

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı**
bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

DOKTORA TEZİ

**PARKİNSON HASTALIĞIYLA İLİŞKİLİ OLABİLECEK
ADAY GENLERİN ARAŞTIRILMASI**

SERVET TUNOĞLU

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. CEM İSMAİL KÜÇÜKALİ**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



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 çalışmasıyla 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.



İTHAF

Oğlum Tuna'ya ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, tezim süresince yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, danışman hocam Doç. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ'ye,

Tezim için gerekli hasta örneklerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Hareket Bozuklukları Birimi'nde görev yapan Prof. Dr. Haşmet Ayhan HANAĞASI'na,

Tezimdeki içten destekleri için Doç. Dr. Özlem TİMİRCİ KAHRAMAN'a,

Tez çalışmam süresince yardımlarından ve desteklerinden ötürü Moleküler Tıp ve Sinirbilim Anabilim Dalı'nda görevli değerli hocalarıma,

Olgu örneklerinin toplanmasında ve örneklerle erişimimde bana her daim sabırla yardım eden Zerrin KARAASLAN'a,

Çalışmaya katılmayı kabul eden tüm idiyopatik Parkinson hastalarına,

Bugüne dek attığım adımlarda sevgileri ve destekleriyle yanımda bulunan canım annem Şaziye TUNOĞLU'na ve babam Cevdet TUNOĞLU'na, ailemin mutluluk kaynağı kardeşlerim Mert TUNOĞLU'na ve Zülal Merve TUNOĞLU'na, eğitim hayatım boyunca bana maddi ve manevi desteklerini sürekli hissettiren babaannem Saniye TUNOĞLU ve rahmetli dedem Yaşar TUNOĞLU'na,

En zor günlerimde bana hayat sevinci veren, laboratuvar çalışmalarım boyunca destek ve ilgisini bir an olsun bırakmayan, çalışmaktan çok keyif aldığım; ekip arkadaşım, sevgili eşim Ezgi Nurdan YENİLMEZ TUNOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36942

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Parkinson Hastalığı	3
2.1.1. PH Tanı Kriterleri	3
2.1.2. PH Etiyolojisi.....	4
2.1.2.1. Genetik Faktörler	5
2.1.2.2. Çevresel Faktörler	7
2.1.3. PH Patogenezi	8
2.1.3.1. Mitokondriyal Bozukluklar	9
2.1.3.2. Proteozom Sistemi ve PH İlişkisi	9
2.1.3.3. Oksidatif Stres ve PH İlişkisi	11
2.1.3.4. Nöroinflamasyon ve Mikroglial Aktivasyon	11
2.2. PH İlişkili Epigenetik Mekanizmalar.....	12
2.2.1. DNA Metilasyonları.....	12
2.2.2. Kromatin Yeniden Düzenlenmesi	13
2.2.3. Epigenetik Mekanizmalarla İlişkili Genler	15
2.2.3.1. Histon Proteinleri, H3C1 ve H3C12	15
2.2.3.2. HDAC4 ve HDAC5	15
2.2.3.3. ANKRD11 ve ANKRD12.....	16
2.2.3.4. ITM2B ve GABBR1	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19

3.1. Olgu Seçimi, Protokol ve İşlem	19
3.2. Gereçler.....	21
3.2.1. Kullanılan Cihazlar	21
3.2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	21
3.2.3. Kullanılan Kitler	21
3.3. Periferik Kan Örneklerinin Toplanması ve Saklanması	21
3.4. Serum ve PBMC Eldesi	21
3.5. PBMC'den RNA İzolasyonu	23
3.6. Komplementer DNA Sentezi	24
3.7. Real-time PCR Yönteminin Uygulanması.....	26
3.8. Gen Ekspresyonlarının Analizi	27
3.9. İstatistiksel Analizler	27
4. BULGULAR.....	29
4.1. Demografik Veriler	29
4.2. Gen Ekspresyon Sonuçları	29
5. TARTIŞMA	32
KAYNAKLAR	37
HAM VERİLER	48
FORMLAR	49
ETİK KURUL KARARI	53
PATENT HAKKI İZNİ	54
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	55
ÖZGEÇMİŞ	56

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Parkinson Hastalığı ile ilgili gen lokusları (Klein ve ark. 2012).	5
Tablo 3-1: Komplementer DNA sentezinde kullanılan malzemeler ve miktarları	25
Tablo 3-2: Komplementer DNA sentez protokolüne ait sıcaklık koşulları	25
Tablo 3-4: Real time PCR yönteminde her bir reaksiyon için kullanılan bileşenler ve bu bileşenlerin miktarları	26
Tablo 3-5: Real time PCR yönteminin sıcaklık koşulları ve döngü sayısı	26
Tablo 4-1: Gruplara ait demografik bilgilerin özeti.....	29
Tablo 4-2: Obezite durumu, hastalık başlangıç yaşı ve H&Y evrelerinin cinsiyete göre dağılımı	29
Tablo 4-3: UPDRS Total değerlerinin cinsiyete göre dağılımı	30
Tablo 4-4: Gen ekspresyon düzeyindeki farklılıkların istatistiksel sonuçları.....	30

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Parkinson Hastalığı'nın histopatolojik bulgularından biri olan Lewy cisimciğinin, beyin kesitinde mikroskop altındaki görünüşü	4
Şekil 2-2: Dopaminerjik nöron ölümünde etkili olan mekanizmalar	8
Şekil 2-3: Ubikutin proteozom sistemi (UPS) ve PH ilişkisi.....	10
Şekil 2-4: Histon modifikasyonu yoluyla kromatinlerin yeniden düzenlenme mekanizması	14
Şekil 2-5: Histon deasetilasyonu ve histon deasetilazların rolü	15
Şekil 2-6: Ankrd11'in gen ekspresyon sürecine etkisi	17
Şekil 3-1: Tam kandan serum ve PBMC eldesinin özet gösterimi	22
Şekil 3-2: PBMC eldesi için tam kandan faz oluşturulmasının öncesini ve santrifüj sonrası oluşan fazın toplanmasını gösteren deneye ait görüntü	23
Şekil 3-3: PBMC'den RNA izolasyonu ile başlayan ve cDNA'ya çevrimle sonlanan basamakların özet gösterimi	25
Şekil 3-4: Örneklerle ait optimizasyon çalışmalarından elde edilen bir örnek Ct grafiği	27
Şekil 4-1: Sağlıklı kontrol grubuna kıyasla PH grubunun ekspresyon düzeyindeki log2 kat değişimleri.....	30

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ANKRD:	Ankirin Tekrar Alanı İçeren Protein
ATP:	Adenozin Trifosfat
cDNA:	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DMNT1:	DNA Metiltransferaz Enzimi 1
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
EDTA:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
GABA:	Gamaaminobütirik Asit
GAPDH:	Gliseraldehit Fosfat Dehidrogenaz
HAT:	Histon Asetilaz
HDAC:	Histon Deasetilaz
IL-6:	İnterlökin 6
lncRNA:	Uzun Kodlamayan Ribonükleik Asit
LRRK:	Lösin Açısından Zengin Tekrarlı Kinaz
mRNA:	Mesajcı Ribonükleik Asit
miRNA:	Mikro Ribonükleik Asit
N27:	Sıçan Dopaminerjik Nöral Hücre Hattı
PH:	Parkinson Hastalığı
PINK1:	PTEN-İlişkili Kinaz 1 Geni
PI3K:	Fosfoinositidil-3-kinaz
PARKIN:	Parkin Geni
PBMC:	Periferel Kan Mononükleer Hücreler
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA:	Ribonükleik Asit
siRNA:	Susturucu Ribonükleik Asit
SN:	Substansia Nigra
SNCA:	Sinüklein Alfa Geni
UCHL1:	Ubikitin C-Terminal Hidrolaz-L1
°C:	Santigrat derece
µl:	Mikrolitre

ÖZET

Tunoğlu, S. (2022). Parkinson Hastalığıyla İlişkili Olabilecek Aday Genlerin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Parkinson Hastalığı (PH), beynin substantia nigra bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybıyla diğer nörodejeneratif bozukluklardan ayrılan ve Alzheimer Hastalığı'yla birlikte en sık görülen nörodejeneratif bir hastalıktır. Patolojik açıdan değerlendirildiğinde Lewy cisimciğinin bulunmasıyla karakterizedir. Tüm PH vakaları arasında tek başına genetik mutasyonlar sonucu PH görülme sıklığının çok düşük olduğu, hastalık gelişiminde çevresel etkilerin de önemli ölçüde katkı sağladığını günümüze kadar yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Hastalıklara bağlı moleküler mekanizmaların sürdürülebilmesi için gen ve protein ifadelerinin gerçekleştirilmesi epigenetik düzenlemeler yoluyla gerçekleştirilmektedir. Nörodejeneratif hastalıklarda, hastalık gelişimi ve patogeneğinde epigenetik düzenlemelerin rolü hala net olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada, idiyopatik PH olgularında epigenetik süreçlerde rol alan genlerden H3C1, H3C12, HDAC4, HDAC5, ANKRD11, ANKRD12, ITM2B ve GABBR1'in ekspresyon düzeylerini inceledik. Çalışmaya idiyopatik PH tanısı alan 75 hasta ve 50 sağlıklı kontrol grubu dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarından alınan tam kandan PBMC elde edilip ardından total RNA izolasyonu yapılmıştır. Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında H3C1, H3C12, ITM2B'nin yüksek ekspresyonu; ANKRD11, HDAC4, HDAC5 ve GABBR1'in düşük ekspresyonu gözlenmiştir ($p<0,05$). Sonuçlar değerlendirildiğinde, hastalık durumunda epigenetik mekanizmalardan birisi olan histon regülasyonu PH arasında bir ilişki olduğu görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: parkinson hastalığı, nörodejeneratif, epigenetik, histon regülasyonu, histon deasetilazlar.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36942

ABSTRACT

Tunoglu, S. (2022). Investigation of Candidate Genes That May Be Related to Parkinson's Disease. İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine. Phd Thesis. İstanbul.

Parkinson's Disease (PD) is a neurological disease that is differed from other neurodegenerative disorders by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra region of the brain, and is the most common neurodegenerative disease as well as Alzheimer's Disease. PD is characterized by the presence of Lewy bodies when evaluated pathologically. Recent studies showed that the incidence of PH development as a result of genetic mutations alone is very low among all PD cases, and that environmental effects contribute significantly to the disease progression. The molecular mechanisms of diseases are associated with the maintenance of gene and protein expressions as a result of epigenetic regulations. The role of these regulations in the development and pathogenesis of neurodegenerative diseases is still not clearly understood. In our study, we examined the expression levels of H3C1, H3C12, HDAC4, HDAC5, ANKRD11, ANKRD12, ITM2B and GABBR1, which are genes involved in epigenetic processes in patients with idiopathic PD. Seventy five patients diagnosed with idiopathic PD and 50 healthy controls were included in the study. Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) was obtained from whole blood taken from the patient and control groups, and then total RNA was isolated from PBMC. According to the comparison of the patient and control groups were compared, the expression of H3C1, H3C12, ITM2B was high, and the expression of ANKRD11, HDAC4, HDAC5 and GABBR1 was low ($p<0.05$). As a conclusion, we propose that histone regulation is one of the epigenetic mechanisms which related with the presence of PD.

Key Words: parkinson's disease, neurodegenerative, epigenetics, histone regulation, histone deacetylases.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 36942

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson Hastalığı (PH), 1800'lü yılların başında motor ve motor olmayan semptomlara göre değerlendirilen bir sendrom olarak tanımlanmıştır. Sonraki yıllarda ise davranışsal bozukluklar, duygudurum değişiklikleri gibi non-motor bozuklukların da hastalarda yaygın olduğu keşfedilmiştir. Genel popülasyonda PH sıklığı %1 civarında iken 60 yaşın üzerinde bu oran artmaktadır. Risk faktörleri arasında yaşlanma önemli bir faktör olsa da tüm yaşlı popülasyonu göz önünde bulundurursak yaşlı popülasyonda düşük insidansa sahiptir (Tysnes ve ark. 2017).

PH'de motor semptomların görülebilmesi Substantia Nigra (SN)'daki dopaminerjik nöronların en az yarısının kaybolmasıyla mümkün olmaktadır. PH ile karakterize olan Lewy cisimcikleri bu aşamadan sonra görülmektedir. Lewy cisimcikleri, monomer yapıdaki α -sinükleinlerin (SNCA) bir araya gelerek çoklu konformasyonu olan β -yaprak formunu oluşturmasıyla birlikte meydana gelen fibrillerdir. Lewy cisimciklerinin PH patolojisinde keşfi ve ana etken olan SNCA mutasyonlarının bulunmasıyla birlikte PH'daki moleküler mekanizmalara dair çalışmalar artmıştır. PH olgularının %10 kadarı ailesel kalıtmı otozomal dominant (OD) geçişlidir. LRRK2 genindeki mutasyonlar, OD kalıtmı olgularda en çok görülenlerdendir. PARK2 geni ise PH'yle ilişkili mutasyonları bulunduran ve otozomal resesif (OR) geçişli kalıtılan en uzun genlerden biridir (Jankovic ve ark. 2020). Günümüzde PARK2 geniyle ilgili birden fazla tipte ekzon mutasyonları tanımlanmış olup klinik olarak Lewy cisimciklerinden yoksun bir patolojik tablo görülebilmektedir. Bu genlerdeki mutasyonlar gibi daha birçok gende PH ilişkili mutasyon görülebilmektedir. Ancak tek gendeki mutasyona bağlı görülen PH oranı çok düşük seviyededir. Bu durum bizlere yalnızca genetik mutasyonların değil, hücrede gen dizilimi dışında süreçlerin de hastalıkla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Epigenetik olarak adlandırılan bu süreçler, genlerin ifade edilmesi ve protein düzeylerindeki farklılıkların ortaya çıktığı mekanizmalardır. Mitokondrideki bozukluklar, proteinlerin katlanmalarıyla ilgili hatalar, nöronların inflamatuvar durumları ve oksidatif stres gibi epigenetikle ilişkili birçok düreç PH patofizyolojisinde önemli yer almaktadır (Antony ve ark. 2013). Bu sebeptendir ki idiyopatik PH patogenezi yalnızca genetik faktörlere değil aynı zamanda epigenetik mekanizmalara da bağlı olarak gelişmektedir.

Nörodejeneratif hastalıklarda genetik etkenler haricinde çevresel etkenlerin etkisi büyüktür. Temel olarak kalıtsal durumlar ve mutasyonlardan bağımsız ortaya çıkan idiyopatik PH'de mitokondrideki defektler ve yanı sıra artmış reaktif oksijen türleri, bunun sonucunda oluşan oksidatif stres nöron hücrelerindeki ölüm kaskadını başlatmaktadır. Çevresel olarak maruz kalınan ve vücudumuzdaki oranı dengesizce artan demir ve kalsiyum iyonları, mikroglia hücrelerinin sayısının anormal artışıyla beraber inflamasyonun gerçekleşmesi, bazı reseptörlerdeki aşırı uyarılma vb süreçler geri dönülemez nöronal kayıplarını başlatarak PH'nin patogenezinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Badanjak ve ark. 2021; Thomas ve ark. 2021). Enerji üretim birimi olan mitokondride hücrenin sağkalım ve ölüm süreçleri, kalsiyum metabolizması vb gibi olaylar kontrol edilmektedir. Son yıllarda mitokondri üzerine yoğunlaşan çalışmalarda PH olgularında mitokondriyal DNA homeostazının bozulduğu ve buna bağlı olarak dopamin ilişkili nöronların ölümünün gerçekleştiği gösterilmiştir. Aynı zamanda ubiquitin proteozom sistemi (UPS) bozuklukları, aşırı mikroglial aktivasyon ve oksidatif stres PH olgularında tespit edilmiştir. İnsan ve deney hayvanlarından elde edilen ölüm sonrası beyin kesitleri, beyin omurilik sıvısı ve kan gibi materyallerle yapılan DNA/RNA sekansı ve transkriptom, kütle spektrometrisi gibi yöntemlerle multidisipliner yaklaşımlar sonucunda epigenetik faktörlerin etkileri gösterilmiştir (Kawahata ve ark. 2020).

Epigenetik mekanizmalar, gen ekspresyonlarının aktif olarak düzenlenmesinde rol oynayan önemli kontrol mekanizmalarındandır. Gen ekspresyon sürecinde de histonlar asetilasyon ve metilasyon ile modifiye edilerek kromatin yapıları düzenlenmektedir. Yapılan bazı çalışmalar göstermektedir ki ölüm sonrasındaki PH olgularına ait beyin kesitlerinde dopaminerjik nöronlardaki histon asetilasyon seviyelerinin sağlıklı bireylere göre yüksek olduğu tespit edilmiştir (Pavlou ve ark. 2017). Karaaslan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da PH vakaları ve sağlıklı kontrollerden elde edilen PBMC'ler mikroyarray yöntemiyle kıyasladıklarında epigenetik mekanizmalar dahil olmak üzere farklı sinyalizasyon yollarında artan ve azalan gen ekspresyonları tespit edilmiştir (Karaaslan ve ark. 2021).

Sonuç olarak, bu araştırmalardan yola çıkarak çalışmamızda PH varlığında özellikle epigenetik mekanizmalardan histon asetilasyonu ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeyinde karşılaştırılmasını amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson Hastalığı (PH), ilk olarak 1817’de motor ve motor olmayan bazı semptomlarla karakterize olan bir sendrom olarak değerlendirilmiştir. James Parkinson’un ortaya çıkardığı bu semptomlar; postürde öne eğilme, kinezi, tremor, yürürken ayakların yere sürünmesi şeklinde sıralanabilir (Parkinson 1817; Wirdefelt ve ark. 2011). Ayrıca gözlemlediği hastalardaki bu semptomları bir kitapta birleştirmiştir. Sonraki yıllarda ise kaslarda sertlik olarak nitelendirilen rijidite ve duyulardaki değişiklikler de bu semptomlar arasına eklenerek Parkinson adıyla yeniden tanımlama yapılmıştır (Charcot ve Vulpian 1862). PH’nin tanımlanmasından sonraki yıllarda motor bozuklukların yanı sıra davranışsal bozukluklar, duygudurumda değişiklik gibi non-motor bozuklukların da hastalarda yaygın olduğu keşfedilmiştir (Duvasion 1937).

İleri yaşlarda PH prevalansı artmakta ve her iki cinsiyette de görülmektedir. 60 yaş üzerinde görülme sıklığı %1 civarında iken genel popülasyonda %1-2 arasındadır. Genel popülasyon değerlendirildiğinde “Erken Başlangıçlı Parkinson Hastalığı” olarak tanımlanan 40 yaş altında görülen ve “Juvenil Parkinsonizm” olarak tanımlanan 20 yaş altında görülen formları mevcuttur (Poewe ve ark. 2017; Tysnes ve Storstein 2017). Bu değerlendirmeler ışığında yaşlanmanın PH görülme sıklığını artırdığını anlaşılmıştır. Yaşlanma önemli bir risk faktörü olsa da yaşlı popülasyonu değerlendirildiğinde PH görülme oranı düşüktür. Bu sebeple PH patolojisi genetik ve çevresel faktörlere bağlanmıştır. Ancak, günümüzde hala PH nedeni olan genetik ve çevresel faktörler net olarak açıklanamamış ve İdiyopatik Parkinson Hastalığı olarak literatürde yer almaktadır (Mou ve ark. 2020).

2.1.1. PH Tanı Kriterleri

Günümüzde PH, “International Parkinson’s Disease and Movement Disorder Society” ve “Birleşik Krallık Parkinson Hastalığı Derneği Beyin Bankası” kriterlerine göre değerlendirilmekte ve teşhis edilmektedir (Postuma ve ark. 2015; Lubomski ve ark. 2021). Hoehn-Yahr Skalası ise PH’yı evrelemede başvuru olan bir ölçek olup bulgu olmadığı durumları “0”, ileri safha yatağa bağımlılık “5” olacak şekilde evrelemiştir. Tremor, bradikinezi gibi semptomlar başlıca değerlendirilirken görüntüleme ile elde edilen striatal dopamin düzeylerindeki farklılıklar da değerlendirmeye alınmaktadır.

Duygu ve düşüncelerin ifadesinde sıkıntı, yavaş ve sakin tonda konuşma muayenede karşılaşılan ilk semptomlardır. Bunlar gibi motor olmayan semptomların yanısıra motor semptomlar ise Substantia Nigra (SN)'daki dopaminerjik olan nöronların yaklaşık yarısının kaybı sonucu ortaya çıkmaktadır (Kulisevsky ve ark. 2013; Yu ve ark. 2018; Bae ve ark. 2021). Lewy cisimcikleri de (Şekil 2-1) nöronal kayıp yaşanmasının ardından görülmektedir. PH ileri evrelerde semptomatik dopaminerjik terapiler etkili olsa nöronal kaybı engellemede yetersizliği görülmektedir (Noyce ve ark. 2017).



Şekil 2-1: Parkinson Hastalığı'nın histopatolojik bulgularından biri olan Lewy cisimciğinin, beyin kesitinde mikroskop altındaki görünüşü (Leung ve Mok 2005).

2.1.2. PH Etiyolojisi

Nörodejeneratif bozukluklar arasında Alzheimer Hastalığı (AH)'ndan sonra en yaygın olan PH'nin hem çevresel hem de genetik faktörlerin birlikte neden olduğu bir hastalık olduğu yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Tek gen mutasyonu olan hastalar toplam popülasyonda düşük oranda bulunmaktadır. DNA dizilerindeki çeşitlilik, oksidatif strese artış, mitokondriyal defektler, nöronal inflamasyon, protein katlanmasındaki bozukluklar vb gibi epigenetik birçok etken idiyopatik PH'de oluşumunda yer almaktadır (Kietzmann ve ark. 2017; Longhe 2020).

2.1.2.1. Genetik Faktörler

PH'nin yaklaşık %10'u otozomal dominant geçişli ailesel kalıtılan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Day ve Mullin 2021). Polymeropoulos ve ark. tarafından Lewy cisimlerinin keşfedilmesi ve temel bileşen olan α -sinüklein'deki mutasyonların tespit edilmesiyle PH'deki genetik çalışmalar hız kazanmıştır (Polymeropoulos ve ark. 1997). Tablo 2-1'de gösterildiği üzere günümüzde SNCA, LRRK2, VPS35 lokusları sırasıyla PARK1/PARK4, PARK8 ve PARK17 spesifik bölgeleri olarak tanımlanmış ve otozomal dominant kalıttan sorumludur. Parkin, PINK1, DJ1, ATP13A2 lokusları ise sırasıyla PARK2, PARK6, PARK7 VE PARK9 olarak tanımlanmış ve otozomal resesif kalıttan sorumludur.

Tablo 2-1: Parkinson Hastalığı ile ilgili gen lokusları (Klein ve ark. 2012).

Lokus	Sembol	Kalıtım	Gen	Tanımlanma Metodu
4q21-22	PARK1	Otozomal Dominant	SNCA	Bağlantı analizi
6q25.2-q27	PARK2	Otozomal Resesif	Parkin	Bağlantı analizi
2p13	PARK3	Otozomal Dominant	Tanımlanmamış	Bağlantı analizi
4q21-q23	PARK4	Otozomal Dominant	SNCA	Bağlantı analizi
4p13	PARK5	Otozomal Dominant	UCHL1	Fonksiyonel aday gen yaklaşımı
1p35-p36	PARK6	Otozomal Resesif	PINK1	Bağlantı analizi
1p36	PARK7	Otozomal Resesif	DJ-1	Bağlantı analizi
12q12	PARK8	Otozomal Dominant	LRRK2	Bağlantı analizi
1p36	PARK9	Otozomal Resesif	ATP13A2	Bağlantı analizi
1p32	PARK10	Risk faktörü	Tanımlanmamış	Bağlantı Analizi
2q36-27	PARK11	Otozomal Dominant	Tanımlanmamış; (GIGYF2 geni değil)	Bağlantı Analizi
Xq21-q25	PARK12	Risk Faktörü	Tanımlanmamış	Bağlantı Analizi
2p12	PARK13	Otozomal Dominant veya Risk Faktörü	HTRA2	Aday Gen Yaklaşımı
22q13.1	PARK14	Otozomal Resesif	PLA2G6	Bağlantı analizi (Homozigotluk Haritalama)
22q12-q13	PARK15	Otozomal Resesif	FBX07	Bağlantı analizi
1q32	PARK16	Risk Faktörü	Tanımlanmamış	GWAS
16q11.2	PARK17	Otozomal Dominant	VPS35	Ekzom Sekanslama
3q27.1	PARK18	Otozomal Dominant	EIF4G1	Bağlantı analizi

SNCA, α -sinüklein ekspresyonunu sağlayan gen olup kopya sayısındaki farklılıklar, frontal kortekste bölgesinde mRNA ve kandaki protein ifadesinin artmasına neden olur. Genellikle nokta mutasyon, lokus/bölge multiplikasyonu, triplikasyon ve

duplikasyon şeklinde meydana gelen mutasyonlar görülmektedir. Lewy cisimsikleri, α -sinükleinin monomer haldeki açık konformasyonunun β -yaprak formundaki oligomer yapılarına dönüşerek ardından amiloid benzeri yapıda oluşturduğu fibrillere verilen isimdir (Mokretar ve ark. 2018; Bisi ve ark. 2021).

LRRK2, otozomal dominant olarak ailesel kalıtımda mutasyonları en sık görülen genlerden biridir. Ailesel geçişli hastalıkların %4'ünde görülen mutasyonlar gliyoz ile karakterizedir (Kalia ve ark. 2015). LRRK2 proteini mitokondri dış zarında yerleşen bir protein olup mutasyon kaynaklı mitokondri yapısının bozulmasına ve sonucunda nörotoksisitesine neden olmaktadır (Mortiboys ve ark. 2010; Trudler ve ark. 2015).

Otozomal resesif geçişli ailesel kalıtılan ve en uzun genlerden biri olan PARK2 geninde İdiyopatik PH'yla ilgili mutasyonlar tanımlanmıştır. Juvenil tip PH'de PARK2 mutasyonları sık görülmektedir. Günümüzde PARK2 geninde SNP, delesyon ve duplikasyon olmak üzere 800'den fazla ekzon mutasyonu tanımlanmıştır. PARK2 mutasyonları klinik bulgulara Lewy cisimciği bulunmamasıyla ilişkilendirilmiştir. PARK2 protein bozukluklarının nöron sitotoksisitesine zemin hazırladığı tespit edilmiştir (Shulman ve ark. 2011; Aasly 2020).

PINK1 geni, protein kinaz aktivitesi gösteren bir proteini kodlamakta ve PH oluşumunda etkili olan ikinci sıklıkta görülen mutasyonları içermektedir. PINK1 mutasyonları nonsense ve missense olarak diğer PARK genlerinden farklılık göstermektedir (Vizziello ve ark. 2021). Mitokondriyal yapının sürdürülmesinde Parkin ile birlikte rol alan PINK1'in nöronlarda koruyucu etkisi ve anti-oksidan işlevi olduğu görülmüştür (Chu 2010).

DJ-1 genindeki mutasyonlar PH oluşumunda nadir görülmektedir. Mutasyonlar nedeniyle doğru katlanamayan ve hızla yıkıma uğrayan DJ-1 proteini, yokluğunda dopaminerjik nöronlarda bozuklukların olduğu bir proteindir. Bu bağlamda da DJ-1'in nöronlar üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu ve oksidatif stres oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir (Singh ve ark. 2020).

ATP13A2, lizozomal membranda bulunan ATPaz aktivitesi olan bir transmembran proteindir. PH oluşumunda ATP13A2'deki mutasyonlar dolaylı olarak etkilidir (Navarro-Romero ve ark. 2020).

PLA2G6 ve FBOX7 genleri de erken dönem PH'de etkili olduğu tespit edilen ve farklı etnik kökenlerde de görülen mutasyonlara sahiptir Gua ve ark. 2018; Shen ve ark. 2019).

2.1.2.2. Çevresel Faktörler

Nörodejeneratif hastalıkların çoğunda genetik faktörlerin yanısıra çevresel faktörlerin de etkisi azımsanamayacak kadar çoktur. Yapılan çalışmalar sonucunda nörodejenerasyon kaynaklı hastalık oluşumu ve hastalığın seyri yalnızca genetik faktörlerle açıklanamadığından, tüm bu çalışmalar çevresel faktörleri de ön plana çıkarmıştır. PH'nin %85-90'ın yalnızca ailesel kalıtımla, genetik geçişle açıklanamaması, çevresel faktörlerin daha yakından incelenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Tarımsal alanlarda sıklıkla karşılaşılan paraquat gibi ajanlara maruz bırakılan SNCA transgenik farelerle yapılan çalışmalar, bu ilaçların PH'nin şiddetli seyretmesine neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu ilaçlara maruz kalan SNCA mutasyonlu bireylerde PH görülme yaşının düşük olduğu gözlenmiştir (Kiebertz ve ark. 2013; Goldman ve ark. 2014). Demir, kurşun gibi ağır metal grubu elementleri de SN'de birikip nöronal hasara yol açmaktadır. Örneğin kurşun, dopaminin önemli ölçüde daha az salgılanmasına ve reseptörlerdeki azalmış hassasiyete neden olmaktadır. Hücrenin antioksidan kapasitesini düşürüp α -sinüklenin birikimine neden olmaktadır. Vakalar değerlendirildiğinde kurşun maruziyeti ve kemik ölçümleri arasındaki ilişkiden yola çıkarak PH riskinin kurşunla birlikte arttığı gösterilmiştir. Demir ve manganez ile PH arasında doğrudan bir ilişki bulunmasa da parkinsonizm belirtileri görülen hastalardan ve ölüm sonrası çalışmalardan elde edilen bilgilerle dolaylı olarak ilişkili olduğu söylenebilmektedir. Bazı *in vitro* çalışmalarda ise nöroblastoma hücrelerinde demir dozuna ve uygulama süresine bağlı olarak sinüklein birikimindeki oranın arttığı gösterilmiştir (Li ve ark. 2010; Chin-Chan ve ark. 2015).

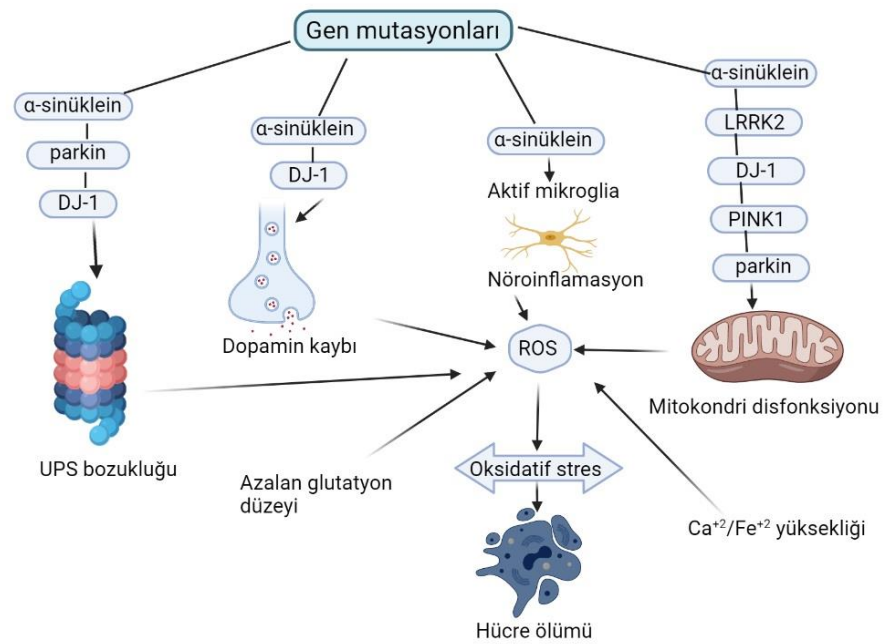
Kadınlarda östrojenin koruyucu etkisinden ötürü PH görülme oranı erkeklerde kadınlara göre daha fazladır. Meslek farklılıkları, X kromozomundaki resesif hassasiyet lokusları, kafa/baş bölgelerinde travma yaşanma olasılığından ötürü ise erkeklerde kadınlara oranlara PH riskinin daha fazla olduğu görülmektedir (Vegeto ve ark. 2020).

Oksidatif stresle yeteri kadar başa çıkılamaması, enerji metabolizmasında görevli genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklik ve dopaminerjik nöronların zaman geçtikçe azalması ve hasara uğraması gibi sonuçları olan yaşlanmanın

nörodejenerasyonda ve buna bağlı hastalıkların oluşumunda önemli rol oynadığı görülmüştür (Wood-Kaczmar ve ark. 2006; Lev ve ark. 2012). PH görülme oranının da 60 yaştan 85 yaş üzerine çıktığında 5 katına ulaştığı görülmüştür. Yaşla bağdaştırılmış olsa da 60 yaş öncesindeki görülme oranları, PH'de etkenin yalnızca yaş olmadığını göstermektedir (Reeve ve ark. 2014).

2.1.3. PH Patogenezi

SN'deki dopaminerjik nöronların kaybına neden olan birçok mekanizma keşfedilmiştir. Bu kayıp sürecinde ise ana etken olarak oksidatif stres oluşumu üzerinde durulmuştur. Temelde genetik geçişten bağımsız olarak gelişen idiyopatik PH'de mitokondriyal bozukluk ve bununla beraber reaktif oksijen türlerindeki artışın sonucu olarak gelişen oksidatif stres oluşumu nöronların geri döndürülemeyen ölüm sürecini başlattığı görülmüştür (Gencer M ve ark. 2011). Demir ve kalsiyum iyonlarındaki artış, mikrogliyal aktivasyonun aşırı artmasıyla birlikte inflamatuvar yanıtın tetiklenmesi, aşırı uyarılan glutamat reseptörleri gibi süreçler değerlendirildiğinde PH patogenezindeki temel mekanizma oksidatif stresle birlikte nöron kayıplarının geri dönülemez hale geldiğini desteklemektedir (Şekil 2-2) (Biorender.com'da düzenlenmiştir.). (Schapira ve Jenner 2011; Núñez ve ark. 2012).



Şekil 2-2: Dopaminerjik nöron ölümünde etkili olan mekanizmalar (Dias ve ark. 2013)

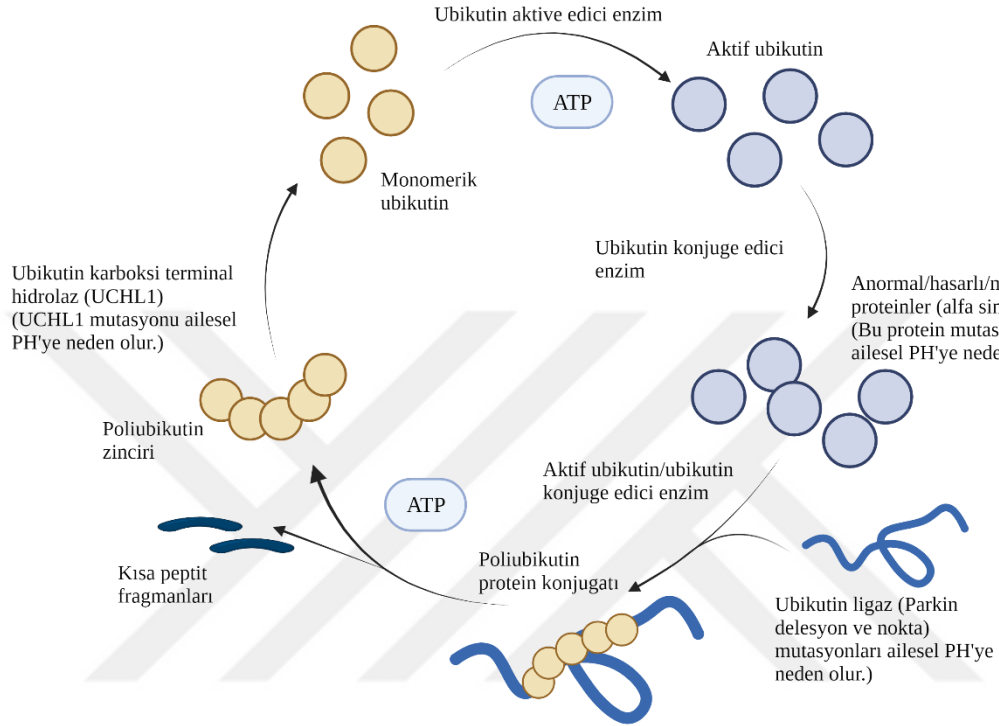
2.1.3.1. Mitokondriyal Bozukluklar

Enerji kaynağı ve üretim yeri olarak mitokondride, kalsiyum metabolizması, hücrel ölümün kontrol edilmesi gibi birçok aktivite gerçekleşmektedir. PH'de mitokondrideki bozuklukların önemli bir etkisi olduğuna dair birçok araştırma yapılmıştır (Moon ve ark. 2015; Hu ve ark. 2016). 1-metil-4-fenil-1, 2, 5, 6-tetrahidropiridin (MPTP) isimli uyuşturucu maddeyi kullanan kişilerde, 1983 senesinde, PH semptomlarının görüldüğü keşfedilmiş ve MPTP ile primatlar üzerinde yapılan çalışmada nörotoksik etki gösterilmiştir (Langston ve ark. 1983; Kolata ve ark. 1983), PH'li bireyle yapılan çalışmalar da mitokondriyal disfonksiyonun hastalıkla ilişkisini doğrular niteliktedir. Hasta bireylerin SN'lerinde mitokondrideki kompleks I'in bariz bir şekilde aktivitesinde azalma olduğu, mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) yüksek oranda kaybolduğu gösterilmiştir (Chen ve ark. 2019). Mitokondrideki bozukluklarla birlikte reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin aşırı düzeylere ulaşması, adenin trifosfatın (ATP) hızla tüketilmesi, kaspaz aktivitelerindeki bozukluk ve salınım, kompleks I ve III'ün hasar görmesi, elektron taşıma zincirinin defekti gibi hücrel ölümü tetikleyen sonuçlar görülmektedir. Artan oksidatif stresle birlikte protein katlanma mekanizmalarında, ubiquitin-proteazomal sistemi (UPS) ve şaperonlar gibi birçok protein aktivitesinde değişimler ve bunlara bağlı olarak da proteinlerin yanlış katlanmaları sonucu birikmesi gerçekleşmektedir. Tüm bunların ışığında dopaminerjik nöronların ölümü de PH'de patolojik bir süreç olarak mitokondriyal disfonksiyonla ilişkilendirilmiştir (Exner ve ark. 2012). mtDNA homeostazının PH'li bireylerde bozulduğu ve dopaminerjik nöronların kaybıyla sonlanan bir süreç olduğu için PH patogenezinin temel özelliği olduğu değerlendirilmektedir (Dickson ve ark. 2012). Mitokondriyal bozukluk sonucu mitokondrinin yıkımı otofajik mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Mitofaji denilen bu süreçte mitokondri sayısı ve kalitesi sürdürülmektedir. PH'de ise mitofajinin proteinik etkileşimler sonucu indüklenerek normal olmayan bir süreçle mitokondri kaybına neden olduğu ortaya konulmuştur (Burchell ve ark. 2013).

2.1.3.2. Proteozom Sistemi ve PH İlişkisi

Protein degradasyonunda en önemli yollardan birisi de Ubikutin-proteozom sistemidir (UPS). Yanlış katlanan veya bozulmuş yapıdaki proteinler, normalde hücrede proteozom sistemi tarafından degrade edilirler. Okside olan veya mutasyona uğrayan protein yapılarının çok olması degrade edilememesine ve sonuç olarak birikime neden

olurken, proteozom sistemindeki fonksiyon kaybı da proteinlerin degrede edilemeyip birikmesine neden olur. Nörodenejeratif hastalıklarda da protein birikimleri gözlenmektedir (Şekil 2-3). (Biorender.com'da düzenlenmiştir.).



Şekil 2-3: Ubikutin proteozom sistemi (UPS) ve PH ilişkisi (McNaught ve ark. 2001).

UPS ile degrede edilecek protein yapıları 76 aminoasitlik ubikitin proteiniyle işaretlenmektedir. E1 enzimiyle normalde inaktif haldeki ubikitin aktive edilir, konjuge edici enzim olan E2'ye aktarılır ve ubikitin spesifik bir ligaz enzimi olan E3 ise E2 enzim yapısını bozarak ilgili proteinin ubikitinle işaretlenme süreci tamamlanmış olur. İlgili protein artık işaretlendiği için proteozom kompleksleri tarafından tanınarak parçalanır (Nakamura ve ark. 2009). α sinüklein gibi proteinlerin degradasyonu için UPS önemli bir sistemdir ve UPS'nin bozuk olduğu durumlarda mutant α sinükleinler kümeleşerek birikirler. Böylece hücre ölümüyle sonlanan sürece girilmiş olur (Reiser ve ark. 2013). PH'li bireylerin ölüm sonrası beyinlerinin SN bölgelerinde Lewy cisimcikleri incelendiğinde ubikutin pozitif immün boyama yapılmıştır. Bu bulgulara göre degrede olacak proteinler ubikit ile işaretlenmiş ancak proteozom sistem tarafından degrede

edilememiştir. Böylece PH ile UPS arasında doğrudan ilişki olduğu keşfedilmiştir (Akbayır ve ark. 2017). Parkin proteini, α sinüklein ile doğru olarak etkileşim göstermezse hücrelerin apoptoza gitmesine neden olur. Ayrıca siklin-E proteininin de Parkin proteinin bir substratı olarak nöronların sağlıklı kalmasında önemli rolü vardır. Parkin ilişkili PH'li bireylerin mezensefalonlarında artan siklin-E düzeyleri görülmüştür. Yalnızca mutant proteinlerin ubiquitinlenmesi değil aynı zamanda mutant UCHL1 genine sahip dopaminerjik nöronlarda da ubiquitin pozitif formların oluşumu ve mutant olmamasına rağmen agregre olmuş α sinükleinlerin oluşmasına neden olur. PH mutasyonları aynı zamanda ubiquitinasyon enzimlerinin fonksiyonunu yitirmesine neden olabilmektedir (Xiong ve ark. 2009; Zucchelli ve ark. 2010, Bekris ve ark. 2010).

2.1.3.3. Oksidatif Stres ve PH İlişkisi

Oksidatif stresin artması PH'de gözlenen patolojik süreçlerden birisidir. Beyin dokuları incelenen PH vakalarında oksidatif farklılıklar gözlemlenmiştir. Reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin oluşumu ve yıkımı olağan bir denge içerisinde gerçekleştiği sürece yaşamsal faaliyetlerde sıkıntılar görülmez. Serbest radikallerin oluşumundaki artışla beraber oksidatif stres denilen tablo ortaya çıkmaktadır (Halliwell ve ark. 2007; Dias ve ark. 2013).

Beyin, ROS'lara duyarlı bir yapıya sahiptir. Antioksidanların ROS türlerini uzaklaştırılmasında önemli rolleri vardır ve organizmada koruyucu etkileri bulunur. Beynin oksidatif stresten korunmasında yardımcı olan yapı glutatyondur (GSH). Beynin SN bölgesindeki dopamin deaminasyonu ve otooksidasyonu monoamin oksidaz (MAO) ile gerçekleştirilir. Bunun sonucunda da melanin oluşmaktadır. Melanin, ölmek üzere dopaminerjik nöronlarda inflamasyon oluşumuna neden olur. Aynı zamanda reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin nöronlardan atılımını, toksik metal ve metabolitlerin de uzaklaştırılmasını sağlar. Hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonu ile karakterize olan oksidatif stres, ölüm sonrası PH'li beyinlerin SN bölgesindeki lipid peroksidasyonunun arttığı gözlenmiştir (Varcin ve ark. 2012; Blesa ve ark. 2015).

2.1.3.4. Nöroinflamasyon ve Mikroglial Aktivasyon

Nöroinflamasyon PH olgularıyla yapılan ölüm sonrası çalışmalarda sıklıkla karşılaşılan patolojik bir durumdur. Bu çalışmalar sonucunda nöroinflamasyonun mikroglia kaynaklı olduğu görülmüştür. Mikroglia hücreleri, myeloid kökenli ve

makrofaj benzeri aktivite gösteren santral sinir sisteminin fagositoz yeteneği olan hücrelerdir (Parkhust ve ark. 2013; Kouli ve ark. 2020). Mikroglial aktivite ROS oluşumuyla başlayıp NF-kB aracılı TNF-alfa, IL-6 ve prostaglandin proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasıyla devam eden bir süreçtir (Zhang ve ark. 2016). PH'li bireylerin periferik dokularında ve kanlarında yüksek düzeylerde TNF α ve IL-6 görülmüştür (Tansey ve ark. 2007). Mikroglial aktivitenin aşırı arttığı durumlarda nöronal inflamasyon sonucu fagositozda artış olmaktadır. PH deney hayvanı modeliyle yapılan çalışmalar göstermektedir ki SN'deki mikroglial aktivitedeki artış sonucunda dopaminerjik nöronların sayısında ciddi azalmalar görülmüştür (Qian ve ark. 2008).

2.2. PH İlişkili Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar, gen ifadeleri ve perotein seviyelerindeki değişikliklerle hücresel süreçlerin yürütülmesini sağlarlar. Yapılan çalışmalara göre PH ve sağlıklı bireyler arasında gen ifade farklılıkları, beyin farklı bölgeleri arasında da benzerlik göstermektedir (Lewis ve ark. 2012). Prefrontal korteks ile yapılan çalışmalarda RNA dizileme, transkriptomik ve kütle spektrometrisi proteomik verilerinin kombinasyonu ile PH gelişiminde yer alan ana yolların protein katlanması ve ilgili mekanizmalar, mitokondriyal süreçler ve metalloproteinlerle ilgili olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmalar sonucunda transkriptomik ve proteomik veriler bir arada değerlendirildiğinde; protein katlanması, mitokondriyal süreçler ve metalloproteinlerle GWAS lokusları ile örtüşen SNCA dahil olmak üzere birçok gen tanımlanmıştır. (Dumitriu ve ark. 2016). Hoss ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada prefrontal kortekste bir dizi mikroRNA'nın (miRNA) ekspresyon seviyelerinin PH beyin örnekleri ile sağlıklı beyin örnekleri arasında farklılıklar gösterilmiştir (Hoss ve ark. 2016). Bu sonuçlar, gen ve protein ekspresyonlarının epigenetik mekanizmalar ile hastalık durumu arasında doğrudan bir bağlantıyı güçlü bir şekilde desteklediğini göstermektedir.

2.2.1. DNA Metilasyonları

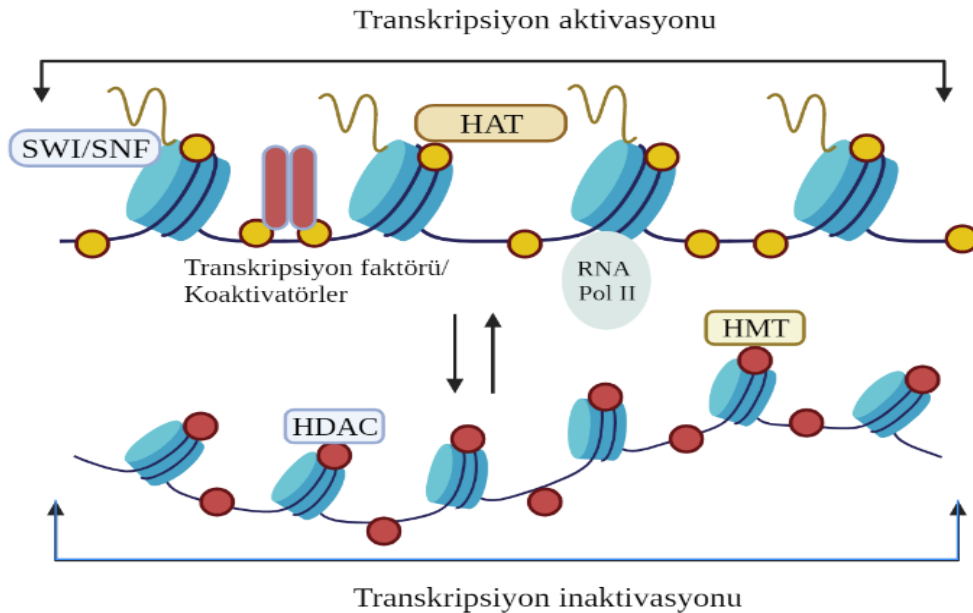
Metil grubunun sitozine eklenerek 5-metilsitozine dönüştürüldüğü modifikasyon tipik olarak CpG adacıkları denilen, sitozin ve guaninin bitişik olduğu bölgelerde meydana gelir. DNA metilasyonu, gen ekspresyonları ve protein seviyelerinin kontrol edilerek hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca açma-kapama anahtarı gibi rol oynayarak DNA'da yoğun olduğu bölgelerde transkripsiyonel aktivitenin azalmasını sağlamaktadır. Daha az metile bölgeler ise transkripsiyonel aktivitenin yüksek

olduğu bölgeleri ifade etmektedir (Portela ve ark. 2010). Yapılan çalışmalar sonucunda α sinükleinin DNA metiltransferaz enzimi 1 (DMNT1) ile etkileşime girerek onu sitoplazmada tuttuğu da gösterilmiştir. PH'li bireylerde DMNT1 seviyelerinin, sağlıklı bireylere kıyasla daha düşük olduğu ve DMNT1 yanlış lokalizasyonunun SNCA geninin metilasyonunu doğrudan değiştirdiği tespit edilmiştir (Desplats ve ark. 2011). 2013 yılında, frontal korteks ve kandan yapılan bir epigenomik çalışmada PH vakalarında tanımlanan diferansiyel olarak metillenmiş bölgelerin %80'inden fazlasının hipometile olduğu gösterilmiştir (Masliah ve ark. 2013). PH'de genomik olarak etkilendiği tespit edilen genlerden olan ve aynı zamanda yüksek oranda metile olduğu tespit edilen genlerden birisi MAPT genidir (Nalls ve ark. 2014). Ancak bazı çalışmalarda MAPT'de hiçbir diferansiyel metilasyon paterni gözlenmezken, kromozom 17q MAPT lokusuyla ilişkili uzun kodlamayan RNA MGC57346 ve kodlayan genler PLEKHM1, ARL17A ve KANSL1'de metilasyon paterni gözlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda genom düzeyindeki çalışmalarda hedef olarak belirlenen genlerle birlikte epigenetik ilişkili olabilecek diğer genlerin de birlikte incelenmesi gerektiği kanısı ortaya çıkmıştır. Bu genler, diğerleri arasında, nöroaktif ligand reseptör etkileşimi ve nörotrofin sinyali gibi beyin merkezli yollarda yer alır. 219 PH ve 223 kontrolle yapılan başka bir çalışmada ise en yüksek hedef genler belirlenmiş ve sırasıyla nöronal apoptoz ile translasyon sonrası sinyalleşmede yer alan iki gen olan FANCC ve TNKS2'de önemli metilasyon farklılığı gösterilmiştir. Metilasyonun gen ekspresyonunun düzenlenmesi üzerindeki etkisi, ancak diğer epigenetik mekanizmalar ile birlikte değerlendirildiğinde anlaşılabilir (Coupland ve ark 2014).

2.2.2. Kromatin Yeniden Düzenlenmesi

Histonların modifikasyonu ile düzenlenen kromatin yeniden düzenlenmesi sayesinde gen ekspresyonları dinamik olarak kontrol edilmektedir. Histonların posttranslasyonel modifikasyonları olan metilasyon ve asetilasyon ile kromatin yapısı değiştirilerek DNA'nın erişilebilirliğini düzenlenebilmektedir (Şekil 2-4). (Biorender.com'da düzenlenmiştir.). Histonların asetillenmesi ve deasetillenmesi genlerin transkripsiyonel olarak aktivitesini etkilemektedir. PH'li bireylerin ölüm sonrası orta beyninden elde edilen dopaminerjik nöronlarında, sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek seviyede histon asetilasyonu görülmüştür (Park ve ark. 2015). PH'ye spesifik olan genlerin aktivasyonu kromatin yeniden düzenlenmesiyle kontrol edilmekteyken, istisnai

bir durum olarak α sinüklein muhtemel bir geri besleme döngüsünden ötürü histon asetilasyonunu da düzenleyebilmektedir. Kontopoulos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, α sinükleinin doğrudan histonlara bağlandığı ve bir deasetilaz olan SIRT2 ile etkileşime girerek H3 histonunun asetilasyonunu inhibe ettiğini gösterilmiştir (Kontopoulos ve ark. 2006). Ayrıca α sinükleinin PH ilişkili mutantları p.A30P ve p.A53T'nin, mutant olmayan α sinüklein ile karşılaştırıldığında artan bir nükleer lokalizasyon sunduğunu gösterilmiştir. Heterozigot p.A53T mutasyonuna sahip bir PH vakasında p.A53T allelinin susturulduğu ve mutant SNCA allelinin susturulmasının histon deasetilasyonundan kaynaklandığı gösterilmiştir. Bunlarla beraber histon deasetilaz (HDAC) inhibitörlerinin α sinüklein aracılı toksisiteye karşı nöronal koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir (Monti ve ark. 2010; Kidd ve ark. 2010). PINK1 proteini, bir transkripsiyonel baskılayıcı olan HDAC3'e bağlanabilir ve nöronal hücrelerde fosforilasyon yoluyla histon deasetilaz aktivitesini artırabilir. Bunun sonucunda fosforile HDAC3'ün p53'e bağlanması aktive edilmiş olur ve böylece p53 asetilasyonunu ve stabilitesini azaltarak p53 aracılı nöronal apoptozu inhibe etmiş olur. HDAC3'ün eksikliği ise PINK1'in p53 üzerindeki etkisini ortadan kaldırır (Choi ve ark. 2015).



Şekil 2-4: Histon modifikasyonu yoluyla kromatinlerin yeniden düzenlenme mekanizması

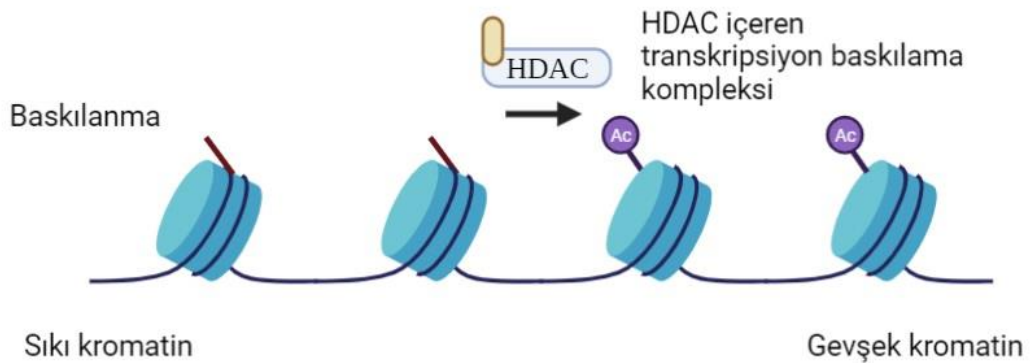
2.2.3. Epigenetik Mekanizmalarla İlişkili Genler

2.2.3.1. Histon Proteinleri, H3C1 ve H3C12

Histonlar, ökaryotik organizmalarda nükleozom yapısından sorumlu olan temel nükleer proteinlerdir. Nükleozom yapısı; dört temel çekirdek histon olan H2A, H2B, H3 ve H4'ün her birinin çiftlerinden oluşan bir oktamerin etrafına sarılmış yaklaşık 146 bp DNA'dan oluşmaktadır. Kromatin iplikçikler, kromatin yapıları oluşturmak için bağlayıcı histon H1'in nükleozomlar arasındaki DNA ile etkileşimi yoluyla daha da sıkıştırılırlar. Bu genler intron içermezler ve histon H3 ailesinin bir üyesini kodlar. Bu genden alınan transkriptler polyA kuyruklarından yoksundur; bunun yerine, bir palindromik sonlandırma ögesi içerirler. Bu gen, kromozom 6p22-p21.3 üzerindeki büyük histon gen kümesinde bulunmaktadır (Zhang ve ark. 2021).

2.2.3.2. HDAC4 ve HDAC5

Histonlar, transkripsiyonel düzenlemede, hücre döngüsü ilerlemesinde ve gelişimsel olaylarda kritik bir rol oynar. Histon asetilasyonu ve/veya deasetilasyonu, kromozom yapısını değiştirip transkripsiyon faktörünün DNA'ya ulaşmasını etkiler (Şekil 2-5). (Biorender.com'da düzenlenmiştir.). Histon deasetilazlar bir DNA'ya doğrudan bağlanamazlar, MEF2 gibi bir transkripsiyon faktörü aracılığıyla DNA'nın promotör bölgesine bağlanıp deasetilasyonu gerçekleştirerek transkripsiyonu baskırlar (Zhang ve ark. 2021).



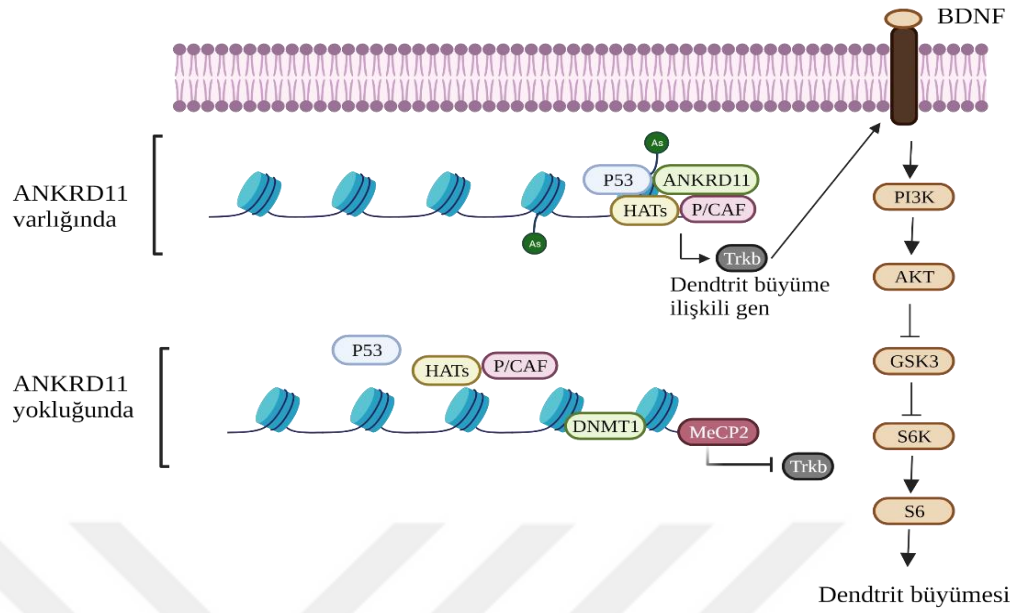
Şekil 2-5: Histon deasetilasyonu ve histon deasetilazların rolü (Ruijter ve ark. 2003)

HDAC4 geni, histon deasetilaz 4 adı verilen bir enzimi sentezlemektedir. Bu enzim, histon proteinlerini yeniden düzenleyen, deasetilasyon grubu enzimlerdendir. Asetil grubunu histon proteinlerinden çıkarıp kromozom yapısındaki DNA'nın sıkıca paketlenmesine neden olurlar. Dolayısıyla doğrudan DNA ile etkileşime girmeden DNA'daki transkripsiyon sürecini histon proteinleri aracılığıyla düzenlerler. Özellikle kalp ve iskelet sisteminde çalışılan HDAC4'ün, bu sistemlerin gelişiminde rol oynayan gen aktivitesinin düzenlenmesinde önemli rolü olduğu keşfedilmiştir. Sinir hücrelerinin sağkalım sürecinde de görevli oldukları gösterilmiştir (Delcuve ve ark. 2012).

HDAC5 ise özellikle bellek konsolidasyonunda rol oynadığı gösterilmiş olup Alzheimer hastalığıyla ilişkilendirilmiştir. Alzheimer hastalığı tedavisi için histon deasetilazların inhibisyonunun sağlanması amacıyla HDAC inhibitörleri geliştirilmiştir. Ancak hafıza ile ilişkisi keşfedildikten sonra HDAC5'i hedeflemekten kaçınılmıştır. Histon deasetilazların işlevleri susturucu RNA'lar (siRNA) aracılığıyla etkin bir şekilde incelenebilmekte ve hastalıklarla ilişkisi keşfedilebilmektedir (Agis-Balboa ve ark. 2013; Munkácsy ve ark. 2016).

2.2.3.3. ANKRD11 ve ANKRD12

Ankirin tekrar alanı adı verilen, ANKRD genleri, adından anlaşılacağı üzere ankirin alanları verilen çok sayıda bölge içermektedir ve bu alanlara sahip proteinler, diğer proteinlerin birbirleriyle etkileşime girmesine yardımcı olmaktadır. ANKRD11 proteini, gen aktivitesini kontrol etmek için önemli olan histon deasetilazlarla etkileşime girerek genlerin ne zaman transkripsiyona uğrayacağını belirlemektedir (Sirmaci ve ark. 2011). ANKRD11, histon deasetilazlarla birlikte ve p160 koaktivatörlerini bir araya getirerek p160 koaktivatörlerinin gen aktivitesini açma yeteneğini düzenlemektedir. ANKRD11 ayrıca hücrelerin büyümesini, bölünüp çoğalmasını ve apoptotik süreçle kendi kendini öldürmesini kontrol eden p53 proteininin aktivitesini etkileyebilir (Şekil 2-6). (Biorender.com'da düzenlenmiştir.). ANKRD11 proteini beyinde sinir hücrelerince ifade edilmektedirler (Roth ve ark. 2021). Embriyonik gelişim sırasında ANKRD11, bu hücrelerin çoğalmasını ve beynin gelişimini düzenlemeye yardımcı olur. Yapılan araştırmalar sonucunda, bu proteinin nöronların öğrenme ve hafıza için önemli olan zamanla değişip uyum sağlama yeteneğinde rol oynayabileceğini göstermektedir. ANKRD11'in kemik gelişiminde de rol oynadığı bilinmektedir (Li ve ark. 2008; Ka ve Kim 2018).



Şekil 2-6: Ankrd11'in gen ekspresyon sürecine etkisi

2.2.3.4. ITM2B ve GABBR1

İntegral membran proteini 2B (ITM2B) tüm dokularda bulunan, hücrelerin kendi kendini yok etmesi olan apoptoz sürecinin başlatılmasında, hücrelerin aşırı hızlı ya da kontrolsüz olarak büyüüp bölünmesini engelleme yani tümör oluşumunu baskılamada rol oynadığı düşünülmektedir. ITM2B'nin APP geni tarafından üretilen amiloid öncü proteininin işlenmesine dahil olduğu düşünülmektedir. Amiloid öncü protein işlevi ile ilgili henüz elde edilen çok fazla bilgi bulunmamakla beraber erken gelişim esnasında beyindeki sinir hücrelerinin işleviyle ilgisi olabileceği düşünülmektedir (Troy ve ark. 2011; Zhang ve ark. 2011). Yapılan çalışmalar ITM2B proteininin, amiloid öncü proteinlerin formlarının hücrelerde, dokularında birikmesini engelleme rolü olduğunu göstermektedir (Baron ve ark. 2015; Mandal ve ark. 2019).

Gama aminobütirik asit (GABA), memeli merkezi sinir sistemindeki ana inhibitör nörotransmitterdir. Gama aminobütirik asit Ttip B reseptör alt birimi 1 (GABBR1) ise nörotransmitter salınımının inhibisyonunu ve nöronal uyarılabilirliğin modülasyonunu sağlamaktadır. Gama aminobütirik asit tip B reseptör alt birimi 2 (GABBR2) ile heterodimer olarak işlev görmektedir (Wang ve ark. 2015). Hücrelerdeki metabolik

aktiviteleri düzenlemek için bir dizi adım tetikleyen membran reseptörü tipi yani metabotropik olan GABBR1, G proteinleri ve sekonder haberci aracılığıyla yavaş, uzun süreli inhibisyon sinyalleri oluşturur. Yapılan çalışmalarda GABBR1 reseptör işlevindeki değişikliklerin epilepsi, depresyon, uyuşturucu bağımlılığı, biliş ve noisepsiyon çeşitli nörolojik, psikiyatrik bozukluklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Terunuma ve ark. 2018; Evenseth ve ark. 2020).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi, Protokol ve İşlem

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hareket Bozuklukları Nöroloji Polikliniği tarafından takipli olan ve PH tanısı konan 75 hasta ve 50 kontrol olgusu yer almaktadır. Örneklem büyüklüğü güç analizine göre belirlenmiştir. Olgu tanısı, Birleşik Krallık Parkinson Hastalığı (PH) Derneği Beyin Bankası'na oluşturulmuş olan klinik PH kriterleri gözetilerek konmuştur (Marsili ve ark. 2018).

Çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 06.12.2019 tarihli, 20 nolu toplantı kararı ile etik yönden kabul edilmiş ve bu karara binaen hastalardan ve kontrol grubundan çalışmaya katılmayı kabul edenlerden "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" imza karşılığı alınmıştır.

Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri;

İÜ, İTF, Davranış Nörolojisi ve Hareket Bozuklukları Polikliniği'nde gönüllü olarak çalışmaya dahil olan hastalar, ikinci bir nöroloji uzmanı tarafından dosya üzerinden tekrar değerlendirilmiştir. Hasta değerlendirmeleri yapılırken dikkate alınan dahil edilme ve dışlanma kriterleri aşağıdaki detaylandırılmıştır.

Dahil edilme kriterleri:

- Birleşik Krallık Parkinson Hastalığı Derneği Beyin Bankası'nın (UPDRS) oluşturduğu klinik parametreleri tamamlayan, idiyopatik PH tanısı konmuş gönüllü olgular.

Dışlanma kriterleri:

- İnme, iskemik atak, immünolojik hastalık, serebellar ve piramidal bulgular, otonom disfonksiyon, dispraksi, bakış parezisi belirgin olan ve Lewy cisimciği kaynaklı demans öyküsü olan olgular,
- DSM V kriterlerine dikkate alınarak demans tanısı konmuş vakalar (American Psychiatric Association (APA) - 2013),
- Muhtemel parkinsonizm nedeni olabilecek baş travması, ensefalit, toksik madde maruziyeti vb gibi öyküye sahip olgular,

- Vasküler parkinsonizm ile parkinson plus tablosu izlenenler, kullanılan nöroleptik ilaca bağlı parkinsonizm görülen vakalar, PH nedeniyle cerrahi operasyona alınan vakalar, ağır kognitif bozukluğa sahip ve/veya muayene esnasında kooperasyon sağlayamayan olgular çalışmadan dışlanmıştır.

Hastalığın klinik evresi ve şiddeti değerlendirilirken UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale) ve Hoehn-Yahr (H&Y) değerlendirme skalaları kullanılmıştır (Hoehn ve Yahr 1967; Fahn ve Elton 1987). Her hasta için hastalığın başlangıç yaşı, hastalığın süresi, hastalığın başlangıcındaki semptomlar ve bulgular not edilmiştir. Her bir olgu standardize edilmiş görüşmeye alınarak nörolojik muayeneler gerçekleştirilmiştir. Bunlara ek olarak sosyodemografik durumları, ailesel soygeçmiş özellikleri ve mevcut şikayetleri değerlendirilmek üzere not edilmiştir.

UPDRS skalasına göre hastalar 4 klinik özellik bakımından değerlendirmeye alınmaktadır (toplamda 183 Puan):

- 1) Davranış, düşünce ve ruh hali (92 Puan)
- 2) Günlük yaşam aktiviteleri (52 Puan)
- 3) Motor beceriler (16 Puan)
- 4) Tedavinin komplikasyonları (23 Puan)

Değerlendirmede kullanılan diğer skala olan H&Y ile hastalık 5 farklı evrede incelenmiştir. Bu evreler ise;

I: Tek tarafta olan tremor, akinezi, rijidite ve postür dengesizliği durumu.

II: İki tarafta olan tremor, akinezi veya bradimimi, rijidite, yutmada güçlük, özellikle boyunda görülen aksiyel rijidite, postürde öne eğilme, ayağını sürüyerek ya da yavaş yürüme, tek başına ya da genel katılık durumu gibi aksiyel bulgularla birlikte görülen postürel bozukluklar.

III: İkinci evreye ek olarak hastanın günlük yaşamsal aktivitelerini tek başına yapabilmesine engel olmayan dengesel bozuklukları.

IV: Hastaların günlük aktivitelerinin tamamı veya büyük bir kısmında yardıma ihtiyaç duymaları.

V: Hastanın yaşamını yatağa bağlı veya tekerlekli sandalye ile sürdürdüğü durumlar.

Sağlıklı kontroller ise nörolojik ve psikiyatrik öyküsü, herhangi bir metabolik rahatsızlığı olmayan, cinsiyet ve yaş bakımından hastalarla uyumlu olan gönüllü bireylerden oluşmaktadır.

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

Mikropipet seti (Eppendorf), qPCR cihazı (Agilent), otoklav (Nüve), vorteks (Isolab), santrifüj (Heraeus), +4°C buzdolabı (Uğur), -20°C buzdolabı (Uğur), -80°C buzdolabı (Thermo-Scientific).

3.2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

qPCR plakaları (Axygen), steril filtreli pipet ucu (Axygen), 2 ml santrifüj tüp (Sorfa), 50 ml santrifüj tüp (Sorfa), 2 ml kryotüp (Sorfa).

3.2.3. Kullanılan Kitler

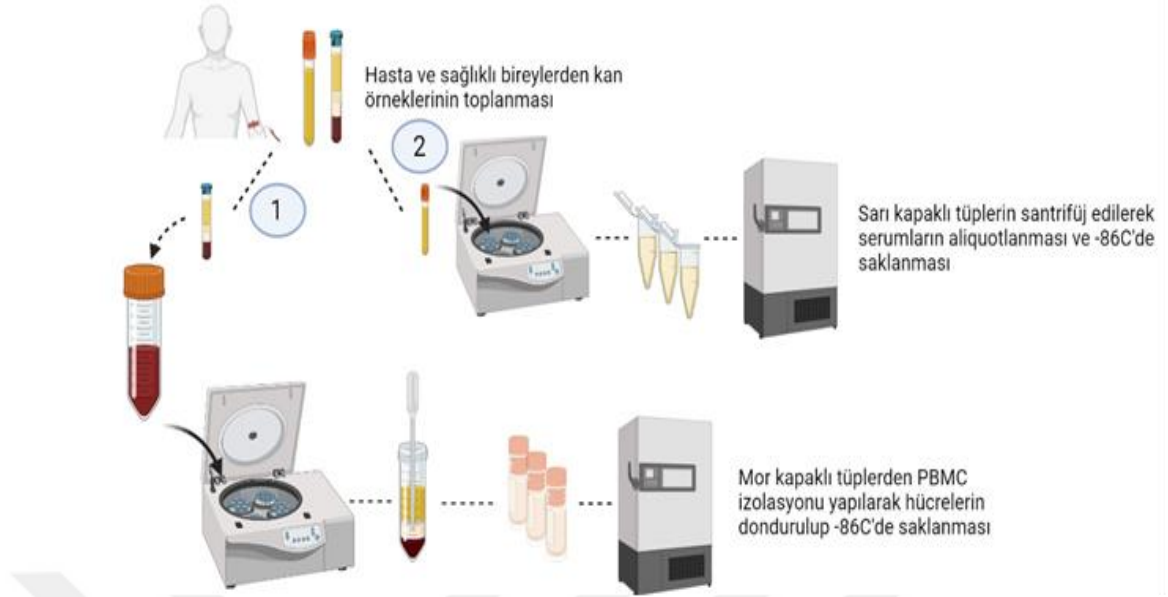
Hücreden RNA izolasyon kiti (AnalytikJena Innuprep), cDNA sentez kiti (SensiFast BioLine), SYBR Green Master Mix (Euroclone).

3.3. Periferik Kan Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Çalışma kapsamında gönüllü bilgilendirme formu imzalatılarak her olgudan 2 tüp 10'ar cc periferik kanı toplanmıştır. Kan tüplerinden biri mor kapaklı EDTA içeren tüpe, diğeri ise sarı kapaklı kuru tüpe alınmıştır. Tüm örnekler İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü laboratuvarında aynı gün içerisinde çalışıldı. EDTA'lı tüpten periferik kan mononükleer hücreler (PBMC) elde edildi. Kuru tüpten ise serumlar elde edildi. Elde edilen tüm örnekler -80 °C'de saklanmıştır.

3.4. Serum ve PBMC Eldesi

Kuru tüpler santrifüj öncesi 2 saat bekletildi, sonrasında 1000xg'de 15 dakika santrifüj edilerek serum toplandı. Serumlar santrifüj tüplerine bölünerek -80 °C'de saklandı (Şekil 3-1) (Biorender.com'da düzenlenmiştir.).

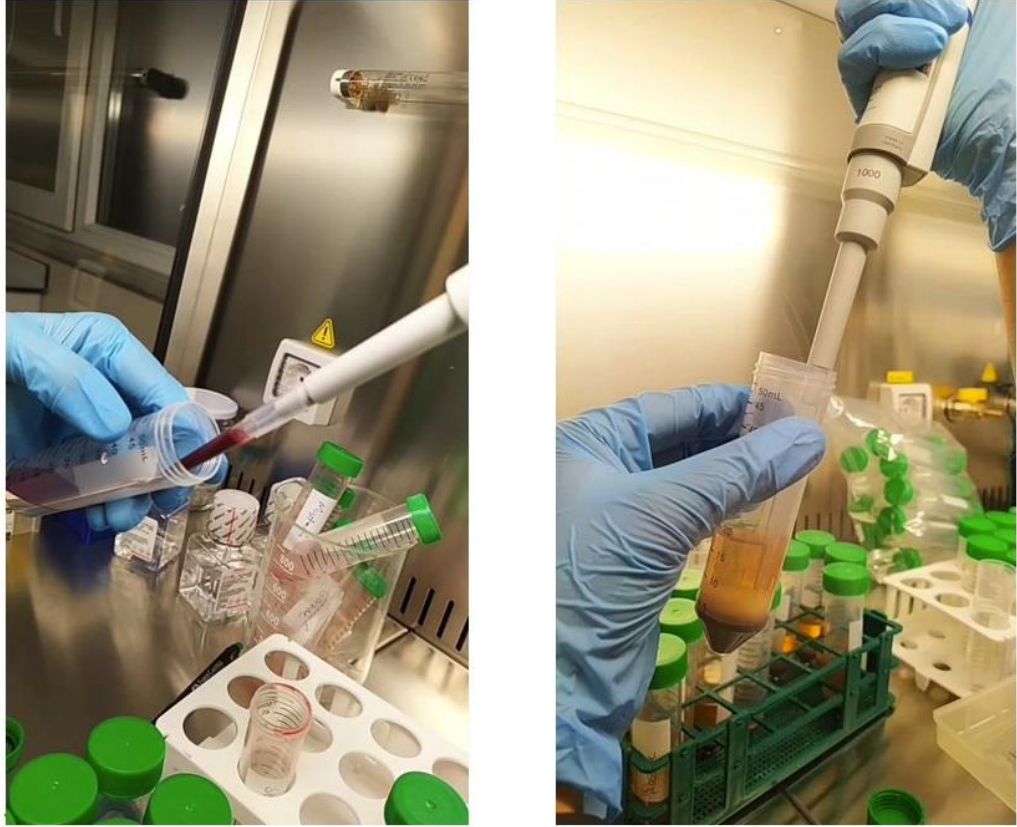


Şekil 3-1: Tam kandan serum ve PBMC eldesinin özet gösterimi

Kan örneklerinden PBMC eldesi aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir;

- 1) Mor kapaklı EDTA'lı tüpteki 20ml tam kanın tamamı 50ml'lik tüpe aktarılırak üzerine 1/1 oranında PBS eklendi ve homojenize edildi.
- 2) Farklı bir 50 ml'lik tüpe toplam hacmin 1/3'ü kadar miktarda Ficoll Paque (Sigma) eklendi.
- 3) PBS eklenmiş kan Ficoll Paque'nın (Sigma) üzerine gradient oluşturacak şekilde yavaş yavaş 1000uL'lik pipet kullanılarak bırakıldı.
- 4) Oluşan fazlar, dikkatlice, birbirine karıştırılmadan santrifüj yerleştirildi. 3000 rpm'de 20 °C'de 25 dk hızlanma ve yavaşlama ayarları 3'te olacak şekilde santrifüj edildi.
- 5) Santrifüj sonrasında fazlar arasında oluşan "buffy coat" pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde toplanarak yeni bir 50'lik tüpe aktarıldı (Şekil 3-2).
- 6) Toplanan "buffy coat"un üzerine ilk eklenen hacimde PBS ilave edildi. 1800 rpm'de +4°C'de 10 dk süreyle hızlanma ve yavaşlama ayarları 9'da olacak şekilde santrifüj edildi. Süpernatant atılarak tekrar PBS ile yıkandı.

- 7) Santrifüj sonrası oluşan pellet üzerine 900 μ L FBS ve 100 μ L DMSO eklenerek hücreler homojen hale getirildi, ardından hücre sayımı yapıldı. Sayım sonrası 1 ml’de 15×10^6 hücre olacak şekilde donduruldu.
- 8) Hücreler $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de dondurularak saklandı.



Şekil 3-2: PBMC eldesi için tam kandan faz oluşturulmasının öncesini ve santrifüj sonrası oluşan fazın toplanmasını gösteren deneye ait görüntü

3.5. PBMC’den RNA İzolasyonu

Kandan elde edilen PBMC örneklerinden H3C1, H3C12, ANKRD11, ANKRD12, HDAC4, HDAC5, ITM2B, GABBR1 ve kontrol olarak GAPDH ile ACTINB gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu için kit kullanılmıştır, kit üreticisinin önerdiği şekilde donmuş hücreler önce su banyosunda $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de çözüldü ardından santrifüj yapıldı.

Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml TRIzol çözeltisi eklenerek hücreler homojenize edildi. Ardından aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

- 1) Homojenatın üzerine 1 ml %95-100'lük etanol eklendi ve homojenize edildi.
- 2) Ardından bu karışım spin kolonlara aktarıldı ve 14.000xg'de 30 sn santrifüj edildi.
- 3) Süzüntü atılarak filtreye 400 µL RNA yıkama tamponu eklenip 14.000xg'de 30 sn santrifüj edildi.
- 4) Her bir örneğe 5 µL DNase I, 75 µL DNA parçalama tamponu eklenerek 15 dk oda ısısında inkübe edildi.
- 5) İnkübasyonun ardından filtrenin üzerine 400 µL RNA ön yıkama tamponu eklenerek 14.000xg'de 30 sn santrifüj edildi ve bu adım 2 kez tekrar edildi.
- 6) Süzüntü atıldıktan sonra filtreye 700 µL RNA yıkama tamponu eklenerek 14.000xg'de 1 dk santrifüj edildi.
- 7) Ardından filtre üzerine 100 µL DNase/RNase free su eklenerek elüe edildi.
- 8) Elde edilen RNA örnekleri daha sonra çalışmaya dahil edilmek üzere -80 °C'de saklandı.
- 9) RNA konsantrasyonunun ve saflığının tespit edilmesi için nanodropta ölçüm yapıldı.

3.6. Komplementer DNA Sentezi

Elde edilen total RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentez işlemi ticari kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üreticinin önerdiği protokolda kullanılan malzemeler, miktarlar ve koşullar sırasıyla Tablo 3-1 ve 3-2'de verilmiştir.

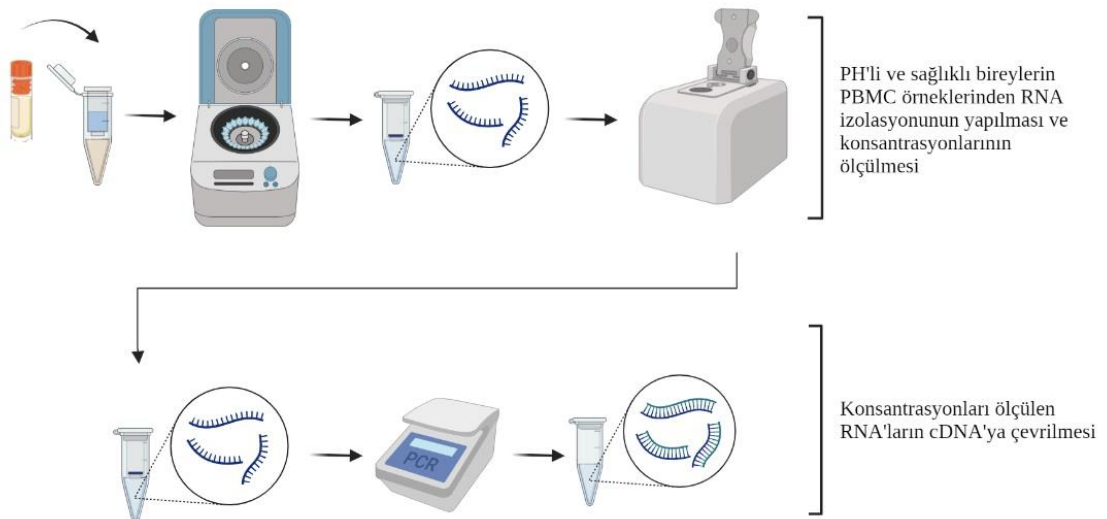
Tablo 3-1: Komplementer DNA sentezinde kullanılan malzemeler ve miktarları

Bileşenler	Miktarlar
Tampon çözeltisi (5X)	4 µl
Ters Transkriptaz Enzimi	1 µl
RNA örneği	1 µg (Hacim, RNA miktarına bağlıdır)
Su	n µl (Toplam hacim 20 µl'ye tamamlanır)

Tablo 3-2: Komplementer DNA sentez protokolüne ait sıcaklık koşulları

Sıcaklık	Süre
25 °C	10 dk
45 °C	15 dk
85 °C	5 dk

RNA izolasyonu, ölçümü ve cDNA'ya çevrim basamakları Şekil 3-3'te (Biorender.com'da düzenlenmiştir.) şematize edilmiştir.

**Şekil 3-3: PBMC'den RNA izolasyonu ile başlayan ve cDNA'ya çevrimle sonlanan basamakların özet gösterimi**

3.7. Real-time PCR Yönteminin Uygulanması

Liyofilize olarak temin edilen gen primer çiftleri üreticinin önerdiği şekilde DNase/RNase free su ile sulandırıldı ve son konsantrasyonu 10 μ M olacak şekilde gerekli seyreltmeler yapılarak -20 °C’de muhafaza edildi. İlk kez kullanılacak olan tüm primerlerin bağlanma sıcaklıkları ve kullanılacak miktarların belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu aşamaların gerçekleştirilmesi için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları Tablo 3-3’te verilmiştir.

Tablo 3-3: Real time PCR yönteminde her bir reaksiyon için kullanılan bileşenler ve bu bileşenlerin miktarları

Bileşenler	Miktarlar
Master Mix	10 μ l
cDNA	1,5 μ l
Primer	2,0 μ l
Su	6,5 μ l
Toplam	20 μl

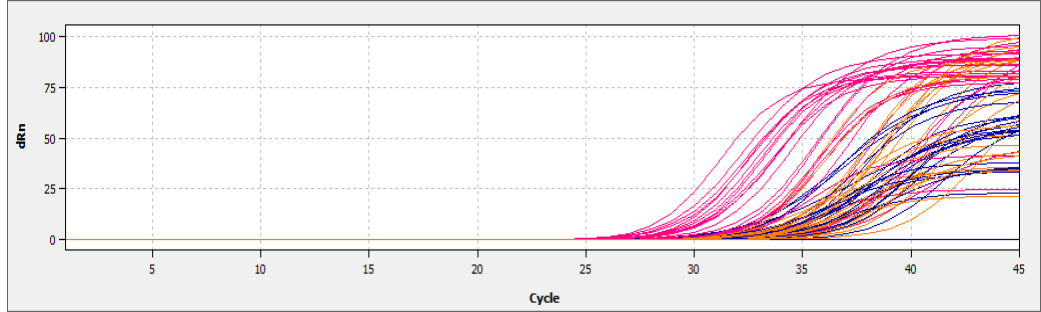
Real time PCR reaksiyonun döngü ve sıcaklık koşulları ise Tablo 3-4’te verilmiştir.

Tablo 3-4: Real time PCR yönteminin sıcaklık koşulları ve döngü sayısı

Zaman	Sıcaklık	Döngü
5 dk	95 °C	1
15 sn	95 °C	45
60 sn	60 °C (Floresans okuma)	

Gen ifadelerinin real-time PCR ile belirlenmesi için BioRad cihazı kullanıldı. Amplifikasyonlar 20 μ L toplam reaksiyon hacmi içerisinde; cDNA, bölgeye özgü ileri-geri yönlü primerler, SYBR Green Master Mix kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerin gen ifadelerini normalize etmek için, GAPDH ve ACTINB genlerine özgü primerler

kullanıldı. Optimizasyon çalışmalarının ardından tüm örnekler çalışılarak Ct değerleri elde edildi (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: Örneklerle ait optimizasyon çalışmalarından elde edilen bir örnek Ct grafiği

3.8. Gen Ekspresyonlarının Analizi

Parkinson Hastalığı PBMÖrnekleri ile kontrol PBMÖrnekleri arasındaki kat değişimi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi (Livak ve ark. 2001) kullanılarak hesaplandı. Endojen kontrol yani Housekeeping genler olarak GAPDH ve ACTINB genleri kullanıldı. Bu genlerin aritmetik ortalamaları alınarak hesaplamalara dahil edildi. Elde edilen Ct (eşik değer) değerlerine göre ekspresyon farklılıkları aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$\Delta Ct = \text{Hedef Gen (Ct)} - \text{Housekeepig gen (Ct)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \text{Hasta hedef gen } (\Delta Ct) - \text{Kontrol ortalaması } (\Delta Ct)$$

$$\Delta\Delta Ct = \text{Hedef gen } (\Delta Ct) - \text{Kontrol ortalama } (\Delta Ct)$$

$\Delta\Delta Ct$ değerleri de kat değişimi hesaplamaları için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yönteminde kullanıldı.

3.9. İstatistiksel Analizler

Gen ekspresyon sonuçlarının log2 çevrimleri gerçekleştirilip istatistiksel olarak anlamlılık seviyeleri değerlendirildi. İstatistiksel analiz, SPSS (18.0) yazılımı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. PH ve sağlıklı kontrol grupları arasındaki gen ekspresyon düzeylerindeki farklılığın istatistiksel olarak anlamlılığının değerlendirilmesi amacıyla t-testi yapıldı. Klinik bulgular, UPDRS skorları ve gen ekspresyonları arasındaki ilişkini belirlemek için Pearson Korelasyon analizi yapıldı.

Gruplar arasındaki kategorik değişkenlerin karşılaştırılması ise ki-kare testiyle yapıldı. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak verilerek p-değerlerinin 0,05'ten küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi.



4. BULGULAR

4.1. Demografik Veriler

Çalışmaya dahil edilen idiyopatik Parkinson hastalarının toplam sayısı 75'tir. Hastaların 45'i erkek, 30'u ise kadındır. Kontrol grubunun toplam sayısı ise 50'dir. Kontrollerden 30'u erkek 20'si kadındır. Her iki grup cinsiyet ve yaş bakımından eşitlenmiştir (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Gruplara ait demografik bilgilerin özeti

	PH (Ort ± SS)	Kontrol (Ort ± SS)	<i>p</i>
Cinsiyet (Erkek/Kadın)	45/30	30/20	<0,05
Yaş	63,16 ± 10,60	62,98±10,54	<0,05
Hastalık başlangıç yaşı	53,41 ± 10,68	-	-
Hastalık süresi	9,75 ± 5,51	-	-

PH grubunun UPDRS Total skoruna ilişkin en yüksek, en düşük, ortanca ve ortalama değerler Tablo 4-2'de verilmiştir. Klinik bulgular, UPDRS skorları ve gen ekspresyonları arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

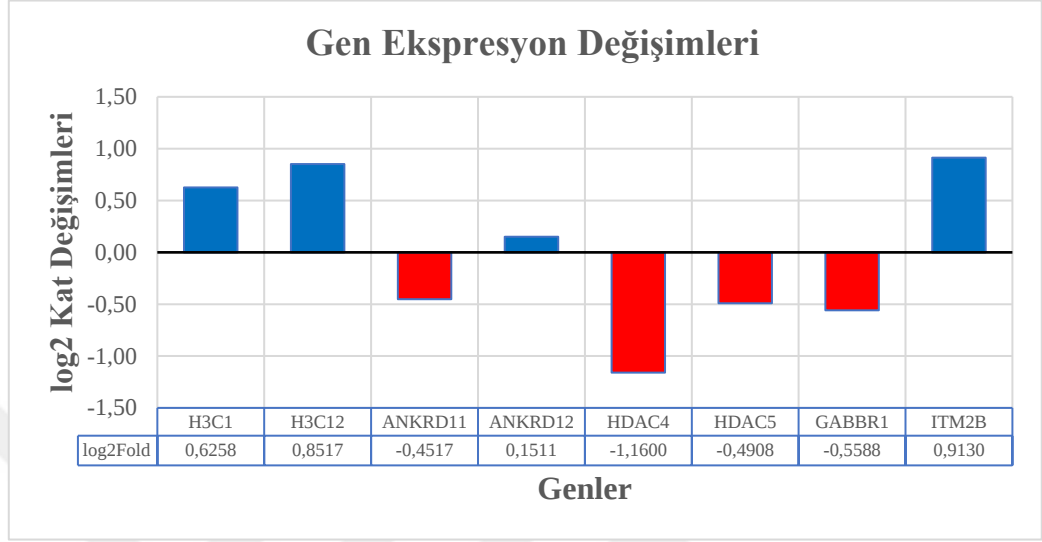
Tablo 4-2: UPDRS III ve UPDRS Total değerlerinin özeti

	UPDRS III	UPDRS TOTAL
En düşük	3	11
En yüksek	75	126
Ortanca	32	48
Ortalama	31,12	51,91

4.2. Gen Ekspresyon Sonuçları

PH ve Kontrol Grubu örneklerinden elde edilen PBMC'lerden RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. RNA'ların cDNA'ya çevrimi yapıldıktan sonra, gen ekspresyonları için real-time PCR çalışmaları başarıyla tamamlanmıştır. Her örnek 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Real-time PCR sonucunda elde edilen Ct değerlerinin normalizasyonu için,

housekeeping gen olarak, GAPDH ve ACTINB kullanılmıştır. İki grup arasında ekspresyon düzeyindeki farklılıklar Şekil 4-1'deki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4-1: Sağlıklı kontrol grubuna kıyasla PH grubunun ekspresyon düzeyindeki log2 kat değişimleri

Gen ekspresyon düzeylerindeki farklılığın istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla yapılan t-testi sonucunda kontrol ve PH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). İstatistik değerleri Tablo 4-3'te özetlenmiştir.

Tablo 4-3: Gen ekspresyon düzeyindeki farklılıkların istatistiksel sonuçları

	Hasta Grubu Ortalama	Kontrol Grubu Ortalama	SS	df	t	p
H3C1	-0,524	0,102	0,122511	74,000000	6,888	0,000001
H3C12	2,585	4,010	0,287279	74,000000	10,275	0,000001
ANKRD11	4,636	1,665	0,204164	74,000000	-30,708	0,000001
ANKRD12	1,823	0,828	0,159678	74,000000	-13,791	0,000001
HDAC4	9,457	4,137	0,288043	74,000000	-44,137	0,000001

HDAC5	5,141	1,963	0,226101	74,000000	-34,226	0,000001
GABBR1	4,789	1,368	0,341618	74,000000	-23,399	0,000001
ITM2B	-0,740	-2,293	0,153792	74,000000	21,929	0,000001

SS: Standart sapma, **df:** serbestlik derecesi, **t:** istatistik değeri, **p:** olasılık değeri



5. TARTIŞMA

İdiopatik Parkinson Hastalığı tüm Parkinson tanılı olguların yaklaşık %80’inde görülmekte olup, başlıca substantia nigra bölgesindeki nöronları etkileyen nörodejeneratif bir süreçtir. Bradikinezi, rijidite, tremor ve postüral reflekslerde bozulma PH’nin majör klinik bulguları arasında olup en sık karşılaşılan bulgulardandır. PH görülme sıklığı toplumsal olarak incelendiğinde, yaş önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Altmış beş yaş üzeri nüfusta %1’lerde hastalık görülme oranının olduğu, Türkiye’ye özgü olarak da bu oranın 111/100000 olduğu bildirilmiştir (Torun ve ark. 1995). Hastalığın patofizyolojisinde görülen, substantia nigra dejenerasyonunun ortaya çıkışının altında yatan mekanizma henüz tam olarak keşfedilememiştir. Bu süreçte yaşlılık önemli bir faktör olarak görülse de neden bazı insanlarda PH görüldüğü diğerlerinde görülmediği hala soru işareti olarak kalmaktadır. Substantia nigra, 850000 hücre bulunduran bir bölge olup PH’nin ortaya çıkması için bu hücrelerin en az %60’ının kaybolması gerekmektedir. Klinik bulguların ortaya çıkmasıyla birlikte substantia nigra incelendiğinde bu hücre kayıpları görülmüş ve hastalığın ortaya çıkışının aslında bulguların görülmesinden çok daha önce olduğunu düşündürmüştür. Hayatta kaldıkları süre boyunca hiç PH bulgusu görülmeyen, PH dışında farklı bir sebepten ötürü hayata veda eden insanların ölüm sonrası beyinleri incelendiğinde substantia nigra bölgesindeki hücrelerin yaklaşık yarısını kaybettiği tespit edilmiştir (de Lau ve Breteler 2006). Tüm bu bilgileri değerlendirdiğimizde; hücre kaybının yavaş ilerlemesi ve sistemin yüksek toleransı nedeniyle klinik bulguların uzun süre sonra ortaya çıktığını, kalıtsal yatkınlık, çevresel toksinlere maruz kalma ve yaşlanmanın PH oluşum sürecinde önemli rol oynadığını görmekteyiz.

Günümüzde gerçekleştirilen patofizyolojik araştırmalar sonucunda, Sporadik Parkinson hastalarındaki gen mutasyonlara bağlı olarak gelişen nöron kayıplarının, genetik veya çevresel fark etmeksizin, tek bir nedenden ötürü olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla PH görülme riskinin artmasında genetik ve çevresel faktörlerin birlikte etkili olduğu anlaşılmıştır. Özellikle çevresel etkenlere karşı alınacak önlemlerin PH oluşumu önleyebilecek koruyucu bir faktör olarak değerlendirilebilmektedir (Angelopoulou ve ark 2022). Bununla birlikte, hastalığın oluşmasında bazı gen mutasyonlarının önemli birer etmen oldukları tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda açıkça görülmektedir ki gen mutasyonları sonucunda hatalı sentezlenen enzim, protein veya gen substratlarının neden olduğu hücre ölümüne bağlı gelişen patolojik süreçler, PH'da görülen önemli bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak PH durumunda temel unsur yalnızca tek bir gen mutasyonu sonucu gelişen patolojik süreç değil, farklı hücresel yapıların fonksiyonunu yitirmesi sonucunda genetik olmayan etkenlerden ötürü patolojik koşulların ortaya çıkmasıdır (Dauer ve Przedborski 2003; Ramos ve ark. 2014). Görüldüğü üzere hastalık nedeni olarak genetik mutasyonlar her zaman tek başına etkili olmayabilir, ancak hastalık seyrini etkileyen bir faktör olarak karşımıza çıkabilmektedir.

Parkinson Hastalığı, beyindeki hücre gruplarının kaybı ve sonrasında gelişen ilerleyici beyin atrofileri sonucunda fonksiyon kaybına neden olan nörodejeneratif hastalıklardan biridir. Geneline bakıldığında, nörodejeneratif hastalıklarda yanlış katlanan proteinlerin birikimi sonucu oluşan bir patolojik süreç görülmektedir (Henderson ve ark 2021). Patolojik süreçlerde rol oynayan birden fazla mekanizma ve parametre bulunmaktadır. Günümüzde bu mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. PH'nin ailesel tipleri ile ilişkilendirilen α sinüklein ve PARKIN gibi genlerin mutasyonu sonucunda patolojik süreçler gelişmesine rağmen, PH vakalarının birçoğu sporadik olarak tanı konulmaktadır. Son yıllarda büyük ölçüde, genetik mutasyonlara doğrudan bağlı olmaksızın gelişen nörodejeneratif hastalıklarda, hücresel homeostazın sürdürülmesini sağlayan mekanizmalardaki farklılıklar incelenmeye başlanmıştır. Epigenetik olarak adlandırdığımız bu değişiklikler birlikte nörolojik hastalıkların patofizyolojisini anlayabilmek için genlerin düzenlenme mekanizmaları araştırılmaktadır (Rathore ve ark. 2021). Bu bilgiler ışığında, biz de bu çalışmamızda son yıllarda önemi daha çok anlaşılan epigenetik değişiklikler üzerine yoğunlaştık.

Epigenetik, DNA diziliminde herhangi bir değişiklik olmadan gen ifadesini modüle eden düzenleyici mekanizmaları ifade etmektedir. Beslenme, toksinler, ilaçlar, stres ve hücresel fizyolojik süreçler arasında bağlantı sağlayan çevre ve genler arasındaki etkileşimleri epigenetik çalışmalarla anlamaya çalışmaktayız (Rasheed ve ark 2021). İlk kez 1940'larda DNA metilasyonu ile keşfedilen epigenetik kavramının, geçmişten günümüze kadar yapılan çalışmalarda, transkripsiyon sonrası düzenleyiciler olan micro RNA'ları (miRNA), transkripsiyonel düzenleyiciler olan uzun kodlamayan RNA'ları (lncRNA) ve histon modifikasyonlarını kapsadığı gösterilmiştir. Epigenetik değişiklikler,

beyin yapısının şekillenmesi, nöral kök hücrelerin korunması ve nöroenez gibi nörogeleimsel süreçlerde rol alır ve beyin hasarı kaynaklı birçok hastalıkta ilişkilendirilmiştir (Waddington ve ark. 2012, Bertogliat ve ark. 2020).

Histon organizasyonu, promotörlerin yapısını ve DNA'nın transkripsiyon faktörleri için uygunluğunu etkileyerek gen ekspresyonunu düzenleyebilir. Asetil gruplarının kromatin yapısındaki histon rezidülerinde varlığı veya yokluğu transkripsiyonel aktivitenin sırasıyla pozitif veya negatif yönde düzenlenmesini sağlamaktadır. Asetilasyon denilen bu süreçte histonların asetillenmesi histon asetilaz (HAT) ve histon deasetilazla (HDAC) dinamik bir şekilde düzenlenmektedir. Histon deasetilazların ve sirtuin deasetilazların aracılık ettiği histon deasetilasyonu sonucunda kromatinler sıkıca sarılmış bir yapı oluşturur ve gen ekspresyonu baskılanmış olur (Chakravarty ve ark. 2014). HDAC'ler akson büyümesi, oksidatif stres, sinaptik plastisite ve biliş ile ilgili süreçlerde aktif rol oynayan düzenleyicilerdir. Histon deasetilazların lokalizasyonları, ekspresyon değişiklikleri ve inhibisyonlarına bağlı olarak değişen farklı nöropatolojik bulgular görülen çalışmalar mevcuttur (Harrison ve ark. 2013). PH hücre modeli ile yapılan çalışmada, bir nörotoksin olan parakuata maruz kalmanın zamana bağlı bir şekilde N27 dopaminerjik hücrelerde histon H3 asetilasyonunu indükleyebileceği gösterilmiştir. Histon asetilasyonundaki belirgin artışın histon ekspresyonlarındaki artışla kısmen de olsa ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte histon deasetilazlardan HDAC4 ve HDAC7'nin hem aktivitesinde azalma hem de protein düzeyinde azalma görüldüğü bildirilmiştir. Retinoik asit ile nöron benzeri morfolojiye farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerinde MPP+ uygulamasıyla birlikte histon asetilasyonunda belirgin artışın olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, HDAC1, HDAC2, HDAC4, HDAC6 ve SirT1 seviyeleri de PH olgularının orta beyin dokularında, eşleştirilmiş kontrollerine göre belirgin bir şekilde daha düşük bulunmuştur (Song ve ark. 2011). Diğer çalışmalarda da nörotoksin kaynaklı HDAC aktivitesindeki veya seviyesindeki değişikliklerin otofaji mekanizmaları yoluyla gerçekleştiği, bu nedenle de otofaji aracılı HDAC eksikliğinin dopaminerjik nöronlarda histon asetilasyonunu anormal ölçüde artırdığı ve nihayetinde nörodejenerasyona neden olduğu gösterilmiştir (Park ve ark. 2016, Toker ve ark. 2021). Sonuçlar, çevresel toksinlerin histon ekspresyonunu anormal ölçüde yukarı yönde düzenlediğini ve histon asetilasyonunu indüklediğini göstermektedir. Benzer şekilde çalışmamızda da PH

olgularında sağlıklı kontrollere göre artmış H3 histon ekspresyonu ve azalmış HDAC4 ve HDAC5 ekspresyonu görülmüştür.

ANKRD11 geni, ankirin tekrar alanı içeren proteini kodlar. Mutasyonlu formu, makrodonti, ayırt edici kraniyofasiyal özellikler, kısa boy, iskelet anomalileri, küresel gelişimsel gecikme, nöbetler ve zihinsel engeller ile karakterize edilen KBG sendromuyla ilişkilendirilmiştir. Kodlanan proteini ise nöral öncü hücrelerde histon asetilasyonunu modüle eden, transkripsiyonun ligand bağımlı aktivasyonunu inhibe eden kromatin düzenleyici bir proteindir. Ligand bağımlı transaktivasyonu inhibe etmek için p160 koaktivatörleri/nükleer reseptör kompleksine histon deasetilazları HDAC'lerin katılımını sağlayabilir. Ayrıca kortikal nöral öncüllerin çoğalmasında ve gelişiminde rol oynarlar (Mullin ve ark. 2013). ANKRD ailesinden ANKRD11 ise, nöral gelişimde önemli rol oynayan birden fazla geni koordineli olarak düzenleyebilmektedir. Başta HDAC3 olmak üzere potansiyel olarak diğer HDAC'lere de bağlanan ANKRD11, nöronlarda histon asetilasyonu ve gen ekspresyon süreçlerini etkileyen bir transkripsiyonel düzenleyici olarak işlev görmektedir. AKRD11 yıkımına bağlı gerçekleşen prekürsör hücrelerin proliferasyonundaki azalmanın, HDAC3'ün aşırı ekspresyonu veya histon asetilazların inhibisyonuyla asetilasyonun dengelenmesi durumunda önlendiği gösterilmiştir ANKRD11 dinamik yapısının bozulması, otistik spektrum bozukluğuna benzer davranışlarla birlikte yetişkin ön beyinde uzun süreli değişikliklere neden olmaktadır (Castelo-Branco ve ark. 2014; Gallagher ve ark. 2015). Dolayısıyla ANKRD'ler ve HDAC'ların transkripsiyonel düzenlenme mekanizmasında birlikte rol aldıkları görülmektedir. Çalışmamızda, sağlıklı bireylere kıyasla PH grubunda HDAC4 ve HDAC5'te olduğu gibi ANKRD11'in ekspresyonunda düşüş tespit edilmiştir. Literatürdeki çalışmalara benzer şekilde; histonlar ve transkripsiyonel düzenlenmeyle ilişkili olan ANKRD11, HDAC4 ve HDAC5 gen ekspresyonlarındaki azalmanın yanı sıra H3C1, H3C12 gen ekspresyonlarında artış tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığında PH grubunda hem deasetilazların yetersiz düzeydeki ekspresyonu hem de histonların artan ekspresyon seviyesi bizlere asetilasyon dengesinin sağlanamadığı bir tablo çizmektedir.

GABBR1, G proteini aracılığıyla potasyum kanalına bağlanan GABAB reseptörünün bir alt birimini kodlayan bir gendir. GABAB reseptörleri GABBR1 ve GABBR2 olmak üzere iki alt birimden oluşur; presinaptik membranda kalsiyum kanallarının inhibitörleri olarak ve postsinaptik membranda potasyum kanallarının

aktivatörleri olarak görev yapar (Chalifoux ve ark 2010). MPTP ve 6-HDA kullanılarak oluşturulan PH modelinde, GABAB reseptörlerinin işleyişinin değiştiği gösterildi ve dopamin yoksunluğu üzerine GABAerjik inhibisyon ihtiyacı ortaya çıktı (Lozovaya ve ark 2018). Ayrıca, insan beyninin çeşitli dokularının çalışmasında elde edilen genom çapında mikrodizi verilerinin yakın tarihli bir meta-analizi, PD ve Alzheimer hastalığında GABBR1 gen ekspresyonunun aşağı regüle edildiğini göstermiştir (Wang ve ark 2017). Bununla birlikte, çalışmamızda PH'li hastaların GABBR1 ekspresyon seviyelerinde de önemli ölçüde azalma görülmüştür.

Epigenetik mekanizmalardan biri olan histon asetilasyonu, transkripsiyonel aktivitenin düzenlendiği mekanizma olması sebebiyle hastalık oluşum sürecini anlamamız adına önemli bilgiler vermektedir. Çalışmamız, Türk popülasyonundaki İdiyopatik PH olgularında histon asetilasyonu ile ilişkili gen ekspresyonlarının ilk kez karşılaştırılması bakımından değerlidir. Diğer yandan, histon asetilasyonu ile ilişkili gen sayısının az olması ve asetilasyon düzeyinde inceleme yapılamamış olması çalışmamızın kısıtlılıklarındandır.

KAYNAKLAR

- Aasly, J. O. (2020). Long-term outcomes of genetic parkinson's disease. *Journal of movement disorders*, 13(2), 81.
- Agis-Balboa, R. C., Pavelka, Z., Kerimoglu, C., & Fischer, A. (2013). Loss of HDAC5 impairs memory function: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 33(1), 35-44.
- Akbayır, E., Şen, M., Ay, U., Şenyer, S., Tüzün, E., & Küçükali, C. İ. (2017). Parkinson hastalığının etyopatogenezi. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 7(13), 1-23.
- Angelopoulou, E., Paudel, Y. N., Papageorgiou, S. G., & Piperi, C. (2022). Environmental Impact on the Epigenetic Mechanisms Underlying Parkinson's Disease Pathogenesis: A Narrative Review. *Brain Sciences*, 12(2), 175. Epigenetic modulation in Parkinson's disease and potential treatment therapies. *Neurochemical Research*, 46(7), 1618-1626
- Antony, P. M., Diederich, N. J., Krüger, R., & Balling, R. (2013). The hallmarks of P arkinson's disease. *The FEBS journal*, 280(23), 5981-5993.
- Badanjak, K., Fixemer, S., Smajić, S., Skupin, A., & Grünewald, A. (2021). The contribution of microglia to neuroinflammation in Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4676.
- Bae, Y. J., Kim, J. M., Sohn, C. H., Choi, J. H., Choi, B. S., Song, Y. S., ... & Kim, J. H. (2021). Imaging the substantia nigra in Parkinson disease and other Parkinsonian syndromes. *Radiology*, 300(2), 260-278.
- Baron, B. W., Baron, R. M., & Baron, J. M. (2015). The ITM2B (BRI2) gene is a target of BCL6 repression: Implications for lymphomas and neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1852(5), 742-748.
- Bekris, L. M., Mata, I. F., & Zabetian, C. P. (2010). The genetics of Parkinson disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, 23(4), 228-242.
- Bertogliat, M. J., Morris-Blanco, K. C., & Vemuganti, R. (2020). Epigenetic mechanisms of neurodegenerative diseases and acute brain injury. *Neurochemistry international*, 133, 104642.

- Bisi, N., Feni, L., Peqini, K., Pérez-Peña, H., Ongerì, S., Pieraccini, S., & Pellegrino, S. (2021). α -synuclein: an all-inclusive trip around its structure, influencing factors and applied techniques. *Frontiers in Chemistry*, 9.
- Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., & Jackson-Lewis, V. R. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in neuroanatomy*, 9, 91.
- Burchell, V. S., Nelson, D. E., Sanchez-Martinez, A., Delgado-Camprubi, M., Ivatt, R. M., Pogson, J. H., ... & Plun-Favreau, H. (2013). The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nature neuroscience*, 16(9), 1257-1265.
- Castelo-Branco, G., Lilja, T., Wallenborg, K., Falcão, A. M., Marques, S. C., Gracias, A., ... & Hermanson, O. (2014). Neural stem cell differentiation is dictated by distinct actions of nuclear receptor corepressors and histone deacetylases. *Stem cell reports*, 3(3), 502-515.
- Chakravarty, S., Pathak, S. S., Maitra, S., Khandelwal, N., Chandra, K. B., & Kumar, A. (2014). Epigenetic regulatory mechanisms in stress-induced behavior. *International review of neurobiology*, 115, 117-154.
- Chalifoux, J. R., & Carter, A. G. (2010). GABAB receptors modulate NMDA receptor calcium signals in dendritic spines. *Neuron*, 66(1), 101-113.
- Charcot, J. M., and Vulpian A. (1861). De la paralysie agitante. *Gaz Hebdomadaire Med Chir*, 8, 765-767.
- Chen, C., Turnbull, D. M., & Reeve, A. K. (2019). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease—cause or consequence?. *Biology*, 8(2), 38.
- Chin-Chan, M., Navarro-Yepes, J., & Quintanilla-Vega, B. (2015). Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 124.
- Choi, H. K., Choi, Y., Kang, H., Lim, E. J., Park, S. Y., Lee, H. S., ... & Yoon, H. G. (2015). PINK1 positively regulates HDAC3 to suppress dopaminergic neuronal cell death. *Human molecular genetics*, 24(4), 1127-1141.
- Chu, C. T. (2010). A pivotal role for PINK1 and autophagy in mitochondrial quality control: implications for Parkinson disease. *Human molecular genetics*, 19(R1), R28-R37.

- Coupland, K. G., Mellick, G. D., Silburn, P. A., Mather, K., Armstrong, N. J., Sachdev, P. S., ... & Kwok, J. B. (2014). DNA methylation of the MAPT gene in Parkinson's disease cohorts and modulation by vitamin E in vitro. *Movement Disorders*, 29(13), 1606-1614.
- Dauer, W., ve Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 39(6): 889-909.
- Day, J. O., & Mullin, S. (2021). The genetics of parkinson's disease and implications for clinical practice. *Genes*, 12(7), 1006.
- de Lau, L.M., Breteler, M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurology*. 5 (6): 525–535.
- Delcuve, G. P., Khan, D. H., & Davie, J. R. (2012). Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clinical epigenetics*, 4(1), 1-13.
- Desplats, P., Spencer, B., Coffee, E., Patel, P., Michael, S., Patrick, C., ... & Masliah, E. (2011). α -synuclein sequesters Dnmt1 from the nucleus: a novel mechanism for epigenetic alterations in Lewy body diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 9031-9037.
- Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*, 3(4), 461-491.
- Dickson, D. W. (2012). Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(8), a009258.
- Dumitriu, A., Golji, J., Labadorf, A. T., Gao, B., Beach, T. G., Myers, R. H., ... & Latourelle, J. C. (2015). Integrative analyses of proteomics and RNA transcriptomics implicate mitochondrial processes, protein folding pathways and GWAS loci in Parkinson disease. *BMC medical genomics*, 9(1), 1-17.
- Evenseth, L. S. M., Gabrielsen, M., & Sylte, I. (2020). The GABAB receptor—structure, ligand binding and drug development. *Molecules*, 25(13), 3093.
- Exner, N., Lutz, A. K., Haass, C., & Winklhofer, K. F. (2012). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO journal*, 31(14), 3038-3062.
- Gallagher, D., Voronova, A., Zander, M. A., Cancino, G. I., Bramall, A., Krause, M. P., ... & Miller, F. D. (2015). Ankrd11 is a chromatin regulator involved in autism that is essential for neural development. *Developmental cell*, 32(1), 31-42.

- Gencer, M., Dasdemir, S., Cakmakoglu, B., Cetinkaya, Y., Varlibas, F., Tireli, H., ... & Aydin, M. (2012). DNA repair genes in Parkinson's disease. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 16(6), 504-507.
- Goldman, S. M. (2014). Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 54, 141-164.
- Guo, Y. P., Tang, B. S., & Guo, J. F. (2018). PLA2G6-associated neurodegeneration (PLAN): review of clinical phenotypes and genotypes. *Frontiers in Neurology*, 1100.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Harrison, I. F., & Dexter, D. T. (2013). Epigenetic targeting of histone deacetylase: therapeutic potential in Parkinson's disease?. *Pharmacology & therapeutics*, 140(1), 34-52.
- Henderson, A. R., Wang, Q., Meechoovet, B., Siniard, A. L., Naymik, M., De Both, M., ... & Dunckley, T. (2021). DNA methylation and expression profiles of whole blood in parkinson's disease. *Frontiers in Genetics*, 12, 509.
- Hoss, A. G., Labadorf, A., Beach, T. G., Latourelle, J. C., & Myers, R. H. (2016). microRNA profiles in Parkinson's disease prefrontal cortex. *Frontiers in aging neuroscience*, 8, 36.
- Hu, Q., & Wang, G. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Translational neurodegeneration*, 5(1), 1-8.
- Jankovic, J., & Tan, E. K. (2020). Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 91(8), 795-808.
- Jellinger, K. (1987). The pathology of parkinsonism. *Movement disorders Vol2*, 124-165.
- Ka, M., & Kim, W. Y. (2018). ANKRD11 associated with intellectual disability and autism regulates dendrite differentiation via the BDNF/TrkB signaling pathway. *Neurobiology of disease*, 111, 138-152.
- Kalia L.V., Lang A.E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet* 386(9996):896-912.
- Karaaslan, Z., Kahraman, Ö. T., Şanlı, E., Ergen, H. A., Ulusoy, C., Bilgiç, B., ... & Küçükali, C. İ. (2021). Inflammation and regulatory T cell genes are differentially expressed in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson's disease patients. *Scientific reports*, 11(1), 1-16.

- Kawahata, I., & Fukunaga, K. (2020). Degradation of tyrosine hydroxylase by the ubiquitin-proteasome system in the pathogenesis of Parkinson's disease and dopa-responsive dystonia. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 3779.
- Kidd, S. K. (2012). Protection of Dopaminergic Cells From 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine/1-methyl-4-phenylpyridinium Toxicity by Histone Deacetylase Inhibitors. Thomas Jefferson University.
- Kiebertz, K., & Wunderle, K. B. (2013). Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Movement Disorders*, 28(1), 8-13.
- Kietzmann, T., Petry, A., Shvetsova, A., Gerhold, J. M., & Görlach, A. (2017). The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), 1533-1554.
- Klein, C., & Westenberger, A. (2012). Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(1), a008888.
- Kolata, G. (1983). Monkey Model of Parkinson's Disease: A contaminant of illicit drugs has caused Parkinson's disease in humans and monkeys. *Science*, 220(4598), 705-705.
- Kontopoulos, E., Parvin, J. D., & Feany, M. B. (2006). α -synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Human molecular genetics*, 15(20), 3012-3023.
- Kouli, A., Camacho, M., Allinson, K., & Williams-Gray, C. H. (2020). Neuroinflammation and protein pathology in Parkinson's disease dementia. *Acta neuropathologica communications*, 8(1), 1-19.
- Kulisevsky, J., Luquin, M. R., Arbelo, J. M., Burguera, J. A., Carrillo, F., Castro, A., ... & Yañez, R. (2013). Advanced Parkinson's disease: clinical characteristics and treatment (part 1). *Neurología (English Edition)*, 28(8), 503-521.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219(4587), 979-980.
- Leung, H., & Mok, V. (2005). Parkinson's disease: aetiology, diagnosis, and management. *Hong Kong Med J*, 11(6), 476-489.
- Lev, N., Barhum, Y., Pilosof, N. S., Ickowicz, D., Cohen, H. Y., Melamed, E., & Offen, D. (2013). DJ-1 protects against dopamine toxicity: implications for Parkinson's disease and aging. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 68(3), 215-225.

- Lewis, P. A., & Cookson, M. R. (2012). Gene expression in the Parkinson's disease brain. *Brain research bulletin*, 88(4), 302-312.
- Li, C. W., Dinh, G. K., Zhang, A., & Chen, J. D. (2008). Ankyrin repeats-containing cofactors interact with ADA3 and modulate its co-activator function. *Biochemical Journal*, 413(2), 349-357.
- Li, W. J., Jiang, H., Song, N., & Xie, J. X. (2010). Dose-and time-dependent α -synuclein aggregation induced by ferric iron in SK-N-SH cells. *Neuroscience bulletin*, 26(3), 205-210.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Longhe, Z. (2020). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement*, 16, 391-460.
- Lozovaya, N., Eftekhari, S., Cloarec, R., Gouty-Colomer, L. A., Dufour, A., Riffault, B., ... & Hammond, C. (2018). GABAergic inhibition in dual-transmission cholinergic and GABAergic striatal interneurons is abolished in Parkinson disease. *Nature communications*, 9(1), 1-14.
- Lubomski, M., Davis, R. L., & Sue, C. M. (2021). Health-related quality of life for Parkinson's disease patients and their caregivers. *Journal of Movement Disorders*, 14(1), 42.
- Mandal, A. K., & Mount, D. B. (2019). Interaction between ITM2B and GLUT9 links urate transport to neurodegenerative disorders. *Frontiers in physiology*, 10, 1323.
- Marsili, L., Rizzo, G., & Colosimo, C. (2018). Diagnostic criteria for Parkinson's disease: from James Parkinson to the concept of prodromal disease. *Frontiers in neurology*, 9, 156.
- Masliah, E., Dumaop, W., Galasko, D., & Desplats, P. (2013). Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. *Epigenetics*, 8(10), 1030-1038.
- McNaught, K. S. P., Olanow, C. W., Halliwell, B., Isacson, O., & Jenner, P. (2001). Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(8), 589-594.

- Mokretar, K., Pease, D., Taanman, J. W., Soenmez, A., Ejaz, A., Lashley, T., ... & Proukakis, C. (2018). Somatic copy number gains of α -synuclein (SNCA) in Parkinson's disease and multiple system atrophy brains. *Brain*, 141(8), 2419-2431.
- Monti, B., Gatta, V., Piretti, F., Raffaelli, S. S., Virgili, M., & Contestabile, A. (2010). Valproic acid is neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: involvement of α -synuclein. *Neurotoxicity research*, 17(2), 130-141.
- Moon, H. E., & Paek, S. H. (2015). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Experimental neurobiology*, 24(2), 103.
- Mortiboys, H., Johansen, K. K., Aasly, J. O., & Bandmann, O. (2010). Mitochondrial impairment in patients with Parkinson disease with the G2019S mutation in LRRK2. *Neurology*, 75(22), 2017-2020.
- Mou, L., Ding, W., & Fernandez-Funez, P. (2020). Open questions on the nature of Parkinson's disease: from triggers to spreading pathology. *Journal of Medical Genetics*, 57(2), 73-81.
- Mullin, A. P., Gokhale, A., Moreno-De-Luca, A., Sanyal, S., Waddington, J. L., & Faundez, V. (2013). Neurodevelopmental disorders: mechanisms and boundary definitions from genomes, interactomes and proteomes. *Translational psychiatry*, 3(12), e329-e329.
- Munkácsy, G., Sztupinszki, Z., Herman, P., Bán, B., Pénczváltó, Z., Szarvas, N., & Győrffy, B. (2016). Validation of rna silencing efficiency using gene array data shows 18.5% failure rate across 429 independent experiments. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 5, e366.
- Nakamura, T., & Lipton, S. A. (2009). Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis*, 14(4), 455-468.
- Nalls, M. A., Pankratz, N., Lill, C. M., Do, C. B., Hernandez, D. G., Saad, M., ... & Singleton, A. B. (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nature genetics*, 46(9), 989-993.
- Navarro-Romero, A., Montpeyó, M., & Martinez-Vicente, M. (2020). The emerging role of the lysosome in Parkinson's disease. *Cells*, 9(11), 2399.
- Noyce, A. J., & Lees, A. (2017). Observations on a 2-Step Approach to Screening for Parkinson Disease. *JAMA neurology*, 74(12), 1506-1506.
- Núñez, M. T., Urrutia, P., Mena, N., Aguirre, P., Tapia, V., & Salazar, J. (2012). Iron toxicity in neurodegeneration. *Biometals*, 25(4), 761-776.

- Park, G., Tan, J., Garcia, G., Kang, Y., Salvesen, G., & Zhang, Z. (2016). Regulation of histone acetylation by autophagy in Parkinson disease. *Journal of Biological Chemistry*, 291(7), 3531-3540.
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates III, J. R., Lafaille, J. J., ... & Gan, W. B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, 155(7), 1596-1609.
- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 14(2), 223-236.
- Pavlou, M. A. S., & Outeiro, T. F. (2017). Epigenetics in Parkinson's disease. *Neuroepigenomics in aging and disease*, 363-390.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., ... & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-21.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., ... & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *science*, 276(5321), 2045-2047.
- Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*, 28(10), 1057-1068.
- Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., ... & Deuschl, G. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement disorders*, 30(12), 1591-1601.
- Qian, L., & Flood, P. M. (2008). Microglial cells and Parkinson's disease. *Immunologic research*, 41(3), 155-164.
- Ramos, P., Santos, A., Pinto, N.R., Mendes, R., Magalhães, T., Almeida, A. (2014). Iron levels in the human brain: a post-mortem study of anatomical region differences and age-related changes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 28: 13- 17.
- Rasheed, M., Liang, J., Wang, C., Deng, Y., & Chen, Z. (2021). Epigenetic regulation of neuroinflammation in Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4956.
- Rathore, A. S., Birla, H., Singh, S. S., Zahra, W., Dilmashin, H., Singh, R., ... & Singh, S. P. (2021). Epigenetic modulation in Parkinson's disease and potential treatment therapies. *Neurochemical Research*, 46(7), 1618-1626.
- Reeve, A., Simcox, E., & Turnbull, D. (2014). Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor?. *Ageing research reviews*, 14, 19-30.

- Rieser, E., Cordier, S. M., & Walczak, H. (2013). Linear ubiquitination: a newly discovered regulator of cell signalling. *Trends in biochemical sciences*, 38(2), 94-102.
- Roth, D. M., Baddam, P., Lin, H., Vidal-García, M., Aponte, J. D., De Souza, S. T., ... & Voronova, A. (2021). The Chromatin Regulator Ankrd11 Controls Palate and Cranial Bone Development. *Frontiers in cell and developmental biology*, 985.
- Ruijter, A. J. D., GENNIP, A. H. V., Caron, H. N., Kemp, S., & KUILENBURG, A. B. V. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal*, 370(3), 737-749.
- Schapira, A.H., ve Jenner, P. (2011). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 26(6): 1049-1055.
- Shen, T., Hu, J., Jiang, Y., Zhao, S., Lin, C., Yin, X., ... & Zhang, B. (2019). Early-onset Parkinson's disease caused by PLA2G6 compound heterozygous mutation, a case report and literature review. *Frontiers in neurology*, 915.
- Shulman, J. M., De Jager, P. L., & Feany, M. B. (2011). Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 193-222.
- Singh, Y., Trautwein, C., Dhariwal, A., Salker, M. S., Alauddin, M., Zizmare, L., ... & Riess, O. (2020). DJ-1 (Park7) affects the gut microbiome, metabolites and the development of innate lymphoid cells (ILCs). *Scientific reports*, 10(1), 1-19.
- Sirmaci, A., Spiliopoulos, M., Brancati, F., Powell, E., Duman, D., Abrams, A., ... & Tekin, M. (2011). Mutations in ANKRD11 cause KBG syndrome, characterized by intellectual disability, skeletal malformations, and macrodontia. *The American Journal of Human Genetics*, 89(2), 289-294.
- Song, C., Kanthasamy, A., Jin, H., Anantharam, V., & Kanthasamy, A. G. (2011). Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration. *Neurotoxicology*, 32(5), 586-595.
- Tansey, M. G., & Goldberg, M. S. (2010). Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiology of disease*, 37(3), 510-518.
- Terunuma, M. (2018). Diversity of structure and function of GABAB receptors: a complexity of GABAB-mediated signaling. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 94(10), 390-411.

- Thomas, G. E., Zarkali, A., Ryten, M., Shmueli, K., Gil-Martinez, A. L., Leyland, L. A., ... & Weil, R. S. (2021). Regional brain iron and gene expression provide insights into neurodegeneration in Parkinson's disease. *Brain*, 144(6), 1787-1798.
- Toker, L., Tran, G. T., Sundaresan, J., Tysnes, O. B., Alves, G., Haugarvoll, K., ... & Tzoulis, C. (2021). Genome-wide histone acetylation analysis reveals altered transcriptional regulation in the Parkinson's disease brain. *Molecular neurodegeneration*, 16(1), 1-20.
- Torun, S., Uysal, M., Gücüyener, D., Özdemir, G. (1995). Parkinson's disease in Eskişehir, Turkey. *Eur J Neurol* 2(suppl 1):44-45.
- Troy, C. M., Akpan, N., & Jean, Y. Y. (2011). Regulation of caspases in the nervous system: implications for functions in health and disease. *Progress in molecular biology and translational science*, 99, 265-305.
- Trudler, D., Nash, Y., & Frenkel, D. (2015). New insights on Parkinson's disease genes: the link between mitochondria impairment and neuroinflammation. *Journal of Neural Transmission*, 122(10), 1409-1419.
- Tysnes, O. B., & Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of neural transmission*, 124(8), 901-905.
- Varçin, M., Bentea, E., Michotte, Y., & Sarre, S. (2012). Oxidative stress in genetic mouse models of Parkinson's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012.
- Vegeto, E., Villa, A., Della Torre, S., Crippa, V., Rusmini, P., Cristofani, R., ... & Poletti, A. (2020). The role of sex and sex hormones in neurodegenerative diseases. *Endocrine reviews*, 41(2), 273-319.
- Vizziello, M., Borellini, L., Franco, G., & Ardolino, G. (2021). Disruption of Mitochondrial Homeostasis: The Role of PINK1 in Parkinson's Disease. *Cells*, 10(11), 3022.
- Waddington, C. H. (2012). The epigenotype. *International journal of epidemiology*, 41(1), 10-13.
- Wang, P., Eshaq, R. S., Meshul, C. K., Moore, C., Hood, R. L., & Leidenheimer, N. J. (2015). Neuronal gamma-aminobutyric acid (GABA) type A receptors undergo cognate ligand chaperoning in the endoplasmic reticulum by endogenous GABA. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 188.

- Wang, Q., Li, W. X., Dai, S. X., Guo, Y. C., Han, F. F., Zheng, J. J., ... & Huang, J. F. (2017). Meta-analysis of Parkinson's disease and Alzheimer's disease revealed commonly impaired pathways and dysregulation of NRF2-dependent genes. *Journal of Alzheimer's Disease*, 56(4), 1525-1539.
- Wirdefeldt, K., Adami, H. O., Cole, P., Trichopoulos, D., & Mandel, J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European journal of epidemiology*, 26(1), 1.
- Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., & Wood, N. W. (2006). Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends in molecular medicine*, 12(11), 521-528.
- Xiong, H., Wang, D., Chen, L., Choo, Y. S., Ma, H., Tang, C., ... & Zhang, Z. (2009). Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *The Journal of clinical investigation*, 119(3), 650-660.
- Yu, Q. J., Yu, S. Y., Zuo, L. J., Lian, T. H., Hu, Y., Wang, R. D., ... & Zhang, W. (2018). Parkinson disease with constipation: clinical features and relevant factors. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.
- Zhang, Y. W., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain*, 4(1), 1-13.
- Zhang, Y., Sun, Z., Jia, J., Du, T., Zhang, N., Tang, Y., ... & Fang, D. (2021). Overview of Histone Modification. In *Histone Mutations and Cancer* (pp. 1-16). Springer, Singapore.
- Zucchelli, S., Codrich, M., Marcuzzi, F., Pinto, M., Vilotti, S., Biagioli, M., ... & Gustincich, S. (2010). TRAF6 promotes atypical ubiquitination of mutant DJ-1 and alpha-synuclein and is localized to Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease brains. *Human molecular genetics*, 19(19), 3759-3770.

HAM VERİLER



FORMLAR

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Çalışmanın Adı “Parkinson Hastalığıyla İlişkili Olabilecek Aday Genlerin Araştırılması”

Kabul etmeniz halinde katılacağınız bu çalışma bir araştırmadır. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla ve nasıl yapılacağını anlamanız ve katılıp katılmama doğrultusundaki kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Araştırma hakkında sözlü olarak size aktaracağım bilgiler yazılı olarak da size bir sonraki bölümde sunulacaktır. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz. Bu belgedeki son bölüm onay işlemleri ile ilgilidir. Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz lütfen bu bölümü imzalayınız. Okuma ve yazma konusunda engelleriniz olduğu takdirde bir tanığın gözetiminde bu belgeyi onaylamanız istenecek ve gerektiğinde parmak iziniz alınacaktır.

Araştırmanın amacı, hastalığınızın gelişimi üzerine etkisi olduğu düşünülen moleküllerdeki değişiklikleri tespit etmektir. Araştırmaya katılacak tahmini gönüllü sayısı 200'dür. Gönüllü olarak sizin araştırma üzerinde herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır. Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

Sizin için herhangi bir rahatsızlık veya risk oluşturmayacak bu çalışma, kısa dönemde size bir fayda da sağlamayacaktır. Ancak uzun dönemde hastalığın gelişiminin daha iyi anlaşılabilmesini ve alternatif tedavi geliştirebilmek için çalışma önemlidir.

Bu çalışma için sizden alınan kan kullanılacaktır. Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya morarma sayılabilir. Bu gibi durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır. Alınacak olan bu kan laboratuvarımızda çalışılacaktır.

Araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlı olup araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz. Reddetmeniz halinde yararınıza engel ya da cezai bir durum ortaya çıkmayacaktır. İzleyiciler, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar size ait tıbbi bilgilere ulaşılabilir ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.

Uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız, gebe kalmanız veya bir yan etkiye maruz kalmanız vb. nedenlerle doktorunuz sizin izniniz olmadan sizi çalışmadan çıkarabilir.

Siz veya yasal temsilciniz bilgilendirilmiş olur formunu imzalamakla bunu kabul etmiş olacaksınız. Ayrıca kimliğinizi ortaya koyacak kayıtlar da gizli tutulacaktır. Araştırma esnasında sizi ilgilendirecek bir bilgi söz konusu olduğunda siz veya yasal temsilcinize derhal haber verilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiye 7/24 saat **0532 335 55 33** numaralı telefondan ulaşabilirsiniz.

Hasta Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum, dinledim, anladım, istediğim soruları sordum ve cevapları aldım. Bu klinik araştırmaya gönüllü olarak hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

“Parkinson Hastalığıyla İlişkili Olabilecek Aday Genlerin Araştırılması” araştırması kapsamında alınan kan ve doku örneklerinin;

- ☐ Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Gönüllünün		İmzası
Adı Soyadı		
Adresi		
Telefon ve Faks		
Tarih		

Velayet Veya Vesayet Altında Bulunanlar İçin Veli Veya Vasinin		İmzası
Adı Soyadı		
Adresi		
Telefon Ve Faks		
Tarih		

Açıklamaları Yapan Araştırmacının		İmzası
Adı Soyadı		
Tarih		

Rıza Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin		İmzası
Adı Soyadı		
Görevi		
Tarih		



ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı		Soyadı	
Doğ.Yeri		Doğ.Tar.	
Email		Uyruğu	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans		
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) YÖKDİL Puanı

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer): ALES Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi



