ekzon 7'de bir hastada

delesyon saptanmıştır. Çalışmamız Bonifati ve ark.'nın elde ettikleri verilerle karşılaştırıldığında bizim hasta grubumuzda 1–5. ekzon arasını kapsayan büyük delesyonlu bir hastaya rastlanmamıştır. Ancak çalışma grubumuzdaki hastalarımızda *DJ-1* genine ait küçük amplifikasyonlar ve delesyonlar bulunan hastalarımız tespit edilmiştir. Ancak tablo 5.5'te görüldüğü üzere bu genomik değişimler PH olgularımızda dikkat çekici bir şekilde ekzon 1, 3 ve 5'te daha yoğundur.

Günümüzde birçok yayını ile PH hakkında önemli çalışmalarını aktaran Pankratz ve ark. 64 PH aileden 93 PH bireyi MLPA ve dizileme yöntemleriyle araştırmışlardır (111). Hastaların yaşları 18–80 arasında değişmektedir ve ortalama başlangıç yaşları 58'dir. Araştırmacılar, PH veya diğer nörolojik hastalıklar hakkında herhangi bir semptom veya teşhisi olmayan 96 kontrol bireyini de bu çalışmaya eklemiştir. PH olguları ve kontrol bireyleri Salsa MLPA P051 kiti ile analiz edilmişlerdir. Taradıkları PH olgularında herhangi bir amplifikasyon ya da delesyona rastlanmamıştır. Ancak doğrudan dizilemede beş hastada bir tanesi homozigot diğer dördü heterozigot R98Q mutasyonu bulunmuştur. Pankratz ve ark. 93 hastalık popülasyonlarına göre buldukları beş mutasyon için diğer araştırmacıların PH olgularında *DJ-1* mutasyonlarının sayısını daha çok tahmin etmiş olabileceklerine bağlamışlardır (69). *DJ-1* mutasyonları ailesel PH saptanan bireylerde Pankratz ve ark.'na göre çok seyrek görülmüştür. Çalışmamızda MLPA ile baktığımız sporadik PH vakalarının %20'sinde (n=12) *DJ-1* genomik dozaj değişikliği tespit edilmiştir. Bu Pankratz ve ark.'nın 93 vaka ile yaptıkları araştırma sonucu saptadıkları %5'e (n=5) nazaran dört kat daha yüksek bir orandır. Bu durum, birisi ailesel diğeri sporadik iki farklı grup hastadaki gen dağılımını gösterebileceği gibi, genlerin toplumdaki prevalans gösterdiğinin kanıtı da olabileceğini düşündürmüştür. *DJ-1* geni hakkında Türk PH olgularıyla yapılmış herhangi büyük ölçekli bir çalışma mevcut değildir. Keza Pankratz ve ark.'nın yaptıkları çalışmada sadece Salsa MLPA P051 kiti kullanılmış, oysa çalışmamızda sporadik hastalarımızda hem P051 hem de P052B kitleri kullanılmış olup çok daha fazla problemler daha fazla genomik bölgedeki değişim incelenebilmiş olduğundan Pankratz ve ark.'nın hasta grubunda elde ettiği sonuçlara göre daha yüksek sayıda mutasyon tespit edilmiş olmasını açıklayabilir (111).

Clark ve ark. aile hikayesi sorulmaksızın dizileme yöntemiyle, kohort analizi yaptıkları 89 EBPH olgusunda ilk defa genin bulunduğu Hollanda ailesinde saptanan 1–5 ekzon arası bölgeyi taramışlar ve ekzon 5’de bir yanlış anlamlı mutasyon bulmuşlardır (22). Bu mutasyonu 308 kontrol DNA’sında taramışlar fakat bulamamışlardır. Keza bu hastalarda herhangi bir delesyon veya amplifikasyona da rastlamamışlardır. Benzer şekilde Hering ve ark. yapmış oldukları aile çalışmasında biri Türk ailesine ait olmak üzere yeni c.192G>C (p.E64D) mutasyonu saptamışlardır (59). Bu mutasyon klinik bulgu veren kızkardeşte homozigot olarak, klinik bulgu vermeyen erkek kardeşte heterozigot olarak bulunmaktadır. Ayrıca homozigot hastalar Pozitron Emission Tomography’de L-Dopa emilim kusurunu göstermişlerdir. Lockhart ve ark. 49 Kuzey ABD’li beyaz EBPH olgularını doğrudan dizileme ile analiz etmişler, yaptıkları çalışmada sadece bir probantta R98Q heterozigot amino asit dönüşümü saptamışlardır. (82). Tan ve ark. Çin, Malay ve Hintli değişik populasyonlarda yaptıkları çalışmalarda herhangi bir DJ–1 mutasyonu saptamamışlardır (142). Şu ana kadar hiçbir araştırmacı DJ–1 amplifikasyonu saptamamıştır (141). Tablo 5.5’te görüldüğü gibi MLPA çalışmamızda *DJ–1* genomik değişimi olan 12 hastamızın %42’sinde (n=5) amplifikasyon saptanmıştır. Literatürde *DJ–1* geninde saptanan ilk amplifikasyon bulgusu tarafımızca yapılan MLPA analizi hastalarında tespit edilmiştir. Tablo 5.4’te görüldüğü gibi delesyon saptadığımız bölgeler, ilk defa mutasyonu bulan van Duijn ve ark. ve diğer araştırmacılarla aynı ekzon bölgelerinde olup, oranı diğer araştırmacıların saptadıklarından daha yüksektir.

Bizim çalışmamızda *DJ–1* geninin telomer kısmında yer alan *TNFRSF9* geninde de amplifikasyon ve delesyonlar saptanmıştır. *TNFRSF9* ile ilgili bulgularımız ilginç bazı çıkarımları düşündürmüştür. *DJ–1* genine ek olarak MLPA kitimizde bulunan *TNFRSF9* probu *DJ–1* geninin telomerik ucundaki değişimleri görüntülemek amacıyla MLPA kitinin içine yerleştirilmiştir. Hücresel enflamasyon cevabı ile ilgili *TNFRSF9* genine yönelik hazırlanmış tek prob sonuçları incelendiğinde, çalışmamızda altı hastamızda delesyon dört hastamızda amplifikasyon bulunmuştur. Hem *DJ–1* geninde hem de bu genin p-telomerik ucundaki *TNFRSF9* geninde tespit edilen genomik değişiklikleri birlikte değerlendirdiğimizde, 12 hastamızda *DJ–1* genomik dozaj değişikliği saptanmıştır. Bu hastalardan %50’sinde (n=6) *TNFRSF9* geni dozaj değişikliği de birlikte

bulunmuştur. İlginç bir şekilde *DJ-1* amplifikasyonu olan hastada *TNFRSF9*'un da amplifiye olduğu, yine *DJ-1* ekzon 1 açısından değerlendirildiğinde, beş delesyonlu hastanın *TNFRSF9* genlerinde de delesyon mevcut olduğu görülmüştür. *DJ-1* gen delesyonu bulunan *TNFRSF9* gen delesyonlu hastaların dördünde ve *TNFRSF9* amplifikasyonlu bir hastada *DJ-1* ekzon 1'de aynı şekilde dört delesyon ve bir amplifikasyon bu genomik değişimlere eşlik etmiştir. Buna ek olarak *DJ-1* ekzon 3'de üç delesyon varken *TNFRSF9* genlerinde de delesyon, *DJ-1* ekzon 3'de bir amplifikasyon varken *TNFRSF9* amplifikasyonu da bu genomik değişime eşlik etmiştir. Ve yine *DJ-1* ekzon 5'de iki delesyon mevcutken *TNFRSF9* genlerinde de delesyon, bir amplifikasyon varken *TNFRSF9* geninde de aynı şekilde amplifikasyon görüldüğü saptanmıştır. Bu genler arası ilişki şu ana kadar ilk defa MLPA analiz çalışmamız tarafından saptanmıştır. Tesadüfi bir sonuç olabileceği gibi hücrel enflamasyon cevabı ile ilgili *TNFRSF9* geninin *DJ-1* geninin telomerik ucunda komşu olarak yer aldığı hatırlanırsa, bu durum antienflamatuvar kullananlarda PH'nın daha az sıklıkla geliştiğini yayınlayan araştırmacılara bir cevap olup olmadığı sorusunu da akla getirmektedir. Bu ilişki daha detaylı incelenmeye değer bulunmuştur.

DJ-1 mutasyonları EBPH sebebi olmasına rağmen, çalışmamızda *DJ-1* mutasyonu tespit edilen 12 hastanın yalnızca iki tanesi 40 yaş altındadır. Oysa hastalarımızın genel başlangıç yaşı ortalaması 57,90 olarak tespit edilmiştir. Hastaların başlangıç yaşları 39–73 aralığında bulunmaktadır. Elbette ki Türkiye şartlarında hastalar semptomlar ortaya çıktıktan uzunca bir süre sonra müracaat ettikleri için başlangıç yaşı tespiti, tekrar doğrulanması gereken bir veridir (32). Ancak literatürde genelde ailesel çalışmalarla EBPH olgularıyla yapılan *DJ-1* genomik değişim araştırmalarına yeni bir veri olarak sporadik PH grubumuzun oldukça yüksek frekansta ve çoğunun GBPH olgularından oluşması değerlendirilmesi gereken tartışmaya açık bir bilgi olarak karşımıza çıkmıştır. MLPA analiz çalışmamız her ne kadar tablo 5.6'da görüldüğü gibi ekzon 1-5 arasında yoğunlaşmış olması sebebiyle literatüre uyumlu bulunsa da, oranının yüksek saptanması doğrulanması gereken bir veridir.

DJ-1 ile birlikte saptanan genlere baktığımızda *DJ-1* geni bulunan 12 hastanın üçüne *SNCA* A30P, beşine *SNCA*, *Parkin* ve *PINK1* mutasyonları eşlik etmiştir. Eğer

DJ-1'deki genomik değişim amplifikasyon ise *SNCA*'daki değişim de amplifikasyon ve eğer *DJ-1* genomik değişimi delesyon ise *SNCA*'daki genomik değişim de aynı şekilde delesyon olarak karşımıza çıkmıştır. Bir hasta hariç *PINK1* ve *Parkin* için de aynı durum tespit edilmiştir. Genomik dozaj değişikliği birbiriyle uyumlu olarak delesyon ise diğer genlerde de delesyon, amplifikasyon ise diğer genlerde de amplifikasyon şeklinde bulunmuştur. Ancak her ikisi de 1p36 lokusunda yer alan *PINK1* ve *DJ-1*'in birbirleriyle uyumlu olarak genomik değişimlerinin aynı olması komşuluk sebebiyle açıklanabilir bir durum iken, fragil bir lokusta yerleşimli 6. kromozomda yer alan *Parkin* ve frajilitesi hakkında bir bilginin olmadığı 4. kromozomda yer alan *SNCA* genomik değişimlerinin *DJ-1* genomik değişiklikleriyle aynı özelliği göstermesi araştırılması gereken ilginç bir durum olarak karşımıza çıkmıştır. Sonuç olarak Da Costa ve ark. sporadik PH vakalarının serebrospinal sıvılarında artmış *DJ-1* mutant proteinlerinin varlığının tespiti

Tablo 5.5 *DJ-1* genomik değişimi saptanan hastalarımızın mutasyon dağılımı.

Protokol	Cinsiyet	Başlangıç	Yaşı	UPDRSIII	SNCA A30P Mut	SNCA WT A30P	SNCA (PARK1-4)	UCH-L1 (PARK5)	PARKIN (PARK2)	<i>DJ-1</i> (PARK7)	TNFRSF9	PINK1 (PARK6)	GCHI	G2019S (PARK8)	LRRK2 (PARK8)
4736	K	61	73	34			+1+5		+11+12	+1+3+5	+	+8			
4737	E	73	76	18			+1+5			+1+3		-5+8			
4784	K	54	64	42	(+)					-1	-	+3			
4798	K	59	70	34			+5			+1		+8			
4817	K	64	67	18			+5			+1		+8			
4833	E	60	71	42			+5			+1+5		-5+8			
4846	E	51	62	42	(+)		-1-5		+6	-1-7	-	+3+5-8			
4886	K	57	66	32			-1		-5-11	-1-3		-8		(+)	-10
5137	E	68	72	37						-5					
5394	K	62	71	48			-1-5		-12	-3-5	-	-8			
5506	K	62	69	18			-5		-8-12	-1-3-5	-	-4			
5507	E	40	56	58	(+)				-12	-1-3	-	+1+5 -6-7-8			
Ortalama		59,2	68,1	35,2											

(+) işareti nokta mutasyonu varlığını, + işareti amplifikasyonu, - işareti delesyonunu göstermektedir. + veya - değerinin önündeki rakam ekzon numarasını ifade etmektedir. Örneğin +5, tablodaki genin ekzon 5 amplifikasyonu olduğunu; -1 tablodaki genin ekzon 1 delesyonu bulunduğunu ifade etmektedir.

ile sporadik PH tanısında *DJ-1* proteininin bir marker olarak kullanılabileceğini düşünmüşlerdir (23). Bu çalışmamızla elde ettiğimiz geniş bir yelpazedeki genlerle ilgili bulgularımız çok daha özelleşmiş çalışmaların kurgulanmasına veri tabanı sunmuştur. Bunun da yeni çalışmalarla açıklığa kavuşacağını düşünmekteyiz.

Tablo 5.6 *DJ-1* Geni Literatür Bilgileri

Araştırmacılar	Çalışma Tipi	Populasyon	Sıklığı (%)	Ek Bilgi
van Duijn ve ark. (152)	Ailesel	Hollanda, EBPH	İlk bulgu	DJ-1 del ?
Bonifati ve ark. (9)	Ailesel	Hollanda, EBPH	Detay	Ekzon 1-5 arası del
Pankratz ve ark. (111)	Ailesel	ABD	5,00	Ekzon 2-7 arası
Clark ve ark. (22)	Randomize	ABD, EBPH	1,12	Ekzon 1-5 arası
Hering ve ark. (59)	Ailesel	Türk, EBPH	Aile	
Lockhart ve ark. (82)	Ailesel	Kuzey ABD, EBPH	2,00	
Tan ve ark. (142)	Sporadik	Çin, EBPH	0	
		Malezya, EBPH	0	
		Hint, EBPH	0	
MLPA Çalışmamız	Sporadik	Türk	22,00	Ekzon 1, 3 ve 5
		Türk, EBPH	25,00	
		Türk, GBPH	22,00	

5.1.5. *PINK1* (PARK6) Prob Bölgeleri

Tunus'ta geniş çaplı bir ailesel PH grubunda 1p36-37 lokusunda bağlantılandırılmış olan OR *PINK1* geni mutasyona uğradığında genelde mitokondriyal işlev bozukluğuna sebep olmakta ise de fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Kodlanan bütün varyantları patojenik mutasyon değildir (66). EBPH vakalarının %1-7'sini oluşturur. Şu ana kadar bu gene ait 18 farklı mutasyon tanımlanmıştır ancak *PINK1* genine ait amplifikasyona rastlanmamıştır (25). Um ve ark. *PINK1* ile *Parkin* arasında fonksiyonel bir etkileşim olduğunu bildirmişlerdir. *Parkin* geninin seçici olarak *PINK1*'e bağlanarak *PINK1* düzeyini regüle ettiğini ve Lewy cisimciği oluşumunda her iki genin de birbirinin stabilitesini, çözünürlüğünü ve agrezom formu oluşturma yatkınlığını etkilemekte olduğunu göstermişlerdir (149). Tang ve ark. ise *PINK1*'in *DJ-1* ile fiziksel etkileşime girdiğini bunun da nöron hücrelerini MPTP sebebiyle oluşan

apoptozise karşı koruyan *PINK1 - DJ-1* kompleksi olduğunu yayınlamışlardır (144). Bunun fenotipe yansması her ne kadar açıkça gösterilemese bile araştırmacıların bu konuda beklentisi vardır. Çünkü şu anki araştırmalara göre *PINK1*'in yukarı regülasyonu *Parkin*'e özel bir olaydır. *Parkin* aşırı üretildiğinde *PINK1*'in übikütinlenmesi dramatik olarak azalır (149). *PINK1* geni silinmiş sineklerde *Parkin* geninin ekspresyonunun artmasıyla gelişecek bozuklukların düzeltildiği, ancak *Parkin* geni silinmiş olan sineklerde *PINK1*'in ifadesinin artmaması, daha distalde yer alan *Parkin*le *PINK1* in birlikte aynı metabolik yolağı paylaştığını göstermiştir (31). MLPA ile taradığımız hastalarımızın on tanesinde hem *Parkin* hem de *PINK1* mutasyonu birlikteliği tespit edilmiştir. Bunlar arasında *Parkin* amplifikasyonu olan hastaların, delesyonu olan hastalarla klinik karşılaştırması UPDRSIII ortalamaları üzerinden yapılacak olursa, tablo 5.7'de görüldüğü gibi, *PINK1* mutasyonu olup *Parkin* amplifikasyonu olan hastaların (n=4) ortalama UPDRSIII değeri 37,5 iken, *Parkin* delesyonu olan hastaların (n=6) ortalama UPDRSIII değeri 38,3'tür. Her iki hasta grubu birbirine benzer oranlara sahiptir. Sebebi hasta sayımızın yeterli olmayışı olabileceği gibi, bu hastaların sahip oldukları diğer mutasyonların kümülatif etkisi sebebiyle klinik olarak tesadüfi yakın değer de olabilir. *Parkin* aşırı üretiminin *PINK1*'de meydana gelen fonksiyon kaybını telafi ettiğini yayınlayan araştırmacılarla MLPA analizi sonuçlarımız uyumlu bulunmuştur (149). Çünkü MLPA problemleriyle taradığımız *PINK1* hastalarından diğer genomik değişiklikler iştirak etmeyen *PINK1* mutasyonlu hastaların UPDRSIII skoru 26,60 bulunmuştur. *PINK1* genomik değişimine ek olarak *Parkin* geni genomik değişime uğramamışsa *PINK1*'in yolu üzerindeki fonksiyon kaybını kompanse edilebilmektedir. (31). Yani eğer *Parkin* geninde amplifikasyon veya delesyon meydana gelmemişse hastalığın şiddetinin azalması gerekmektedir. *Parkin* geni mutasyona uğramamışsa ifadesini arttırarak fonksiyon kaybını düzeltebilmektedir. MLPA analizimize göre *Parkin* geninde fonksiyon kaybı meydana getiren bir genomik değişim, *PINK1* geni mutant bir hastada klinik şiddetini arttırmıştır ve literatürle uyumlu bulunmuştur.

PINK1 geninde, çoğu kinaz domaini etrafına dağılmış birçok mutasyon tanımlanmıştır. *DJ-1* ve *PINK1*'in ilişkisinden dolayı PH'nın patogeneğinde mitokondriyal fonksiyon bozukluğu gelişmesi hipotezi güçlenmiştir (163). MLPA çalışmamızda *DJ-1* geni amplifikasyonu veya delesyonuyla *PINK1* genomik değişimini

birlikte taşıyan 11 hastayı karşılaştırdığımızda tablo 5.7’de görüldüğü gibi, *DJ-1* amplifikasyonu olan *PINK1* hastalarının (n=4) UPDRSIII değeri ortalaması 28 iken, *DJ-1* delesyonu olan *PINK1* hastalarının (n=7) UPDRSIII değeri 39,5 olarak yüksek bulunmuştur. *DJ-1* amplifikasyonu olan *PINK1* mutasyonlu hastaların UPDRSIII değeri, *DJ-1* delesyonu olan *PINK1* mutasyonlu hastalara oranla 1,41 kat daha fazla bulunmuştur. *DJ-1* amplifikasyonlu hastalarda UPDRSIII değerinin daha düşük çıkması, daha iyi klinik tablonun varlığını göstermektedir. Bu durum *DJ-1* amplifikasyonunun koruyucu etkisi sebebiyle olabilir mi sorusunu akla getirmektedir.

Ishihara ve ark. 208 bireyi etkilenmiş, 340 bireyi etkilenmemiş 92 aile, 240 ailesel olmayan PH ve 368 sağlıklı kontrol ile yürüttükleri Tunus çalışmasında klinik teşhis kriteri olarak Hoehn-Yahr ve UPDRSIII kullanmışlardır (66). Çalışmalarında *PINK1* için dizileme, 1116 mikrosatellit marker tarayarak nonparametrik bağlantı analizi ve dozaj analizi için kantitatif RT-PCR tekniği yöntemlerini kullanmışlardır. Ek olarak *Parkin* ve *LRRK2* genlerini de çalışmışlardır. Birçok etkisiz mutasyona ek olarak üç tanesi yeni buldukları olmak üzere dört *PINK1* mutasyonu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar sadece tek ailenin biri etkilenmiş diğeri etkilenmemiş iki bireyinde *LRRK2* G2019S mutasyonu tespit etmişlerdir. *PINK1* geni taramasında ise biri Q456X mutasyonu olan dört nokta mutasyonu incelemeye alınan 92 ailenin 14’ündeki 46 bireyde (%15), hem homozigot Q456X hem de Q129X substitüsyonu ailesel olmayan 240 PH olgusunun altısında (%2,5) tespit edilmiştir. Ailesel PH grubunda *PINK1* homozigot ise başlangıç yaşı (36 ± 12) mutasyon taşıyıcı olmayan gruba göre (57 ± 15) daha küçük olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar sadece dört mutasyonun *PINK1* geni için hastalık etkeni, diğer mutasyonların zararsız polimorfizmler olarak değerlendirildiğini bildirmişlerdir. Bu sebeple birçok *PINK1* varyantının PH etkeni olduğu konusunda henüz ciddi bir kanıt ortaya konmadığını yayınlamışlardır. MLPA çalışmamızda başka mutasyonun eşlik etmediği saf *PINK1* mutasyonu olan hasta oranı %6 iken (n=4) birlikte herhangi bir PH gen mutasyonu eklenen hasta oranı %34 (n=20) bulunmuştur. Tablo 5.7’de görüldüğü gibi tek başına *PINK1* genomik değişikliği bulunan dört hastanın UPDRSIII ortalaması 21,75’tir ve UPDRSIII değerleri 12–27 aralığında bulunmuştur. Herhangi bir gen mutasyonu ile birlikte olan *PINK1* genomik değişikliğine sahip PH olgularının UPDRSIII ortalaması 31,83 iken UPDRSIII değerleri 10–58 aralığındadır.

Herhangi bir gen mutasyonu eklenmiş olan *PINK1* genomik değişimi olan hastaların saf *PINK1* mutasyonu olan PH'larının UPDRSIII puanlarına oranı 1,46 gibi bir sonuç vermektedir. *PINK1* genomik değişimine bir veya birkaç genetik faktör daha eklendiğinde hastalarımızda UPDRSIII skoru yükselmiştir. Bu bulgu literatüre uygun bulunmuştur, çünkü Kumazawa ve ark. tek başına *PINK1* heterozigot mutasyonlarının bir başka predispozan faktör olmadıkça PH gelişimini sağlamadığını bildirmişlerdir (74). Ancak bizim sonuçlarımıza göre saf *PINK1* mutant hastalarda da PH kliniği görülmektedir. Bu ya ilave bir çevresel faktörün tetiklemesiyle hastalık ortaya çıkmaktadır, ya da problemlerimiz bu dört hastada var olan ilave genetik etyolojik faktörü saptayamamıştır. Bu sonuç, daha geniş hasta popülasyonunda araştırma yapılmasının gerekli olduğunu düşündürmüştür.

Kumazawa ve ark. beş tanesi Türk, çoğu Asya kökenli 13 ülkeden 190 sporadik PH olgusu, 201'i ailesel formda olan 391 PH olgusu ve 300 sağlıklı DNA örneğini *PINK1* geni mutasyon analizi için taramışlardır (74). Bu araştırmalarında *PINK1*'e ait önceden yaptıkları çalışmalarla başka genomik delesyonu tespit edilen hastaları tarama dışına almışlardır. qRT-PCR ve doğrudan dizileme yöntemini kullandıkları tekniklerinde tüm ekzonları taramışlardır. Toplam 10 hastada nokta mutasyonu bulmuşlardır. Mutasyonların ekzon 1, 2, 7 ve 8'de birer tane nokta mutasyonu; ekzon 4, 5 ve 6'da ikişer tane nokta mutasyonu şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. Saptanan mutasyonlar, tüm gen boyunca dengeli dağılmış olup bu hastaların beş tanesi ailesel, beş tanesi sporadiktir. Başlangıç yaşı 19 olan ailesel bir Türk kadın hasta da bu hastalar arasındadır. Bu çalışmada *PINK1* mutasyonu taranan beş Türk hastadan birinde *PINK1* mutasyonu (%20) bulunmuştur. Bu Türk hastanın UPDRSIII skoru 22'dir ve bu da bizim bulduğumuz saf *PINK1* mutant hastaların ortalama UPDRSIII değerleri olan 21,75'e çok yakındır. MLPA analiz çalışmamızda *PINK1* genomik değişimi saptanan PH olguları %41 (n=24) gibi şu ana kadar araştırmacılarca bulunmamış çok yüksek bir değerde tespit edilmiştir. Tablo 5.8'de araştırmacıların literatürde saptadıkları frekanslar özetlenmiştir. Tablo 5.7'de görüldüğü gibi başka hiçbir mutasyonun eşlik etmediği saf *PINK1* mutasyonu olan sadece dört hastamız vardır. Bunların değerleri UPDRSIII ortalamaları 21,75 gibi hafif bir klinik seyri yansıtmaktadır.

Tablo 5.7 *PINK1* genomik değişimi saptanan hastalarımızın mutasyon dağılımı.

Protokol	Cinsiyet	Başlangıç	Yaşı	UPDRSIII	SNCA A30P Mut	SNCA WT A30P	SNCA (PARK1-4)	UCH-L1 (PARK5)	PARKIN (PARK2)	DJ-1 (PARK7)	TNFRSF9	PINK1 (PARK6)	GCHI	G2019S (PARK8)	LRRK2 (PARK8)
4736	K	61	73	34			+1+5		+11+12	+1+3+5	+	+8			
4737	E	73	76	18			+1+5			+1+3		-5+8			
4779	K	61	77	42	(+)				+4+11			+6			
4784	K	54	64	42	(+)					-1	-	+3			
4786	E	70	75	32	(+)				-5			+3			
4798	K	59	70	34			+5			-1		+8			
4817	K	64	67	18			+5			+1		+8			
4823	E	59	68	34			+5					+8			+10
4825	E	66	78	29	(+)							+6+8			
4833	E	60	71	42			+5			+1+5		-5+8			
4834	K	50	55	10			+5					+8			
4843	K	61	64	14			+6					-1			
4846	E	51	62	42	(+)		-1-5		+6	-1-7	-	+3+5-8			
4875	E	58	63	24								-6			
4886	K	57	66	32			-1		-5-11	-1-3		-8		(+)	-10
4894	E	57	62	24								+1		?	
4910	K	54	66	32			+1+5		+11		+	+8			+10+15
4924	K	52	63	42	(+)				-9			+1+5-7		(+)	
5184	E	58	63	27								+5			
5371	K	52	56	12								-8			
5394	K	62	71	48			-1-5		-12	-3-5	-	-8			
5506	K	62	69	18			-5		-8-12	-1-3-5	-	-4			
5507	E	40	56	58	(+)				-12	-1-3	-	+1+5-6-7-8			
5522	K	60	64	28			-1					-8	-2-6		
Ortalama		58,4	66,6	30,0											

(+) işareti nokta mutasyonu varlığını, + işareti amplifikasyonu, - işareti delesyonunu göstermektedir. + veya - değerinin önündeki rakam ekzon numarasını ifade etmektedir. Örneğin +5, tablodaki genin ekzon 5 amplifikasyonu olduğunu; -1 tablodaki genin ekzon 1 delesyonu bulunduğunu ifade etmektedir.

Deng ve ark. 62 sağlıklı kontrol bireyi ile 6 EBPH olgusunda *Parkin* ve *PINK1* genlerini intronik bölgeleri de dahil olmak üzere doğrudan dizileme ve kantitatif RT-

PCR yöntemiyle taramışlardır (25). Bu altı EBPH olgusu *SNCA* ve *LRRK2* gen dozaj değişimi olmayan altı aileden çalışmaya alınmış bireyden oluşmuştur. Bu çalışmada sadece bir PH olgusunda bileşik heterozigot (ekzon 3 delesyonu ve ekzon 3-4 delesyonu) genomik değişim saptanmıştır (%16). Bizim çalışmamızda ise sekiz EBPH taranmıştır. EBPH olgularının tartışıldığı bu grupta sadece bir hastada hem *Parkin* hem *PINK1*, *SNCA*, *DJ-1*, *TNFRSF9* mutasyonları saptanmıştır. Bu hasta bölüm 5.1.3'de tartışılmıştır.

Literatürde *PINK1* genine ait amplifikasyona rastlanmamıştır. Ancak yaptığımız MLPA çalışmasında sporadik PH'larımızın %29'unda (n=17) amplifikasyon saptanmıştır. Bu amplifikasyonlar ekzon 1, 3, 5, 6 ve 8'de saptanmış olup ilk defa tarafımızca bulunmuştur. Bulduğumuz amplifikasyonların daha çok ekzon 8'de yoğunlaştığı saptanmıştır. Bu veriler, benzer çalışmalar yapıldığında daha etkin değerlendirilebilecek ve karşılaştırılabilecektir.

Tablo 5.8 PINK1 Geni Literatür Bilgileri

Araştırmacılar	Çalışma Tipi	Populasyon Bölgesi	Sıklığı (%)	Ek Bilgi
Ishihara ve ark. (66)	Sporadik	Tunus	2,50	
Kumazawa ve ark. (74)	Ailesel	Asya	4,26	
	Ailesel	Türk	20,00	1/5 Türk hasta
	Sporadik	Asya	0,53	
Deng ve ark. (25)	Ailesel	Amerika	16,00	
MLPA Çalışmamız	Sporadik	Türk	41,00	
		Türk, EBPH	12,50	
		Türk, GBPH	46,00	

5.1.6. *GCHI* Prob Bölgeleri

Tek gen mutasyonu olarak *GCHI*'in Parkinsonizmin herhangi bir formundan sorumlu olduğunu gösteren bir çalışma mevcut değildir. Sadece Momma ve ark. 2009'da Çin'de ekzon 4 heterozigot c.524 A>G mutasyonu bulunan tek bir erkek hasta yayınlamışlardır. MLPA çalışmamızda *GCHI* geni beş ekzon bölgesine yönelik hazırlanmış proplar ile incelenmiştir. Sadece bir hastamızda ekzon 2 ve ekzon 6'da

delesyon saptanmıştır. Bu hastada *SNCA* ekzon 1'de ve *PINK1* ekzon 8'de birer delesyon da ek olarak bulunmuştur. Literatürde L-Dopa'dan yarar sağlayan distoni hastalarında görülen bu genomik değişim tek başına tespit edilmiş bir delesyon değildir. Sonuç olarak araştırmamızda seçilen hastalar arasında L-Dopa'ya cevap vermesi sebebiyle PH ile ayırıcı tanıya giren Dopa Responsif Distoni probu araştırmaya dahil edilmiş olabilecek hastaları ayırıcı tanıda kullanılmak amacıyla, kitimizde bulunmaktadır. Sadece bir hastada saptanan *GCHI* genomik değişimlerine ek olarak *PINK1* ve *SNCA* delesyonları bu hastaya eşlik etmektedir. Bu da hastamızda saptanan PH kliniğinin sebebinin öncelikli olarak *SNCA* ve *PINK1* mutasyonları olduğunu düşündürmüştür.

5.1.7. *LRRK2* (PARK8) Prob Bölgeleri

PH hastalığının moleküler etyopatogenezinde rol alan genlerden biri de son dönemlerde OD geç başlangıçlı birçok vakadan sorumlu tutulması sebebiyle mercek altına alınan *LRRK2*'dir. *LRRK2* geni kromozom 12q11.2-q13.1 üzerinde PARK8 lokusunda yerleşiktir ve 51 ekzonlu büyük bir gendir. 2.527 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. Şu ana kadar bu gende trunkasyon ve delesyon tipi mutasyonların bulunduğu ve bu mutasyonların da hücre içinde fonksiyon kaybı mekanizmasıyla kendini gösterdiği saptanmıştır. Hastalığın penetransının ilerleyen yaşla birlikte artması araştırmacıların dikkatini çekmektedir. 2008 yılında Peru ve Uruguay'ı içeren bir *LRRK2* çalışmasında Mata ve ark'nın toplam 365 PH olgusu ile (Peru Lima'dan 240, Uruguay Montevideo'dan 125 hasta) yaptıkları çalışmada dizileme yöntemiyle hastaları genotiplemişlerdir (90). Uruguay'lı hastalarda G2019S taşıyıcılığı %4 (n=5), Peru'lu hastalarda ise %0,4 (n=1) bulunmuştur. Tüm hastalar sporadiktir ve ailelerinde PH öyküleri yoktur. Uruguay'lı hasta grubunun %4,0'lük frekansı İspanyol (%2,2-7,6) ve İtalyan (%2,1-2,9) hasta frekansları ile uyumlu olup bu Uruguaylı hastalar buraya Avrupa'dan göç etmişlerdir (49). Mata ve ark.' çalışmalarıyla MLPA analizi oranlarımızın karşılaştırması tablo 5.10'da gösterilmiştir.

Araştırmacılar tarafından İngiltere'nin güney doğusundan olan PH olgularının frekansı Avrupa kökenli olanlarla aynı (%1,6) saptanmıştır (46, 166). Nichols ve ark. 352 farklı gruptan ailenin PH'ndan etkilenmiş 757 bireyinde, 965 hasta olmayan kontrol bireyi ile karşılaştırma yaptıkları restriksiyon enzimi ve doğrudan dizileme ile G2019S mutasyonu taramışlar, hem heterozigot (n=34) hem homozigot (n=1) toplam %5 (n=35) hastada bu mutasyona rastlamışlardır. Kontrol grubunda ise bu mutasyona rastlanmamıştır (98). MLPA analizi oranımız tablo 5.10'da gösterildiği gibi (%12) yüksektir.

2008 yılında Patra ve ark. İspanyol olmayan beyaz ırk Amerika'lı 350 sporadik ve 225 ailesel PH olgusu ve 186 kontrol ile yaptıkları G2019S nokta mutasyonunu dizileme yöntemiyle taradıkları çalışmada G2019S mutasyon frekansını sporadik PH olgularında %0,3 (n=1) bulmuşlardır (114). Hastaların mutasyon dağılımının yaşlarıyla ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. MLPA analizi oranımız tablo 5.10'da gösterildiği gibi (%12) yüksektir ancak bizim hastalarımızın mutasyon dağılımı da yaşla ilişkili değildir. Tablo 5.9'da görüldüğü gibi başlangıç yaşı ortalamamız 53,90 ve hasta başlangıç yaşları 38-66 arasında bulunmuştur.

Diğerlerine oranla daha düşük hasta örneğinde (n=23) tüm *LRRK2* ekzonlarının doğrudan dizileme yöntemiyle tarandığı Paisan-Ruiz ve ark. *DJ-1*, *SNCA* ve *PINK1* mutasyonu olmayan %93'ü Kanada'lı beyaz hasta örneği kullanarak yaptıkları çalışmada da *LRRK2* geni %8 oranında tespit edilmiştir (106). MLPA analizi oranımız tablo 5.10'da gösterildiği gibi (%12) yüksektir. Ancak Paisan-Ruiz ve ark.'nın çalıştığı hasta sayısı az olduğundan belli bir popülasyonu yansıtamayacağı düşünülmüştür.

Lesage ve ark. Kuzey Afrikalı Arap PH ile ekzon 41'i dizileme yöntemiyle yaptıkları, 151 sağlıklı Arap kontrol deneği kullandıkları çalışmada sporadik 49 PH olgusunda %41, ailesel 27 PH olgusunda %37 oranında *LRRK2* G2019S kuzey Afrikalı Arap mutasyonuna rastlamışlardır (76). Bu mutasyon iki Afrikalı sağlıklı kontrol örneğinde de tespit edilmiştir. G2019S mutasyon taşıyıcılarının hepsinin de birbirine yakın hastalık başlangıç yaşına sahip olduğu görülmüştür. MLPA analizi oranımız tablo 5.10'da gösterildiği gibi bu araştırmacılara göre (%12) düşüktür.

Orr-Urtreger ve ark. tarafından yayınlanan bir çalışmada Parkinson hastası olan Aşkenazi Yahudilerinde *LRRK2* G2019S mutasyonu araştırılmıştır (101). Bu araştırma, altı mikrosatellit marker kullanarak G2019S ve birkaç ilave nokta mutasyonunun araştırıldığı bir kohort tip haplotip analizidir. Bu çalışmada 472 yahudi PH olgusu, 1802 kontrol bireyi kullanılmıştır. Sporadik PH olgularının %10,60'ı, ailesel PH olgularının %26'sının G2019S mutasyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Bir başka Aşkenazi Yahudisi çalışması olan ve bu çalışmaya benzer sonuçların elde edildiği Ozelius ve ark.'nın çalışmasında G2019S mutasyon frekansı ailesel PH olanlarda %29,70 iken sporadik PH olanlarda %13,30 bulunmuştur (104). Bu çalışmada 120 Aşkenazi Yahudisi hasta iki SNP ve beş mikrosatellit marker kullanılarak genotip taramasına alınmıştır. Bu hastalarda ömürboyu penetrans iki ayrı yöntemle %31,80 ve %35,20 hesaplanmıştır. Orr-Urtreger'in çalışmasında 100 Türk hastası dahil edilmiş olup ve bunlardan %1'i (n=1) G2019S mutasyon taşıyıcısı olarak tespit edilmiştir. Toft ve ark. *LRRK2* G2019S mutasyonunun yayımlandığı sıklıkta olmadığını iddia etmektedirler (146). Buna karşın Yahudi araştırmacı Orr-Urtreger ise bu mutasyonun Amerika, Asya ve Avrupa'da prevalansının düşük, Kuzey Afrika ve Aşkenazi Yahudilerinde yüksek olmasının bu mutasyonun Ortadoğu merkezli yayıldığını düşündüğünü söylemiştir (101). Yahudi araştırmacının oluşturduğu araştırma grubundaki G2019S mutasyonlu Türk hasta grubu şu ana kadar Türk populasyonu hakkında elimizdeki saptanmış tek veridir. Buna göre araştırmacının Türk olgularından (%1) yüksek, Aşkenazi Yahudisi olgularından %41 düşük oranda hastamız (%12) G2019S mutasyonuna sahiptir.

Toft ve ark. yine Lancet merkezli yayınlarda benimsendiği şekilde *LRRK2* mutasyonunun penetransının 50 yaşında %21 iken, 70 yaşında %81'dir diyerek Kashergus ve ark. yaptığı Avrupa populasyon çalışmasına göndermede bulunmuştur (67). Change ve ark. Güneybatı Avrupa, Kuzey Afrika ve Sefardik Yahudileri ile yaptıkları mikrosatellit ile genotipleme analizinde birbirinden bağımsız gruplarca yapılan araştırmalarda *LRRK2* G2019S mutasyonu olan sporadik hastaların frekansının %1-2 olduğunu, kuzeyden güneye frekansının arttığını (16); Kuzey Avrupa çalışmasında frekansın %2,9 (5); İspanya'nın kuzeyinde %3,4, Katalonya'da %6,4, Portekizde %6 iken (10, 42, 91); Lesage ve ark. Kuzey Afrikada %41 olduğunu

ve kendi buldukları sonuçlarda 3100 sağlıklı kontrol bireyinden ikisinde (%0,06) ve Kuzey Afrikalı (Libya, Tunus, Cezayir, Fas) 597 hastadan 13'ünde (%2,17) ve 361 Sefardik Yahudisinden (Kuzey Afrika ve İspanyol) beşinde (%1,4) G2019S mutasyonu saptandığını bildirmişlerdir (76). MLPA çalışmamızda sağlıklı kontrol bireylerimizde G2019S mutasyonu saptanmamıştır. Ancak bu genin penetransının değişkenliği göz önüne alındığında daha ileri çalışmalarla ve sağlıklı birey sayısı artırıldığında daha farklı sonuçlar alınabilir.

Araştırmacıların bulgularının tersine 2008 yılında Ishihara ve ark. beklentinin dışında olarak Tunus'lu 208 etkilenmiş hastadan sadece %1'inde (n=2) *LRRK2* G2019S mutasyonunu bulduğunu yayınlarken (66), diğer bir araştırmacı grubu yaptıkları mikrosatellit analizi ile kendi hastaları içinde en yüksek mutasyon oranına (%3,3) sahip Fas'lı Berberi toplumu olduğunu bildirmişlerdir (164). Her ikisi de Kuzey Afrika yerleşimine sahip bu popülasyonların bu bölgenin yeniden farklı bir gözle değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmüştür. Zabetian ve ark. G2019S mutasyonun kökeninin tahminen 2250 yıl önce Kuzey Afrika'da ortaya çıktığını, Lesage ve ark. ise buna zıt olarak 725 yıl önce güney Avrupada yaşamış olan atadan gelmekte olduğunu bildirmişlerdir (77, 164). MLPA analizimiz sonucu G2019S saptanan hasta oranımız tablo 5.10'da gösterildiği gibi kuzeydeki araştırmacılardan yüksek, güneydeki araştırmacılardan düşük saptanmıştır. Ancak G2019S mutasyonunun dağılımı coğrafik değişime bağlı olmaktan çok belli ırklara yönelik bir dağılım gösterdiğini düşündürmektedir.

Pimentel ve ark. 31.ekzonu dizileme yöntemiyle inceledikleri 154 Brezilya'lı birbiriyle ilişkisiz sporadik ve familyal PH olgularını taradıkları çalışmalarında 31.ekzonda mutasyon bulamamışlardır (117). Nichols ve ark. ABD'li G2019S mutasyonu olmayan 430 PH'dan kohort yöntemiyle bağlantı analizi yaparak ilişkilendirdikleri 88 multipleks PH olgusunun tüm *LRRK* genlerinin 51 ekzonunu da kromozom 12 genomik contig dizileme ve restriksiyon enzimiyle keserek elektroforezde karşılaştırma yöntemiyle taramışlardır (97). Araştırmacılar 1-24 arası ekzonlarda altı mutasyon bulduklarını bildirmişlerse de hangileri olduğunu açıklamamışlardır. *LRRK2* üzerindeki herhangi bir ekzona ait yeni mutasyona sahip altı

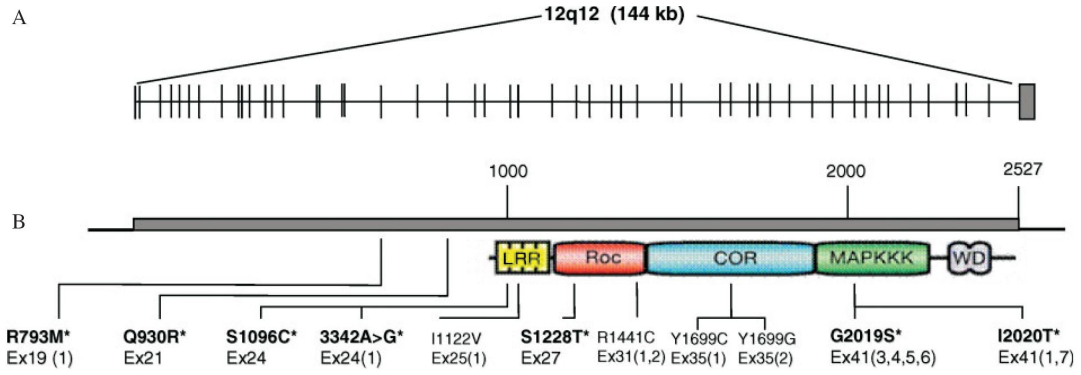
probandın her biri klasik PH bulgularına sahip olup semptom başlangıç yaşı geç olan hastalardır. 70 yaş üstü prevalans %2 veya daha yüksektir. Ancak bu çalışmada heterojen bir grup dağılımı vardır. Dupre ve ark. Fransız-Kanadalı 125 PH olgusu ve 95 kontrol bireyinin 31 ve 41. ekzonunu doğrudan dizileme ve SNP analizi yöntemiyle incelemişler ve herhangi bir genomik değişim bulamamışlardır (34). Spanaki ve arkadaşları 300 sağlıklı kontrol bireyi ve 92'si ailesel 174'ü sporadik 266 PH vakası üzerinde Girit Adası popülasyonu ile sınırlı çalışmalarında, tüm bireyleri G2019S, I2020T (ekzon 40) ve R1441H/C/G (ekzon 31) dizileme, sporadik hastaları ise G2019S ve I2020T mutasyonu açısından RFLP yöntemiyle taramışlardır (136). Sporadik grupta herhangi bir hastada genomik değişim saptanmamıştır. Familial gruptan bir tek bireyde R1441H/C/G (ekzon 31) mutasyonu mevcuttur. Bu araştırmada yaşları 48-74 arasında olan hastalar incelenmiş, Akdenizin güney-doğusunda yer alan bu kapalı toplumun Akdenizin en düşük oranda mutasyona sahip topluluğu olduğu gösterilmiştir. Literatürde G2019S haricinde Spanaki ve ark. Girit popülasyonunda 31. ekzonda saptadıkları hastalık etkeni mutasyon haricinde anlamlı ve hastalık etkisi yaratan bir başka mutasyon saptanmamıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz *LRRK2* ekzon 1, 10 ve 15'de saptanan delesyon, ekzon 10 ve 15'de saptanan amplifikasyonlar literatürden farklı bulunmuştur. Yeni bir bulgu olarak saptanmıştır.

Zabetain ve arkadaşları 586 Japon PH olgusundan bir grup oluşturup, bunların içinden ailesel olanları ve bir veya ikinci derece yakınında PH bulunanları hariç tutarak 317 sporadik PH olgusunun *LRRK2* 41.ekzonunu dizileme yöntemiyle taramışlar ve 453 Avrupa-Amerikalı G2019S taşıyıcısı kontrol grubu ile haplotip analizi yapmak üzere dokuz SNP ve yedi mikrosatellit marker sonuçlarıyla karşılaştırmışlardır (165). G2019S mutasyonu taşıyan tüm PH olguları geç başlangıçlı, L-Dopa cevabı olan, atipik semptomları olmayan hastalardır. Bu çalışmada iki hastada G2019S mutasyonu bulunmuşlardır. Bir hastada da yine 41.ekzonda ait yeni bir mutasyon tespit etmişler, ancak bu mutasyonun etkisiz bir mutasyon olduğunu açıklamışlardır. Papapetropoulos ve ark patolojik olarak doğrulanmış, hepsi ölürken beyin bağışında bulunmuş 130 hasta ve sağlıklı 85 kontrol bireyi kullanarak üç *LRRK2* kinaz domain bölgesine karşılık gelen I2012T, G2019S ve I2020T mutasyonunu doğrudan dizileme yöntemiyle, dondurulmuş beyin piyesi örneklerinden elde ettikleri DNA'ları tarayarak yaptıkları çalışmalarında

G2019S mutasyonunu dört hastada (%3) ve bir kontrol bireyinde tespit etmişlerdir (112). Kontrol bireyi herhangi bir nörodejeneratif bulgu vermeden 68 yaşında miyokard infarktüsü sebebiyle ölen bir olgudur. Araştırmacılar, hem hasta hem de kontrol bireyi örneklerinde I2012T veya I2020T mutasyonlarını tespit etmemişlerdir. MLPA çalışmamızda *LRRK2* geni ekzon 1, 2, 10, 15, 27, 41, 49 ve ekzon 41 G2019S Mutasyonu olmak üzere 8 ekzon bölgesi incelenmiştir. Bu sonuçlara göre *LRRK2* ekzon 1’de iki hastada delesyon; ekzon 10’da bir hastada delesyon, üç hastada amplifikasyon; ekzon 15’de bir hastada delesyon, dört hastada amplifikasyon saptanmıştır. Ancak kitimizde 41. ekzonda yer alan G2019S haricinde diğer nokta mutasyonlarına spesifik prob bulunmadığından taranmamıştır. G2019S mutasyonu açısından Papapetropoulos’un çalışmasına göre yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda 15 (%12) hastamızda *LRRK2* G2019S mutasyonu tespit edilmiştir. Hastalarımızın başlangıç yaş ortalaması 53,90’dır ve başlangıç yaşları 38–66 arasında değişmektedir. Yedi tanesinde G2019S nokta mutasyonu olup, altı tanesi başka *LRRK2* genomik değişimin bulunmadığı saf G2019S mutasyonu olarak saptanmıştır. Ancak bu 15 G2019S mutasyonlu hastadan dördünde *SNCA* A30P heterozigot mutasyonu, bir tanesinde *SNCA* A30P homozigot mutasyonu ek olarak saptanmıştır. Bu hastaların başlangıç yaşı ortalaması 49,40’tır. En genç olan 38, en yaşlı olanı 66 yaşındadır. Bir hastada G2019S mutasyonuna ek olarak *LRRK2* 10.ekzonda bir delesyon, *PINK1*, *DJ-1*, *Parkin* ve *SNCA*’da muhtelif ekzonlarda delesyonları olup bu hasta görece diğerlerine nazaran daha yüksek UPDRSIII değerine (32 puan) sahip bulunmaktadır. Dört hastamızda *LRRK2* 15. ekzonda amplifikasyon, bu gruptan üç hastada ek olarak *LRRK2* 10.ekzonda amplifikasyon bulunmuştur. Bu grupta da başlangıç yaşı ortalaması 53,2’dir ve *LRRK2* 15.ekzon grubundan farklı ortalama bir başlangıç yaşı farkına sahip değildir. *LRRK2* geninde en sık rastlanan bu G2019S mutasyonu, gen düzeyinde 6055G>A dönüşümüne sebep olarak amino asit düzeyinde Glisin-Serin pozisyonel değişikliğine yol açmaktadır. Bu mutasyonun sporadik vakalarda yaklaşık %1, ailesel vakalarda yaklaşık %5 ve sağlıklı kontrol bireylerinde hiç görülmediği bildirilmiştir (155). G2019S mutasyon bölgesi *LRRK2* geni üzerinde mitojenaktif protein kinaz kinaz kinaz (MAPKKK) domaininin hayli korunmuş bir aktivasyon parçasıdır. Bu yüzden burada meydana gelen bir mutasyon, *LRRK2* geninin kinaz aktivitesini doğrudan etkiler. İlginç olarak tipik GBPH bulunan, Alman ailesinde ve Japon Samagihara soyunda *LRRK2* ile

bağlantılandırılmış I2020T, G2019S'e bitişiktir (41, 168). Buna ek olarak I2012T pozisyonunda patojenik yer değiştirme olarak tanımlanan mutasyon da bulunduğu, PH saptanan hastalarda 41. ekzonda bu bölge mutasyonlarının fonksiyonel önemini gündeme getirmiştir (147). Şekil 5.1'de görüldüğü gibi *LRRK2* geninde iki önemli ve korunmuş domain, Roc ve COR'a ek olarak lösinden zengin tekrar bölgesi, WD40 domaini ve bir tirozin kinaz katalitik domain de bu gende önemli bölgeler olarak araştırmacılarca tanımlanmıştır (28). Farrer yaş bağlantılı çalışmalarda *LRRK2* G2019S mutasyon spesifik penetrans sebebiyle bu gen mutasyonunu taşıyanlarda PH geliştirme riskinin 14 kat olduğunu ancak *LRRK2* G2385R taşıyıcılarında bu riskin 2 kata düştüğünü bildirmiştir (39). Bu bize böylesi büyük bir genin G2019S mutasyonunun doğrudan işlevini bozan fonksiyonel ciddi bir kayba sebep olması nedeniyle *LRRK2* proteinin üretime en hassas parçası olduğunu göstermektedir. Zabetain ve ark. G2019S mutasyonunun Avrupa'daki farklı prevalanslarda yayılımı ile iki büyük kohort çalışmasıyla yaklaşık 1200 Çinli PH tarandığı iki büyük yayında hiç mutasyon bulunmamasını bu mutasyonun bölgesel kökeninin Orta-doğu olduğuna bağlamıştır (85, 140). Tablo 5.10'da görüldüğü gibi MLPA bulgularımızla saptanan G2019S mutasyonlu hasta oranımız %12'dir. Tablo 5.9'da görüldüğü gibi başka hiçbir *LRRK2* genomik değişimi olmaksızın sadece G2019S mutasyonu saptanan hasta oranımız %10'dur (n=6). *LRRK2* geninde saptadığımız amplifikasyon ve delesyonları karşılaştırmak amacıyla baktığımız yayınlarda, bağlantı analizi veya SNP ile tarama yapılmış ancak bu bölgelerde herhangi bir genomik değişime rastlanmamıştır. Ancak MLPA çalışmamızda saptadığımız genomik değişimlerin Ekzon 1, 10 ve 15'de amplifikasyon ve delesyonlar olması bu bölgelerde yapılacak çalışmaların *LRRK2* geninin kinaz fonksiyon kaybı patolojisine ışık tutacağını düşündürmüştür. Elbette 51 ekzonlu büyük bir genin sadece sekiz ekzonunun belli bölgelerine ait sonuçları değerlendirmek halen biraz spekülatif kalmakta ise de yapılacak yeni çalışmaların sonuçlarının da katılmasıyla gerçeğe daha yakın olacaktır (166). Araştırmacıların ortak görüşü ekzon 41 de bulunan G2019S mutasyonunun "hot spot" olduğudur. Şimdilik yayınlar bize sadece bu mutasyona yönelik çalışmaların yoğunlukta olduğunu, diğer ekzonlarda yapılacak çalışmalara da ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Ancak mekanik bir yaklaşımla değerlendirmek gerekirse G2019S mutasyonunun genomik

yerleşim yeri bakımından, *LRRK2*'nin tam aktivasyon segmentinde meydana geldiğinden proteinin konformasyonunu değiştirerek kinaz aktivitesini bozmasının, araştırmacıları *LRRK2*'nin diğer ekzonlarına yoğunlaşmaktan uzak tuttuğunu söyleyebiliriz. Schapira, *LRRK2* nin kinaz aktivitesi sebebiyle α -sinükleini fosforillemesinde meydana gelecek aksaklıkların kliniğe yansıtacağını, bu sebeple farmakogenomik çalışmalarda hedef protein olarak düşünülmesi gerektiğini bildirmiştir (125). Araştırmacıların şekil 5.1'de saptadıkları bulgulara göre *LRRK2* geni mutasyonu en sık ve en etkin MAPKKK bölgesinde bulunmaktadır. Buna göre tablo 5.10'da araştırmacıların yoğunlaştıkları ekzon 41 G2019S bölgesiyle ilgili bazı çalışmalarda görüldüğü gibi, bu genomik değişimin etnik ve coğrafik dağılımı Ortadoğu merkezli olup, Avrupa, Asya ve Amerika'ya gidildikçe düştüğü görülmektedir. Kimi araştırmacılara göre güneyde kuzeyden, kimilerine göre Ortadoğu merkezinde çevresinden, kimilerine göre founder etki sebebiyle sadece belli ırklarda yüksek bulunması değişik hipotezlerdir ve halen açıklama beklemektedir. Buna uygun olarak



Şekil 5.1 (A) Ekzon pozisyonları. (B) LRRK domainleri ve mutasyon pozisyonlarının şematik diyagramı: *Kalın yazılar, çalışmalarda bulunmuş mutasyonlar; parantezler, Önceden bulunmuş mutasyonların referansları. (1) Zimprich ve ark. (2004); (2) Paisan-Ruiz ve ark. (2004); (3) Di Fonzo ve ark. (2005); (4) Nichols ve ark. (2005); (5) Gilks ve ark. (2005); (6) Toft ve ark. (2005); (7) Funayama ve ark. (2005). (Berg ve ark.'dan (5))*

Türk-Anadolu populasyonunu içeren çalışmamızda sporadik PH olgularımızın frekansı tarafımızca literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiş, Ortadoğuyla diğer bölgeler arasında köprü olacak orana sahip olduğunu (%12) düşündürmüştür.

Patra ve ark., Japon populusyonunda taranan 586 PH olgusundan sadece 2 tanesi (%0,34) heterozigot G2019S mutasyonu iken Güney Avrupa populusyonunda yüksek saptanmasını (kökeni Kuzey Afrika olan) founder etkiye bağlamıştır (114). MLPA analizi yaptığımız G2019S mutasyon frekansı güney-kuzey arasında köprü gibi duran PH olgularımızın founder etki açısından da incelenmesi halinde ilginç bulgularla karşılaşılabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamız bu araştırmacılara basamak teşkil edebilecektir.

Tablo 5.9 *LRRK2* genomik değişimi saptanan hastalarımızın mutasyon dağılımı.

Protokol	Cinsiyet	Başlangıç	Yaşı	UPDRSIII	SNCA A30P Mut	SNCA WT A30P	SNCA (PARK1-4)	UCH-L1 (PARK5)	PARKIN (PARK2)	DJ-1 (PARK7)	TNFRSF9	PINK1 (PARK6)	GCHI	G2019S (PARK8)	LRRK2 (PARK8)
4745	K	47	50	22					-11						-1
4787	K	38	43	12	(+)		-6							(+)	
4788	E	65	70	32					-12					(+)	
4789	K	52	63	42	(+)									(+)	
4818	K	63	77	38											-1-15
4823	E	59	68	34			+5					+8			+10
4872	E	56	61	24					+9						+15
4886	K	57	66	32			-1		-5-11	-1-3		-8		(+)	-10
4894	E	57	62	24								+1			
4895	E	39	44	22	(+)	(-)					-			(+)	
4910	K	54	66	32			+1+5		+11		+	+8			+10+15
4924	K	52	63	42	(+)				-9			+1+5-7		(+)	
5086	E	54	57	19											+10+15
5087	K	49	52	18					-4+6						+15
5505	E	66	70	21	(+)									(+)	
Ortalama		53,9	60,8	27,6											

(+) işareti nokta mutasyonu varlığını, + işareti amplifikasyonu, - işareti delesyonunu göstermektedir. + veya - değerinin önündeki rakam ekzon numarasını ifade etmektedir. Örneğin +5, tablodaki genin ekzon 5 amplifikasyonu olduğunu; -1 tablodaki genin ekzon 1 delesyonu bulunduğunu ifade etmektedir.

Tablo 5.10 LRRK2 Geni Literatür Bilgileri

Araştırmacılar	Çalışma Tipi	Populasyon Bölgesi	Sıklık (%)	Ek Bilgi
Mata ve ark. (90)	Sporadik	Uruguay	4,00	Ekzon 41 (G2019S)
	Sporadik	Peru	0,40	Ekzon 41 (G2019S)
Gilks ve ark. (46)	Sporadik	Güney-doğu İngiltere	1,60	Ekzon 41 (G2019S)
Nichols ve ark. (98)	Ailesel	Karışık grup	5,00	Ekzon 41 (G2019S)
Patra ve ark. (114)	Ailesel	Beyaz Irk Amerikalı	3,50	Ekzon 41 (G2019S)
	Sporadik		0,03	Ekzon 41 (G2019S)
Zabetian ve ark. (166)	Ailesel	Avrupa Kökenli	1,60	Ekzon 41 (G2019S)
Paisan-Ruiz ve ark. (106)	Ailesel	Kanadalı Beyaz	8,00	Ekzon 41 (G2019S)
Lesage ve ark. (76)	Ailesel	Kuzey Afrika	37,00	Ekzon 41 (G2019S)
	Sporadik		41,00	Ekzon 41 (G2019S)
	Sporadik	(Libya, Tunus, Cezair, Fas)	2,10	Ekzon 41 (G2019S)
	Sporadik	Sefardik Yahudisi	1,40	Ekzon 41 (G2019S)
Or-Utregger ve ark. (101)	Ailesel	Aşkenazi Yahudisi	26,00	Ekzon 41 (G2019S)
	Sporadik		10,60	Ekzon 41 (G2019S)
	Sporadik/Ailesel	Türk	1,00	Ekzon 41 (G2019S)
Ozelius ve ark. (104)	Ailesel	Aşkenazi Yahudi	29,70	Ekzon 41 (G2019S)
	Sporadik		13,30	Ekzon 41 (G2019S)
Change ve ark. (16)	Sporadik	Güneybatı Avrupa Kuzey Afrika Sefardik Yahudi	1,00	Kuzeyden güneye frekans artmaktadır. Ekzon 41 (G2019S)
			-2,00	
Berg ve ark. (5)	Ailesel/Sporadik	Kuzey Avrupa	2,90	Ekzon 41 (G2019S)
Mata ve ark. (91)	Sporadik	Kuzey İspanya	3,40	Ekzon 41 (G2019S)
Gaig ve ark. (42)	Ailesel	Katalonya	3,40	Ekzon 41 (G2019S)
	Sporadik		6,40	
Bras ve ark. (11)	Sporadik	Portekiz	6,00	Ekzon 41 (G2019S)
Ishihara ve ark. (66)	Ailesel	Tunus	1,00	Ekzon 41 (G2019S)
Zabetian ve ark. (164)	Ailesel	Faslı Berberi	3,30	Ekzon 41 (G2019S)
Pimentel ve ark. (117)	Ailesel/Sporadik	Brezilya	0	Ekzon 31
Nichols ve ark. (97)	Ailesel/Sporadik	Amerika (70 yaş üstü)	2,00	Ekzon 41 (G2019S)
Dupre ve ark. (34)	Ailesel/Sporadik	Fransız-Kanadalı	0	Ekzon 41 ve 31
Spanaki ve ark. (136)	Ailesel	Girit	1,00	Ekzon 31
	Sporadik		0	
Zabetain ve ark. (165)	Sporadik	Japon	0	Ekzon 41
Papapetropoulos ve ark. (112)	Sporadik	Amerikan (Karışık)	3,00	Ekzon 41 (G2019S)
Lu ve ark. (85)	Sporadik	Tayvan	0	Ekzon 41 (G2019S)
Tan ve ark. (140)	Sporadik	Çin	0,10	Ekzon 41
MLPA Çalışmamız	Sporadik	Türk	12,00	Ekzon 41 (G2019S)
		EBPH	25,00	
		GBPH	10,00	

5.1.8. Literatürde Ailesel Parkinson Hastalığı MLPA Analizi Çalışmaları

Son yıllarda Chung ve ark 94 EBPH olgusu, Pankratz ve ark. 64 PH aileden 93 bireyle, Scarciolla ve ark. 16 EBPH olgusu, Hakansson ve ark. 63 EBPH olgusu ile olmak üzere dört ayrı ailesel MLPA analizi çalışması yapılmıştır (19, 54, 111, 124). Bu çalışmalar tablo 5.11'de özetlenmiştir.

Chung ve ark 94 EBPH olgusu ile yaptığı MLPA analizi çalışmasında %5 (n=3) Parkinson hastasında *Parkin* mutasyonu saptanmıştır. Hastalardan birincisinde ekzon 2 ve 7'de delesyon, ikincisinde ekzon 2 ve 11'de delesyon, üçüncüsünde ekzon 3 ve 7'de delesyon tespit edilmiş ve hastalar bileşik heterozigot olarak değerlendirilmiştir. Chung ve ark.'ları bu çalışmalarında *PINK1* mutasyonu da saptanmadığını bildirmişlerdir. MLPA çalışmamızda EBPH grubumuzda (n=8) *Parkin* mutasyonu saptanan hastaların oranı %37,5 (n=3) saptanmış olup Chung ve ark. göre oldukça yüksek saptanmıştır. Hastalarımızdan birincisi, başlangıç yaşı 40, UPDRSIII skoru 58 olarak en yüksek olan *Parkin* ekzon 12 delesyonu saptanan bir hastadır. Ancak yukarıda anlatıldığı şekilde bu hastada ek olarak *SNCA* A30P mutasyonu, *DJ-1* ekzon 1 ve 3 delesyonu, *TNFRSF9* delesyonu, *PINK1* ekzon 6, 7, 8 delesyonu ve ekzon 1 ve 5 amplifikasyonu saptanmıştır. Hastanın ayrıntılı analizi yukarıda anlatılmıştır. İkinci hastada *Parkin* ekzon 11 delesyonu ve *LRRK2* ekzon 1 delesyonu; üçüncü hastada *Parkin* ekzon 4 delesyonu, ekzon 6 amplifikasyonu ve *LRRK2* ekzon 15 amplifikasyonu saptanmıştır. Chung ve ark. tarafından Koreli EBPH populasyonu ile yapılan MLPA çalışmasına göre iki MLPA EBPH olgusunda daha genomik değişim saptanmıştır. Bu EBPH olgularından birinde homozigot *SNCA* A30P, *LRRK* G2019S nokta mutasyonu ve *SNCA* ekzon 6 delesyonu saptanmıştır. İkincisinde ise *SNCA* A30P heterozigot nokta mutasyonu ve *LRRK2* G2019S nokta mutasyonları bulunmuştur. Bu iki hastanın başlangıç yaşları 38 ve 39'dir. UPDRSIII skorları ise 12 ve 22 dir ve EBPH olgularının ortalama değeri olan 30'dan daha düşüktür. MLPA çalışmamız Chung ve ark. çalışmalarıyla uyumsuz bulunmuştur.

Pankratz ve ark. yaptıkları ailesel *DJ-1* geni taramalarında MLPA analizinde sadece P051 kitini kullandıklarından ekzon 2 ve 4 hariç tüm geni taramışlardır. Sadece *DJ-1* geniyle ilgili bulgularını yayınlayan araştırmacılar herhangi bir dozaj değişimi saptamamışlar ancak hastalarında %5 nokta mutasyonu tespit etmişlerdir. MLPA çalışmamızda hastalarımızda *DJ-1* genine ait ekzon 2 ve 4'de herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Analiz çalışmamızda P052B kiti de kullanıldığından, olgularımız ailesel PH olguları olmadığından, Pankratz ve ark. ABD'li PH olgularını taramış olduğundan ve sadece *DJ-1* belli genleri taradığından birbirleriyle karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Ancak 58 olgumuzun *DJ-1* geninde ekzon 1 üzerinde genomik değişikliği dikkat çekmiştir. 93 ailesel Amerikalı bireyde sadece %5 rastlanan *DJ-1* genomik değişimi, 58 PH olgumuzdan %38'inde (n=22) saptanmıştır. Olgular tartışmamızın *DJ-1* altbaşlığında tartışılmıştır.

Scarciolla ve ark. tarafından 16 EBPH olgusu, 13 pozitif kontrol mutasyonlu birey, 31 sağlıklı 60 yaş üzeri birey MLPA tekniğiyle taranmıştır. Araştırmacılar dizileme ile tespit ettikleri LRRK G2019S mutasyonlu PH olgularını MLPA analiz çalışmalarından çıkarmışlardır. Ayrıca pozitif kontrol olgularını MLPA analizi uyguladıkları çalışmalarında tekrar saptamışlardır. Çalışmanın güvenilirliğine azami dikkat ettikleri araştırmalarında üç *Parkin* genomik değişimi saptamışlardır. Bunlardan birincisi ekzon 2 ve 3 delesyonu, ikincisi ekzon 3,5 ve 6 delesyonu, üçüncüsü homozigot ekzon 3 delesyonu olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrudan dizileme ve kantitatif RT-PCR ile doğrulanmıştır. Araştırmacılar sadece Salsa MLPA P051 kitini kullanmışlar ve *DJ-1* geni ekzon 2 ve ekzon 4'ü taramamışlardır. Sonuç olarak *Parkin* genomik değişimi saptadıkları hasta oranını %19 (n=3) olarak saptamışlardır. Öncelikle MLPA çalışmamız hem GBPH hem de EBPH olgularını içermektedir. Scarciolla ve ark.'na göre literatürde izole *DJ-1* ekzon 2 ve ekzon 4 değişimi saptanmamıştır. MLPA analizi yaptığımız EBPH olgularımızın 3 tanesinde *Parkin*, 1 tanesinde *DJ-1* gen dozaj değişikliği saptanmıştır. *DJ-1* genomik değişimi olan hastamızda *Parkin* mutasyonu da mevcuttur. Aynı ayrı değerlendirdiğimizde Scarciolla ve ark.'nın oranlarından yüksek %38 *Parkin*, %12,5 *DJ-1* mutasyonlu EBPH olgumuz saptanmıştır. Bu literatürde saptanan %15-18 *Parkin* oranından, %1-5 *DJ-1* oranından yüksektir. Ancak *Parkin*

mutasyonu için Hattori ve ark.'nın EBPH saptanan Japon vakaların %66'lık oranından ise düşük saptanmıştır.

İsveç'te 16'sı ailesel olan 63 EBPH olgusunun tarandığı, Hakansson ve ark. MLPA ve doğrudan dizi analizi yöntemiyle yapılan çalışmada *Parkin* geni ekzon 3'te bir tane heterozigot yanlış anlamalı mutasyon bulmuşlardır (54). Hakansson ve ark. çalışmalarında ekzon 7 de iki de-novo mutasyon da saptamışlardır ancak meydana gelen amino asit değişiminin protein fonksiyonunu değiştirip değiştirmediğini analiz ettikleri PolyPhen yöntemiyle sınıdıklarında tespit ettikleri mutasyonun *Parkin* protein fonksiyonunu bozmadığını tespit etmişlerdir. Saptanan bu iki genomik değişim sessiz mutasyondur. Salsa MLPA P051-P051 kitinin her ikisi ile analiz yapan Hakansson ve ark. çalıştığımız MLPA kitinin bir önceki versiyonu ile çalışmışlardır. Bizim çalıştığımız MLPA kitimiz *Parkin* genine ait ekzon 3 ve 12'ye spesifik iki prob daha ilave edilerek güncelleşmiş versiyondur. Daha geniş *Parkin* geni tarayan yeni versiyon MLPA kitiyle yaptığımız çalışma sonucu EBPH olan *Parkin* gen mutasyonu saptadığımız olgularımız %37,5 (n=3) iken, Hakansson ve ark. çalışmalarında saptadıkları %4 (n=3) oranında İsveç popülasyonunda saptanmıştır. Hakansson ve ark. İsveçli EBPH olgularında başka genomik değişim saptamamışlardır. Bu sonuca göre yaptığımız MLPA analizi ile Hakansson ve ark.'nın MLPA analiz çalışmalarını kıyaslarsak EBPH olgularımız arasında iki hastamız daha genomik değişime sahiptir. Bu iki hastadan birinde heterozigot *SNCA* A30P nokta mutasyonu, *SNCA* ekzon 6 delesyonu ve *LRRK2* G2019S nokta mutasyonu, diğerinde *SNCA* A30P homozigot nokta mutasyonu ve *LRRK2* G2019S nokta mutasyonu saptanmıştır. Bu hastalar yukarıda detaylı incelenmiştir. Özetle MLPA çalışmamızda, Hakansson ve ark. İsveç'li EBPH olgularında saptadıklarından daha yüksek oranda genomik değişim saptamamız, genlerin coğrafik dağılım farkına, ırk farkına, *Parkin* 3, 12. ekzonda mutasyon bulunmasına rağmen eski versiyon olduğu için 3 ve 12. ekzonuna bakan proba spesifik alanda mutasyonu saptayamayan MLPA kitine bağlı olabilir. Hakansson ve ark. çalışmalarında elde ettikleri önemli bir veri de MLPA analizi ile elde ettikleri sonuçlarla, doğrudan dizileme ile elde ettikleri verilerin birebir uyumlu olduğunu göstermiştir.

Şu ana kadar sporadik PH olguları ile MLPA analizi çalışması yapılmamıştır. Salsa MLPA P051 ve P052 kiti şu ana kadar saptanmış olan ailesel PH genlerini taramak üzere tasarlanmıştır. Oysa Sporadik PH olgularını taramak üzere yapılmış olan MLPA analizimiz hem sporadik hem de ailesel olgularda görülmekte olan PH'ndan sorumlu genleri taramak üzere ilk defa çalışılmıştır. Literatürde saptanan olguların hem sporadik hem de ailesel olguları kesiştirdiği hipotezinden hareketle yapılan çalışmamız Sporadik PH genlerinin MLPA ile saptandığı ilk araştırmadır. Sonuç olarak MLPA analizi yöntemi ile hastalarını tarayan bilim adamlarının bulgularına göre, asya populasyonunda seyrek rastlanan PH genlerine ait mutasyonların MLPA analizi çalışmamız sonucunda EBPH'mızda oldukça yüksek saptanmasının coğrafik farklılığa, EBPH olgularımızın azlığı sebebiyle tesadüfen hasta olgularımızın sayıca yüksek rastgelmesine veya Türk populasyonunda *Parkin* mutasyonunun founder etki sebebiyle yüksek olmasına bağlayabiliriz.

MLPA çalışmamız yeni bir bakış açısı getirmiştir. Büyük genomik değişimler komşu genleri de bu değişimlere dahil edebilme ihtimaline sahiptir. Bu tür geniş bir genomik sahayı kapsayan büyük değişimlerde saf tek gen mutasyonunun beklenen kliniğine ilave olarak komşu gendeki genomik değişimin etkisine bağlı yeni bir klinik tablo ortaya çıkabilmektedir. Kişiler arası genomik varyasyonlar da buna ilave olduğunda genotip-fenotip korelasyonu kurmakta zorluklar yaşanabilmektedir. Çok sık rastlanmayan, OR kalıtılan hastalık etkenlerinin araştırılmasında hasta populasyonunun seçilmesi aşamasında birbirine benzer genoma sahip olduklarından, aile çalışmaları önemli yer tutmaktadır. Ailesel çalışma sonuçlarının daha doğru değerlendirilmesi ve

Tablo 5.11. Ailesel PH MLPA Analiz Çalışmaları Literatür Bilgileri

Araştırmacılar	Çalışma Tipi	Populasyon Bölgesi	Sıklığı (%)	Ek Bilgi
Chung ve ark. (19)	Ailesel	Kore	5,00 Parkin	
Pankratz ve ark. (111)	Ailesel	ABD'li Beyaz	5,00 <i>DJ-1</i>	Ekzon 2-7 arası
Scarciolla ve ark. (124)	Ailesel	İtalyan	19,00 Parkin	
Hakansson ve ark. (54)	Sporadik	İsveç	4,00	Ekzon 3

ilave bir veya iki değişkenin daha karşılaştırma kriterlerine eklenmesini sağlaması bakımından sporadik hasta çalışmaları, PH hakkında edindiğimiz bilgilere genlerin etkileşimi açısından çok daha yeni bilgileri kazandırabilmektedir. Çalışmamızda ailesel genomik değişiklik verilerinden sporadik hastalarımızı değerlendirmede yararlanma imkanı bulduk.

Hastaların “hatırlama fenomeni” diye bilinen kendi ailelerinden yalnızca hastaneye yatırılan hastaları hatırlama, bu sebeple de diğer hasta aile bireylerini hatırlamayarak ailesel oldukları halde sporadik olarak saptanmalarına sebep olan yanlış anamnez verme olasılıkları her zaman klinisyenlerin araştırma defterlerinin bir yaprağını işgal etmektedir. Mesela literatürde *Parkin* mutasyonu saptanan sporadik EBPH’ları oranından (%18) MLPA analizi bakılan hastalarımızın (%27) yüksek saptanması, “hatırlama fenomeni” sebebiyle aslında ailesel olduğu halde sporadik görünen bir grup hastanın oranı değiştirmesi olabilir. MLPA çalışmamızla elde edilen veriler klinik için yeni bir geri-bildirim olacak, hasta grubu yeniden gözden geçirilerek artık moleküler bilgisine sahip olunan hastalarla daha ayrıntılı çalışmalar yapılabilecektir. Çalışmamız ayrıca klinisyene ipucu verme özelliğindedir. Normalde OR kalıtılan bir hastalık geninin sporadik olarak başka coğrafik bölgelerden, başka etnik topluluklardan ciddi farklı frekansta çıkması bu hastalar hakkında teyid çalışmalarını gerektirmektedir. Araştırmamıza ek olarak yapılacak teyid çalışmaları her gen için ayrı ayrı ve her hasta için yeniden sorgulamaların yapılacağı uzun bir zaman diliminde tamamlanabilecek gibi görünmektedir. Çalışmamız teyidi gereken yeni araştırmalar için öncülük yapmıştır. Önemli bulgular saptanmıştır. Bu bulgular literatürde hiç saptanmayan yeni bilgileri literatüre kazandırmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırma grubunu oluşturan 58 sporadik PH olgusundan alınan kan örneklerinden elde edilen DNA ile her bir olgu *SNCA*, *UCH-L1*, *Parkin*, *DJ-1*, *PINK1*, *GCH1* ve *LRRK2* genlerine ait 67 ayrı bölgeden MLPA analizi tekniğiyle incelenmiştir. MLPA aynı hastaya daha geniş bir pencereden bakma imkanı sunmuştur.

MLPA analizi yaptığımız hastaların hiçbirisinde triplikasyon saptanmamıştır.

SNCA geni altı ekzonu, A30P yabancı ve A30P mutasyon bölgeleri incelenmiş olup biri homozigot olmak üzere 15 hastada A30P nokta mutasyonu saptanmış, ayrıca bu gene ait ekzon 5, hotspot düşündürecek şekilde genomik değişikliklerin yoğunlaştığı bölge olarak tespit edilmiştir. *SNCA* geni üzerinde aynı hastada hem delesyon hem de duplikasyonun birlikte bulunmadığı gözlenmiştir. Çalışmamızda tespit edilen *SNCA* genomik değişimleri literatüre göre yüksek oranda saptanmıştır.

UCH-L1 geninde dört ekzon bölgesi incelenmiş, prob bölgelerinde herhangi bir amplifikasyon veya delesyona rastlanmamıştır. Sadece birkaç ailede rastlanan bu genomik değişime çalışmamızda da rastlanmaması literatüre uyumlu bulunmuştur.

Parkin geni, 12 ekzon bölgesi incelenmiş, en sık değişim ekzon 5 ve 12'de görülen delesyonlar, ekzon 9 ve 11 de duplikasyonlar olmak üzere ekzon 11 ve 12'de yoğunlaşmış genomik değişimler saptanmıştır. Sporadik Türk Parkinson hastalarından oluşan grubumuzda literatürden farklı genomik değişimler saptanmıştır. *Parkin* geninin promotor bölgesinde bulunan *PACRG* geninde herhangi bir genomik değişim bulunmamıştır.

DJ-1 geni incelendiğinde, genomik değişim bölgelerinin literatürle uyumlu olarak ekzon 1, 3 ve 5'te olması, ancak hastaların çoğunun beklenmedik şekilde GBPH'na sahip olması ve literatürde rastlanmadığı halde amplifikasyonlar saptanması açıklama

gerektirmektedir. Mutasyonlarında nöroprotektif fonksiyon kaybı geliştiren bu genin hastaları çevresel etkilere açık hale getirdiği düşünülmüştür.

PINK1 geninde duplikasyon ilk defa MLPA çalışmamızda %29 olarak saptanmıştır. Literatürde benzer bulguya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda *LRRK2* geninde saptanan delesyon ve amplifikasyonlar literatürden farklı bulunmuştur, en sık rastlanan *LRRK2* mutasyonu G2019S ise kuzey ile güney arasında köprü oluşturacak şekilde literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Çok değişken penetransa sahip, bölgenin mi yoksa ırkın mı daha etkin rol oynadığı netleşmemiş olan G2019S mutasyonu araştırmacılarca founder etki açısından da değerlendirilmeye çalışılmaktadır. Sporadik Türk Parkinson hastalarına ait bu çalışma araştırmacılara yeni bir bilgi sunmuştur. Hasta sayısı arttırılarak yapılacak çalışmalarla daha sıhhatli bilgilere ulaşılabilecektir.

MLPA analiz çalışmamız sporadik PH grubu ile literatürde bir ilk olma özelliğine sahiptir. MLPA tarama sonuçlarımız Türk popülasyonu ile ilgili çok az literatür bilgisine veritabanı oluşturarak sonraki çalışmalara basamak teşkil etmiştir.

PACRG, *TNFRSF9*, *UCH-L1* ve *GCHI* genleri incelenerek PH hakkında ek bilgilere kavuşmamızı sağlayan testimiz, sorumlu genlerle birlikte her biri hastalık yolağında bulunan şüpheli genler hakkında da yorum yapabilmemizi sağlayacak verileri bize sunmuştur.

Sonuç olarak, PH epidemiyolojisinde tarama testi olmaması, kesin tanı için postmortem muayene gerektirmesi, uzun prelinik dönem varlığı, ileri yaş hastalığı olması ve bildirim zorunluluğu olmaması sebebiyle bugüne kadar yapılmış MLPA analizi dışı bilgilerin kısıtlılığı dikkat çekicidir. PCR ve kapiller elektroforez cihazı kullanılarak yapılan MLPA tekniğinin tarama amaçlı kullanılabilir ucuzluk, hızlılık ve kolaylığa sahip olması sebebiyle PH araştırmalarına hız getireceğini düşündürmüştür.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Abbas, N., Lucking, C.B., Ricard, S., Durr, A., Bonifati, V., De, M.G., Bouley, S., Vaughan, J.R., Gasser, T., Marconi, R., Broussolle, E., Brefel-Courbon, C., Harhangi, B.S., Oostra, B.A., Fabrizio, E., Bohme, G.A., Pradier, L., Wood, N.W., Filla, A., Meco, G., Deneffe, P., Agid, Y., ve Brice, A., 1999, A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease, 8, 4, 567-574 p.
2. Ahn, T.B., Kim, S.Y., Kim, J.Y., Park, S.S., Lee, D.S., Min, H.J., Kim, Y.K., Kim, S.E., Kim, J.M., Kim, H.J., Cho, J., ve Jeon, B.S., 1-1-2008, Alpha-Synuclein gene duplication is present in sporadic Parkinson disease, 70, 1, 43-49 p.
3. Arialdi M., 21-8-2007, "National Final Statistics Reports" Deaths:Final Data for 2004, USA Government, Vol 55, No 19,
4. Bardien, S., Keyser, R., Yako, Y., Lombard, D., ve Carr, J., 2009, Molecular analysis of the parkin gene in South African patients diagnosed with Parkinson's disease, 15, 2, 116-121 p.
5. Berg, D., Schweitzer, K., Leitner, P., Zimprich, A., Lichtner, P., Belcredi, P., Brussel, T., Schulte, C., Maass, S., ve Nagele, T., 2005, Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease*, 128, Pt 12, 3000-3011 p.
6. Beyer, K., Domingo-Sabat, M., Lao, J.I., Carrato, C., Ferrer, I., ve Ariza, A., 2008, Identification and characterization of a new alpha-synuclein isoform and its role in Lewy body diseases, 9, 1, 15-23 p.
7. Bonifati, V., Breedveld, G.J., Squitieri, F., Vanacore, N., Brustenghi, P., Harhangi, B.S., Montagna, P., Cannella, M., Fabbrini, G., Rizzu, P., van Duijn, C.M., Oostra, B.A., Meco, G., ve Heutink, P., 2002, Localization of autosomal recessive early-onset parkinsonism to chromosome 1p36 (PARK7) in an independent dataset, 51, 2, 253-256 p.
8. Bonifati, V., Oostra, B.A., ve Heutink, P., 2004, Linking DJ-1 to neurodegeneration offers novel insights for understanding the pathogenesis of Parkinson's disease, 82, 3, 163-174 p.
9. Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., van Dongen, J.W., Vanacore, N., van Swieten, J.C., Brice, A., Meco, G., van Duijn, C.M., Oostra, B.A., ve Heutink, P., 10-1-2003, Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism, 299, 5604, 256-259 p.
10. Bras, J., Guerreiro, R., Ribeiro, M., Morgadinho, A., Januario, C., Dias, M., Calado, A., Semedo, C., Oliveira, C., Hardy, J., ve Singleton, A., 2008, Analysis of Parkinson disease patients from Portugal for mutations in SNCA, PRKN, PINK1 and LRRK2, 8, 1-
11. Bras, J.M., Guerreiro, R.J., Ribeiro, M.H., Januario, C., Morgadinho, A., Oliveira, C.R., Cunha, L., Hardy, J., ve Singleton, A., 2005, G2019S dardarin substitution is a common cause of Parkinson's disease in a Portuguese cohort, 20, 12, 1653-1655 p.
12. Brighina, L., Frigerio, R., Schneider, N.K., Lesnick, T.G., de, A.M., Cunningham, J.M., Farrer, M.J., Lincoln, S.J., Checkoway, H., Rocca, W.A., ve Maraganore, D.M., 15-4-2008, Alpha-synuclein, pesticides, and Parkinson disease: a case-control study, 70, 16 Pt 2, 1461-1469 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

13. Brueggemann, A.B., Mitterer, M., Lanthaler, A.J., Djarmati, A., Hagenah, J., Wieggers, K., Winkler, S., Pawlack, H., Lohnau, T., Pramstaller, P.P., Klein, C., ve Lohmann, K., 2009, Frequency of heterozygous Parkin mutations in healthy subjects: Need for careful prospective follow-up examination of mutation carriers, Elsevier, 10, 1016, 1-5 p.
14. Brueggemann, N., Odin, P., Gruenewald, A., Tadic, V., Hagenah, J., Seidel, G., Lohmann, K., Klein, C., ve Djarmati, A., 14-10-2008, Re: Alpha-synuclein gene duplication is present in sporadic Parkinson disease, 71, 16, 1294-
15. Çakmur R, 2003, Parkinson hastalığının epidemiyolojisi ve klinik özellikleri, Özel Sayı, 15-17 s.
16. Change, N., Mercier, G., ve Lucotte, G., 2008, Genetic screening of the G2019S mutation of the LRRK2 gene in Southwest European, North African, and Sephardic Jewish subjects, 12, 3, 333-339 p.
17. Chartier-Harlin, M.C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M., ve Destee, A., 25-9-2004, Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease, 364, 9440, 1167-1169 p.
18. Chen, R., Gosavi, N.S., Langston, J.W., ve Chan, P., 2003, Parkin mutations are rare in patients with young-onset parkinsonism in a US population, 9, 5, 309-312 p.
19. Chung, E.J., Ki, C.S., Lee, W.Y., Kim, I.S., ve Kim, J.Y., 2006, Clinical features and gene analysis in Korean patients with early-onset Parkinson disease, 63, 8, 1170-1174 p.
20. Clarimon, J., Johnson, J., Dogu, O., Horta, W., Khan, N., Lees, A.J., Hardy, J., ve Singleton, A., 5-2-2005, Defining the ends of Parkin exon 4 deletions in two different families with Parkinson's disease, 133B, 1, 120-123 p.
21. Clark, L.N., Afridi, S., Karlins, E., Wang, Y., Mejia-Santana, H., Harris, J., Louis, E.D., Cote, L.J., Andrews, H., Fahn, S., Waters, C., Ford, B., Frucht, S., Ottman, R., ve Marder, K., 2006, Case-control study of the parkin gene in early-onset Parkinson disease, 63, 4, 548-552 p.
22. Clark, L.N., Afridi, S., Mejia-Santana, H., Harris, J., Louis, E.D., Cote, L.J., Andrews, H., Singleton, A., Wavrant De-Vrieze, F., Hardy, J., Mayeux, R., Fahn, S., Waters, C., Ford, B., Frucht, S., Ottman, R., ve Marder, K., 2004, Analysis of an early-onset Parkinson's disease cohort for DJ-1 mutations, 19, 7, 796-800 p.
23. da Costa, C.A., 2007, DJ-1: a newcomer in Parkinson's disease pathology, 7, 7, 650-657 p.
24. Davidzon, G., Greene, P., Mancuso, M., Klos, K.J., Ahlskog, J.E., Hirano, M., ve DiMauro, S., 2006, Early-onset familial parkinsonism due to POLG mutations, 59, 5, 859-862 p.
25. Deng, H., Le, W., Shahed, J., Xie, W., ve Jankovic, J., 3-1-2008, Mutation analysis of the parkin and PINK1 genes in American Caucasian early-onset Parkinson disease families, 430, 1, 18-22 p.
26. Deng, H., Le, W.D., Xie, W.J., Pan, T.H., Zhang, X., ve Jankovic, J., 15-7-2005, Genetic analysis of parkin co-regulated gene (PACRG) in patients with early-onset parkinsonism, 382, 3, 297-299 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

27. DeStefano, A.L., Lew, M.F., Golbe, L.I., Mark, M.H., Lazzarini, A.M., Guttman, M., Montgomery, E., Waters, C.H., Singer, C., Watts, R.L., Currie, L.J., Wooten, G.F., Maher, N.E., Wilk, J.B., Sullivan, K.M., Slater, K.M., Saint-Hilaire, M.H., Feldman, R.G., Suchowersky, O., Lafontaine, A.L., Labelle, N., Growdon, J.H., Vieregge, P., Pramstaller, P.P., Klein, C., Hubble, J.P., Reider, C.R., Stacy, M., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., ve Myers, R.H., 2002, PARK3 influences age at onset in Parkinson disease: a genome scan in the GenePD study, 70, 5, 1089-1095 p.
28. Di, F.A., Rohe, C.F., Ferreira, J., Chien, H.F., Vacca, L., Stocchi, F., Guedes, L., Fabrizio, E., Manfredi, M., Vanacore, N., Goldwurm, S., Breedveld, G., Sampaio, C., Meco, G., Barbosa, E., Oostra, B.A., ve Bonifati, V., 29-1-2005, A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease, 365, 9457, 412-415 p.
29. Di, N.M., Shah, I.M., ve Stewart, D.A., 2007, Molecular pathways and genetic aspects of Parkinson's disease: from bench to bedside, 7, 12, 1693-1729 p.
30. Djarmati, A., Hedrich, K., Svetel, M., Schafer, N., Juric, V., Vukosavic, S., Hering, R., Riess, O., Romac, S., Klein, C., ve Kostic, V., 2004, Detection of Parkin (PARK2) and DJ1 (PARK7) mutations in early-onset Parkinson disease: Parkin mutation frequency depends on ethnic origin of patients, 23, 5, 525-
31. Dodson, M.W. ve Guo, M., 2007, Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease, 17, 3, 331-337 p.
32. Dogu, O., 2008, Temel Bilimler: Epidemiyoloji ve Etiyoloji Hakkında Öğrettikleri, 1, 4, 1-5 s.
33. Dogu, O., Johnson, J., Hernandez, D., Hanson, M., Hardy, J., Apaydin, H., Ozekmekci, S., Sevim, S., Gwinn-Hardy, K., ve Singleton, A., 2004, A consanguineous Turkish family with early-onset Parkinson's disease and an exon 4 parkin deletion, 19, 7, 812-816 p.
34. Dupre, N., Riviere, J.B., Myers, R.H., Provencher, P., Pourcher, E., Emond, F., ve Rouleau, G.A., 2007, LRRK2 is not a significant cause of Parkinson's disease in French-Canadians, 34, 3, 333-335 p.
35. Duvasion RC, 1937, History of Parkinsonizm, Pharmacology and Therapeutics, 32, 1-17 p.
36. Elibol, B. ve ATAÇ, F.B., 2003, Parkinson Hastalığında Klinik Gelişmeler, 1, 3, 173-182 s.
37. Eriksen, J.L., Dawson, T.M., Dickson, D.W., ve Petrucelli, L., 30-10-2003, Caught in the act: alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease, 40, 3, 453-456 p.
38. Farrer, M.J., 2006, Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects, 7, 4, 306-318 p.
39. Farrer, M.J., 30-10-2007, Lrrk2 in the limelight!, 69, 18, 1732-1733 p.
40. Fearnley, J.M. ve Lees, A.J., 1991, Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity, 114 (Pt 5), 2283-2301 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

41. Funayama, M., Hasegawa, K., Ohta, E., Kawashima, N., Komiyama, M., Kowa, H., Tsuji, S., ve Obata, F., 2005, An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family, 57, 6, 918-921 p.
42. Gaig, C., Ezquerra, M., Marti, M.J., Munoz, E., Valldeoriola, F., ve Tolosa, E., 2006, LRRK2 mutations in Spanish patients with Parkinson disease: frequency, clinical features, and incomplete penetrance, 63, 3, 377-382 p.
43. Galvez-Jimenez N, 2005, Parkinson Hastaly?ynyn Tedaisi için Bilimsel Temeller, Taylor & Francis Group, 2nd Ed,
44. Gasser, T., Ebadi M ve Pfeiffer RF, 2005, Parkin and Its Role in Parkinson's Disease, CRC Press, NY, 13, 129-137 p.
45. Gerlach, M., Riederer, P., ve Youdim, M.B., 1996, Molecular mechanisms for neurodegeneration. Synergism between reactive oxygen species, calcium, and excitotoxic amino acids, 69, 177-194 p.
46. Gilks, W.P., Abou-Sleiman, P.M., Gandhi, S., Jain, S., Singleton, A., Lees, A.J., Shaw, K., Bhatia, K.P., Bonifati, V., Quinn, N.P., Lynch, J., Healy, D.G., Holton, J.L., Revesz, T., ve Wood, N.W., 29-1-2005, A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease, 365, 9457, 415-416 p.
47. Gilroy J, 2000, "Movement Disorders" Basic Neurology , The McGraw-Hill Companies, USA, 3th Ed, Chapter 6, 149-197 p.
48. Gispert, S., Trenkwalder, C., Mota-Vieira, L., Kostic, V., ve Auburger, G., 2005, Failure to find alpha-synuclein gene dosage changes in 190 patients with familial Parkinson disease, 62, 1, 96-98 p.
49. Goldwurm, S., Di, F.A., Simons, E.J., Rohe, C.F., Zini, M., Canesi, M., Tesei, S., Zecchinelli, A., Antonini, A., Mariani, C., Meucci, N., Sacilotto, G., Sironi, F., Salani, G., Ferreira, J., Chien, H.F., Fabrizio, E., Vanacore, N., Dalla, L.A., Stocchi, F., Diroma, C., Lamberti, P., Sampaio, C., Meco, G., Barbosa, E., Bertoli-Avella, A.M., Breedveld, G.J., Oostra, B.A., Pezzoli, G., ve Bonifati, V., 2005, The G6055A (G2019S) mutation in LRRK2 is frequent in both early and late onset Parkinson's disease and originates from a common ancestor, 42, 11, e65-
50. Gong, B. ve Leznik, E., 2007, The role of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 in neurodegenerative disorders, 20, 6, 365-370 p.
51. Grimes, D.A., Han, F., Panisset, M., Racacho, L., Xiao, F., Zou, R., Westaff, K., ve Bulman, D.E., 2006, Translated mutation in the Nurr1 gene as a cause for Parkinson's disease, 21, 7, 906-909 p.
52. Guyton A.C., Gökhan N. ve Çavuşoğlu H., 1987, (Çeviri) Beyin Sapı ve Bazal Gangliyonların Motor Fonksiyonları, Merck Yayıncılık, İstanbul. 888-905 s.
53. Hague, S., Rogaeva, E., Hernandez, D., Gulick, C., Singleton, A., Hanson, M., Johnson, J., Weiser, R., Gallardo, M., Ravina, B., Gwinn-Hardy, K., Crawley, A., George-Hyslop, P.H., Lang, A.E., Heutink, P., Bonifati, V., Hardy, J., ve Singleton, A., 2003, Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation, 54, 2, 271-274 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

54. Hakansson, A., Belin, A.C., Stiller, C., Sydow, O., Johnels, B., Olson, L., Holmberg, B., ve Nissbrandt, H., 2008, Investigation of genes related to familial forms of Parkinson's disease--with focus on the Parkin gene, 14, 6, 520-522 p.
55. Halliwell, B., 2006, Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?, 97, 6, 1634-1658 p.
56. Hattori, N., Kitada, T., Matsumine, H., Asakawa, S., Yamamura, Y., Yoshino, H., Kobayashi, T., Yokochi, M., Wang, M., Yoritaka, A., Kondo, T., Kuzuhara, S., Nakamura, S., Shimizu, N., ve Mizuno, Y., 1998, Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals, 44, 6, 935-941 p.
57. Hattori, N. ve Sato, S., 2007, Animal models of Parkinson's disease: similarities and differences between the disease and models, 27, 5, 479-483 p.
58. Hedrich, K., Eskelson, C., Wilmot, B., Marder, K., Harris, J., Garrels, J., Meija-Santana, H., Vieregge, P., Jacobs, H., Bressman, S.B., Lang, A.E., Kann, M., Abbruzzese, G., Martinelli, P., Schwinger, E., Ozelius, L.J., Pramstaller, P.P., Klein, C., ve Kramer, P., 2004, Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and case studies, 19, 10, 1146-1157 p.
59. Hering, R., Strauss, K.M., Tao, X., Bauer, A., Voitalla, D., Mietz, E.M., Petrovic, S., Bauer, P., Schaible, W., Muller, T., Schols, L., Klein, C., Berg, D., Meyer, P.T., Schulz, J.B., Wollnik, B., Tong, L., Kruger, R., ve Riess, O., 2004, Novel homozygous p.E64D mutation in DJ1 in early onset Parkinson disease (PARK7), 24, 4, 321-329 p.
60. Hicks, A.A., Petursson, H., Jonsson, T., Stefansson, H., Johannsdottir, H.S., Sainz, J., Frigge, M.L., Kong, A., Gulcher, J.R., Stefansson, K., ve Sveinbjornsdottir, S., 2002, A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease, 52, 5, 549-555 p.
61. Hughes, A.J., Daniel, S.E., Kilford, L., ve Lees, A.J., 1992, Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases, 55, 3, 181-184 p.
62. Ichinose, H., Ohye, T., Matsuda, Y., Hori, T., Blau, N., Burlina, A., Rouse, B., Matalon, R., Fujita, K., ve Nagatsu, T., 28-4-1995, Characterization of mouse and human GTP cyclohydrolase I genes. Mutations in patients with GTP cyclohydrolase I deficiency, 270, 17, 10062-10071 p.
63. Ichinose, H., Ohye, T., Takahashi, E., Seki, N., Hori, T., Segawa, M., Nomura, Y., Endo, K., Tanaka, H., Tsuji, S., ve ., 1994, Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene, 8, 3, 236-242 p.
64. Ikeuchi, T., Kakita, A., Shiga, A., Kasuga, K., Kaneko, H., Tan, C.F., Idezuka, J., Wakabayashi, K., Onodera, O., Iwatsubo, T., Nishizawa, M., Takahashi, H., ve Ishikawa, A., 2008, Patients homozygous and heterozygous for SNCA duplication in a family with parkinsonism and dementia, 65, 4, 514-519 p.
65. Inagaki, H., Ohye, T., Suzuki, T., Segawa, M., Nomura, Y., Nagatsu, T., ve Ichinose, H., 14-7-1999, Decrease in GTP cyclohydrolase I gene expression caused by inactivation of one allele in hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation, 260, 3, 747-751 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

66. Ishihara-Paul, L., Hulihan, M.M., Kachergus, J., Upmanyu, R., Warren, L., Amouri, R., Elango, R., Prinjha, R.K., Soto, A., Kefi, M., Zouari, M., Sassi, S.B., Yahmed, S.B., El Euch-Fayeche, G., Matthews, P.M., Middleton, L.T., Gibson, R.A., Hentati, F., ve Farrer, M.J., 16-9-2008, PINK1 mutations and parkinsonism, 71, 12, 896-902 p.
67. Kachergus, J., Mata, I.F., Hulihan, M., Taylor, J.P., Lincoln, S., Aasly, J., Gibson, J.M., Ross, O.A., Lynch, T., Wiley, J., Payami, H., Nutt, J., Maraganore, D.M., Czyzewski, K., Styczynska, M., Wszolek, Z.K., Farrer, M.J., ve Toft, M., 2005, Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations, 76, 4, 672-680 p.
68. Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., ve Shimizu, N., 9-4-1998, Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism, 392, 6676, 605-608 p.
69. Klein, C., Djarmati, A., Hedrich, K., Schafer, N., Scaglione, C., Marchese, R., Kock, N., Schule, B., Hiller, A., Lohnau, T., Winkler, S., Wieggers, K., Hering, R., Bauer, P., Riess, O., Abbruzzese, G., Martinelli, P., ve Pramstaller, P.P., 2005, PINK1, Parkin, and DJ-1 mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism, 13, 9, 1086-1093 p.
70. Kontopoulos, E., Parvin, J.D., ve Feany, M.B., 15-10-2006, Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity, 15, 20, 3012-3023 p.
71. Korell M ve Tanner C.M, Ebadi M ve Pfeiffer RF, 2005, Epidemiology of Parkinson's Disease: An Overview, CRC Press, NY, 5, 39-50 p.
72. Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schols, L., ve Riess, O., 1998, Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease, 18, 2, 106-108 p.
73. Kruger, R., Vieira-Saecker, A.M., Kuhn, W., Berg, D., Muller, T., Kuhl, N., Fuchs, G.A., Storch, A., Hungs, M., Woitalla, D., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schols, L., ve Riess, O., 1999, Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined alpha-synuclein/apolipoprotein E genotype, 45, 5, 611-617 p.
74. Kumazawa, R., Tomiyama, H., Li, Y., Imamichi, Y., Funayama, M., Yoshino, H., Yokochi, F., Fukusako, T., Takehisa, Y., Kashihara, K., Kondo, T., Elibol, B., Bostantjopoulou, S., Toda, T., Takahashi, H., Yoshii, F., Mizuno, Y., ve Hattori, N., 2008, Mutation analysis of the PINK1 gene in 391 patients with Parkinson disease, 65, 6, 802-808 p.
75. Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P.J., Wilkinson, K.D., ve Polymeropoulos, M.H., 1-10-1998, The ubiquitin pathway in Parkinson's disease, 395, 6701, 451-452 p.
76. Lesage, S., Durr, A., ve Brice, A., 2006, [LRRK2 is a major gene in North African parkinsonism], 22, 5, 470-471 p.
77. Lesage, S., Leutenegger, A.L., Ibanez, P., Janin, S., Lohmann, E., Durr, A., ve Brice, A., 2005, LRRK2 haplotype analyses in European and North African families with Parkinson disease: a common founder for the G2019S mutation dating from the 13th century, 77, 2, 330-332 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

78. Lesage, S., Magali, P., Lohmann, E., Lacomblez, L., Teive, H., Janin, S., Cousin, P.Y., Durr, A., ve Brice, A., 2007, Deletion of the parkin and PACRG gene promoter in early-onset parkinsonism, 28, 1, 27-32 p.
79. Lim, K.L., Dawson, V.L., ve Dawson, T.M., 2002, The genetics of Parkinson's disease, 2, 5, 439-446 p.
80. Lim, K.L. ve Tan, J.M., 2007, Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease, 8 Suppl 1, S13-
81. Litvan, I., Bhatia, K.P., Burn, D.J., Goetz, C.G., Lang, A.E., McKeith, I., Quinn, N., Sethi, K.D., Shults, C., ve Wenning, G.K., 2003, Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders, 18, 5, 467-486 p.
82. Lockhart, P.J., Lincoln, S., Hulihan, M., Kachergus, J., Wilkes, K., Bisceglia, G., Mash, D.C., ve Farrer, M.J., 2004, DJ-1 mutations are a rare cause of recessively inherited early onset parkinsonism mediated by loss of protein function, 41, 3, e22-
83. Louis, E.D., Marder, K., Cote, L., Tang, M., ve Mayeux, R., 1997, Mortality from Parkinson disease, 54, 3, 260-264 p.
84. Lowe, J., McDermott, H., Landon, M., Mayer, R.J., ve Wilkinson, K.D., 1990, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases, 161, 2, 153-160 p.
85. Lu, C.S., Simons, E.J., Wu-Chou, Y.H., Fonzo, A.D., Chang, H.C., Chen, R.S., Weng, Y.H., Rohe, C.F., Breedveld, G.J., Hattori, N., Gasser, T., Oostra, B.A., ve Bonifati, V., 2005, The LRRK2 I2012T, G2019S, and I2020T mutations are rare in Taiwanese patients with sporadic Parkinson's disease, 11, 8, 521-522 p.
86. Manyam, B.V., 1990, Paralysis agitans and levodopa in "Ayurveda": ancient Indian medical treatise, 5, 1, 47-48 p.
87. Marek, K., Jennings, D., Tamagnan, G., ve Seibyl, J., 2008, Biomarkers for Parkinson's disease: tools to assess Parkinson's disease onset and progression, 64 Suppl 2, S111-S121 p.
88. Marongiu, R., Brancati, F., Antonini, A., Ialongo, T., Ceccarini, C., Scarciolla, O., Capalbo, A., Benti, R., Pezzoli, G., Dallapiccola, B., Goldwurm, S., ve Valente, E.M., 2007, Whole gene deletion and splicing mutations expand the PINK1 genotypic spectrum, 28, 1, 98-
89. Marx, F.P., Holzmann, C., Strauss, K.M., Li, L., Eberhardt, O., Gerhardt, E., Cookson, M.R., Hernandez, D., Farrer, M.J., Kachergus, J., Engelender, S., Ross, C.A., Berger, K., Schols, L., Schulz, J.B., Riess, O., ve Kruger, R., 1-6-2003, Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease, 12, 11, 1223-1231 p.
90. Mata, I.F., Cosentino, C., Marca, V., Torres, L., Mazzetti, P., Ortega, O., Raggio, V., Aljanati, R., Buzo, R., Yearout, D., Dieguez, E., ve Zabetian, C.P., 1-11-2008, LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease from Peru and Uruguay,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

91. Mata, I.F., Ross, O.A., Kachergus, J., Huerta, C., Ribacoba, R., Moris, G., Blazquez, M., Guisasola, L.M., Salvador, C., Martinez, C., Farrer, M., ve Alvarez, V., 2006, LRRK2 mutations are a common cause of Parkinson's disease in Spain, 13, 4, 391-394 p.
92. Mellick, G.D., Siebert, G.A., Funayama, M., Buchanan, D.D., Li, Y., Imamichi, Y., Yoshino, H., Silburn, P.A., ve Hattori, N., 2009, Screening PARK genes for mutations in early-onset Parkinson's disease patients from Queensland, Australia, 15, 2, 105-109 p.
93. Moore, D.J., Zhang, L., Troncoso, J., Lee, M.K., Hattori, N., Mizuno, Y., Dawson, T.M., ve Dawson, V.L., 1-1-2005, Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress, 14, 1, 71-84 p.
94. Mori, H., Kondo, T., Yokochi, M., Matsumine, H., Nakagawa-Hattori, Y., Miyake, T., Suda, K., ve Mizuno, Y., 1998, Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q, 51, 3, 890-892 p.
95. Nakaso, K., Adachi, Y., Yasui, K., Sakuma, K., ve Nakashima, K., 29-5-2006, Detection of compound heterozygous deletions in the parkin gene of fibroblasts in patients with autosomal recessive hereditary parkinsonism (PARK2), 400, 1-2, 44-47 p.
96. Nicholl, D.J., Vaughan, J.R., Khan, N.L., Ho, S.L., Aldous, D.E., Lincoln, S., Farrer, M., Gayton, J.D., Davis, M.B., Piccini, P., Daniel, S.E., Lennox, G.G., Brooks, D.J., Williams, A.C., ve Wood, N.W., 2002, Two large British kindreds with familial Parkinson's disease: a clinicopathological and genetic study, 125, Pt 1, 44-57 p.
97. Nichols, W.C., Elsaesser, V.E., Pankratz, N., Pauciulo, M.W., Marek, D.K., Halter, C.A., Rudolph, A., Shults, C.W., ve Foroud, T., 30-10-2007, LRRK2 mutation analysis in Parkinson disease families with evidence of linkage to PARK8, 69, 18, 1737-1744 p.
98. Nichols, W.C., Pankratz, N., Hernandez, D., Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Halter, C.A., Michaels, V.E., Reed, T., Rudolph, A., Shults, C.W., Singleton, A., ve Foroud, T., 29-1-2005, Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease, 365, 9457, 410-412 p.
99. Nishioka, K., Hayashi, S., Farrer, M.J., Singleton, A.B., Yoshino, H., Imai, H., Kitami, T., Sato, K., Kuroda, R., Tomiyama, H., Mizoguchi, K., Murata, M., Toda, T., Imoto, I., Inazawa, J., Mizuno, Y., ve Hattori, N., 2006, Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease, 59, 2, 298-309 p.
100. Okubadejo, N., Britton, A., Crews, C., Akinyemi, R., Hardy, J., Singleton, A., ve Bras, J., 2008, Analysis of Nigerians with apparently sporadic Parkinson disease for mutations in LRRK2, PRKN and ATXN3, 3, 10, e3421-
101. Orr-Urtreger, A., Shifrin, C., Rozovski, U., Rosner, S., Bercovich, D., Gurevich, T., Yagev-More, H., Bar-Shira, A., ve Giladi, N., 16-10-2007, The LRRK2 G2019S mutation in Ashkenazi Jews with Parkinson disease: is there a gender effect?, 69, 16, 1595-1602 p.
102. Ozansoy M ve Başak AN, 2004, Parkinson hastalığının genetiği ve nörodejenerasyonun moleküler biyolojisi, 7, 2, 109-120 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

103. Ozansoy M ve Başak AN, 2006, Parkinson Hastalığında Programlanmış Hücre Ölümü, 9, 1, 54-61 s.
104. Ozelius, L.J., Senthil, G., Saunders-Pullman, R., Ohmann, E., Deligtisch, A., Tagliati, M., Hunt, A.L., Klein, C., Henick, B., Hailpern, S.M., Lipton, R.B., Soto-Valencia, J., Risch, N., ve Bressman, S.B., 26-1-2006, LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews, 354, 4, 424-425 p.
105. Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simon, J., van der Brug, M., Lopez de, M.A., Aparicio, S., Gil, A.M., Khan, N., Johnson, J., Martinez, J.R., Nicholl, D., Carrera, I.M., Pena, A.S., de, S.R., Lees, A., Marti-Masso, J.F., Perez-Tur, J., Wood, N.W., ve Singleton, A.B., 18-11-2004, Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease, 44, 4, 595-600 p.
106. Paisan-Ruiz, C., Lang, A.E., Kawarai, T., Sato, C., Salehi-Rad, S., Fisman, G.K., Al-Khairallah, T., St George-Hyslop, P., Singleton, A., ve Rogaeva, E., 13-9-2005, LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study, 65, 5, 696-700 p.
107. Pal, P.K. ve Wzsolek, Z.K., Ebadi M ve Pfeiffer RF, 2005, Heredofamilial Parkinsonism, CRC Press, NY, 14, 139-158 p.
108. Pankratz, N. ve Foroud, T., Ebadi M ve Pfeiffer RF, 2005, Other Mutations: Their Role in Parkinson's Disease, CRC Press, NY, 15, 159-169 p.
109. Pankratz, N., Nichols, W.C., Uniacke, S.K., Halter, C., Murrell, J., Rudolph, A., Shults, C.W., Conneally, P.M., ve Foroud, T., 15-10-2003, Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families, 12, 20, 2599-2608 p.
110. Pankratz, N., Nichols, W.C., Uniacke, S.K., Halter, C., Rudolph, A., Shults, C., Conneally, P.M., ve Foroud, T., 2003, Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37, 72, 4, 1053-1057 p.
111. Pankratz, N., Pauciulo, M.W., Elsaesser, V.E., Marek, D.K., Halter, C.A., Wojcieszek, J., Rudolph, A., Shults, C.W., Foroud, T., ve Nichols, W.C., 20-11-2006, Mutations in DJ-1 are rare in familial Parkinson disease, 408, 3, 209-213 p.
112. Papapetropoulos, S., Singer, C., Ross, O.A., Toft, M., Johnson, J.L., Farrer, M.J., ve Mash, D.C., 2006, Clinical heterogeneity of the LRRK2 G2019S mutation, 63, 9, 1242-1246 p.
113. Passarge E. ve Wirth J., Lüleci G., Sakızlı M., ve Alper Ö., 2000, (Çeviri) Mitokondride, genetik olarak denetlenen enerji iletim işlemleri, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul. 116-117 p.
114. Patra, B., Parsian, A.J., Racette, B.A., Zhao, J.H., Perlmutter, J.S., ve Parsian, A., 26-8-2008, LRRK2 gene G2019S mutation and SNPs [haplotypes] in subtypes of Parkinson's disease,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

115. Periquet, M., Lucking, C., Vaughan, J., Bonifati, V., Durr, A., De, M.G., Horstink, M., Farrer, M., Illarioshkin, S.N., Pollak, P., Borg, M., Brefel-Courbon, C., Deneffe, P., Meco, G., Gasser, T., Breteler, M.M., Wood, N., Agid, Y., ve Brice, A., 2001, Origin of the mutations in the parkin gene in Europe: exon rearrangements are independent recurrent events, whereas point mutations may result from Founder effects, 68, 3, 617-626 p.
116. Pienaar, I.S., Daniels, W.M., ve Gotz, J., 2008, Neuroproteomics as a promising tool in Parkinson's disease research, 115, 10, 1413-1430 p.
117. Pimentel, M.M., Moura, K.C., Abdalla, C.B., Pereira, J.S., de Rosso, A.L., Nicaretta, D.H., Campos, M., Jr., de Almeida, R.M., dos Santos, J.M., Bastos, I.C., Mendes, M.F., Maultasch, H., Costa, F.H., Werneck, A.L., ve Santos-Reboucas, C.B., 5-3-2008, A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil, 433, 1, 17-21 p.
118. Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di, I.G., Golbe, L.I., ve Nussbaum, R.L., 27-6-1997, Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, 276, 5321, 2045-2047 p.
119. Prestel, J., Sharma, M., Leitner, P., Zimprich, A., Vaughan, J.R., Durr, A., Bonifati, V., De, M.G., Hanagasi, H.A., Farrer, M., Hofer, A., Asmus, F., Volpe, G., Meco, G., Brice, A., Wood, N.W., Muller-Myhsok, B., ve Gasser, T., 2005, PARK11 is not linked with Parkinson's disease in European families, 13, 2, 193-197 p.
120. Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L.P., Goebel, I., Mubaidin, A.F., Wriekat, A.L., Roeper, J., Al-Din, A., Hillmer, A.M., Karsak, M., Liss, B., Woods, C.G., Behrens, M.L., ve Kubisch, C., 2006, Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase, 38, 10, 1184-1191 p.
121. Ross, O.A., Braithwaite, A.T., Skipper, L.M., Kachergus, J., Hulihan, M.M., Middleton, F.A., Nishioka, K., Fuchs, J., Gasser, T., Maraganore, D.M., Adler, C.H., Larvor, L., Chartier-Harlin, M.C., Nilsson, C., Langston, J.W., Gwinn, K., Hattori, N., ve Farrer, M.J., 2008, Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism, 63, 6, 743-750 p.
122. Sasco, A.J. ve Paffenbarger, R.S., Jr., 1985, Measles infection and Parkinson's disease, 122, 6, 1017-1031 p.
123. Sasco, A.J., Paffenbarger, R.S., Jr., Gendre, I., ve Wing, A.L., 1992, The role of physical exercise in the occurrence of Parkinson's disease, 49, 4, 360-365 p.
124. Scarciolla, O., Brancati, F., Valente, E.M., Ferraris, A., De Angelis, M.V., Valbonesi, S., Garavaglia, B., Uncini, A., Palka, G., Stuppia, L., ve Dallapiccola, B., 15-11-2007, Multiplex ligation-dependent probe amplification assay for simultaneous detection of Parkinson's disease gene rearrangements, 22, 15, 2274-2278 p.
125. Schapira, A.H., 2006, The importance of LRRK2 mutations in Parkinson disease, 63, 9, 1225-1228 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

126. Schapira, A.H., 2007, Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease, 14, 7, 1261-1266 p.
127. Schapira, A.H., 2008, Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease, 7, 1, 97-109 p.
128. Schlitter, A.M., Kurz, M., Larsen, J.P., Voitalla, D., Muller, T., Epplen, J.T., ve Dekomien, G., 2006, Parkin gene variations in late-onset Parkinson's disease: comparison between Norwegian and German cohorts, 113, 1, 9-13 p.
129. Schoenberg, B.S., 1987, Descriptive epidemiology of Parkinson's disease: disease distribution and hypothesis formulation, 45, 277-283 p.
130. Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwiijnenburg, D., Diepvens, F., ve Pals, G., 15-6-2002, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, 30, 12, e57-
131. Schroeder, C., Walter, M., Berg, D., Leitner, P., Bauer, P., Kohl, Z., Winkler, J., Riess, O., ve Bonin, M., 2008, High-throughput homogeneous mass cleave assay technology for the diagnosis of autosomal recessive Parkinson's disease, 10, 3, 217-224 p.
132. Shadrina, M.I., Semenova, E.V., Slominsky, P.A., Bagyeva, G.H., Illarioshkin, S.N., Ivanova-Smolenskaia, I.I., ve Limborska, S.A., 2007, Effective quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the parkin gene (PARK2) exon 1-12 dosage, 8, 6-
133. Sharma, M., Mueller, J.C., Zimprich, A., Lichtner, P., Hofer, A., Leitner, P., Maass, S., Berg, D., Durr, A., Bonifati, V., De, M.G., Oostra, B., Brice, A., Wood, N.W., Muller-Myhsok, B., ve Gasser, T., 2006, The sepiapterin reductase gene region reveals association in the PARK3 locus: analysis of familial and sporadic Parkinson's disease in European populations, 43, 7, 557-562 p.
134. Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M.R., Muentner, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., ve Gwinn-Hardy, K., 31-10-2003, Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease, 302, 5646, 841-
135. Slater, H.R., Bruno, D.L., Ren, H., Pertile, M., Schouten, J.P., ve Choo, K.H., 2003, Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA), 40, 12, 907-912 p.
136. Spanaki, C., Latsoudis, H., ve Plaitakis, A., 24-10-2006, LRRK2 mutations on Crete: R1441H associated with PD evolving to PSP, 67, 8, 1518-1519 p.
137. Stacy, M., 1999, Managing late complications of Parkinson's disease, 83, 2, 469-81, vii p.
138. Strauss, K.M., Martins, L.M., Plun-Favreau, H., Marx, F.P., Kautzmann, S., Berg, D., Gasser, T., Wszolek, Z., Muller, T., Bornemann, A., Wolburg, H., Downward, J., Riess, O., Schulz, J.B., ve Kruger, R., 1-8-2005, Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease, 14, 15, 2099-2111 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

139. Sun, M., Latourelle, J.C., Wooten, G.F., Lew, M.F., Klein, C., Shill, H.A., Golbe, L.I., Mark, M.H., Racette, B.A., Perlmutter, J.S., Parsian, A., Guttman, M., Nicholson, G., Xu, G., Wilk, J.B., Saint-Hilaire, M.H., DeStefano, A.L., Prakash, R., Williamson, S., Suchowersky, O., Labelle, N., Growdon, J.H., Singer, C., Watts, R.L., Goldwurm, S., Pezzoli, G., Baker, K.B., Pramstaller, P.P., Burn, D.J., Chinnery, P.F., Sherman, S., Vieregge, P., Litvan, I., Gillis, T., MacDonald, M.E., Myers, R.H., ve Gusella, J.F., 2006, Influence of heterozygosity for parkin mutation on onset age in familial Parkinson disease: the GenePD study, 63, 6, 826-832 p.
140. Tan, E.K., Shen, H., Tan, L.C., Farrer, M., Yew, K., Chua, E., Jamora, R.D., Puvan, K., Puong, K.Y., Zhao, Y., Pavanni, R., Wong, M.C., Yih, Y., Skipper, L., ve Liu, J.J., 26-8-2005, The G2019S LRRK2 mutation is uncommon in an Asian cohort of Parkinson's disease patients, 384, 3, 327-329 p.
141. Tan, E.K. ve Skipper, L.M., 2007, Pathogenic mutations in Parkinson disease, 28, 7, 641-653 p.
142. Tan, E.K., Tan, C., Zhao, Y., Yew, K., Shen, H., Chandran, V.R., Teoh, M.L., Yih, Y., Pavanni, R., ve Wong, M.C., 26-8-2004, Genetic analysis of DJ-1 in a cohort Parkinson's disease patients of different ethnicity, 367, 1, 109-112 p.
143. Tanaka, Y., Engelender, S., Igarashi, S., Rao, R.K., Wanner, T., Tanzi, R.E., Sawa, A., Dawson, L., Dawson, T.M., ve Ross, C.A., 15-4-2001, Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis, 10, 9, 919-926 p.
144. Tang, B., Xiong, H., Sun, P., Zhang, Y., Wang, D., Hu, Z., Zhu, Z., Ma, H., Pan, Q., Xia, J.H., Xia, K., ve Zhang, Z., 1-6-2006, Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease, 15, 11, 1816-1825 p.
145. Taylor, J.M., Song, Y.J., Huang, Y., Farrer, M.J., Delatycki, M.B., Halliday, G.M., ve Lockhart, P.J., 2007, Parkin Co-Regulated Gene (PACRG) is regulated by the ubiquitin-proteasomal system and is present in the pathological features of Parkinsonian diseases, 27, 2, 238-247 p.
146. Toft, M., Mata, I.F., Kachergus, J.M., Ross, O.A., ve Farrer, M.J., 2-4-2005, LRRK2 mutations and Parkinsonism, 365, 9466, 1229-1230 p.
147. Tomiyama, H., Li, Y., Funayama, M., Hasegawa, K., Yoshino, H., Kubo, S., Sato, K., Hattori, T., Lu, C.S., Inzelberg, R., Djaldetti, R., Melamed, E., Amouri, R., Gouider-Khouja, N., Hentati, F., Hatano, Y., Wang, M., Imamichi, Y., Mizoguchi, K., Miyajima, H., Obata, F., Toda, T., Farrer, M.J., Mizuno, Y., ve Hattori, N., 2006, Clinicogenetic study of mutations in LRRK2 exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries, 21, 8, 1102-1108 p.
148. Torun Ş, Uysal M, Gücüyener D, ve Özdemir G, 1995, Parkinson's Disease in Eskisehir, Turkey, 2, Suppl-1, 44-45 s.
149. Um, J.W., Stichel-Gunkel, C., Lubbert, H., Lee, G., ve Chung, K.C., 8-1-2009, Molecular interaction between parkin and PINK1 in mammalian neuronal cells,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

150. Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del, T.D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W.P., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Dallapiccola, B., Auburger, G., ve Wood, N.W., 21-5-2004, Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1, 304, 5674, 1158-1160 p.
151. Valente, E.M., Salvi, S., Ialongo, T., Marongiu, R., Elia, A.E., Caputo, V., Romito, L., Albanese, A., Dallapiccola, B., ve Bentivoglio, A.R., 2004, PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism, 56, 3, 336-341 p.
152. van Duijn, C.M., Dekker, M.C., Bonifati, V., Galjaard, R.J., Houwing-Duistermaat, J.J., Snijders, P.J., Testers, L., Breedveld, G.J., Horstink, M., Sandkuijl, L.A., van Swieten, J.C., Oostra, B.A., ve Heutink, P., 2001, Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36, 69, 3, 629-634 p.
153. Vila, M. ve Przedborski, S., 2004, Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease, 10 Suppl, S58-S62 p.
154. Vilarino-Guell, C., Soto, A.I., Lincoln, S.J., Yahmed, S.B., Kefi, M., Heckman, M.G., Hulihan, M.M., Chai, H., Diehl, N.N., Amouri, R., Rajput, A., Mash, D.C., Dickson, D.W., Middleton, L.T., Gibson, R.A., Hentati, F., ve Farrer, M.J., 9-12-2008, ATP13A2 variability in Parkinson disease,
155. Vitale, C., Ciotti, P., Gulli, R., Bellone, E., Scaglione, C., Abbruzzese, G., Martinelli, P., Barone, P., ve Mandich, P., 2009, Common mutations in the LRRK2 exon 41 are not responsible for essential tremor in Italian patients, 15, 2, 162-163 p.
156. Weber, G.F., 1994, The pathophysiology of reactive oxygen intermediates in the central nervous system, 43, 4, 223-230 p.
157. Weintraub, D. ve Stern, M.B., 2005, Psychiatric complications in Parkinson disease, 13, 10, 844-851 p.
158. West, A.B., Lockhart, P.J., O'Farell, C., ve Farrer, M.J., 7-2-2003, Identification of a novel gene linked to parkin via a bi-directional promoter, 326, 1, 11-19 p.
159. Winkler, S., Hagenah, J., Lincoln, S., Heckman, M., Haugarvoll, K., Lohmann-Hedrich, K., Kostic, V., Farrer, M., ve Klein, C., 30-10-2007, Alpha-Synuclein and Parkinson disease susceptibility, 69, 18, 1745-1750 p.
160. Wintermeyer, P., Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Berg, D., Becker, G., Leroy, E., Polymeropoulos, M., Berger, K., Przuntek, H., Schols, L., Epplen, J.T., ve Riess, O., 14-7-2000, Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients, 11, 10, 2079-2082 p.
161. www.mlpa.com
162. Xiromerisiou, G., Hadjigeorgiou, G.M., Gourbali, V., Johnson, J., Papakonstantinou, I., Papadimitriou, A., ve Singleton, A.B., 2007, Screening for SNCA and LRRK2 mutations in Greek sporadic and autosomal dominant Parkinson's disease: identification of two novel LRRK2 variants, 14, 1, 7-11 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

163. Yang, Y.X., Wood, N.W., ve Latchman, D.S., 2009, Molecular basis of Parkinson's disease, (C) 2009 Lippincott Williams & Wilkins, Inc., 20, 2, 150-156 p.
164. Zabetian, C.P., Hutter, C.M., Yearout, D., Lopez, A.N., Factor, S.A., Griffith, A., Leis, B.C., Bird, T.D., Nutt, J.G., Higgins, D.S., Roberts, J.W., Kay, D.M., Edwards, K.L., Samii, A., ve Payami, H., 2006, LRRK2 G2019S in families with Parkinson disease who originated from Europe and the Middle East: evidence of two distinct founding events beginning two millennia ago, 79, 4, 752-758 p.
165. Zabetian, C.P., Morino, H., Ujike, H., Yamamoto, M., Oda, M., Maruyama, H., Izumi, Y., Kaji, R., Griffith, A., Leis, B.C., Roberts, J.W., Yearout, D., Samii, A., ve Kawakami, H., 22-8-2006, Identification and haplotype analysis of LRRK2 G2019S in Japanese patients with Parkinson disease, 67, 4, 697-699 p.
166. Zabetian, C.P., Samii, A., Mosley, A.D., Roberts, J.W., Leis, B.C., Yearout, D., Raskind, W.H., ve Griffith, A., 13-9-2005, A clinic-based study of the LRRK2 gene in Parkinson disease yields new mutations, 65, 5, 741-744 p.
167. Zarranz, J.J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Gomez, T.E., del, S.T., Munoz, D.G., ve de Yebenes, J.G., 2004, The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia, 55, 2, 164-173 p.
168. Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., Stoessl, A.J., Pfeiffer, R.F., Patenge, N., Carbajal, I.C., Vieregge, P., Asmus, F., Muller-Myhsok, B., Dickson, D.W., Meitinger, T., Strom, T.M., Wszolek, Z.K., ve Gasser, T., 18-11-2004, Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology, 44, 4, 601-607 p.
169. Zimprich, A., Muller-Myhsok, B., Farrer, M., Leitner, P., Sharma, M., Hulihan, M., Lockhart, P., Strongosky, A., Kachergus, J., Calne, D.B., Stoessl, J., Uitti, R.J., Pfeiffer, R.F., Trenkwalder, C., Homann, N., Ott, E., Wenzel, K., Asmus, F., Hardy, J., Wszolek, Z., ve Gasser, T., 2004, The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval, 74, 1, 11-19 p.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler:

Adı-Soyadı: Atilla KURTULUŞ
Doğum tarihi ve yeri: 15 Şubat 1967, Karasar
Uyruğu: T.C.
Medeni Durumu: Evli
İletişim Adresi: Büyükdere Mh. Gülersoy Sk. Esin Apt. No:23/2
ESKİŞEHİR

İletişim Tel: GSM: (532) 4155220
GSM: (505) 2157553

1967 yılında Sivas'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğretimimi İstanbul'da yaptı. 1987 İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'ne girdi. 1993 senesinde buradan mezun oldu. Aynı yıl İstanbul Kartal Devlet Hastanesi Acil Serviste Acil Tabibi olarak göreve başladı. Sırasıyla İstanbul Sağlık Müdürlüğü 112 Acil Tıbbi Hizmet Şube Müdürlüğü, Eskişehir Sağlık Müdürlüğü 112 Acil Tıbbi Hizmet Şube Müdürlüğü, Eskişehir Devlet Hastanesi Acil Servis Tabibi ve Zübeyde Hanım Kadın-Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi Çocuk Acil Servis Tabibi olarak görev yapmıştır. 2002–2003 eğitim-öğretim yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Doktora Programına başladı. 23 Mayıs 2005 tarihinde Doktora Yeterlilik Sınavı'nı başarı ile bitirdi. Halen Yunussemre Devlet Hastanesi Başhekim Yardımcılığı görevi yapmaktadır.