

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS)

**OTOZOMAL RESESİF GEÇİŞLİ PARKİNSON
HASTALIĞINDA PARKİN (PARK2) GENİ
MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

BURCU DURSUN

**DANIŞMAN
PROF.DR. NİHAN ERGİNEL ÜNALTUNA**

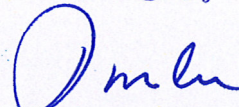
**GENETİK ANABİLİM DALI / GENETİK ORTAK
PROGRAMI**

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

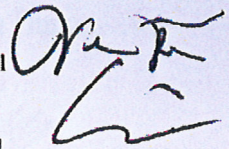
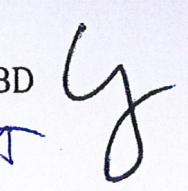
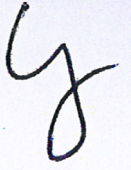
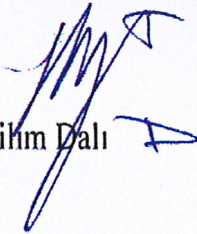
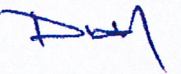
12 / 08 / 2008


Prof. Dr. Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Genetik Ortak Programı
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı : Genetik A.B.D
Tez Sahibi : Burcu Dursun
Tez Başlığı : Otozomal Resesif Geçişli Parkinson Hastalığında Parkin (PARK2) Geni Mutasyonlarının Araştırılması
Sınav Yeri : İ. Ü DETAE
Sınav Tarihi : 07 / 08 / 08

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Nihan Erginel Ünaltona İstanbul Üniversitesi DETAE Genetik Anabilim Dalı 
2. Prof. Dr. Uğur Özbek İstanbul Üniversitesi DETAE Genetik Anabilim Dalı 
3. Doç. Dr. Kıvanç Çefle İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D. Tıbbi Genetik BD 
4. Doç. Dr. Haşmet Hanağası İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji AD 
5. Yrd. Doç Dr. Duran Üstek İstanbul Üniversitesi DETAE Genetik Anabilim Dalı 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Burcu Dursun

İTHAF

CANIM AİLEME İTHAF EDİYORUM

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana olan desteği, katkısı ve sabrı için tez danışmanım sayın Prof. Dr. Nihan Erginel Ünaltuna'ya,

Tez çalışmalarına başladığım günden beri verdikleri büyük destek, imkan ve sabır için sayın Prof. Dr. Murat Emre'ye, sayın Doç. Dr. Haşmet Hanağasına ve sayın Dr. Ebba Lohmann'a,

Tezimin deneysel aşamalarını gerçekleştirmem için labaratuvar imkanlarını kullanmama olanak sağlayan enstitü müdürümüz sayın Prof. Dr. Mehmet Kaya'ya, ayrıca Fransa'daki ortak çalışma grubumuzun koordinatörü sayın Prof. Dr. Alexis Brice ve Suzanna Leusage'a,

Tezimde en az benim kadar emeği geçtiğine inandığım sevgili arkadaşım Mukaddes Pala'ya, stajerken yanına geldiğimde bana yol gösteren ve her konuda yardımcı olmaya çalışan Dr. Neslihan Abacı'ya, sorduğum sorulara bıkmadan cevap veren ve beni de dinleyen Çağrı Güleç'e, benimle bir yaz boyu çalışan sevgili Aslı Çalık'a, bana hergün güleryüzle merhaba diyen sayın Yrd. Doç. Dr. Duran Üstek'e, labaratuvar arkadaşlarım Filiz Güçlü, Neslihan Çoban ve Aris Çakiris'e,

Labaratuvar dışında sıkıntılarımı paylaştığım arkadaşlarım Simge Tekiç'e ve Betül Erten'e,

Ve hayatımın her döneminde bana her konuda destek olan, beni hiç yalnız bırakmayan, canım babam Güner Dursun'a, canım annem Nalan Dursun'a, tez çalışmalarım sırasında olan dertlerimi ve sıkıntılarımı paylaştığım, kardeşten çok en yakın arkadaşlarım diyebileceğim Pelin Dursun ve Emre Dursun'a,

Teşekkür ve Şükranlarımı Sunarım...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-56/15122006

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
4. BULGULAR.....	52
5. TARTIŞMA	66
KAYNAKLAR	71
ETİK KURUL KARARI.....	81
ÖZGEÇMİŞ	82

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1:Parkinson sendromunun sınıflandırılmasını gösteren tablo(11).	6
Tablo 2-2: PH sendromlarını gösterir tablo.	8
Tablo 2-3 Parkinson Hastalığı ve Esansiyel Tremor arasındaki belirgin farklılıkları gösterir tablo.	10
Tablo 2-4 Sıklıkla kullanılan görüntüleme tekniklerini gösterir tablo.	12
Tablo 2-5 <i>UK Parkinson's Disease Society Brain Bank's clinical criteria for the diagnosis of probable Parkinson's disease</i> kriterleri	13
Tablo 2-6: <i>National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS)</i> tanı kriterlerini gösterir tablo.	14
Tablo 2-7:GGPH'da rol alan genetik lokuslar ve gen bölgeleri. (73).Otozomal dominant geçişli Parkinson hastalığı	23
Tablo 2-8:Otozomal Resesif geçiş gösteren PH genleri ve özelliklerini gösterir tablo.	25
Tablo 2-9:Parkin genine bağlı PH olgularının klinik özelliklerini gösterir tablo.	27
Tablo 3-1:Hasta ailelerinin özelliklerini gösterir tablo.	31
Tablo 3-2: Parkin geni haplotip analizlerinde kullanılan mikrosatellit markerları ve sekans özelliklerini gösterir tablo.	40
Tablo 3-3: Mikrosatellit PZR koşullarını gösterir tablo.Ci:Stok molaritesini, Cf: PZR reaksiyonu içinde kullanılan molaritesini ifade etmektedir.	40
Tablo 3-4: Mikrosatellit PZR dilüsyonunu gösterir tablo.	42
Tablo 3-5:DHPLC ve sekans analizi için kullanılan primer sekansları, PZR Erime ısıları yada uygun Toch-down koşulları ve DHPLC koşullarını gösterir tablo.	44
Tablo 3-6: Sekans analizi için kullanılan her ekzon için farklı optimize edilmiş PZR koşullarını gösterir tablo.	45
Tablo 3-7: Farklı ekzon bölgeleri için farklı volümlerde PZR ürünü kullanıldığını gösterir tablo.	46
Tablo 3-8:Sekans analiz reaksiyon koşullarını gösterir tablo.	47
Tablo 3-9 Prob karışım oranını ve değerlerini gösterir tablo.	49
Tablo 3-10: Ligasyon karışımını gösterir tablo.	49
Tablo 3-11: Pre-PZR karışımını gösterir tablo.	50
Tablo 3-12:PZR karışımını gösterir tablo.	50

Tablo 3-13:Genotipleme amaçlı hazırlanan marker reaksiyonunu gösterir tablo.....	51
Tablo 4-1: Mikrosatellit değerlerini gösterir tablo.Yeşil renkli olanlar, aynı ailenin etkilenmiş bireylerini, turuncu renkli olanlar ise aynı ailenin etkilenmemiş bireylerini göstermektedir.....	52
Tablo 4-2: Mikrosatellit değerleri tüm bireyleri için heterozigot olan ve aynı haplotipi aktarmayan etkilenmiş bir ailenin genotip sonuçlarını gösterir tablo.	53
Tablo 4-3:Sadece Parkin mutasyonu taşıyan olgular ile taşımayan olgular arasındaki karşılaştırmayı gösterir tablo. $p < 0,05$	64
Tablo 4-4:Sadece homozigot Parkin mutasyonu taşıyan olgular ile taşımayan olgular arasındaki karşılaştırmayı gösterir tablo. $p < 0,05$	65
Tablo 5-1 Mutasyon saptanan hastaların klinik özelliklerini gösterir tablo.	68
Tablo 5-2.(^a)Periquet ve arkadaşlarının farklı toplumlarda yapmış olduğu çalışmayı göstermektedir (109).Tez sonuçlarına göre bulunan mutasyon sıklığının farklı toplum çalışmaları ile birlikte gösterir tablo.....	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Normal ve Parkinson Hastası arasındaki direk ve indirek yol mekanizması (Expert Reviews in Molecular Medicine’den alınmıştır.)	5
Şekil 2-2: PH patogenezinde görevli mekanizmalar ve ilişkili genleri gösterir şekil.+ işareti: PH’de olası tedavi yaklaşımlarını ,siyah ok:PH patogenezindeki koruyucu yolları,kırmızı ok ise:Dopaminerjik hücre kaybına neden olan yolları ifade etmektedir. (72)	20
Şekil 2-3:α-sinüklein proteini ve tanımlanan nokta mutasyonlarını gösterir şekil	22
Şekil 2-4: LRRK2 geninin şematik yapısını gösterir şekil.	24
Şekil 2-5:PİNK1 proteinini ve sıklıkla mutasyon saptanan bölgelerini gösterir şekil. ...	26
Şekil 2-6: DJ1 proteininin yapısal domainlerini ve şimdiye kadar bulunmuş olan patojenik mutasyonlarını gösterir şekil.	26
Şekil 2-7: Parkin proteini ve sıklıkla mutasyon saptanan bölgelerini gösterir şekil.	29
Şekil 2-8: ÜPS sistemini gösterir şekil.Proteotozomal ve non-proteotozomal yolakta parkin işlevini açıklayan diyagramı göstermektedir.K29 ve K48 poliübikütilasyonla proteotozomal mekanizmada etkin iken K63 ile proteotozomal olmayan yolakta etkilidir.....	30
Şekil 3-1: Mikrosatellit markerlerin 6. kromozomun q26 bölgesindeki yerleşimini gösterir tablo.(Ensembl ‘dan alınarak düzenlenmiştir.)	39
Şekil 4-1: 081 numaralı ailede haplotip geçişini gösterir aile ağacı.	54
Şekil 4-2: 138 numaralı ailede haplotip geçişini gösterir aile ağacı.	54
Şekil 4-3:Ekzon 7’de heterozigot mutasyon saptadığımız 078 numaralı ailenin etkilenmiş bireyinin kromatogram görüntüsü.....	55
Şekil 4-4:Ekzon 7 bölgesinde mutasyon taşımayan bireyin kromatogram görüntüsü....	55
Şekil 4-5: 078 numaralı hastadaki heterozigot EX 7 Arg 275 Trp : c. 924 C>T mutasyonunu gösteren kromatogram.	56
şekil 4-6: 138 numaralı ailenin iki etkilenmiş bireyinin kromatogram verisini gösterir şekil.	56
Şekil 4-7: 138 numaralı ailenin etkilenmemiş bireyinin kromatogram verisini gösterir şekil.	57

Şekil 4-8: 081-005 numaralı olguda amlifiye olmamış ekzon 3 bölgesini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon 3 bölgesine spesifik amplifiye olmamış prob bölgesini göstermektedir.....	57
Şekil 4-9: 081-004 numaralı olguda amlifiye olmamış ekzon 3 bölgesini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon 3 bölgesine spesifik amplifiye olmamış prob bölgesini göstermektedir.....	58
Şekil 4-10: 109 numaralı olguda amlifiye olmamış ekzon 3 bölgesini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon 3 bölgesine spesifik amplifiye olmamış prob bölgesini göstermektedir.....	58
Şekil 4-11: 99 numaralı olguda amlifiye olmamış ekzon 3 bölgesini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon 3 bölgesine spesifik amplifiye olmamış prop bölgesini göstermektedir.....	59
Şekil 4-12: 105 numaralı olguda amlifiye olmamış ekzon 4 bölgesini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon 4 bölgesine spesifik amplifiye olmamış prop bölgesini göstermektedir.....	59
Şekil 4-13: 086 numaralı olguda heterozigot ekzon 3 ve ekzon 4 bölgelerini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon3 ve ekzon 4 bölgelerinde meydana gelmiş delesyonları göstermektedir.....	60
Şekil 4-14: 055 numaralı olguda heterozigot ekzon 3 ve ekzon 4 bölgelerini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon3 ve ekzon 4 bölgelerinde meydana gelmiş delesyonları göstermektedir.....	60
Şekil 4-15: “EX 2 c182-184 del AAG” delesyonunun parkin proteininin 26. lizin amino asitinin delesyonuna neden olduğunu gösterir blast analizi sonucu.....	61
Şekil 4-16: 26. lizin aminositinin evrim sürecinde korunmuş bir amino asit olduğunu gösterir şekil.....	62
Şekil 4-17: <i>Ubiquitin-like domain</i> (Übiküitin-benzeri domaini)’de meydana gelen lizin amino asidi delesyonunu gösterir üç-boyutlu resmi. Sarı bölge delesyona uğramış lizin amino asidini göstermektedir ve pembe ok ile belirtilmiştir. Resim NCBİ’nin sayfasından <i>3ND structure</i> programı kullanılarak tanımlanmıştır ve übiküitin benzeri alt yapının sembolü: Ubld(1IYF)’dir.....	63
Şekil 4-18: Ubld alt yapısının yük dağılımını gösterir şekil. <i>3ND structure</i> programı yardımı ile bulunmuştur. Pozitif yüklü amino asitler mavi ile gösterilmiş, negatif yüklü	

amino asitler ise kırmızı ile gösterilmiştir.Şekilde 26. lizin aminoasiti mavi yüklü olarak ifade edilmiş olup pembe ok ile belirtilmiştir.63

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

PH	: Parkinson Hastalığı
PARK2	:Parkin geni sembolü ve kromozom üzerindeki lokalizasyonu
DHPLC	:Denaturing High Performance Liquid Chromatography
MLPA	:Multiple Ligation-dependent Probe Amplification
STR	:Short Tandem Repeats
ÜPS	:Übiküitin Proteozom Sistem
ORPH	:Otozomal Resesif geçişli Parkinson Hastalığı
BG	:Bazal Ganglia
SNc	:Substantia Nigra pars compacta
VTa	:Ventral Tegmental Area
UKPDS	: UK Parkinson's Disease Society Brain Bank's clinical criteria
NINDS	: National Institute of Neurological Disorders and Stroke Tanı Kriterleri
Pael-R	:Endothelin Receptor-like receptor
UCH-L1	:Ubiquitin Carboxyhydrolase 1
LRRK2	:Leucine-Rich Repeat Kinase 2
MAPK	:Mitogen activated protein Kinase
AH	:Alzheimer Hastalığı
MPTP	:1-Methyl 4-phenyl 1,2,3,6 tetrahydropyridine
ROS	:Reactive Oxygen
LB	:Lewy body
ORPH	: Otozomal Dominant geçişli Parkinson Hastalığı
PET	:Position Emission Tomography
UBL	:Ubiquitin like domain

ÖZET

Dursun B., (2008).”Otozomal Resesif Geçişli Parkinson Hastalığında Parkin Geni Mutasyonlarının Araştırılması” İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans. İstanbul.

Parkinson Hastalığı (PH) 65 yaş üstü popülasyonun % 1’den fazlasını etkileyen, Alzheimer’dan sonra görülen ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. Etiyolojisi henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir ancak hastalık patogenezinde genetik ve çevresel birçok faktörün rol oynadığı düşünülmektedir. Aile çalışmaları PH’nın erken başlangıçlı formlarında önemli bir genetik yatkınlığın varlığını göstermektedir. PH olgularının büyük bir kısmı sporadik olmasına rağmen, hastalığın nadir ailesel formlarının keşfedilmesi ve yapılan hayvan modeli çalışmaları hastalık patogenezinde rol oynayan moleküler mekanizmaların ve olası tedavi yaklaşımlarının tanımlanması konusunda önemli gelişmeler sağlamıştır.

Şimdiye kadar PH patogenezinde rol aldığı belirtilmiş 6 gen bölgesi tanımlanmıştır. Bunların içinde Parkin (*PARK2*) geni PH’nın en sık mutasyon rastlanan genetik faktörü olarak belirtilmektedir. Amacımız; Türk Parkinson hastalarında *Parkin* geni mutasyon taraması yapmak, patogeneze olan olası ilişkisine açıklayıcı bir katkı sağlamak, Türk popülasyonuna özgü bir fenotip-genotip korelasyonu oluşturmaktır.

Tez kapsamında, 69 Parkinson hastası bunların 23 etkilenmemiş aile bireyi ve 50 kontrol örneği taranmıştır. Uygulanan genetik yaklaşımlar sırası ile mikrosatellit markerları (STR) ile haplotip analizi, DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatograph) metodu ile varyasyonların tespiti, sekans analizi ve MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification) analiz yöntemleridir.

Tüm bu genetik analizler sonucunda, toplam 8 indeks olguda mutasyon saptanmış olup, bunların 3 tanesi Parkin geni homozigot ekzon 3 delesyonu, 1 tanesi Parkin geni homozigot ekzon 4 delesyonu, 2 tanesi Parkin geni *compound* heterozigot 3-4 delesyonu ve 2 tanesinde daha önce literatürde gösterilmemiş olan homozigot; *c182-184 del AAG* delesyonudur. Bulgular daha önce farklı toplum çalışmaları ile kıyaslanmış ve anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler : Parkinson hastalığı, ailesel, genetik, Parkin geni , mutasyon

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: T-56/15122006

ABSTRACT

Dursun B., "Parkin (PARK2) Gene Mutation Analysis in Autosomal Recessive Parkinson Disease" Istanbul University, Institute of Health Science, Genetics Common Programme, Istanbul, 2008

Parkinson's Disease (PH) is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's Disease, affecting more than 1% over the age of 65 years population. Etiology of PH hasn't been evaluated completely yet but genetics and environmental factors seem to play a role in PH pathogenesis. Family studies suggest that there is a significant genetic susceptibility in Early Onset Parkinson's Disease (EOP). The majority of PD cases are sporadic however, the discovery of genes linked to rare familial forms of disease and studies of experimental animal models has provided crucial insights into molecular mechanisms in disease pathogenesis and identified probable targets for therapeutic intervention.

Up to the present, 6 genetic loci have been determined, play a role in PH pathogenesis. Parkin (PARK2) is the most frequent mutation identified genetic factor among them. Our aim is to screen Parkin gene mutations in Turkish Parkinson's patients, to provide a comprehensive contribution to probable association with pathogenesis, establish genotype-phenotype correlation specific for Turkish population.

In the contents of thesis; 69 Parkinson's patients, 23 their unaffected relatives and 50 control samples were screened. The genetic methodologies subsequently are; haplotype analysis with microsatellite markers (STR), identification variation with DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) and MLPA (Multiple Ligation dependent Probe Amplification) analysis.

Conclusion of the genetics analyses, mutations identified in total 8 index cases; 3 of them Parkin homozygous exon 3 deletion, 1 of them parkin homozygous exon 4 deletion, 2 of them Parkin compound heterozygous 3-4 deletion, and 2 of them homozygous "*c182-184 del AAG*" novel deletion that has never been reported. Results have been compared with different population studies and determined its significant importance.

Key Words: Parkinson's Disease, Familial, Genetics, Parkin gene, mutation

This study is supported by IU Research Grant /Project no: T-56/15122006

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson Hastalığı(PH), ikinci sıklıkta görülen nörodejeneratif bir hastalık olup, karakteristik klinik özellikleri, rijidite, bradikinezi, dinlenme tremoru ve postural instabilitedir. Prevalans çalışmaları yıllık insidansını 16-19/ 100.000 ve sıklığını ise 65 yaş üstü popülasyonda %1-5 olarak belirtmektedir(1,2). PH'nın patofizyolojisindeki temel olay *corpus striatum* ve *substantia nigra*'daki dopamin eksikliği ayrıca *Lewy body* olarak adlandırılan sitoplazmik agregatların birikimidir(3). PH'nın etyolojisi ve patogenezi ise daha az bilinmektedir. Şimdiye kadar tekrarlayan kafa travmaları, toksik etkenler, viral enfeksiyonlar ve frontal lobe tümörleri gibi pek çok etyolojik etken gösterilmiş olup, asıl neden aydınlatılabilmemiş değildir. PH'nın patogenezinde genetik ve çevresel etkenlerin birlikte rol aldığı düşünülmektedir(4,5,6.). Epidemiyolojik çalışmalar vakaların yaklaşık %10'unda genetik faktörlerin varlığını gösterecek şekilde ailesellik bildirmiştir(7).

Şimdiye kadar PH ile ilişkili 13 genetik lokus tanımlanmış ancak bunlardan sadece altısının geni belirlenebilmiştir(8). Bunlar, α -Synuclein proteinini kodlayan *SNCA*-, Parkin proteinini kodlayan *PRKN*-, UCHL1 proteinini kodlayan *UCHL1*-, PINK1 proteinini kodlayan *PINK1*-, DJ1 proteinini kodlayan *DJ1*- ve -yakın zaman önce tanımlanmış- LRRK2 (Dardarin) proteinini kodlayan *LRRK2*- genlerindeki mutasyonlar ile ilişkilidir.

Bu gen bölgelerinin içinde Parkin geni mutasyonları, Otozomal resesif geçişli (ORPH), 45 yaş altı (<45) erken başlangıçlı PH olgularının yaklaşık yarısından sorumlu olup bunlarında %10-15'ini sporadik vakalar oluşturmaktadır(9). Parkin geni PH patogenezinde büyük rol oynayan Übiküitin Proteozom Sistem (ÜPS)'de ve non-proteozomal yoldaki görevli E3 übiküitin protein ligaz enzimini kodlamaktadır. Ayrıca Parkin kaynaklı ORPH olgularında rastlanan temel klinik bulgular olası genotip-fenotip korelasyonunu düşündürmektedir (10). Tüm bu nedenler tezin çıkış noktasını oluşturmaktadır. Yapılan bu çalışma ile Türk toplumunda görülen parkin mutasyonları, bunların fenotipe olan etkisi, patogeneziyle olası ilişkisinin saptanması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hareket Bozuklarının Etiyolojisi ve Sınıflandırılması

Hareket bozuklukları terimi istemsiz veya anormal elemanter hareket bozukluklarını ve bu bozuklukların altında yatan hastalıkları ifade etmektedir. Bu grup hastalıklarda tutulan fonksiyonel sistem ve anatomik yapıları göz önüne alarak hareket bozuklukları hastalıklarına *ekstrapiramidal sistem hastalıkları* veya *bazal ganglia* (*bazal ganglionlar*, BG) hastalıkları da denilmektedir(1). Ekstrapiramidal sistemin ana oluşumu bazal ganglionlardır ayrıca premotor korteks, primer motor korteks ve talamus da sisteme dahil olan unsurlardır(13).

Parkinson Hastalığında (PH) görülen motor fonksiyon kayıplarının *bazal ganglia*'da meydana gelen değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Şimdiye kadar yapılmış çalışmalar BG'nin motor işlevlerini tam olarak açıklayamasa da en temel görevinin, hareketin hız ve şiddetinin ayarlanması, başlatılması, devamı ve durdurulması, öğrenilmiş motor fonksiyonların otomatik olarak uygulanması ve kas tonusunun ayarlanması şeklinde olduğunu desteklemektedir. BG'nin bu fonksiyonları gerçekleştirirken bir ölçekleme ve odaklama merkezi olarak çalıştığı belirtilmektedir. Bazal ganglia; striatum (*putamen*, *nucleus caudatus*, *ventral striatum*) globus pallidus (*pars interna* ve *pars eksterna*), subtalamik nükleus (*Korpus Luysii*) ve substantia nigra (*pars reticulata* ve *pars compacta*) kısımlarından oluşmaktadır(12).

Striatum:

Striatum yukarıda da bahsedildiği gibi *putamen*, *nucleus caudatus* ve *ventral striatum*dan oluşan, BG'nin temel girdi çekirdeğidir ve birçok kortikal alandan eksitator girdileri kabul etmektedir. BG talamus ile korteksi bağlayan subkortikal yapılar olarak görülebilir ve anatomisi içinde birbirine paralel 5 temel döngüsü tanımlanmıştır. Bunlar; motor döngü, okülomotor döngü, dorsolateral prefrontal döngü, lateral orbitofrontal döngü ve anterior singulat döngü'dür.

Striatum ayrıca orta beyinin ventralinde bulunan dopaminerjik nöronlardan da girdi almaktadır ve iki çekirdek bölge tarafından uyarılmaktadır. Bunlar; *Substantia nigra pars compacta* (SNc) ve Ventral tegmental area (VTA) olup dopamin, bu iki bölgeden *putamen*, *nucleus caudatus* ve *ventral striatum*'a ulaşır. Bir diğer dopaminerjik sistem ise hipotalamusa ulaşmaktadır(12).

Neostriatal projeksiyon nöronlarında iki tip dopaminerjik reseptör tanımlanmaktadır ve bunlar G-protein reseptörleri tipindedirler. Dopamin D1 tipi reseptörlere bağlandığında, bir ikinci mesajcı sinyal mekanizması zinciri başlatılmakta ve nöronların depolarizasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bunun tersine dopamin D2 tipi reseptörlere bağlandığında ise nöronal hiperpolarizasyon kaskadı başlatılmaktadır. Böylece D1 tipindeki reseptörler direk yolda kortikostriatal etkiyi güçlendirirken, D2 tipindeki reseptörler indirek yolda bu etkiyi zayıflatırlar.

Globus pallidus:

Striatum gibi *Globus pallidus*'da pallidal sınır hücreleri ile birbirinden ayrılan iki çekirdek bölgeden oluşmaktadır. Bunlar; *pars interna* ve *pars eksterna* olarak adlandırılmaktadır. Her iki segmental bölgede striatal spiny projeksiyon nöronlarından GABAerjik girdi alırlar. Direk yolda GABA- P maddesi aracılığıyla *pars interna*'ya, indirek yolda ise enkefalin aracılığı ile *pars eksterna*, *subtalamik* çekirdeğe uzanır ve bu yolak BG'nin tek eksitator entrensek bağlantısıdır.

Subtalamik Nükleus:

Talamusun ventralinde bulunur ve indirek yolda *Globus pallidus eksterna*' dan afferant uyarınları alırlar.

Substantia nigra:

Substantia nigra compacta, striatuma dopaminerjik girdi yapan dopamin hücrelerinden oluşmaktadır ve nigro-striatal dopaminerjik sistem olarak adlandırılmaktadır.*Substantia nigra pars reticulata* ise farklı tiptedir ve nöronları GABA-erjiktir(12).

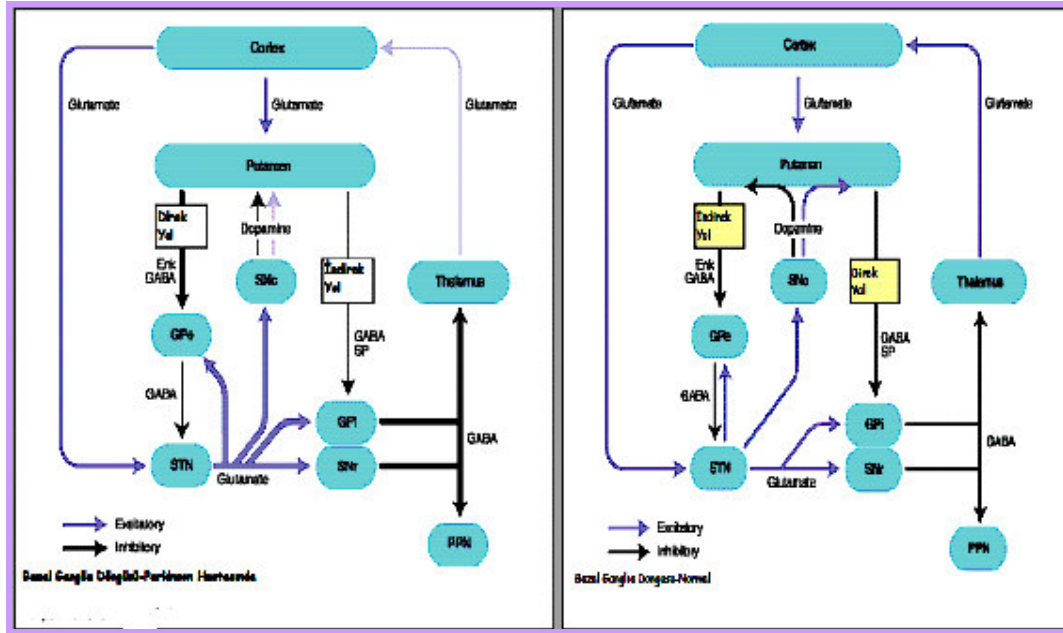
Direk- indirek yollar modeli:

Motor işlevlerin nasıl yürütüldüğüne dayanan direk ve indirek yollar modeline göre, kortikal seviyede başlatılan hareket paternini, istenilen hareketleri, seçilen motor programları direk yolla kolaylaştırıp, kuvvetlendirirken, ilgili ancak istenmeyen çelişen motor paternlerini indirek yolla baskılayarak odaklar (11).

BG ile talamus arasındaki devrede doğrudan yolak, pozitif geri bildirim, dolaylı yolak ise negatif geri bildirim sağlamaktadır. Direk yol dopaminin D1 tipi reseptörlere bağlanması ile uyarılırken, indirek yol D2 tipi reseptörlere bağlanması ile uyarılmaktadır.

PH tipindeki hareket bozukluklarının temelinde ise direk ve indirek yollar mekanizmasındaki bozukluklar yatmaktadır. SNC' daki dopaminerjik hücrelerin kaybı direk ve indirek yollar arasındaki *feed-back* mekanizmasını bozmakta, BG çıkış sinyalleri azalırken talamusdan kortekse giden negatif *feed-back* bastırılır, pozitif *feed-back* ise artırılır.

Hareket bozuklukları tabloya hakim olan anormal veya istemsiz hareketin niteliğine göre hipokinetik (hareketin azaldığı) ve hiperkinetik (hareketin arttığı) sendromlar olarak iki büyük gruba ayrılmaktadır.



Şekil 2-1: Normal ve Parkinson Hastası arasındaki direk ve indirek yol mekanizması (Expert Reviews in Molecular Medicine’den alınmıştır.)

2.2. Hipokenetik Hareket Bozuklukları ve Sınıflandırılması

Bu gruptaki hastalıklara akinetik-rijid sendromlar da denir. Bu hastalıklarda hakim tablo hareketlerin azalması, güçleşmesi ve eşlik eden kas tonusundaki artıştır. Akinetik-rijid sendromların prototipi Parkinson sendromudur (11).

2.2.1. Parkinson Sendromu Tanımı ve Sınıflandırılması

Parkinson sendromu etyolojik açıdan dejeneratif ve semptomatik olarak iki gruba ayrılmaktadır. Dejeneratif kökenli Parkinsonizm İdyopatik Parkinson Hastalığı ve Parkinson Artı sendromları olarak iki gruba ayrılmaktadır ve etyopatogenezinde dejeneratif hücre kaybı yatmaktadır, semptomatik Parkinsonizm’de ise BG doğrudan yada ikicil başka bir yoldan etkilenmektedir ve altta yatan başka bir etyolojik faktör ile ilişkilendirilmektedir (11).

Parkinson Sendromu Sınıflandırılması:

Dejeneratif:	Semptomatik:
• İdyopatik Parkinson Hastalığı • Parkinson Artı Sendromları ▪ MultisistemAtrofisi ▪ Progressif Supranükleer Palsi ▪ Yaygın Lewy Body Hastalığı ▪ Kortikal-bazal ganglion dejenerasyon ▪ Lytigo-Boding ▪ Progressif Pallidal atrofi	• Vasküler (multi-infarkt sendromu) • Normal basınçlı hidrosefali • İlaça bağlı (nöroleptikler) • Enfeksiyonlar • Metabolik (Hipokalsemik Parkinsonizm, kronik hepatoserebral dejenerasyon) • Toksik nedenlerden kaynaklanan (Mn, CO, MPTP gibi) • Hipoksiye bağlı gelişen Parkinsonizm

Tablo 2-1:Parkinson sendromunun sınıflandırılmasını gösteren tablo(11).

2.3. İdyopatik Parkinson Hastalığı ve Prevalansı

Parkinson Hastalığı ilk olarak James Parkinson tarafından “*An essay on the shaking palsy*” adlı makalesi ile 1817 yılında klinik bir sendrom olarak tanımlanmış, Jean Marie Charcot, James Parkinson’un orijinal tanımına ek olarak hastalarda gözlediği kas rijiditesini ve duyuşal değışiklikleri de ekleyerek hastalığı tekrar tanımlamış ve ilk bulan kişinin adını vermiştir (14,15).

PH (PD, MIM#168600) ikinci en yaygın görülen nörodejeneratif hastalık olup, en sık görülen parkinsonizm nedenidir(15,16). Prevalansı artmış nüfus ile birlikte en kalabalık toplumlarda iki katına ulaşmış olup, batı Avrupa toplumunda 160/100.000 ve 80 yaş üstü toplum kesiminde %4 olarak belirtilmiştir (17).

PH’nin klinikopatolojik tanımlaması; beynin *Substantia Nigra Pars Compacta* (SNc) ve *corpus striatum* daki dopaminerjik hücre kaybıdır (18). Bu hasara yol açan nedenler kesin olarak bilinmediği için sebebi bilinmeyen anlamında “İdyopatik” kelimesi ile anılmaktadır.

2.3.1. Klinik Özellikleri

“Parkinsonizm” terimi PH’nin kardinal bulguları olan istirahat tremoru, bradikinezi, rijidite ve postural instabilitayı içeren bir klinik sendromu tanımlar. Ayrıca tüm bu bulgulara ek olarak, duruş bozukluğu ve motor hareketlerin kilitlenmesi en yaygın görülen diğer klinik bulgulardır. Tüm bu motor ve non motor semptomların oraya çıkış şekli ve seyri PH’na tanı yaklaşımını değıştirerek diğer parkinsoniyen bozukluklardan ayrımını sağlamaktadır(19).Tablo2-2’de PH ’ da en sık görülen motor ve non- motor semptomlar sıralanmıştır.

Motor Semptomlar	Non-Motor Semptomlar
<i>Tremor (Resting tremor)</i> ; titreme	Bilişsel bozukluklar
<i>Bradikinezi-Akinezi</i> ;hareketlerde yavaşlama	Depresyon
<i>Rijidite</i> ; kas sertliği	Psikiyatrik bozukluklar
<i>Postural instabilite</i> ; duruş değişiklikleri	<i>Apathy</i> ;duyusal isteklerde değişim
<i>Hypomimia</i> ;mimik ve ifade bozukluğu	Ortostatik Hipotansiyon,
<i>Dysarthria</i> ; konuşma bozukluğu	Üriner sistem bozuklukları
<i>Dysphagia</i> ;yutma zorluğu	Anormal terleme
Yürüme bozukluğu; ayakları sürüyerek	Uyku sorunları (<i>restless legs syndrome</i>)

Tablo 2-2: PH sendromlarını gösterir tablo.

Tremor:

Dinlenme tremoru PH'nın en belirgin ve kolay teşhis edilen semptomudur. Titreme genelde tek taraflı olarak bir elde yada ayakta ortaya çıkmaktadır, frekansı genelde 4-6 hz olup, çoğunlukla ekstremitenin distalini etkilemektedir. Elde ortaya çıkan titreme başparmak ve işaret parmaklarının ileri geri hareketleri şeklindedir ve elin bozuk para saymaya benzer farklı bir tarzı vardır ("*pill-rolling*"). Hastalarda dilde, dudakta ve çenede titreme görülebilmesine karşın Esansiyel Tremor 'dan farklı olarak baş ve ses titremesi saptanmaz. Esansiyel Tremor ve PH arasında görülen farklılıklar tablo2-3'de özetlenmiştir. Karakteristik olarak dinlenme tremoru, uyku ve hareket halinde kaybolmaktadır.

Dinlenme tremoruna ek olarak birçok hastada postural tremor da görülebilmektedir. Esansiyel tremordan farklı olarak postural tremor görülen hastalar da vücut yere yatay pozisyonda yatırıldığında titreme ertelenmektedir(20). Esansiyel tremor ile PH kaynaklı tremor daha birçok klinik belirtilerle ayrılabilir.(Tablo 2-3)

Rijidite (Kas sertliği):

Pasif harekete karşı oluşan direnç olarak ifade edilmektedir. Hastalarda dişli çark “*cogwheel*” fenomeni olarak tanımlanan ve kasların sertliğinden kaynaklanan belirti gözlenmektedir.

Proksimalde; boyun ve omuzlarda, distalde ise; ayak ve el bileğinde oluşmaktadır. Omuz ve sırt bölgesinde ağrı ile birlikte hissedilen rijidite eğer artrit yanlış tanısı verilmediyse genellikle PH’nın ilk belirtilerinden biridir (20,21,22).

Bradikinezi (Hareketlerde yavaşlama):

Hareketlerin yavaşlaması olarak ifade bulan bradikinezi, diğer başka bozukluklarla birlikte görünse dahi PH’nın en karakteristik belirtisidir. Bradikinezi BG disfonksiyonunun en önemli sonucu olup, hareketin planlanması, başlatılması ve devam ettirilmesi bunun yanında sıralı ve simültane bir şekilde sürdürülmesinin zorlaşması durumudur (23). Hastaların başlangıçta günlük işlerini yapmada hissettikleri zorluk zamanla ilerler (24). Hastalığın ilerleyen süreçlerinde ince motor kontrole gereksinim duyulan düğme ilikleme, çatal bıçak kullanma ve ayakkabı bağlama gibi aktivitelerde zorlanma gerçekteşir. Spontan hareketlerde görülen yavaşlama ise PH hastalarında görülen diğer belirtilerdir, örneğin yutkunma, yüz mimiklerinde azalma, yürürken kolları sallamama gibi (25). Bradikinezinin patofizyolojisi henüz tam olarak tanımlanabilmiş olmamasına karşın yapılan çalışmalar, dopamin eksikliğiyle olan korelasyonunu kanıtlamış ve en önemli kardinal bulgularından biri olduğunu göstermiştir (26).

Akinezi ise hareketlerin tamamen yapılamama durumudur ve hastalığın ilerleyen döneminde görülür.

Postural İnstabilite:

Hastalarda öne propulsiyon ve retropulsiyon şeklinde olan denge kaybı olarak ortaya çıkar. Postural instabilitesi olan hastalarda fleksiyon posturu ve festinasyon denilen, öne doğru küçük adımlarla yürüyüş şekli ortaya çıkar.

Klinik Özellik	Parkinson Hastalığı	Esansiyel Tremor
Başlangıç yaşı	55-75	10-80
Aile hikayesi	+/-	+/+
Tremor sıklığı (hz)	4-6	6-10
Tremor karakteristikleri	Ellerin bozuk para sayar gibi pozisyonu	Uzun süeli
Etkileyen faktörler		
Dinlenme halinde	Artar	Azalır
Hareket halinde	Azalır	Artar
Mental konsantrasyon	Azalır	Artar
Yazma halide	Azalır	Artar
Yürüme halinde	Artar	Azalır
Alkol alımında	-	Azalır
Postural tremor	Tekrar ortaya çıkan	Geç ortaya çıkan
Kinetik tremor	+/-	Evet
Kol tremoru	Asimerik	Simetrik
Kollardan başka organlara dağılımı	Yüz, çene, dudaklar	Baş ,ses
Dopaminerjik sistem tutulumu	Dikkat çekici dopaminerjik hasar	Hafif dopaminerjik hasar
Nöropatolojik tutulum	Nigrostriatal dejenerasyon, Lewy-body varlığı	Hafif serebeller dejenerasyon, <i>Substantia Nigra</i> 'daLewy-body oluşumu
Tedavi	Antikolinerjikler, amantadin, dopaminerjik ilaçlar, <i>deep brain stimulation</i>	Alkol, beta-blokerler, primidon,topiramet, gabapentin, botulinum toksin, <i>deep brain stimulation</i>

Tablo 2-3 Parkinson Hastalığı ve Esansiyel Tremor arasındaki belirgin farklılıkları gösterir tablo.

2.3.1.1. Tanısı ve kriterleri

PH'nın henüz kesin bir tanı testi bulunmamaktadır bu nedenle tanısı klinik kriterlere göre yapılabilmektedir. Geçmişte klinik tanı kriteri olarak *Lewy-body* oluşumunun patolojik incelemesi düşünülmüş ancak bazı eksiklik ve olumsuzlukları nedeniyle uygulanabilir olmamıştır (27).

Klinikte uygulanan tanı yöntemi ise; kardinal motor bulguların ve levodopaya verilen cevabın değerlendirilmesi şeklindedir.(28). PH'nın kardinal belirtilerini taşıyan hastalarda iyi bir klinik değerlendirmenin sonrasında doğru teşhis koyulabilmesine karşın, başka parkinsoniyen bozukluklarla karıştırılabilmesi olağandır. (29).

Tüm bu nedenler yüzünden, uzman hekimler tarafından yaygın kullanımlı klinik tanı uzlaşıları olan "*United Kingdom Parkinson's Disease Society (UKPDS) Brain Bank Clinical Diagnostic Criteria*" ve "*National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) Diagnostic criteria for Parkinson's Disease*" tanı kriterleri kullanılmaktadır.

Şimdiye kadar uzlaşa sağlanmış ve hekimler tarafından sıklıkla kullanılan bu tanı kriterlerinin geçerliliği ve doğruluğu kesinlik kazanmamıştır. Bu konuda yapılmış bir çalışmada UK brain bank kriterlerine göre Parkinson tanısı konulmuş 100 hasta üzerinde yapılan patolojik inceleme sonunda %76 doğruluk sağlandığı tespit edilmiştir (31).

Tremor, yürüyüş ve hareket bozuklukları, postural instabilite, levodopaya verilen cevap gibi çok çeşitli klinik gözlemler Parkinson ve parkinsoniyen sendromlarını birbirinden ayırmak için kullanılabilmektedir. Levodopaya verilen cevap hastalığın klinik tanısı için yönlendirici olmasına karşın diğer parkinsoniyen bozukluklarla kesin bir şekilde ayırımı sağlayamamaktadır ve tanı metodu olarak kullanılabilirliği çelişkilidir(32).

Yardımcı tanı yöntemlerinden bir diğeri ise, *Neuro-imaging* (nörogörüntüleme) olup PH'nın diğer parkinsoniyen bozukluklardan ayırımı sağlamak amaçlı kullanılmaktadır(33). *Neuroimaging* teknikleri ümit verici yaklaşımlar olmasına karşın tanı amaçlı kullanılabilirliği tartışma konusudur.

Genetik tanı yöntemleri ise son zamanlarda birçok genetik geçişli hastalıkta (*Hungtington Disease* vs) uygulandığı gibi Parkinson içinde kullanılması düşünülmüş tekniklerdendir. Ancak Parkinson hastalığının heterojen bir hastalık olması ve birçok genetik lokusun hastalık patogenezinde rol oynaması genetik testlerin klinik tanıya yardımcı bir tanı metodu olabilirliğini kısıtlamaktadır. Ancak *α-synuclein* ve *parkin* gen analizleri görece pahalı ve uzun süreli olmalarına karşın uygulanabilir tanı teknikler arasındadır (34).

Aşağıda sıralanmış olan çeşitli görüntüleme teknikleri bulunmaktadır:

-
- *Potential imaging studies include high field strength (1.5 T) heavily T2 weighted MRI,*
 - *[18F]-fluorodopa positron emission tomografi,*
 - *[11C]-raclopride imaging of dopamine D2 receptors*
 - *single photon emission compute tomografi*
-

Tablo 2-4 Sıklıkla kullanılan görüntüleme tekniklerini gösterir tablo.

<i>UK Parkinson's Disease Society Brain Bank's clinical criteria (UKPDS) Tamı Kriterleri</i>
Adım1: Bradikinezi Aşağıdaki kriterlerden en az bir tanesi: Rijidite 4-6 Hz dinlenme tremoru Postural instabilite
Adım 2: Diğer Parkinsonizm nedenlerini dışla
Adım 3: Aşağıdaki beklenen kriterlerden en az 3 tanesi: Tek taraflı başlangıç Dinlenme tremoru İlerleyici bozukluk İlerleyen dönemde asimetric seyretmesi Levodopaya çok iyi cevap (%70-100) Çeşitli Levodopa kaynaklı kore (diskineziler) Klinik vadede 10 yıl ve daha fazla

Tablo 2-5 UK Parkinson's Disease Society Brain Bank's clinical criteria for the diagnosis of probable Parkinson's disease kriterleri

<i>National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) Tanı Kriterleri</i>
Grup A (Karakteristik PH belirtileri): - Dinlenme tremoru - Bradikinezi - Rijidite - Asimetrik belirtiler
Grup B belirtileri: - Belirtilerin nadiren hastalığın erken döneminde ortaya çıkması - Semptomlar ortaya çıktıktan 3 yıl sonra belirgin bir şekilde ortaya çıkan postural instabilite - İlk 3 yılda ortaya çıkan otonom fonksiyon kayıpları - İlk 3 yılda ilaç kullanımından bağımsız ortaya çıkan halüsinasyonlar - İlk yıl motor semptomlardan önce ortaya çıkan demans - Ciddi subkortikal beyaz cevher hastalığı, hidrosefali veya Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) parkinsonizme neden olabilecek strüktürel lezyonların bulunması - Parkinsonizme neden olabilecek durumların varlığı (örneğin son 6 ay içinde nörepilektik kullanımı gibi)
PH kesin tanı kriterleri - Tüm olası Parkinson Hastalığı kriterleri ile birlikte - otopsi materyalinde histopatolojik inceleme
Olası PH kriterleri - Grup A daki belirtilerden en az 3 tanesinin varlığı - Grup B deki belirtilerden hiçbirinin olmaması - Levodopaya verdiği iyi derece yanıt
Olanaklı PH kriterleri - Grup A daki belirtilerden en az 3 tanesinin varlığı ve bir tanesinin bradikinezi yada tremor olması - Grup B deki semptomların olmaması veya 3 yıldan kısa süreli devamı ve Grup B deki semptomların hiçbirinin olmaması - Levodopaya ve dopamin agonistlerine karşı iyi derece yanıt

Tablo 2-6: *National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) tanı kriterlerini gösterir tablo.*

Değerlendirme Ölçekleri:

PH'nin özelliklerinin değerlendirilmesinde pek çok ölçek kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale / Birleşik Parkinson Hastalığı Değerlendirme ölçeği) en sık kullanılan ölçektir. Ölçek Fahn, Elton ve UPDRS Geliştirme Komite üyeleri tarafından 1987 yılında geliştirilmiştir (35). Ölçek 5 bölüm ve 42 maddeden oluşmaktadır. Her bir madde 0 (semptom ya da bulgu yok) ile 4 (semptom veya bulgu olabilecek en şiddetli halinde) arasında değerlendirilir. Birinci bölüm düşünce, davranış ve duygulanımı; ikinci bölüm günlük yaşam etkinliklerini değerlendirmeye yöneliktir. Motor muayene ve tedavinin komplikasyonları ölçeğin diğer bölümleridir. Hoehn-Yahr evrelemesi ve Schwab-England günlük yaşam etkinlikleri de UPDRS içerisinde yer almaktadır.

2.3.1.2. Tedavisi

PH'nin tedavi sürecini iki ana kategoride incelemek mümkündür:

Nöro-koruyucu tedavi: Hastalığın histolojik mekanizmasını engellemek amaçlı kullanılan bir yaklaşımdır. Şimdiye kadar çeşitli yöntemler denenmiş fakat hastalığın patolojik mekanizması henüz tam olarak bilinmediği için başarı sağlanamamıştır (36).

Semptomotik Tedavi: Hastalığın bulgu ve belirtilerini iyileştirmek için uygulanan tedavi yaklaşımı olup en sık tercih edilir.

Farmakoterapi ilk uygulanan tedavi yöntemi olup hastalarda farklı etkiler meydana getirebilmektedir. Mevcut ilaçlar dopamini yerine koyar yada onun etkisini artırır. Farmakoterapik tedavi uygulanmadan dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır:

- Hastanın başlangıç yaşı tedavi sürecinde ilk dikkat edilmesi gereken belirleyici olmalıdır. Genç hastalarda L-dopa tedavisinden önce dopamin agonistleri tercih edilmelidir. Başlangıçta L-dopa alınımı kimi hastalarda, diskinezi gibi semptomların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir, bu etkileri dışlamak için dopamin agonistlerinin kullanılmasının faydalı olacağı görüşü yaygındır (36).
- Yaşlı hastalarda ise L-dopa'nın düşük dozları ile başlanıp hastanın vereceği yanıtı göre doz ayarlaması yapılması bir diğer yaklaşımdır.
- Yapılan çalışmalar, PH olgularının yaklaşık %40'ında demans geliştiğini kaydetmektedir. Bu durumda kolinesteraz inhibitörlerinin kullanımının yararlı olacağı bildirilmiştir (38).

- PH tedavisinde son yıllarda uygulanabilirliği tartışılan bir diğer yaklaşım ise cerrahi bir girişim olan “*Deep Brain Stimulation*” yöntemidir. L-dopa’nın etkinliği düştüğünde uygulanan bir yöntem olup uzun süreli etki mekanizması ve tedavi sürecindeki rolü hala tartışma konusudur. Amaç nöronal aktivitenin hızını ve paternini değiştirmek, kortikal aktiviteyi normalize etmektir.

2.3.2. Etiyolojisi

PH’nın etiyojisinde genetik ve çevresel birçok faktör rol oynamaktadır.

Genetik faktörler: Gowers tarafından Parkinson hastası bireyler ve aileleri üzerinde yapılan bir çalışma sonucunda PH’nın genetik boyutu ilk olarak tanımlanmıştır(39). Daha sonra yapılan vaka-kontrol çalışmaları ve monozigotik ikiz çalışmaları ise bu gözlemi destekler nitelikte olmuş, birinci derece akraba bireylerde 2-3 kat artmış risk saptanmıştır(40,41). PH olgularının %10-15’i ailesellik gösterirken, %5’lik küçük bir kısmı ise tek gen defektlerinden kaynaklanmaktadır.(42). Tüm hasta popülasyonu içinde mendel kalıtımı gösteren olgu oranı düşük olmasına karşın ilgili genlerdeki mutasyonlar ve bu mutasyonlardan kaynaklanan bozukluklar hastalık etyopatogenezinde büyük öneme sahiptir. Şimdiye kadar 13 genetik lokus tanımlanmış ve bunlardan 6 tanesinde sorumlu gen tespit edilebilmiştir. Bu genlerden hastalık etiyojisi üzerine olası etkileri araştırılmış olanlar aşağıda kısaca özetlenmektedir:

α -synuclein: İdyopatik Parkinson hastalığının en önemli patolojik bulgusu olan α -synuclein *Lewy-body*’lerin bir bileşeni olup ayrıca, Alzheimer hastalığından sorumlu amiloid plaklarında içeriğini oluşturmaktadır(43). *Lewy-body* ler PH patogenezinde rol olan, parkin ve α -sinüklein proteinlerini içeren sitoplazmik agregatlardır ve hastalık etiyojisi üzerine olan etkileri patolojik incelemeler sonucunda da desteklenmiştir. Ayrıca α -sinüklein üzerine yapılan hayvan modeli çalışmaları genin *over-ekspresyonunun* dopaminerjik hücre kaybına yol açtığını göstermiştir(44).

Parkin: Parkin geni mutasyonlarından kaynaklanan PH olgularında rastlanan temel patolojik bulgular *corpus striatum* ve *substantia nigra* ile sınırlı dopaminerjik hücre kaybı ve lewy-body oluşumunun gözlenmemesidir(45). Şimdiye kadar çeşitli nokta mutasyonları, insersiyon ve delesyonlar tanımlanmıştır(46,47). Parkin übiküitin-proteinlerin proteozomal yolda yıkımını sağlayan bir E3 übiküitin-ligaz’dır. Parkinin birçok substratı tanımlanmış olup, bunların patogeneze üzerine olası etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmalardan biride parkin substratlarından biri olan *endothelin receptor-like receptor*

(Pael-R) üzerine yapılmış ve over-ekspresyonunun endoplazmik retikulum stresine ve hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir(48)

UCH-L1: Übiküitin Proteozom Sisteminde (ÜPS) görevli *ubiquitin carboxyhydrolase L1 (UCH-L1)* proteinini kodlamaktadır(49). UCH-L1 enzimi übiküitin C terminalini hidrolize ederek serbest übiküitin sisteme geri dönmesini sağlamakla görevlidir.

PINK1: Genel görüş, PINK1'in hücresel stres durumunda mitokondriyel membran potansiyelini etkileyerek koruyucu bir rol oynadığı yönündedir.

LRRK2: *LRRK2* geninin kodladığı Dardarin (*LRRK2, Leucine-Rich Repeat Kinase 2*) proteini beyinde baskın olarak bazal ganglia ve hippocampus bölgelerinde eksprese edilmektedir. Dardarin, birbirinden bağımsız ve korunmuş birçok fonksiyonel bölge içerir. Bunlardan ikisi, protein kinaz (MAPKKK bölgesi) ve GTPaz (Roc-COR modülü) etkinliği gösteren enzimatik bölgelerdir. Bunların dışında Dardarin'de birçok internal tekrar bölgesi (Ankyrin, LRR ve WD40) vardır. Böylece, Dardarin, biri Roc bölgesi ve diğeri COR bölgesi olmak üzere iki adet korunmuş bölge içeren ve ROCO proteinleri olarak bilinen yeni tanımlanmış bir protein ailesine dahildir. Bugüne kadar tanımlanmış bütün ROCO proteinleri gibi Dardarin'in de sitoskeletal süreçlerin regülasyonu ile ilişkili bir fonksiyonu olması olasıdır. Dardarin'in protein kinaz bölgesi MAPKKK ise protein kinazların TKL alt-ailesine dahil olup olasılıkla MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) metabolik yollarında görevlidir. Dardarin'in internal tekrar bölgeleri olan Ankyrin, LRR ve WD40 bölgeleri olasılıkla protein-protein etkileşiminde önemlidir.

LRRK2 geninde en sık rastlanan mutasyon G2019S mutasyonu olup , nöropatolojik incelemeler sonucunda patogeneze üzerine olan etkisi kanıtlanmıştır.Bir diğer önemli bulgu ise Alzheimer Hastalığı (AH) ve diğer Parkinsoniyen bozukluklarda tanımlanmamış olmamasıdır. G2019S mutasyonu kinaz aktivasyon segmentinin başında olan yüksek derecede korunmuş glisin amino asitini değiştirmektedir ve fonksiyon kazanım etkisi göstererek etyopatogeneizde rol almaktadır (50).

Çevresel faktörler: Çevresel faktörlerin PH etyolojisi üzerine olan etkisi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Kırsal yerleşim bölgelerinde yaşayan bireylerin PH gelişiminde artmış risk taşıdıkları toplum çalışmalarında gösterilmiş olup bu bölgelerde yoğun pestisit ve çeşitli endüstriyel ajanlara marus kalmalarının budurumun nedeni olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir diğer çalışma ise Parkinson hastalarında artmış herbisit birikimi olduğunu göstermiş ve diğer görüşleri desteklemiştir (51).PH gelişimi üzerine

etkisi kanıtlanmış diğer bir toksik ajan ise; *dithiocarbamates* olup, 1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP) toksisitesini artırarak PH patogenezinde rol oynadığını gösterilmiştir (52). Diğer taraftan sigara ve kahve kullanımının PH gelişimi yönünde risk azaltıcı etkisi olduğu yapılan başka çalışmalarla ifade edilmektedir.

Mitokondriyel Faktörler: PH ‘nin patogenezinin aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmaların birinde mitokondriyel bir bileşen olan solunum zinciri kompleks 1’de defekt tespit edilmiş ve bu çalışma PH patogenezinde mitokondri fonksiyonunu gösteren ilk çalışma olmuştur (53). Mitokondriyel proteinler olan DJ1 ve PINK1 genlerindeki mutasyonların ve α -sinüklein, parkin gen ekspresyonu ile mitokondri fonksiyonu arasındaki ilişkilerin tanımlanması ile PH etyolojisinde mitokondri işlevi desteklenmiştir. Ayrıca, MPTP, rotenon ve annonacin gibi mitokondri kompleks 1 inhibitörlerinin Parkinsonizm etkeni olarak tanımlanması mitokondri fonksiyonunun PH patogenezindeki etkisinin ispatı niteliğinde olmuştur (54).

2.3.3. Patogenezi ve moleküler biyolojisi

PH’nın SNC’da dopaminerjik hücre kaybından kaynaklanan bir nörodejeneratif hastalık olduğu bilinmesine rağmen altda yatan patolojik ve etiyolojik mekanizma henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Son yıllarda PH’nın tek gen mutasyonlarına bağlı mendel formlarının bulunması ile birlikte yapılan fonksiyon çalışmaları, bu genlerin hastalık patogenezindeki olası etkilerini ve moleküler mekanizmasını büyük ölçüde aydınlatmaya yönelik olmuş ve bu konuda büyük gelişme kaydedilmiştir(55). Genetik etkiler:

Charcot’un PH tanımından sonra hastalık etiyolojisinde sadece çevresel etkilerin değil genetik faktörlerinde rol oynayabileceği düşünülmeye başlanmıştır. 1900’lü yıllarda klinisyenler tarafından PH olgularında sıklıkla etkilenmiş akraba bireylerinin varlığının gözlenmesi ve ilerleyen yıllarda ise klasik mendel kalıtımı gösteren ailelerin farkedilmesi ile PH patogenezinde genetik faktörlerin rol oynadığı görüşü kesinleşmiş oldu. (56).

Mitokondri hasarı, oksidatif stres ve Übiküitin Proteozom Sistem (ÜPS) bozukluğu ailesel ve sporadik PH patogenezinin en temel nedenleridir ve karşılıklı etkileşimleri PH’yi doğurmaktadır.(Şekil 2-2)

Mitokondriyel Fonksiyon kaybı ve oksidatif stres:

Sporadik PH olgularının post-mortem incelemeleri sonucunda SNc'da lipit, protein ve DNA moleküllerinde oksidatif hasar olduğunun gözlenmesi mitokondri fonksiyonun PH patogenezi üzerine olan etkisini göstermekteydi (57). Mitokondri fonksiyon bozukluğundan kaynaklanan artmış oksidatif stres ise hidrojen peroksit ve ROS(Reactive Oxygen Species) gibi serbest radikallerin birikimi ve bozulmuş antioksidan mekanizması ile ortamdan uzaklaştırılamaması sonucunda dopaminerjik nöron kaybına neden olmaktadır.

Mitokondriyel kompleks-1 aktivitesindeki düşüş PH patogenezindeki temel mekanizmalardan biridir. Solunum zinciri kompleks-1 bozukluğu azalmış ATP sentezine ve PH'da nöronal dejenerasyona neden olmaktadır. Nadir maternal geçiş gösteren hastalık formları mitokondri DNA'da meydana gelebilecek mutasyonlarında PH'ye neden olabileceği görüşünü doğurmuş ve yapılan maternal kaynaklı hibrit soylarıda bu tezi desteklemiştir. (58).

Epidemiyolojik çalışmalar, pestisit, MPTP ve diğer bazı çevresel toksinlerin sporadik PH olgularında Mitokondri kompleks-1 fonksiyonunu inhibe ettiğini göstermiştir.(59,60). MPTP'den farklı bir şekilde direk dopaminerjik hücreler tarafından alınmayan ama kompleks-1 defektine neden olan bir diğer çevresel toksin böcek ilacı ve bazı zehirlerin içinde bulunan rotenondur. Rotenon da spesifik nörodejenerasyona ve LB benzeri patolojik bulgulara neden olmaktadır. (61,62).

α -sinüklein agregatlarının mitokondri fonksiyon kaybına ve nöron ölümüne neden olan bir diğer faktör olduğu saptanmış ve yapılan hayvan modeli çalışmalarıyla desteklenmiştir (63,64).

PH patogenezi aydınlatmaya yönelik yapılan başka çalışmalarda parkin geni ile mitokondri fonksiyonu arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır. Oksidatif stres *S-nitrosilasyonunu* tetikleyerek parkinin übiküitin ligaz aktivitesini ve nöro-koruyucu fonksiyonunu bozmaktadır. Mitokondri ile ilişkili bir başka gen ise bir mitokondriyel kinaz olan PINK1'dir. PINK1 mitokondriyi proteozom inhibisyonuna bağlı fonksiyon kaybına karşı korumaktadır. (65,66)

2.4. Genetik geçişli Parkinson hastalığı ve sınıflandırılması

PH olgularının yaklaşık %10-15'i pozitif aile hikayesi olan ve klasik mendel kalıtımı gösteren bireylerden oluşmaktadır. Birçoğunda başlangıç yaşı PH'nin sporadik formlarına göre daha düşük olmasına rağmen ailesel PH'nı sporadik PH'den ayıran bir başka özel klinik yada semptomatik presentasyon bulunmamaktadır. Genetik geçişli Parkinson Hastalığı; Otozomal Dominant PH (ODPH) ve Otozomal Resesif PH (ORPH) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

Şimdiye kadar PH ile ilişkili 11 genetik lokus tanımlanmış ,bazı kaynaklara göre bu sayı 13'e çıkmaktadır ve yalnızca 6'sının geni belirlenebilmiştir. Bu genler ve özellikleri tablo-2-7'de özetlenmiştir.

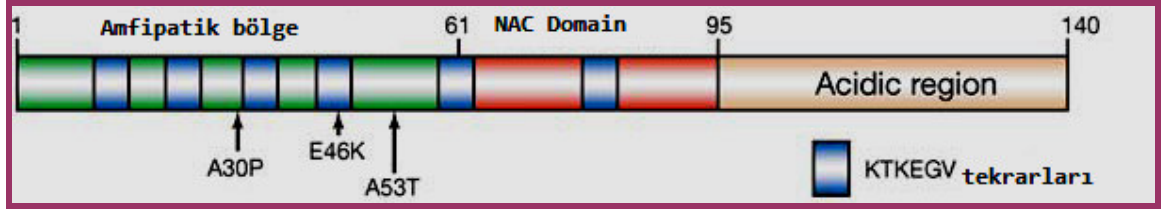
Otozomal dominant kalıtım paterni gösteren üç gen tanımlanmıştır. Bunlar, α -sinüklein, LRRK2 VE UCHL-1 genleridir. UCHL-1 geninin PH ile ilişkisi halen tartışmalı olmasına rağmen ilişkili genler arasına dahil edilmektedir.

PARK1/ α -sinüklein:

Otozomal dominant geçiş gösteren geniş bir ailede ,4. kromozomun uzun kolunda haritalanan ilk PH genidir. Şimdiye kadar yalnızca 3 farklı tek nokta mutasyonu tanımlanmış olup sporadik olgularda saptanmamıştır(74,75)Bunlar; A30P, E46K, A53T'dir. Mutasyonları nadir olsa dahi kodladıkları proteinin PH patolojisinin en temel bulgularından biri olan LB oluşumunda kritik rol oynaması yönünden büyük önem taşımaktadır. Yukarıda bahsedilen nokta mutasyonlarından başka duplikasyonlar ve triplikasyonlarda görülmektedir ve triplikasyonu durumunda toksik etki göstermektedir, klinik bulgulara ise demans eklenmektedir (76,77).

α -sinüklein geni mutasyonu taşıyan PH hastalarının klinik presentasyonu tipik İdyopatik PH'den demans varlığı, erken başlangıç yaşı ve hızlı hastalık süreci gibi özellikleri ile ayrılmaktadır(78,79).

α -sinüklein proteini ise beyinin çeşitli bölgelerinde eksprese olan ve presinaptik sinir terminalinde lokalize küçük bir proteindir.(Şekil-2-3) PH patofizyolojisindeki etkisi henüz tam olarak aydınlatılabilmiş olmamasına rağmen ÜPS'i bloke ederek proteolitik aktiviteyi bozduğu görüşü yaygın bir kanıdır (80).



Şekil 2-3: α -sinüklein proteini ve tanımlanan nokta mutasyonlarını gösterir şekil

Lokus/gen	Kalıtımı	Başlangıç yaşı	Patolojisi	Kromozomal Lokalizasyonu	Geni
PARK1	Dominant	~40	LB ile birlikte nigral dejenerasyon	4q21	α -sinüklein
PARK2	Resesif	20-40	LB oluş olmaksızın nigral dejenerasyon	6q25	Parkin
PARK3	Dominant	~30	Nigral dejenerasyon ve LB benzeri inklüzyonlar	2p13	?
PARK4	Dominant	~30	Nigral dejenerasyon ile birlikte LB oluşumu ve hipokampusdaki nöronlardaki bozukluklar	4q21	α -sinüklein triplikasyonları ve duplikasyonu
PARK5	Dominant	~50	Patoloji tanımlanmamış	4p14	Übiküitin C-Terminal Hidrolaz L1 (UCHL-1)
PARK6	Resesif	30-40	Patoloji tanımlanmamış	1p35-37	PINK1
PARK7	Resesif	30-40	Patoloji tanımlanmamış	1p38	DJ1
PARK8	Dominant	60	Çeşitli sinüklein ve tau patoloji	12 cen	LRRK2
PARK9	Resesif	20-40	Patoloji tanımlanmamış	1p36	ATP13A2
PARK10	Dominant	50-60	Patoloji tanımlanmamış	1p32	?
PARK11	Dominant	Geç baş.	Patoloji tanımlanmamış	2p34	?
PARK12	X-bağılı	Geç.baş.	Patoloji tanımlanmamış	Zq21	?
PARK13	Dominant	Geç. Baş.	Patoloji tanımlanmamış	2p12	HTRA2

Tablo 2-7:GGPH’da rol alan genetik lokuslar ve gen bölgeleri. (73).Otozomal dominant geçişli Parkinson hastalığı

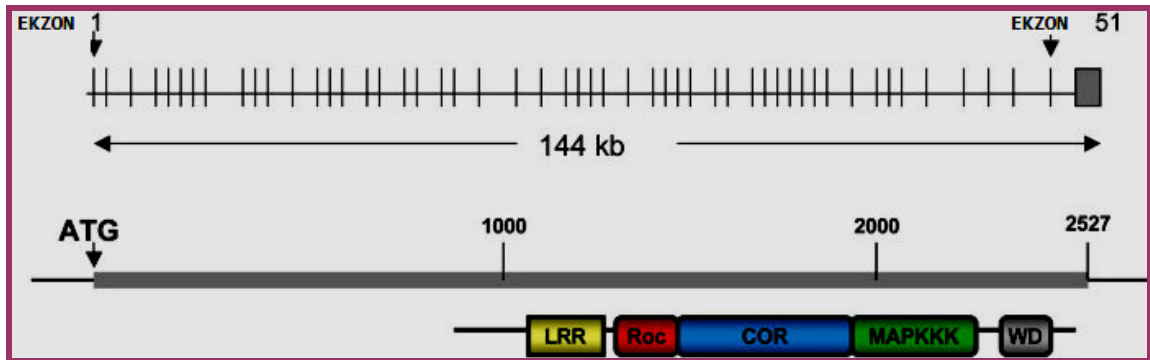
PARK8/LRRK2(*Leucine Rich Repeat Kinase 2*) Geni:

PH'nin bir diğer dominant formu geniş bir Japon ailede 12. kromozomun perisentromerik bölgesinde haritalanmış ve PARK8 olarak adlandırılmıştır. Sonrasında yapılan çalışmalar ise PARK8'deki tek nokta mutasyonlarının LRRK2 geninde meydana geldiğini göstermiş, kodladığı proteine de “dardarin” denmiştir (81).144 kb'lık bir bölgeyi kaplayan LRRK2 geni 51 ekzon ve 2527 amino asit'ten oluşmaktadır. LRRK2 tüm beyinde eksprese olan bir protein olmasına rağmen, periferik dokulardaki ekspresyon düzeyi düşüktür.

LRRK2 geni mutasyonlarının otozomal dominant PH olgularındaki sıklığı dikkat çekici olmuştur. En sık rastlanan G2019S mutasyonu Avrupa toplumunda ailesel vakaların %5-6'sını, sporadik vakaların ise %1-2'sini oluşturmaktadır. G2019S mutasyon sıklığı Askenazi Yahudileri ve Güney Afrikalı Araplar gibi genetik olarak izole toplumlarda ise %20-30'lara çıkmaktadır(82).

PH ile ilişkili diğer tek gen mutasyonları değişken hastalık fenotipleri gösterirken LRRK2'ye bağlı mutasyonlar tipik İdyopatik PH fenotipi göstermektedir. Bunun yanında çok değişken bir patojenik etki göstermektedir; kimi olgularda klasik nigral dejenerasyonla birlikte, LB oluşumu gözlenirken bir kısmında taupati agregasyonu olabilmektedir.

LRRK2 geninin kodladığı “dardarin”, biri Roc bölgesi ve diğeri COR bölgesi olmak üzere iki adet korunmuş bölge içeren ve ROCO proteinleri olarak bilinen yeni tanımlanmış bir protein ailesine dahildir. LRRK2 mutasyonları ise yüksek derecede korunmuş fonksiyonel olarak önemli bu bölgelerde meydana gelmektedir ve son deneysel çalışmalar patojenik mutasyonların artmış kinaz aktivitesi ile olası ilişkisini göstermektedir.



Şekil 2-4: LRRK2 geninin şematik yapısını gösterir şekil.

2.4.1. Otozomal resesif geçişli Parkinson hastalığı

Şimdiye kadar mutasyonu halinde Otozomal Resesif Parkinson Hastalığına yol açtığı bulunmuş 3 gen bildirilmiş olup bunlar; Parkin, PINK1 ve DJ1 genleridir(Tablo:2-8)

	PARK2	PARK6	PARK7
Lokus	6q25-27	1p35-36	1p36
Gen	Parkin	PINK1	DJ1
Kalıtım	Resesif	Resesif	Resesif
Mutaston sayısı	>95	>17	>9
Mutasyon tipi	ekzonik duplikasyon,delesyon ve insersiyonlar, nonsense ve missense mutasyonlar	İnsersiyoniyon,delesyon, Nonsense ve missense mutasyonlar	ekzonik delesyonlar ve missense mutasyonlar
Lewy body	İki olgu haricinde rastlanmamıştır	?	?

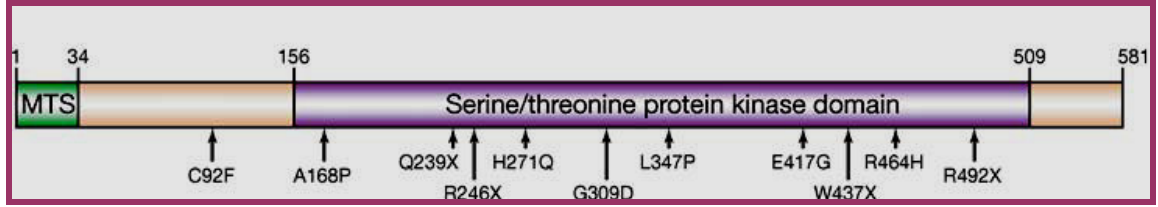
Tablo 2-8:Otozomal Resesif geçiş gösteren PH genleri ve özelliklerini gösterir tablo.

PINK1:

PINK1 geni 581 amino asitden oluşan, mitokondriyel hedefleme motifi ve korunmuş serin-treonin kinaz domaini olan bir proteini kodlamaktadır (Şekil 2-5).

PINK1 mutasyonları Otozomal resesif PH olgularında parkin genine oranla çok daha az sıklıkta görülmektedir(yaklaşık %1-2).

PINK1 geninin mitokondriyel fonksiyon ve oksidatif stresle olan ilişkisi özellikle PH patogenezinde büyük öneme sahiptir. Bu görüşü destekler şekilde hücre kültürü çalışmaları PINK1 mutasyonlarının hücrel stres koşullarında mitokondriyel membran potansiyelini değiştirdiğini göstermiştir (83). PET çalışmaları aynı parkin geninde görüldüğü gibi heterozigot PINK1 mutasyonu taşıyan asemptomatik bireylerde nigrostriatal anomaliler saptamış ve haplo yetersizliğin patogeneizde nedensel bir faktör olabileceği sorusunu akla getirmiştir.



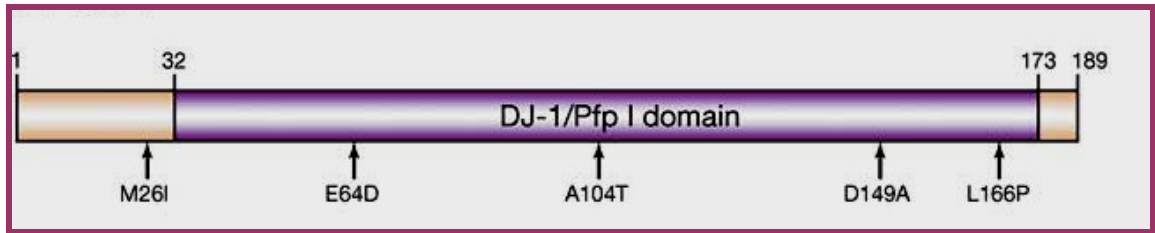
Şekil 2-5:PINK1 proteinini ve sıklıkla mutasyon saptanan bölgelerini gösterir şekil.

DJ1:

İlk olarak Otozomal resesif geçiş gösteren Avrupalı iki ailede tanımlanmış olan DJ1 (PARK7;MIM#602533) geni, antioksidan, transkripsiyonel ko-aktivatör ve şaperon aktivitesi olan, 189 amino asitten oluşan iyi korunmuş bir proteini kodlamaktadır (84)(Şekil 2-6)

DJ1 mutasyonları ORPH olgularının yaklaşık %1'ini içine alıp, ekzonik delesyon ve *splice-site* mutasyonlarından oluşmaktadır (85).

DJ1 proteininin normal fonksiyonu ve patogeneze olan etkisi henüz aydınlatılabilmiş olmamasına rağmen oksidatif stres ve mitokondriyel fonksiyonda görevli olduğu düşünülmektedir.



Şekil 2-6: DJ1 proteininin yapısal domainlerini ve şimdiye kadar bulunmuş olan patojenik mutasyonlarını gösterir şekil.

2.4.1.1. Parkin Geni tanımı

Parkin geni ilk olarak 1998 yılında Otozomal Resesif Jüvenil başlangıçlı PH olgularında bağlantı analizi ve pozisyonel klonlama yöntemi ile tanımlanmış, 12 ekzondan oluşan büyük bir gendir(86). Genin (PARK2;MIM#600116) kodladığı protein 465 amino asitten oluşmakta olup, N-terminalinde übiküitin benzeri bir bölge(UBL), C-terminalinde Ring-finger motifi içeren iki bölge ve bunların arasında da IBR bölgesi bulunmaktadır(87)(Şekil 2-7).

Parkin geni mutasyonları ailesel olguların yaklaşık %50'sinden ve 20 yaş altı (<20) sporadik olguların ise yaklaşık %50'sinden sorumludur. (88)

Parkin geni mutasyonları sporadik PH olgularından farklı bir hastalık fenotipi göstermektedir. Aşağıda Parkin genine bağlı PH olgularında görülen klinik özellikler sıralanmaktadır(Tablo-2-9). Klinik fenotip değişse dahi yapılan birçok çalışma özellikle erken başlangıç yaşı, bulguların daha simetrik ortaya çıkması, levodopaya verilen çok iyi derece yanıt gibi bazı özelliklerin Parkin'e bağlı ORPH'da belirleyici tanı kriterleri olduğunu ortaya koymaktadır (89).

Parkin genine bağlı PH olgularının klinik özellikleri:

<40 yaş altı başlangıç yaşı

Normal bilişsel özellikler

Sıklıkla ayaklarda görülen distoni (vakaların %44)

Erken denge bozukluğu ve *festinasyon* tarzı yürüme

Levodopaya iyi derece yanıt, doza bağlı motor ve psikiyatrik bozukluklar

Bazı hastalarda antikolinerjiklere karşı çok iyi cevap

Yavaş hastalık süreci

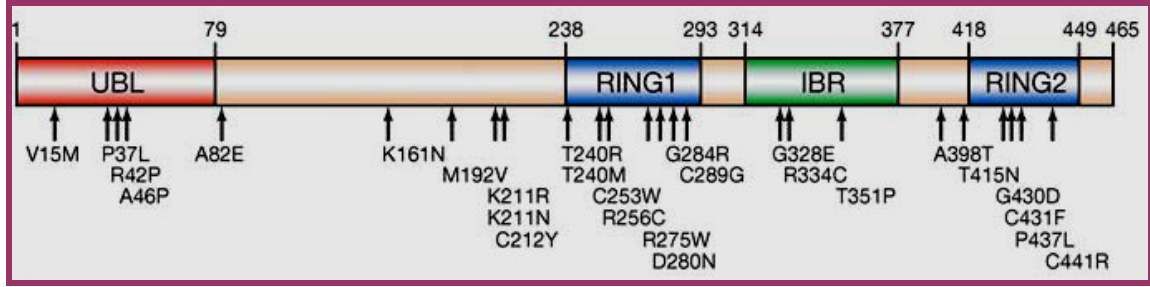
Tablo 2-9:Parkin genine bağlı PH olgularının klinik özelliklerini gösterir tablo.

Parkin mutasyonu taşıyan olgularda görülen klasik histopatolojik bulgular ise, *Substantia nigra ve locus coeruleus*'da görülen dopaminerjik hücre kaybı, PH'nin karakteristik bulgularından olan LB oluşumunun ise gözlenmemesidir. Şimdiye kadar yapılan patolojik incelemeler sonucunda parkin geni *compound* heterozigot mutasyonu taşıyan iki olguda LB oluşumu gözlenmiş olup bu değişimin neden kaynaklandığı bilinmemektedir. Bunun yanında serebral korteks'de tau patolojisi gözlenmesi bir diğer atipik bulgusudur. Tüm bu patolojik farklılıkların Parkin mutasyonlarının E3 protein ligaz aktivitesinde yarattığı farklı etkilerden kaynaklandığı düşünülmektedir (90,91,92).

Şimdiye kadar parkin geninde delesyon, duplikasyon, missense ve nonsense mutasyonlardan oluşan yaklaşık 95 farklı mutasyon tanımlanmış olup bu sayı her geçen gün yenilerinin eklenmesi ile artmaktadır. Tanımlanan bu mutasyon frekansları etnik orijine ve yapılan çalışmada kullanılan deneysel yaklaşımlara göre farklılık göstermektedir (93).

Parkin geni mutasyonlarının otozomal resesif geçiş göstermesi, mutasyonun her iki allelde de var olması durumunda, işlev kaybı mekanizması ile hastalık nedeni olacağı görüşü şimdiye kadar yaygın bir kanı olmasına rağmen, heterozigot parkin mutasyonu taşıyan etkilenmiş PH olgularının varlığı haployetersizliğin de patogeneizde rol oynayabileceği görüşünü doğurmuştur. Bu görüşü doğrular nitelikte olan bir çalışmada, asemptomatik heterozigot parkin mutasyonu taşıyan bireylerde yüksek derecede striatal dopaminerjik fonksiyon kaybı saptanmıştır (94). Ayrıca heterozigot parkin mutasyonu taşıyan olgularda geç başlangıç yaşı belirlenmiş, tek bir allelde meydana gelen mutasyonun hastalık etkeni olduğu belirlenmiş ancak hastalığın şiddetinde ve başlangıç yaşında, homozigot taşıyıcılara göre farklılıklar gözlenmiştir. Sonuçta heterozigot taşıyıcıların daha geç başlangıçlı bir hastalık tablosu çizdiği saptanmıştır (95).

Şimdiye kadar parkin geninde meydana gelen tek nokta mutasyonlarının proteinin fonksiyonel bir bölgesinde meydana gelmesi durumunda patojenik bir etki gösterdiği ve erken başlangıçlı PH'na neden olduğu belirtilmiş olsa dahi, farklı mutasyonların farklı patolojik etkiler yaratması ve parkin geni mutasyonlarının çok geniş bir spektrumda olması genotip-fenotip korelasyonunu zorlaştırmaktadır (95). Örneğin sadece C-terminal RING2 domaininde amino asit değişikliğine neden olan yanlış anlamlı mutasyonların parkinin katalitik etkisini değiştirdiği yapılan deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır (96,97).



Şekil 2-7: Parkin proteini ve sıklıkla mutasyon saptanan bölgelerini gösterir şekil.

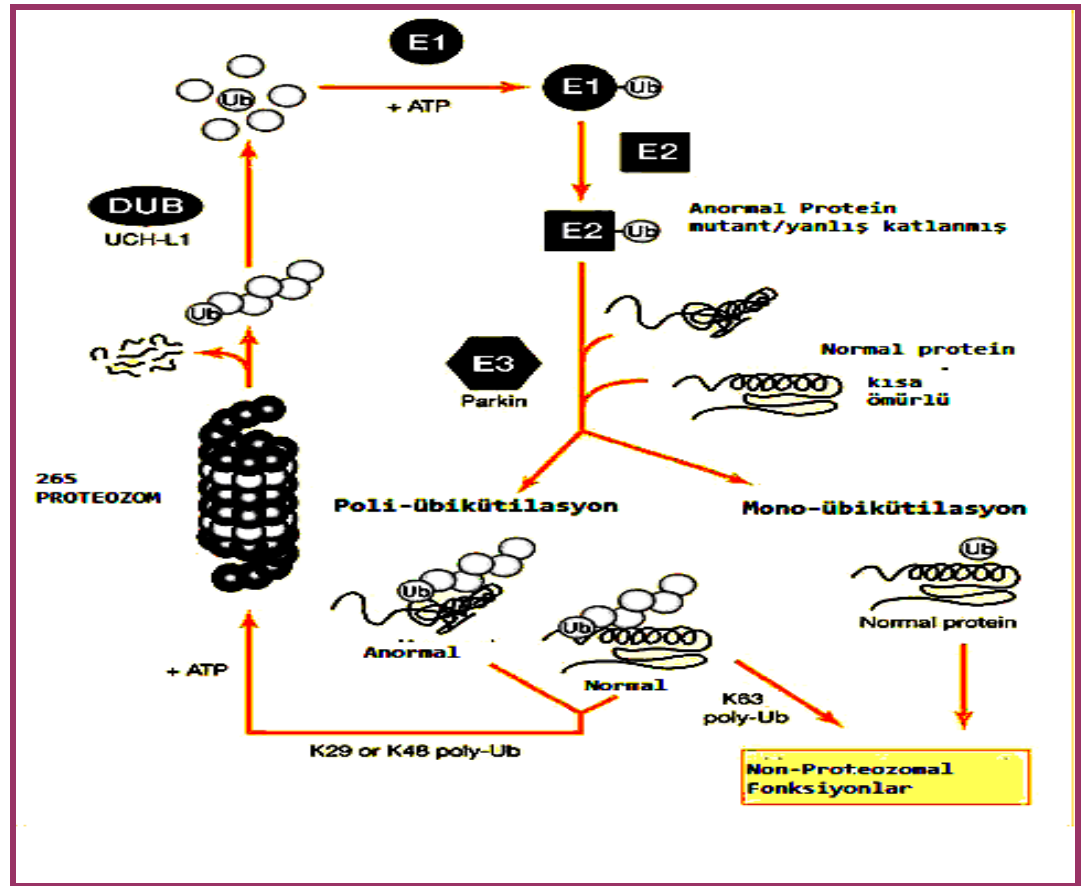
2.4.1.2. Hastalık patogenezi olan katkısı

Parkin geninin kodladığı protein 465 amino asitten oluşmakta olup, N-terminalinde übiküitin benzeri bir bölge(UBL), C-terminalinde Ring-finger motifi içeren iki bölge ve bunların arasında da IBR bölgesi bulunmaktadır. Parkin proteini de diğer RING-finger içeren proteinler gibi E3-übiküitin protein ligaz özelliğindedir(98). E3-übiküitin protein ligazlar hedef proteinlere übikütini kovalent bir şekilde bağlayan hücresel sistemin önemli bir parçasıdır(99). Protein übikütilasyonu , übiküitin aktive edici enzim (E1), übiküitin-konjüge edici enzim(E2) ve übiküitin bağlayıcı (E3) enzimin sıralı ve koordine bir şekilde çalışması sonucu gerçekleşmektedir. Her bir übiküitin monomerinin bir öncekinin alıcısı lizin bölgesine kovalent bir şekilde sıralı bağlanması sonucunda poli- übiküitin zinciri oluşmaktadır. Poliübiküitin zinciri K29 ve K48 sinyal mekanizması ile ATP bağımlı 26S proteozom sisteminde transfer edilir ve küçük peptid yapılarına ayrılır. Poli-übiküitin zinciri UCHL1 enzimi gibi übiküitin serbest bırakıcı enzim tarafından monomerlere ayrılır ve übikütilasyon sistemine tekrar dahil edilir. Normal proteinler ise K63 bağlı zincir ile poli übiküitine yada mono übiküitine olabilmektedir ve DNA tamiri, endositoz, protein trafiği ve transkripsiyon gibi mekanizmaların dahil olduğu non-proteozomal sistemlerde görev alabilmektedir.

Parkin geninde meydana gelen mutasyonlar proteinin fonksiyonel bölgesinde bir değişikliğe neden olduğunda enzimin substrata yada E2'ye bağlanma aktivitesini düşürmektedir. Aktivitesi azalmış olan enzim proteozomal yolda düzgün çalışmadığı için degrade olamayan proteinlerin agregasyonu gerçekleşir ve son olarak nöron ölümü ile sonuçlanır. Tüm bu nedenlerden dolayı parkin geni substratlarının tanımlanması ve dopaminerjik hücre kaybında olası etkilerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır. İn-vitro hücre kültürü çalışmalarında olası parkin substratları tanımlanmıştır.

Parkin substratlarından bir diğeri ise Nuclear Factor-kB sinyal yolağında çalışan , IKK α 'dır ve çalışmalar parkinin bu yolakta nöro koruyucu faktör olduğunu göstermiştir. (100)

Diğer bir başka çalışma ise parkinin C-Jun N-terminal kinaz yolağında negatif düzenleyici olarak görev aldığı yönündedir (101).



Şekil 2-8: ÜPS sistemini gösterir şekil. Proteozomal ve non-proteozomal yolakta parkin işlevini açıklayan diyagramı göstermektedir. K29 ve K48 poliübikütilasyonla proteozomal mekanizmada etkin iken K63 ile proteozomal olmayan yolakta etkilidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1.1.Hasta Grubu

İ.Ü. İ.T.F. Nöroloji A.D. Davranış Nörolojisi ve Hareket Bozuklukları Birimi tarafından izlenmekte olup UKPDS ("*United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank Clinical Diagnostic Criteria*") Ölçütleri'ne göre klinik olarak Parkinson Hastalığı tanısı almış olan veya bu ölçütleri karşılamasa dahi başka bir etyoloji ile ilişkilendirilemeyen bir "atipik parkinsonizm" veya "parkinsonizm-plus" sendromu olan hastalardan çalışma hakkında bilgilendirildikten sonra yazılı olarak gönüllü onayı alınan 69 Parkinson Hastası bu çalışmaya dahil edilmiştir.

Hastalardan 10 ml periferik kan örneği steril ETDA'lı tüplere alınarak ve DNA izolasyon kiti kullanılarak genomik DNA elde edilmiştir.

PH Özellikleri	Aile Sayısı	Yaş Ortalaması	Kesin PH	Olası PH	Olanaklı PH
ORPH	32	50±5	%99	%0.5	%0.5
Sporadik	37	43±5	%99	%1	-
Aile Hikayesi olan	11	55	%99	%0.5	%0.5
Aile Hikayesi olmayan	58	43±5	%99	%1	-
Toplam (n=69)	69	49±5	%99	%0.5	%0.5

Tablo 3-1:Hasta ailelerinin özelliklerini gösterir tablo.

3.1.1.2..Kontrol Grubu

Kontrol grubu için Parkinson Hastalığı tanısı almamış veya bu ölçütleri karşılamasa dahi başka "parkinsonizm" yada "Parkinson-plus" sendromu olmayan sağlıklı bireyler kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Hastalardan 10 ml periferik kan örneği steril ETDA'lı tüplere alınarak ve DNA izolasyon kiti kullanılarak genomik DNA elde edilmiştir.

3.1.1.3.Gönüllü Bilgilendirme Formu Örneği

Çalışmanın Adı: ” Otozomal Resesif Geçişli Parkinson Hastalığında PARK2 (PARKİN) Geni Mutasyonlarının Araştırılması”

Araştırılacak olan hastalığa neden olduğu düşünülen gende mutasyon polimorfizm taraması yapılacaktır. Böylece hastalığın ilgili gendeki mutasyonlar ile muhtemel ilişkisi araştırılmış olacaktır.

Tezin amacı; Otozomal resesif geçiş gösteren parkinson hastalığında; ilişkili olduğu düşünülen PARK 2, geninde mutasyon araştırılması ve klinik tanıya yardımcı bir tanı metodu oluşturulmasıdır.

Tez kapsamında ailesel ve erken başlangıçlı olduğu görülen hastalardan 10 ml periferik kan örneği alınacaktır Alınan kan örneğinden DNA izolasyonu yapılarak saklanacaktır. Oluşturulan bu bankada kişi isimleri kullanılmayacak örnekler numaralı olarak korunacaktır. DNA örneklerinde DHPLC(Denaturing High Performance Liquid Chromatography) metodu kullanılarak Parkin genindeki mutasyonlar saptanacak ve Türk toplumu için bir mutasyon profili oluşturulacaktır. DHPLC yöntemi; DNA üzerindeki farklı bölgeleri saptamaktadır.

Araştırmadan beklenen tıbbi yarar hastalığın erken tanısı ve ailesel genetik taramaların mümkün olabileceğidir. .

Araştırmadan beklenen tıbbi yarar hastalığın erken tanısının ve ailesel genetik taramaların mümkün olabileceğidir.

Projenin öngörülen süresi 1 yıldır.Çalışma; İstanbul Üniversitesi Nöroloji A.B.D Davranış ve Hareket nörolojisi bilim dalı ile ortak yürütülecek, hasta örneklerinin sağlanması ve bilgilerinin toplanması konusunda yardım alınacaktır.

Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizin psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.

Elde edilen genetik bilgi sonuçları şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacak olup sadece size ve hekiminize bildirilecek üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

Araştırmada 30 Otozomal Resesif Geçişli Parkinson Hastası ile 30 sağlıklı gönüllü yer alacaktır.

Yapılması planlanan genetik incelemeler için sizden maddi destek talep edilmeyecektir.

Sayın Dr..... tarafından (kurum adı)..... (anabilim dalı adı, ünite adı vb.)’da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr.....(Doktor ismi),(telefon ve adres) ‘ten arayabileceğimi biliyorum. (Doktor ismi, telefon ve adres bilgileri mutlaka belirtilmelidir)

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı-soyadı, İmzası, Görevi

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz

Big-Dye Terminator Sekans Analiz kiti

DNA İzolasyon kiti (50 örneklik maksit kit)

Etil alkol

Etidyum Bromid

Hİdi Formamid

HD-500 Size standart marker

MLPA Kit (SALSA MLPA Kit P051/P052 Parkinson; MRCHolland;

www.mrc-holland.com)

Proteinaz K

Sephadeks-50

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı ve Derin Dondurucu (+ 4 °C ve -20 °C Uğur,)

CCD kamera-bilgisayar donanımı (Mitsubishi-Machintosh)

Çalkalamalı su banyosu (Memmert)

Çalkalayıcı (shaker) (Memmert)

Çeker Ocak (Kermanlar)

DHPLC cihazı (Transgenomic)

Distile su cihazı (Milipore)

Elektroforez aleti (Owl)

Etüv (Heraeus)

Güç kaynağı (Ec Appatus Corporation)

Hassas terazi (Shimadzu)

Hibridizasyon fırını (Techne)

Homojenizatör (Heidolph)

Horizontal beyaz ışık kaynağı (Fotodyne)

Isı bloğu	(Vive scientific)
Masaüstü mini santrifüj	(Eppendorf)
Otomatik pipetler	(Gilson)
PZR cihazı	(Borad)
PH metre	(Corning)
Soğutmalı santrifüj	(Heraus)
Sekans Cihazı (Genetic Analyser)	(ABI 3730)
Spektrofotometre	(Labomed)
UV- transluinatör	(Fotodyne)
UV-crosslink	(Stratagene)

3.1.4.Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Yükleme Tamponu

6X agaroz jel yükleme tamponu

% 25	Bromfenol mavisi
% 30	Gliserol

50 X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA)

Tris baz:	242 g
Glasiyal asetik asit:	57.1 g
EDTA (0.5M):	100 ml

Distile su ile 1 lt'ye tamamlandı ve otoklav ile steril edildi.

5 X TBE (Tris baz-Borik asit-EDTA)

Tris baz:	60.57 g
Borik asit:	30.90 g
EDTA (0.5M):	40 ml

Sephadeks-G50 Solüsyonu:

Sephadeks-G50	2,5 g
---------------	-------

Distile su ile 50 ml'ye tamamlandı ve çalkalanarak +4°C'de muhafaza edildi.

3.2 YÖNTEM

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu “DNA izolasyon kiti” kullanılarak yapılmıştır.

Yöntem aşağıdaki gibidir:

- 10 ml periferik kan örneği steril EDTA’lı tüpe alındı.
- Steril 50 ml’lik falkon üzerine 500 µl proteinaz K ve 10 ml kan örneği eklenerek vorteks edildi. Üzerine kırmızı hücreleri parçalayan bir çözelti olan *Buffer BL* 12 ml eklendi ve birkaç dakika vorteks edildikten sonra 10 dakika 70°C’de inkübe edildi.
- Üzerine presipitasyon için 10 ml %99’luk Etil alkol eklendi ve tekrar 5 dakika vorteks edildi.
- Fitreli falkonlara aktarıldı ve 3000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilerek, 3 sefer tekrar edildi .Her seferinde dipte kalan hücre membran kalıntılarını ve protein kalıntılarını içeren süpernatant atıldı.
- Fitre üzerlerine 5 ml *Washing Buffer 1* eklendi ve 1 dakika 5000 rpm’de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası filtre üzerine 5 ml *Washing Buffer 2* eklendi ve 5000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi.
- Genomik DNA ‘nın toplandığı filtrelerin alkolden kurtulması için 10 dakika 70°C’de inkübe edildi.
- Filtreler temiz falkona alındı.
- Mikrolitrede 100 ng genomik DNA veya daha fazla olacak şekilde ilk seferde 1000 µl *Buffer AE* eklendi , oda ısında 5 dakika beklendi ve 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. İkinci sefer de 800 µl *Buffer AE* eklendi 5 dakika oda ısısında beklendi ve 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.

- Toplamda 1800 µl elde edilen genomik DNA iki farklı alikot yapılarak, 2 farklı ependorf tüpüne alındı. Birinci ependorf *Working* olup erken aşamalarda kullanılmak üzere saklanacak 600 µl Genomik DNA örneğini içerdi. İkinci ependorf *stok* olup, uzun süreli gelecekte kullanılacak çalışmalar için hazırlandı ve geri kalan 1200 µl genomik DNA bu ependorfa alındı.
- Hazırlanan iki alikot ependorf üzerine hasta kodu, tarihi ve DNA konsantrasyonu, gerekirse bazı durumlarda izolasyonu yapan kişinin ismi yazıldı.
- DNA örnekleri uzun süreli kullanım amaçlı -20°C’de saklandı. Kısa süreli kullanım için hazırlanan *working* ependorflar ise +4 °C’de saklandı.

DNA Konsantrasyonu Ölçümü:

DNA konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazında ölçüldü. Başlangıçta 2 µl dH₂O ile cihazın çalışması kontrol edildi, ölçüme başlamadan DNA’nın çözüldüğü solüsyonla cihaz sıfıra ayarlandı ve 2 µl DNA örneği ile ölçüm yapıldı.

Cihaz otomatik olarak 260/280 nanometrede yaptığı ölçüm değerlerini, DNA konsantrasyonunu hesapladı ve 260/280 değeri 1.8 olanlar ideal temiz DNA olarak kabul edildi.

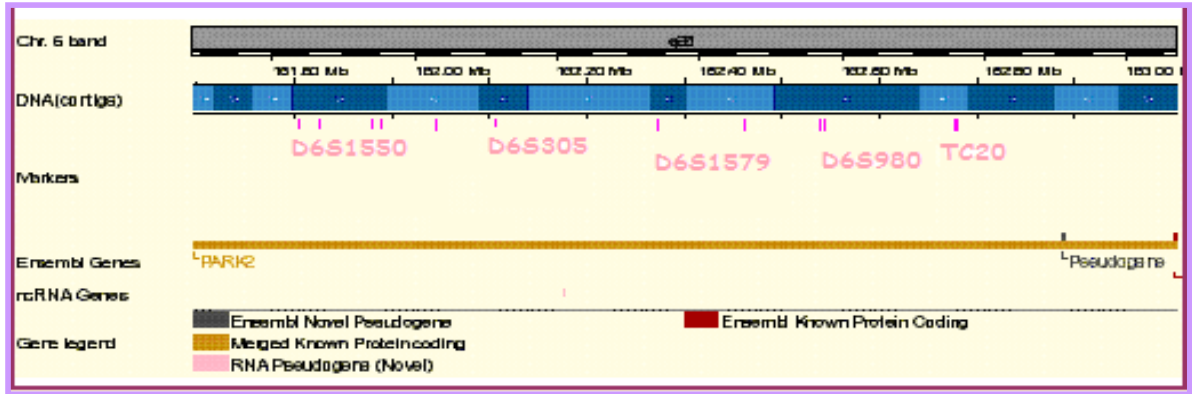
3.2.2.Mikrosatellit Haplotip Analizi

3.2.2.1.Tanım

Mikrosatellit yada Short Tandem Repeat (STR) markerlar , 1-4 nükleotidlik genom üzerinde dağılmış baz tekrarları olup genellikle $(CA)_n$ seklindedir, tek yumurta ikizleri hariç her bireyde farklılık gösterirler. Mikrosatellit markerların bu özelliği bireyler arasındaki farklılığı anlamaya yardımcı olduğu gibi genetik bağlantı analizleri içinde en sık kullanılan deneysel belirteçlerdir.

Tez kapsamında Parkin geni; lokalize olduğu 6. kromozomun q26 bölgesine özgü mikrosatellit markerları ile tarandı. Haplotip bölgelere özgü mikrosatellit marker bölgeleri minimum rekombinasyon oranına göre dizayn edildi.

69 PH hastası aile, bu ailelerin tüm etkilenmiş olguları ve 23 etkilenmemiş aile bireyi, parkin genine özgü 5 mikrosatellit markerı ile taranmıştır.



Şekil 3-1: Mikrosatellit markerların 6. kromozomun q26 bölgesindeki yerleşimini gösterir tablo.(Ensembl ‘dan alınarak düzenlenmiştir.)

Mikrosatellit Markerları	Forward Sekans	Reverse Sekans	bp	Pozisyon	TM °C
TC20	CTTCCTTGCCCTCATGCACC	CATCCTGCAGCCTAAAGC	182	5'	63
D6S980	AGGGAGCCGAGATTGCAC	CTGAAGGGTGAGGAGTTTCT	292	5'	57
D6S305	CACCAGCGTTAGAGACTGC	GCAAATGGAGCATGTCACT	204	Intronik	55
D6S1550	TCAAGGGTACAATTCTCAAGTC	TTGTGGTGCAAAGTATTCAAGTC	132	İntronik	57
D6S1579	TACTCACACATGCACAGGC	CTTCCTACCCACATGCAG	161	3'	57

Tablo 3-2: Parkin geni haplotip analizlerinde kullanılan mikrosatellit markerları ve sekans özelliklerini gösterir tablo.

3.2.2.2. Mikrosatellite analizi deney düzeni:

Hasta grubuna ait genomik DNA örnekleri aşağıda belirtilen reaksiyon koşullarında çoğaltıldı (Tablo 3-2)

Mikrosatellit PZR Reaksiyon karışımı			
	Ci	Cf	1 x
			(µL)
Tampon 10X	10	1	2.5
MgCl ₂ 50mM	50	1.5	0.75
dNTP 25mM	25	0.2	0.2
Mikrosatellit F 20µM	20	0.4	0.5
Mikrosatellit R 20µM	20	0.4	0.5
Taq polimeraz (5U/µL)			0.1
dH ₂ O			16.45
DNA 20ng/µL			4
Volüm final			25

Tablo 3-3: Mikrosatellit PZR koşullarını gösterir tablo. Ci: Stok molaritesini, Cf: PZR reaksiyonu içinde kullanılan molaritesini ifade etmektedir.

PZR Koşulları

96°C	5 dakika		
96°C	30 saniye	}	35x
64-57°C	30 saniye		
72°C	45 saniye		
72°C	30 saniye		
15°C	∞		

Agaroz Jel Elektroforezi

PZR aşaması sonrası çoğaltılmış bölgenin kontrolü %2'lik agaroz jel elektroforezi ile yapıldı.

Agaroz Jelin Hazırlanması

%2'lik jel hazırlamak için, 1 gr agaroz tartılarak 50 ml TAE tamponunda karıştırıldı. Karışım, mikrodalga fırında ısıtılarak agarozun tam olarak çözünmesi sağlandı. Tam olarak çözünen karışımın 40°C'ye kadar soğuması için manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi. Yeterince soğuyan jele, çeker ocak içinde, pipet ile 1 µl etidyum bromid eklenerek karıştırıldı. Jel, önceden hazırlanan jel kabına hava kabarcığı bırakmayacak şekilde döküldü. Örnek sayısına uygun taraklar yerleştirilerek jel çeker ocakta donması için bekletildi.

Jelin Yüklenmesi ve Görüntüleme

Daha önce hazırlanan agaroz jeli, içinde yürütme tamponu TAE bulunan yürütme tankına, kuyular negatif kutba yakın olacak şekilde yerleştirildi. Taraklar kuyuların zarar görmemesi için dikkatlice çıkartıldı. 6X brom fenol mavisi ve gliserol içeren '*loading buffer*' solüsyonundan 1'er µl alınarak, 5 µl PZR ürünleri ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Tüm örneklerin ve uygun büyüklükte marker'ın yüklenmesini takiben 60-100 volt altında yaklaşık 45 dakika yürütüldü. İşlem sonunda jel U.V. ışığı altında CCD kamera ile görüntülendi

Genotipleme:

5 farklı mikrosatellit markerına özgü PZR örnekleri agaroz jel üzerinde kontrol edildikten sonra bant yoğunluklarına göre farklı PZR dilüsyonları yapıldı (Tablo 3-3)

Mikrosatellit markerları	PZR Dilüsyonları
TC20	1/50 dilüye edildi
D6S980	Dilüye edilmedi
D6S305	Dilüye edilmedi
D6S1550	1/50 dilüye edildi
D6S1579	Dilüye edilmedi

Tablo 3-4: Mikrosatellit PZR dilüsyonunu gösterir tablo.

Tüm dilüye PZR örnekleri aşağıda belirtilen oranlarda Formamid ve *size standart marker*'ı ile karıştırılarak *ABI 3730 genetic analyser* cihazına yükledi ve analizi yapıldı.

Genotipleme koşulları:

Reaktif	Reaksiyonda kullanılan miktarı
Formamid	12,85µl
HS 500 size standart	0,15µl
Toplam	13µl
PZR	1µl

Genotip Analizi:

Sonuçlar *Genemapper 3.5 software* programı kullanılarak analiz edildi.

3.2.3.DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*)

3.2.3.1.Tanım:

DHPLC yöntemi mutasyon taramalarında diğer yöntemlere göre daha hızlı ve güvenilir olması nedeni ile tercih edilmiştir. DHPLC, amplifiye edilen kromozomal fragmanlar arasında oluşan uyumsuzluklar ve bunların sonucu oluşan heterodupleks yapıların tanınması esasına dayanır. Mutasyon veya polimorfizm içeren tek zincir DNA molekülleri, yabanıl tip bir tek zincir DNA molekülü ile hibridize edildiğinde, heteroduplexler oluşur. Bu heteroduplekslerin erime sıcaklığı homoduplekslerden daha düşüktür. Kısmi eritilmiş heterodupleksler, yabanıl tip homoduplekslerden DHPLC sisteminde kolayca ayrılabilir. İlk aşamada 95°C'de 3 dk süre ile denatüre edilen DNA fragmanlarının ikinci aşamada özgül bir sıcaklıkta hibridizasyonu sağlanmaktadır. Farklı uzunluktaki DNA segmentleri UV ile saptanır. Farklılık gösteren nükleotid dizilerinin farklı pikler oluşturması beklenmektedir.

3.2.3.2.DHPLC Yöntem:

PZR :

69 Parkinson hastası aile bunların toplam 77 etkilenmiş aile bireyi DHPLC yöntemi ile taranmıştır.

Parkin geni 12 ekzon bölgesine özgü primerler kullanılarak PZR koşulları tablo 3-4'de belirtilen şekilde amplifiye edilmiştir. 12. ekzon bölgesi DHPLC analizi için çok büyük olduğu için daha önce başka bir çalışmada referans edildiği şekilde 5 bölgeye ayrılmıştır. Çalışmada kullanılan primerlerin bir kısmında gene aynı referans yayından alınmıştır, bazıları ise *primer3* primer dizayn programı kullanılarak dizayn edilmiştir(102,103).

Tüm hasta PZR ürünleri 1/1 oranında *wild type* (yabanıl tip) DNA örneği ile karıştırıldı ve 95°C'de denatüre edilip tekrar renatüre edilerek (1 saat'de 2 °C düşürülerek 25°C'ye indirildi) DHPLC cihazına yüklendi.

Ekzon No	Forward Sekans	Reverse Sekans	Erime ısısı™	DHPLC Sıcaklık ısıları
Promotor	GCATTGTTAAGCTCAGGGTCTCT	GTTAGAACTACGACTCCCAGCAGG	Touch Down(TD) 50-60	-
Ekzon 1	AGGCCTGGAGGATTTAAC	TCCCCAGCTCAGCGAGGCG	Touch Down(TD) 50-60	66.2°C
Ekzon 2	ATGTTGCTATCACCATTTAAGGG	CATGCCGCCTGCGCTGCCAATCT	55°C	59°C
Ekzon 3	ACATGTCACTTTTGCTTCCCT	GCAGTC TGCATGGAGCATGGCCT	59°C	60-57°C
Ekzon 4	ACAAGCTTTTAAAGAGTTTCTTGT	TGTGTACTAACATTGCCT	55°C	56-54°C
Ekzon 5	ACATGTCCTAAGGAGTACATTT	TGCAAGAAAAATGACATCTTC	59°C	56-55°C
Ekzon 6	AGAGATTGTTACTGTGGAACA	AGGATCTAAAAATAGCATCACTC	59°C	60-58°C
Ekzon 7	TGCCTTTCCACACTGACAGGTA CT	TCTCTAATGCTAATGAAGAACAGA	57°C	59-58°C
Ekzon 8	CGTCTGTGTCCTCCAAAAG	GCTAATGAGACAGTTTGGGC	55°C	59°C
Ekzon 9	GGGTGAAATTTGCAGTCAGT	TGCACATGGGCTGGGATTATATT	55°C	60-55°C
Ekzon 10	GACCCATCATCTGTAGCCCTG	AGGGACAAGGCATGTGAGCATT	58°C	59-55°C
Ekzon 11	ACAGGGAACATAAACTCTGATCC	TCTGAAGGTGCCTGGTGTGTTG	57°C	60-55°C
Ekzon 12(sek)	TTGTATTGCTTGTGATATTGG	CAGTGTCTACCTTCATTTTCTA	55°C	-
Ekzon 12a	TCTGAGACGACGGGACTGT	TTCCCCAGGAGAGACCTTCT	60°C	63-60°C
Ekzon 12b	CTGAAATCCAATCCATGTCAA	TGCTAATACATTTGGCTCCAC	58.3°C	61-55°C
Ekzon 12c	TTCTGGAAAGGCTCCTCTTT	AACTGCAGTGGGTTCTCCAAA	58.5°C	63°C
Ekzon 12d	TTTGA CTATTGCCTGGGGTT	GGAGCATACCAGTGTCTACC	Touch Down(TD) 50-60	63°C
Ekzon 12e	AACTGAAGAGTGTGTGTGCG	GAGCTGCCCTATTGTGCTTTA	58.5°C	61.4°C

Tablo 3-5:DHPLC ve sekans analizi için kullanılan primer sekansları, PZR Erime ısıları yada uygun Toch-down koşulları ve DHPLC koşullarını gösterir tablo.

<u>PZR Reaksiyon Karışımı : (Ekzon:2-4-9-10-12)</u>			
	Ci	Cf	1 x
Tampon 10X	10	1	2.5
MgCl2 50mM	50	1.5	0.75
dNTP 25mM	25	0.2	0.2
Primer F 20µM	20	0.4	0.5
Primer R 20µM	20	0.4	0.5
Taq Polimeraz (5U/µL)			0.1
H2O			16.45
DNA 20ng/µL			4
Volüme final			25
<u>PZR Reaksiyon Karışımı: (Ekzon: 3-5-6-7-8-11)</u>			
	Ci	Cf	1 x
Tampon 10X	10	1	2.5
dNTP 25mM	25	0.2	0.2
Primer F 20µM	20	0.4	0.5
Primer R 20µM	20	0.4	0.5
Taq polimeraz (5U/µL)			0.2
H2O			17.10
DNA20ng/µL			4
Volume final / puit			25
<u>PZR Reaksiyon Karışımı: (Ekzon: 1-promotor)</u>			
	Ci	Cf	1x
Tampon 10X (MgCl2)	10	1	2.5
Sol Q	5	1	5
dNTP 25mM	25	0.2	0.2
Primer F 20µM	20	0.4	0.5
Primer R 20µM	20	0.4	0.5
Taq Polimeraz (5U/µL)			0.2
H2O (qsp 21µL)			12.10
DNA 20ng/µL			4
Volüme final			25

Tablo 3-6: Sekans analizi için kullanılan her ekzon için farklı optimize edilmiş PZR koşullarını gösterir tablo.

3.2.4. Sekans Analizi:

Mikrosatellit analizler ve DHPLC sonuçlarına göre mutasyon taşıması ihtimal 30 etkilenmiş birey (bunların 7 tanesi mikrosatellit sonuçlarına göre homozigosite gösteren kalan 23 tanesi ise 30 yaş altı olgular) direkt sekans analizi yapılarak mutasyon tespiti yapıldı. Tüm primerler, sekansları, TM dereceleri ve DHPLC ısıları yukarda verilen tablo ile gösterilmiştir (Tablo 3-4).

PZR koşulları: Her ekzon için optimize edilmiş farklı PZR koşulları Tablo 3-4’de gösterilmiştir

PZR Pürifikasyonu:

Tüm PZR ürünleri agaroz jelde görüntüledikten sonra *Ekzo-sap* pürifikasyon yöntemi ile pürifiye edildi.

Ekzonükleaz I (20U/μL)	10U	0.5μl
SAP (1U/μL) (Shrimp Alkaline Fosfotaz)	2U	2μl
	Final volüm	2.5μl

- 2.5 μl reaksiyon karışımı tüm PZR örneklerine dağıtıldı.
- 37 °C’de 15 dakika ve 81 °C’de 15 dakika inkübe edildi.

Sekanslama Reaksiyonu:

Pürifiye edilen PZR ürünleri her ekzon bölgesi için ayrı optimize edilmiş sekanslama reaksiyonuna tabi tutularak analiz edildiler.

Ekzon	Prom_258	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pb	440	280	308	427	261	227	268	239	246	278	563	303	301
PZR (μL)	1.2	1	1	1.2	1	1	1	1	1	1	1.4	1	1

Tablo 3-7: Farklı ekzon bölgeleri için farklı volümlerde PZR ürünü kullanıldığını gösterir tablo.

	≤ 300 pb		$440 \leq x < 500$ pb		> 500 pb
dH ₂ O	6	dH ₂ O	5	dH ₂ O	4.6
Tampon 5X	2	Tampon 5X	2	Tampon 5X	2
Oligo	0.5	Oligo	0.8	Oligo	1
Big Dye	0.5	Big Dye	1	Big Dye	1

Tablo 3-8: Sekans analiz reaksiyon koşullarını gösterir tablo.

Sekans analizi koşulları:

96 °C	5 dakika	}
96 °C	10 saniye	
52 °C	5 dakika	
60 °C	4 dakika	
60 °C	7 dakika	}
10 °C	∞	

Sephadeks-G50 yöntemi ile Sekanslama Reaksiyonu Pürifikasyonu:

- *Big-dye terminator* sekans analiz yöntemi için *filtre plate*'ler kullanılmaktadır. Sephadeks-G50 solüsyonundan *filtre platelerin* her bir örnek kuyusuna 250 µl dağıtıldı.
- 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- İkinci defa sephadeks-G50 solüsyonundan 250 µl dağıtıldı.
- 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- 20 µl dH₂O filtre platelerin her bir örnek kuyusuna dağıtıldı
- 10 µl sekans reaksiyonu örnek kuyularına dağıtıldı.
- 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- *Sekans analiz plate'i ABI3730 genetic analyser* cihazına yüklenerek analiz edildi.

Sekans Analizi:

Yürütülen örnekler *Seqscape 5.0 sekans analyser* software'ı kullanılarak analiz edildi.

3.2.5.MLPA (Multiplex Ligation -dependent Probe Amplification) Metodu:

3.2.5.1. Tanımı:

PH bilinen yada henüz bilinmeyen birçok genetik lokusun rol oynadığı ve bu lokuslarda meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanan multigenetik bir bozukluktur. Şimdiye kadar PH ile ilişkisi bildirilmiş 13 genetik lokus tanımlanmış, bunlardan sadece 6 tanesinin geni belirlenebilmiştir. İlişkisi ispatlanmış olan bu genlerde nokta mutasyonları, delesyon, duplikasyon ve tripplikasyonları kapsayan çok çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu genlerin büyük genler olması ve mutasyon çeşitliliği PH'da mutasyon taramasını zorlaştırmaktadır. MLPA hızlı bir teknik olması yanında PH ile ilişkisi tespit edilmiş tüm bu gen bölgelerinin mutasyon taramasına imkan tanınması nedeniyle son zamanlarda tercih edilen bir yöntem olmuştur(104).

MLPA parkin ,SNCA ve PINK1 genlerinin tüm ekzon bölgelerinin, DJ1'ın 1,3,5-7 numaralı ekzonlarının, LRRK2'nin 2, 41 ,27 ,49, 1, 10 ve 15 numaralı ekzonlarının, ayrıca SNCA *A30P* ve LRRK2 *G2019S* mutasyonlarına özgü dizayn edilmiş problemlerin aynı anda amplifiye edilmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Yöntem iki aşamalı olup, Prob karışımları PH genleri ve mutasyonlarına özgü problemlere ek olarak sistemin doğru çalıştığının kontrolünü sağlayan kontrol problemlerinden oluşmaktadır.

Mikrosatellit sonuçlarına göre seçtiğimiz toplam 24 hasta örneği MLPA aşamasına dahil edilmiştir. Her reaksiyon için ilgili prob bölgelerinde mutasyon taşımadığı belirlenmiş 3 negatif kontrol ve Parkin geni ekzon 8 ve ekzon 9 bölgeleri için heterozigot delesyon taşıdığı belirlenmiş pozitif kontrol örnekleri kullanılmıştır.

MLPA yöntemi ; 3 deney aşamasından oluşmaktadır ve yaklaşık 18-20 saat sürmektedir. Her hasta örneği en az iki defa yüklenmiş ve kontrol edilmiştir.,

MLPA sonuçlarına göre homozigot delesyon saptanan hasta örnekleri, ilgili ekzon bölgesine özgü PZR yapılarak, %2'lik agaroz jele yüklenmiş ve kontrol edilmiştir.

Denetürasyon ve Hibridizasyon:

- Çalışmaya dahil edilen hastaların DNA örnekleri konsantrasyonlarına göre hazırlanarak ,her bir MLPA reaksiyonu için 200 ng DNA örneği; 98°C’de 5 dakika denatüre edildi.
- Denatürasyondan hemen sonra buz üzerine alındı optimum sıcaklık koşulları sağlandı.(25°C). Hibridizasyon reaksiyon karışımı aşağıdaki koşullarda hazırlandı:

Reaktifler	1x
SALSA probe karışımı (P051 yada P052)	1.5 µl
MLPA Buffer	1.5 µl

Tablo 3-9 Prob karışım oranını ve değerlerini gösterir tablo.

- Denatüre edilmiş DNA örnekleri üzerine 3 µl hibridizasyon karışımı dağıtıldı.
- 95 °C’de 1 dakika
- 60°C’de 16-18 saat arası inkübe edildi.

Ligasyon:

(Tüm aşamalar buz üzerinde yapılmıştır.)

- Ligasyon karışımı aşağıdaki koşullarda hazırlandı:

	1x
MLPA Rektif A	3.0 µl
MLPA Rektif B	3.0 µl
dH20	25.0 µl
Ligaz 65 enzimi	1.0 µl

Tablo 3-10: Ligasyon karışımını gösterir tablo.

- Probla hibridize edilmiş DNA örnekleri 54 °C ye getirildi ve 32µl ligasyon karışımı dağıtıldı.
- 54 °C’de 15 dakika ve 98 °C’de 5 dakika inkübe edildi.

PZR Reaksiyonu:

(Tüm aşamalar buz üzerinde yapılmıştır.)

- Ligasyon aşamasından sonra cihaz 60°C’ getirildi ve aşağıda koşulları belirtilmiş olan *pre-PZR* (PZR öncesi) karışımı 30 µl olacak şekilde hazırlanıp, ligasyonu tamamlanmış örneklerden PZR öncesi karışımı üzerine 10 µl dağıtıldı.

	1x
SALSA PZR Reaktifi	4.0 µl
dH2O	26.0 µl

Tablo 3-11: Pre-PZR karışımını gösterir tablo.

- 60°C ‘de 1-2 dakika inkübe edildikten sonra aşağıda koşulları belirtilmiş PZR karışımı hazırlandı ve 10 µl olacak şekilde dağıtıldı.

	1x
SALSA Primerler	2.0 µl
SALSA Enzim Dilüsyon buffer	2.0 µl
dH2O	5.5 µl
SALSA Polimeraz	0.5 µl

Tablo 3-12:PZR karışımını gösterir tablo.

- Cihaz 60°C’de iken SALSA PZR karışımı eklendi ve aşağıda koşulları verilmiş PZR koşullarında amplifiye edildi.

PZR koşulları:

96 °C	30 saniye	
60°C	30 saniye	} 35x
72°C	60 saniye	
72°C	20 dakika	
10°C	∞	

Genotipleme:

- PZR ürünü aşağıda belirtilen koşullarda hazırlanan *size standart marker* (büyüklük standartı markerı) ile karıştırıldı ve *ABI 3730 Genetic Analyser* cihazına yüklenerek genotiplendi.

	1x
Marker (500 HD)	0.3 µl
HiDi Formamid	9.0 µl

Tablo 3-13:Genotipleme amaçlı hazırlanan marker reaksiyonunu gösterir tablo.

- 9,3 µl size standart karışımının üzerine 1µl PZR karışımı dağıtıldı.
- Genotipleme *Genemapper 4.0* software'ı kullanılarak yapıldı. Hesaplama için negatif örnek değeri ile kıyaslama yapabilecek şekilde hazırlanmış bir hesaplama cetveli kullanıldı ve tüm sonuçlarda tanımlanan pik değerleri kontrol edildi.

3.2.6. İstatistik analiz

Hasta ve kontrol gruplarının istatistik analizleri SPSS 10.0 programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1.Mikrosatellit Analizi Sonuçları:

Mikrosatellit analiz sonuçlarına göre,

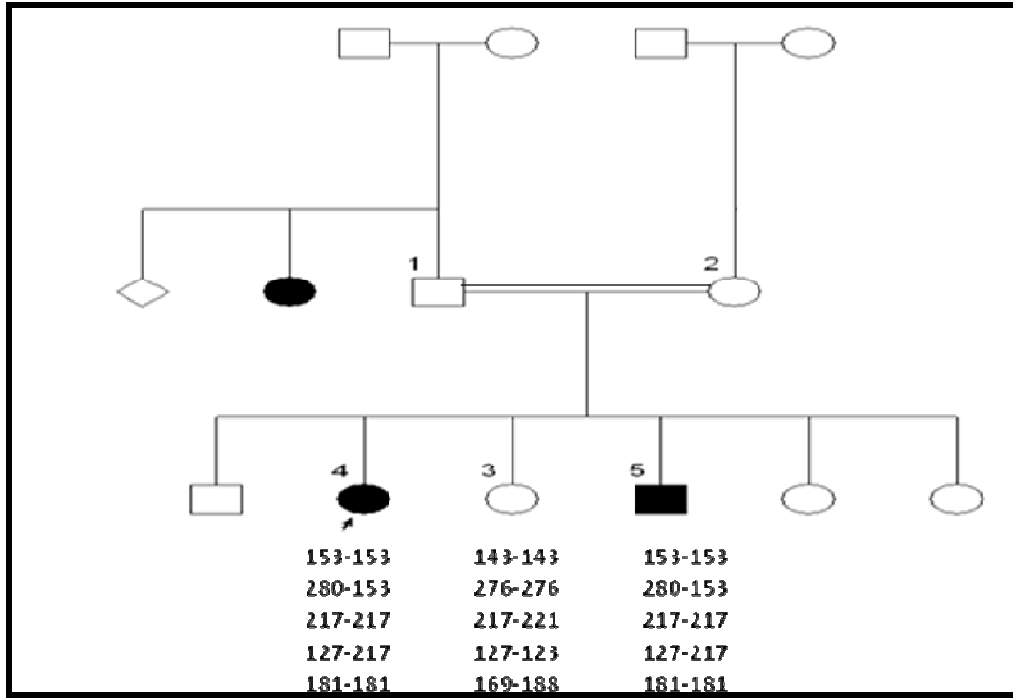
- Otozomal resesif geçiş gösteren iki ailede (081 ve 138) 5 mikrosatellit markerınında etkilenmiş aile bireylerinde homozigot geçiş gösterdiği ancak etkilenmemiş aile bireylerinde göstermediği tespit edildi.
- PH 109, PH 99 ve PH 105 numaralı olgularda da 5 mikrosatellit markerı için homozigosite saptandı.
- 055 numaralı aile 5 homozigot marker içinde homozigosite göstermedi. Bu ailenin etkilenmiş bireyinde Parkin geni ekzon3-4 *compound heterozigot* mutasyon saptanmasında bu veriyi doğrular nitelik taşımaktadır.

PH NO	D6S1579		D6S980		D6S305		D6S1550		TC20	
	Boyut1	Boyut2	Boyut1	Boyut2	Boyut1	Boyut2	Boyut1	Boyut2	Boyut1	Boyut2
081-004	153	153	280	280	217	217	127	127	181	181
081-005	153	153	280	280	217	217	127	127	181	181
081-003	143	143	276	276	217	221	127	123	169	188
099-005	143	143	280	280	203	203	123	123	176	176
105-002	155	155	280	280	203	203	123	123	169	169
109-007	143	143	280	280	229	229	127	127	181	181
120-008	143	143	280	280	217	217	127	127	181	181
138-003	145	145	286	286	227	227	131	131	168	168
138-006	145	145	286	286	227	227	131	131	168	168
138-014	143	159	287	287	219	219	123	123	181	181

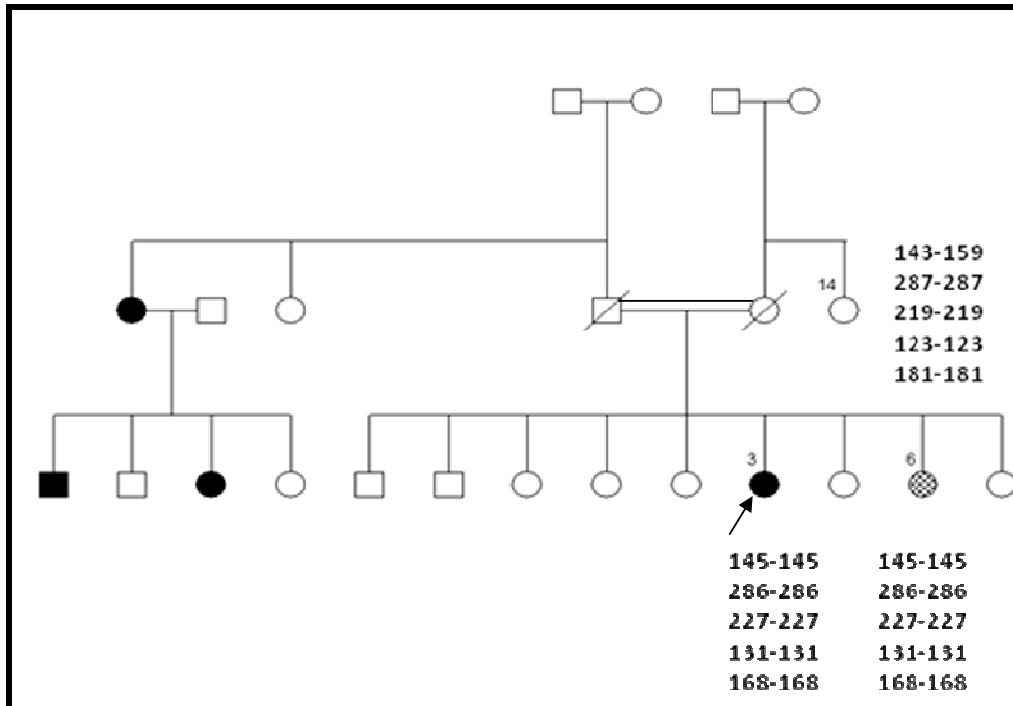
Tablo 4-1: Mikrosatellit değerlerini gösterir tablo.Yeşil renkli olanlar, aynı ailenin etkilenmiş bireylerini, turuncu renkli olanlar ise aynı ailenin etkilenmemiş bireylerini göstermektedir.

PD NO	D6S1579		D6S980		D6S305		D6S1550		TC20	
	Boyut1	Boyut2	Boyut1	Boyut2	Boyut1	Boyut2	Boyut1	Boyut2	Boyut1	Boyut2
055-008	143	153	283	308	213	219	127	127	178	181
055-003	143	153	276	283	213	217	124	124	178	181
055-007	143	155	294	308	217	225	117	127	181	181
055-009	153	155	283	294	213	227	117	123	180	181

Tablo 4-2: Mikrosatellit değerleri tüm bireyleri için heterozigot olan ve aynı haplotipi aktarmayan etkilenmiş bir ailenin genotip sonuçlarını gösterir tablo.



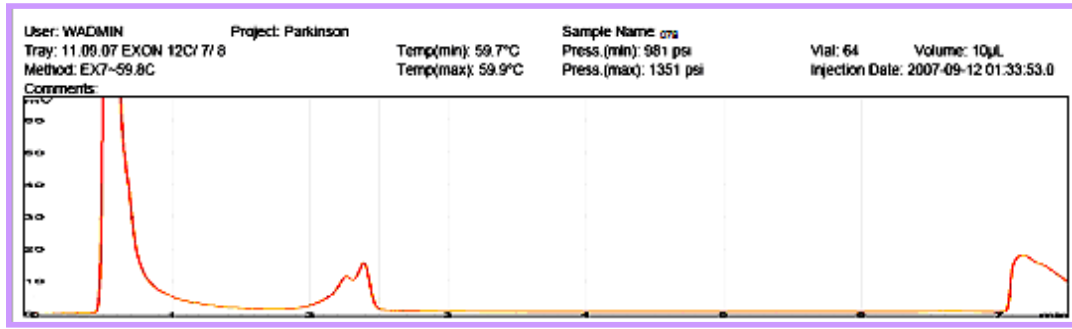
Şekil 4-1: 081 numaralı ailede haplotip geçişini gösterir aile ağacı.



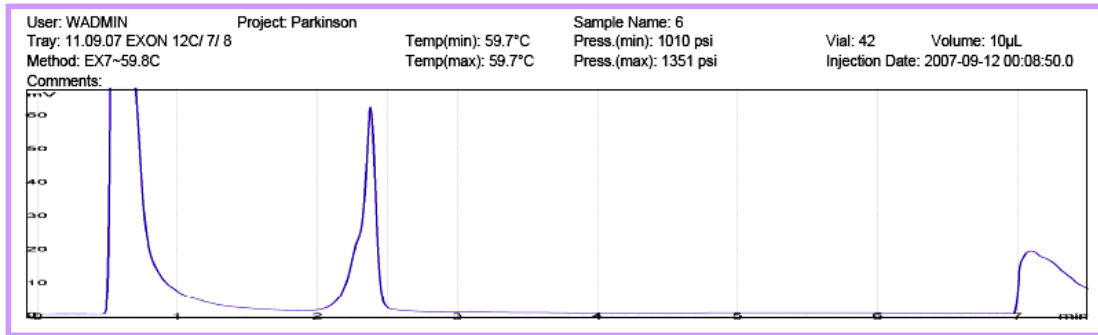
Şekil 4-2: 138 numaralı ailede haplotip geçişini gösterir aile ağacı.

4.2.DHPLC analiz sonuçları:

- DHPLC tek baz değişimlerini yüksek duyarlılıkta saptayabilen bir yöntem olması nedeniyle tez çalışmasında uygulanan yöntemler arasına dahil edilmiştir. Hem diğer yöntemlere göre duyarlılığı hemde ilerleyen dönemlerde bize sağlayacağı pratiklik yönünden test edilmiştir. Parkin geni mutasyon taramasına dahil edilen tüm olgular DHPLC yöntemi ile de taranmış ve farklılık gösteren örneklerin dizilemesi yapılmıştır
- DHPLC sonuçlarına göre 3 örnekte farklılık gözlenmiş, bu örneklerin dizileme sonuçlarına göre bir örneğin heterozigot mutasyon taşıdığı tespit edilmiştir. Şekil 4-3'de farklılık saptanan örneğin kromatogramı gösterilmektedir.



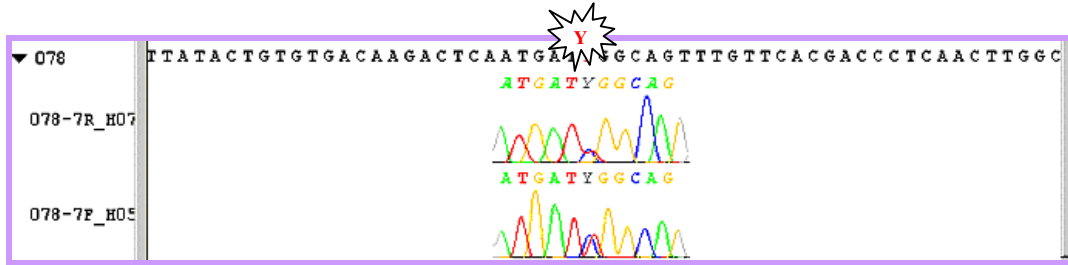
Şekil 4-3:Ekzon 7’de heterozigot mutasyon saptadığımız 078 numaralı ailenin etkilenmiş bireyinin kromatogram görüntüsü.



Şekil 4-4:Ekzon 7 bölgesinde mutasyon taşımayan bireyin kromatogram görüntüsü.

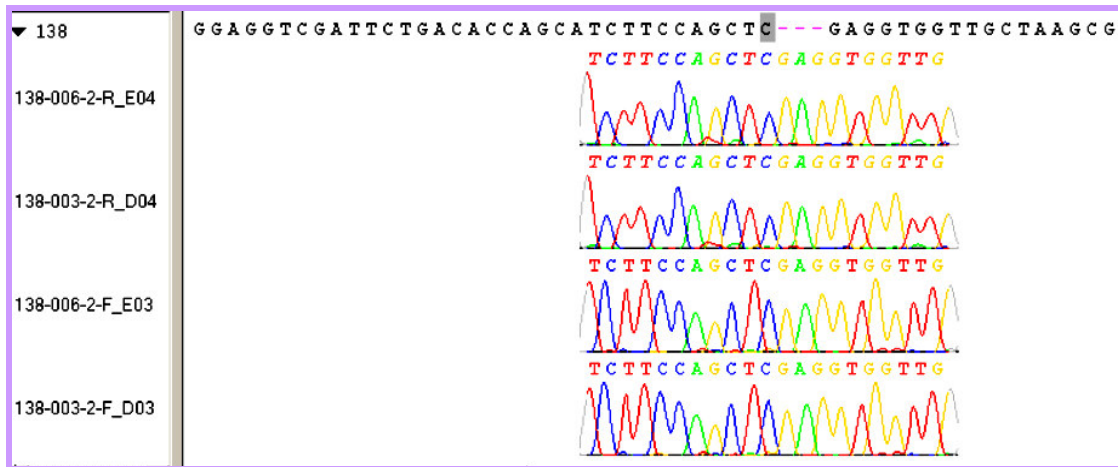
4.3.Sekans Analizi Sonuçları:

- Sekans analiz sonuçlarına göre sadece tek bir örnekte tek nokta mutasyonu saptanmıştır. Aynı örnekteki değişiklik öncelikle DHPLC analizi ile belirlenmiş ve dizi analizi sonuçlarında bu bulguyu desteklemiştir. 078 numaralı örnekte saptanan mutasyon heterozigot EX 7 Arg 275 Trp : c. 924 C>T değişimidir. (Şekil 4-6). Kontrol örneklerinde saptanmamış olmasına rağmen Avrupa toplumunda yapılan çalışmalar founder etkinin bu mutasyon sıklığında etkin rol oynadığını göstermektedir (108).

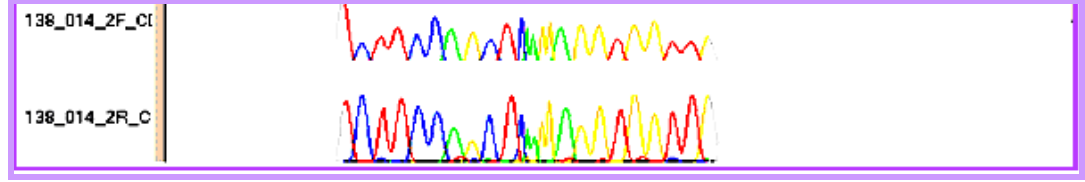


Şekil 4-5: 078 numaralı hastadaki heterozigot EX 7 Arg 275 Trp : c. 924 C>T mutasyonunu gösteren kromatogram.

- Mikrosatellit haplotip analizine göre homozigot geçiş gösteren 138 numaralı ailenin etkilenmiş bireylerinde “EX 2 c182-184 del AAG” delesyonu saptanmış olup ailenin etkilenmemiş diğer bireyi analiz edildiğinde delesyon bulunmamıştır. Kromatogramı şekil 4-7’de gösterilmektedir (Şekil 4-7,4-8)



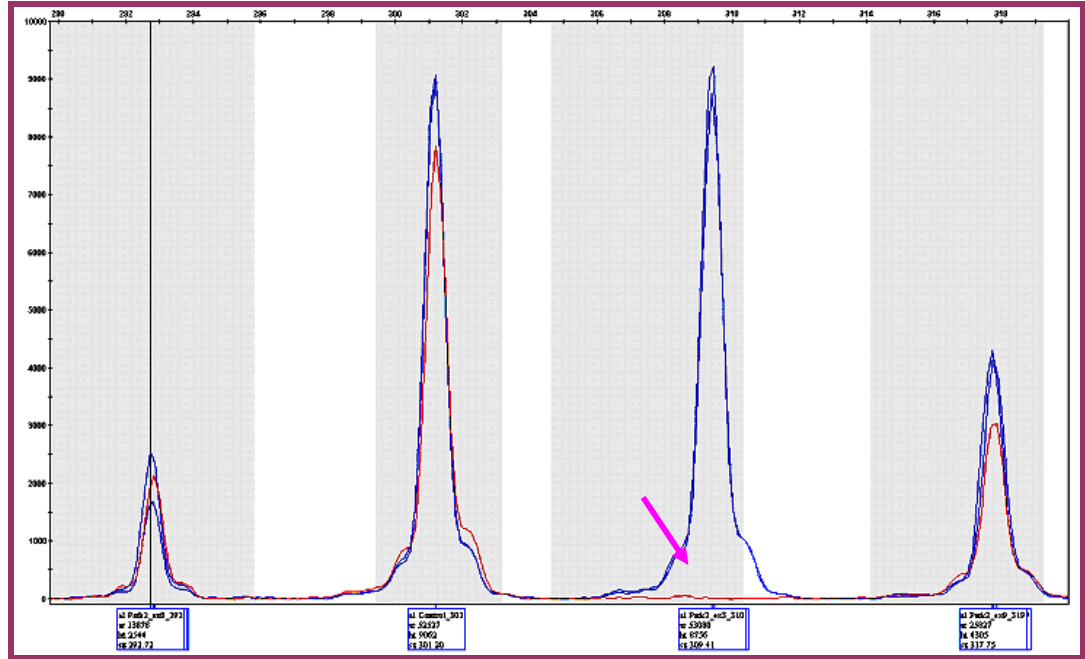
şekil 4-6: 138 numaralı ailenin iki etkilenmiş bireyinin kromatogram verisini gösterir şekil.



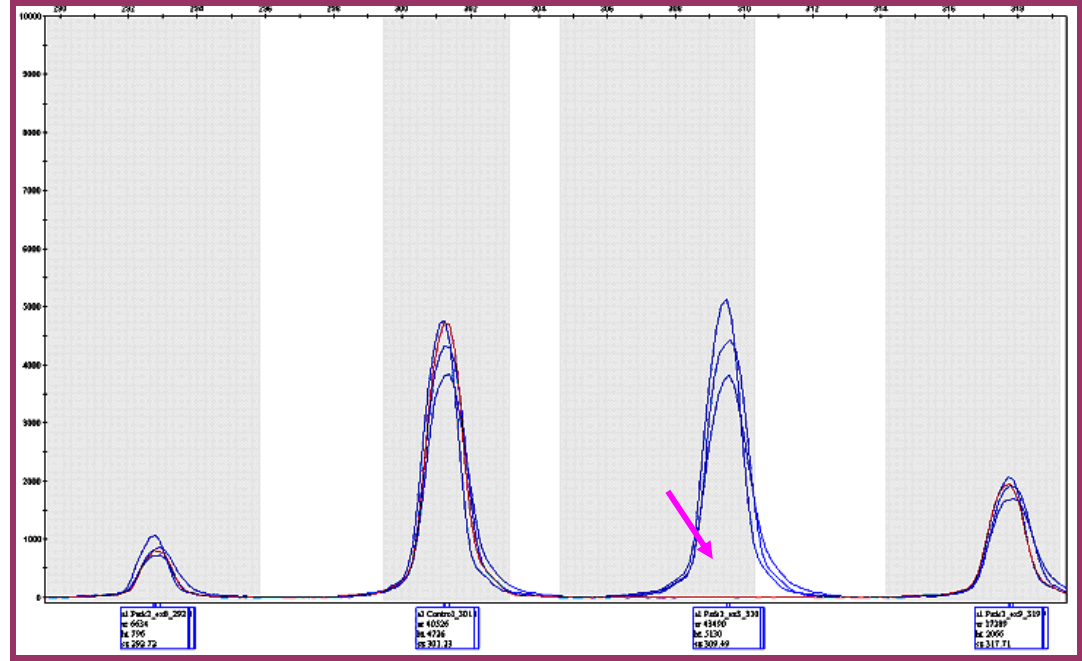
Şekil 4-7: 138 numaralı ailenin etkilenmemiş bireyinin kromatogram verisini gösterir şekil.

4.4. MLPA Analizi Sonuçları:

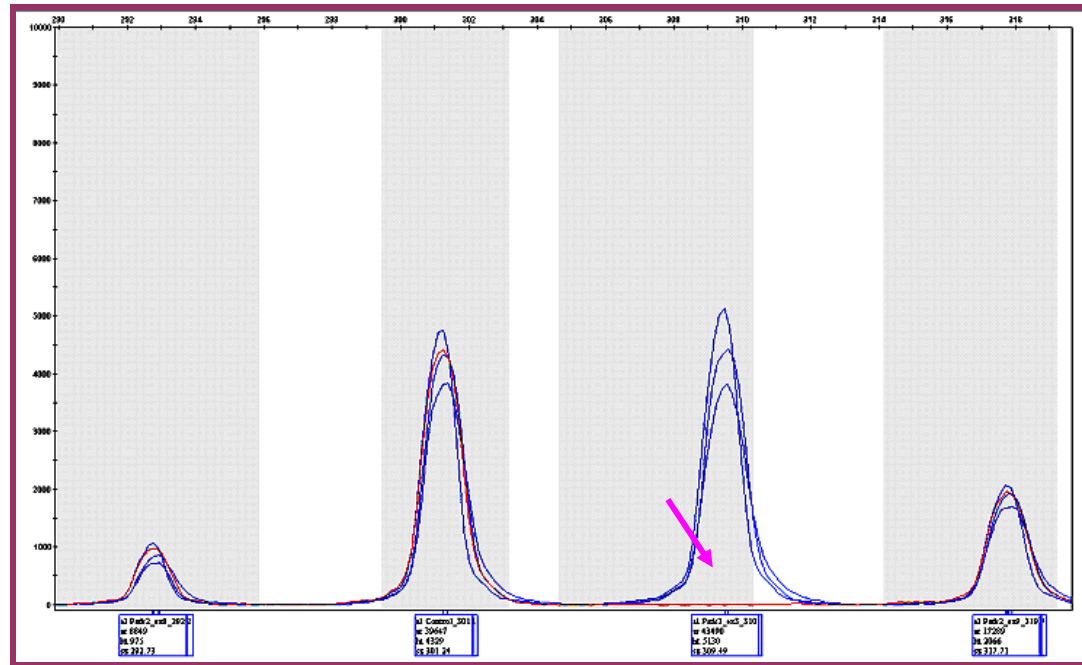
MLPA sonuçlarına göre ailesel geçiş gösteren 081 numaralı ailenin etkilenmiş 2 bireyinde homozigot ekzon 3 delesyonu ($\Delta 3 \Delta 3$), 109 ve 99 numaralı 2 indeks olguda homozigot ekzon 3 delesyonu ($\Delta 3 \Delta 3$), 105 numaralı diğer olguda homozigot ekzon 4 delesyonu ($\Delta 4 \Delta 4$), 055 ve 086 numaralı iki indeks olguda ise *compound* heterozigot ekzon3-ekzon4 ($\Delta 3 \Delta 4$) delesyonu saptanmıştır. Aşağıda kromatogram değerleri gösterilmektedir.



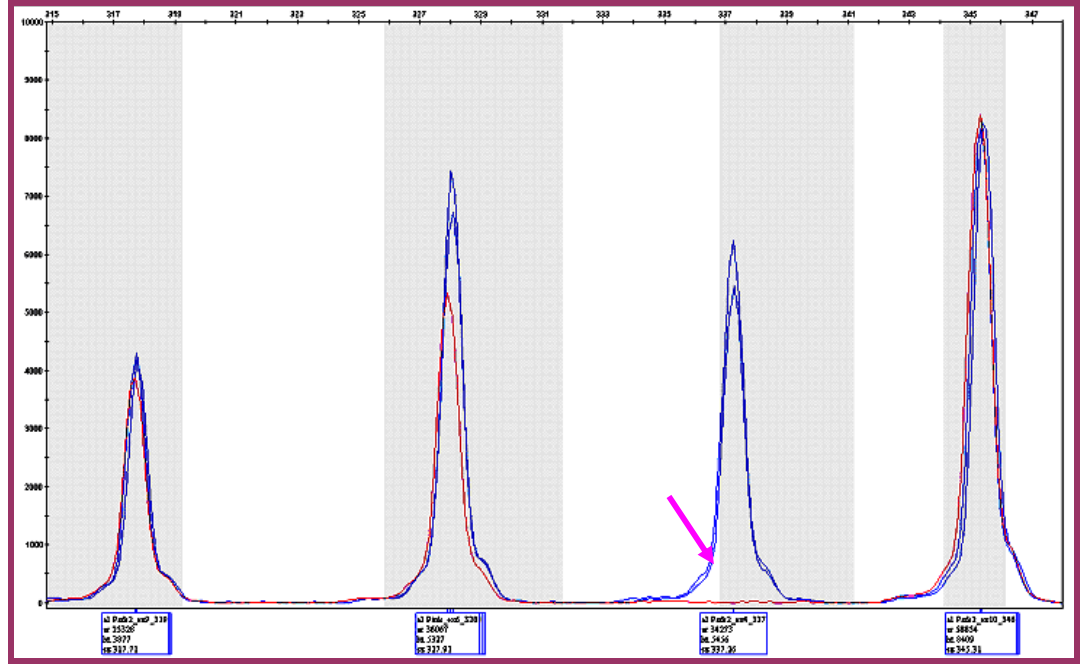
Şekil 4-8: 081-005 numaralı olguda amplifiye olmamış ekzon 3 bölgesini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon 3 bölgesine spesifik amplifiye olmamış prob bölgesini göstermektedir.



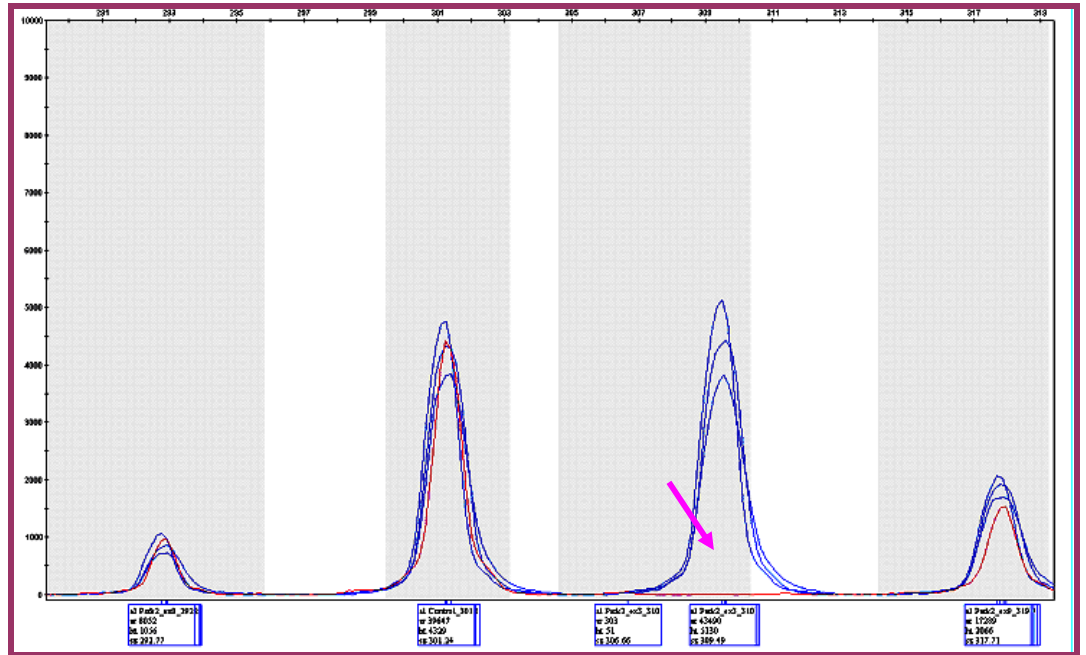
Şekil 4-9: 081-004 numaralı olguda amplifiye olmamış ekzon 3 bölgesini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon 3 bölgesine spesifik amplifiye olmamış prob bölgesini göstermektedir.



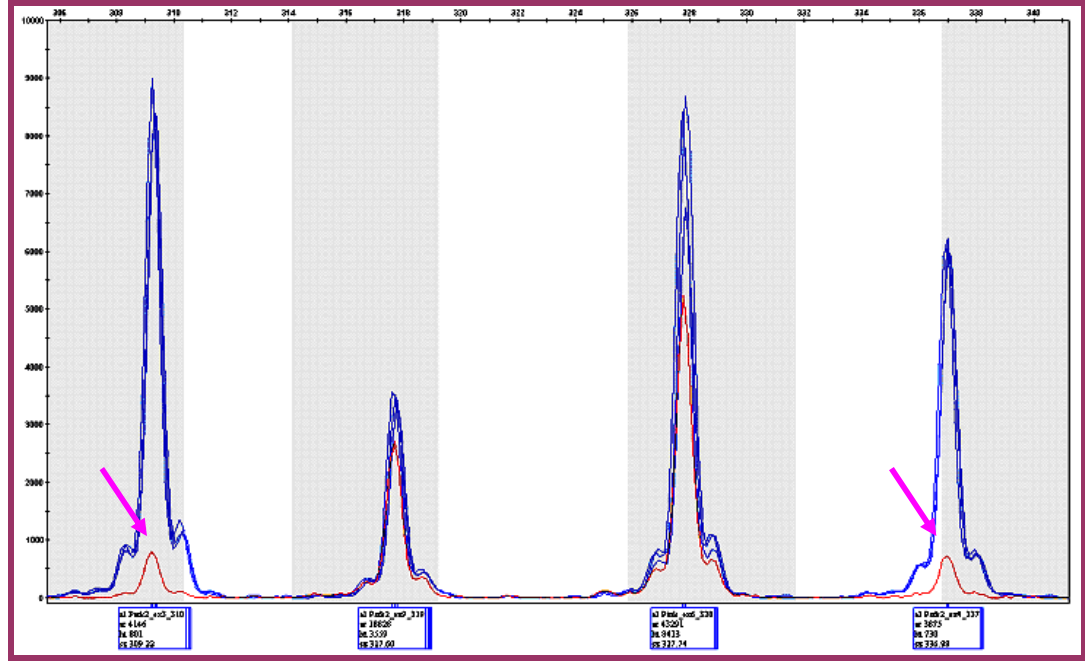
Şekil 4-10: 109 numaralı olguda amplifiye olmamış ekzon 3 bölgesini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon 3 bölgesine spesifik amplifiye olmamış prob bölgesini göstermektedir.



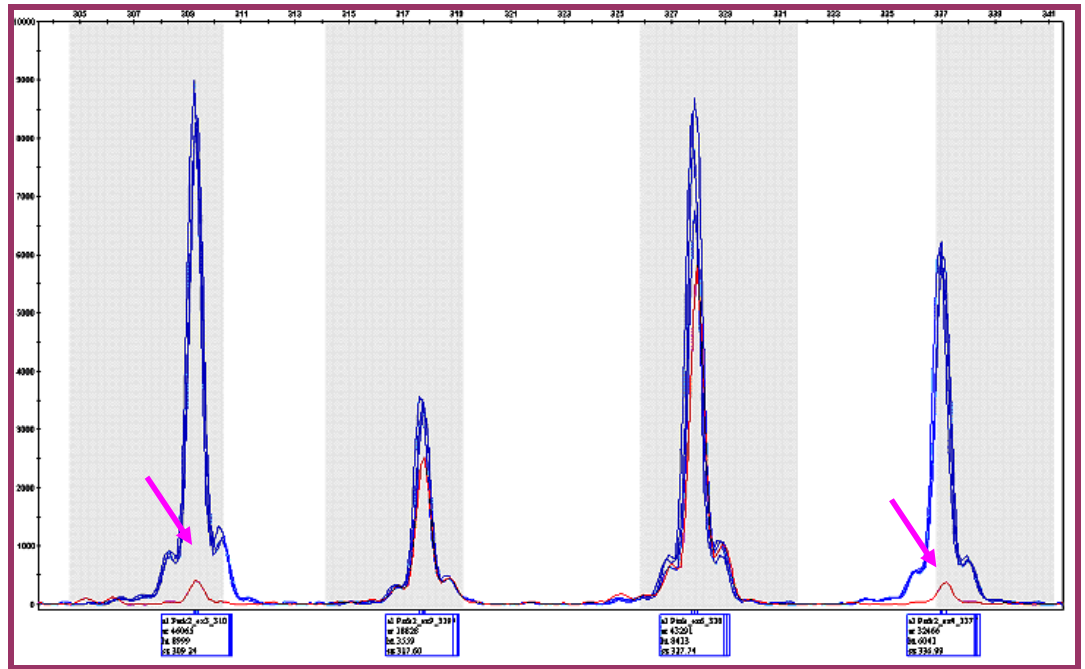
Şekil 4-11: 99 numaralı olguda amplifiye olmamış ekzon 3 bölgesini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon 3 bölgesine spesifik amplifiye olmamış prop bölgesini göstermektedir.



Şekil 4-12:105 numaralı olguda amplifiye olmamış ekzon 4 bölgesini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon 4 bölgesine spesifik amplifiye olmamış prop bölgesini göstermektedir.



Şekil 4-13:086 numaralı olguda heterozigot ekzon 3 ve ekzon 4 bölgelerini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon3 ve ekzon 4 bölgelerinde meydana gelmiş delesyonları göstermektedir



Şekil 4-14:055 numaralı olguda heterozigot ekzon 3 ve ekzon 4 bölgelerini gösterir kromatogram. Pembe ok ekzon3 ve ekzon 4 bölgelerinde meydana gelmiş delesyonları göstermektedir

4.5. Biyoinformatik Analiz Sonuçları:

138 numaralı hastada saptanan “EX 2 c182-184 del AAG” delesyonun patogeneze olan katkısını teorik olarak tespit etmek amaçlı biyoinformatik analizler yapıldı.

Öncelikli olarak NCBI’nin <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html> sayfasında doğru açık okuma kalıbı (*open reading frame*) belirlendi.

İkinci şamada NCBI’nin <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> sayfasında mutant örneğe ait translated nükleotid-protein blast yapıldı ve ilgili proteinde hangi bölgede değişiklik yaptığı belirlendi.

```

GENE ID: 5071 PARK2 | Parkinson disease (autosomal recessive, juvenile) 2,
parkin [Homo sapiens] (Over 100 PubMed links)

Score = 104 bits (260), Expect = 2e-21
Identities = 53/54 (98%), Positives = 53/54 (98%), Gaps = 1/54 (1%)
Frame = +3

Query 3      FVRFNSSHGFPVEVSDTSIFQL-EVVAKRQGVVPADQLRVIFAGKELRNDWTVQ 161
              FVRFNSSHGFPVEVSDTSIFQL EVVAKRQGVVPADQLRVIFAGKELRNDWTVQ
Sbjct 4      FVRFNSSHGFPVEVSDTSIFQLKEVVAKRQGVVPADQLRVIFAGKELRNDWTVQ 57

```



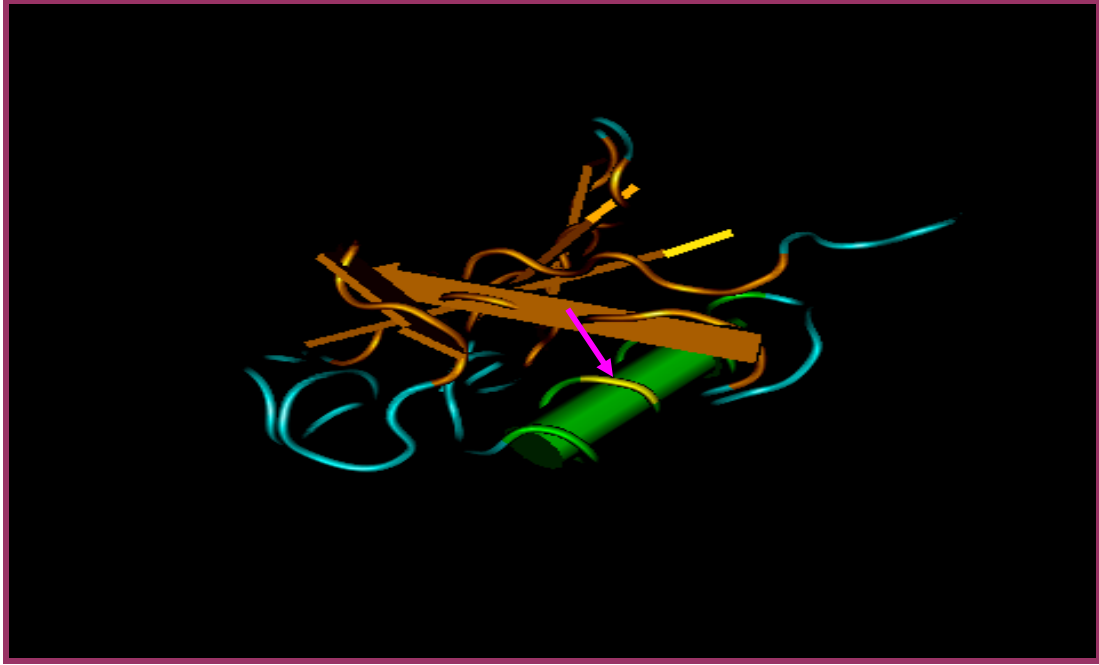
Şekil 4-15: “EX 2 c182-184 del AAG” delesyonunun parkin proteininin 26. lizin amino asitinin delesyonuna neden olduğunu gösterir blast analizi sonucu.

Proteinin evrim sürecinde korunmuş altyapılarını araştırmak için *Parkin geni conserved domainleri* incelendi ve delesyona uğramış amino asidin bu bölgedeki konumu belirlendi. Evrimsel süreçte yüksek derecede korunmuş bölgede olduğu saptandı.

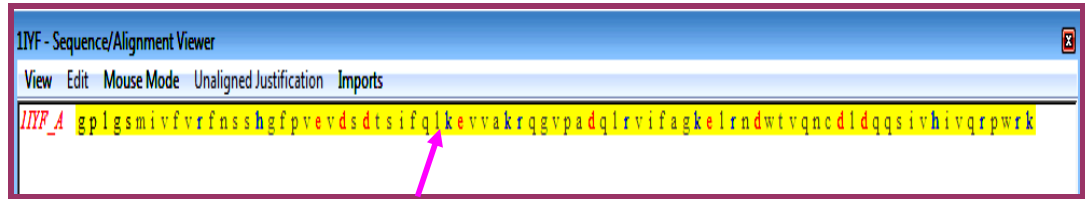
Feature 1		#
1IYF_A	8	VFVRFNSSHGFPVEVSDTSIFQLKEVVAKRQGVADQLRWIFAGKELRNDUTVQNCDLDDQ
query	3	VFVRFNSSHGFPVEVSDTSIFQLKEVVAKRQGVADQLRWIFAGKELRNDUTVQNCDLDDQ
IMG8_A	5	VFVRFNSSYGFPVEVSDTSILQLKEVVAKRQGVADQLRWIFAGKELPNHLTVQNCDELEQQ
gi 16198297	32	IYVKTNTGKTLTVNLEPQWDIKNVKELVAPQLGLQPD DLKIIFAGKELSDATTIEQC DLGQQ
gi 47222378	1	VIVRYNLGPVVVEVQEEATVAELKEVVARQQGVQPERLRVLFAGRELKSTSTLQGPSCWDD.
gi 31248006	57	VYVKTNTGNTLAVDLEPHMDIKDVKEVAPRLGLEPQELKIIFAGRELSDTTITIECDLGQQ
gi 7669540	3	VFVRFNSSHGFPVEVSDTSIFQLKEVVAKRQGVADQLRWIFAGKELRNDUTVQEFFFKCG.
gi 7669538	3	VFVRFNSSHGFPVEVSDTSIFQLKEVVAKRQGVADQLRWIFAGKELRNDUTVQNCDLDDQ
gi 48117986	463	IYVKTNTGNTFAVDLDPKWDIKNVKEIVASQMGTSPE DIKIIFAGKELHNSTIIECDLGQQ

Şekil 4-16: 26. lizin aminositinin evrim sürecinde korunmuş bir amino asit olduğunu gösterir şekil.

Son aşamada ise mutasyonun proteinin üç boyutlu yapısında meydana getirdiği değişim saptandı. Proteinin *ubiquitin-like domain* (übiküitin-benzeri alt yapısı)'da değişikliğe neden olduğu belirlendi. Bu bölge lizin amino asiti nedeniyle pozitif yüklü bir bölge olup mutasyonu halinde yük dengesini değiştireceği düşünülmektedir.



Şekil 4-17: Ubiquitin-like domain (Übiküitin-benzeri domaini)'de meydana gelen lizin amino asidi delesyonunu gösterir üç-boyutlu resmi. Sarı bölge delesyona uğramış lizin amino asidini göstermektedir ve pembe ok ile belirtilmiştir. Resim NCBI'nin sayfasından *3ND structure* programı kullanılarak tanımlanmıştır ve übiküitin benzeri alt yapının sembolü: Ubld(1IYF)'dir.



Şekil 4-18: Ubld alt yapısının yük dağılımını gösterir şekil. *3ND structure* programı yardımı ile bulunmuştur. Pozitif yüklü amino asitler mavi ile gösterilmiş, negatif yüklü amino asitler ise kırmızı ile gösterilmiştir. Şekilde 26. lizin aminoasiti mavi yüklü olarak ifade edilmiş olup pembe ok ile belirtilmiştir.

4.6. İstatistiksel Analiz sonuçları

Parkin mutasyonu taşıyan olgular, hastalık başlangıç yaşı, levopodaya verdiği cevap, ilk klinik incelemeleri gibi önemli özellikleri yönünden, mutasyon taşımayan olgularla SPSS 10.0 programı kullanılarak karşılaştırılmış ve istatistik değerlendirmeleri yapılmıştır. Sonuçlar tüm gruplarda anlamlı görünmektedir(Tablo 4-3,4-4).

	Parkin mutasyonu taşıyan olgular n= 8	Parkin mutasyonu taşımayan olgular n = 61	p
Cinsiyet (K/E)	4 / 4	21 / 40	
İlk klinik inceleme yaşı (y)	39.5 ± 5.8	55.7 ± 13.9	P<0.002
Başlangıç yaşı (y)	29 ± 6	48.9 ± 14.8	P<0.001
Günlük levopoda dozu (mg)	292 ± 262 (n=7)	489 ± 271 (n=53)	P=0.075
Levopodaya verdiği cevap (%)	78 ± 17 (n=7)	61 ± 21 (n=42)	P=0.068

Tablo 4-3:Sadece Parkin mutasyonu taşıyan olgular ile taşımayan olgular arasındaki karşılaştırmayı gösterir tablo. p< 0,05

	Homozigot Parkin mutasyonu taşıyan olgular n = 7	Mutasyon taşımayan olgular n = 61	p
Cinsiyet (K/E)	4 / 3	21 / 40	
İlk klinik inceleme yaşı (y)	39 ± 6	55.7 ± 13.9	P<0.002
Başlangıç yaşı (y)	27.8 ± 5.5	48.9 ± 14.8	P<0.001
Günlük levopoda dozu (mg)	317 ± 278 (n=6)	489 ± 271 (n=53)	P=0.092
Levopodaya verdiği cevap (%)	75 ± 15.8 (n=6)	61 ± 21 (n=42)	P=0.081

Tablo 4-4:Sadece homozigot Parkin mutasyonu taşıyan olgular ile taşımayan olgular arasındaki karşılaştırmayı gösterir tablo. p< 0,05

5. TARTIŞMA

PH nigrostriatal dopaminerjik nöronların kaybıyla karakterize, kronik ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. 85 yaş üstü popülasyonunun %4'ü gibi büyük bir kısmını etkileyen PH, bir yaşlılık hastalığı gibi görünsede altda yatan genetik ve çevresel birçok faktörün rol oynadığı oldukça ciddi bir sağlık problemidir (105).

Genetik etkenlerin PH etiyojisi üzerine olan olası etkisini saptamak amaçlı birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan bir kısmı İdyopatik Parkinson hastalarının birinci derece akrabalarının ikinci derece akrabalarına oranla 3 kat artmış risk taşıdığını saptamıştır ve genetik faktörlerin hastalık patogenezeine olan katkısını desteklemiştir. İlerleyen yıllarda sporadik olgularda patojenik mutasyonların saptanması ile PH üzerindeki genetik faktörlerin etkinliği desteklenmiştir.

PH olgularının %20-25 gibi büyük bir kısmı ailesellik göstermekte olup bunların %5'lik bir kısmı ise klasik mendel kalıtımı göstermektedir. Şimdiye kadar PH ile ilişkisi ispatlanmış 6 gen bölgesi tanımlanmıştır. Bunlar Otozomal resesif geçiş gösteren Parkin, PINK1, DJ1 ve Otozomal dominant geçiş gösteren α -sinüklein, LRRK2 ve UCHL1 genleridir.

Parkin geni Otozomal resesif geçiş gösteren 45 yaş altı (<45) PH olgularının yaklaşık yarısından, sporadik olguların ise %10-20'si gibi büyük bir kısmından sorumludur(106).

Parkin geni 12 ekzondan oluşan oldukça büyük bir gen olup şimdiye kadar delesyon, duplikasyon ve nokta mutasyonları gibi çok çeşitli genetik bozukluklar tanımlanmıştır. Bu nedenle genin tümüyle analizi için farklı yöntemlerin bir arada kullanılması gerekmektedir.

Tez kapsamında Türk Parkinson hastalarında Parkin geni mutasyon taraması yapılmış olup, deney aşamasında 4 farklı metodoloji uygulanmıştır.

İlk aşamada etkilenmiş aile bireyleri arasındaki haplotip geçişlerini belirlemek amaçlı, Parkin geni 6q26 bölgesine özgü dizayn edilmiş mikrosatellit markerları kullanıldı. Analiz sonuçlarına göre aynı aile içindeki etkilenmiş bireylerin haplotip geçişleri incelendi ve homozigosite gösteren bireyler belirlendi. Mikrosatellit analiz sonuçlarına göre homozigosite gösteren ailesel olgular yada ailesel olmayıpa buna rağmen sadece homozigosite gösteren hasta örnekleri, ikinci aşamada sekans analizi ve MLPA deneyleri ile

analiz edildi. Sekans analizi ve MLPA sonuçlarına göre mutasyon taşımasına rağmen mikrosatellit markerları ile mutasyon tespit edemediğimiz iki aile vardı. Bu olguların ikisinde *compound* heterozigot özellikteydi ve bu nedenle tanımlanamamaları normaldi.

İkinci aşamada ise DHPLC analizi uygulandı. DHPLC tek nokta varyasyonlarını saptayan etkin bir yöntem olması nedeniyle tercih edildi ve deneyler kapsamında diğer yöntemlerle kıyaslanarak duyarlılığı test edilmiş oldu. Gerçektende DHPLC sonuçlarına göre Ekzon 7’de tanımladığımız bir farklılık sekans analizi ilede doğrulandı. Böylece DHPLC’nin delesyonlar ve duplikasyonlar için duyarlı olmadığı ancak tek baz değişimleri için ideal bir yöntem olduğu gösterilmiş oldu.

Üçüncü aşamada ise; mikrosatellit bulgularına göre homozigosite gösteren hemde homozigosite göstermese dahi başlangıç yaşı 30’dan küçük (<30) olan Parkinson hastaları direkt sekans analizi yapılarak tarandı. Sekans analiz sonuçlarına göre aynı ailenin 2 etkilenmiş bireyinde daha önce literatürde gösterilmemiş olan homozigot “c182-184 del AAG” mutasyonu ve bir indeks olguda ise heterozigot Arg 275 Trp : c. 924 C>T tanımlandı.

Sekans analizi sonuçlarına göre tanımlanan “c182-184 del AAG” delesyonunun teorikteki patolojik etkinliği araştırılmak istendi ve biyoinformatik yöntemle analiz edildi. Sonuçta delesyona uğramış olan bu bölgenin Parkin proteininin Ubl domaininde evrimsel süreçte oldukça korunmuş olan bir bölgede olan 26. lizin aminoasiti olduğu saptandı. Gerçektende bu bölge daha önce yapılmış fonksiyon çalışmalarında mutasyonu halinde parkin’in aktivitesini azaltan ve PH’nin patolojik mekanizmasına katkıda bulunan bir bölge olarak belirlenmişti (107). Ayrıca delesyona uğramış olan lizin aminoasiti + yüklü olduğu için proteinin yük dengesini değiştirecek zaten kararsız olan Ubl bölgesini dahada kararsız hale getirecek ve direkt ÜPS sisteminin işleyişini bozacak (Şekil 4-6). Teorikte düşünülen bu mekanizma yapılacak fonksiyon çalışmaları ile daha da anlam kazanacaktır.

	PH-055	PH-086	PH-081/004	PH-081/005	PH-099	PH-105	PH-109	PH-138/003	PH-138/006	PH-078
Mutasyon	Ekzon 3_4 del ($\Delta 3$ - $\Delta 4$)	Ekzon 3_4 del ($\Delta 3$ - $\Delta 4$)	Homozigot Ekzon3 delesyonu	Homozigot Ekzon3 delesyonu	Homozigot Ekzon3 delesyonu	Homozigot Ekzon4 delesyonu	Homozigot Ekzon3 delesyonu	c182-184 del AAG	c182-184 del AAG	Heterozigot Arg 275 Trp :
Cinsiyeti	Erkek	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın	Kadın	Kadın	Kadın
Genetik geçiş	ODPH- birden fazla etkilenen aile bireyi	ODPH- birden fazla etkilenen aile bireyi	ORPH Akraba evliliği	ORPH Akraba evliliği	ORPH Akraba evliliği	ORPH Akraba evliliği	Sporadik	ORPH- Akraba evliliği	ORPH- Akraba evliliği	ORPH- Akraba evliliği Aile hikayesi olan
Etnik köken	Beyaz-Türk	Beyaz-Türk	Beyaz-Türk	Beyaz-Türk	Beyaz-Türk	Beyaz-Türk	Beyaz-Türk	Beyaz-Türk	Beyaz-Türk	Beyaz-Türk
Başlangıç yaşı	34	40	19	8	26	27	28	31	35	37
Semptomları	Bradikinezi Rijidite Dinlenme tremoru	Bradikinezi Rijidite	Bradikinezi, Rijidite Dinlenme tremoru	Bradikinezi, Rijidite Dinlenme tremoru	Bradikinezi Rijidite	Bradikinezi Rijidite Dinlenme tremoru	Bradikinezi Rijidite Dinlenme tremoru	Bradikinezi Rijidite Dinlenme tremoru	Bradikinezi Dinlenme tremoru	Bradikinezi Rijidite Dinlenme tremoru
Asimetrik/ Simetrik	Asimetrik	Asimetrik	Asimetrik	Asimetrik	Asimetrik	Asimetrik	Asimetrik	Asimetrik	Asimetrik	Asimetrik
L-Dopa cevap	50%	-	95%	70%	95%	70%	50%	70	-	95%
L-Dopa ile geleişen Diskinezi	yok	-	var	yok	var	var		var	var	var
UPDRS on	23	-	11	21	4	41	27	-	-	5
Hoehn-Yahr Evresi on	1	-	0.5	2	0.5	3	2	2	-	0

Tablo 5-1 Mutasyon saptanan hastaların klinik özelliklerini gösterir tablo.

Sekans analiz sonuçlarına göre mutasyon tespit ettiğimiz bir diğer bulgu ise; heterozigot “Arg 275 Trp : c. 924 C>T” mutasyonudur. Daha önce farklı toplum çalışmalarında da saptanmış olan bu mutasyon; sıklığı nedeniyle polimorfizm olarakta nitelendirilebilmektedir(108).Founder etkinin mutasyon sıklığında nedensel bir faktör olabileceği belirtilmiştir.

Parkin geninde saptanan heterozigot mutasyonlar hala devam eden bir tartışmanın sorularına cevap olması yönünden önemlidir. Yapılan bir çok vaka-kontrol çalışmasında saptanan heterozigot mutasyon taşıyan etkilenmiş bireyler ve bu bireylerin hastalık gelişim süreçleri, haployetersizliğinde parkin genine bağlı patojenik mekanizmada rol oynadığı görüşünü doğurmuştur. Tez çalışması kapsamında sadece tek bir olguda heterozigot mutasyon tespit edilmesi bu kanıyı destekler nitelikte değildi.

Son aşamada ise MLPA yöntemi uygulanmış sonuçta 3 olguda homozigot ekzon 3 mutasyonu,1 olguda homozigot ekzon 4 mutasyonu ve 2 olguda ise *compound* heterozigot ekzon3-4 delesyonu saptanmıştır. Bu mutasyonlar daha önce farklı toplum çalışmalarında da saptanmış olup Türk Parkinson hastalarında da benzer bulgular tespit edilmiştir (110). Daha önceki çalışmalarda mutasyon saptanan hasta bireylerin fenotipik özellikleri ve bizim saptadığımız hastaların fenotipik özellikleri karşılaştırıldığında önemli bir benzerlik göze çarpmaktadır (10). Periquet ve arkadaşlarının çalışmasında gösterilmiş olan bir olgu örneği de homozigot ekzon 3 delesyonu taşıyan Parkinson hastası bir bireyde gözlenen fenotipik özellikleri açıklamaktadır.Tablo 5-1’de mutasyon saptanan bireylerin fenotipik özellikleri gösterilmiştir. Klinik belirtileri İdyopatik Serebellar Ataksiyi gösteren bir İtalyan hastada, ilerleyen yaşlarda levodopa kaynaklı distoni gelişmeye başlamış ,34 yaşında ise bradikinezi, sol tarafta rijidite ve distoninin eşlik ettiği semptomlar oluşmuştur. Tüm bu klinik veriler doğrultusunda Jüvenil başlangıçlı Parkinson teşhisi konulmuş ve genetik testi sonucunda homozigot ekzon 3 delesyonu saptanarak teşhis doğrulanmıştır(108).

Yapılan istatistik analizler sonucunda, parkin mutasyonu taşıyan olgular taşımayanlarla kıyaslanmış ve hastalık başlangıç yaşı, levodopaya verdiği cevap gibi özellikleri açısından anlamlı çıkmıştır.(tablo 4-3, 4-4)

	ORPH Ailesel olgular	Ailesel Olmayan Olgular <45 yaş altı
Parkin Mutasyon sıklığı ^(a)	% 80-90	%15
Tez kapsamında saptanan Parkin mutasyon sıklığı	% 87.5	%12.5

Tablo 5-2.(^a)Periquet ve arkadaşlarının farklı toplumlarda yapmış olduğu çalışmayı göstermektedir (109).Tez sonuçlarına göre bulunan mutasyon sıklığının farklı toplum çalışmaları ile birlikte gösterir tablo.

Tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular, daha önce yapılmış çalışmaları destekler nitelikte olmuş ve Türk parkinson hastalarına özgü bir Parkin mutasyon grafiği çizmiştir (Tablo 5-2). ORPH olgular ve 40 yaş altı 69 aile ve toplamda 77 etkilenmiş olgu tez kapsamında taranmış olup, Parkin geni mutasyon sıklığı yaklaşık %11,5 olarak saptanmıştır. Parkin mutasyonu taşıyan olguların klinik özelliklerine bakıldığında erken başlangıç yaşı, kardinal klinik özelliklerden en az 3 tanesinin birlikte seyri, belirtilerin asimetrik varlığı, distoni gelişimi gibi tipik bulgular göze çarpmaktadır(10) Bizim çalışmamız sonucunda da mutasyon taşıyan olgularda benzer klinik özelliklerin varlığı açıkça görülmektedir(Tablo5.1)(110).Çalışmanın ilerleyen dönemlerde de devam ettirilmesi ve çalışmaya dahil edilen hasta sayısının artırılması, genotip-fenotip korelasyonunun kurulabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Twelves D, Perkins KS, Counsell C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003;**18**:19 –31.
2. Farrer MJ (2006) Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* 2007, **306**–318.
3. Forno, L.S. Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*1996., **55**, 259–272.
4. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983;**219**:979 –980
5. Tanner CM, Langston JW. Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review. *Neurology* 1990;**40**(Suppl. 3):17–30; (discussion) 30–31.
6. Poskanzer DC, Schwab RS. Studies in the epidemiology of Parkinson's disease predicting its disappearance as a major clinical entity by 1980. *Trans Am Neurol Assoc* 1961;**86**:234 –235.
7. Thomas B, Beal M. Parkinson's Disease. *Human Molecular Genetics*, 2007. **16**. R183–R194
8. BelinA, Westerlund M. Parkinson's Disease: A genetic Perspective. *FEBS Journal* ,2008 **275**,1377–1383 .
9. Corti, O. and Brice, A. Parkin. Targeted proteins database, [19719],doi:10.2970/tpdb.2007.73
10. Gasser T.Update on the genetics of Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2007 **22**, 1. 17, ,
11. İTF Nöroloji-kitap, Hareketbozuklukları, ;20.06.2003. Erişim, 05.05.2008. <http://www.itfnoroloji.org/ekitap.htm>
12. Utter A., Basso M. The basal ganglia: An overview of circuits and function. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2008.**32**;333-342

13. Delong M.,Wichmann T. Circuits and Circuit Disorders of the Basal Ganglia. *Arch Neurol.* 2007;**64**:20-24
14. Parkinson J.An essay on the shaking palsy.*J.Neuropsychiatry Clin Neurosci*,2002.**14**:223-36.
15. Fahn S, Przedborsky S. Parkinsonism. In: Rowland LP, ed. Merritt's Textbook of Neurology, chapter 114. 10th. Ed. 2000 by Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA:679-693.
16. Rijic MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S,et al. Prevalance of Parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the Europarkinson collaborative study.*J Neurol Neurosurg Psychiatry*,1997.**62**:10-25
17. C. A. Davie.A Review of Parkinson's disease.*British Medical Bulletin*, 2008.**1-19**
18. Marras Connic, Lang Anthony.Changing concepts in Pakinson disease.*Neurology*,2008.**70**:1996-2003)..
19. Jankovic J.Parkinson's disease:clinical features and diagnosis. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2008 **79**:368-376). .
20. Jankovic J, Schwartz KS, Ondo W. Re-emergent tremor of Parkinson's disease.*J. Neurol Neurosurg Psychiatry*,1999; **67**:646-50) .
21. Riley D.,Lang AE.,Blair.RD.Frozen shouder and other shoulder disturbances in Parkinson's disease..*J.Neurol Neurosurg Psychiatry*,1989.**52**:63-6
22. Stamey WP.Jankovic J.Shoulder pain in Parkinson's disease.*Mov. Disorders*,2007.**22**;S247-8)
23. Barardelli A, Rothwell JC.,Thompson PD.et al.Pathophysiology of bradikinesia in Parkinson's disease.*Brain*,2001.**124**;2131-46)
24. Cooper JA., Sagar HJ.,TidswellP.,et al.Slowed central processingin simple and go/no go reaction time tasks in Parkinsons disease.*Brain*,1994.**117**,517-29
25. Bagheri H.,Damase Michel C.,Lapeyre-Mestre M.Astudy of salivary secretion in Parkinson's disease.*Chilin Neuroparmacol*,1999.**22**;213-15 .

26. Vingerhoets FJG.,Schulzer M.,Calne DB.,et al.Which clinical sign of Parkinson's diseasebest reflects the nigrostriatal lesion?*AnnNeurol* 1997;**41**;58-64 .
27. Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;**51**:745–52.)
28. Rao G, Fisch L, Srinivasan S, et al. Does this patient have Parkinson disease? *JAMA*,2003;**289**:347–53.
29. Tolosa E, Wenning G, Poewe W. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006;**5**:75–86.
30. Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol*,1999;**56**:33–9.
31. Hughes AJ, Ben-Shlomo Y, Daniel SE, et al. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. *Neurology* 1992;**42**:1142–6.
32. Parati EA, Fetoni V, Geminiani GC, et al. Response to L-DOPA in multiple system atrophy. *Clin Neuropharmacol* 1993;**16**:139–44. .
33. Piccini P, Brooks DJ. New developments of brain imaging for Parkinson's disease and related disorders. *Mov Disord* 2006;**21**:2035–41.
34. Aideen McInerney-Leo et al.,Genetic Testing in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*,2005.**20**
35. Siderowf, A., et al., Test-retest reliability of the unified Parkinson's disease rating scale in patients with early Parkinson's disease: results from a multicenter clinical trial. *Mov Disord*, 2002. 17(4): p. 758-63. (35).
36. Marras C., Lang A. Changing concepts in Parkinson's disease. *Neurology*, 2008.**70**;1996-2003
37. Anthony H.V. Schapira. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology*,2006. **66**;S10-S23
38. Hanagasi H., Emre M., Treatment of behavioural symptoms and dementia in Parkinson's disease. *Fundamental & Clinical Pharmacology*,2005. **19** 133–146

39. Gowers WR., Diseases of the Nervous system. 1888
40. Gasser T., Genetics of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 1998. **44**:S53-57
41. Piccini P., Burn DJ., Ceravolo R., Maraganore D., Brooks DJ. The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease :evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins. *Ann Neurol*, 1999.**45**:577-582
42. Cordato DJ, Chan DKY., Genetics and Parkinson's disease. *Clin Neurosci*, 2004; **11**(2): 119-123.
43. Spillantini MG., Schmidt ML., Lee VM., et al. Alpha synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 1997. **388**:839-840
44. Feany MB., Bender WW., A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature*, 2000.**404**:394-398
45. Takahashi H., Ohama E., Suzuki S., et al. Familial Juvenil Parkinsonism : clinical and pathologic study in a family. *Neurology* 1994. **44**,437-431
46. Hattori N., Kitada T. Molecular genetic analysis of a novel parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenil parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the parkin gene in affected individuals. *Ann Neurology*, 1998.**44**:935-941
47. Abbas N., Lucking CB, Ricard S., et al. A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. *Hum. Mol. Genet.* 1999., **8**,567-564
48. Imai Y., Soda M, et al. An unfolded putative transmembran polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stres, is a substrat of parkin. *Cell*, 2001.**105**:891-902
49. Leroy E., Boyer R., Auburger G., et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, 1998.**395**:451-452
50. Anthony H.V. Schapira. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology*, 2006. **66**:S10-S23
51. Semchuk KM., Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticides chemicals. *Neurology*, 1992.**42**:1328-1335

52. Chen H, Zhang SM, Hernan MA, Schwarzschild MA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson's disease. *Arc Neurology*, 2003. **60**;1059-1064
53. Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D. Mitochondrial complex 1 deficiency in Parkinson's disease. *Ann Neurology*, 1989. **26**;122-123
54. Anthony H.V. Schapira. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology*, 2006. **66**;S10-S23
55. Moore D., West A., Dawson V., Dawson T. Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 2005. **28**:57–87.
56. Bell J, Clark AJ. 1926. A pedigree of paralysis agitans. *Ann. Eugen.* 1:455–62
57. Jenner P.. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol*, 2003. **53**:S26–36
58. Wooten GF, Currie LJ, Bennett JP, Harrison MB, Trugman JM, Parker WDJr.. Maternal inheritance in Parkinson's disease. *Ann. Neurol*, 1997. 41:265–68.
59. Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT.. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α -synuclein aggregation. *Exp. Neurol* 2003. **179**:9–16
60. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I.. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983. **219**:979–80
61. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 2000. **3**:1301–6
62. Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α -synuclein aggregation. *Exp. Neurol*, 2003. **179**:9–16
63. Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of α -

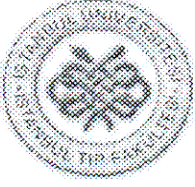
- synuclein in mice: paraquat and α -synuclein. *J. Biol. Chem*, 2002. **277**:1641–44
64. Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, Rao RK, Wanner T, et al. 2001. Inducible expression of mutant α -synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondriadependent apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* 10:919–26
 65. Chung KK, Thomas B, Li X, Pletnikova O, Troncoso JC, et al. 2004. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science* 304:1328–31
 66. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, et al. 2004a. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304:1158–60
 67. McNaught KS, Belizaire R, Jenner P, Olanow CW, Isacson O. 2002. Selective loss of 20S proteasome α -subunits in the substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 326:155–58
 68. Chung KK, Dawson VL, Dawson TM. 2001a. The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 24:S7–14
 69. Von Coelln R, Thomas B, Savitt JM, Lim KL, Sasaki M, et al. 2004b. Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:10744–49
 70. Mori H, Kondo T, Yokochi M, Matsumine H, Nakagawa-Hattori Y, et al. 1998. Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* 51:890–92
 71. Hardy J, Cookson MR, Singleton A. 2003. Genes and parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2:221–28
 72. Moore et al. . *Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease*, 2005. Annu. Rev. Neurosci. **28**:57–87
 73. Gasser T. Update on the Genetics of Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, 2007. 17, S:343-350.

74. Kru"ger R, Kuhn W, Mu"ller T, et al. Ala39Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998;18:106–108.
75. Berg D, Niwar M, Maass S, et al. Alpha-synuclein and Parkinson's disease: implications from the screening of more than 1,900 patients. *Mov Disord* 2005;20:1191–1194.
76. Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, et al. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004;364:1169–1171.
77. Miller DW, Hague SM, Clarimon J, et al. Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* 2004;62:1835–1838.
78. Golbe LI, Di Iorio G, Bonavita V, Miller DC, Duvoisin RC. A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1990;27:276–282.
79. Spira PJ, Sharpe DM, Halliday G, Cavanagh J, Nicholson GA. Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr alpha-synuclein mutation. *Ann Neurol* 2001;49:313–319.
80. Snyder H, Mensah K, Theisler C, Lee J, Matouschek A, Wolozin B. 2003. Aggregated and monomeric α -synuclein bind to the S6₂ proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *J. Biol. Chem.* 278:11753–59.
81. Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004;44:595–600.
82. Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, et al. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* Lesage S, Durr A, Tazir M, et al. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N Engl J Med* 2006;354:422–423.
83. Abou-Sleiman PM, Muqit MM, McDonald NQ, Yang YX, Gandhi S, Healy DG, Harvey K, Harvey RJ, Deas E, Bhatia K, Quinn N, Lees A, Latchman DS, Wood NW. 2006. Heterozygous effect for PINK1 mutations in Parkinson's disease? *Ann Neurol* 60:414–419.

84. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. 2003. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299:256–259
85. Lockhart PJ, Lincoln S, Hulihan M, Kachergus J, Wilkes K, Bisceglia G, Mash DC, Farrer MJ. 2004. DJ-1 mutations are a rare cause of recessively inherited early onset parkinsonism mediated by loss of protein function. *J Med Genet* 41:e22.
86. Kitada, T. *et al.* Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608 (1998).
87. Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25:302–305
88. Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Deneffe P, Wood NW, Agid Y, Brice A, French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. 2000. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 342:1560–1567
89. Lohmann E, Periquet M, Bonifati M, et al. How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotyp? *Ann Neurol*, 2003. 54, 176-185
90. Mori H, Kondo T, Yokochi M, et al. Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q *Neurology* 1998;51:890–892.
91. Farrer M, Chan P, Chen R, et al. Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol* 2001;50:293–300.
92. van De Warrenburg BP, Lammens M, Lucking CB, et al. Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. *Neurology* 2001;56:555–557.

93. Tan E-K.,Skipper L.,Pathogenic mutations in Parkinson Disease.Human Mutation,2007.13,0-1
94. . Khan NL, Brooks DJ, Pavese N, Sweeney MG, Wood NW, Lees AJ, Piccini P. 2002a. Progression of nigrostriatal dysfunction in a parkin kindred: an [18F]dopa PET and clinical study. *Brain* 125(Pt 10):2248–2256
95. Corti O.,Brice A., Of Parkin and Parkinson's: light anddark sides of a multifaceted E3 ubiquitin–protein ligase .Drug Discovery Today: Disease Mechanisms,2007.7,240
96. Hampe, C. et al. (2006) Biochemical analysis of Parkinson's diseasecausing variants of Parkin, an E3 ubiquitin–protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2059–2075
97. Matsuda, N. et al. (2006) Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro. *J. Biol. Chem.* 281,3204–3209
98. . Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, et al. 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25:302–5
99. Glickman MH, Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82:373–428
100. Henn, I.H. et al. (2007) Parkin mediates neuroprotection through activation of IkappaB kinase/nuclear factor-kappaB signaling. *J. Neurosci.*27, 1868–1878
101. Cha, G.H. et al. (2005) Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102,10345–10350 .
102. Simonna P;et al. Mutational Analysis of Parkin gene by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) in Essential Tremor. *Parkinsonism and Related Disorders* 2004.10, 357–362
103. Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography:a review. *Hum Mutat* 2001;17:439–74.

104. Stuppia L., et al. Multiplex Ligation dependent Probe Amplification Assay for Simultaneous Detection of Parkinson's Disease Rearrangements. *Movement Disorders*, 2007. **22**, 15
105. de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000 **54**(Suppl 5):S21–S23.
106. Corti, O. and Brice, A. Parkin. Targeted proteins database, [19719] doi:10.2970/tpdb.2007.73
107. Safadi S., Shaw S. A Disease State Mutation Unfolds the Parkin Ubiquitin-like Domain. *Biochemistry*, 2007. **46**, 14162-14169.
108. Periquet M., et al. Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain*, 2003. **126**, 1271-1278
109. Periquet M. et al. Origin of the Mutations in the *parkin* Gene in Europe: Exon Rearrangements Are Independent Recurrent Events, whereas Point Mutations May Result from Founder Effects. *Am. J. Hum. Genet.* 2001. **68**:617–62.
110. Jordi Clarimon,^{1*} Janel Johnson,¹ Okan Dogu,² Wagner Horta,³ Naheed Khan,⁴ Andrew J. Lees,⁵ John Hardy,¹ and Andrew Singleton¹. Defining the Ends of Parkin Exon 4 Deletions in Two Different Families With Parkinson's Disease. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*, 2005. **133B**:120–123



**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI**

Toplantı Tarihi : 22/11/2006

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Pembe Salon

Toplantı Sayısı : 11

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Öğretim Üyesi Prof.Dr. Nihan ÜNALTUNA'nın, üstlendiği Yüksek Lisans Öğrencisi Burcu Dursun'un yürüteceği 2006/1970 protokol numaralı "Otozomal Resesif Geçişli Parkinson Hastalığında Parkin (PARK 2) Geni Mutasyonlarının Araştırılması" başlıklı tez çalışması kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI

Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL

İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Cahide GÖKKUŞU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM

Tıp tarihi ve Deontoloji A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan COBAN

Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Sevinç EMRE

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Veli UYSAL

Patoloji A.D.

Prof.Dr. Yeşim ERBİL

Genel Cerrahi A.D.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	BURCU	Soyadı	DURSUN
Doğ.Yeri	İSTANBUL	Doğ.Tar.	08.05.1983
Uyruğu	TC	TC Kim No	22946203604
Email	burcdursun@gmail.com	Tel	05375749798

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Tıbbi Genetik ortak programı	2005-
Lisans	Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2001-2005
Lise	Buyukcekmece YDA Lisesi	1998-2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi	55	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	67	67	68
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Mikrosoft office	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Beşin Arastirmalari Dernegi Seyehat ve Egitim bursu

Özel İlgi Alanları (Hobileri):