

ESİN CANDAS

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2017



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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**LRRK2 GENİ POLİMORFİZMLERİNİN PARKİNSON
HASTALIĞI İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ESİN CANDAŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. SELMA YILMAZER**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

TEZ ONAYI

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Programında Yüksek Lisans öğrencisi Esin CANDAS tarafından Prof.Dr.Selma YILMAZER 'in danışmanlığında hazırlanan "LRRK2 Geni Polimorfizmlerinin Parkinson Hastalığı İle İlişkisinin Araştırılması "

başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından. 30/05/2017. tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

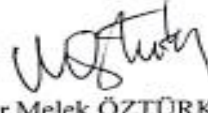

Jüri Danışman

Prof.Dr.Selma YILMAZER

Danışman

İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji A.D


Jüri

Prof.Dr.Melek ÖZTÜRK

İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji A.D


Jüri

Prof .Mehmet GÜRTEKİN

Aydın Üniversitesi Tıp Fak.

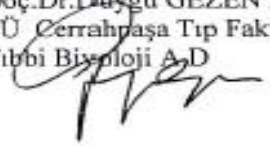
SABİF Dekan


Jüri

Prof.Dr.Sibel ERTAN

İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Nöroloji A.D


Jüri

Doç.Dr.Duygu GEZEN AK

İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji A.D

BEYAN

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

ESİN CANDAŞ

İTHAF

Annem Nazlı Candaş, Babam Ersin Candaş ve Abim Yunus Emre Candaş'a ithafen...

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, akademik kişiliği ve başarılarıyla bana örnek olan, birlikte çalışmaktan dolayı her zaman mutluluk ve onur duyacağım saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Selma YILMAZER'e, lisans döneminde bilgi ve tecrübeleriyle yardımcı olan, anabilim dalı olanaklarını kullanmamı sağlayan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e, bilgi ve desteklerini benden esirgemeyen Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK'e, veri toplanması ve bilimsel katkıları için Prof. Dr. Sibel ERTAN'a ve Doç. Dr. Gençer GENÇ'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışma sürecimde her zaman yanımda olduklarını bildiğim, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, desteklerini her daim üzerimde hissettiğim, akademik kişilikleri ve başarılarıyla bana örnek olan, büyük bir emek ve sabırla laboratuvar konusunda bildiğim herşeyi bana öğreten Doç. Dr. Duygu GEZEN-AK ve Doç. Dr. Erdinç DURSUN'a, her zaman yanımda olduklarını bildiğim, çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini benden esirgemeyen, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyacağım çok değerli çalışma arkadaşlarım M.Sc. Merve ALAYLIOĞLU, B.Sc. Büşra ŞENGÜL, M.Sc. Lutfiye İrem ATASOY, B.Sc. Ebru KESKİN, Bio. Pelin SORDU'ya, dostluklarını, sevgileri ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım B.Sc. Pelin BULUT ve M.Sc. Alişa Bahar BEYDOĞAN'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman evlatları olduğum için sükretiltiğim, hayatıma yön verirken her daim manevi ve maddi anlamda yanımda olan, emek, sabır ve fedakarlıklarla beni bugünlere getiren, onlara sahip olduğum için onur ve gurur duyduğum, sevgilerini ve inançlarını her zaman hissettiğim babam Ersin CANDAS, annem Nazlı CANDAS ve abim Yunus Emre CANDAS'a, destekleri ve bana olan inançları için Kader CANDAS ve Alev DUBAZ'a ve benimle her zaman gurur duyduklarına inandığım, sevgilerini ve varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim büyükanne ve büyükbabalarım Yunus-Zehra CANDAS ve Mehmet-Feride DURSUN'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 58745



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XVİİ
ÖZET	XİX
ABSTRACT.....	XX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Parkinson Hastalığı	4
2.1.1. Parkinson Hastalığı'nın Patolojik Bileşenleri	5
2.1.1.1. Parkinson hastalığının patogeneze katılan moleküler mekanizmalar	8
2.2. Parkinson Hastalığı Genetiği	13
2.2.1. Otozomal Dominant Parkinson Hastalığı ile ilişkili genler	15
2.2.1.1. LRRK2 (Lösinden zengin tekrarlar içeren kinaz 2)	15
2.2.1.2. α -Sinüklein (SNCA).....	17
2.2.1.3. VPS35 (PARK17)	18
2.2.1.4. UCH-L1(PARK5)	18
2.2.1.5. EIF4G1(PARK18).....	19
2.2.1.6. CHCHD2.....	19
2.2.2. Otozomal Resesif Parkinson Hastalığı ile ilişkili genler	19
2.2.2.1. PARKİN (PARK2).....	19
2.2.2.2. PINK1 (PARK6)	20
2.2.2.3. DJ-1 (PARK7).....	20
2.2.2.4. ATP13A2 (PARK9)	21
2.2.2.5. PLA2G6 (PARK14)	22
2.2.2.6. FBXO7(PARK15).....	22

2.2.3. GBA (Glukoserebrosidaz).....	22
2.2.4. MAPT (Mikrotübül ilişkili protein Tau)	23
2.3. LRRK2 Proteininin Yapısal Özellikleri.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Kullanılan Malzemeler.....	31
3.2. DNA İzolasyonu	31
3.2.1. DNA İzolasyonu Protokolü.....	31
3.3. DNA Saflığı ve Miktarının Tespiti	32
3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile LRRK2 genotiplerinin belirlenmesi	32
3.4.1. LRRK2 Genotipleri.....	33
3.4.2. Deneylerde Kullanılan Simple Prob'ların Hazırlanışı	37
3.4.3. RT-PZR Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanması	37
3.4.4. RT-PZR Döngü Programı	38
3.5. Haplotip Analizi.....	39
3.6. RNA İzolasyonu Protokolü.....	40
3.6.1. Örneklerin RNA miktarının ve saflığının ölçülmesi.....	41
3.6.2. Normalizasyon	42
3.6.3. cDNA Sentezi Protokolü.....	42
3.6.4. cDNA'ların sulandırılması.....	43
3.7. Ekspresyon Analizi	43
3.7.1. 2. Normalizasyon	44
3.7.2. Deneylerde kullanılan qRT-PCR Primerleri ve UPL Probları.....	44
3.7.3. Deneylerde kullanılan primerlerin sulandırılması.....	44
3.7.3.1. RPL13A ve HPRT1 primerlerinin hazırlanması	44
3.7.3.2. LRRK2 primerlerinin hazırlanması.....	44
3.7.4. qRT-PCR reaksiyon karışımının hazırlanması	44
3.7.4.1. qRT-PCR Sıcaklık Döngüsü	45
3.8. İstatistiksel Yöntemler	48
4. BULGULAR.....	49
4.1. DNA izolasyonu sonuçları.....	49
4.2. LRRK2 Genotipleme Sonuçları.....	49

4.2.1. Hasta ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi Genotip ve Allel dağılımları	49
4.2.2. Hasta ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi Genotip ve Allel dağılımları	57
4.2.3. Hasta ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi Genotip ve Allel dağılımları	65
4.3. LRRK2 geni Haplotip Analizi Sonuçları	73
4.4. LRRK2 geni Ekspresyon Analizi Sonuçları	77
4.5. LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesi ile LRRK2 genotip sonuçlarının karşılaştırılması	79
4.6. LRRK2 genotip ve allel sonuçlarının klinik verilerle karşılaştırılması	87
4.6.1. Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs11176013 genotiplerinin ve allellerinin klinik verilerle karşılaştırılması	87
4.6.2. Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs10878371 genotiplerinin ve allellerinin klinik verilerle karşılaştırılması	91
4.6.3. Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs11835105 genotiplerinin ve allellerinin klinik verilerle karşılaştırılması	94
5. TARTIŞMA	100
KAYNAKLAR	106
FORMLAR	113
ETİK KURUL KARARI	116
ÖZGEÇMİŞ	117

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Parkinson Hastalığı ile ilişkili genler	14
Tablo 3-1: Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri	30
Tablo 3-2: LRRK2 geninde araştırılmış olan polimorfizm bölgelerinin bulunduğu konum ve değişiklik sonucu ortaya çıkan alleller	33
Tablo 3-3: LRRK2 geninin 3 SNP bölgesine ait allel değişimleri	33
Tablo 3-4: LRRK2 geni için kullanılan reaksiyon karışımı	38
Tablo 3-5: RT-PZR Döngü Programı	39
Tablo 3-6: LRRK2 genine ait SNP'lerin kromozom üzerindeki konumları	40
Tablo 3-7: Lökosit miktarına göre kullanılan RLT Tamponu miktarı	40
Tablo 3-8: Kullanılan kalıp RNA ve primer karışımının içeriği	42
Tablo 3-9: RT reaksiyonunda kullanılan maddelerin konsantrasyonları	43
Tablo 3-10: LRRK2 prob ve primerlerinin özellikleri	44
Tablo 3-11: RPL13A prob ve primerlerinin özellikleri	44
Tablo 3-12: HPRT1 prob ve primerlerinin özellikleri	44
Tablo 3-13: qRT-PCR sıcaklık döngüsü	46
Tablo 4-1: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesinin genotip dağılımı	50
Tablo 4-2: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı	51
Tablo 4-3: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı	52
Tablo 4-4: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı	53
Tablo 4-5: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı	54
Tablo 4-6: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı	55
Tablo 4-7: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı	56

Tablo 4-8: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı.....	57
Tablo 4-9: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı.....	58
Tablo 4-10: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı.....	59
Tablo 4-11: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı.....	60
Tablo 4-12: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı.....	61
Tablo 4-13: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı.....	62
Tablo 4-14: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı.....	63
Tablo 4-15: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı.....	64
Tablo 4-16: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı.....	65
Tablo 4-17: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı.....	66
Tablo 4-18: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı.....	67
Tablo 4-19: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı.....	68
Tablo 4-20: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı.....	69
Tablo 4-21: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı.....	70
Tablo 4-22: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı.....	71
Tablo 4-23: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı.....	72

Tablo 4-24: Ailesel Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı	73
Tablo 4-25: Tüm Parkinson hastası ve sağlıklı kontrollerde LRRK2 genine ait 3 SNP (rs11176013, rs10878371, rs11835105)'nin haplotip analizi sonuçları	74
Tablo 4-26: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastası ve sağlıklı kontrollerde LRRK2 genine ait 3 SNP (rs11176013, rs10878371, rs11835105)'nin haplotip analizi sonuçları	75
Tablo 4-27: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ile Ailesel Parkinson hastalarının birleştirildiği grup ve sağlıklı kontrollerde LRRK2 genine ait 3 SNP (rs11176013, rs10878371, rs11835105)'nin haplotip analizi sonuçları	76
Tablo 4-28: Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 genine ait 3 SNP genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları	80
Tablo 4-29: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 genine ait 3 SNP genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları	81
Tablo 4-30: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 genine ait 3 SNP genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları	83
Tablo 4-31: Ailesel Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 genine ait 3 SNP genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları	84
Tablo 4-32: Sağlıklı kontrollerde LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 genine ait 3 SNP genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları	86
Tablo 4-33: LRRK2 genotip sonuçlarının klinik verilerle karşılaştırılma sonuçları	97
Tablo 4-34: LRRK2 allel sonuçlarının klinik verilerle karşılaştırılma sonuçları	98
Tablo 4-35: LRRK2 geni genotip sonuçlarının hastalığın gidişatı ile karşılaştırılma sonuçları	98
Tablo 4-36: LRRK2 geni allel sonuçlarının hastalığın gidişatı ile karşılaştırılma sonuçları	99

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Substantia Nigra pars kompakta'daki dopaminerjik nöronlarda görülen Lewy cisimciklerinin mikroskopik görünümü	6
Şekil 2-2: Nigrostriatal yolağın normal ve Parkinson hastalığındaki dejenerasyonunun şematik olarak gösterilmesi	7
Şekil 2-3: Parkinson Hastalığında Bazal Ganglia ile Talamus arasındaki direk ve indirek yolları gösteren şema.	8
Şekil 2-4: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin(MPTP)'in etki mekanizması.....	9
Şekil 2-5: Parkinson hastalığında ubikuitin proteazom sistemindeki bozukluğun şematik olarak gösterilmesi.....	11
Şekil 2-6: Parkinson Hastalığı patogenezinin katılan moleküler yollar	12
Şekil 2-7: LRRK2 geni ve proteininin şematik gösterimi	17
Şekil 2-8: Parkinson hastalığında genetik araştırmaların açığa çıkardığı farklı nöropatolojik yollar	23
Şekil 2-9: LRRK2 proteininin içerdiği 7 fonksiyonel bölge görülmektedir	24
Şekil 2-10: LRRK2'nin kinaz ve GTPaz aktivitesi bulunmaktadır	25
Şekil 2-11: Farklı mutasyonların neden olduğu LRRK2 fonksiyon bozuklukları.....	27
Şekil 3-1: LRRK2 geni rs11176013 bölgesine ait GG genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (58, 48°C) gösteren grafik	34
Şekil 3-2: LRRK2 geni rs11176013 bölgesine ait AG genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (51, 75°C ve 58, 48°C) gösteren grafik	34
Şekil 3-3: LRRK2 geni rs11176013 bölgesine ait AA genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (51, 75°C) gösteren grafik	34
Şekil 3-4: LRRK2 geni rs10878371 bölgesine ait CC genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (55, 02°C) gösteren grafik.	35
Şekil 3-5: LRRK2 geni rs10878371 bölgesine ait CT genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (55, 02°C ve 59, 97°C) gösteren grafik.	35
Şekil 3-6: LRRK2 geni rs10878371 bölgesine ait TT genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (59, 97°C) gösteren grafik.	35
Şekil 3-7: LRRK2 geni rs11835105 bölgesine ait TT genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (58, 39 °C) gösteren grafik.	36

Şekil 3-8: LRRK2 geni rs11835105 bölgesine ait TG genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (58, 39 °C ve 65, 62 °C) gösteren grafik.	36
Şekil 3-9: LRRK2 geni rs11835105 bölgesine ait GG genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (65, 62°C) gösteren grafik.	36
Şekil 3-10: LRRK2 geni mRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılan amplifikasyon eğrilerini gösteren grafik.....	46
Şekil 3-11: RPL13A geni mRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılan amplifikasyon eğrilerini gösteren grafik.....	47
Şekil 3-12: HPRT1 geni mRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılan amplifikasyon eğrilerini gösteren grafik.....	47
Şekil 4-1: Tüm Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı.....	50
Şekil 4-2: Tüm Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı.....	51
Şekil 4-3: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı.....	52
Şekil 4-4: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı.....	53
Şekil 4-5: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı.....	54
Şekil 4-6: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı.....	55
Şekil 4-7: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı.....	56
Şekil 4-8: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı.....	57
Şekil 4-9: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı.....	58
Şekil 4-10: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı.....	59
Şekil 4-11: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı.....	60

Şekil 4-12: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı.....	61
Şekil 4-13: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı	62
Şekil 4-14: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı	63
Şekil 4-15: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı.....	64
Şekil 4-16: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı.....	65
Şekil 4-17: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı.....	66
Şekil 4-18:Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı.....	67
Şekil 4-19: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı.....	68
Şekil 4-20: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı	69
Şekil 4-21: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı	70
Şekil 4-22: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı	71
Şekil 4-23: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı.....	72
Şekil 4-24: Ailesel Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı.....	73
Şekil 4-25: Tüm Parkinson hastası ve sağlıklı kontrollerde LRRK2 geninde araştırmış olduğumuz 3 SNP için Bağlantı Eşitsizliği Analizi.....	74
Şekil 4-26: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastası ve sağlıklı kontrollerde LRRK2 geninde araştırmış olduğumuz 3 SNP için Bağlantı Eşitsizliği Analizi	75
Şekil 4-27: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ile Ailesel Parkinson hastalarının birleştirildiği grup ve sağlıklı kontrollerde LRRK2 geninde araştırmış olduğumuz 3 SNP için Bağlantı Eşitsizliği Analizi.....	76

Şekil 4-28: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarının LRRK2 göreceli mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	77
Şekil 4-29: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarının LRRK2 göreceli mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	78
Şekil 4-30: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarının LRRK2 göreceli mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	78
Şekil 4-31: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarının LRRK2 göreceli mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	79
Şekil 4-32: Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 geni 3 SNP (sırasıyla rs11176013, rs10878371, rs11835105) genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları	80
Şekil 4-33: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 geni 3 SNP (sırasıyla rs11176013, rs10878371, rs11835105) genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları	82
Şekil 4-34: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 geni 3 SNP (sırasıyla rs11176013, rs10878371, rs11835105) genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları	83
Şekil 4-35: Ailesel Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 geni 3 SNP (sırasıyla rs11176013, rs10878371, rs11835105) genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları	85
Şekil 4-36: Sağlıklı kontrollerde LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 geni 3 SNP (sırasıyla rs11176013, rs10878371, rs11835105) genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları	86

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- PH: Parkinson Hastalığı
- LRRK2: Lösinden zengin tekrarlar içeren kinaz 2
- ROC: Ras kompleksi
- COR: Ras kompleksinin C terminali
- MAPKK: Mitojenle aktiflenen protein kinaz kinaz
- LRR: Lösince zengin tekrarlar
- ANK: Ankrin
- ARM: Armadillo
- GWAS: Genom çapında ilişki taraması
- SNP: Tek nükleotid polimorfizmi
- TD: Tremor Dominant
- AR: Akinetik Rijit
- TT: Tremor dominant semptomu ile başlayan hastalığın tremor dominant semptomları ile devam etmesi
- TB: Tremor dominant semptomu ile başlayan hastalığın bradikinezi semptomları ile devam etmesi
- BB: Bradikinezi dominant semptomu ile başlayan hastalığın bradikinezi dominant semptomları ile devam etmesi
- BG: Bazal Ganglia
- MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
- SNCA: Alfa sinüklein
- VPS35: Vakuolar protein ayırımı ile ilişkili protein 35
- PRKN: Parkin
- PINK1: PTEN tarafından indüklenen kinaz 1
- DJ-1: Daisuke-Junko-1
- UCHL1: Ubikuitin karboksi-terminal esteraz L1
- ATP13A2: ATPaz Tip 13A2
- EIF4G1: Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4 gama 1
- SYNJ1: Synaptojanin 1

RAB39A: Ras ilişkili protein Rab-39A

DNAJC13: DnaJ ısı-şok protein ailesi üyesi C13

HTRA2: HtrA serin peptidaz 2

PLA2G6: Fosfolipaz a2 grup VI

FBXO7: F-box protein 7

DNAJC6: DnaJ ısı-şok protein ailesi üyesi C6

GBA: Glukoserebrosidaz

MAPT: Mikrotübül ilişkili protein tau

AR-JP: Otozomal Resesif Juvenil Parkinsonizm

ml: Mili Litre

µl: Mikro Litre

nm: Nano Metre

SNpc: Substantia nigra pars kompakta

UPS: Ubikuitin-proteozom sistemi

PARK: Parkinson hastalığı ile ilişkili lokus

qRT-PCR: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

ÖZET

Candaş, E. (2017). LRRK2 geni polimorfizmlerinin Parkinson hastalığı ile ilişkisinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Parkinson hastalığı (PH) yavaş ve ilerleyici seyirli, kronik bir nörodejeneratif hastalıktır. LRRK2 geni mutasyonları ve polimorfizmleri ile PH'nın ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmamızda LRRK2 geninin rs11176013, rs10878371, rs11835105 bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmleri ile Parkinson hastalığı arasında ilişkiyi araştırmayı amaçladık. 132 Parkinson hastası ve 133 sağlıklı bireyin qRT-PCR yöntemiyle genotipleri belirlendi. Belirlemiş olduğumuz genotiplerin ve haplotip analizleri yapılarak haplotiplerin hastalık ile ilişkisi incelendi. Ayrıca 87 Parkinson hastası ve 55 sağlıklı bireyde LRRK2 geni ekspresyon düzeyleri belirlendi. Söz konusu genotipler ile LRRK2 mRNA ekspresyonunun ilişkisi araştırıldı. Hastalığın klinik verileri ile genotipler arasında ilişki bulunup bulunmadığı da incelendi. Parkinson hastalarında rs11176013 bölgesi “GG” genotipinin ve “G” allelinin, sağlıklı bireylerde ise “AA” genotipinin ve “A” allelinin daha çok görüldüğü saptandı. rs10878371 bölgesi “CC” genotipinin ve “C” allelinin Parkinson hastalarında, “TT” genotipinin ve “T” allelinin ise sağlıklı bireylerde daha sık görüldüğü saptandı. “GCG” haplotipinin hastalarda, “ATT” haplotipinin ise sağlıklı bireylerde daha sık görüldüğü bulundu. Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı saptandı. LRRK2 mRNA ekspresyon seviyelerinin rs11176013 “GG” genotipi ve rs10878371 “CC” genotipini taşıyan Parkinson hastalarında diğer genotiplere kıyasla yakın anlamlı düzeyde azaldığı saptandı. LRRK2 genotipleri ile klinik verileri karşılaştırdığımızda “tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden ve bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden” hastalarda rs11176013 “A” alleli ve rs10878371 “T” allelinin daha fazla görüldüğü saptandı.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular Türk toplumunda rs11176013 ve rs10878371 polimorfizmlerinin PH ile ilişkili olduğuna, ayrıca bu polimorfizmlerin LRRK2 geninin ekspresyonunu ve hastalığın gidişatını etkileyebileceğine, dolayısıyla PH patogenezinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Parkinson Hastalığı, LRRK2, Tek nükleotid polimorfizmi, mRNA ekspresyonu, Nörodejenerasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 58745

ABSTRACT

Candas, E. (2017). Investigation of Association Between LRRK2 Polymorphisms and Parkinson's Disease. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. MSc Thesis. İstanbul.

Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disease with slowly progressive pattern. It has been reported that LRRK2 gene mutations and polymorphisms are associated with PD. In this study, we aimed to investigate the association between single nucleotide polymorphisms in rs11176013, rs10878371 and rs11835105 regions of LRRK2 gene and PD. Genotypes of 132 Parkinson's patients and 133 healthy individuals were determined by qRT-PCR method. Haplotype analysis of these genotypes was also carried out to investigate the association with the disease. In addition, LRRK2 gene mRNA expression levels were determined in 87 Parkinson's patients and 55 healthy subjects, and their association with the genotypes was also investigated. The association between clinical data of the patients and the genotypes was also examined. It was detected that "GG" genotype and "G" allele of rs11176013 were more frequent in patients, and "AA" genotype and "A" allele of rs11176013 were more frequent in controls. It was also detected that "CC" genotype and "C" allele of rs10878371 were significantly frequent in patients and "TT" genotype and "T" allele was significantly frequent in controls. It was found that "GCG" haplotype was significantly high in patients where "ATT" haplotype was high in controls. LRRK2 mRNA expression level of the patients were significantly lower than the control group. The patients who have "CC" genotype for rs10878371 and "GG" genotype for rs11176013 had lower LRRK2 mRNA levels, yet it was statistically nearly significant. When comparing LRRK2 genotypes with clinical data, we found that rs11176013 "A" alleles and rs10878371 "T" alleles were seen in patients who "started with tremor symptoms and continued with bradykinesia symptoms and started with bradykinesia symptoms and continued with bradykinesia symptoms."

In conclusion, our results show that rs11176013 and rs10878371 polymorphisms are associated with PD in a Turkish cohort and moreover these results suggest that these polymorphisms may affect the expression of LRRK2 gene and disease progression and thus play a role in the pathogenesis of PD.

Key Words: Parkinson's disease, LRRK2, Single Nucleotide Polymorphism, mRNA expression, Neurodegeneration

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 58745

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH) yavaş ve ilerleyici seyirli, kronik nörodejeneratif bir hastalıktır (Ertan 2005).

PH, dinlenme halinde uzuvlarda görülen titreme, kaslarda sertleşme, hareketlerde yavaşlama, postür bozukluğu, denge ve yürüme bozukluğu gibi hareket bozukluklarına neden olan bir hastalıktır (Braak ve Del Tredici 2008).

Parkinson hastalığının temel patolojik bulguları orta beyindeki Substantia Nigra pars kompaktadaki pigmentli dopaminerjik nöronların kaybı ve nöronlar içerisinde Lewy cisimciği denilen inklüzyonların birikimidir (Braak, Ghebremedhin ve ark. 2004). Hastalığın kesin nedeni bilinmemekle birlikte hem çevresel hem de genetik faktörlerin PH'na neden olduğu anlaşılmaktadır. Son zamanlardaki genetik gelişmeler çeşitli genlerdeki mutasyonların, PH ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Thomas ve Beal 2007) Sözkonusu genetik çalışmalar PH'nın moleküler temellerinin anlaşılmasına önemli katkılar yapmaktadır.

PH'nın ailesel ve sporadik olmak üzere iki çeşidi vardır. Ailesel PH, otozomal dominant ve otozomal resesif olmak üzere ikiye ayrılır. Yapılan bağlantı analizleri ve genom çapında ilişki çalışmaları sonucu ailesel PH ile ilgili 21 lokus ve bu lokuslarda yer alan 17 gen tanımlanmıştır (Singleton, Farrer ve ark. 2013; Spatola ve Wider 2014; Kalinderi, Bostantjopoulou ve ark. 2016).

Otozomal dominant geçişli ailesel Parkinson hastalığı ile ilişkili olduğu bildirilen genlerden biri olan LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2/Lösinden zengin tekrarlar içeren kinaz 2) geni insanda 12. kromozomda (12q11.2 – q13.1) yer almaktadır ve 144 kb uzunluğundadır. 2527 aminoasit büyüklüğünde 286 KDa'luk Dardarin isimli bir proteini kodlamaktadır. LRRK2 proteininin kinaz ve GTPaz olmak üzere iki önemli etkinliği vardır. Kinaz bölgesi fosforilasyonu katalizlerken, GTPaz bölgesi GTP-GDP hidrolizi ile ilişkilidir (Patra, Parsian ve ark. 2009).

LRRK2 geni beyinde yaygın şekilde ifade edilir. Perikaryon sitoplazmasında, mikrotübül, mitokondri ve membranla çevrili organellerde yer aldığı gösterilmiştir. LRRK2'nin nörit uzaması, sitoiskelet yapısının korunması, vezikül trafiği, otofajik

protein yıkımı gibi hücrel fonksiyonlarda ve immün sistemde rol oynadığı bildirilmiştir (Li, Tan ve ark. 2014).

İlk olarak 2002 yılında PARK8 lokusunun PH ile ilişkisi bulunmuş ardından 2004 yılında bu lokusta LRRK2 geninin bulunduğu tespit edilmiştir (Funayama, Hasegawa ve ark. 2002, Zimprich, Biskup ve ark. 2004). LRRK2 genindeki mutasyonların hem ailesel hemde sporadik PH'na neden olabileceği gösterilmiştir. LRRK2 mutasyonlarının ailesel PH'nın % 5-13'üne, sporadik PH'nın % 1-5'ine neden olduğu ifade edilmiştir (Kumari ve Tan 2009). Bugüne kadar Parkinson hastalığına neden olduğu belirlenen mutasyonlar arasında en sık rastlananı LRRK2 mutasyonlarıdır. LRRK2 ile ilişkili Parkinsonizmin önemli bir özelliği farklı etnik kökenli toplumlarda bazı özgün mutasyonların yüksek sıklıkta görülmesidir (Ross, Soto-Ortolaza ve ark. 2011)

LRRK2 geni üzerinde en çok görülen Gly2019Ser (G2019S) mutasyonu ailesel PH'nın %5-6'sında, sporadik PH'nın %1-2'sinde görülür. Bu mutasyon LRRK2 proteininin kinaz bölgesi üzerinde bulunur ve artmış kinaz aktivitesi ile ilişkilidir. G2019S mutasyonundan sonra en çok görülen ikinci mutasyon R1441 (G/H/C) olup GTPaz bölgesi üzerinde bulunmaktadır (Li, Tan ve ark. 2014).

Yapılan çeşitli çalışmalarda LRRK2 polimorfizmlerinin de ailesel ve sporadik Parkinson hastalığı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Paisan-Ruiz, Jain ve ark. 2004; Zimprich, Biskup ve ark. 2004) Farklı ırklar üzerinde yapılan çalışmalarda LRRK2 geninde PH ile ilişkili çok sayıda tek nükleotid polimorfizmi bildirilmiştir (Li, Teo ve ark. 2013; Soto-Ortolaza, Heckman ve ark. 2013; Cardo, Coto ve ark. 2014).

rs11176013 polimorfizminin PH ile ilişkisi tekrarlanan şekilde gösterilmiştir (Li, Teo ve ark. 2013; Mata, Checkoway ve ark. 2013; Jiang, Li ve ark. 2015). rs10878371 polimorfik bölgesinin de Afrika kökenli Amerikan toplumunda yapılan bir çalışmada ve 2011 yılında yapılan bir GWA çalışmasında PH ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Ross, Wilhoite ve ark. 2010; Ross, Soto-Ortolaza ve ark. 2011). 2013 yılında LRRK2 geni üzerine yapılan genom çapında ilişki çalışması (GWAS) sonucu rs11835105 polimorfik bölgesinin de Asya popülasyonunda PH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Li, Teo ve ark. 2013).

Devam etmekte olan çalışmalar LRRK2 varyantlarının görülme sıklığını ve patojenitesini ortaya koymaya çalışmaktadır. Burada açık olan nokta LRRK2

varyantlarının PH üzerine etkisi ve sıklığının farklı etnik gruplarda belirlenmesidir. Türk toplumunda LRRK2 geni mutasyonları ile PH arasındaki ilişkiyi araştıran bir kaç çalışma yapılmıştır. Ancak LRRK2 geni polimorfizmlerinin PH ile ilişkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Biz de bu çalışmamızda Türk toplumunda LRRK2 geninin rs11176013, rs10878371, rs11835105 bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmleri ile Parkinson hastalığı arasında ilişki bulunup bulunmadığını araştırdık. Ayrıca LRRK2 geni mRNA ekspresyon düzeylerini belirleyerek, LRRK2 genotipleri ile ilişkisini ve söz konusu genotiplerle hastalığın klinik verileri arasında ilişki bulunup bulunmadığını araştırdık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson Hastalığı (PH) genellikle 50-60 yaşları arasında başlayan, yavaş ve ilerleyici seyirli, kronik bir nörodejeneratif hastalıktır. Alzheimer hastalığından sonra en sık rastlanan nörodejeneratif hastalıktır (Ertan 2005).

PH, ilk olarak 1817 yılında Dr. James Parkinson tarafından titrek felç adıyla tanımlanmıştır. Hastalığın daha detaylı tanımını Dr. Jean Marie Charcot yapmıştır ve hastalığa onu ilk tarif eden kişinin adını vermiştir (Parkinson 2002).

PH, dinlenme halinde uzuvlarda görülen titreme (istirahat tremoru), kaslarda sertleşme (rijidite), hareketlerde yavaşlama (bradikinezi), postür bozukluğu, denge ve yürüme bozukluğu gibi hareket bozuklukları ile birlikte görülen bir hastalıktır (Ertan 2005). Tremor dinlenme halinde görülüp hareket sırasında ortadan kaybolur. Titreme tek taraflı olarak bir elde ya da ayakta ortaya çıkmaktadır ve ekstremitenin distalini etkilemektedir. Başparmak ve işaret parmağının birbirlerine ritmik sürtmesi olarak ortaya çıkar. Tremor, yavaş bir ilerleme gösterir. Rijidite, agonist ve antagonist kasların eş zamanlı kasılmalarına bağlı olarak hastanın ekstremitelerinde, boyun veya gövdesinin pasif hareketi sırasında ortaya çıkan devamlı bir direnme şeklinde kendini gösteren kas tonusundaki artıştır. PH'nın en karakteristik belirtisi olan bradikinezi, harekete başlamada güçlük ve hareketlerde yavaşlama olarak tanımlanır. Bradikinezi tüm Parkinson hastalarında görülür (Bergman ve Deuschl 2002). Postür bozukluğu, ilk olarak denge kaybı ile birlikte ortaya çıkan, ayakta veya otururken alınan vücut pozisyonunun devamını sağlayan postürel reflekslerin bozulması veya kaybıdır (Stamey ve Jankovic 2007).

Parkinson hastalığında motor hareket semptomlarının yanında motor olmayan semptomlarda görülmektedir. Bunlar; bilişsel bozukluklar, iskelet deformiteleri, ortostatik hipotansiyon, üriner sistem bozuklukları, ağrı ve duyuşsal semptomlar, anormal terleme, uyku bozuklukları ve depresyondur (Emre 2008)

PH, görülme sıklığı 65 yaş üstü kişilerde %1,8 iken, 85 yaş üstü kişilerde %2,6'ya çıkmaktadır (Dorsey, Constantinescu ve ark. 2007). Hastalık başlangıcı genellikle 50-60 yaşları arasında değişmektedir. Hastalık 20 yaşından önce başlarsa "primer juvenil parkinsonizm", 20-40 yaşları arasında başlarsa "genç başlangıçlı parkinsonizm" olarak adlandırılır (Ertan 2005).

Ailede Parkinson hastası olması, ileri yaş, kafa travması, stres, beyaz ırk ve cinsiyetin yanısıra genetik faktörler ve çevresel faktörler gibi etkenlerde Parkinson hastalığı oluşumunu önemli derecede etkilediği bilinmektedir. Hastalığın insidansı erkeklerde 1,8 oranında daha fazla görülmektedir. Günümüzde dünya genelinde 6 milyon kişinin Parkinson hastası olduğu bildirilmiştir. ABD ve Avrupa’da yılda 100.000 kişinin PH’na yakalandığı tespit edilmiştir (Wirdefeldt, Adami ve ark. 2011).

2.1.1. Parkinson Hastalığı’nın Patolojik Bileşenleri

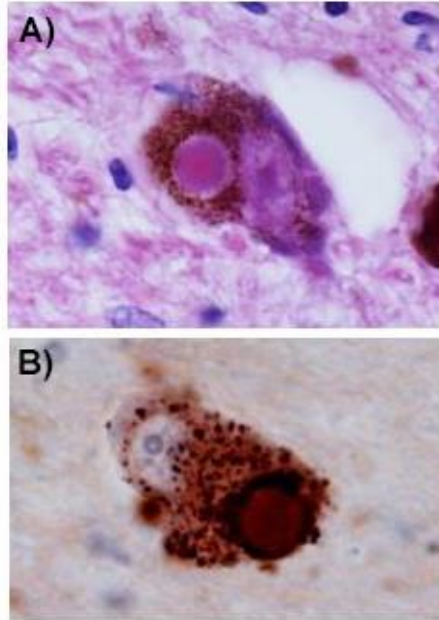
Parkinson hastalığının temel patolojik bulguları orta beyindeki Substantia Nigra pars kompakta’daki dopaminerjik nöronların kaybı ve nöronlar içerisinde Lewy cisimciği denilen inklüzyonların birikimidir.

Lewy cisimciği 8-30 um çapında sitoplazmik inklüzyonlardır. Parkinson hastalarında Lewy cisimciği patolojisi ilk olarak vagusun dorsal motor nukleusu ve koku alma sistemi gibi alt beyin nukleuslarında görülür. Daha sonra giderek beynin coeruleus, substantia nigra pars compacta, bazal ön beynin magnoselüler çekirdeği, subtalamik çekirdek, amigdala bölgelerinde değişikliklere yol açar (Braak, Del Tredici ve ark. 2002) Lewy cisimcikleri beyin sapı Lewy cisimcikleri ve kortikal tip Lewy cisimcikleri olarak ikiye ayrılır. Klasik beyin sapı Lewy cisimcikleri hiyalin eozinofilik bir çekirdek, konsantrik lamel bantları ve dar soluk renkli halolar içeren nöron içi küresel sitoplazmik inklüzyonlardır (Şekil 2-1). Kortikal tip Lewy cisimciklerinde ise halo eksiktir. Beyin sapı Lewy cisimcikleri, beyin sapı çekirdekleri ve diensefalonda görülürken, kortikal Lewy cisimcikleri serebral limbik korteks ve amigdala’da görülmektedir (Gomez-Tortosa, Irizarry ve ark. 2000). Lewy cisimcikleri, proteinlerin anormal çökmesiyle ortaya çıkan sitoplazmik inklüzyonlardır ve ubikuitin (Ub) için immünpozitif boyanırlar. Ub, proteinlerin ubikitinasyonu ve indirgenmesinde rol oynayan, yüksek oranda korunmuş 76 a.a’lık bir proteindir.

Proteinlerin yıkımından sorumlu olan ubikuitin-proteozom yolunun genetik ve çevresel nedenlerle hasara uğraması ile yanlış katlanmış proteinlerin yıkılamayarak birikmesi sonucu Lewy cisimciklerinin oluştuğu düşünülmektedir (Emre 2008).

Lewy cisimcikleri içerisinde çok fazla sayıda proteinin varlığı saptanmakla birlikte biyokimyasal içeriği tam olarak bilinmemektedir. Şimdiye kadar 76’dan fazla Lewy cisimciği bileşeni tanımlanmıştır. Bunlar; yapısal elemanlar, α -sinüklein bağlayan proteinler, synphilin-1 bağlayıcı proteinler, ubikuitin-proteazom sisteminin bileşenleri,

hücresel cevaplara katılan proteinler, fosforilasyon ve sinyal iletimi ile ilişkili proteinler, sitoskelet proteinleri, hücre döngüsü proteinleri, sitozolik proteinler ve diğer proteinler olmak üzere 10 farklı protein sınıfına aittir (Wakabayashi, Tanji ve ark. 2007).



Şekil 2-1: Substantia Nigra pars kompakta'daki dopaminerjik nöronlarda görülen Lewy cisimciklerinin mikroskopik görünümü

A) H+E B) α -sinüklein için immunohistokimya uygulanmıştır

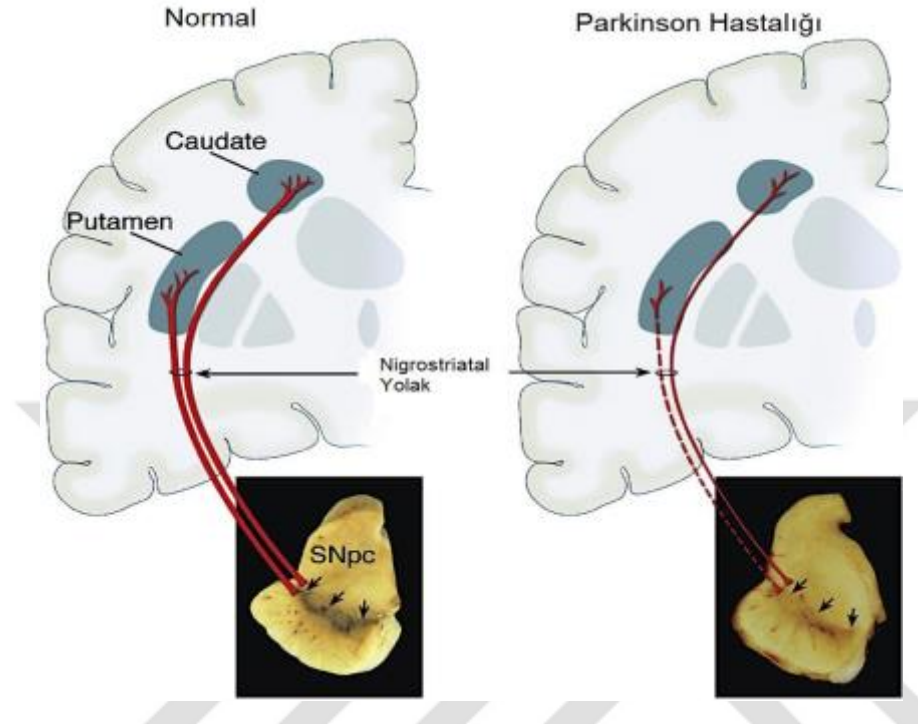
(<https://kaitlynroland.wordpress.com/tag/lewy-body/>).

Her Parkinson hastasında Lewy cisimciği görülmemektedir. Buna karşın Lewy cisimcikli demans ve Alzheimer hastalığının Lewy cisimcikli tipi gibi farklı nörolojik hastalıklarda da Lewy cisimciği görülmektedir. Parkinson hastalığı veya Lewy cisimcikli demans gibi hastalıkların ilişkili olduğu bilinen diğer proteinler de α -sinüklein gibi Lewy cisimciklerinin içerisinde bulunmaktadır.

Bunlardan PINK1, parkin, DJ-1 ve HtrA2/Omi mitokondri ilişkili, UCH-L1 ve parkin proteazom ilişkili, sinfilin-1 proteazom fonksiyon bozukluğu ile ilişkili genlerdir (Beyer, Domingo-Sabat ve ark. 2009).

Lewy cisimciği oluşumu, akson içindeki nöroflamentlerin fonksiyonunu bozmakta ve dopaminerjik işleve sahip Substantia Nigra'dan striatuma uzanan aksonal bağlantıya hasar vermektedir (Şekil 2-2) (Licker, Kovari ve ark. 2009). SNCA triplikasyonu görülen vakalarda, yaygın olarak kortikal ve subkortikal Lewy

cisimcikleri, vakuolar dejenerasyon, büyük nöronal kayıplar ve gliozis görülmektedir (Farrer, Kachergus ve ark. 2004).

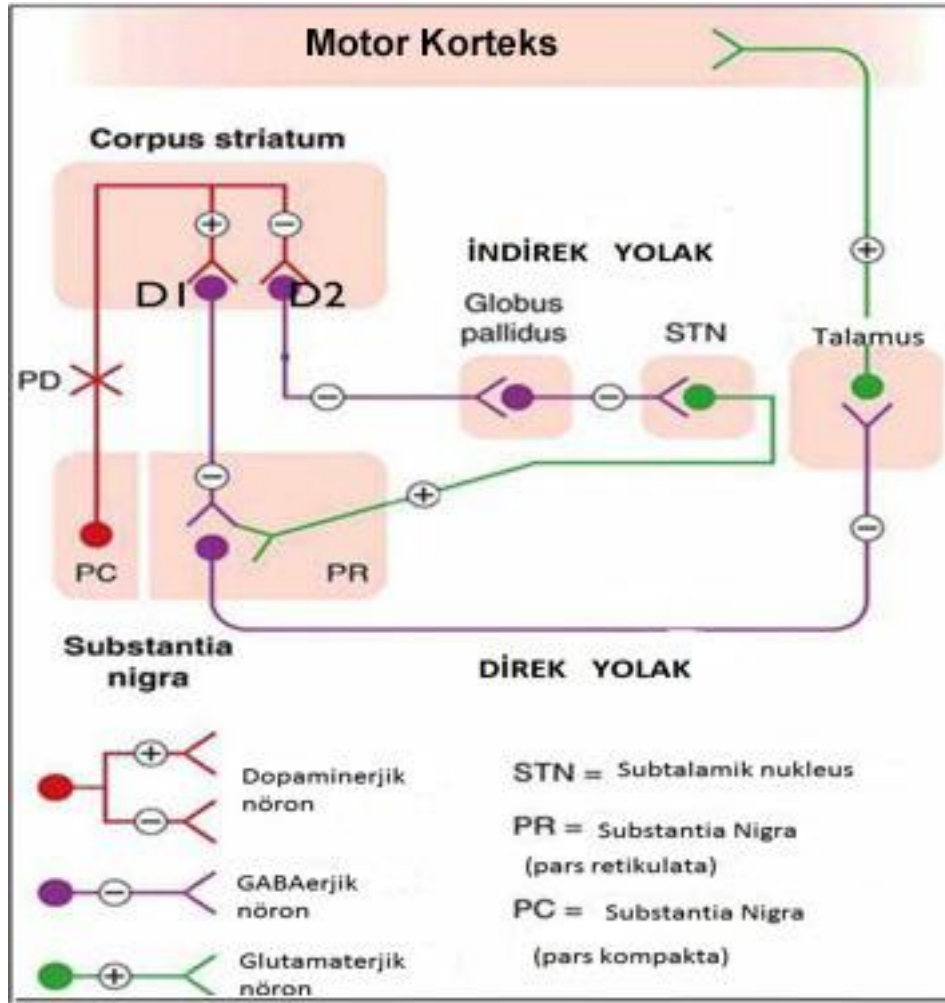


Şekil 2-2: Nigrostriatal yolağın normal ve Parkinson hastalığındaki dejenerasyonunun şematik olarak gösterilmesi

(Dauer ve Przedborski 2003'den uyarlanmış)

Parkinson Hastalığında (PH) görülen motor fonksiyon kayıpları bazal ganglia (BG)'da meydana gelir. Bazal ganglia; striatum globus, pallidus, subtalamik nukleus ve substantia nigra kısımlarından oluşmaktadır. PH'nın temelinde BG ile talamus arasındaki direk ve indirek yolak mekanizmasındaki bozukluklar yatmaktadır. BG ile talamus arasındaki direk yolak, pozitif geri bildirim, indirek yolak ise negatif geri bildirim sağlamaktadır.

Direk yol dopaminin D1 tipi reseptörlere bağlanması ile uyarılırken, indirek yol D2 tipi reseptörlere bağlanması ile uyarılmaktadır. Substantia Nigra pars kompakta'daki dopaminerjik nöronların kaybı direk ve indirek yollar arasındaki geri bildirim mekanizmasını bozmaktadır (Şekil 2-3) (Utter ve Basso 2008).



Şekil 2-3: Parkinson Hastalığında Bazal Ganglia ile Talamus arasındaki direk ve indirek yolları gösteren şema.

(<https://www.studyblue.com/notes/note/n/pha3-2-02-anti-parkinson-drugs/deck/3440543>)

2.1.1.1. Parkinson hastalığının patogeneze katılan moleküler mekanizmalar

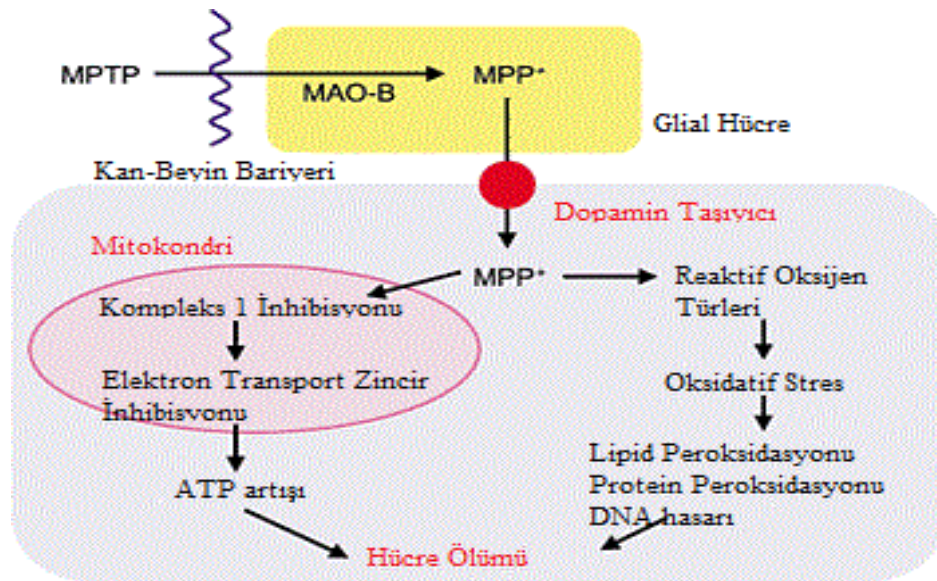
Parkinson hastalığı ile ilişkili birçok patolojik mekanizma tanımlanmıştır.

Ubikuitin proteozom sistemi ile protein yıkım yollarındaki bozukluklar, oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, lizozom ve şaperon aracılı otofajik sistemde görülen fonksiyon kaybı, inflamasyon ve diğer bazı yolların Parkinson hastalığına neden olduğu bilinmektedir (Şekil 2-6).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda pestisitler, karbon monoksit, kuyu suyu, kırsal kesimde yaşam, endüstriyel ajanlar, metaller (mangan, civa, demir), viral enfeksiyonlar (İnfluenza A, von Econom ensefaliti), rotenon ve özellikle 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) gibi bazı toksinlerin PH'na neden olduğu gösterilmiştir (Moore, West ve ark. 2005).

MPTP'nin; etki mekanizmasının açığa çıkarılması ile mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun PH'nın temelinde yer aldığı ortaya konmuştur. MPTP kan-beyin bariyerini geçer, glial hücelere girer, monoamin oksidaz tarafından oksitlenerek ve tekrar oksidasyona uğrayıp nörotoksin MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridin)'ye dönüştürülür. MPP⁺ dopamin taşıyıcısı tarafından monoaminergik nöronların içine alınır (Langston ve Ballard 1984). MPP⁺ mitokondri içerisinde yoğunlaşarak Kompleks I' i inhibe eder ve sonucunda ATP azalması, oksidatif stres ve apoptotik hücre ölümüne yol açar (Şekil 2-4). Bu buluştan sonra sporadik Parkinson hastalarında mitokondriyal Kompleks I aktivitesi araştırılmaya başlanmıştır ve Parkinson hastalarının substantia nigralarında orta derecede mitokondriyal Kompleks I eksikliği bulunduğu bildirilmiştir. Bu eksiklik daha sonra PH hastalarının frontal kortekslerinde de saptanmıştır. Parkinson hastalığı nedeniyle hayatını kaybeden hastaların post-mortem beyin dokularında sadece Substantia Nigra pars kompaktada Kompleks I aktivitesinde azalma saptanmıştır (Olanow 2002).

MPTP gibi diğer nörotoksinler, insanda ve hayvan modellerinde Parkinson hastalığını aktive etmektedir. Diğer bir nörotoksin olan rotenon, sıçanlarda benzer bir etki meydana getirir ve Parkinson hastalığı modeli oluşturmak için kullanılmaktadır (Schapira 2002).



Şekil 2-4: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin(MPTP)'in etki mekanizması

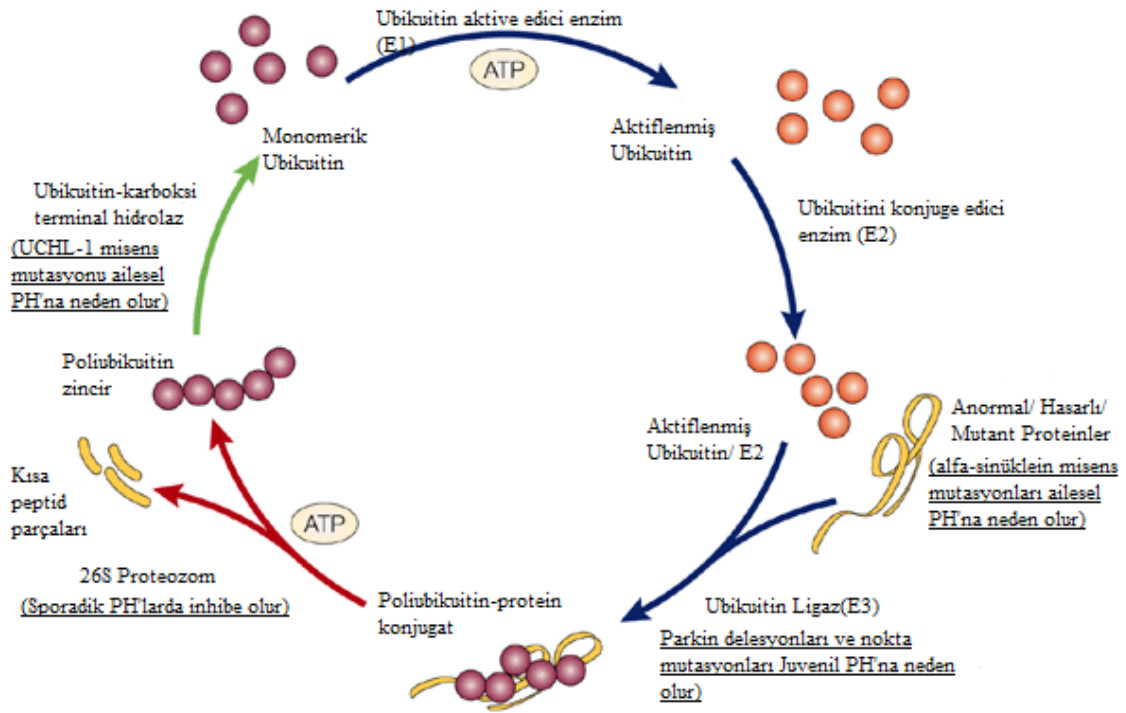
MPTP kan beyin bariyerini geçer ve glial monoamin oksidaz B (MAO-B) ile metabolit MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridin) haline dönüştürülür. (Drug News Perspect 2002, 15(9): 586)

Kompleks I inhibisyonu mitokondriyal solunum zincirinde hasara sebebiyet vererek oksidatif stresi aktive edebilir. Mitokondri, endoplazmik retikulum ve nukleus membranında bulunan serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres, Parkinson hastalığında nörodejenerasyona ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır (Beal 1998).

Oksidatif stres, sitokin seviyelerinde azalma, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar ve amiloid-beta-peptidi birikimi apoptozu hızlandıran patolojik süreçlerdir. Apoptozun en önemli mediatörleri reaktif oksijen türleridir. Dopaminerjik nöronlar üzerinde koruyucu ve yenileyici özelliğe sahip olan glial-kökenli nörotrofik faktörün (GDNF) ve beyin-kökenli nörotrofik faktörün (BDNF) yeterli olmaması durumunda apoptotik nöronal ölüm meydana gelir (Naoi ve Maruyama 1999).

Ubikuitin proteazom sistemi (UPS) hücre içi protein yıkımından sorumlu sistemdir. Bu sistemde yıkılmak üzere gönderilen proteinler 76 a.a'lık bir peptid olan ubikuitin ile işaretlenir. Ubikuitinlenme işlemi aşamalar şeklinde gerçekleşir ve ubikuitin aktive edici (E1), ubikuitini konjuge edici (E2), ubikuitini bağlayıcı (E3) enzimlerin ardarda etkinliği gereklidir (Hershko ve Ciechanover 1998). Ubikitinasyon işlemi bir poliübikütün zincirinin oluşumunu sağlamak üzere ardarda birçok kez tekrarlanır.

Parkinson hastalığıyla UPS arasındaki ilişki araştırılarak ailesel parkinsonizme neden olan parkin genindeki mutasyonun UPS'inde direk rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır. Otozomal resesif erken başlangıçlı Parkinson hastalığına parkin genindeki mutasyonlar sebep olmaktadır. Parkin geni, bir ubikuitin ligazdır ve protein substratlarının UPS yoluyla yıkılmasını sağlar. Bu nedenle, ubikuitin aracılı proteolizin Parkinson hastalığında önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır (Şekil 2-5) (Kitada, Asakawa ve ark. 1998).

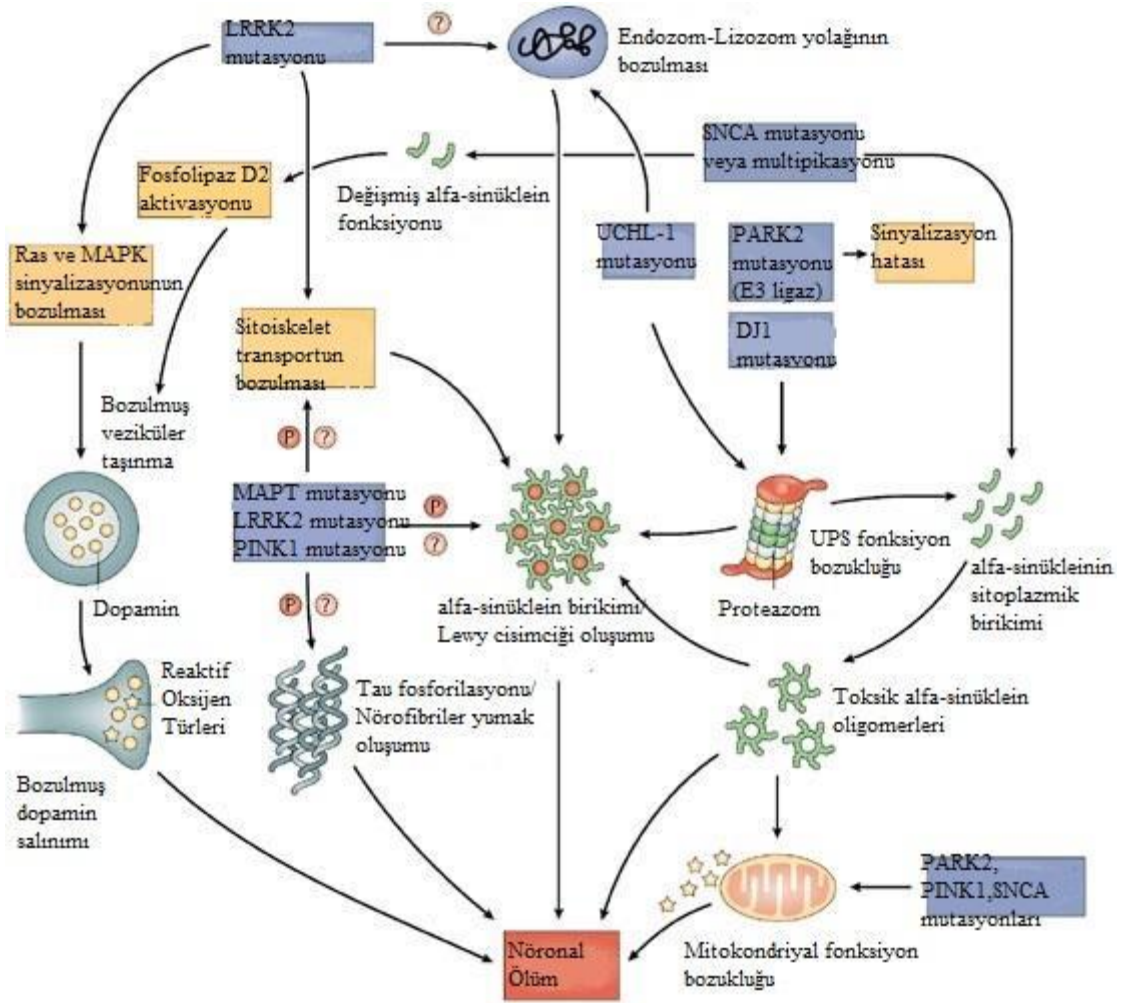


Şekil 2-5: Parkinson hastalığında ubiquitin proteazom sistemindeki bozukluğun şematik olarak gösterilmesi

(McNaught, Olanow ve ark. 2001'dan uyarlanmış)

Fonksiyonel α -sinüklein proteini düzeylerindeki değişiklikler, sinaptik vezikül tutunmasına ve füzyonuna zarar vermekte, veziküllerin geri dönüşümü önlenmekte ve sitozolde dopamin birikmesine neden olmaktadır. α -sinüklein üzerine yapılan hayvan modeli çalışmaları SNCA geninin aşırı ifade edilmesinin dopaminerjik hücre kaybına yol açtığını göstermiştir (Venda, Cragg ve ark. 2010).

Lizozomlar hidrolitik enzimlerin etkinliği ile endositoz, fagositoz ve otofaji gibi çeşitli yollar aracılığıyla hücre içi bileşenlerin parçalanmasını sağlayan dinamik organellerdir. İdiyopatik Parkinson hastalarının post-mortem beyin örneklerinde ve genetik olarak Parkinson modeli oluşturulan kemirgenlerde intranöronal lizozomların sayısının azalmış olduğu, lizozom ilişkili proteinlerin seviyesinde azalma olduğu ve otofagozomların biriktiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar PH-bağılantılı lizozomal yetmezliğin dopaminerjik nörodejenerasyonun neden olduğu hücre ölümünden önce otofajik bozulmaya katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur. Böylece lizozomal fonksiyon bozukluğunun Parkinson patogenezinde katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Li, Tan ve ark. 2014).



Şekil 2-6: Parkinson Hastalığı patogeneziye katılan moleküler yollar

(<http://www.humpath.com/spip.php/article>)

2.2. Parkinson Hastalığı Genetiği

PH, başlangıç yaşına ve aile öyküsüne göre sınıflandırılmaktadır. Başlangıç yaşına göre erken başlangıçlı PH (50 yaş altı), geç başlangıçlı PH (50 yaş ve üzeri) ve Juvenil Parkinsonizm (20 yaş altı) olarak adlandırılır (Liu, Wu ve ark. 2015).

PH'nın ailesel ve sporadik olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. PH olgularının, %85'i sporadik olarak, %10-15'i ise ailesel olarak ortaya çıkmaktadır (Emre 2010)

Parkinson hastalığı üzerindeki genetik çalışmalar hastalığın moleküler nedenlerini belirlemede katkı sağlamaktadır. Yapılan bağlantı analizleri ve genom çapında ilişki çalışmaları sonucu PH ile ilgili 21 lokus ve bu lokuslarda yer alan 17 gen tanımlanmıştır (Kalinderi, Bostantjopoulou ve ark. 2016). Yapılan çalışmalarda LRRK2, SNCA, VPS35, EIF4G1, DNAJC13, UCHL1, HTRA2 gen mutasyonlarının otozomal dominant Parkinson hastalığı, PRKN, PINK1, DJ-1, ATP13A2, PLA2G6, FBXO7, DNAJC6, SYNJ1 gen mutasyonlarının otozomal resesif PH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kalinderi, Bostantjopoulou ve ark. 2016). Son olarak 2014 yılında X-bağılantılı erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastalığına neden olan RAB39B gen mutasyonu ve 2015 yılında otozomal dominant Parkinson hastalığına neden olan CHCHD2 gen mutasyonu tanımlanmıştır (Ferreira ve Massano 2016). Parkinson hastalığı riskini arttıran diğer genler arasında GBA ve MAPT genleri bulunmaktadır (Schulte ve Gasser 2011).

Parkinson hastalığı ile ilişkili lokuslar PARK olarak adlandırılmış ve bulunma sırasına göre numaralandırılmıştır. Parkinson hastalığı ile ilişkili genler ve kalıtım şekli Tablo 2-1'de gösterilmiştir.

Tablo 2-1: Parkinson Hastalığı ile ilişkili genler

(Kalinderi, Bostantjopoulou ve ark. 2016)

Sembol	Gen	Gen Lokusu	Kalıtım şekli	Hastalık tipi
PARK1	SNCA	4q21-22	Otozomal Dominant	Erken başlangıçlı PH
PARK2	PARKIN	6q25.2-q27	Otozomal Resesif	Erken başlangıçlı PH
PARK3	Bilinmiyor	2p13	Otozomal Dominant	Geç başlangıçlı PH
PARK4	SNCA	4q21-q23	Otozomal Dominant	Erken başlangıçlı PH
PARK5	UCHL1	4p13	Otozomal Dominant	Geç başlangıçlı PH
PARK6	PINK1	1p35-p36	Otozomal Resesif	Erken başlangıçlı PH
PARK7	DJ-1	1p36	Otozomal Resesif	Erken başlangıçlı PH
PARK8	LRRK2	12q12	Otozomal Dominant	Geç başlangıçlı PH
PARK9	ATP13A2	1p36	Otozomal Resesif	Kufor-Rakeb Sendromu; atipik PH
PARK10	Bilinmiyor	1p32	Risk Faktörü	Bilinmiyor
PARK11	Bilinmiyor	2q36-37	Otozomal Dominant	Geç başlangıçlı PH
PARK12	Bilinmiyor	Xq21-q25	Risk Faktörü	Geç başlangıçlı PH
PARK13	HTRA2	2p12	Otozomal Dominant veya Risk Faktörü	Geç başlangıçlı PH
PARK14	PLA2G6	22q13.1	Otozomal Resesif	Erken başlangıçlı distoni-parkinsonizm
PARK15	FBX07	22q12-q13	Otozomal Resesif	Erken başlangıçlı Parkinsoniyen-Primal sendrom
PARK16	Bilinmiyor	1q32	Risk Faktörü	Geç başlangıçlı PH
PARK17	VPS35	16q11.2	Otozomal Dominant	Geç başlangıçlı PH
PARK18	EIF4G1	3q27.1	Otozomal Dominant	Geç başlangıçlı PH
PARK19	DNAJC6	1p31.3	Otozomal Resesif	Juvenil başlangıçlı, atipik PH
PARK20	SYNJ1	21q22.11	Otozomal Resesif	Juvenil başlangıçlı, atipik PH
PARK21	DNAJC13	3q22.1	Otozomal Dominant	Geç başlangıçlı PH

2.2.1. Otozomal Dominant Parkinson Hastalığı ile ilişkili genler

2.2.1.1. LRRK2 (Lösinden zengin tekrarlar içeren kinaz 2)

LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2/Lösinden zengin tekrarlar içeren kinaz 2) geni, insanda 12. kromozomda (12q11.2 – q13.1) yer almaktadır. 144 kb uzunluğundadır ve 51 adet ekzona sahiptir. LRRK2 genindeki mutasyonlar ailesel otozomal dominant Parkinson hastalığının en sık rastlanan sebebidir. LRRK2'nin artmış kinaz aktivitesi ile fosforilasyonun artışı nöronal ölüm yolağını aktive ederek Parkinson hastalığına sebep olmaktadır (Gandhi, Chen ve ark. 2009).

İlk olarak 2002 yılında geç başlangıçlı otozomal dominant PH görülen geniş bir Japon ailede PARK8 lokusunun PH ile ilişkisi tespit edilmiş ardından 2004 yılında bu lokusta LRRK2 geninin bulunduğu ve mutasyonlarının PH'na neden olabileceği gösterilmiştir (Kumari ve Tan 2009).

LRRK2 geninde PH ile ilişkili olan 80 mutasyon bulunmuştur. Bunlardan 7 LRRK2 mutasyonunun (R1441C, R1441G, R1441H, Y1699C, G2019S, I2020T, N1437H) patojenik olduğu bağlantı analizleriyle ispatlanmıştır (Kalinderi, Bostantjopoulou ve ark. 2016). LRRK2 mutasyonlarının ailesel otozomal dominant PH'larında görülme sıklığı yaklaşık olarak % 10 (Khan, Jain ve ark. 2005; Paisan-Ruiz, Nath ve ark. 2008; Lesage ve Brice 2009), sporadik PH'larında % 3.6 olarak bulunmuştur (Lesage, Durr ve ark. 2007). LRRK2'nin en sık görülen mutasyonu ilk olarak 2005 yılında tanımlanan G2019S mutasyonudur. Hem ailesel hem de sporadik Parkinson hastalığında yaygın olarak görülmektedir (Nichols, Pankratz ve ark. 2005). Bu mutasyonun görülme sıklığının ailesel PH'da %5-6 arasında iken sporadik PH'da %1-2 arasında olduğu açıklanmıştır. Kuzey Afrika toplumlarında daha sık görülürken Asya ve Avrupa toplumlarında daha nadir görüldüğü tespit edilmiştir (Tan 2007).

Mutasyonun en yaygın olarak Kuzey Afrika populasyonunda ailesel ve sporadik Parkinson hastalarının %40'ında, Aşkenazi Yahudi populasyonunda PH'nın %20'sinde ve Portekiz populasyonunda PH'nın %10'unda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu mutasyon proteinin kinaz bölgesinde yer alır ve artmış kinaz aktivitesi ile ilişkilendirilir (Ferreira ve Massano 2016).

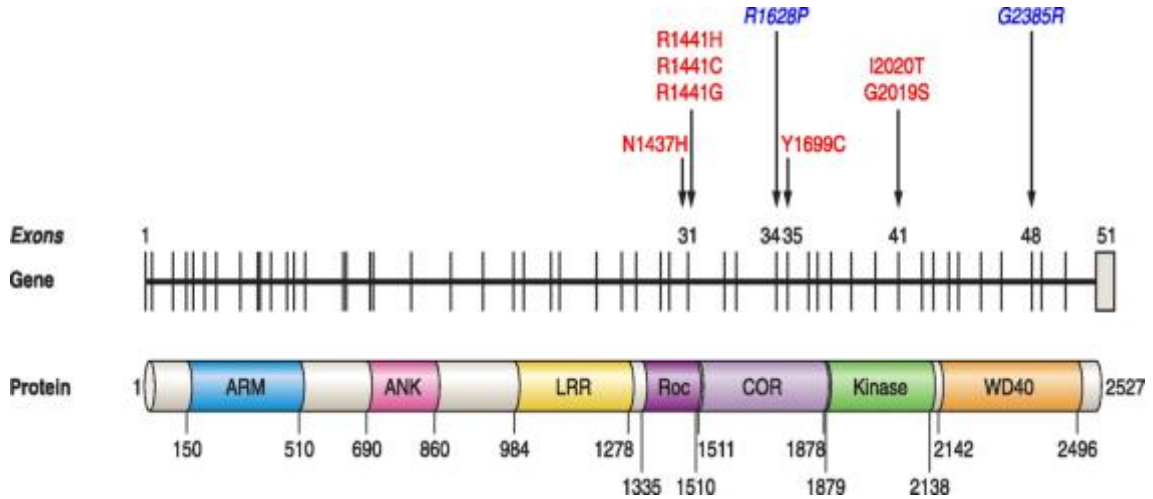
Aşkenazi Yahudileri, Avrupa ve Afrika kökenli Parkinson hastalarında G2019S mutasyonunun Haplotip 1 isimli genomik bölgesi bulunmuştur. Avrupa kökenli 5 ailede G2019S mutasyonunun Haplotip 2 isimli genomik bölgesi bulunmuştur.

Haplotip 3 genomik bölgesi ise Japon taşıyıcılarda bulunmuş ve bir Türk hastada bildirilmiştir (Kumari ve Tan 2009; Pirkevi, Lesage ve ark. 2009)

En sık görülen ikinci LRRK2 geni mutasyonu ROC bölgesi üzerinde bulunan R1441C mutasyonudur (Di Fonzo, Tassorelli ve ark. 2006). İlk kez iki otozomal dominant ailesel Parkinson hastası ailede bulunmuştur. Kuzey İspanya (Basque), güney İtalya ve Fransa popülasyonlarında en sık görülen mutasyondur (Gandhi, Chen ve ark. 2009). Bask popülasyonundaki Parkinson hastalarında R1441C mutasyonunun görülme sıklığı %15 olarak tespit edilmiştir. Bu mutasyon postsinaptik kalsiyum dengesizliğine neden olur (Kalinderi, Bostantjopoulou ve ark. 2016).

G2385R varyantı Singapur ve Tayvan popülasyonlarında Parkinson hastalığı riskini arttıran yaygın bir polimorfizmdir. LRRK2 proteininin WD40 bölgesi üzerinde yer alır. WD40 bölgesi protein-protein etkileşimine aracılık eder. Hücrel stres altında pro-apoptotik etkisi olabilir ve kinaz aktivitesini arttırabilir (Jaleel, Nichols ve ark. 2007).

I2020T mutasyonu G2019S mutasyonu ile birlikte kinaz bölgesi üzerinde bulunan ve patojenik olan bir diğer mutasyondur. Hastalıkla ilişkili I2020T mutasyonunun LRRK2 proteinin otofosforilasyonunu % 40 oranında artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca LRRK2 proteininin kinaz aktivitesinin kaybına neden olmaktadır (Gloeckner, Kinkl ve ark. 2006). Y1699C mutasyonu COR bölgesinde yer alır ve kinaz aktivitesinin artışına neden olur (Sancho, Law ve ark. 2009). N1437H mutasyonu otozomal dominant Parkinson hastası Norveçli bir ailede bulunmuştur. Bu mutasyon ROC bölgesinde bulunur, R1441C/G/H mutasyon bölgesine yakındır, kinaz ve GTPaz aktivitelerinde artışa neden olmaktadır (Şekil 2-10) (Bardien, Lesage ve ark. 2011).



Şekil 2-7: LRRK2 geni ve proteininin şematik gösterimi

Kanıtlanmış yedi patojenik mutasyon (kırmızı renkte) ve Asya'ya özgü iki risk faktörü (mavi) gösterilmiştir.

(Corti, Lesage ve ark. 2011'den uyarlanmış)

2.2.1.2. α -Sinüklein (SNCA)

140 a.a büyüklüğünde, doğal olarak katlanmamış bulunan ve yanlış katlanma eğilimi olan bir proteindir. α -Sinüklein dopamin varlığında oligomer ve fibriller oluşturabilir bu da orta beyindeki dopaminerjik nöronların α -Sinüklein toksisitesine duyarlılığını kısmen de olsa açıklayabilir. α -Sinüklein nörotransmisyon ve sinaptik ileti gibi membran trafiği dinamiklerinde moleküler şaperon olarak önemli bir rol oynar (Maguire-Zeiss 2008). Proteinin yanlış katlanması oksidatif ve inflamatuvar stresi artırır aynı zamanda otofaji, proteozomal yıkım ve membran özelliklerinde değişikliklere neden olan toksik ara ürünlerin oluşumuna neden olur. α -Sinükleinin yanlış katlanması ve Lewy cisimciği oluşumu PH'na yol açar (Angot, Steiner ve ark. 2010).

α -Sinüklein geni öğrenme, hafıza ve sinaptik plastisitede rol oynadığı düşünülen bir presinaptik proteini kodlar. Bu protein, Lewy cisimciklerinin en önemli bileşenidir ve proteinin oluşturduğu fibriller, 20S ve 26S proteozomlar ile indirgenir (Spillantini, Schmidt ve ark. 1997).

SNCA geni 1997 yılında geniş bir İtalyan ailede 4.kromozomda tanımlanmıştır (Polymeropoulos, Higgins ve ark. 1996). Bu keşif Parkinson hastalığının genetiğinde bir dönüm noktası olmuştur (Spillantini, Schmidt ve ark. 1997). Şimdiye kadar SNCA geninde PH'na neden olan 5 farklı yanlış anlamlı mutasyon tanımlanmıştır (Ferreira ve Massano 2016)

Yanlış anlamlı mutasyonlara ilave olarak birden fazla PH bulunan ailelerde α -Sinüklein genindeki duplikasyon ve triplikasyonlar da bildirilmiştir. Daha önce ayrı bir lokus olarak bulunan PARK4'ün α -Sinüklein multipilkasyonlarına bağlı olduğu belirlenmiş ve PARK1 ve PARK4 aynı başlık altında toplanmıştır (Singleton, Farrer ve ark. 2003).

2.2.1.3. VPS35 (PARK17)

2011 yılında geç başlangıçlı otozomal dominant Parkinson hastası İsveç ve Avusturyalı ailelerde yapılan iki farklı çalışma ile 16q11.2 kromozom bölgesinde PARK17 lokusu bulunduğu ve VPS35 (vakuolar protein ayırımı ile ilişkili protein 35) geninin bulunduğu bildirildi. İki aile grubunda da VPS35 genindeki D620N mutasyonunun Parkinson hastalığının ailesel otozomal dominant formunun altında yatan sebep olduğu tespit edildi (Sheerin, Charlesworth ve ark. 2012). Bu mutasyonun Parkinson hastası tüm ailesel olguların yaklaşık %1'inden sorumlu olduğu bildirildi. VPS35 mutasyonlarının etnik dağılımı değişkenlik göstermektedir. D620N mutasyonunun Fransız popülasyonunda (%1,2), Tunus popülasyonunda (%0,5) ve Yemenlilerde (%1,67) oranında görüldüğü tespit edilmiştir (Deng, Gao ve ark. 2013). VPS35 geni endozom-trans Golgi trafiğini ve zar-ilişkili proteinlerin yeniden kullanımı için retromer kargo-tanım bileşenini kodlamaktadır (Ferreira ve Massano 2016). VPS35 endozomlar ve vezikül trafiği ile ilişkisi nedeniyle diğer otozomal dominant genlerle de (LRRK2, SNCA) ilişkilidir (Hernandez, Reed ve ark. 2016).

2.2.1.4. UCH-L1(PARK5)

Ubikutin C terminal hidrolaz 1 (UCHL1) geni 23.63 kb olup 7 adet ekzona sahiptir. Kromozom 4p14'deki genin şifrelediği, beyinde en bol bulunan proteinlerden biridir. Ubikutin C terminal hidrolaz 1, ubikutin polimerlerini hidroliz yoluyla monomerik forma geri dönüştürür ve ubikutin/proteozom sisteminde önemli bir rol oynar. Otozomal dominant kalıtım gösteren bir Alman ailesindeki iki kardeşte UCH-L1'deki yanlış anlamlı mutasyon gösterilmiştir (Das, Hoang ve ark. 2006). UCHL-1 geninde bugüne kadar PH ile ilişkili bir nokta mutasyonu (I93M) ve bir de koruyucu polimorfizm (S18Y) tespit edilmiştir (Healy, Abou-Sleiman ve ark. 2004).

2.2.1.5. EIF4G1(PARK18)

2011 yılında Chartier Harlin ve arkadaşları Parkinsonizmin nedeni olarak EIF4G1 (Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 4 gama 1/ Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 Gama 1) mutasyonlarını bildirmişlerdir. GWA çalışmaları sonucu Kuzey Fransa’da yaşayan geç başlangıçlı otozomal dominant PH görülen bir ailede EIF4G1 geni üzerinde iki mutasyon (R1205H ve A502V) bulunmuştur. Bu mutasyonları taşıyan hastaların, klinik tabloları geç başlangıçlı PH’na benzer olup nöropatolojilerinde Lewy cisimcikleri görülmektedir. EIF4G1 geninin PH ile ilişkili varyantları tüm populasyonlardaki Parkinson hastalarının %1’inden azında görülmektedir. EIF4G1 geni tüm vücutta farklı dokularında çok miktarda ifade edilir. EIF4G1 proteini PABP, eIF3, eIF4E ve RNA helikaz eIF4A da dahil olmak üzere birçok translasyon başlatma faktörü ile ve 40S ribozomla etkileşen bir iskele proteini görevi yapmaktadır (Deng, Wu ve ark. 2015).

2.2.1.6. CHCHD2

2015 yılında Japonya’da otozomal dominant PH görülen bir ailede CHCHD2 mutasyonları tespit edilmiştir. İlk olarak bu ailede heterozigot Thr6Ile mutasyonu tanımlanmıştır. Daha sonra ailesel PH görülen 340 Japon ailesinde Thr6Ile mutasyonunun yanı sıra iki yeni mutasyon (Arg145Gln and 300+5G>A) daha bulunmuştur. Ayrıca CHCHD2 geninde iki farklı tek nükleotid polimorfizmi ile (rs10043 ve rs142444896) PH arasında bir ilişki de tanımlanmıştır. CHCHD2 geni bir transkripsiyon faktörü olan CHCHD2 proteinini kodlar. PH patogenezinde CHCHD2 mutasyonlarının rolü tam olarak bilinmemekle birlikte mitokondriyal solunum zincirinin, CHCHD2 ile PH arasında bir bağ oluşturabileceği öne sürülmüştür (Funayama ve Hattori 2015)

2.2.2. Otozomal Resesif Parkinson Hastalığı ile ilişkili genler

2.2.2.1. PARKİN (PARK2)

Parkin geni yaklaşık 1.35Mb’lık ve 12 ekzonu bulunan bir gendir. Parkin genindeki mutasyonlar erken başlangıçlı PH’nın en sık rastlanan nedenidir. Parkin mutasyonları farklı etnik kökenli hastalarda bulunmuştur ve ailesel otozomal resesif juvenil parkinsonizmde (AR-JP) en sık rastlanan mutasyondur.

Parkin mutasyonlarının sıklığının artan yaşla birlikte önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir; 50 yaşından sonra başlayan PH'da çok nadir görülürken 20 yaşından önce başlayan hastalarda ~ 80% oranındadır (Schulte ve Gasser 2011).

Parkin geni 1998'de AR-JP görülen Japon ailelerinin genetik materyallerinden klonlanarak bulunmuştur. Parkin'in iki alleli birden mutant olduğu durumda hastalığın ortaya çıktığı ve dolayısıyla kalıtımının resesif olduğu gösterilmiştir. Bugüne kadar yalnızca PH'nın ailesel formunda değil farklı ırksal kökenlerden olan sporadik PH vakalarında da 100'den fazla farklı parkin mutasyonu bildirilmiştir. Ülkemizde de parkin mutasyonları araştırılmış ve bu mutasyonları taşıyan hastalar bildirilmiştir (Dogu, Johnson ve ark. 2004; Serdaroglu, Hanagasi ve ark. 2005).

Parkin geni esas olarak sinir sisteminde ifade edilir (Shimura, Hattori ve ark. 2000). Parkin proteini sitozolde yer alır ve ubiquitin-proteazom yolağı ile protein yıkılması sürecinde bir E3-ubikutin ligaz olarak fonksiyon görür. Parkin proteininin Parkinson hastalığı patogenezi ile ilişkili olan birçok substratı tanımlanmıştır (Imai, Soda ve ark. 2001). Fizyolojik koşullar altında Parkin'in mitokondriyal onarımda görev aldığı ve fonksiyonu bozulmuş mitokondrilerin otofajisini indükleyebildiği gösterilmiştir (Narendra, Tanaka ve ark. 2009).

2.2.2.2. PINK1 (PARK6)

PINK1 (PTEN indükleyici kinaz 1) mutasyonları ilk olarak 2004 yılında otozomal resesif Parkinson hastalığı görülen Sicilyalı bir ailede tespit edilmiştir. Otozomal resesif Juvenil PH'da Parkinden sonra en çok rastlanan mutasyonlardır. Mutasyon sıklığı coğrafik bölgelere göre % 0-15 arasında değişmektedir. PINK1 mutasyonları Kafkas toplumlarında erken başlangıçlı Parkinson hastalarının %2-4'ünde, Asya toplumlarında ise % 4-9'unda tespit edilmiştir (Schulte ve Gasser 2011).

PINK1, 581 a.a'lık mitokondriyal bir kinazdır. PINK1 hücrel stres durumunda mitokondriyal proteinleri fosforilleyerek mitokondri fonksiyon bozukluğuna karşı koruyucu rol oynar. Hasarlı ve depolarize mitokondri üzerinde bulunan PINK1 proteini mitofajiye yol açar (Kazlauskaitė, Kondapalli ve ark. 2014).

2.2.2.3. DJ-1 (PARK7)

Kromozom 1p36'da yer alan DJ-1 (Daisuke-Junko 1) genindeki mutasyonlar otozomal resesif juvenil parkinsonizmin (AR-JP) sıklıkla görülen nedenlerinden biridir. DJ-1 mutasyonları AR-JP vakalarının %1-2'sinden sorumludur. DJ-1 geninin oksidatif

stres ve mitokondriyal hasara karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir (Bonifati, Rizzu ve ark. 2003).

DJ-1 geni L166P mutasyonu, erken başlangıçlı ailesel PH'da en çok araştırılan mutasyondur ve fonksiyon kaybına neden olur. L166P mutasyonunun DJ-1 dimerizasyonunu engellediği ve farklı oksidatif stres uyarıları altında hücrelerin apoptoza daha duyarlı olmasını sağladığı gösterilmiştir (Li, Yu ve ark. 2013). Ülkemizde de bu mutasyonu taşıyan vakalar bildirilmiştir (Erer, Egeli ve ark. 2016).

DJ-1'in, hücre metabolizmasını ve proliferasyonunu, PINK1 aracılığı ile düzenlediği bulunmuştur (Requejo-Aguilar, Lopez-Fabuel ve ark. 2015). DJ-1 proteini, peptidaz C56 protein ailesine aittir. 189 a.a. büyüklüğünde çok fonksiyonlu ve birçok hastalıkla ilişkilendirilmiş bir proteindir (Abdullah, Basak ve ark. 2015). Nigrostriatal yolda normal dopaminerjik fonksiyonu korumada rol oynadığı bildirilmiştir. DJ-1, anti-oksidan, anti-apoptotik ve anti-inflamatuar yolları düzenleyen evrimsel olarak korunmuş nöroprotektif bir proteindir (Dias, Junn ve ark. 2013). DJ-1 proteini astrositlerde güçlü bir şekilde ifade edilir ve az da olsa sporadik Parkinson hastalarının beyinlerindeki Lewy cisimciklerinde bulunduğu gösterilmiştir (Abdullah, Basak ve ark. 2015)

2.2.2.4. ATP13A2 (PARK9)

ATP13A2 geni 2001 yılında kromozom 1p36'ya haritalanmıştır. ATP13A2 genindeki homozigot ve heterozigot mutasyonların Kufor-Rakeb sendromu olarak adlandırılan PH'nın juvenil başlangıçlı otozomal resesif atipik bir formuna neden olduğu bulunmuştur (Ramirez, Heimbach ve ark. 2006). ATP13A2 geninde homozigot ve heterozigot 10 patojenik mutasyon bulunmuştur (Grunewald, Arns ve ark. 2012)

ATP13A2, 1180 a.a.'lık bir proteini kodlayan, 29 ekzondan oluşan büyük bir gendir. ATP13A2 proteini 10 transmembran bölgeye ve bir ATPaz bölgesine sahip olan lizozomal bir membran proteinidir (Grunewald, Arns ve ark. 2012). Çok fonksiyonlu bir protein olup endozom-lizozom dinamikleri ve metallerin (Mn^{2+} ve Zn^{2+}) neden olduğu sitotoksisteye karşı hücrelerin korunması gibi PH ile ilgili çeşitli yollarda rol oynar. ATP13A2 mutasyonlarının lizozomal fonksiyon bozukluğuna yol açtığı ve aşırı ekspresyonunun ise α -sinüklein toksisitesini önlediği gösterilmiştir (Ramirez, Heimbach ve ark. 2006).

2.2.2.5. PLA2G6 (PARK14)

PLA2G6 geni mutasyonları, otozomal resesif erken başlangıçlı PH ile ilişkilendirilmiştir. PLA2G6 mutasyonlarının beyinde demir birikiminin neden olduğu nörodejenerasyonla ilişkili olduğu bulunmuştur. PLA2G6 mutasyonlarından biri olan p.R747W mutasyonunun mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir. 2015 yılında yapılan bir çalışmada PLA2G6 mutasyonlarına sahip iki hastadan alınan fibroblast kültürleri incelenmiş ve mitokondriyal membran anormalileri ile sitoplazmik ve mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin seviyelerinde artış gözlenmiştir (Kinghorn, Castillo-Quan ve ark. 2015).

PLA2G6 geni, fosfolipaz a2 grup VI adı verilen bir proteini kodlar. 806 a.a'lık bu protein 7 ankrin tekrarı, bir lipaz bölgesi ve bir kalmodulin bağlayıcı bölge içerir. PLA2G6 proteini mitokondride bulunur ve sinyal iletimi, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi çeşitli fonksiyonlara katılır (Kinghorn, Castillo-Quan ve ark. 2015).

2.2.2.6. FBXO7(PARK15)

FBXO7 (F-box protein 7) ilk olarak otozomal resesif juvenil Parkinson hastalığı görülen İranlı bir ailede tespit edilmiştir (Shojaee, Sina et al. 2008). FBXO7 geni mutasyonları otozomal resesif juvenil parkinsonizm de az görülen bir neden olmakla birlikte pek çok populasyonda heterozigot olarak bulunurlar. FBXO7 geninin “p.T22M” mutasyonu, FBXO7 proteininin sitozolde yanlış yerleşimine yol açar (Hernandez, Reed ve ark. 2016).

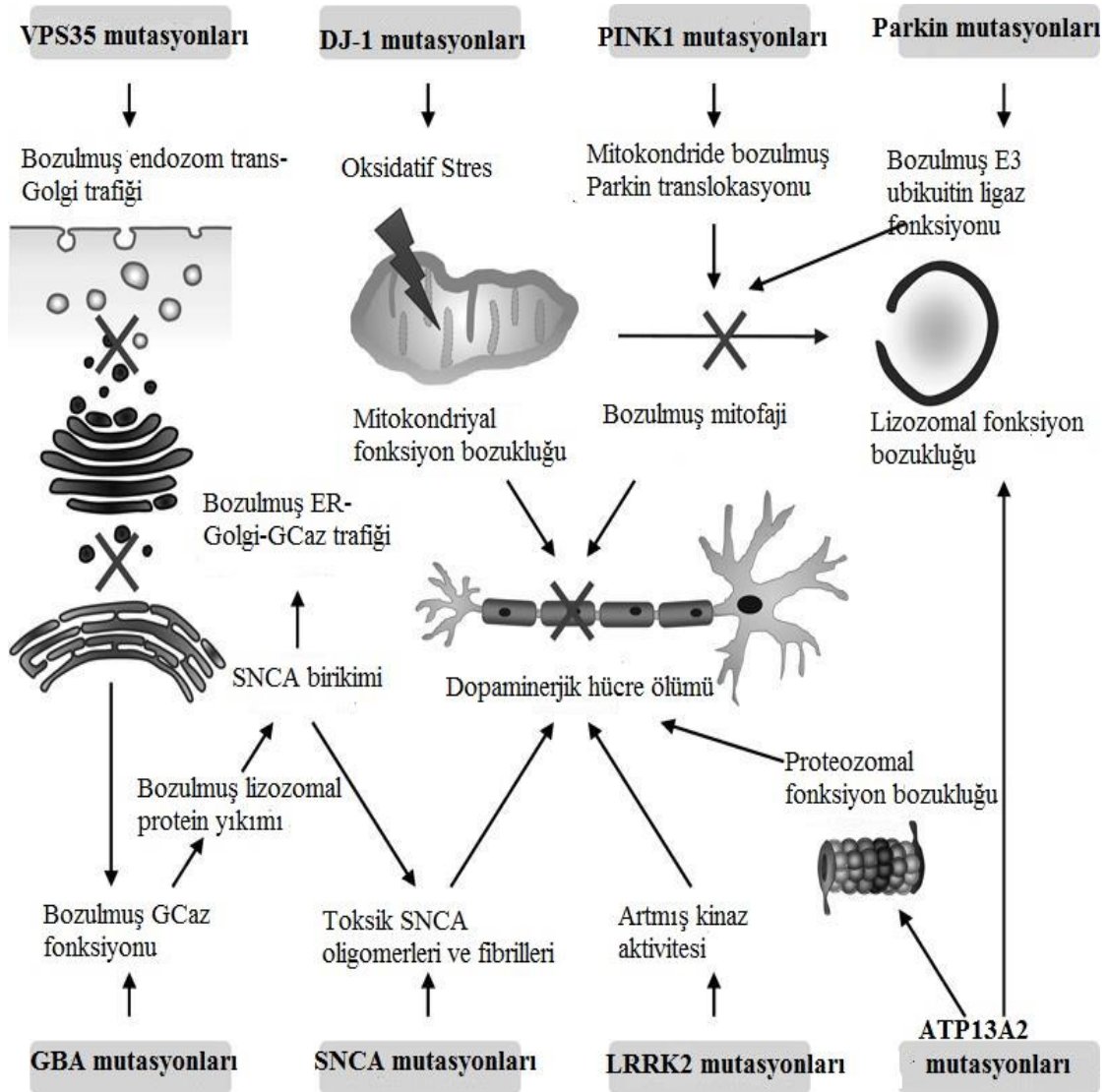
FBXO7 geni, 443 a.a uzunluğundaki F-box protein 7'yi kodlar. Mitokondriyal onarım ve mitofaji süreçlerinde PINK ve Parkin ile etkileşimde bulunduğu gösterilmiştir (Burchell, Nelson ve ark. 2013; Zhou, Xie ve ark. 2015).

2.2.3. GBA (Glukoserebrosidaz)

PH ile ilişkili risk faktörleri arasında yer alan GBA geni, glikolipid metabolizmasında rol oynayan lizozomal bir enzim olan β -glukoserebrosidaz'ı kodlar. Gendeki fonksiyon kaybı mutasyonları, glukoserebrosid birikimine neden olur. GBA mutasyonlarının PH'nın oluşma riskini arttırdığı ve Parkinson hastalarının % 8-14'ünde bulunduğu bildirilmiştir. GBA genindeki heterozigot ve homozigot mutasyonların, parkinsonizm için kalıtsal bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Kumar, Ramirez ve ark. 2013).

2.2.4. MAPT (Mikrotübül ilişkili protein Tau)

PH ile ilişkili bir diğer risk faktörü olan MAPT geni, hücre iskeletinin organizasyonunda ve bütünlüğünde anahtar rol oynayan mikrotübül ilişkili protein Tau'yu kodlar. MAPT geni öncelikle nöronlarda ifade edilir. MAPT geninin Parkinson hastalığı riski bulunmakta olup diğer nörodejeneratif bozukluklarla da ilişkilidir (Schulte ve Gasser 2011). MAPT genindeki çok sayıda mutasyon arasında N279K mutasyonu ve bazı intronik mutasyonların Parkinson hastalığına neden olabileceği gösterilmiştir (Puschmann 2013).



Şekil 2-8: Parkinson hastalığında genetik araştırmaların açığa çıkardığı farklı nöropatolojik yollar

(Kumar, Djarmati-Westenberger ve ark. 2013'dan uyarlanmış.)

2.3. LRRK2 Proteininin Yapısal Özellikleri

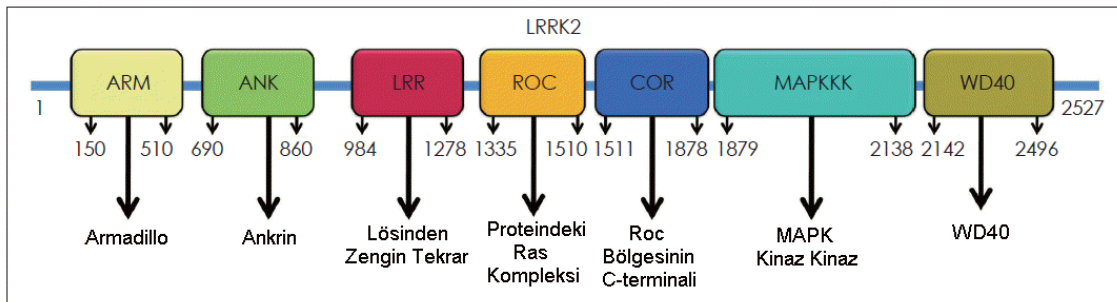
LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2/Lösinden zengin tekrarlar içeren kinaz 2) geni, insanda 12. kromozomda (12q11.2 – q13.1) yer almaktadır. 144 kb uzunluğundadır ve 51 adet ekzona sahiptir. LRRK2 (PARK8=dardarin) geni geç başlangıçlı kalıtsal otozomal dominant PH ile ilişkilendirilmiştir (Paisan-Ruiz, Jain ve ark. 2004).

İlk olarak 2002 yılında Funayama ve arkadaşları tarafından otozomal dominant kalıtımın gözlemlendiği 31 kişilik Japon bir aile üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda PARK8 lokusunun PH ile ilişkisi tespit edilmiştir (Funayama, Hasegawa ve ark. 2002).

Ardından 2004 yılında İspanya'nın Bask bölgesinde ve İngiltere'de bulunan birbirinden bağımsız iki ayrı grubun yaptığı çalışmalar sonucunda PARK8 lokusunda bulunan genin LRRK2 olduğu bulunmuştur (Zimprich, Biskup ve ark. 2004).

LRRK2 geni ROCO protein ailesine ait Ras GTPaz süper ailesinden 2527 aminoasit büyüklüğünde 286 KDa'luk Dardarin isimli bir proteini kodlamaktadır. LRRK2 proteinine Bask dilinde titreme anlamına gelen Dardarin ismi verilmiştir (Lu ve Tan 2008).

Dardarin birbirinden bağımsız ve evrimsel olarak korunmuş 7 fonksiyonel bölgeye sahiptir. Bu bölgeler 200-250 a.a'lık ROC (Ras kompleksi) bölgesi, Ras kompleksinin C terminaline bağlı olarak bulunan 300-400 a.a'lık COR (ROC bölgesinin C terminali) bölgesi, LRR(lösinden zengin tekrar) bölgesi, MAPKK (mitojenle aktiflenen protein kinaz kinaz) bölgesi, ANK (Ankrin) bölgesi, ARM (Armadillo) bölgesi ve WD40 bölgesidir (Şekil 2-7).

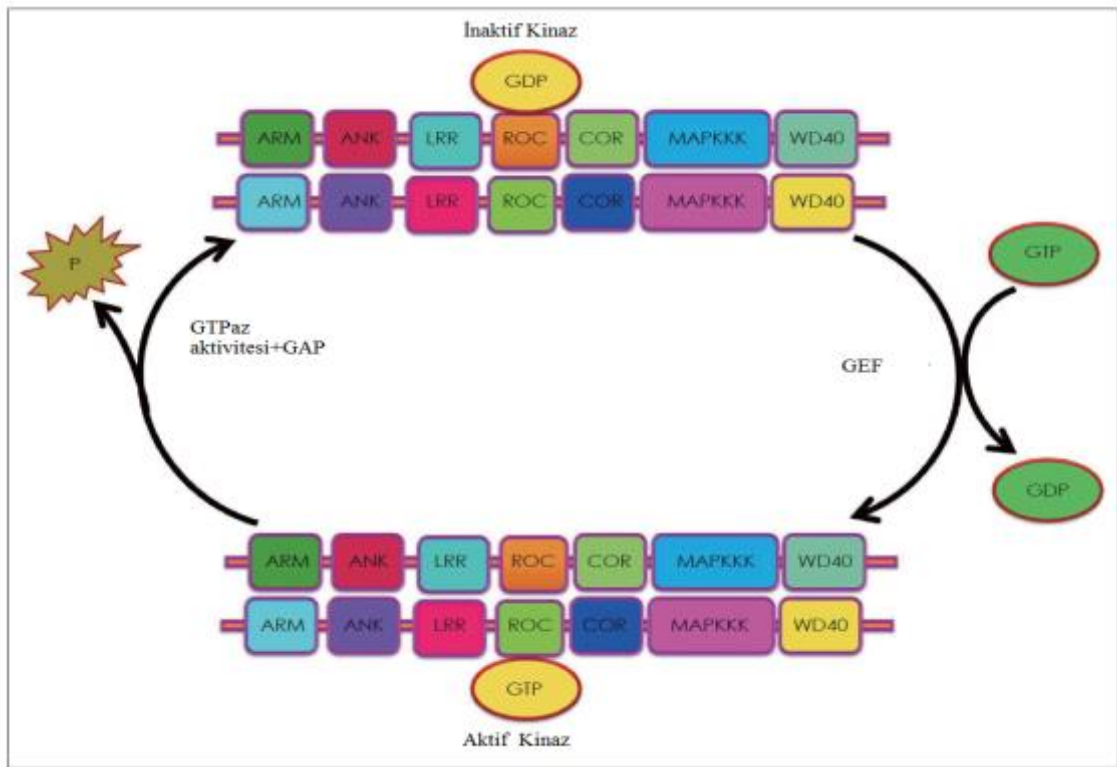


Şekil 2-9: LRRK2 proteininin içerdiği 7 fonksiyonel bölge görülmektedir

(Kumari ve Tan 2010'dan uyarlanmıştır)

ROCO protein ailesi üyelerinin hücre polaritesinin düzenlenmesi, sitokinez, kemotaksis, programlanmış hücre ölümü ve sitoiskeletin düzenlenmesi gibi görevleri bulunmaktadır (Anand ve Braithwaite 2009).

Dimerleşme protein kinazlar arasında yaygın bir olgudur. ROC-COR modülü bir arada fonksiyonlarını yerine getirebilen evrimsel olarak korunmuş bir yapıdır (Marin, van Egmond ve ark. 2008). LRRK2'nin kinaz ve GTPaz olmak üzere iki önemli etkinliği vardır. Kinaz bölgesi fosforilasyonu katalizlerken, ROC-GTPaz bölgesi GTP-GDP hidrolizi ile ilişkilidir (Şekil2-8) (Patra, Parsian ve ark. 2009).



Şekil 2-10: LRRK2'nin kinaz ve GTPaz aktivitesi bulunmaktadır

(Kumari ve Tan 2010'dan uyarlanmış)

COR bölgesi kinaz aktivitesine sahiptir ve iki kısımdan oluşur: ROC bölgesi ile ilişkili olan ve yüksek düzeyde korunmuş bir N-terminal bölgesi ve dimerizasyon fonksiyonuna sahip olan C-terminal bölgesi. PH ile ilişkili olduğu gösterilen Y1699C ve R1638P mutasyonları COR bölgesinde yer almaktadır (Gilsbach ve Kortholt 2014).

MAPKK bölgesi protein kinazların MAPK metabolik yollarında rol oynar. MAPKK (mitojenle aktiflenen protein kinaz kinaz) serin-treonin kinaz aktivitesine sahiptir.

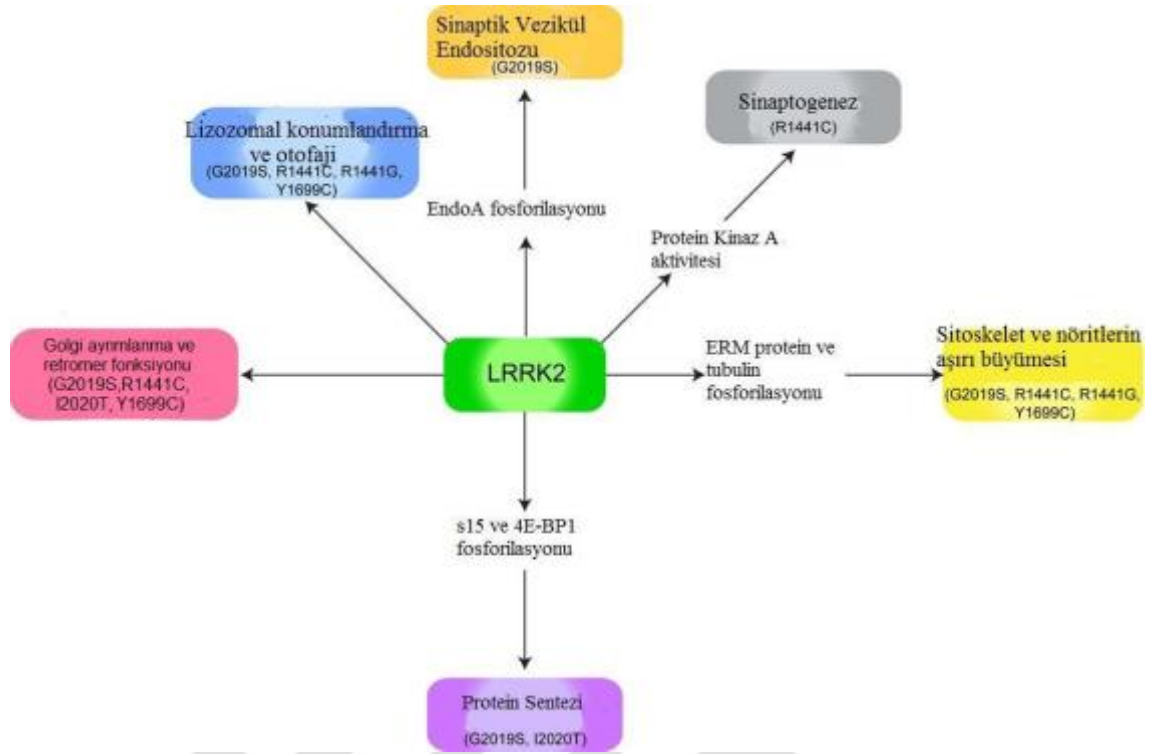
Dimer formunda otofosforilasyon ve fosforilasyon aktivitesi azalmış olarak görülürken mutasyon olduğunda artmış olarak görülür. Artmış kinaz aktivitesinin nöronal ölüm sinyal yolağını aktive ederek Parkinson hastalığı patogenezinin neden olduğu gösterilmiştir. En çok bilinen ve PH'na neden olan G2019S ve I2020T mutasyonları MAPKK bölgesinde bulunmakta ve kinaz aktivitesinin artışına sebep olmaktadır (Lu ve Tan 2008).

Ankrin bölgesi 7 ankrin tipi tekrardan ve 13 lösince zengin tekrardan (LRR) oluşur ve LRRK2'nin N-terminal bölgesine bağlı bulunmaktadır. WD40 bölgesi ise C-terminal tekrarlarından oluşmaktadır. Ankrin, Armadillo ve WD40 bölgeleri protein-protein etkileşiminde rol alır. Armadillo tekrar bölgesi hücre polaritesini sağlayan WNT sinyal yolağı ile ilgilidir (Cardona, Tormos-Perez ve ark. 2014).

LRR bölgesini içeren proteinler hormon-reseptör etkileşimi, enzim inhibisyonu, hücre adezyonu ve vezikül trafiğı, erken memeli gelişimi, nöral gelişim, hücre polaritesi, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, apoptoz ve sitoskelet dinamiklerinin düzenlenmesi gibi birçok önemli biyolojik işleve katılırlar (Kobe ve Deisenhofer 1995).

LRRK2 geni, beyinde (serebral korteks, medulla, serebellum, omurilik, putamen, substantia nigra) yaygın şekilde ifade edilir (Schapira 2006). LRRK2 beyinde nöronların yanı sıra astrositlerde ve mikroglia da ifade edilir. Ayrıca en yüksek seviyede böbreklerde olmak üzere karaciğer, akciğer ve kalp gibi vücudun diğer organlarında da ekspresyonu vardır. LRRK2 proteininin perikaryon sitoplazmasında ve dendritik uzantılar boyunca veziküler ve membranöz yapılarda, mikrotübül ağı, mitokondri ve diğer membranla çevrili organellerde yer aldığı gösterilmiştir (Biskup, Moore ve ark. 2006; Hatano, Kubo ve ark. 2007; Gandhi, Wang ve ark. 2008)

LRRK2'nin nörit uzaması, sitoskelet yapısının korunması, vezikül trafiğı, otofajik protein yıkımı gibi hücresel fonksiyonlarda ve immün sistemde rol oynadığı bildirilmiştir (Rideout ve Stefanis 2014).



Şekil 2-11: Farklı mutasyonların neden olduğu LRRK2 fonksiyon bozuklukları

(https://www.researchgate.net/figure/265968737_fig2_Figure-2-Leucine-rich-repeat-kinase-2-LRRK2-functions-affected-by-pathogenic)

LRRK2'nin Parkinson hastalığı ile ilişkili mutasyonları, nöronal hücre toksisitesi ile ilişkilendirilmiştir. Bazı LRRK2 mutasyonlarının kinaz aktivitesini arttırdığı ve bunun önemli ölçüde apoptotik hücre ölümüyle ilişkili olduğu dopaminerjik hücre dizinlerinde ve primer nöronlarda gösterilmiştir; kinaz fonksiyonunun durdurulması bu hücresel toksisiteyi iyileştirmektedir (Lu ve Tan 2008).

LRRK2 mutasyonlarının α -sinüklein, tau ve ubikuitin patolojisi de dahil olmak üzere pleomorfik patolojiye sahip geç başlangıçlı PH'na yol açtığı keşfedilmiştir. Böylece bu molekül parkinsonizmde en ilgi çekici terapötik hedeflerden biri haline gelmiştir (Taylor, Mata ve ark. 2006). LRRK2 geninin sadece PH için değil diğer nörodegeneratif hastalıklar için de önemli olduğu düşünülmektedir (Zimprich, Biskup ve ark. 2004). Bazı LRRK2 gen mutasyonları (G2019S, R1628P) Alzheimer hastalığı ile de ilişkilendirilmiştir (Zhao, Ho ve ark. 2011; Linnertz, Lutz ve ark. 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Nöroloji Anabilim Dalı tarafından 2015-2016 yılları arasında Minimental test, Saat çizim testi, Set testi ile psikometrik değerlendirmeleri yapılan ayrıca kan sayımı, kan elektrolitleri, T3, T4, TSH, B12, folik asit tayini yapılan ve BBT veya MR'ı tetkikleri yapılarak (UK PH Society Brain Bank kriterlerine göre) klinik teşhisleri konulan 132 Parkinson hastası ve bu hasta grubuyla yaş paralelliği gösteren 133 sağlıklı kontrol dahil edildi. Parkinson hastalarının yaş ortalaması 63.6 ± 10.7 iken, sağlıklı kontrollerin yaş ortalaması 60.7 ± 12.8 idi. Parkinson hastalarının %45,5'i kadın, %54,5'u erkek sağlıklı kontrollerin ise %49,6'sı kadın, %50,4'ü erkekti.

132 Parkinson hastası ve bu hasta grubuyla yaş paralelliği gösteren 133 sağlıklı kontrolden alınan venöz kan örnekleri kullanıldı. Kandan DNA izolasyonunu takiben Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) geni polimorfizmleri belirlemek amacıyla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu metodu uygulandı. Periferik kan örneklerinden elde edilen DNA'larda, LRRK2 genine ait rs11176013, rs10878371 ve rs11835105 bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile saptandı.

Ayrıca hasta grubuna dahil olan 87 sporadik Parkinson hastası ve 55 sağlıklı bireyin periferik kanından RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri ile LRRK2 geni ekspresyon düzeyleri belirlenerek LRRK2 genotipleri ile ilişkisi araştırıldı. LRRK2 genine ait belirlediğimiz 3 genotipin (rs11176013, rs10878371, rs11835105) hastalığın klinik verileriyle ilişkisi araştırıldı.

Hastalığın klinik özelliklerinin değerlendirilmesi 6 klinik veriye dayandırılarak yapıldı. 1-Başlangıç semptomları (TD=Tremor Dominant, AR=Akinetik Rijit veya AR+TD=Akinetik Rijit+Tremor Dominant), 2- Hastalık evresi (1'den 5'e kadar, Hoehn Yahr evrelemesi), 3- Hareketlerde donma semptomunun varlığı, 4- Düşme semptomunun varlığı, 5- Hastalığın semptomlarının gidişatı (TT= tremor dominant semptomu ile başlayan hastalığın tremor dominant semptomları ile devam etmesi, TB=Tremor dominant semptomu ile başlayan hastalığın bradikinezi semptomları ile devam etmesi, BB=bradikinezi dominant semptomu ile başlayan hastalığın bradikinezi

dominant semptomları ile devam etmesi), 6-Hastalığın süresi (<7 yıl veya ≥ 7 yıl olarak) (Hoehn ve Yahr 1998).

Hareketlerde donma ve düşme hastalığın ilerlemiş evreleri ile ilişkilidir. Tremor nispeten iyi huylu gidişat ile ilgili bir semptomdur. Tremor dominant Parkinson hastaları akinetik-rijit dominant Parkinson hastalarından daha yavaş ilerlemektedir. Evre 3 hastalığın ilerlemesinde önemli bir dönüm noktasıdır.

Düşme ile ilişkili postural instabilite ve hastanın bağımlı hale gelmesinin 3. evrede ortaya çıkması nedeniyle daha ağır vakaları tanımlamak için hastalık evresi ≥ 3 olarak değerlendirilmektedir oysa < 3 daha hafif vakalar olarak tanımlanmaktadır. Hastalığın seyri oldukça değişken olmakla birlikte, 3.evredeki ortalama süre yaklaşık 7 yıl olduğundan PH süresi < 7 yıl veya ≥ 7 yıl olarak değerlendirilmektedir.

Bizim hasta grubumuzdaki tüm Parkinson hastaları levodopa eşdeğer günlük dozu (LEDD) olarak hesaplanan dopaminerjik tedavi altındaydı. Hastalığın seyri esnasında dopaminerjik ilaçların dozunun arttırılmasına veya yeni ilaçlar eklenmesine ihtiyaç duyulabileceği için, yüksek dozda LEDD hastalığın ilerleyen aşamalarıyla ilişkili olabilir (Gezen-Ak, Dursun ve ark. 2017)

Hastalar ayrıca, başlangıç yaşına ve aile öyküsüne göre (Nörodejeneratif bozuklukları olan birinci veya ikinci derece yakınları olan hastalar) alt gruplara ayrılarak analiz edildi. Hasta ve sağlıklı kişilerin tüm demografik verileri Tablo 3-1'de verilmiştir.

Tablo 3-1: Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri

Gruplar	n (Kişi Sayısı)	Yaş (ortalama±SD)/ Cinsiyet(k/e)	Başlangıç yaşı/ PHSüresi(ortalama±SD) LEDD dozu (mg)
HASTA GRUPLARI			
TÜM PH (Başlangıç yaşı ve aile öyküsünden bağımsız olarak)	132	63.6±10.7 (yaş aralığı 31-89) (%45,5 k, %54,5 e)	Başlangıç yaş aralığı 7-83/ Süre 5.5±6.2 / LEDD 617.4±362.4
Başlangıç yaşına ve aile öyküsüne göre alt gruplar			
PH sporadik Başlangıç yaşı >50	91	67.7±8.4 (yaş aralığı 51-89) (%45 k, %55 e)	Başlangıç yaş aralığı 50-83 Süre 4.6±3.3/ LEDD 594.2±348.7
PD sporadik Başlangıç yaşı <50	18	49.8±7.2 (yaş aralığı 31-63) (%44,4 k, %55,6 e)	Başlangıç yaş aralığı 28-50 Süre**7.6±5.2/ LEDD 699.8±357.1
PH Aile öyküsü olan	23	58.3±10.1 (yaş aralığı 41-82) (%47,8 k, %52,2 e)	Başlangıç yaş aralığı 7-78 Süre 7.6±12.2 / LEDD 647.6±426.2
KONTROL GRUBU			
Sağlıklı Bireyler Yaşları tüm PH grubuyla eşleştirilmiş*	133	60.7±12.8 (yaş aralığı 24-90) (%49,6 k, %50,4 e)	

*Tüm Parkinson hastaları yaşları bakımından sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.12).

Gruplar cinsiyet açısından eşleştirilmiştir. Tüm Parkinson hastaları cinsiyetleri bakımından sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmış anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.49).

**Başlangıç yaşı 50'nin altında olan sporadik Parkinson hastalarının hastalık süresi başlangıç yaşı 50'den büyük olan sporadik Parkinson hastalarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu (p=0.05) (Mann-Whitney testi). Diğer gruplar arasında hastalık süreleri açısından bir anlamlı bir fark bulunmadı (Kruskal-Wallis testi).

Gruplar arasında LEDD dozu açısından anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Çalışmaya dahil olan tüm bireyler ya da yakınlarından bilgilendirilmiş gönüllülük formu alındı. Çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 83045809/604.01 sayı ve 09.09.2015 tarihli yazısı ile onaylandı. Çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Nörogenetik Laboratuvarı ile Beyin ve Nörodejenaratif Hastalıkları Araştırma laboratuvarlarında yapıldı.

3.1. Kullanılan Malzemeler

QIAamp DNA Mini Kit (51304, QIAGEN, Hilden, Germany)
 Fast Start DNA Master HybProbe (Roche, Mannheim, Germany)
 QIAamp RNA Mini Kit (51304, QIAGEN, Hilden, Germany)
 LightSNiP (TibMolBiol, Berlin, Germany)
 LightCycler® 480 II cihazı (Roche, Mannheim, Germany)
 cDNA sentez kiti (Roche, Mannheim, Germany)
 LightCycler® Nano cihazı (Roche, Mannheim, Germany)
 Santrifüj Cihazı
 Mikropipet
 Spektrofotometre (Picodrop)

3.2. DNA İzolasyonu

Vakumlu steril K3-EDTA'lı tüplere alınan 5 ml periferik kan örnekleri - 20°C'de saklandı ve QIAamp DNA Mini Kit (51304, QIAGEN, Hilden, Germany) izolasyon kiti ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.2.1. DNA İzolasyonu Protokolü

1. 1.5ml'lik temiz bir tüpün dibine 20 µl QIAGEN Protease (Proteinaz K) pipetlendi.
2. 200µl periferik kan örneği bu tüpün içine konuldu.
3. Örneklerin üstüne 200 µl Buffer AL eklendi. 15 sn vorteks yapıldı.
4. Örnekler 56°C'de 10dk inkübe edildi.
5. 1.5ml'lik tüp cidarına yapışmış sıvıları aşağıda toplamak üzere kısa süre santrifüj edildi.

6. Örnekler üzerine 200 µl etanol (%96-100) eklendi ve 15 sn vorteks yapıldı. Vorteksten sonra tüpün cidarına yapışmış sıvıları aşağıda toplamak üzere kısa süre santrifüj edildi.

7. 6. adımda elde edilen karışım 2 ml'lik toplama tüpünün içerisine yerleştirilen QIAamp Mini spin kolonun içine konuldu. Kapak kapatılıp 6000 g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra QIAamp Mini spin kolon temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.

8. QIAamp Mini spin kolonun kapağı dikkatlice açılıp kenarları ısıtılmadan 500 µl Buffer AW1 eklendi. Kapak kapatıldı ve 6000 g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra QIAamp Mini spin kolon temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.

9. QIAamp Mini spin kolonun kapağı dikkatlice açılıp kenarları ısıtılmadan 500 µl Buffer AW2 eklendi. Kapak kapatılıp en yüksek hızda (20.000 x g/14.000 rpm) 3 dakika santrifüj edildi.

10. QIAamp Mini spin kolon temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. En yüksek hızda 1 dakika santrifüj edildi.

11. QIAamp Mini spin kolon temiz bir 1.5 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. QIAamp Mini spin kolonun kapağı dikkatlice açılıp 50-200 µl Buffer AE veya distile su eklendi. Oda sıcaklığında (15-25°C) 1-5 dakika inkübe edildi ve 6000 g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.

3.3. DNA Saflığı ve Miktarının Tespiti

İzolasyon sonucu elde edilen DNA'ların saflık ve miktar tayini spektrofotometrik ölçüm ile yapıldı. DNA'ların 260 ve 280 nm'deki absorbansları okunduktan sonra konsantrasyon ve saflıkları aşağıda belirtilen formüllere göre hesaplandı.

$$\text{DNA konsantrasyonu (mg/ml)} = \text{OD 260 nm} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 50$$

$$\text{DNA saflığı} = \text{OD 260} / \text{OD 280} = 1,8 \pm 0,2$$

3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile LRRK2 genotiplerinin belirlenmesi

LRRK2 genine ait rs11176013, rs10878371 ve rs11835105 bölgelerinde görülen SNP'ler tüm hasta ve kontrollerde Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) yöntemiyle belirlendi. RT-PZR yönteminde; Simple Probe, Fast Start DNA

Master HybProbe (Roche, Mannheim, Germany) ve PZR döngü koşullarını gerçekleştiren LightCycler® Nano (Roche, Mannheim, Germany) cihazı kullanıldı. Simple Probe olarak, LRRK2 geni için LightSNiP (TibMolBiol, Berlin, Germany) kullanıldı.

3.4.1. LRRK2 Genotipleri

LRRK2 geninde çalışılan SNP bölgelerinin kromozom üzerinde bulunduğu konumlar ve alleller Tablo 3-2’de, allel değişim bölgeleri ise Tablo 3-3’de gösterilmiştir.

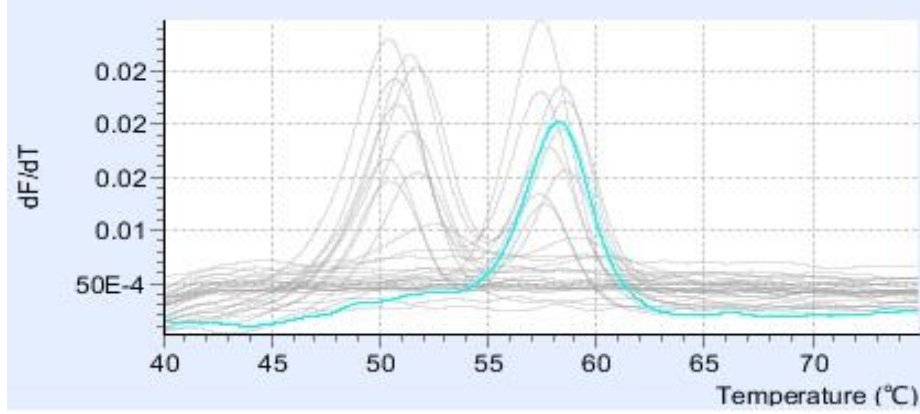
Tablo 3-2: LRRK2 geninde araştırılmış olan polimorfizm bölgelerinin bulunduğu konum ve değişiklik sonucu ortaya çıkan alleller

SNP No’su	Bulunduğu Konum	Değişiklik Gösteren Alleller
rs11176013	Ekzon	A/G
rs10878371	Ekzon	C/T
rs11835105	İntron	G/T

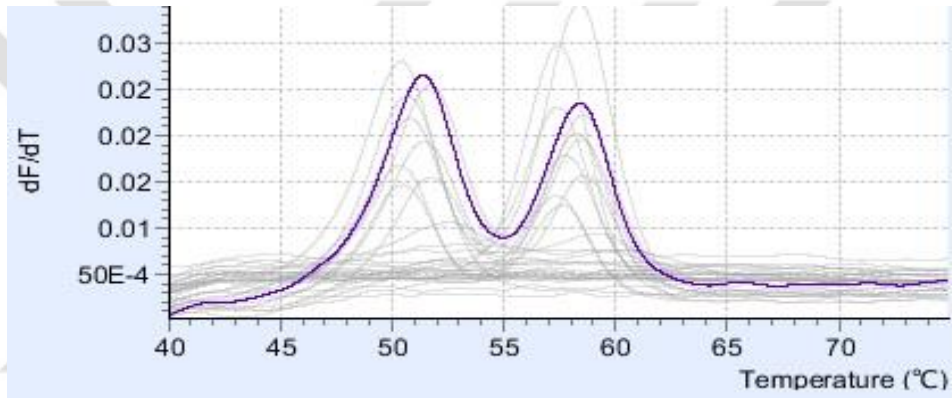
Tablo 3-3: LRRK2 geninin 3 SNP bölgesine ait allel değişimleri

SNP No’su	Allel Değişim Bölgeleri
rs11176013	GAGATGTGGAAAAATTTCTTTCAAA [A/G] AAAAGGAAATTTCCAAAGAACTACA
rs10878371	GGGCATTATATAGTTTTAATGATGG [C/T] GAAGAACATCAAAAAATCTTACTTG
rs11835105	TTCAAAGTTTCCTGTCTTAGATTCA [G/T] CTGACAGTTTTTCTATGGATTGTGA

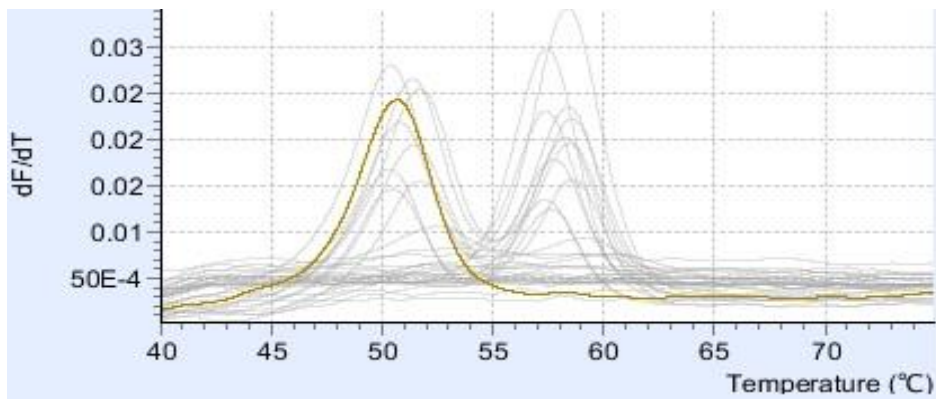
LRRK2 geninin rs11176013, rs10878371 ve rs11835105 bölgelerine özgü prob’larla işaretlenmesi sonucu erime noktaları; rs11176013 bölgesine ait GG genotipi için 58,48°C (Şekil 3-1), AG genotipi için 51,75°C – 58,48°C (Şekil 3-2) ve AA genotipi için 51,75°C (Şekil 3-3), rs10878371 bölgesine ait CC genotipi için 55,02°C (Şekil 3-4), CT genotipi için 55,02°C – 59,97°C (Şekil 3-5) ve TT genotipi için 59,97°C (Şekil 3-6), rs11835105 bölgesine ait TT genotipi için 58,39°C (Şekil 3-7), TG genotipi için 58,39°C– 65,62°C (Şekil 3-8) ve GG genotipi için 65,62°C’dir.



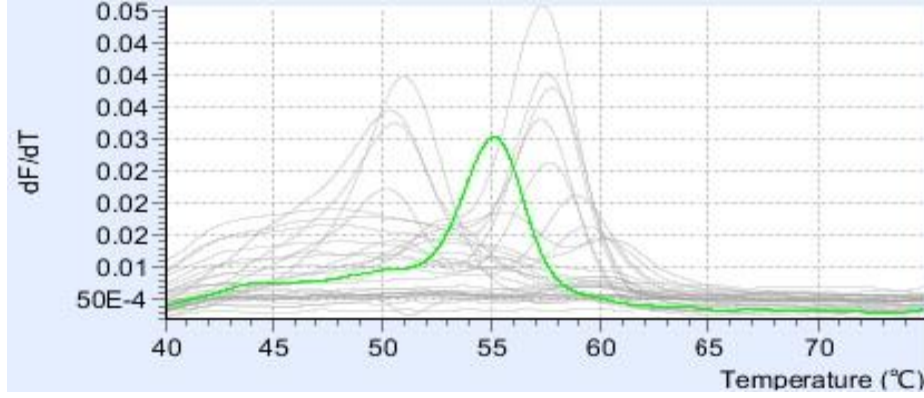
Şekil 3-1: LRRK2 geni rs11176013 bölgesine ait GG genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (58, 48°C) gösteren grafik



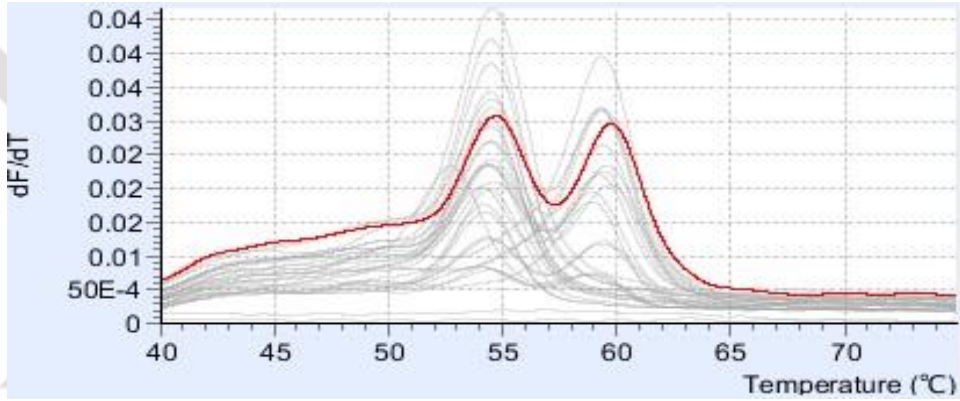
Şekil 3-2: LRRK2 geni rs11176013 bölgesine ait AG genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (51, 75°C ve 58, 48°C) gösteren grafik



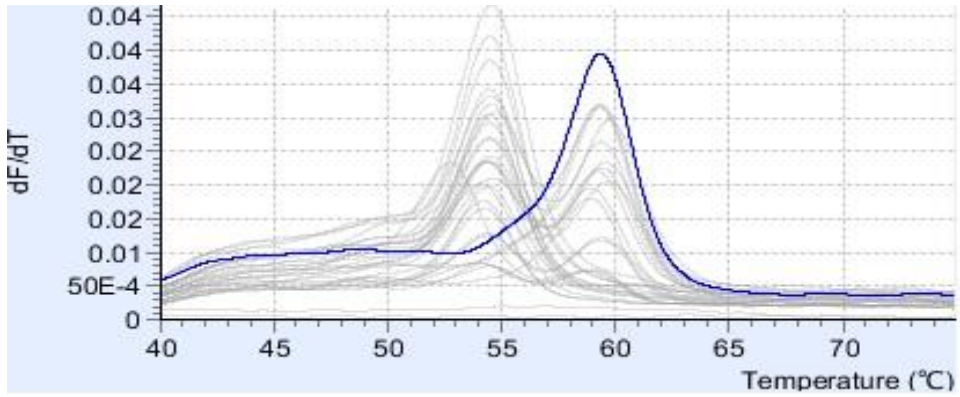
Şekil 3-3: LRRK2 geni rs11176013 bölgesine ait AA genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (51, 75°C) gösteren grafik



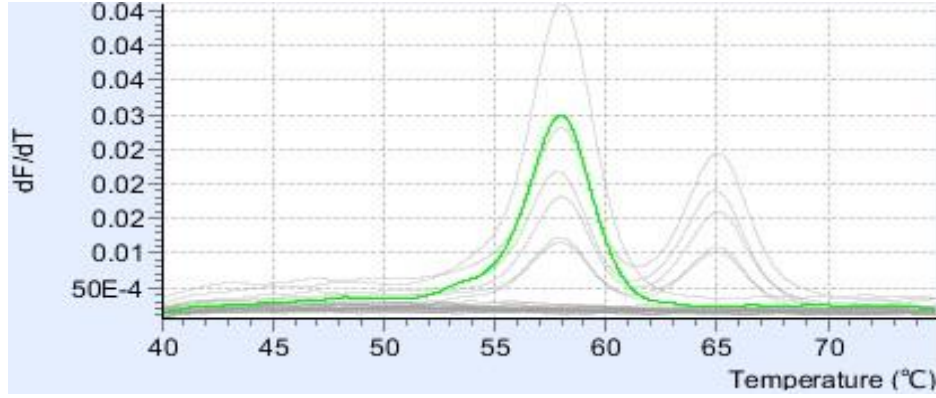
Şekil 3-4: LRRK2 geni rs10878371 bölgesine ait CC genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (55, 02°C) gösteren grafik.



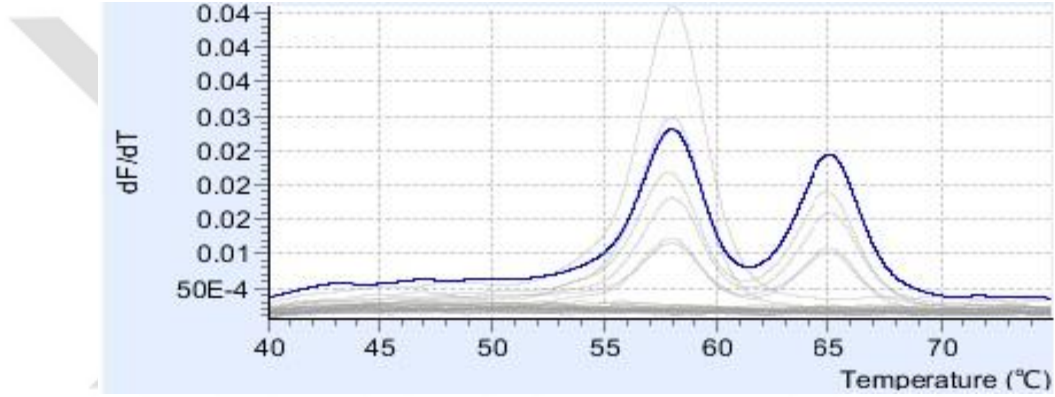
Şekil 3-5: LRRK2 geni rs10878371 bölgesine ait CT genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (55, 02°C ve 59, 97°C) gösteren grafik.



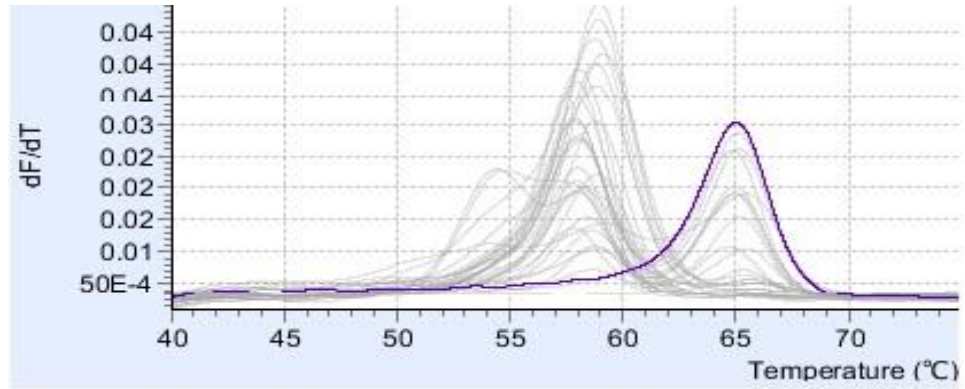
Şekil 3-6: LRRK2 geni rs10878371 bölgesine ait TT genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (59, 97°C) gösteren grafik.



Şekil 3-7: LRRK2 geni rs11835105 bölgesine ait TT genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (58, 39 °C) gösteren grafik.



Şekil 3-8: LRRK2 geni rs11835105 bölgesine ait TG genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (58, 39 °C ve 65, 62 °C) gösteren grafik.



Şekil 3-9: LRRK2 geni rs11835105 bölgesine ait GG genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını (65, 62°C) gösteren grafik.

3.4.2. Deneylerde Kullanılan Simple Prob'ların Hazırlanışı

LRRK2 genine ait genotiplerin tespiti için Simple Prob olarak LightSNiP (TibMolBiol, Berlin, Germany) kullanıldı. LRRK2 geni için kullanılan her bir SimpleProb'u hazırlamak üzere aşağıdaki işlemler takip edildi.

1. Liyofilize primer ve prob karışımını içeren tüpler açılmadan önce kısabir süre santifüjlenerek sarı bir çökelti elde edildi.
2. Tüplerin içerisine 100 µl dH₂O eklendi.
3. Kısa bir süre vorteks ile karıştırıldıktan sonra santrifüjlenerek tüm sıvı tüpün dibinde toplandı.

3.4.3. RT-PZR Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanması

RT-PZR reaksiyon karışımlarını hazırlamak üzere aşağıdaki işlemler takip edildi.

1. Tüm solüsyonlar, içeriklerinin tamamı karışına kadar çözündürüldü ve kısa bir süre santifüjlendikten sonra mikropipet yardımıyla karıştırılıp buz üzerine alındı.
2. Primer ve prob karışımları hazırlandı.
3. Buz üzerindeki 1.5 ml tüpe reaksiyon karışımları Tablo 3-4'te gösterildiği gibi konuldu. Karışım mikropipet yardımıyla karıştırıldıktan sonra kısa bir süre santrifüjlenerek tüm sıvı tüpün dibinde toplandı.
4. 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 15 µl reaksiyon karışımı konuldu. Üzerine 5 µl kalıp DNA eklendi.
5. 96 kuyulu plakanın yüzeyi kaplama folyosuyla kaplandı.
6. 96 kuyulu plaka uygun rotora sahip santrifüjde kısa bir süre santrifüj edildi ve LightCycler 480 II cihazına yüklendi.

Tablo 3-4: LRRK2 geni için kullanılan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşeni	Hacim
dH ₂ O	6.2 µl
Primer Prob Karışımı	1.6 µl
FastStart DNA Master*	4.0 µl
MgCl ₂ (25 nM)	1.2 µl
MgCl ₂ son konsantrasyonu 3 nM	15 µl
*LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostic)	

3.4.4. RT-PZR Döngü Programı

LightCycler 480 II cihazında yapılan RT-PZR'nun döngü programı LRRK2 geni için Tablo 3-5'de gösterildiği gibi uygulandı.

Tablo 3-5: RT-PZR Döngü Programı

Program Adı:	Denatürasyon	Amplifikasyon			Erime			Soğuma
Analiz Modu	Yok	Kantifikasyon			Erime Eğrisi			Yok
Döngü Sayısı	1	45			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Hedef Sıcaklık (°C)	95	95	60	72	95	40	75	40
Bekleme Süresi (ss:dd:ss)	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Yükselme Oranı (°C/sn)	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0
Yükselme Oranı (°C/sn)	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5
Kazanım Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Yok	Devamlı	Yok

3.5. Haplotip Analizi

Haplotip Analizi, bir genin çeşitli varyantlarının ilgili kromozom üzerinde birlikte kalıtılma olasılığını gösteren bir yöntemdir. Haplotip analizi ile homolog kromozomların mayoz sırasındaki olası parça değişim noktaları (crossing-over bölgeleri) saptanmaktadır. Analiz, polimorfizm olduğu bilinen bölgelerin kromozom üzerinde bulundukları yere göre yapılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan her bir bölgenin kromozom üzerindeki konumu Tablo 3-6'de gösterilmiştir.

Tablo 3-6:LRRK2 genine ait SNP'lerin kromozom üzerindeki konumları

SNP No'su	Kromozom	Kromozom Konumu
rs11176013	12	40713873
rs10878371	12	40322458
rs11835105	12	40758045

3.6. RNA İzolasyonu Protokolü

Qiagen RNA izolasyon kiti protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

1. 1 ml insan kanı ile 5 ml EL tamponu bir tüp içerisine konuldu.
2. Buz üzerinde 10-15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında 4 kez kısa süreyle vortekslenerek karıştırıldı.
3. 400 g'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi ve üst sıvı tamamen atıldı.
4. Çökeltinin üzerine 2 ml EL tamponu eklendi. Kısa bir süre vortekslendi.
5. 400 g'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi ve üst sıvı tamamen atıldı.
6. Çökeltideki lökositlere aşağıdaki Tablo 3-7'ye göre RLT tamponu eklendi. Vorteks ya da pipet ile karıştırıldı.

Tablo 3-7: Lökosit miktarına göre kullanılan RLT Tamponu miktarı

RLT Tamponu (µl)	Kan Miktarı (ml)	Lökosit Miktarı
350	0.5'e kadar	2x10 ⁶ 'ya kadar
600	0.5 – 1.5	2x10 ⁶ – 1x10 ⁷

7. Lizat 2 ml toplama tüpü içerisindeki QIAshredder spin kolon içerisine doğrudan pipetlendi ve homojenize etmek için 2 dakika en yüksek hızda santrifüjlendi. QIAshredder spin kolon atıldı ve homojenize lizat korundu.

8. Homojenize lizata 1 hacim (350 yada 600 µl) etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.

9. Tüm örnek temiz bir 2 ml toplama tüpü içerisindeki QIAamp spin kolona kenarlar ıslatılmadan konuldu. 15 s >8000g (>10000 rpm)'de santrifüj edildi. Toplama tüpü sıvıyla birlikte atıldı.

10. QIAamp spin kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı. Yıkama için QIAamp spin kolona 700 µl RW1 tamponu konuldu ve 15 s >8000g (>10000 rpm)' de santrifüj edildi. Toplama tüpü sıvıyla birlikte atıldı.

11. QIAamp spin kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı. QIAamp spin kolona 500 µl RPE tamponu konuldu ve 15 s >8000g (>10000 rpm)' de santrifüj edildi. Toplama tüpü sıvıyla birlikte atılır.

12. QIAamp spin kolon dikkatlice açıldı ve 500 µl RPE tamponu konuldu, kapak kapatıldı, 3 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi.

13. QIAamp spin kolon, 1, 5 ml'lik bir tüpe aktarıldı ve doğrudan QIAamp membranı üzerine 40 µl RNaz'dan arındırılmış su konuldu. Ayırıştırmak için 1 dk >8000g (>10000 rpm) 'de santrifüj edildi.

3.6.1. Örneklerin RNA miktarının ve saflığının ölçülmesi

RNA izolasyonunun sonuçları 1'er µl RNA örneği NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific™ Delaware, USA) cihazına yüklenerek ölçüldü. RNA konsantrasyonu 260 nm'deki optik yoğunluğundan, saflığı da 260 nm / 280 nm'deki OD oranından tespit edildi. RNA konsantrasyonu ve saflığı aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\text{RNA konsantrasyonu (ng / µl)} = \text{OD 260 nm} \times \text{seyreltme faktörü} \times 40$$

$$\text{RNA saflığı} = \text{OD 260} / \text{OD 280} = 2$$

3.6.2. Normalizasyon

qRT-PCR’da her bir grup için eşit miktarda (400 ng) total RNA kullanılarak cDNA’ların sentezi yapıldı.

3.6.3. cDNA Sentezi Protokolü

cDNA sentezi, cDNA sentez kiti (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche 04 379 012 001. Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, GE) kullanılarak yapıldı.

1. 20 µl’lik kalıp ve primer karışımı PCR tüpü içinde aşağıdaki tabloya göre hazırlandı (Tablo 3-7).

Tablo 3-8: Kullanılan kalıp RNA ve primer karışımının içeriği

	Hacim	Final Konsantrasyon
Total RNA	400 ng	
Anchored-oligo(dT)18 Primer 50 pmol / ul	1 µl	2.5 uM
Random Hexamer Primer 50 pmol / ul	2 µl	60 uM
dH₂O	Değişken	Toplam hacim 13 µl olacak şekilde

Toplam Hacim: 13 ul

2. Kalıp RNA-primer karışımı aşağıdaki ısı döngüsüyle kararlı hale getirildi.
65 °C 10 dk
+ 4 °C 1 dk
3. Bu işlemten sonra ters transkriptaz (RT) reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3-9: RT reaksiyonunda kullanılan maddelerin konsantrasyonları

	Hacim	Final Konsantrasyon
Transkriptör Ters Transkriptaz Reaksiyon tamponu, 5x konsantrasyon	4 µl	8Mm MgCl ₂
Koruyucu RNaz inhibitörü (40 U/ul)	0.5 µl	20 U
dNTP karışımı, 10 mM	2 µl	1 mM her biri
TranskriptörTers Transkriptaz (20 U/ul)	0.5 µl	10 U
Final hacim:	20 µl	

4. Tüpün içine konan reaksiyon karışımı dikkatlice karıştırıldı ve santrifüjlendi.

5. RT reaksiyonu aşağıda verilen ısı döngüleri kullanılarak gerçekleştirildi:

25 °C 10 dk
50°C 60 dk
85 °C 5 dk
+ 4 °C ∞

6. Reaksiyon sonrası tüpler -20 °C’de saklandı.

3.6.4. cDNA’ların sulandırılması

cDNA’lar qRT-PCR öncesi 3 katı kadar dH₂O ile sulandırıldı.

3.7. Ekspresyon Analizi

cDNA sentezini takiben Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile LRRK2 genine ait mRNA miktarlarındaki değişimler saptandı. Yöntem, Roche LIGHTCYCLER 480 cihazında, UPL Probları ve Lightcycler 480 Probe Master Mix kiti kullanılarak gerçekleştirildi. mRNA miktarlarının doğru şekilde saptanabilmesi için her dokuda ifade edildiği bilinen referans (housekeeping) genler kullanılarak normalizasyon işlemi yapıldı. Reaksiyon 96 kuyulu plakalarda gerçekleştirildi. Her bir cDNA örneği için deneyler 2 kez tekrarlandı.

3.7.1. 2. Normalizasyon

2. Normalizasyon işlemi için, çalışılan her bir hedef genin ekspresyon seviyeleri RPL13A ve HPRT1 olmak üzere 2 farklı referans gen ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.7.2. Deneylerde kullanılan qRT-PCR Primerleri ve UPL Probları

1. Universal Probe Library (UPL) insan RPL13A Gene Assay, UPL Prob #28, 04687604001(Roche Applied Biosystems, California, USA)
2. Universal Probe Library (UPL) insan HPRT1 Gene Assay, UPL Prob #73, 04688961001 (Roche Applied Biosystems, California, USA)
3. Universal Probe Library (UPL) insan LRRK2 Gene Assay, UPL Prob #77, 04689003001 (Roche Applied Biosystems, California, USA)

3.7.3. Deneylerde kullanılan primerlerin sulandırılması

Primerler final konsantrasyonları 5 pmol olacak şekilde hazırlandı.

3.7.3.1. RPL13A ve HPRT1 primerlerinin hazırlanması

20 μ M'lik ileri ve geri primer stoklarından 5 pmol'lük primerler hazırlandı.

25 μ l ileri primer +75 μ l dH ₂ O	5 pmol
25 μ l geri primer +75 μ l dH ₂ O	5 pmol

3.7.3.2. LRRK2 primerlerinin hazırlanması

100 μ M'lik ileri ve geri primer stoklarından 5 pmol'lük primerler hazırlandı.

5 μ l ileri primer +95 μ l dH ₂ O	5 pmol
5 μ l geri primer +95 μ l dH ₂ O	5 pmol

3.7.4. qRT-PCR reaksiyon karışımının hazırlanması

10 μ l'lik standart qRT-PCR reaksiyon karışımını hazırlamak üzere aşağıdaki işlemler takip edildi.

1. Bütün solüsyonlar içeriklerinin tamamı karışımaya kadar çözündürüldü ve santrifüj edildikten sonra açıldı.
2. Mikropipet yardımıyla karıştırıldı buz üzerine alındı. Primerler ve hidroliz problemleri içeren 10x konsantrasyonda solüsyon hazırlandı.
3. Buz üzerindeki 1.5 ml tüpe aşağıdaki gibi hazırlanacak olan 10 µl'lik reaksiyon karışımı konuldu.

LC480 Probe Master Mix (2x konsantrasyon): 5 µl

Probe: 0,1 µl

Primer 1: 0,2 µl

Primer 2: 0,2 µl

PCR dH₂O: 2 µl

cDNA: 2,5 µl

Toplam: 10 µl

4. Karışım mikropipet yardımıyla karıştırıldı. 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 7,5 µl PCR karışımı konuldu. Üzerine 2,5 µl cDNA eklendi.
5. 96 kuyulu plakanın yüzeyi kaplama folyosuyla kaplandı.
6. 96 kuyulu plaka uygun rotora sahip santrifüjde 2 dk 1500g'de santrifüj edildi ve LightCycler 480 cihazına yüklendi.
7. Deney sonucunda elde edilen Ct değerleri ile göreceli ekspresyon seviyeleri belirlendi.
8. Hasta ve kontrollere ait örneklerin mRNA düzeylerinin referans genler (RPL13A ve HPRT1) ile karşılaştırmaları yapılarak istatistiksel analizi gerçekleştirildi.

3.7.4.1. qRT-PCR Sıcaklık Döngüsü

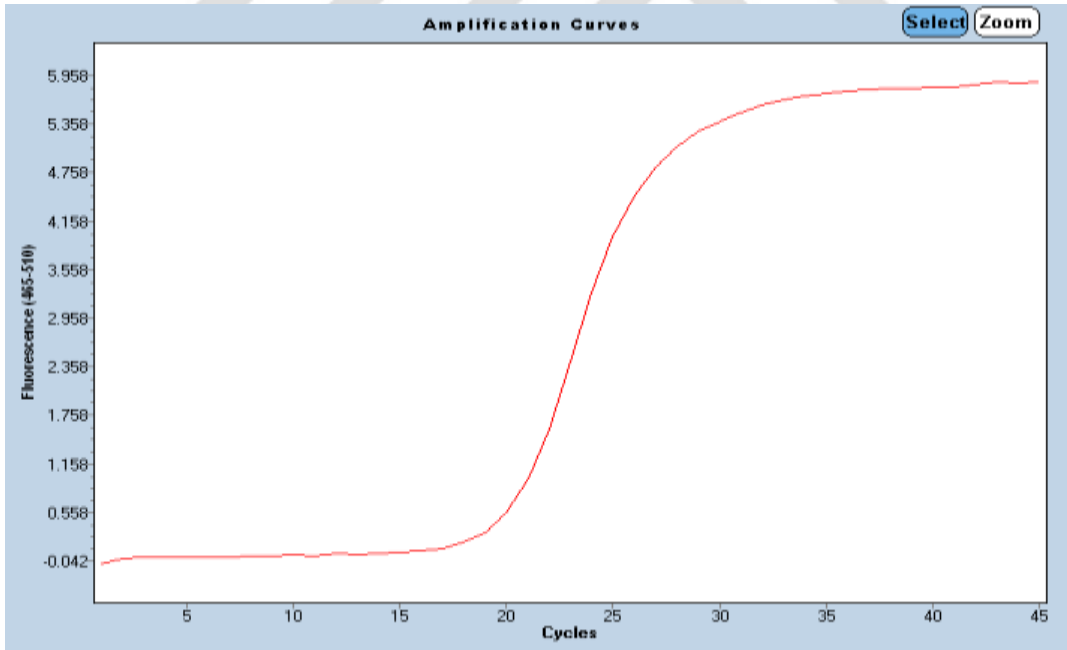
LightCycler 480 cihazında yapılan qRT-PCR'ın sıcaklık döngüsü aşağıdaki tabloda verildiği gibi uygulandı (Tablo 3-13)

Tablo 3-10: qRT-PCR sıcaklık döngüsü

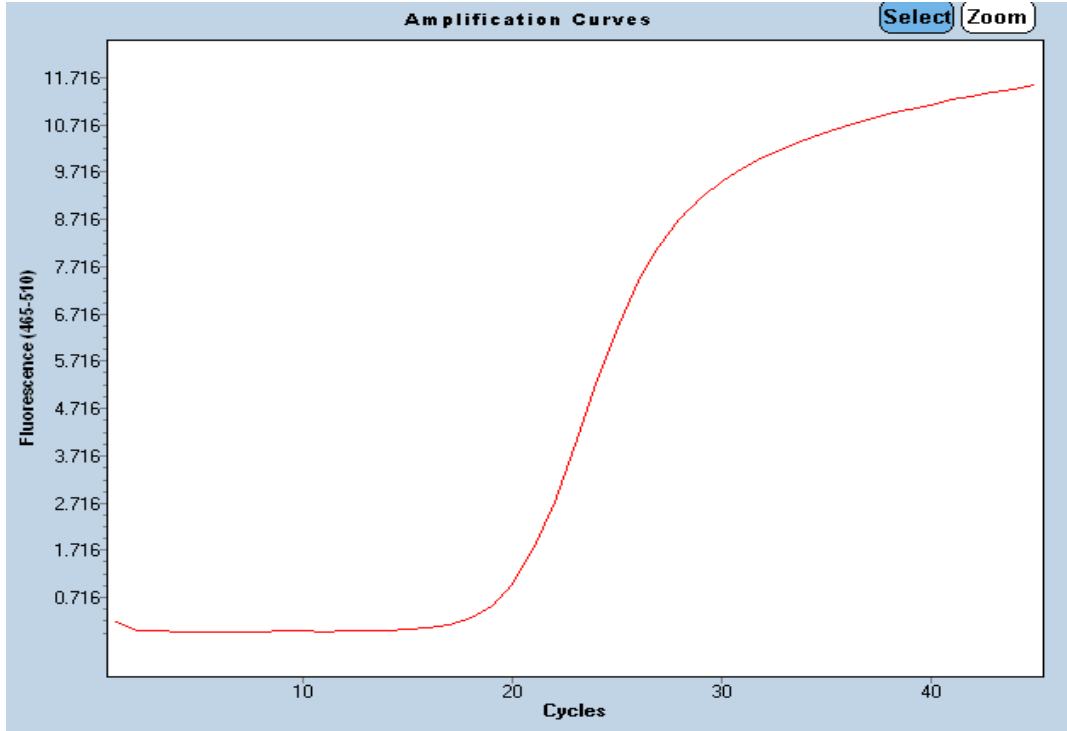
Program İsmi	Döngü sayısı	Analiz tipi
Pre-İnkübasyon*	1	-
Amplifikasyon**	45	
Soğutma***	1	-

Sıcaklıklar (°C)	İnkübasyon	Sıcaklık değişim oranı (°C /sn)
Pre-İnkübasyon		
95 °C	10 dk	4.4
Amplifikasyon		
95 °C	10 sn	4.4
45-60 °C	30 sn	2.2
72 °C	1 sn	4.4
Soğutma		
40 °C	10 sn	1.5

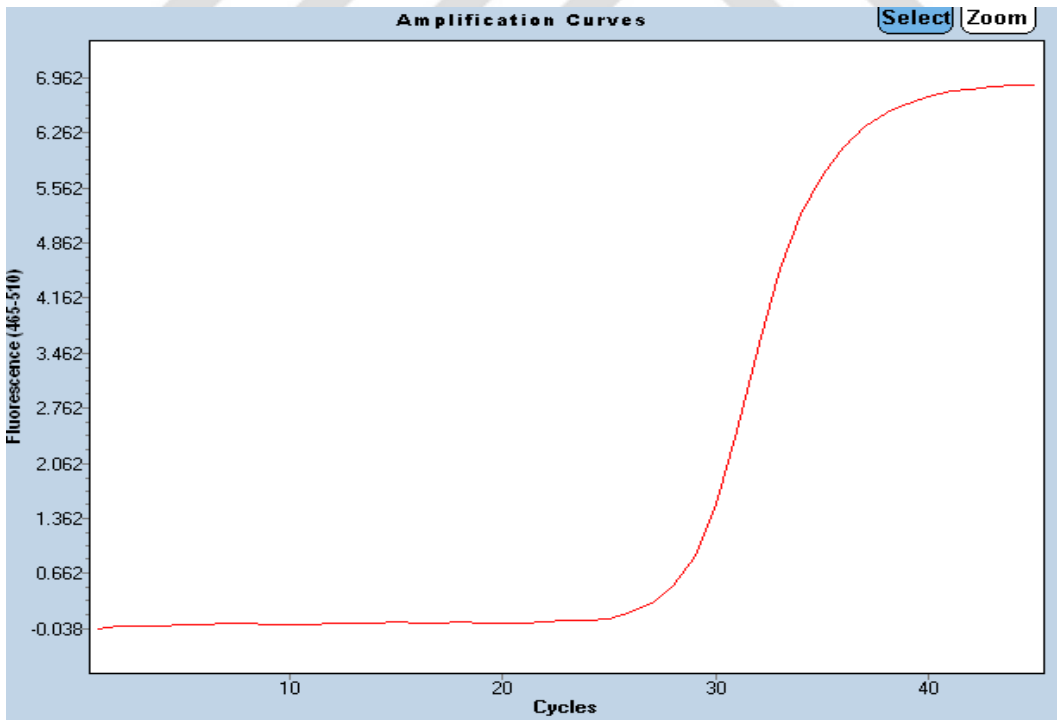
*Pre-inkübasyon: FastStart Taq DNA polimerazı aktif hale getirir ve DNA'yı denature eder **Amplifikasyon: Hedef DNA'yı çoğaltır ***Soğutma: Termal bloğu soğutur.



Şekil 3-10: LRRK2 geni mRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılan amplifikasyon eğrisini gösteren grafik



Şekil 3-11: RPL13A geni mRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılan amplifikasyon eğrisini gösteren grafik



Şekil 3-12: HPRT1 geni mRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılan amplifikasyon eğrisini gösteren grafik

3.8. İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel analizler, SPSS 17.0® istatistik yazılım programı kullanılarak yapıldı. LRRK2 genine ait polimorfizmlerin analizi için kıkare (χ^2) yöntemi kullanıldı. Değerler ortalama standart sapma (SS) olarak verildi. $p < 0,05$ olan değerler anlamlı olarak değerlendirildi. Genotiplere, Hardy Weinberg Eşitliği (HWE) kullanılarak test yapıldı.

Örneklerin qRT-PCR deneylerinden elde edilen Ct değerleri göreceli ekspresyon seviyelerini belirlemek üzere $\Delta Ct = 2$ (Referans Genlerin geometrik ortalaması - Ct hedef Gen) formülüne konuldu. Hesaplamalar ve sonuçlara ait grafikler Microsoft Office Excel programında yapıldı. Örneklerin LRRK2 mRNA seviyelerinin referans genlerin mRNA seviyeleri ile karşılaştırılması, GraphPad InStat DTCG 3.06 (GraphPad Software, Inc.) üzerinde tek yönlü ANOVA yöntemi kullanılarak analiz edildi ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlamına gelmektedir.

4. BULGULAR

Çalışmada 91 geç başlangıçlı sporadik, 18 erken başlangıçlı sporadik, 23 ailesel olmak üzere toplam 132 Parkinson hastasının ve herhangi bir nörodejeneratif hastalığı bulunmayan, yaş bakımından hasta grubuyla uygunluk gösteren 133 sağlıklı bireyin LRRK2 geni rs11176013, rs10878371 ve rs11835105 tek nükleotid polimorfizmleri ile PH arasındaki ilişkiyi araştırdık. Ayrıca 87 Parkinson hastasının ve 55 sağlıklı bireyin LRRK2 mRNA ekspresyon seviyelerini belirleyerek söz konusu LRRK2 polimorfizmleri ile ilişkisini inceledik. Söz konusu polimorfizmlere ait genotiplerin hastalığın klinik verileri ile ilişkisi bulunup bulunmadığını da araştırdık.

4.1. DNA izolasyonu sonuçları

DNA izolasyonu yapılan örneklerin 260nm/280nm dalga boylarındaki OD değerlerinin 1.8 ± 0.1 arasında olduğu, DNA konsantrasyonlarının ise 50-100 ng/μl olduğu saptandı.

4.2. LRRK2 Genotipleme Sonuçları

Tespit edilen genotiplere ait bulgular aşağıda sunulmuştur.

4.2.1. Hasta ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi Genotip ve Allel dağılımları

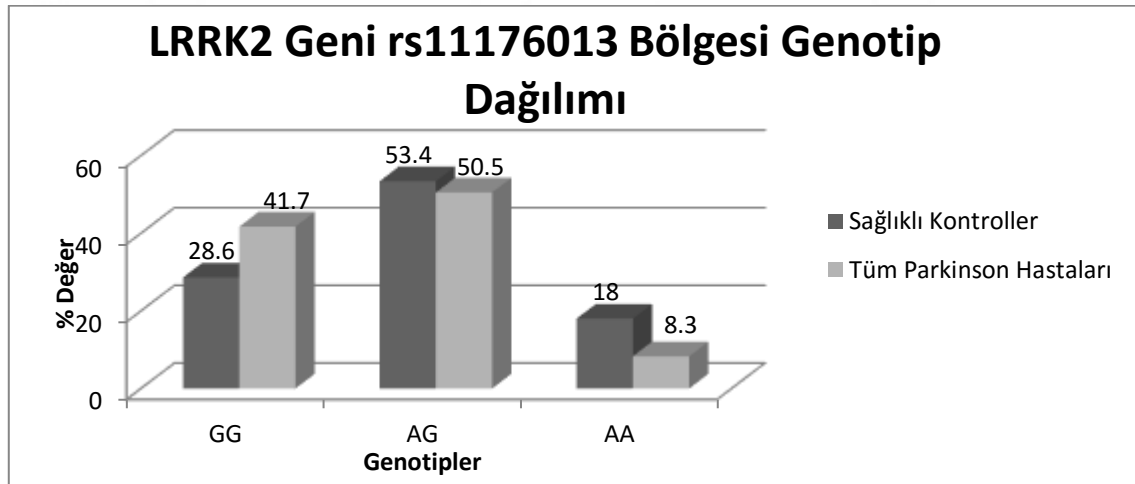
Tüm Parkinson Hastaları

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesine ait genotip dağılımı; 132 hastanın 55'inde GG (%41,7), 66'sinde AG (%50,5) ve 11'inde AA (%8,3) olarak belirlendi. 133 bireyden oluşan kontrol grubunun ise 38'inin GG (%28,6), 71'inin AG (%53,4) ve 24'ünün AA (%18) genotipine sahip olduğu saptandı. GG genotipinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla, AA genotipinde kontrol grubunda hasta grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha sık görüldüğü saptandı (Şekil 4-1) (Tablo 4-1, $p=0.017$).

Tablo 4-1: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesinin genotip dağılımı

Gruplar	rs11176013 Genotipleri, n (%)		
	GG	AG	AA
Sağlıklı Kontroller (n=133)	38(%28,6)	71(%53,4)	24(%18)
Tüm Parkinson Hastaları (n=132)	55(%41,7)*	66(%50,5)	11(%8,3)
Toplam (n=265)	93(%35,1)	137(%51,7)	35(%13,2)

$$\chi^2=8,115, p= 0,017* (* p<0.05)$$



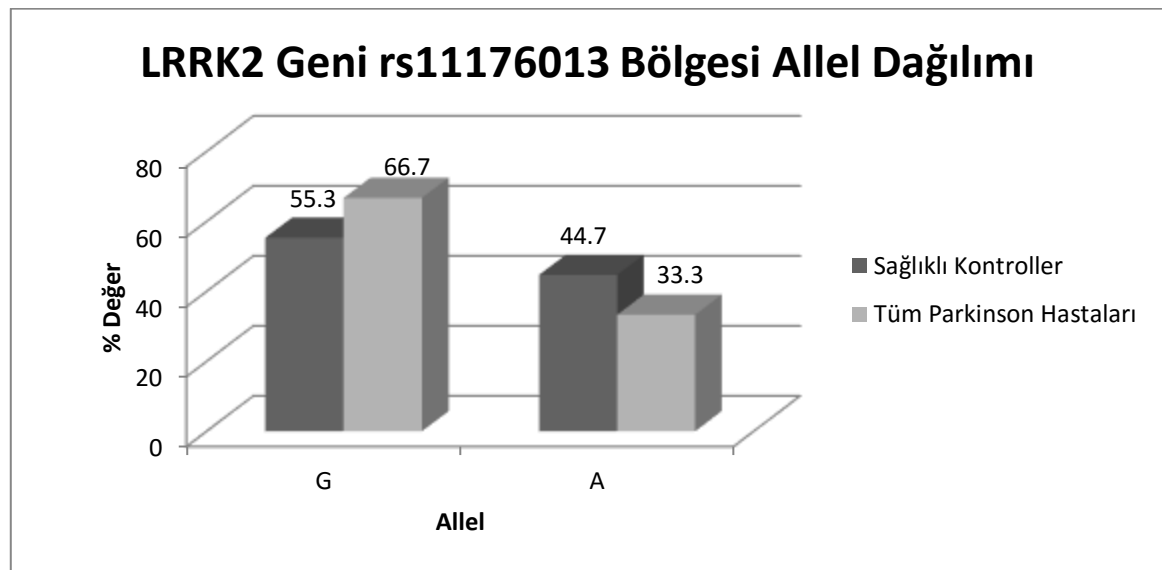
Şekil 4-1: Tüm Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı

rs11176013 için allel sıklığı açısından karşılaştırıldığında, Parkinson hasta grubunda G alleli frekansının %66,7; A alleli frekansının ise %33,3 olduğu; kontrol grubunda ise sırasıyla G allelinin %55,3; A allelinin %44,7 olarak görüldüğü belirlendi. G allelinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla, A allelinin kontrol grubunda hasta grubuna kıyasla istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı şekilde daha sık görüldüğü saptandı (Şekil 4-2) (Tablo 4-2, p=0,007).

Tablo 4-2: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs11176013 Allelleri, n (%)	
	G	A
Sağlıklı Kontroller (n=133)	147(%55,3)	119(%44,7)
Tüm Parkinson Hastaları (n=132)	176(%66,7)**	88(%33,3)

$$\chi^2 = 7,239, p = 0,007^{**} (**p < 0.01)$$



Şekil 4-2: Tüm Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı

Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları

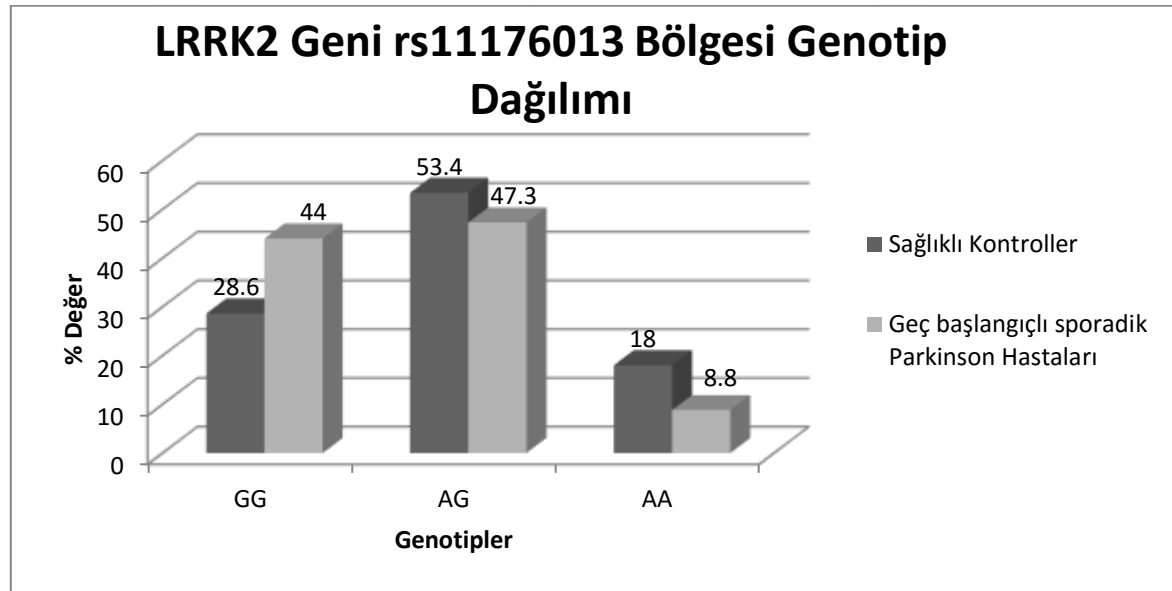
Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesine ait genotip dağılımı; 91 hastanın 40'ında GG (%44,0), 43'ünde AG (%47,3) ve 8'inde AA (%8,8) olarak belirlendi. 133 bireyden oluşan kontrol grubunun ise 38'inin GG (%28,6), 71'inin AG (%53,4) ve 24'ünün AA (%18) genotipine sahip olduğu belirlendi.

GG genotipinin hasta grubunda kontrole grubuna kıyasla, AA genotipinde kontrol grubunda hasta grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha sık görüldüğü saptandı (Şekil 4-3) (Tablo 4-3, p=0.026).

Tablo 4-3: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı

Gruplar	rs11176013 Genotipleri, n (%)		
	GG	AG	AA
Sağlıklı Kontroller (n=133)	38(%28,6)	71(%53,4)	24(%18)
Geç başlangıçlı sporadik Parkinson Hastaları (n=91)	40(%44,0)*	43(%47,3)	8(%8,8)
Toplam (n=224)	78(%34,8)	114(%50,9)	32(%14,3)

$$\chi^2=7,310, p= 0,026* (* p<0.05)$$



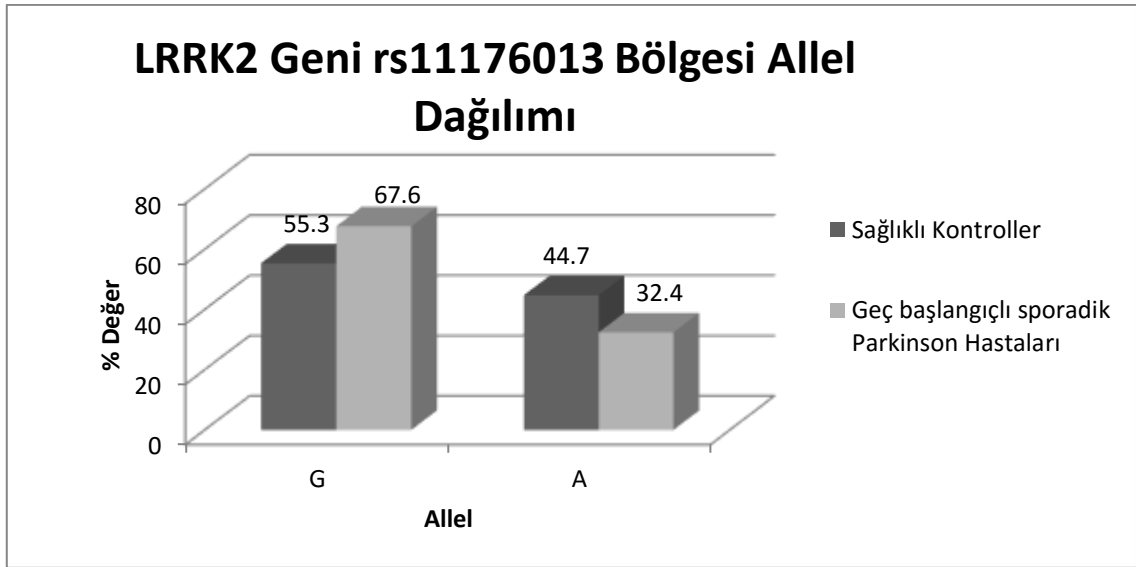
Şekil 4-3: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı

rs11176013 allel sıklığı açısından karşılaştırıldığında, geç başlangıçlı Parkinson hasta grubunda G alleli frekansının %67,6; A alleli frekansının ise %32,4 olduğu; kontrol grubunda ise G allelinin %55,3; A allelinin %44,7 olarak görüldüğü belirlendi. G allelinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla, A allelinin kontrol grubunda hasta grubuna kıyasla istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı şekilde daha sık görüldüğü saptandı (Şekil 4-4) (Tablo 4-4, p=0,009).

Tablo 4-4: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs11176013 Allelleri, n (%)	
	G	A
Sağlıklı Kontroller (n=133)	147(%55,3)	119(%44,7)
Geç başlangıçlı sporadik Parkinson Hastaları (n=91)	270(%67,6)**	178(%32,4)

$$\chi^2 = 6,849, p = 0,009^{**} (**p < 0.01)$$



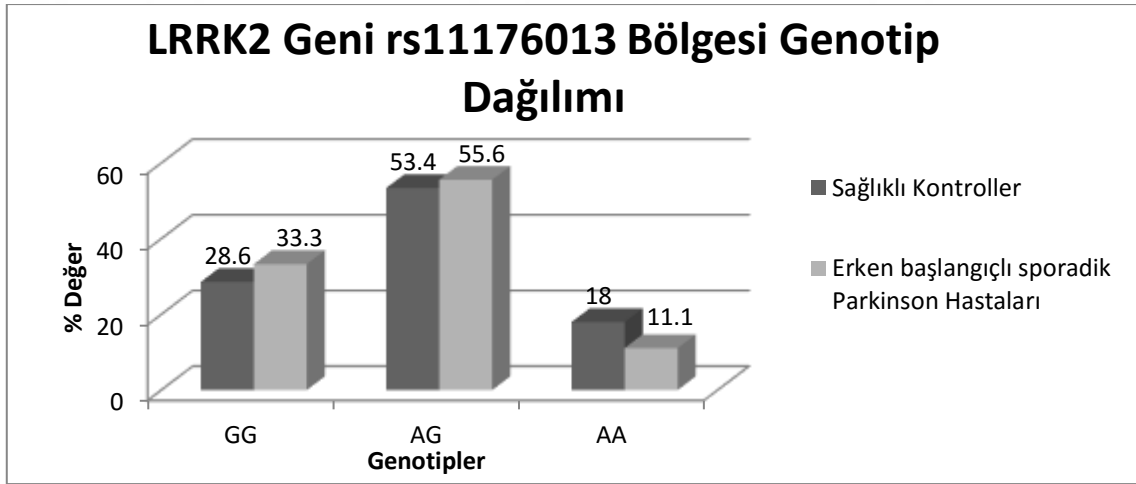
Şekil 4-4: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı

Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları

Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesine ait genotip dağılımı; 18 hastanın 6'sında GG (%33, 3), 10'unda AG (%55,6) ve 2'sinde AA (%11,1) olarak belirlendi. 133 bireyden oluşan kontrol grubunun ise 38'inin GG (%28,6), 71'inin AG (%53,4) ve 24'ünün AA (%18) genotipine sahip olduğu belirlendi (Şekil 4-5) (Tablo 4-5). Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hasta sayısının az olmasından dolayı istatistiksel değerlendirme yapılamadı.

Tablo 4-5: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı

Gruplar	rs11176013 Genotipleri, n (%)		
	GG	AG	AA
Sağlıklı Kontroller (n=133)	38(%28,6)	71(%53,4)	24(%18)
Erken başlangıçlı sporadik Parkinson Hastaları (n=18)	6(%33,3)	10(%55,6)	2(%11,1)
Toplam (n=151)	44(%29,1)	81(%53,6)	26(%17,3)



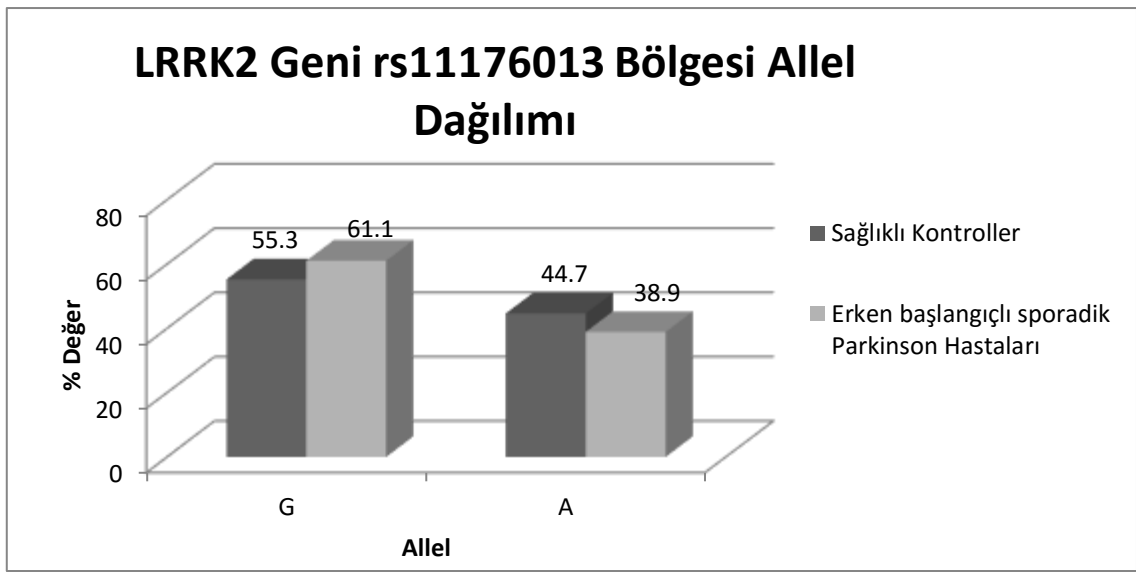
Şekil 4-5: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı

rs11176013 allel sıklığı açısından karşılaştırıldığında, erken başlangıçlı sporadik Parkinson hasta grubunda G alleli frekansının %61,1; A alleli frekansının ise %38,9 olduğu; kontrol grubunda ise G allelinin %55,3; A allelinin %44,7 olarak görüldüğü belirlendi. Hasta ve kontrol grupları allel dağılımları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4-6) (Tablo 4-6, p=0,5).

Tablo 4-6: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs11176013 Allelleri, n (%)	
	G	A
Sağlıklı Kontroller (n=133)	147(%55,3)	119(%44,7)
Erken başlangıçlı sporadik Parkinson Hastaları (n=18)	22(%61,1)	14(%38,9)

$$\chi^2 = 0,440, p = 0,5$$



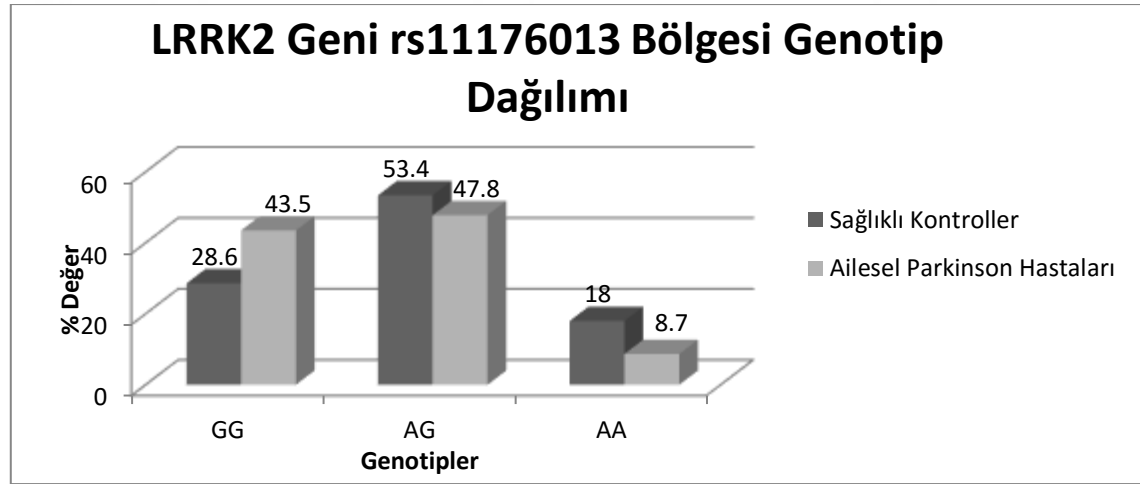
Şekil 4-6: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı

Ailesel Parkinson hastaları

Ailesel Parkinson hastalarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesine ait genotip dağılımı; 23 hastanın 10'unda GG (%43,5), 11'inde AG (%47,8) ve 2'sinde AA (%8,7) olarak belirlendi. 133 bireyden oluşan kontrol grubunun ise 38'inin GG (%28,6), 71'inin AG (%53,4) ve 24'ünün AA (%18) genotipine sahip olduğu belirlendi (Şekil 4-7) (Tablo 4-7). Ailesel Parkinson hasta sayısının az olmasından dolayı istatistiksel değerlendirme yapılamadı.

Tablo 4-7: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı

Gruplar	rs11176013 Genotipleri, n (%)		
	GG	AG	AA
Sağlıklı Kontroller (n=133)	38(%28,6)	71(%53,4)	24(%18)
Ailesel Parkinson Hastaları (n=23)	10(%43,5)	11(%47,8)	2(%8,7)
Toplam (n=156)	48(%30,8)	82(%52,6)	26(%16,6)



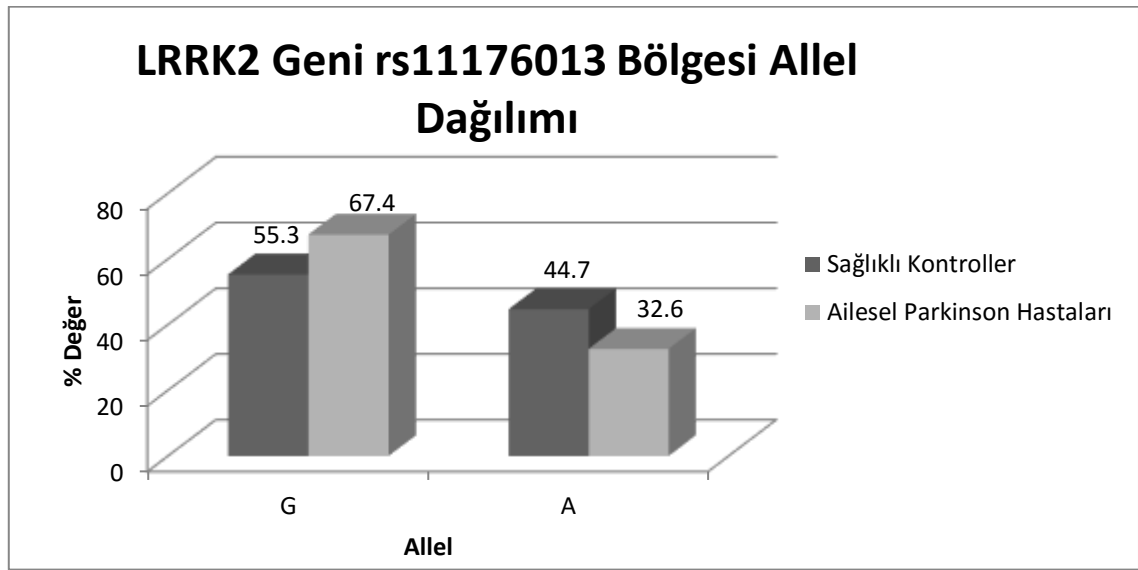
Şekil 4-7: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi genotip dağılımı

rs11176013 allel sıklığı açısından karşılaştırıldığında, Parkinson hasta grubunda G alleli frekansının %67,4; A alleli frekansının ise %32,6 olduğu; kontrol grubunda ise sırasıyla G allelinin %55,3; A allelinin %44,7 olarak görüldüğü belirlendi. Hasta ve kontrol grupları allel dağılımları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4-8) (Tablo 4-8, $p=0,125$).

Tablo 4-8: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs11176013 Allelleri, n (%)	
	G	A
Sağlıklı Kontroller (n=133)	147(%55,3)	119(%44,7)
Ailesel Parkinson Hastaları (n=23)	31(%67,4)	15(%32,6)

$$\chi^2=2,354, p= 0,125$$



Şekil 4-8: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11176013 bölgesi allel dağılımı

4.2.2. Hasta ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi Genotip ve Allel dağılımları

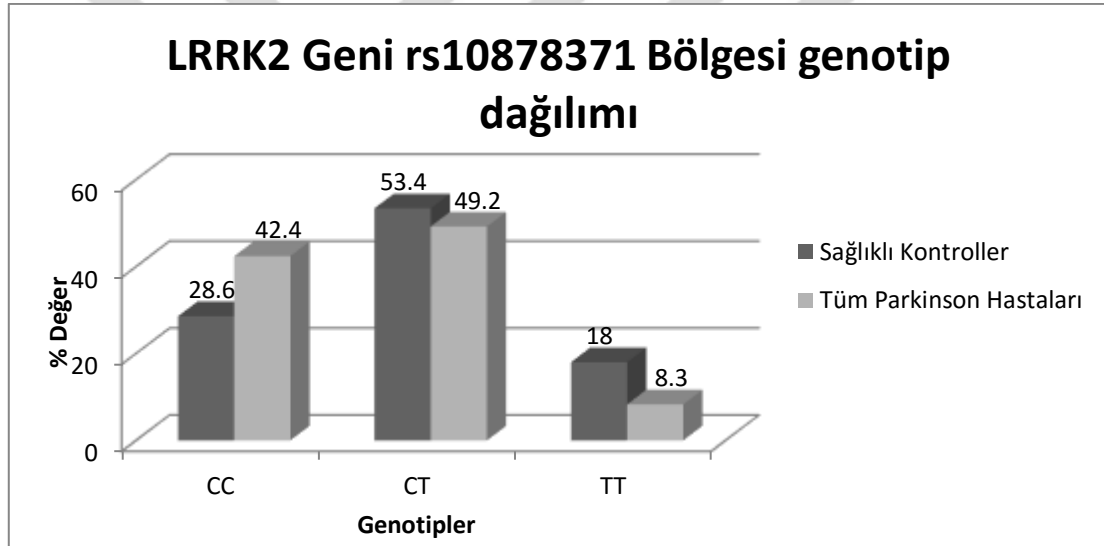
Tüm Parkinson Hastaları

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesine ait genotip dağılımı; 132 hastanın 56'sında CC (%42,4), 65'inde CT (%49,2) ve 11'inde TT (%8,3) olarak belirlendi. 133 bireyden oluşan kontrol grubunun ise 38'inin CC (%28,6), 71'inin CT (%53,4) ve 24'ünün TT (%18) genotipine sahip olduğu belirlendi. CC genotipinin hasta grubunda kontrole grubuna kıyasla, TT genotipinde kontrol grubunda hasta grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha sık görüldüğü tespit edildi (Şekil 4-9) (Tablo 4-9, p=0.014).

Tablo 4-9: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı

Gruplar	rs10878371 Genotipleri, n (%)		
	CC	CT	TT
Sağlıklı Kontroller (n=133)	38(%28,6)	71(%53,4)	24(%18)
Tüm Parkinson Hastaları (n=132)	56(%42,4)*	65(%49,2)	11(%8,3)
Toplam (n=265)	94(%35,5)	136(%51,3)	35(%13,2)

$$\chi^2=8,536, p= 0,014* (* p<0.05)$$



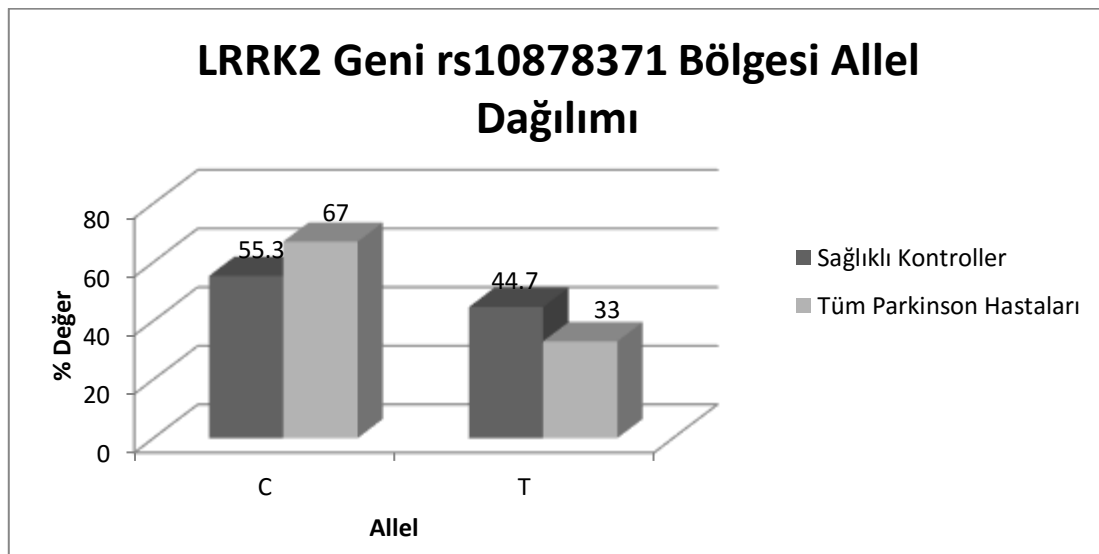
Şekil 4-9: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı

rs10878371 allel sıklığı açısından karşılaştırıldığında, Parkinson hasta grubunda C alleli frekansının %67,0; T alleli frekansının %33,0 olduğu; kontrol grubunda ise C allelinin %55,3; T allelinin %44,7 olarak görüldüğü belirlendi. C allelinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla, T allelinin kontrol grubunda hasta grubuna kıyasla istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı şekilde daha sık görüldüğü saptandı (Şekil 4-10) (Tablo 4-10, p=0,005).

Tablo 4-10: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs10878371 Allelleri, n (%)	
	C	T
Sağlıklı Kontroller (n=133)	147(%55,3)	119(%44,7)
Tüm Parkinson Hastaları (n=132)	177(%67,0)**	87(%33,0)

$$\chi^2 = 7,741, p = 0,005^{**} (**p < 0.01)$$



Şekil 4-10: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı

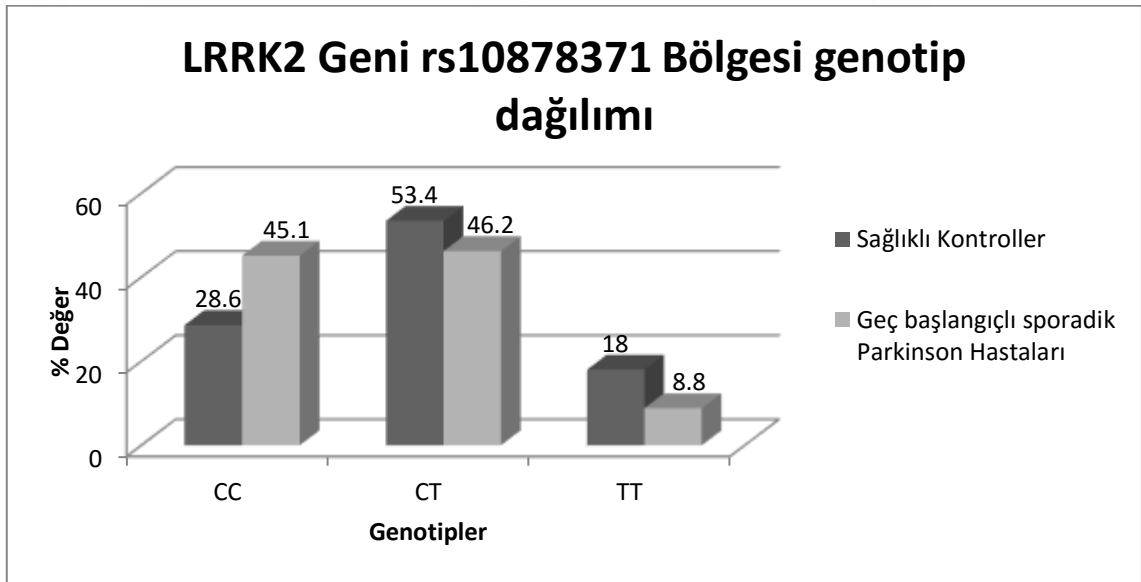
Geç başlangıçlı Sporadik Parkinson hastaları

Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesine ait genotip dağılımı; 91 hastanın 41'inde CC (%45,1), 42'sinde CT (%46,2) ve 8'inde TT (%8,8) olarak belirlendi. 133 bireyden oluşan kontrol grubunun ise 38'inin CC (%28,6), 71'inin CT (%53,4) ve 24'ünün TT (%18) genotipine sahip olduğu belirlendi. CC genotipinin hasta grubunda kontrole grubuna kıyasla, TT genotipinde kontrol grubunda hasta grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha sık görüldüğü tespit edildi (Şekil 4-11) (Tablo 4-11, p=0.019).

Tablo 4-11: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı

Gruplar	rs10878371 Genotipleri, n (%)		
	CC	CT	TT
Sağlıklı Kontroller (n=133)	38(%28,6)	71(%53,4)	24(%18)
Geç başlangıçlı sporadik Parkinson Hastaları (n=91)	41(%45,1)*	42(%46,2)	8(%8,8)
Toplam (n=224)	79(%35,3)	113(%50,4)	32(%14,3)

$$\chi^2=7,961, p= 0,019* \quad (* p<0.05)$$



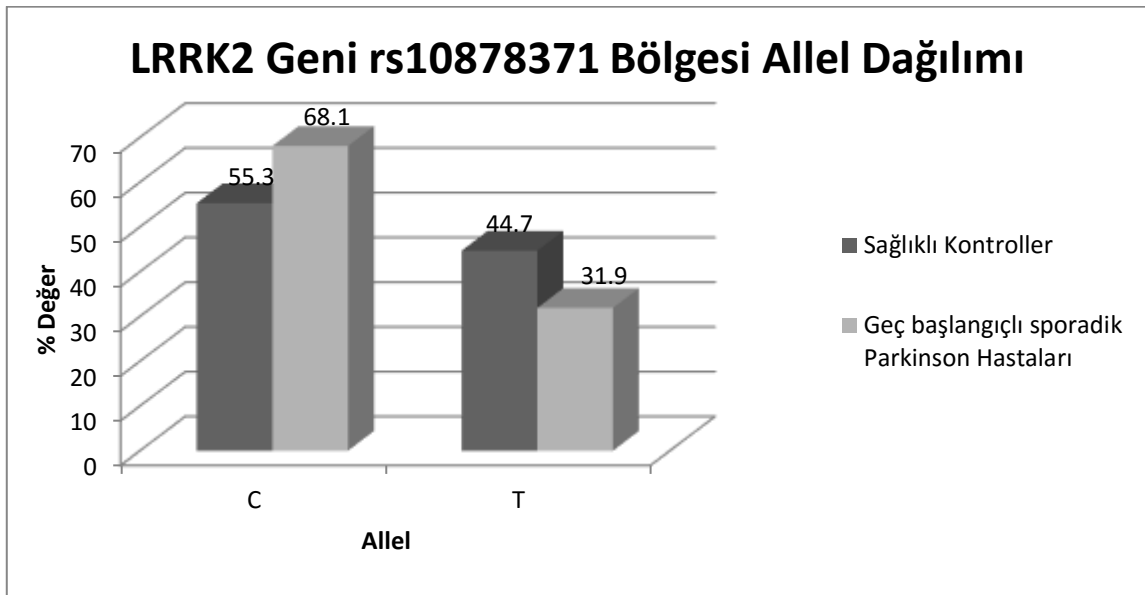
Şekil 4-11: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı

rs10878371 allel sıklığı açısından karşılaştırıldığında, geç başlangıçlı sporadik Parkinson hasta grubunda C alleli frekansının %68,1; T alleli frekansının ise %31,9 olduğu; kontrol grubunda ise sırasıyla C allelinin %55,3; T allelinin %44,7 olarak görüldüğü belirlendi. C allelinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla, T allelinin kontrol grubunda hasta grubuna kıyasla istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı şekilde daha sık görüldüğü saptandı (Şekil 4-12) (Tablo 4-12, p=0,006).

Tablo 4-12: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs10878371 Allelleri, n (%)	
	C	T
Sağlıklı Kontroller (n=133)	147(%55,3)	119(%44,7)
Geç başlangıçlı sporadik Parkinson Hastaları (n=91)	124(%68,1)*	58(%31,9)

$$\chi^2=7,488, p= 0,006^{**} \quad (**p<0.01)$$



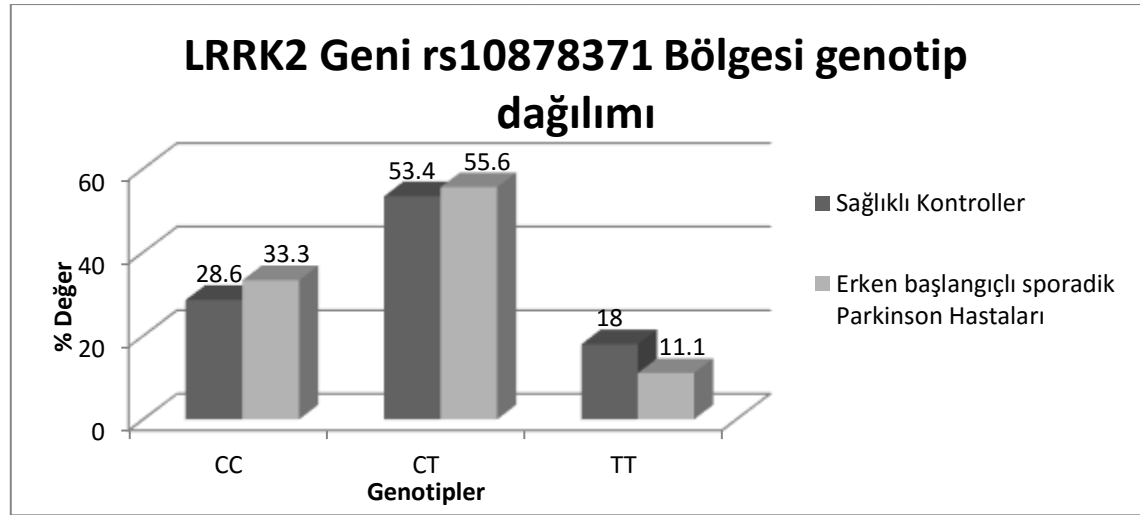
Şekil 4-12: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı

Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları

Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesine ait genotip dağılımı; 18 hastanın 6'sında CC (%33,3), 10'unda CT (%55,6) ve 2'sinde TT (%11,1) olarak belirlendi. 133 bireyden oluşan kontrol grubunun ise 38'i CC (%28,6), 71'i CT (%53,4) ve 24'ü TT (%18) genotipine sahip olduğu belirlendi (Şekil 4-13) (Tablo 4-13). Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hasta sayısının az olmasından dolayı istatistiksel değerlendirme yapılamadı.

Tablo 4-13: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı

Gruplar	rs10878371 Genotipleri, n (%)		
	CC	CT	TT
Sağlıklı Kontroller (n=133)	38(%28,6)	71(%53,4)	24(%18)
Erken başlangıçlı sporadik Parkinson Hastaları (n=18)	6(%33,3)	10(%55,6)	2(%11,1)
Toplam (n=151)	44(%29,1)	81(%53,6)	26(%17,3)



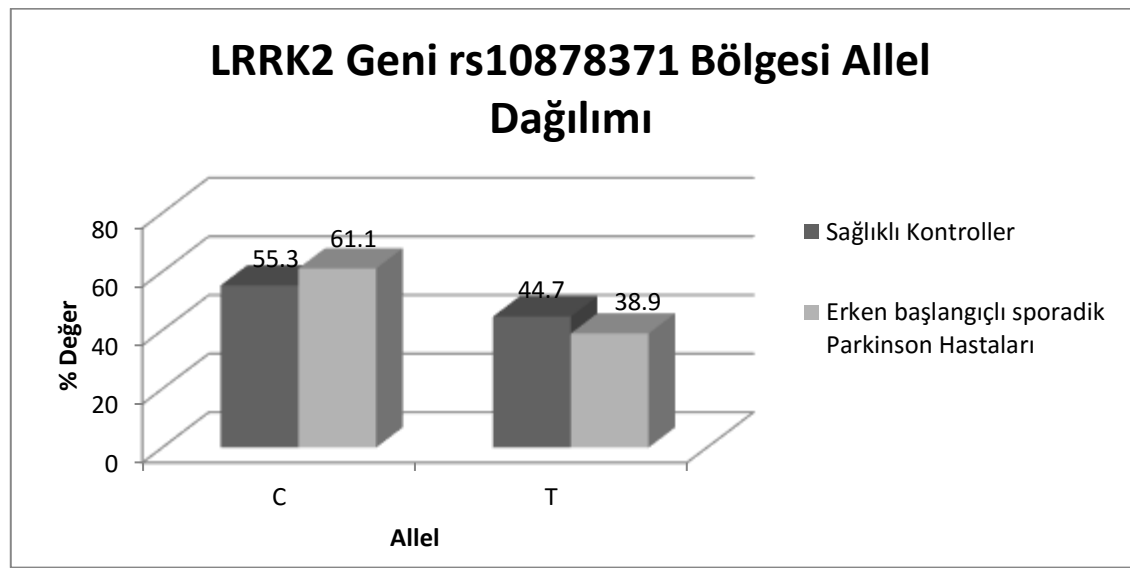
Şekil 4-13: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı

rs10878371 allel sıklığı açısından karşılaştırıldığında, erken başlangıçlı sporadik Parkinson hasta grubunda C alleli frekansının 61,1; T alleli frekansının ise %38,9 olduğu; kontrol grubunda ise C allelinin %55,3; T allelinin %44,7 olarak görüldüğü belirlendi. Hasta ve kontrol grupları allel dağılımları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4-14) (Tablo 4-14, p=0,5).

Tablo 4-14: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs10878371 Allelleri, n (%)	
	C	T
Sağlıklı Kontroller (n=133)	147(%55,3)	119(%44,7)
Erken başlangıçlı sporadik Parkinson Hastaları (n=18)	22(%61,1)	14(%38,9)

$$\chi^2=0,440, p= 0,5$$



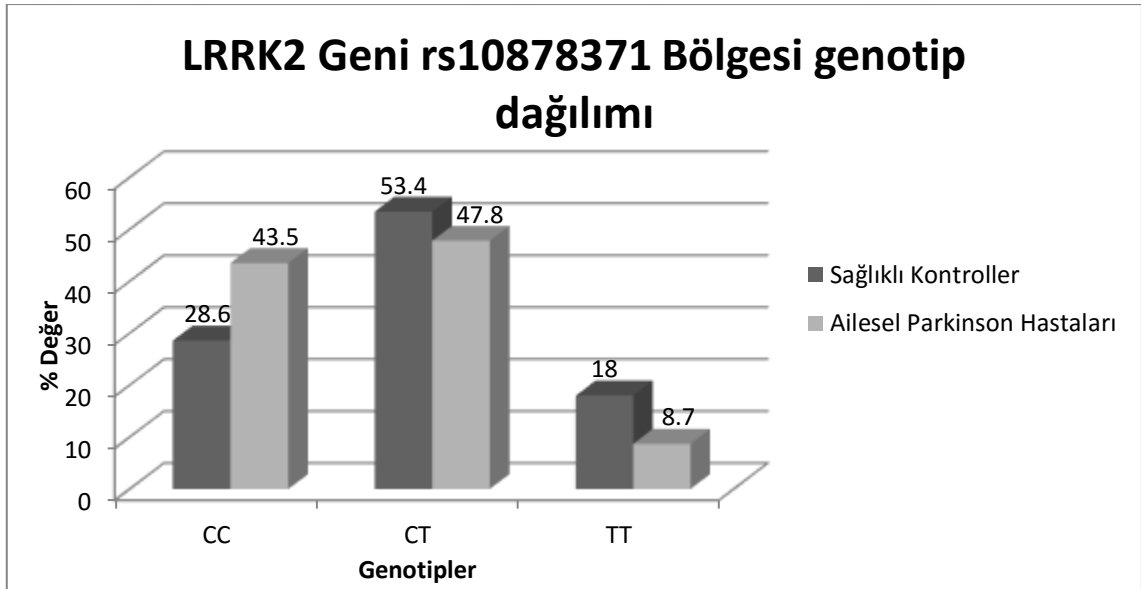
Şekil 4-14: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı

Ailesel Parkinson hastaları

Ailesel Parkinson hastalarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesine ait genotip dağılımı; 23 hastanın 10'unda CC (%43,5), 11'inde CT (%47,8) ve 2'sinde TT (%8,7) olarak belirlendi. 133 bireyden oluşan kontrol grubunun ise 38'i CC (%28,6), 71'i CT (%53,4) ve 24'ü TT (%18) genotipine sahip idi (Şekil 4-15) (Tablo 4-15). Ailesel Parkinson hasta sayısının az olmasından dolayı istatistiksel değerlendirme yapılmadı.

Tablo 4-15: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı

Gruplar	rs10878371 Genotipleri, n (%)		
	CC	CT	TT
Sağlıklı Kontroller (n=133)	38(%28,6)	71(%53,4)	24(%18)
Ailesel Parkinson Hastaları (n=23)	10(%43,5)	11(%47,8)	2(%8,7)
Toplam (n=156)	48(%30,8)	82(%52,6)	26(%16,6)



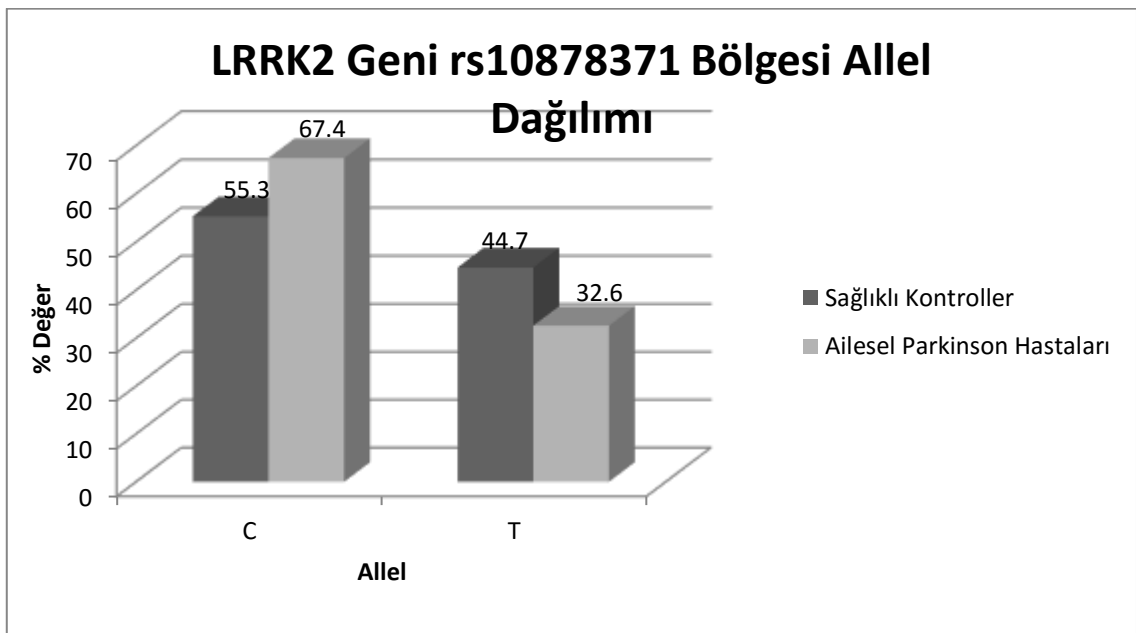
Şekil 4-15: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi genotip dağılımı

rs10878371 için allel sıklığı açısından karşılaştırıldığında, ailesel Parkinson hasta grubunda C alleli frekansının 67,4; T alleli frekansının ise %32,6 olduğu belirlendi. Kontrol grubunda C alleli %55,3; T alleli %44,7 olarak bulundu. Hasta ve kontrol grupları allel dağılımları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4-16) (Tablo 4-16, $p=0,125$).

Tablo 4-16: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs10878371 Allelleri, n (%)	
	C	T
Sağlıklı Kontroller (n=133)	147(%55,3)	119(%44,7)
Ailesel Parkinson Hastaları (n=23)	31(%67,4)	15(%32,6)

$$\chi^2=2,354, p= 0,125$$



Şekil 4-16: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs10878371 bölgesi allel dağılımı

4.2.3. Hasta ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi Genotip ve Allel dağılımları

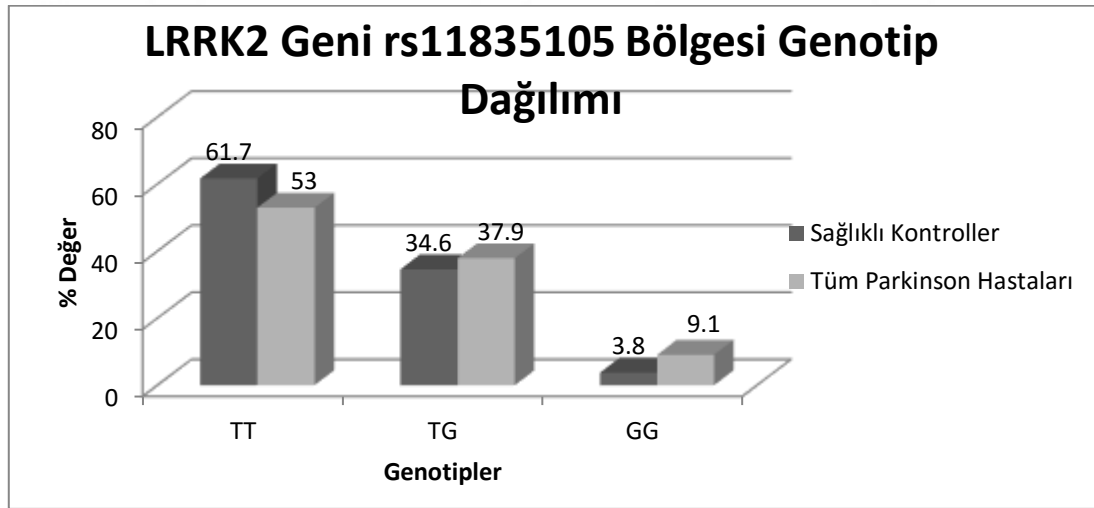
Tüm Parkinson Hastaları

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesine ait genotip dağılımı; 132 hastanın 70'inde TT (%53,0), 50'sinde TG (%37,9) ve 12'sinde GG (%9,1) olarak belirlendi. 133 bireyden oluşan kontrol grubunun ise 82'sinin TT (%61,7), 46'sının TG (%34,6) ve 5'inin GG (%3,8) genotipine sahip olduğu saptandı. Ancak hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları açısından anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4-17) (Tablo 4-17, p=0,136).

Tablo 4-17: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı

Gruplar	rs11835105 Genotipleri, n (%)		
	TT	TG	GG
Sağlıklı Kontroller (n=133)	82(%61,7)	46(%34,6)	5(%3,8)
Tüm Parkinson Hastaları (n=132)	70(%53,0)	50(%37,9)	12(%9,1)
Toplam (n=265)	152(%57,4)	96(%36,2)	17(%6,4)

$$\chi^2 = 3,993, p = 0,136$$



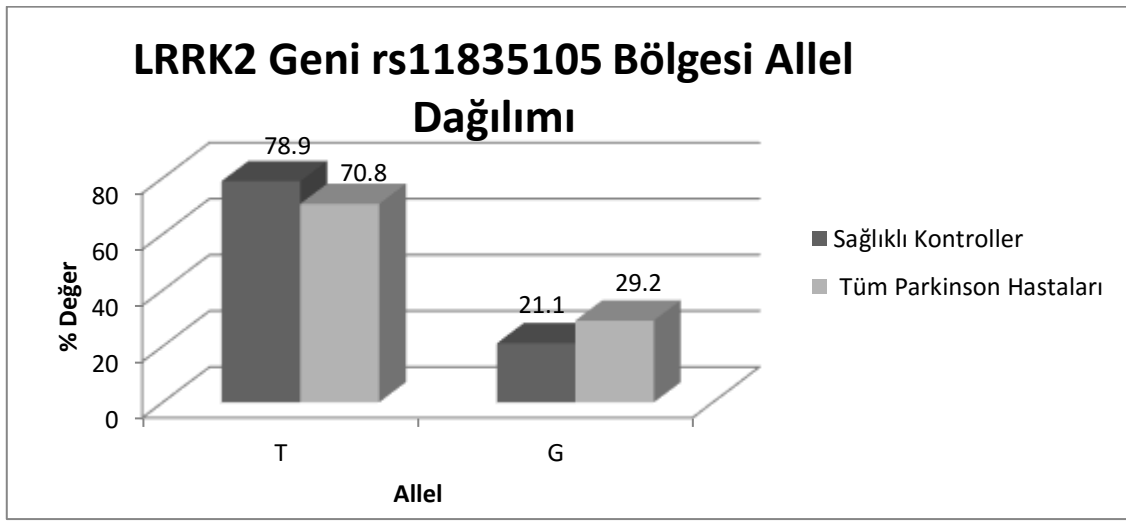
Şekil 4-17: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı

Hasta ve kontrol grupları rs11835105 allel sıklığı açısından karşılaştırıldığında, Parkinson hasta grubunda T alleli frekansının %70,8; G alleli frekansının ise %29,2 olduğu; kontrol grubunda ise sırasıyla T allelinin %78,9; G allelinin %21,1 olarak bulunduğu belirlendi. G allelinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla, T allelinin kontrol grubunda G alleleline kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha sık görüldüğü saptandı (Şekil 4-18) (Tablo 4-18, p=0,031).

Tablo 4-18: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs11835105 Allelleri, n (%)	
	T	G
Sağlıklı Kontroller (n=133)	210(%78,9)	56(%21,1)
Tüm Parkinson Hastaları (n=132)	187 (%70,8)	77 (%29,2)*

$$\chi^2=4,641, p= 0,031* (* p<0.05)$$



Şekil 4-18: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı

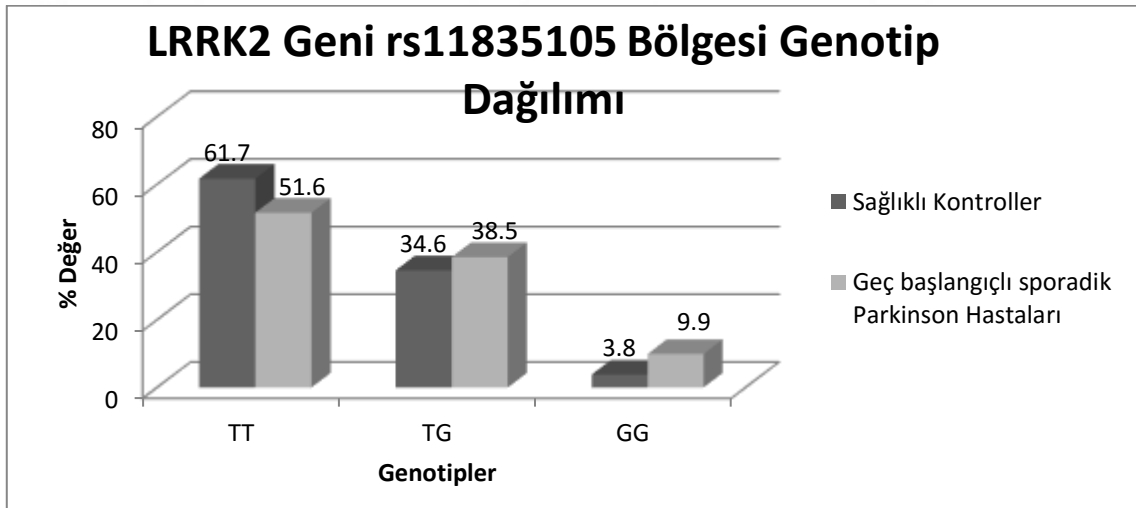
Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları

Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesine ait genotip dağılımı; 91 hastanın 47'si TT (%51,6), 35'i TG (%38,5) ve 9'u GG (%9,9) olarak belirlendi. 133 bireyden oluşan kontrol grubunun ise 82'si TT (%61,7), 46'sı TG (%34,6) ve 5'i GG (%3,8) genotipine sahip olduğu belirlendi. Ancak hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları açısından anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4-19) (Tablo 4-19, p= 0,110).

Tablo 4-19: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı

Gruplar	rs11835105 Genotipleri, n (%)		
	TT	TG	GG
Sağlıklı Kontroller (n=133)	82(%61,7)	46(%34,6)	5(%3,8)
Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları (n=91)	47(%51,6)	35(%38,5)	9(%9,9)
Toplam (n=224)	129(%57,6)	81(%36,2)	14(%6,2)

$$\chi^2=4,413, p= 0,110$$



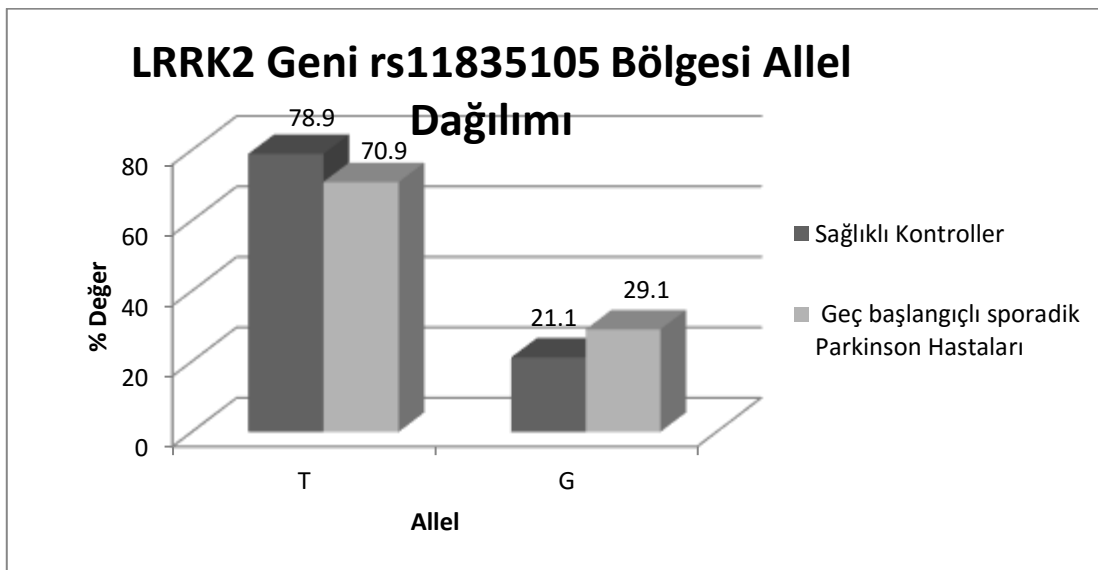
Şekil 4-19: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı

rs11835105 allel sıklığı açısından karşılaştırıldığında, geç başlangıçlı Parkinson hasta grubunda T alleli frekansının %70,9 ; G alleli frekansının ise %29,1 olduğu; kontrol grubunda ise sırasıyla T allelinin %78,9; G allelinin %21,1 olarak görüldüğü belirlendi. G allelinin hasta grubunda kontrole kıyasla T allelinin kontrol grubunda G allele kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha sık görüldüğü saptandı (Şekil 4-20) (Tablo 4-20, p=0,051).

Tablo 4-20: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs11835105 Allelleri, n (%)	
	T	G
Sağlıklı Kontroller (n=133)	210(%78,9)	56(%21,1)
Geç başlangıçlı sporadik Parkinson Hastaları (n=91)	129 (%70,9)*	53 (%29,1)

$$\chi^2=3,821, p= 0,051* (* p\leq 0.05)$$



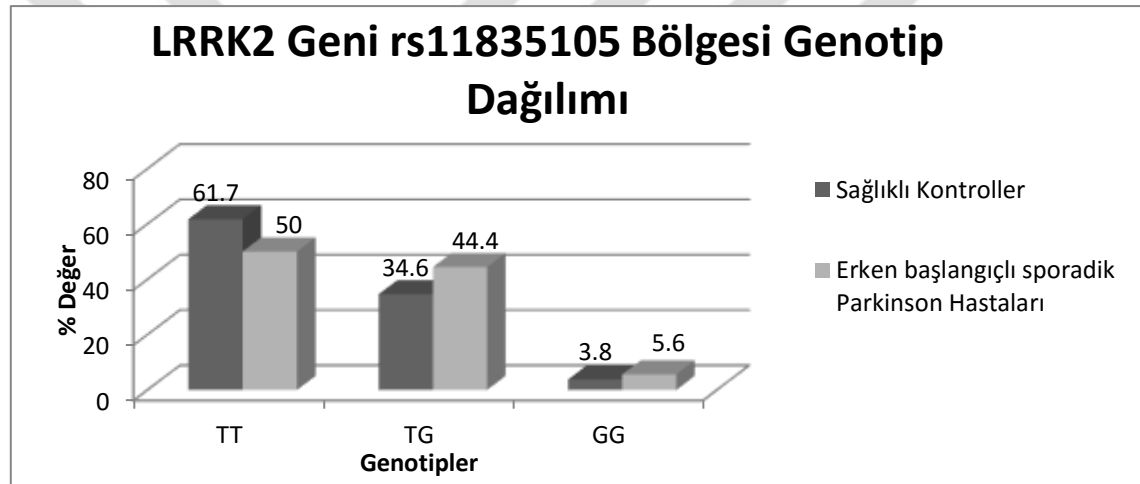
Şekil 4-20: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı

Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları

Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesine ait genotip dağılımı, 18 hastanın 9'u TT (%50,0), 8'i TG (%44,4) ve 1'i GG (%5,6) olarak belirlendi. 133 bireyden oluşan kontrol grubunun ise 82'si TT (%61,7), 46'sı TG (%34,6) ve 5'i GG (%3,8) genotipine sahip idi (Şekil 4-21) (Tablo 4-21). Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hasta sayısının az olmasından dolayı istatistiksel değerlendirme yapılamadı.

Tablo 4-21: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı

Gruplar	rs11835105 Genotipleri, n (%)		
	TT	TG	GG
Sağlıklı Kontroller (n=133)	82(%61,7)	46(%34,6)	5(%3,8)
Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları (n=18)	9(%50,0)	8(%44,4)	1(%5,6)
Toplam (n=151)	91(%60,3)	54(%35,8)	6(%3,9)



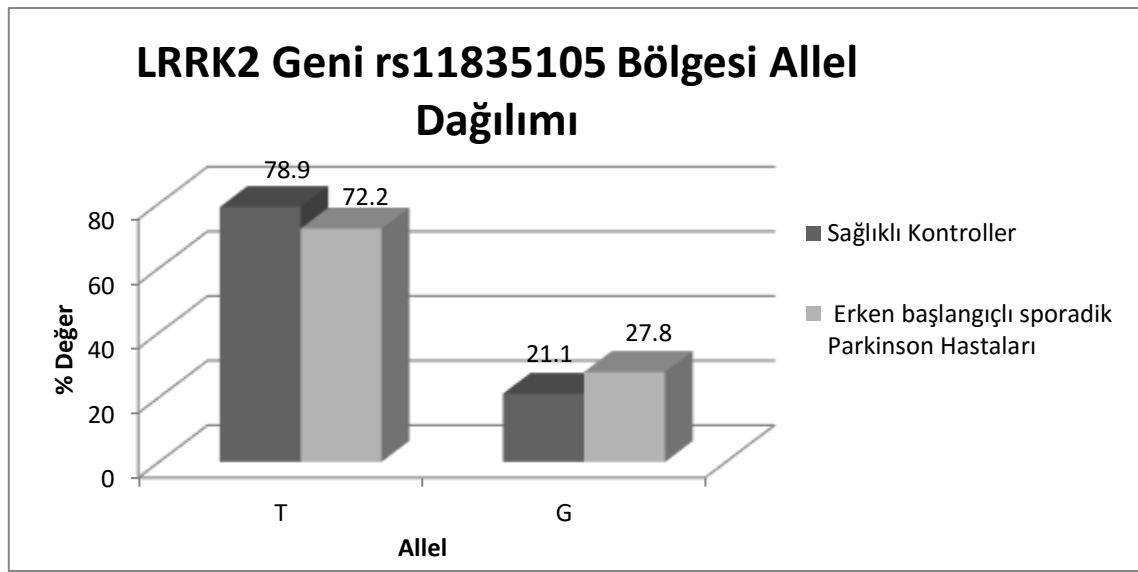
Şekil 4-21: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı

rs11835105 allel sıklığı açısından karşılaştırıldığında, erken başlangıçlı sporadik Parkinson hasta grubunda T alleli frekansının %72,2 ; G alleli frekansının %27,8 olduğu; kontrol grubunda ise sırasıyla T allelinin %78,9; G allelinin %21,1 olduğu belirlendi. Hasta ve kontrol grupları allel dağılımları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4-22) (Tablo 4-22, p=0,359)

Tablo 4-22: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs11835105 Allelleri, n (%)	
	T	G
Sağlıklı Kontroller (n=133)	210(%78,9)	56(%21,1)
Erken başlangıçlı sporadik Parkinson Hastaları (n=18)	26 (%72,2)	10 (%27,8)

$$\chi^2=0,840, p= 0,359$$



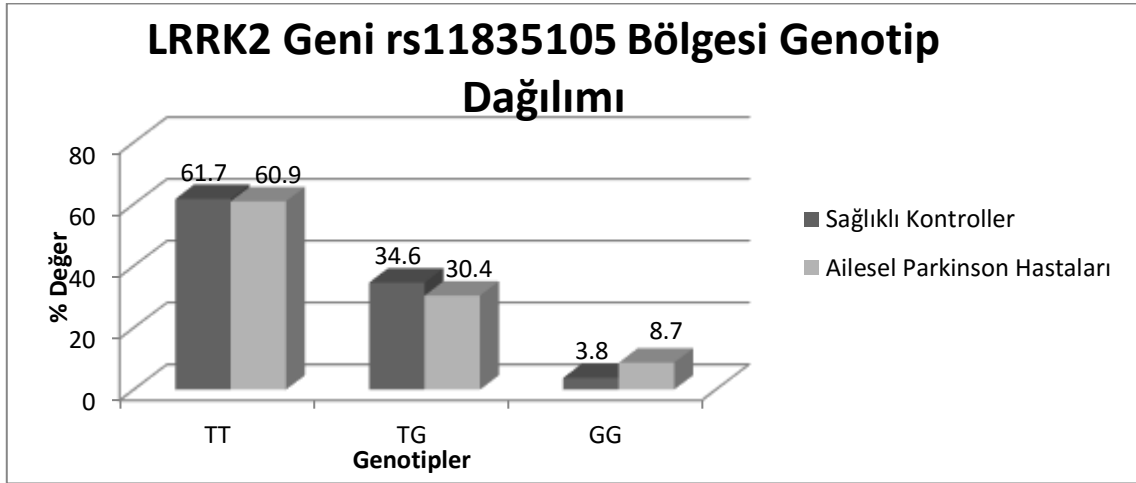
Şekil 4-22: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı

Ailesel Parkinson hastaları

Ailesel Parkinson hastalarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesine ait genotip dağılımı; 23 hastanın 14'ünde TT (%60,9), 7'sinde TG (%30,4) ve 2'sinde GG (%8,7) olarak belirlendi. 133 bireyden oluşan kontrol grubunun ise 82'si TT (%61,7), 46'sı TG (%34,6) ve 5'i GG (%3,8) genotipine sahip idi (Şekil 4-23) (Tablo 4-23). Ailesel Parkinson hasta sayısının az olmasından dolayı istatistiksel değerlendirme yapılmadı.

Tablo 4-23: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı

Gruplar	rs11835105 Genotipleri, n (%)		
	TT	TG	GG
Sağlıklı Kontroller (n=133)	82(%61,7)	46(%34,6)	5(%3,8)
Ailesel Parkinson hastaları (n=23)	14(%60,9)	7(%30,4)	2(%8,7)
Toplam (n=156)	96(%61,5)	53(%34,0)	7(%4,5)



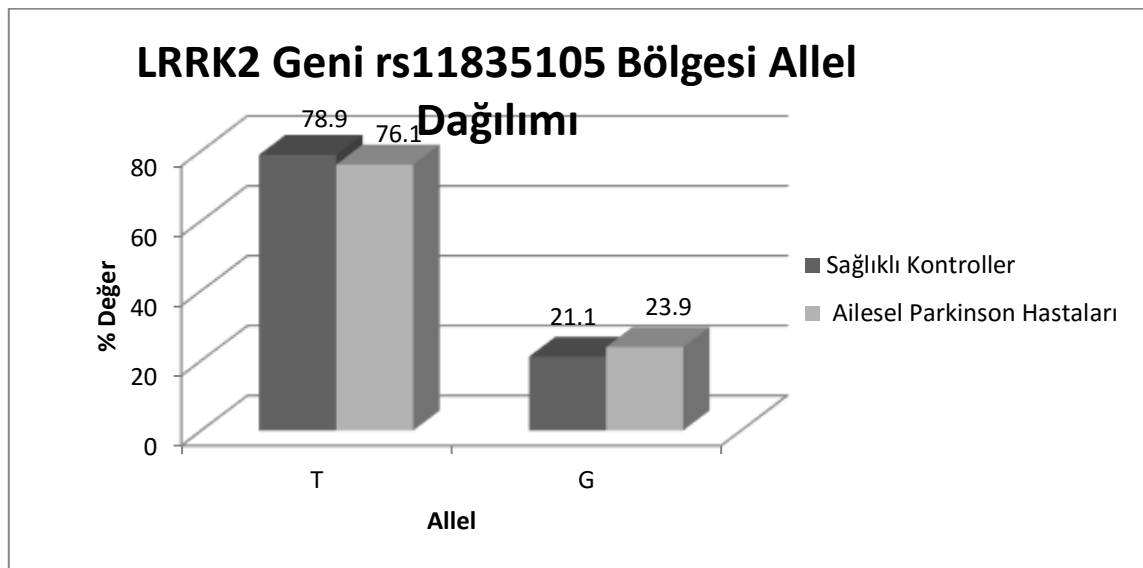
Şekil 4-23: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi genotip dağılımı

rs11835105 allel sıklığı açısından karşılaştırıldığında, Ailesel Parkinson hasta grubunda T alleli frekansının %76,1 ; G alleli frekansının ise %23,9 olduğu; kontrol grubunda ise sırasıyla T allelinin %78,9; G allelinin %21,1 olarak görüldüğü belirlendi. Hasta ve kontrol grupları allel dağılımları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4-24) (Tablo 4-24, p=0,663).

Tablo 4-24: Ailesel Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs11835105 Allelleri, n (%)	
	T	G
Sağlıklı Kontroller (n=133)	210(%78,9)	56(%21,1)
Ailesel Parkinson Hastaları (n=23)	35 (%76,1)	11 (%23,9)

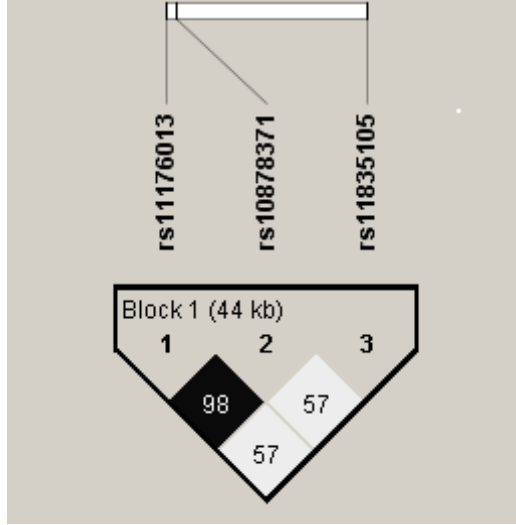
$$\chi^2 = 0,190, p = 0,663$$



Şekil 4-24: Ailesel Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 geninin rs11835105 bölgesi allel dağılımı

4.3. LRRK2 geni Haplotip Analizi Sonuçları

Tüm Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 genine ait araştırılan SNP'ler, haplotip sıklığını belirlemek üzere analiz edildi. 3 SNP'ye ait Bağlantı Eşitsizliği Analizi sonuçları Şekil 4-25'te gösterilmiştir. Kromozom üzerinde sırasıyla rs11176013, rs10878371, ve rs11835105 polimorfizmlerinin birlikte analizi sonucu "GCG" haplotipini taşıyan hastaların aynı haplotipi taşıyan sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu bulundu ($p=0.0353$). "ATT" haplotipini taşıyan sağlıklı bireylerin ise aynı haplotipi taşıyan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu bulundu (Tablo 4-25, $p=0,0099$).



Şekil 4-25: Tüm Parkinson hastası ve sağlıklı kontrollerde LRRK2 geninde araştırmış olduğumuz 3 SNP için Bağlantı Eşitsizliği Analizi

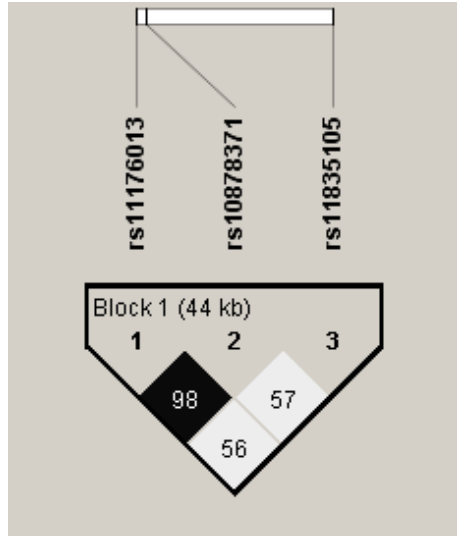
Koyu olan bölgeler iki bölge arasında birlikte kalıtılma olasılığının yüksek olduğunu (r^2 değerinin yüksek olduğunu) göstermektedir. (r^2 değeri iki bölge arasındaki korelasyon katsayısıdır.)

Tablo 4-25: Tüm Parkinson hastası ve sağlıklı kontrollerde LRRK2 genine ait 3 SNP (rs11176013, rs10878371, rs11835105)'nin haplotip analizi sonuçları

Haplotip	Hasta	Kontrol	χ^2	p değeri
GCT	0,427	0,383	1,08	0,2986
ATT	0,292	0,399	6,654	0,0099*
GCG	0,293	0,166	4,43	0,0353*
ATG	0,037	0,037	0,0	0,9986

* $p < 0.05$

Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastası ve kontrol gruplarında LRRK2 genine ait çalıştığımız SNP'ler, haplotip sıklığını belirlemek üzere analiz edildi. 3 SNP'ye ait Bağlantı Eşitsizliği Analizi sonuçları Şekil 4-26'da gösterilmiştir. Kromozom üzerinde sırasıyla rs11176013, rs10878371 ve rs11835105 polimorfizmlerinin birlikte analizi sonucu "GCG" haplotipini taşıyan hastaların aynı haplotipi taşıyan sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu bulundu ($p=0.0312$). "ATT" haplotipini taşıyan sağlıklı bireylerin ise aynı haplotipi taşıyan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu bulundu (Tablo 4-26, $p=0,013$).



Şekil 4-26: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastası ve sağlıklı kontrollerde LRRK2 geninde araştırmış olduğumuz 3 SNP için Bağlantı Eşitsizliği Analizi

Koyu olan bölgeler iki bölge arasında birlikte kalıtılma olasılığının yüksek olduğunu (r^2 değerinin yüksek olduğunu) göstermektedir. (r^2 değeri iki bölge arasındaki korelasyon katsayısıdır.)

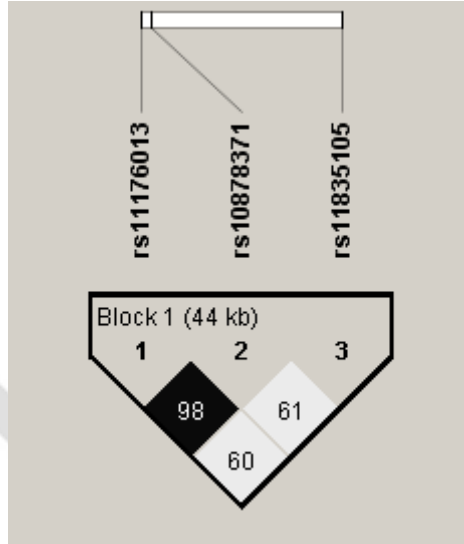
Tablo 4-26: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastası ve sağlıklı kontrollerde LRRK2 genine ait 3 SNP (rs11176013, rs10878371, rs11835105)'nin haplotip analizi sonuçları

Haplotip	Hasta	Kontrol	χ^2	p Değeri
GCT	0,421	0,383	0,696	0,4041
ATT	0,290	0,399	6,176	0,013*
GCG	0,244	0,166	4,644	0,0312*
ATG	0,040	0,037	0,02	0,8888

(* $p < 0.05$)

Tüm Parkinson hastaları ve geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında yapılan haplotip analizine ek olarak hem **geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları, hemde ailesel Parkinson hastalarında** LRRK2 ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığını saptadığımız için haplotip analizinin ekspresyon analizi ile paralellik gösterip göstermediğini belirlemek üzere iki hasta grubu birleştirilerek kontrol grubuna kıyasla haplotip sıklığı analiz edildi. Söz konusu birleştirilmiş hasta grubu ve kontrollerde 3 SNP'ye ait Bağlantı Eşitsizliği Analizi sonuçları Şekil 4-27'de gösterilmiştir. Kromozom üzerinde sırasıyla rs11176013, rs10878371 ve rs11835105 polimorfizmlerinin birlikte analizi sonucu "GCG" haplotipini taşıyan hastaların aynı haplotipi taşıyan sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla

olduğu bulundu ($p=0.0316$). Ayrıca “ATT” haplotipini taşıyan sağlıklı bireylerinaynı haplotipi taşıyan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı. (Tablo 4-27, $p=0,0098$).



Şekil 4-27: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ile Ailesel Parkinson hastalarının birleştirildiği grup ve sağlıklı kontrollerde LRRK2 geninde araştırmış olduğumuz 3 SNP için Bağlantı Eşitsizliği Analizi

Koyu olan bölgeler iki bölge arasında birlikte kalıtılma olasılığının yüksek olduğunu (r^2 değerinin yüksek olduğunu) göstermektedir. (r^2 değeri iki bölge arasındaki korelasyon katsayısıdır.)

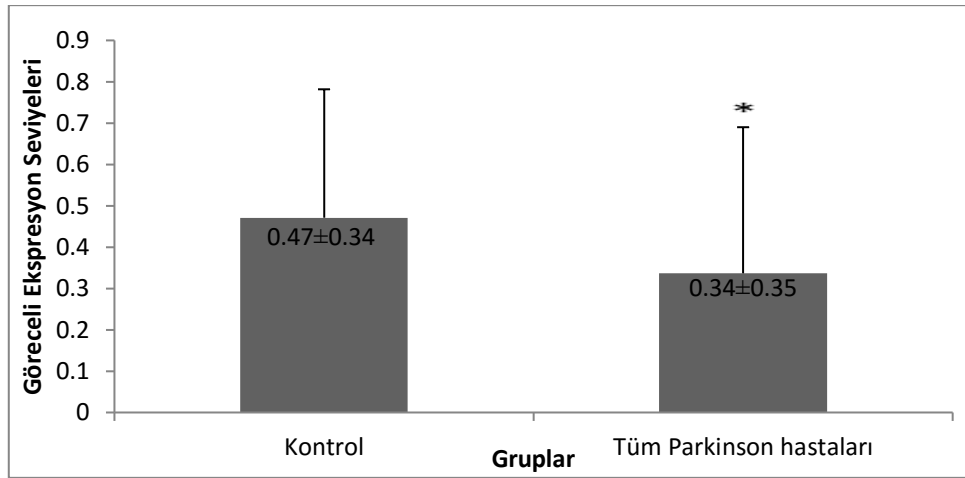
Tablo 4-27: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ile Ailesel Parkinson hastalarının birleştirildiği grup ve sağlıklı kontrollerde LRRK2 genine ait 3 SNP (rs11176013, rs10878371, rs11835105)’nin haplotip analizi sonuçları

Haplotip	Hasta	Kontrol	χ^2	p değeri
GCT	0,430	0,382	1,199	0,2735
ATT	0,289	0,400	6,476	0,0098*
GCG	0,245	0,167	4,622	0,0316*
ATG	0,031	0,036	0,086	0,7693

(* $p<0.05$)

4.4. LRRK2 geni Ekspresyon Analizi Sonuçları

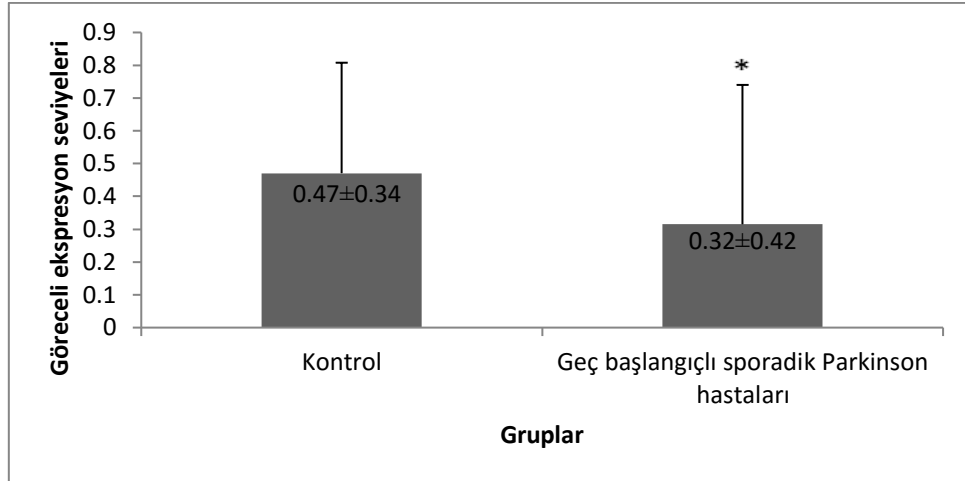
Tüm gruplara ait 87 Parkinson hastası ve 55 sağlıklı bireyde periferik kandan RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri ile LRRK2 geni ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi sonucu saptanan LRRK2 mRNA seviyeleri Şekil 4-28’de gösterilmiştir. Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesinin (0.34 ± 0.35) kontrol grubuna (0.47 ± 0.34) kıyasla azaldığı görüldü. Bu azalmanın istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.0001$).



Şekil 4-28: Tüm Parkinson hastaları ve kontrol gruplarının LRRK2 göreceli mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

*Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyelerinin (RPL13A ve HPRT1 housekeeping genler referans gen alınarak hesaplanmıştır) istatistiksel olarak hasta grubunda ileri derecede anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir ($p < 0.0001$).

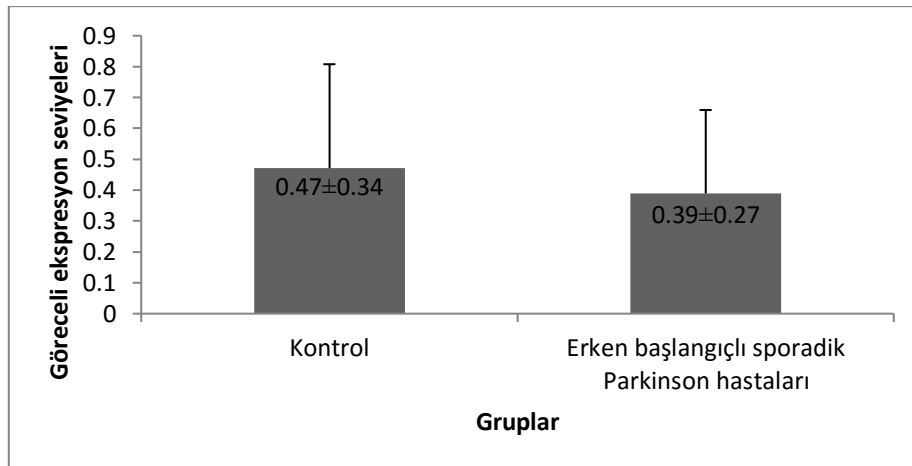
Ekspresyon analizi yapılan geç başlangıçlı sporadik 51 Parkinson hastası ve 55 sağlıklı bireyde LRRK2 geni ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi sonucu saptanan LRRK2 mRNA seviyeleri Şekil 4-29’de gösterilmiştir. Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesinin (0.32 ± 0.42) kontrol grubuna (0.47 ± 0.34) kıyasla azaldığı görüldü. Bu azalma istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı idi ($p < 0.0001$).



Şekil 4-29: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarının LRRK2 göreceli mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

*Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyelerinin (RPL13A ve HPRT1 housekeeping genler referans gen alınarak hesaplanmıştır) istatistiksel olarak hasta grubunda ileri derecede anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir ($p < 0.0001$).

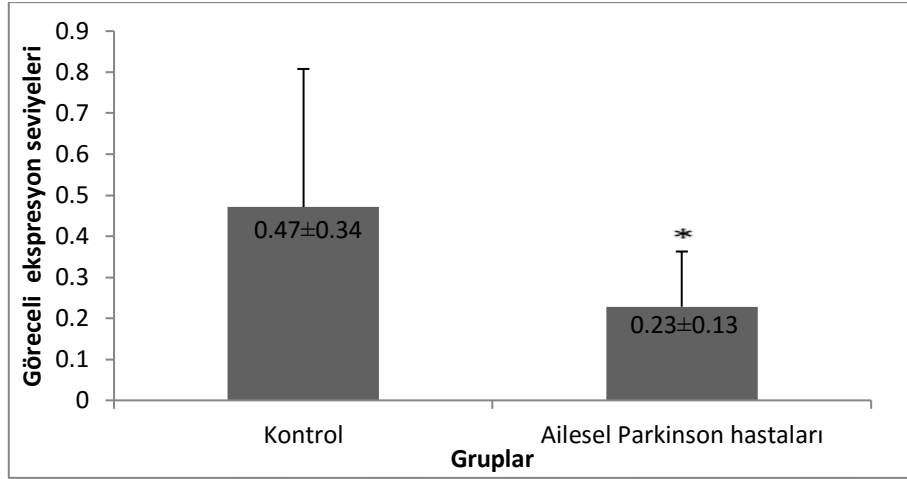
Ekspresyon analizi yapılan erken başlangıçlı sporadik 17 Parkinson hastası ve 55 sağlıklı bireyde LRRK2 geni ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi sonucu saptanan LRRK2 mRNA seviyeleri Şekil 4-30'de gösterilmiştir. Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesinin (0.39 ± 0.27) kontrol grubuna (0.47 ± 0.34) kıyasla azaldığı görüldü. Ancak bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p = 0.42$).



Şekil 4-30: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve kontrol gruplarının LRRK2 göreceli mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyelerinin (RPL13A ve HPRT1 housekeeping genler referans gen alınarak hesaplanmıştır) istatistiksel olarak hasta grubunda ileri derecede anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir ($p = 0.42$).

Ekspresyon analizi yapılan 17 ailesel Parkinson hastası ve 55 sağlıklı bireyde LRRK2 geni ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi sonucu saptanan LRRK2 mRNA seviyeleri Şekil 4-31’de gösterilmiştir. Ailesel Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesinin (0.23 ± 0.13) kontrol gruplarına (0.47 ± 0.34) oranla istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı düzeyde daha az olduğu saptandı. ($p=0.0011$)



Şekil 4-31: Ailesel Parkinson hastaları ve kontrol gruplarının LRRK2 göreceli mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

*Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyelerinin (RPL13A ve HPRT1 housekeeping genler referans gen alınarak hesaplanmıştır) istatistiksel olarak hasta grubunda ileri derecede anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir ($p=0.0011$).

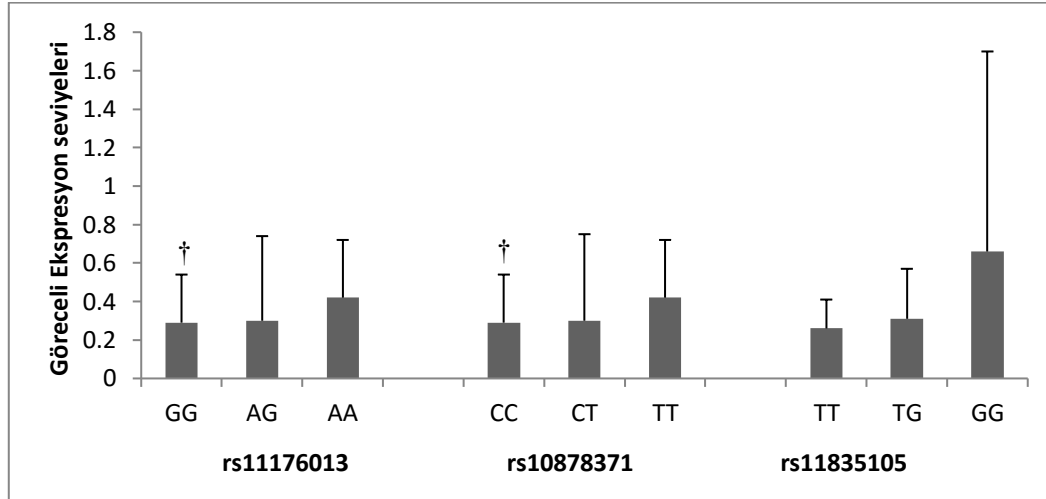
4.5. LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesi ile LRRK2 genotip sonuçlarının karşılaştırılması

Ekspresyon seviyesi belirlenen **tüm gruplara** ait 87 Parkinson hastasının LRRK2 mRNA seviyeleri ile LRRK2 genine ait araştırılan 3 SNP genotipleri karşılaştırılmıştır. rs11176013 bölgesi GG genotipi ve rs10878371 bölgesi CC genotipinde LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesinin diğer genotiplere kıyasla istatistiksel açıdan yakın anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır (sırasıyla $p=0.08$; $p=0.08$). rs11835105 bölgesine ait genotiplerin LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesi ile karşılaştırılması sonucu anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Şekil 4-32) ($p=0.78$, Tablo 4-28)

Tablo 4-28: Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 genine ait 3 SNP genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları

SNP	Genotipler	Hasta sayısı	Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesi	p değeri
rs11176013	GG	39	0.29±0.25	0.08 †
	AG	38	0.30±0.44	
	AA	10	0.42±0.30	
rs10878371	CC	40	0.29±0.25	0.08 †
	CT	37	0.30±0.45	
	TT	10	0.42±0.30	
rs11835105	TT	43	0.26±0.15	0.78
	TG	37	0.31±0.26	
	GG	7	0.66±1.04	

†Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyelerinin (RPL13A ve HPRT1 housekeeping genler referans gen alınarak hesaplanmıştır) istatistiksel olarak yakın anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir (†p=0.08)



Şekil 4-32: Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 geni 3 SNP (sırasıyla rs11176013, rs10878371, rs11835105) genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları

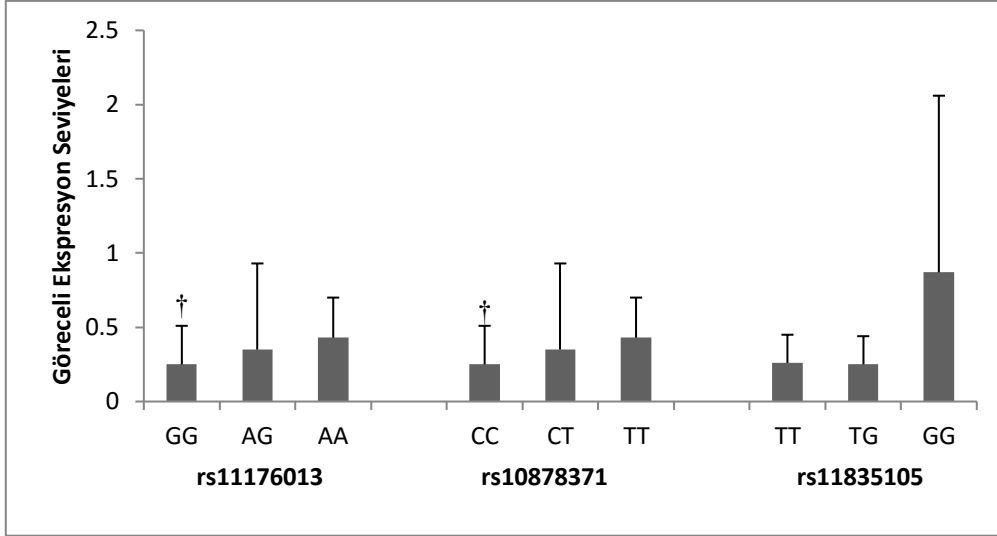
† p=0.08

Ekspresyon seviyesi belirlenen 51 **geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastasına** ait LRRK2 mRNA seviyeleri ile LRRK2 genine ait araştırılan 3 SNP genotipleri karşılaştırılmıştır. rs11176013 bölgesi GG genotipi ve rs10878371 bölgesi CC genotipinde LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesinin diğer genotiplere kıyasla istatistiksel açıdan yakın anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır (sırasıyla $p=0.09$; $p=0.09$). rs11835105 bölgesine ait genotiplerin LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesi ile karşılaştırılması sonucu istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Şekil 4-33) ($p=0.94$, Tablo 4-29).

Tablo 4-29: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 genine ait 3 SNP genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları

SNP	Genotipler	Hasta sayısı	Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesi	p değeri
rs11176013	GG	23	0.25±0.26	0.09†
	AG	22	0.35±0.58	
	AA	6	0.43±0.27	
rs10878371	CC	23	0.25±0.26	0.09†
	CT	22	0.35±0.58	
	TT	6	0.43±0.27	
rs11835105	TT	25	0.26±0.19	0.94
	TG	21	0.25±0.19	
	GG	5	0.87±1.19	

†Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyelerinin (RPL13A ve HPRT1 housekeeping genler referans gen alınarak hesaplanmıştır) istatistiksel olarak yakın anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir († $p=0.09$).



Şekil 4-33: Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 geni 3 SNP (sırasıyla rs11176013, rs10878371, rs11835105) genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları
(† p=0.09)

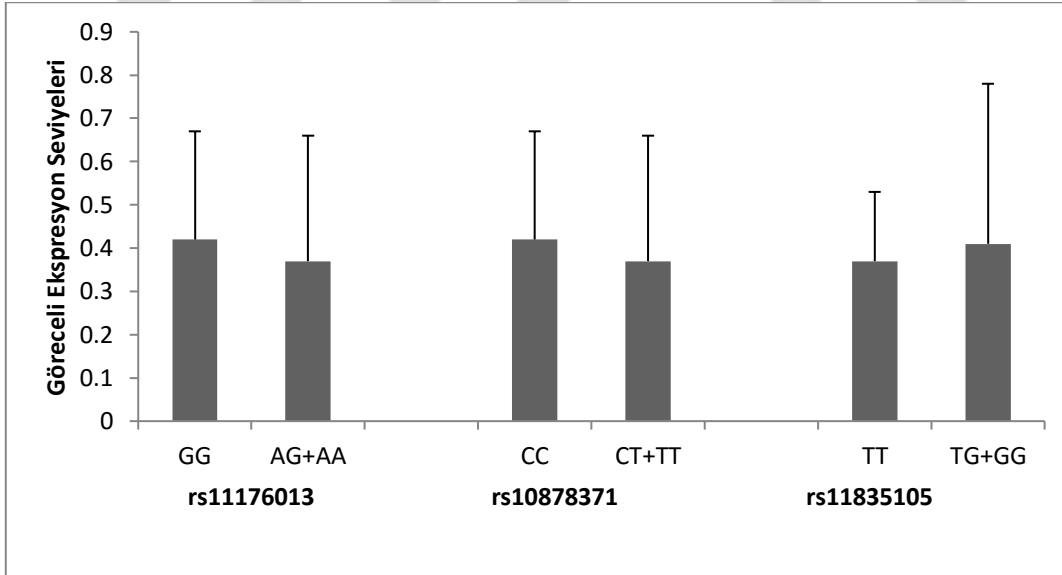
Ekspresyon seviyesi belirlenen 17 **erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastası** bireyde LRRK2 mRNA seviyeleri ile LRRK2 genine ait araştırılan 3 SNP genotipleri karşılaştırılmıştır. rs11176013, rs10878371, rs11835105 bölgelerine ait genotiplerin mRNA ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırılması sonucu istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Şekil 4-34) (sırasıyla p=0.54; p=0.66 ; p=0.61, Tablo 4-30)

Gruptaki hasta sayısının azlığı nedeniyle istatistiksel analizler rs11176013 için AG ve AA genotipleri (AG+AA), rs10878371 için CT ve TT genotipleri (CT+TT), rs11835105 için TG ve GG genotipleri (TG+GG) tek grup halinde birleştirilerek yapılmıştır.

Tablo 4-30: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 genine ait 3 SNP genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları

SNP	Genotipler	Hasta sayısı	Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesi	p değeri
rs11176013	GG	6	0.42±0.25	0.54
	AG+AA	11	0.37±0.29	
rs10878371	CC	6	0.42±0.25	0.66
	CT+TT	11	0.37±0.29	
rs11835105	TT	9	0.37±0.16	0.61
	TG+GG	8	0.41±0.37	

Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyelerinin (RPL13A ve HPRT1 housekeeping genler referans gen alınarak hesaplanmıştır) istatistiksel olarak yakın anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir ($p>0.01$).



Şekil 4-34: Erken başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 geni 3 SNP (sırasıyla rs11176013, rs10878371, rs11835105) genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları
($p>0.01$)

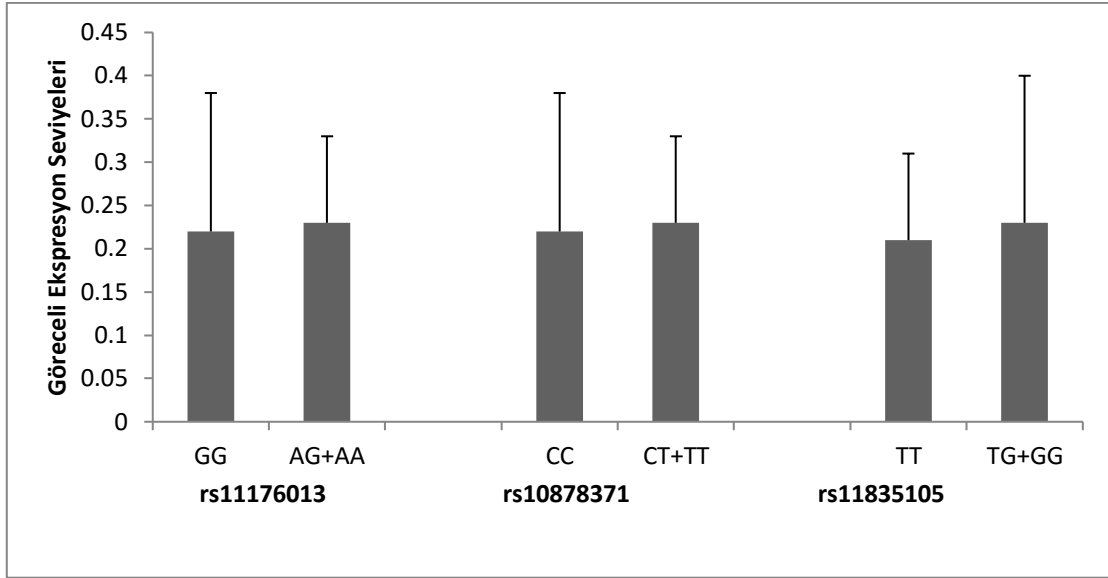
Ekspresyon seviyesi belirlenen 17 **ailese Parkinson hastası** bireyde LRRK2 mRNA seviyeleri ile LRRK2 genine ait araştırılan 3 SNP genotipleri karşılaştırılmıştır. rs11176013, rs10878371, rs11835105 bölgelerine ait genotiplerin mRNA ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırılması sonucu istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Şekil 4-35) (sırasıyla $p=0.89$; $p=0.54$; $p=0.96$, Tablo 4-31).

Gruptaki hasta sayısının azlığı nedeniyle istatistiksel analizler rs11176013 için AG ve AA genotipleri (AG+AA), rs10878371 için CT ve TT genotipleri (CT+TT), rs11835105 için TG ve GG genotipleri (TG+GG) tek grup halinde birleştirilerek yapılmıştır.

Tablo 4-31: Ailese Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 genine ait 3 SNP genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları

SNP	Genotipler	Hasta sayısı	Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesi	p değeri
rs11176013	GG	9	0.22±0.16	0.89
	AG+AA	8	0.23±0.10	
rs10878371	CC	9	0.22±0.16	0.54
	CT+TT	8	0.23±0.10	
rs11835105	TT	10	0.21±0.10	0.96
	TG+GG	7	0.25±0.17	

Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyelerinin (RPL13A ve HPRT1 housekeeping genler referans gen alınarak hesaplanmıştır) istatistiksel olarak yakın anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir ($p>0.01$).



Şekil 4-35: Ailesel Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 geni 3 SNP (sırasıyla rs11176013, rs10878371, rs11835105) genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları
($p>0.01$)

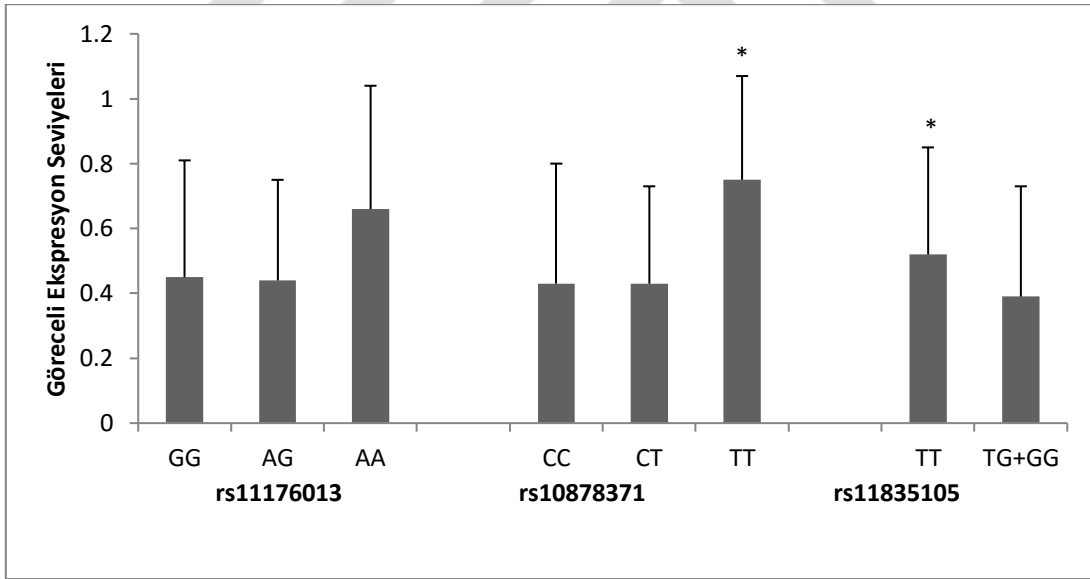
Ekspresyon seviyesi belirlenen 55 **sağlıklı bireyde** LRRK2 mRNA seviyeleri ile LRRK2 genine ait araştırılan 3 SNP genotipleri karşılaştırılmıştır. rs11176013 bölgesine ait genotiplerin LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesi ile karşılaştırılması sonucu istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.19$). rs10878371 bölgesi TT genotipi ve rs11835105 bölgesi TT genotipinde LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesinin diğer genotiplere kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 4-36) (sırasıyla $p=0.03$; $p=0.05$, Tablo 4-32).

rs118351015 genotiplerinden GG genotipini içeren hasta sayısının azlığı nedeniyle istatistiksel analizler TG ve GG genotipleri (TG+GG) tek grup halinde birleştirilerek yapılmıştır.

Tablo 4-32: Sağlıklı kontrollerde LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 genine ait 3 SNP genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları

SNP	Genotipler	Sağlıklı birey sayısı	Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesi	p değeri
rs11176013	GG	17	0.45±0.36	0.19
	AG	31	0.44±0.31	
	AA	7	0.66±0.38	
rs10878371	CC	16	0.43±0.37	0.03*
	CT	32	0.43±0.30	
	TT	7	0.75±0.32	
rs11835105	TT	34	0.52±0.33	0.05*
	TG+GG	21	0.39±0.34	

Göreceli LRRK2 mRNA ekspresyon seviyelerinin (RPL13A ve HPRT1 housekeeping genler referans gen alınarak hesaplanmıştır) istatistiksel olarak yakın anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir (*p≤0.05).



Şekil 4-36: Sağlıklı kontrollerde LRRK2 mRNA ekspresyon seviyeleri ile LRRK2 geni 3 SNP (sırasıyla rs11176013, rs10878371, rs11835105) genotiplerinin karşılaştırılma sonuçları

(*p≤0.05)

4.6. LRRK2 genotip ve allel sonuçlarının klinik verilerle karşılaştırılması

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs11176013, rs10878371, rs11835105 polimorfik bölgelerinin genotip ve allel sonuçları hastalığın 1-Başlangıç semptomları (TD=Tremor Dominant, AR=Akinetik Rijit veya AR+TD=Akinetik Rijit+Tremor Dominant), 2-Hastalık evresi (1'den 5'e kadar, Hoehn Yahr evrelemesi), 3-Hareketlerde donma semptomunun varlığı, 4-Düşme semptomunun varlığı, 5-Hastalığın semptomlarının gidişatı (TT= tremor dominant semptomu ile başlayan hastalığın tremor dominant semptomları ile devam etmesi, TB= Tremor dominant semptomu ile başlayan hastalığın bradikinezi semptomları ile devam etmesi, BB=bradikinezi dominant semptomu ile başlayan hastalığın bradikinezi dominant semptomları ile devam etmesi), 6-Hastalığın süresi (<7 yıl veya ≥ 7 yıl) gibi klinik özellikler ile karşılaştırıldı.

LRRK2 genotipleri hastalığın klinik verileri ile karşılaştırılırken genotipler homozigot major allel taşıyıcıları ve minör allel taşıyıcıları olarak 2 grup halinde ayrılarak istatistiksel analiz yapıldı.

4.6.1. Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs11176013 genotiplerinin ve allellerinin klinik verilerle karşılaştırılması

Başlangıç Semptomu

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs11176013 **genotiplerinin**, başlangıç semptomu ile karşılaştırılması sonucu tremor dominant (TD) görülen hastalarda GG genotipi (%48,2) ve AG+AA genotipi (%51,8) olarak saptandı. Akinetik rijit (AR) ve akinetik rijit+tremor dominant (AR+TD) semptomları görülen hastalarda GG genotipi (%31,2) ve AG+AA genotipi (%68,8) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs11176013 genotipleri ile başlangıç semptomları karşılaştırıldığında rs11176013 bölgesi AG+AA genotipinin akinetik rijit(AR) ve akinetik rijit+tremor dominant(AR+TD) semptomları görülen hastalarda istatistiksel olarak yakın anlamlı derecede daha fazla görüldüğü bulundu.(p=0.06, Tablo 4-33)

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs11176013 **allellerinin** başlangıç semptomu ile karşılaştırılması sonucu tremor dominant(TD) hastalarda G alleli (%69,9) ve A alleli (%30,1), akinetik rijit(AR) ve akinetik rijit+tremor dominant(AR+TD) semptomları görülen hastalarda ise G alleli (%61,5) ve A alleli (%38,5) olarak bulundu.

Tüm Parkinson hastalarının rs11176013 allelleri ile başlangıç semptomları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0.16, Tablo 4-34)

Hastalık Evresi

Hastalığın ≤ 3 . evresinde bulunan hasta grubunda LRRK2 geni rs11176013 **genotip** dağılımı; GG genotipi (%43,1) ve AG+AA genotipi (%56,9) olarak görülürken, hastalığın > 3 . evresinde bulunan hasta grubunda GG genotipi (%14,3) ve AG+AA genotipi (%85,7) olarak saptandı. Tüm Parkinson hastalarının rs11176013 genotipleri ile hastalık evresi verileri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. (p=0.13, Tablo 4-33)

Hastalığın ≤ 3 . evresinde bulunan hasta grubunda LRRK2 geni rs11176013 **allel** dağılımı; G alleli (%67,5) ve A alleli (%32,5) olarak bulunurken, hastalığın > 3 . evresinde bulunan hasta grubunda G alleli (%50,0) ve A alleli (%50,0) olarak saptandı. Tüm Parkinson hastalarının rs11176013 allelleri ile hastalık evresi verileri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.18, Tablo 4-34).

Hareketlerde Donma

Klinik olarak hareketlerde donma semptomu görülen ve görülmeyen hastaların LRRK2 geni rs11176013 **genotip** dağılımlarının karşılaştırılması sonucu hareketlerde donma görülmeyen hastalarda GG genotipinin (%43,2) ve AG+AA genotipinin (%56,8), hareketlerde donma görülen hastalarda GG genotipinin (%31,6) ve AG+AA genotipinin (%68,4) olarak bulunduğu saptandı. Tüm Parkinson hastalarının rs11176013 genotipleri ile hareketlerde donma semptomu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0.34, Tablo 4-33).

Klinik olarak hareketlerde donma semptomu görülen ve görülmeyen hastaların LRRK2 geni rs11176013 **allel** dağılımlarının karşılaştırılması sonucu hareketlerde donma görülmeyen hastalarda G alleli (%68,0) ve A alleli (%32,0) olarak görülürken, hareketlerde donma görülen hastalarda G alleli (%57,9), A alleli (%42,1) olarak saptandı.

Tüm Parkinson hastalarının rs11176013 allelleri ile hareketlerde donma semptomları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0.22, Tablo 4-34)

Düşme Semptomu

Klinik olarak düşme semptomu görülen ve görülmeyen hastaların LRRK2 geni rs11176013 **genotip** dağılımlarının karşılaştırılması sonucu düşme görülmeyen hastalarda GG genotipi (%41) ve AG+AA genotipi (%59) olarak bulunurken, düşme

görülen hastalarda GG genotipi (%42,5) ve AG+AA genotipi (%57,5) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs11176013 genotipleri ile düşme semptomunun varlığı karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,73$, Tablo 4-33)

Klinik olarak düşme semptomu görülen ve görülmeyen hastaların LRRK2 geni rs11176013 **allel** dağılımlarının karşılaştırılması sonucu düşme görülmeyen hastalarda G alleli (%68,1) ve A alleli (%31,9) iken, düşme durumu görülen hastalarda G alleli (%63,8) ve A alleli (%36,2) olarak saptandı. Tüm Parkinson hastalarının rs11176013 allelleri ile düşme semptomunun varlığı karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,49$, Tablo 4-34).

Hastalığın Gidişatı

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs11176013 **genotiplerinin** ve **allellerinin** hastalığın semptomlarının gidişatı (TT, TB ve BB) ile karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Bu nedenle “*tremor semptomuyla başlayıp tremor semptomuyla devam eden*(TT) ve *tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden*(TB)” hasta grupları birleştirilerek (TT+TB), “*bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden*(BB)” hasta grubuyla karşılaştırıldı. Ayrıca “*Tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden* (TB) ve *bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden*(BB) hasta grupları da birleştirilerek (TB+BB)”, “*tremor semptomu ile başlayıp tremor semptomuyla devam eden*(TT)” hasta grubu ile karşılaştırıldı.

“Tremor semptomuyla başlayıp tremor semptomuyla devam eden ve tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (TT+TB)” hastalarda GG genotipi (%47,8) ve AG+AA genotipi (%52,2) olarak görülürken, “bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden(BB) hastalarda GG genotipi (%29,4) ve AG+AA genotipi (%70,6) olarak saptandı. “BB” grubu hastalarda rs11176013 bölgesi AG+AA genotipinin “TT+TB” hasta grubuna kıyasla istatistiksel olarak yakın anlamlı derecede daha fazla görüldüğü saptandı ($p=0,065$).

“Tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden ve bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomu ile devam eden (TB+BB)” grubunda GG genotipi (%36,1) ve AG+AA genotipi (%63,9) olarak bulunurken, “tremor semptomu ile başlayıp tremor semptomuyla devam eden (TT)” hastalarda GG

genotipi (%56,1) ve AG+AA genotipi (%43,9) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs11176013 bölgesinin genotipleri ile hastalığın gidişatı karşılaştırıldığında “TB+BB” grubu hastalarda rs11176013 bölgesi AG+AA genotipinin “TT” hasta grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla görüldüğü saptandı ($p=0,035$, Tablo 4-35).

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 rs11176013 allellerinin hastalığın gidişatı ile karşılaştırılması sonucu “*tremor semptomuyla başlayıp tremor semptomuyla devam eden ve tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden*(TT+TB)” hastalarda G alleli (%70,0) ve A alleli (%30,0) olarak bulunurken, “*bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomu devam eden*(BB)” hastalarda G alleli (%58,8) ve A alleli (%41,2) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs11176013 bölgesi allelleri ile hastalığın gidişatı karşılaştırıldığında “TT+TB” hastalarda rs11176013 bölgesi G allelinin “BB” grubundan hastalara kıyasla istatistiksel olarak yakın anlamlı derecede daha fazla görüldüğü saptandı ($p=0,095$).

“Tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden ve bradikinezi semptomu ile başlayıp bradikinezi semptomu ile devam eden(TB+BB)” hastalarda G alleli (%62,0), A alleli (%38,0) olarak bulunurken, “tremor semptomuyla başlayıp tremor semptomuyla devam eden(TT)” hastalarda G alleli (%76,8) ve A alleli (%23,2) olarak bulunmuştur. “TT” hasta grubunda rs11176013 bölgesi G allelinin “TB+BB” hasta grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla görüldüğü bulunmuştur ($p=0,020$, Tablo 4-36).

Hastalığın Süresi

Hastalığın süresi <7 ve ≥ 7 olarak değerlendirildi. Hastalık süresi 7 yıldan az olan ve rs11176013 için “GG” genotipi taşıyan hasta bireylerin baskın olarak tremor dominant hastalık başlangıcı göstermekte olduğu bulundu ($p=0.017$; OR:1,88 ; %95 CI: 1.06-3.32). Hastalığın süresi diğer klinik verilerle de karşılaştırıldı fakat anlamlı bir ilişki bulunamadı.

4.6.2. Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs10878371 genotiplerinin ve allellerinin klinik verilerle karşılaştırılması

Başlangıç Semptomu

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs10878371 **genotiplerinin** başlangıç semptomları ile karşılaştırılması sonucu tremor dominantlarda (TD) CC genotipi (%48,2), CT+TT genotipi (%51,8) olarak saptandı. Akinetik rijit veya akinetik rijit+tremor dominant semptomu (AR) görülenlerde ise CC genotipi (%33,3), CT+TT genotipi (%66,7) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs10878371 genotipleri ile başlangıç semptomları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0.1$, Tablo 4-33)

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs10878371 **allellerinin** başlangıç semptomu ile karşılaştırılması sonucu tremor dominantlarda C alleli (%69,9) ve T alleli (%30,1), akinetik rijit veya akinetik rijit+tremor dominant semptomu görülenlerde ise C alleli (%62,5), T alleli ise (%37,5) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs10878371 allelleri ile başlangıç semptomları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0.22$, Tablo 4-34).

Hastalık Evresi

Hastalığın ≤ 3 . evresinde bulunan hasta grubunda LRRK2 geni rs10878371 **genotip** dağılımı CC genotipi (%43,9) ve CT+TT genotipi (%56,1) görülürken, hastalığın >3 evresinde bulunan hastalarda CC genotipi (%14,3) ve CT+TT genotipi (%85,7) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs10878371 genotipleri ile hastalık evresi verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.12$, Tablo 4-33)

Hastalığın ≤ 3 . evresinde bulunan hasta grubunda LRRK2 geni rs10878371 **allel** dağılımı sonucu C alleli (%68), T alleli (%32) görülürken, hastalığın >3 . evresinde bulunan hastalarda C alleli (%50) ve T alleli (%50) olarak saptandı. Tüm Parkinson hastalarının rs10878371 allelleri ile hastalık evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. ($p=0.17$, Tablo 4-34)

Hareketlerde Donma

Klinik olarak hareketlerde donma semptomu görülen ve görülmeyen hastaların LRRK2 geni rs10878371 **genotip** dağılımlarının karşılaştırılması sonucu hareketlerde donma görülmeyen hastalarda CC genotipi (%44,1) ve CT+TT genotipi (%55,9) olarak görülürken, hareketlerde donma görülen hastalarda CC genotipi (%31,6) ve CT+TT genotipi (%68,4) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs10878371 genotipleri ile hareketlerde donma semptomunun varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmedi ($p=0.31$, Tablo 4-33)

Klinik olarak hareketlerde donma semptomu görülen ve görülmeyen hastaların LRRK2 geni rs10878371 **allel** dağılımlarının karşılaştırılması sonucu hareketlerde donma görülmeyen hastalarda C alleli (%68,5), T alleli (%31,5) iken, hareketlerde donma görülen hastalarda C alleli (%57,9), T alleli ise (%42,1) olarak saptandı. Tüm Parkinson hastalarının rs10878371 allelleri ile hareketlerde donma semptomu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmedi ($p=0.20$, Tablo 4-34)

Düşme Semptomu

Klinik olarak düşme semptomu görülen ve görülmeyen hastaların LRRK2 geni rs10878371 **genotip** dağılımlarının karşılaştırılması sonucu düşme görülmeyen hastalarda CC genotipi (%40,9),CT+TT genotipi (%59,1) olarak görülürken, düşme semptomu görülen hastalarda CC genotipi (%44,7) ve CT+TT genotipi (%55,3) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs10878371 genotipleri ile düşme semptomunun varlığını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0.68$, Tablo 4-33)

Klinik olarak düşme semptomu görülen ve görülmeyen hastaların LRRK2 geni rs10878371 **allel** dağılımlarının karşılaştırılması sonucu düşme görülmeyen hastalarda C alleli (%68,1),T alleli (%31,9) iken, düşme görülen hastalarda C alleli (%64,9) ve T alleli (%35,1) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs10878371 allelleri ile düşme semptomunun varlığını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0.60$, Tablo 4-34)

Hastalığın Gidişatı

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs10878371 **genotiplerinin**ve **allellerinin** hastalığın semptomlarının gidişatı (TT, TB ve BB) ile karşılaştırılması sonucu anlamlı bir farklılık görülmedi. Bu nedenle “*tremor semptomuyla başlayıp tremor semptomuyla devam eden (TT) ve tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (TB)*” hasta grupları birleştirilerek (TT+TB), “*bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (BB)*” hasta grubuyla karşılaştırıldı. Ayrıca “*Tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (TB) ve bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (BB) hasta grupları birleştirilerek (TB+BB)*, “*tremor semptomu ile başlayıp tremor semptomuyla devam eden (TT)*” hasta grubu ile karşılaştırıldı.

“Tremor semptomuyla başlayıp tremor semptomuyla devam eden ve tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (TT+TB)” hasta grubunda CC genotipi (%47,8), CT+TT genotipi (%52,2) olarak görülürken, “bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (BB)” hastalarda CC genotipi (%32,3) ve CT+TT genotipi (%67,7) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs10878371 genotipleri ile hastalığın gidişatı istatistiksel açıdan karşılaştırıldığında “BB” grubu hastalarda rs10878371 bölgesi CT+TT genotipinin “TT+TB” hasta grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla görüldüğü saptandı ($p=0,048$, Tablo 4-35).

“Tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (TB+BB)” hastalarda CC genotipi (%37,3), CT+TT genotipi (%62,7) olarak bulunurken, “Tremor semptomuyla başlayıp tremor semptomuyla devam eden (TT)” hastalarda CC genotipi (%56,1), CT+TT genotipi (%43,9) olarak görüldü.

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs10878371 **allellerinin** hastalığın gidişatı ile karşılaştırılması sonucu “Tremor semptomuyla başlayıp tremor semptomuyla devam eden ve bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (TT+TB)” hastalarda C alleli (%70,0) ve T alleli (%30,0) olarak görülürken, “bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (BB)” hastalarda C alleli (%60,3) ve T alleli (%39,7) olarak bulundu.

“Tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden ve bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (TB+BB)”

hastalarda C alleli (%62,6), T alleli (%37,4) olarak bulunurken, “Tremor semptomuyla başlayıp tremor semptomuyla devam eden(TT)” hastalarda C alleli (%76,8), T alleli (%23,2) olarak bulundu.

Tüm Parkinson hastalarının rs10878371 allelleri ile hastalığın gidişatı istatistiksel açıdan karşılaştırıldığında “*tremor semptomu ile başlayıp tremor semptomu ile devam eden (TT)*” hastalarda rs10878371 bölgesi C allelinin “TB+BB” hasta grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla görüldüğü saptandı ($p=0,025$, Tablo 4-36).

Hastalığın Süresi

Hastalığın süresi <7 ve ≥ 7 olarak değerlendirildi. Hastalık süresi 7 yıldan az olan ve rs10878371 için “CC” genotipi taşıyan hasta bireylerin baskın olarak tremor dominant hastalık başlangıcı göstermekte olduğu bulundu ($p=0.017$; OR: 1,88; %95 CI: 1.06-3.32). Hastalığın süresi diğer klinik verilerle de karşılaştırıldı ancak aralarında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

4.6.3. Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs11835105 genotiplerinin ve allellerinin klinik verilerle karşılaştırılması

Başlangıç Semptomu

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs11835105 **genotiplerinin** başlangıç semptomu ile karşılaştırılması sonucu tremor dominant (TD) görülen hastalarda TT genotipi (%56,6) ve TG+GG genotipi (%43,4) olarak saptandı. Akinetik rijit(AR) ve akinetik rijit+tremor dominant(AR+TD) semptomu görülenlerde TT genotipi (%45,8), TG+GG genotipi (%54,2) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs11835105 genotipleri ile başlangıç semptomları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0.23$, Tablo 4-33)

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs11835105 **allellerinin** başlangıç semptomu ile karşılaştırılması sonucu tremor dominant (TR) görülen hastalarda T alleli (%71,7), G alleli ise (%28,3) olarak saptandı. Akinetik rijit veya akinetik rijit+tremor dominant (AR) semptomu görülenlerde T alleli (%68,7), G alleli (%31,3) olarak bulundu.

Tüm Parkinson hastalarının rs11835105 allelleri ile başlangıç semptomları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0.61$, Tablo 4-34)

Hastalık Evresi

Hastalığın ≤ 3 . evresinde bulunan hasta grubunda LRRK2 geni rs11835015 **genotip** dağılımı sonucu TT genotipi (%52), TT+TG genotipi (%48) olarak bulunurken, hastalığın >3 . evresinde bulunan hasta grubunda TT genotipi (%71,4) ve TT+TG genotipi (%28,6) olarak saptandı.

Tüm Parkinson hastalarının rs11835105 genotipleri ile hastalık evresi verileri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.31$, Tablo 4-33).

Hastalığın ≤ 3 . evresinde bulunan hasta grubunda LRRK2 geni rs11835015 **allel** dağılımı; T alleli (%69,9) ve G alleli (%30,1) olarak bulunurken, hastalığın >3 . evresinde T alleli (%85,7) ve G alleli (%14,3) olarak saptandı. Tüm Parkinson hastalarının rs11835105 allelleri ile hastalık evresi verileri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.21$, Tablo 4-34).

Hareketlerde Donma

Klinik olarak hareketlerde donma semptomu görülen ve görülmeyen hastaların LRRK2 geni rs11835015 **genotip** dağılımlarının karşılaştırılması sonucu hareketlerde donma görülmeyen hastalarda TT genotipi (%51,3), TG+GG genotipi (%48,7) olarak görülürken, hareketlerde donma görülen hastalarda TT genotipi (%63,2) ve TG+GG genotipi (%36,8) olarak saptandı. Tüm Parkinson hastalarının rs11835105 genotipleri ile hareketlerde donma semptomu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki görülmedi ($p=0.34$, Tablo 4-33)

Klinik olarak hareketlerde donma semptomu görülen ve görülmeyen hastaların LRRK2 geni rs11835015 **allel** dağılımlarının karşılaştırılması sonucu hareketlerde donma görülmeyen hastalarda T alleli (%69,8) ve G alleli (%30,2) olarak bulunurken, hareketlerde donma görülen hastalarda T alleli (%76,3) ve G alleli (%23,7) olarak saptandı. Tüm Parkinson hastalarının rs11835105 allelleri ile hareketlerde donma semptomunun varlığı arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0.42$, Tablo 4-34)

Düşme Semptomu

Klinik olarak düşme semptomu görülen ve görülmeyen hastaların LRRK2 geni rs11835015 **genotip** dağılımlarının karşılaştırılması sonucu düşme görülmeyen hastalarda TT genotipi (%54,2) ve TT+TG genotipi (%45,8) görülürken, düşme durumu

görülen hastalarda TT genotipi (%51,1) ve TT+TG genotipi (%48,9) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs11835105 genotipleri ile düşme semptomunun varlığını karşılaştırdığımızda istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0.73$, Tablo 4-33)

Klinik olarak düşme semptomu görülen ve görülmeyen hastaların LRRK2 geni rs11835015 **allel** dağılımlarının karşılaştırılması sonucu düşme görülmeyen hastalarda T alleli (%70,5) ve G alleli (%29,5), düşme görülen hastalarda ise T alleli (%71,3) ve G alleli (%28,7) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs11835105 allelleri ile düşme semptomu varlığı karşılaştırıldığında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0.90$, Tablo 4-34)

Hastalığın Gidişatı

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs11835105 **genotiplerininve allellerinin** hastalığın semptomlarının gidişatı (TT, TB ve BB) ile karşılaştırılması sonucu anlamlı bir farklılık görülmedi. Bu nedenle “*tremor semptomuyla başlayıp tremor semptomuyla devam eden (TT) ve tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (TB)*” hasta gruplarının birleştirilerek (TT+TB), “*bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (BB)*” hasta grubuyla karşılaştırıldı (TT+TB/BB).

“Tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (TB) ve bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (BB) hasta grupları birleştirilerek (TB+BB),” “Tremor semptomu ile başlayıp tremor semptomuyla devam eden (TT)” hasta grupları ile karşılaştırıldı (TB+BB/TT).

“Tremor semptomuyla başlayıp tremor semptomuyla devam eden ve tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (TT+TB)” hastalarda TT genotipi (%55,6) ve TG+GG genotipi (%44,4) iken, “Bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden (BB)” hastalarda TT genotipi (%41,2), TT+TG genotipi (%58,8) olarak saptandı.

“Tremor semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomuyla devam eden ve bradikinezi semptomuyla başlayıp bradikinezi semptomu ile devam eden (TB+BB)” hastalarda TT genotipi (%50,6) ve TG+GG genotipi (%49,4) olarak bulunmuş olup, “tremor semptomuyla başlayıp tremor semptomuyla devam eden (TT)” hastalarda TT genotipi (%53,6) ve TT+TG genotipi (%46,4) olarak bulundu. Tüm Parkinson hastalarının rs11835105 genotipleri ile hastalığın gidişatı karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0.15$ ve $p=0,75$, Tablo 4-35).

Tüm Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs11835105 **allellerinin** hastalığın gidişatı ile karşılaştırılması sonucu “TT+TB” grubu hastalarda T alleli (%71,1) ve G alleli (%28,9) iken, “BB” grubu hastalarda T alleli (%66,2) ve G alleli (%33,8) olarak saptandı. “TB+BB” grubu hastalarda T alleli (%68,3), G alleli (%31,7) olarak bulunurken, “TT” grubu hastalarda T alleli (%68,3) ve G alleli (%31,7) görüldü. Tüm Parkinson hastalarının rs11835105 allelleri ile hastalığın gidişatı karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmadı (sırasıyla p=0.45 ve p=0.72, Tablo 4-36).

Hastalığın Süresi

Hastalığın süresi <7 ve ≥7 olarak değerlendirildi. Hastalık süresi 7 yıl ve üzerinde olup rs11835105 için “TT” genotipi taşıyan Parkinson hastası bireyler baskın olarak tremor dominant başlangıcı göstermektedirler (p=0,027; OR: 2,016; %95 CI: 0,96-4,24). Hastalığın süresi diğer klinik verilerle de karşılaştırıldı fakat anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Tablo 4-33: LRRK2 genotip sonuçlarının klinik verilerle karşılaştırılma sonuçları

SNP	Genotipler	Başlangıç Semptomu (%)		p değeri	Hastalık Evresi (%)		p değeri	Hareketlerde donma (%)		p değeri	Düşme (%)		p değeri
		Tremor Dominant (TD)	Akinetik Rijit (AR) ve AR+TD		≤3	>3		Hayır	Evet		Hayır	Evet	
rs11176013	GG	48,2	31,2	0.06†	43,1	14,3	0.13	43,2	31,6	0.34	41	42,5	0.86
	AG+AA	51,8	68,8		56,9	85,7		56,8	68,4		59	57,5	
rs10878371	CC	48,2	33,3	0.1	43,9	14,3	0.12	44,1	31,6	0.31	40,9	44,7	0.68
	CT+TT	51,8	66,7		56,1	85,7		55,9	68,4		59,1	55,3	
rs11835105	TT	56,6	45,8	0.23	52	71,4	0.31	51,3	63,2	0.34	54,2	51,1	0.73
	TG+GG	43,4	54,2		48	28,6		48,7	36,8		45,8	48,9	

(†p<0.01)

Tablo 4-34: LRRK2 allel sonuçlarının klinik verilerle karşılaştırılma sonuçları

SNP	Alleller	Başlangıç Semptomu (%)		p değeri	Hastalık Evresi (%)		p değeri	Hareketlerde donma (%)		p değeri	Düşme (%)		p değeri
		Tremor Dominant (TD)	Akinetik Rijit(AR) veya AR+TD		≤3	>3		Hayır	Evet		Hayır	Evet	
rs11176013	G	69,9	61,5	0.16	67,5	50,0	0.18	68,0	57,9	0.22	68,1	63,8	0.49
	A	30,1	38,5		32,5	50,0		32,0	42,1		31,9	36,2	
rs10878371	C	69,9	62,5	0.22	68,0	50,0	0.17	68,5	57,9	0.20	68,1	64,9	0.60
	T	30,1	37,5		32,0	50,0		31,5	42,1		31,9	35,1	
rs11835105	T	71,7	68,7	0.61	69,9	85,7	0.21	69,8	76,3	0.42	70,5	71,3	0.90
	G	28,3	31,3		30,1	14,3		30,2	23,7		29,5	28,7	

Tablo 4-35: LRRK2 geni genotip sonuçlarının hastalığın gidişatı ile karşılaştırılma sonuçları

SNP	Hastalığın Gidişatı (%)						
	Genotip	TT+TB	BB	p değeri	TT	TB+BB	p değeri
rs11176013	GG	47,8	29,4	0.065†	56,1	36,1	0.035*
	AG+AA	52,2	70,6		43,9	63,9	
rs10878371	CC	47,8	32,3	0.122	56,1	37,3	0.048*
	CT+TT	52,2	67,7		43,9	62,7	
rs11835105	TT	55,6	41,2	0.15	53,6	50,6	0.75
	TG+GG	44,4	58,8		46,4	49,4	

Hastalığın gidişatının (TT, TB ve BB) LRRK2 genotiplerine göre karşılaştırılması sonucu anlamlı bir farklılık görülmedi ve karşılaştırmalar TT + TB ile BB ve TB + BB ile TT olarak tekrarlandı (*p<0.05; †p<0.01).

Tablo 4-36: LRRK2 geni allel sonuçlarının hastalığın gidişatı ile karşılaştırılma sonuçları

SNP	Hastalığın Gidişatı (%)						
	Allel	TT+TB	BB	p değeri	TT	TB+BB	p değeri
rs11176013	G	70	58,8	0.095†	76,8	62	0.02*
	A	30	41,2		23,2	38	
rs10878371	C	70	60,3	0.146	76,8	62,6	0.025*
	T	30	39,7		23,2	37,4	
rs11835105	T	71,1	66,2	0.45	68,3	68,3	0.72
	G	28,9	33,8		31,7	31,7	

Hastalığın gidişatının (TT, TB ve BB) LRRK2 genotiplerine göre karşılaştırılması sonucu anlamlı bir farklılık görülmedi ve karşılaştırmalar TT + TB ile BB ve TB + BB ile TT olarak tekrarlandı (*p<0.05 ; †p<0.01).

5. TARTIŞMA

PARK8 lokusunda bulunan lösinden zengin tekrarlar içeren kinaz 2 (LRRK2) geninin, sporadik PH ve otozomal dominant olarak kalıtılan ailesel PH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Satake, Nakabayashi ve ark. 2009). Bu gendeki nokta mutasyonlarının ve genetik varyasyonların ailesel otozomal dominant ve geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastalığı ile ilişkili olduğunun gösterilmesinden bu yana LRRK2 geni Parkinson hastalığı üzerinde çalışan araştırmacıların ilgisini çeken bir konu haline gelmiştir (Simon-Sanchez, Schulte ve ark. 2009).

Biz bu çalışmamızda ailesel Parkinson hastaları, erken ve geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastaları ve sağlıklı kontrollerde, LRRK2 geninin 34.ekzonunda bulunan COR bölgesi üzerinde yer alan rs11176013, 37.ekzonunda bulunan COR bölgesi üzerinde yer alan rs10878371 bölgeleri ve 48. intronunda bulunan rs11835105 bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmleri ile Parkinson hastalığı arasında ilişkiyi, ayrıca Parkinson hastaları ve sağlıklı bireylerde LRRK2 genotipleri ile LRRK2 geni ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki bulunup bulunmadığını araştırdık. Bunlara ek olarak LRRK2 genotipleri ile hastalığın klinik verileri arasındaki ilişkiyi de inceledik.

LRRK2 geninin günümüze kadar 80'nin üzerinde varyantı tanımlanmıştır. Bunlardan en az 16'sının patojenik olduğu bildirilmiştir. PH'na neden olduğu bilinen mutasyonlar, proteinin merkezi katalitik bölgesinde kümelenirler. Bunlardan GTPaz bölgesinde (N1437H, R1441C, R1441G, ve R1441H), COR bölgesinde (Y1699C) ve kinaz bölgesinde (G2019S and I2020T) mutasyonları görülmektedir. Bunlardan en sık görülen G2019S mutasyonu olup Asya ve Güney Afrika toplumlarında daha sık görülmekteyken Avrupa toplumlarında daha nadir görüldüğü tespit edilmiştir. GTPaz bölgesindeki R1441H mutasyonu en sık olarak Kuzey İspanya (Basque), Güney İtalya ve Fransa toplumlarında görülür. LRRK2 geni G2385R ve R1628P mutasyonları Asya toplumlarında en sık görülen varyantlardır (Kalideri, Bostantjopoulou ve ark. 2016).

Türk toplumunda Parkinson hastalarında LRRK2 mutasyonları üzerinde yapılan bazı çalışmalar bulunmaktadır. 2011 yılında Türk toplumunda 255 Parkinson hastasında (110 ailesel PH, 145 sporadik PH) LRRK2 geninin en sık görülen mutasyonları (G2019S, I2020T, Y1699C, R1441C/G/H) araştırılmış ve hiç bir hastada LRRK2 geninin söz konusu patojen mutasyonları bulunmamıştır (Hanagasi, Lohmann ve ark.

2011). Diğer bir çalışmada ise bir hastada G2019S mutasyonu saptanmıştır (Pirkevi ve ark. 2009)

Bugüne kadar farklı ırklar arasında yapılan çalışmalarda PH ile ilişkili çok sayıda tek nükleotid polimorfizmi bildirilmiştir (Li, Teo ve ark. 2013; Soto-Ortolaza, Heckman ve ark. 2013; Cardo, Coto ve ark. 2014). Kuzeybatı Amerika toplumundaki 1264 hasta-kontrol örneği ve Amerika ve İspanya toplumlarındaki 6129 hasta-kontrol örneği kullanılarak 2 aşamalı bir çalışma yapılmıştır. Kuzey Amerika toplumunda LRRK2 genindeki 66 SNP genotiplenerek PH ile ilişkisi araştırılmış ve 3 SNP'nin (rs7294619, rs10878226, rs11176013) PH ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Daha sonra yapılan çalışmada söz konusu SNP'lerin PH ile ilişkisi teyit edilmiştir. Ayrıca rs10878371 polimorfik bölgesinin PH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Mata, Checkoway ve ark. 2012). 2015 yılında Çin toplumunda Parkinson hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada da LRRK2 geninin rs11176013 bölgesinin PH'na olan etkisi gösterilmiştir (Jiang, Li ve ark. 2015).

Yapılan bir genom çapında ilişki çalışmasında LRRK2 ekzonlarında bulunan 121 LRRK2 varyantı Kafkas, Asya ve Arap-Berberi kökenli toplam 15540 PH ve sağlıklı bireyde değerlendirilmiş, PH ile ilişkisi en sık görülen LRRK2 varyantları belirlenmiştir. Bunlardan toplumlar arası farklılık gösteren rs11176013 (p.K1637K) varyantının allel dağılımlarına bakıldığında Kafkas toplumunda minör allel "A" alleli iken Arap-Berberi ve Asya toplumlarında "G" alleli olarak bulunmuştur. LRRK2 varyantlarından rs10878731 (p.G1819G) varyantının Kafkas toplumunda minör allel "T" alleli, Arap-Berberi ve Asya toplumlarında ise "C" alleli olarak bulunmuştur (Ross, Soto-Ortolaza ve ark. 2011).

Çalışmamızda rs11176013 genotip ve allel dağılımlarını araştırdık ve GG genotipinin ve G allelinin hasta grubunda daha sık görüldüğünü dolayısıyla hem genotip hem de allel dağılımları ile PH arasında ilişki bulunduğunu gösterdik.

rs11176013 polimorfizmi ile PH arasındaki ilişkiyi gösteren bu bulgularımız; Amerika, İspanya ve Çin popülasyonlarında gerçekleştirilmiş olan çalışma sonuçları ile uyumluluk göstermektedir (Mata, Checkoway ve ark. 2012; Jiang, Li ve ark. 2015).

Ignacio F. Mata ve ark.'nın Kuzey Amerika ve İspanya toplumunda rs11176013 bölgesi G allelinin hastalığa yatkınlığı arttırdığını bildiren sonuçları ile de uyumludur (Mata, Checkoway ve ark. 2012).

Çalışmamızda rs10878371 genotip ve allel dağılımlarını araştırdık ve rs10878371 polimorfizmi ve PH arasında bir ilişki bulunduğunu saptadık.

rs10878371 polimorfizmi ile ilgili söz konusu bulgularımız; Amerika ve İspanya populasyonlarında gerçekleştirilmiş olan çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Mata, Checkoway ve ark. 2012).

2013 yılında LRRK2 geni üzerine yapılan genom çapında ilişki çalışması (GWAS) sonucu rs11835105 polimorfik bölgesinin de Asya populasyonunda PH ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Li, Teo ve ark. 2013). Çalışmamızda, rs11835105 bölgesine ait genotip dağılımları açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Allel dağılımı açısından ise anlamlı bir ilişki saptandı.

LRRK2 geni polimorfizmleri üzerinde yapılmış olan bazı çalışmalarda genotip ve allel dağılımları bakımından Parkinson hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamazken, haplotip analizi yapıldığında bazı haplotiplerin hastalığa yatkınlığı arttırdığı gösterilmiştir (Bardien, Marsberg ve ark. 2010; Lorenzo-Betancor, Samaranch ve ark. 2012).

2016 yılında Çin toplumunda yapılan moleküler haplotiplendirme çalışmasında LRRK2 geni rs11176013 polimorfizminin Parkinson hastalığıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Pan ve Xiao 2016).

Çalışmamızda, LRRK2 genine ait rs11835105, rs11176013 ve rs10878371 genotiplerinin haplotip analizini gerçekleştirdik. Parkinson hastalarında, “GCG” haplotipinin, sağlıklı kontrollerde ise “ATT” haplotipinin daha fazla bulunduğunu saptadık.

Çalışmamızda genotip ve allel dağılımları ile haplotip analizlerinin yanısıra LRRK2 geni ekspresyon seviyelerini de araştırdık ve LRRK2 genotipleri ile LRRK2mRNA ekspresyon seviyeleri arasında ilişki bulunup bulunmadığını inceledik.

Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında ve ailesel Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol gruplarına oranla ileri derecede anlamlı olarak azaldığını saptadık.

LRRK2 genotipleri ile LRRK2 mRNA ekspresyon seviyelerini karşılaştırdığımızda rs10878371 bölgesi CC genotipi ve rs11176013 bölgesi GG genotipini taşıyan geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında LRRK2 mRNA seviyelerinin diğer genotiplere kıyasla yakın anlamlı düzeyde azaldığını saptadık. rs10878371 bölgesi TT genotipi ve rs11835105 bölgesi TT genotipini taşıyan sağlıklı

bireylerin LRRK2 mRNA ekspresyon seviyelerinin ise diğer genotiplere kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek olduğunu belirledik.

LRRK2 geni esas olarak insan beyinde nöronlarda ve glial hücrelerde ifade edilir. Ayrıca karaciğer ve kalp ekstratlarında da bulunduğu gösterilmiştir. Birçok nörodejeneratif bozukluğa neden olan patolojik inklüzyonlarda da LRRK2'nin varlığı gösterilmiştir (Miklossy, Arai ve ark. 2006).

İnsan periferik kan mononükleer hücrelerinde LRRK2 mRNA ve protein ekspresyon analizleri yapılarak LRRK2 mRNA ve proteininin dolaşımdaki B lenfositlerinde ve monositlerde ifade edildiği gösterilmiştir (Thevenet, Pescini Gobert ve ark. 2011). Ayrıca kan ve beyin LRRK2 gen ekspresyonu açısından önemli benzerlikler gösterdiği bildirilmiştir (Galter, Westerlund ve ark. 2006).

2016 yılında İspanyol toplumunda yapılan genom çapında bir gen ekspresyonu çalışmasında LRRK2 geni G2019S mutasyonu taşıyan Parkinson hastaları, sporadik Parkinson hastaları ve nörolojik hastalığı bulunmayan sağlıklı bireylerde periferik kanda transkriptom karşılaştırması yapılmıştır. Sporadik PH ve LRRK2 G2019S mutasyonu taşıyıcıları arasında farklı ifade edilen 850 gen ortaya çıkarılmıştır (Infante, Prieto ve ark. 2016).

2011 yılında İngiltere'de LRRK2 mutasyonlarının gen ekspresyon seviyesini etkileyebileceği düşüncesiyle LRRK2 mutasyon taşıyıcılarından izole edilen fibroblastlar, G2019S mutasyonu taşıyıcılarından ve G2019S mutasyonu taşımayan kontrollerden elde edilen post-mortem beyin dokuları ile yapılan bir çalışmada, LRRK2 mutasyonlarının gen ekspresyonunda anlamlı değişikliklere neden olmadığı bildirilmiştir (Devine, Kaganovich ve ark. 2011).

Çalışmamızda Parkinson hastalarında LRRK2 geni rs11176013, rs10878371, rs11835105 polimorfik bölgelerine ait genotip ve allel sonuçları ile klinik verileri de karşılaştırdık.

Tüm Parkinson hastalarının rs11176013 genotipleri ile başlangıç semptomları karşılaştırıldığında rs11176013 bölgesi A alleli taşıyan Parkinson hastalarında A alleli taşımayan Parkinson hastalarına kıyasla Akinetik Rijit semptomunun daha sık görüldüğünü saptadık.

rs11176013 bölgesi genotipleri ve allelleri ile hastalığın gidişatı karşılaştırıldığında rs11176013 bölgesi A alleli taşıyan Parkinson hastalarında taşımayan hastalara kıyasla bradikinezi semptomu daha sık olarak görülürken, rs11176013 bölgesi G alleli taşıyan Parkinson hastalarında tremorun daha sık olarak görüldüğünü belirledik.

rs10878371 genotipleri ve allelleri ile hastalığın gidişatı karşılaştırıldığında rs10878371 bölgesi T alleli taşıyan Parkinson hastalarında taşımayan hastalara kıyasla bradikinezi semptomu daha sık olarak görülürken, rs10878371 bölgesi C alleli taşıyan Parkinson hastalarında tremor semptomunun daha sık olarak görüldüğünü saptadık. Parkinson hastalarının rs11835105 genotipleri ile klinik verilerin karşılaştırılması sonucu anlamlı bir ilişki bulunmadı.

2005 yılında Norveç toplumunda G2019S mutasyonu taşıyan ve aile öyküsü olan 10 hastanın başlangıç semptomları değerlendirilerek G2019S mutasyonu taşıyan hastalarda Tremor semptomunun daha sık görüldüğü bildirilmiştir (Aasly, Toft ve ark. 2005). 2007 yılında Tunus ve Amerika toplumlarında yapılan bir çalışmada G2019S mutasyonu taşıyan ve taşımayan Parkinson hastaları ile başlangıç semptomlarının karşılaştırılması sonucu anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Ishihara, Gibson ve ark. 2007).

Avustralya’da Parkinson hastalarında en yaygın görülen LRRK2 mutasyonları G2019S, R1441H, A1442P olarak belirlenmiş ve hastalığın klinik verileri ile ilişkisi araştırılmıştır. G2019S ve R1441P mutasyonları bulunan Parkinson hastalarında en yaygın klinik özelliğin tremor olduğu bildirilmiştir. LRRK2 A1442P mutasyonu taşıyan PH’larında ise başlangıç semptomunun tremor ve bradikinezi olduğu tespit edilmiştir (Huang, Halliday ve ark. 2007). 2015 yılında LRRK2 G2019S mutasyonu taşıyıp Lewy cisimciği patolojisi görülen ve görülmeyen Parkinson hastalarının da klinik verileri araştırılmış ve 2 grup arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Kalia, Lang ve ark. 2015).

Her ne kadar yapılan genetik ve klinik çalışmalar LRRK2 geni varyantları ile geç başlangıçlı sporadik PH ve ailesel PH arasında bir ilişki olduğuna işaret etse de, LRRK2 geni varyantlarının hastalık oluşumunu hangi mekanizma ile etkilediği halen kesin olarak bilinmemektedir. Parkinson hastalığı ile ilgili LRRK2 mutasyonlarının nöronal hücre toksisitesine neden olduğu bildirilmiştir. Bazı LRRK2 mutasyonlarının kinaz aktivitesini arttırdığı ve bunun önemli ölçüde apoptotik hücre ölümüyle ilişkili olduğu dopaminerjik hücre dizinlerinde ve primer nöronlarda gösterilmiştir; kinaz fonksiyonunun durdurulması bu hücrel toksisiteyi iyileştirmektedir (Lu ve Tan 2008).

LRRK2'nin PH patolojisi ile ilişkili olabilecek çeşitli özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Schapira 2006).

Sonuç olarak;

Türk toplumunda yapmış olduğumuz bu çalışmada, LRRK2 geni rs11176013 bölgesi G allelinin hastalık riskini arttırıcı, A allelinin ise koruyucu özelliği olduğu saptanmıştır.

LRRK2 geni rs10878371 bölgesi C allelinin hastalık riskini arttırıcı, T allelinin ise koruyucu özelliği olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca sonuçlarımız; sırasıyla rs11176013, rs10878371 ve rs11835105 bölgeleri "GCG" haplotipinin Parkinson hastalığı riskini arttırdığını göstermiştir.

Geç başlangıçlı sporadik Parkinson hastalarında ve ailesel PH'da LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesinin azaldığını göstermiştir.

Buna ek olarak LRRK2 geni rs11176013 bölgesi GG genotipinin ve rs10878371 bölgesi CC genotipinin LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesinin azalmasına neden olarak hastalık riskini arttırabileceği ve rs10878371 bölgesi TT genotipi ile rs11835105 bölgesi TT genotipinin LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesini arttırarak koruyucu özellikte olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca LRRK2 geni rs11176013 ve rs10878371 polimorfizmlerinin Parkinson hastalığının gidişatı üzerine etkisi olduğunu göstermektedir.

Tüm bu bulgularımız LRRK2'nin Parkinson hastalığı patogenezinde önemli bir rolü olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamız, Türk toplumunda LRRK2 geni polimorfizmleri ile ailesel ve sporadik PH arasındaki ilişkiyi, ayrıca LRRK2 geni polimorfizmleri ile LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesi ve hastalığın klinik verileri arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışma olmakla birlikte;

Çalışmamızda değerlendirilen hasta ve kontrollere ait örnek sayısının kısıtlı oluşu nedeniyle örnek sayısının arttırılmasıyla yapılacak olan çalışmalar LRRK2 geni ile PH arasındaki ilişkiyi aydınlatmada yararlı olacaktır.

LRRK2 geni ve LRRK2 proteini ile ailesel ve sporadik PH arasındaki biyolojik ilişkiyi belirlemek üzere bundan sonra yapılacak deneysel çalışmalara gerek vardır.

KAYNAKLAR

- Aasly, J. O., M. Toft, ve ark. (2005). "Clinical features of LRRK2-associated Parkinson's disease in central Norway." Ann Neurol**57**(5): 762-5.
- Abdullah, R., I. Basak, ve ark. (2015). "Parkinson's disease and age: The obvious but largely unexplored link." Exp Gerontol**68**: 33-8.
- Anand, V. S. ve S. P. Braithwaite (2009). "LRRK2 in Parkinson's disease: biochemical functions." FEBS J**276**(22): 6428-35.
- Angot, E., J. A. Steiner, ve ark. (2010). "Are synucleinopathies prion-like disorders?" Lancet Neurol**9**(11): 1128-38.
- Bardien, S., S. Lesage, ve ark. (2011). "Genetic characteristics of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) associated Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord**17**(7): 501-8.
- Bardien, S., A. Marsberg, ve ark. (2010). "LRRK2 G2019S mutation: frequency and haplotype data in South African Parkinson's disease patients." J Neural Transm (Vienna)**117**(7): 847-53.
- Beal, M. F. (1998). "Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis." Ann Neurol**44**(3 Suppl 1): S110-4.
- Bergman, H. ve G. Deuschl (2002). "Pathophysiology of Parkinson's disease: from clinical neurology to basic neuroscience and back." Mov Disord**17 Suppl 3**: S28-40.
- Beyer, K., M. Domingo-Sabat, ve ark. (2009). "Molecular pathology of Lewy body diseases." Int J Mol Sci**10**(3): 724-45.
- Biskup, S., D. J. Moore, ve ark. (2006). "Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain." Ann Neurol**60**(5): 557-69.
- Bonifati, V., P. Rizzu, ve ark. (2003). "DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism." Neurol Sci**24**(3): 159-60.
- Braak, H. ve K. Del Tredici (2008). "[A new look at the corticostriatal-thalamocortical circuit in sporadic Parkinson's disease]." Nervenarzt**79**(12): 1440-5.
- Braak, H., K. Del Tredici, ve ark. (2002). "Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages)." J Neurol**249 Suppl 3**: III/1-5.
- Braak, H., E. Ghebremedhin, ve ark. (2004). "Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology." Cell Tissue Res**318**(1): 121-34.
- Burchell, V. S., D. E. Nelson, ve ark. (2013). "The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy." Nat Neurosci**16**(9): 1257-65.
- Cardo, L. F., E. Coto, ve ark. (2014). "The screening of the 3'UTR sequence of LRRK2 identified an association between the rs66737902 polymorphism and Parkinson's disease." J Hum Genet**59**(6): 346-8.
- Cardona, F., M. Tormos-Perez, ve ark. (2014). "Structural and functional in silico analysis of LRRK2 missense substitutions." Mol Biol Rep**41**(4): 2529-42.
- Corti, O., S. Lesage, ve ark. (2011). "What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease." Physiol Rev**91**(4): 1161-218.
- Das, C., Q. Q. Hoang, ve ark. (2006). "Structural basis for conformational plasticity of the Parkinson's disease-associated ubiquitin hydrolase UCH-L1." Proc Natl Acad Sci U S A**103**(12): 4675-80.

- Dauer, W. ve S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron**39**(6): 889-909.
- Deng, H., K. Gao, ve ark. (2013). "The VPS35 gene and Parkinson's disease." Mov Disord**28**(5): 569-75.
- Deng, H., Y. Wu, ve ark. (2015). "The EIF4G1 gene and Parkinson's disease." Acta Neurol Scand**132**(2): 73-8.
- Devine, M. J., A. Kaganovich, ve ark. (2011). "Pathogenic LRRK2 mutations do not alter gene expression in cell model systems or human brain tissue." PLoS One**6**(7): e22489.
- Di Fonzo, A., C. Tassorelli, ve ark. (2006). "Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease." Eur J Hum Genet**14**(3): 322-31.
- Dias, V., E. Junn, ve ark. (2013). "The role of oxidative stress in Parkinson's disease." J Parkinsons Dis**3**(4): 461-91.
- Dogu, O., J. Johnson, ve ark. (2004). "A consanguineous Turkish family with early-onset Parkinson's disease and an exon 4 parkin deletion." Mov Disord**19**(7): 812-6.
- Dorsey, E. R., R. Constantinescu, ve ark. (2007). "Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030." Neurology**68**(5): 384-6.
- Emre M., H. Hanagasi, ve ark. (2008). "Hareket Bozuklukları". Erişim 12.2008 <http://www.itfnoroloji.org/norodej/harboz.htm>
- Erer, S., U. Egeli, ve ark. (2016). "Mutation analysis of the PARKIN, PINK1, DJ1, and SNCA genes in Turkish early-onset Parkinson's patients and genotype-phenotype correlations." Clin Neurol Neurosurg**148**: 147-53.
- Ertan, S. (2005). "Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri". Nörolog Olmayanlar İçin Nöroloji Sempozyum Dizisi**42**: 249-254
- Farrer, M., J. Kachergus, ve ark. (2004). "Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications." Ann Neurol**55**(2): 174-9.
- Ferreira, M. ve J. Massano (2016). "An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations." Acta Neurol Scand**135**(3): 273-284.
- Funayama, M., K. Hasegawa, ve ark. (2002). "A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1." Ann Neurol**51**(3): 296-301.
- Funayama, M. ve N. Hattori (2015). "CHCHD2 and Parkinson's disease--authors' reply." Lancet Neurol**14**(7): 682-3.
- Galter, D., M. Westerlund, ve ark. (2006). "LRRK2 expression linked to dopamine-innervated areas." Ann Neurol**59**(4): 714-9.
- Gandhi, P. N., S. G. Chen, ve ark. (2009). "Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2): a key player in the pathogenesis of Parkinson's disease." J Neurosci Res**87**(6): 1283-95.
- Gandhi, P. N., X. Wang, ve ark. (2008). "The Roc domain of leucine-rich repeat kinase 2 is sufficient for interaction with microtubules." J Neurosci Res**86**(8): 1711-20.
- Gezen-Ak, D., M. Alaylıoğlu, ve ark. (2017). "GC and VDR SNPs and Vitamin D Levels in Parkinson's Disease: The Relevance to Clinical Features." Neuromolecular Med**19**(1): 24-40
- Gilsbach, B. K. ve A. Kortholt (2014). "Structural biology of the LRRK2 GTPase and kinase domains: implications for regulation." Front Mol Neurosci**7**: 32.
- Gloeckner, C. J., N. Kinkl, ve ark. (2006). "The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity." Hum Mol Genet**15**(2): 223-32.

- Gomez-Tortosa, E., M. C. Irizarry, ve ark. (2000). "Clinical and neuropathological correlates of dementia with Lewy bodies." Ann N Y Acad Sci**920**: 9-15.
- Grunewald, A., B. Arns, ve ark. (2012). "ATP13A2 mutations impair mitochondrial function in fibroblasts from patients with Kufor-Rakeb syndrome." Neurobiol Aging**33**(8): 1843 e1-7.
- Hanagasi, H. A., E. Lohmann, ve ark. (2011). "LRRK2 mutations are uncommon in Turkey." Eur J Neurol**18**(10): e137.
- Hatano, T., S. Kubo, ve ark. (2007). "Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts." Hum Mol Genet**16**(6): 678-90.
- Healy, D. G., P. M. Abou-Sleiman, ve ark. (2004). "Genetic causes of Parkinson's disease: UCHL-1." Cell Tissue Res**318**(1): 189-94.
- Hernandez, D. G., X. Reed, ve ark. (2016). "Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance." J Neurochem**139 Suppl 1**: 59-74.
- Hershko, A. ve A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem**67**: 425-79.
- Hoehn, M.M. ve M.D. Yahr (1998). "Parkinsonism: onset, progression, and mortality. 1967." Neurology**50**(2): 318-16
- Huang, Y., G. M. Halliday, ve ark. (2007). "Prevalence and clinical features of common LRRK2 mutations in Australians with Parkinson's disease." Mov Disord**22**(7): 982-9.
- Imai, Y., M. Soda, ve ark. (2001). "An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin." Cell**105**(7): 891-902.
- Infante, J., C. Prieto, ve ark. (2016). "Comparative blood transcriptome analysis in idiopathic and LRRK2 G2019S-associated Parkinson's disease." Neurobiol Aging**38**: 214 e1-5.
- Ishihara, L., R. A. Gibson, ve ark. (2007). "Screening for Lrrk2 G2019S and clinical comparison of Tunisian and North American Caucasian Parkinson's disease families." Mov Disord**22**(1): 55-61.
- Jaleel, M., R. J. Nichols, ve ark. (2007). "LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity." Biochem J**405**(2): 307-17.
- Jiang, E., F. Li, ve ark. (2015). "High-Resolution Melting Analysis as a Developed Method for Genotyping the PD Susceptibility Loci in LRRK2 Gene." J Clin Lab Anal**29**(4): 299-304.
- Kalia, L. V., A. E. Lang, ve ark. (2015). "Clinical correlations with Lewy body pathology in LRRK2-related Parkinson disease." JAMA Neurol**72**(1): 100-5.
- Kalinderi, K., S. Bostantjopoulou, ve ark. (2016). "The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects." Acta Neurol Scand**134**(5): 314-326.
- Kazlauskaitė, A., C. Kondapalli, ve ark. (2014). "Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65." Biochem J**460**(1): 127-39.
- Khan, N. L., S. Jain, ve ark. (2005). "Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data." Brain**128**(Pt 12): 2786-96.
- Kinghorn, K. J., J. I. Castillo-Quan, ve ark. (2015). "Loss of PLA2G6 leads to elevated mitochondrial lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction." Brain**138**(Pt 7): 1801-16.

- Kitada, T., S. Asakawa, ve ark. (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." *Nature***392**(6676): 605-8.
- Kobe, B. ve J. Deisenhofer (1995). "Proteins with leucine-rich repeats." *Curr Opin Struct Biol***5**(3): 409-16.
- Kumar, K. R., A. Djarmati-Westenberger, ve ark. (2011). "Genetics of Parkinson's disease." *Semin Neurol***31**(5): 433-40.
- Kumar, K. R., A. Ramirez, ve ark. (2013). "Glucocerebrosidase mutations in a Serbian Parkinson's disease population." *Eur J Neurol***20**(2): 402-5.
- Kumari, U. ve E. K. Tan (2009). "LRRK2 in Parkinson's disease: genetic and clinical studies from patients." *FEBS J***276**(22): 6455-63.
- Kumari, U. ve E. K. Tan (2010). "Leucine-rich repeat kinase 2-linked Parkinson's disease: clinical and molecular findings." *J Mov Disord***3**(2): 25-31.
- Langston, J. W. ve P. Ballard (1984). "Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease." *Can J Neurol Sci***11**(1 Suppl): 160-5.
- Lesage, S. ve A. Brice (2009). "Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors." *Hum Mol Genet***18**(R1): R48-59.
- Lesage, S., A. Durr, ve ark. (2007). "LRRK2: a link between familial and sporadic Parkinson's disease?" *Pathol Biol (Paris)***55**(2): 107-10.
- Li, B., D. Yu, ve ark. (2013). "Edaravone prevents neurotoxicity of mutant L166P DJ-1 in Parkinson's disease." *J Mol Neurosci***51**(2): 539-49.
- Li, H., Y. Y. Teo, ve ark. (2013). "Patterns of linkage disequilibrium of LRRK2 across different races: implications for genetic association studies." *PLoS One***8**(9): e75041.
- Li, J. Q., L. Tan, ve ark. (2014). "The role of the LRRK2 gene in Parkinsonism." *Mol Neurodegener***9**: 47.
- Licker, V., E. Kovari, ve ark. (2009). "Proteomics in human Parkinson's disease research." *J Proteomics***73**(1): 10-29.
- Linnertz, C., M. W. Lutz, ve ark. (2014). "The genetic contributions of SNCA and LRRK2 genes to Lewy Body pathology in Alzheimer's disease." *Hum Mol Genet***23**(18): 4814-21.
- Liu, S. Y., J. J. Wu, ve ark. (2015). "Onset-related subtypes of Parkinson's disease differ in the patterns of striatal dopaminergic dysfunction: A positron emission tomography study." *Parkinsonism Relat Disord***21**(12): 1448-53.
- Lorenzo-Betancor, O., L. Samaranch, ve ark. (2012). "LRRK2 haplotype-sharing analysis in Parkinson's disease reveals a novel p.S1761R mutation." *Mov Disord***27**(1): 146-51.
- Lu, Y. W. ve E. K. Tan (2008). "Molecular biology changes associated with LRRK2 mutations in Parkinson's disease." *J Neurosci Res***86**(9): 1895-901.
- Maguire-Zeiss, K. A. (2008). "alpha-Synuclein: a therapeutic target for Parkinson's disease?" *Pharmacol Res***58**(5-6): 271-80.
- Marin, I., W. N. van Egmond, ve ark. (2008). "The Roco protein family: a functional perspective." *FASEB J***22**(9): 3103-10.
- Mata, I. F., H. Checkoway, ve ark. (2012). "Common variation in the LRRK2 gene is a risk factor for Parkinson's disease." *Mov Disord***27**(14): 1822-5.
- McNaught, K. S., C. W. Olanow, ve ark. (2001). "Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease." *Nat Rev Neurosci***2**(8): 589-94.
- Miklossy, J., T. Arai, ve ark. (2006). "LRRK2 expression in normal and pathologic human brain and in human cell lines." *J Neuropathol Exp Neurol***65**(10): 953-63.

- Moore, D. J., A. B. West, ve ark. (2005). "Molecular pathophysiology of Parkinson's disease." Annu Rev Neurosci**28**: 57-87.
- Naoi, M. ve W. Maruyama (1999). "Cell death of dopamine neurons in aging and Parkinson's disease." Mech Ageing Dev**111**(2-3): 175-88.
- Narendra, D., A. Tanaka, ve ark. (2009). "Parkin-induced mitophagy in the pathogenesis of Parkinson disease." Autophagy**5**(5): 706-8.
- Nichols, W. C., N. Pankratz, ve ark. (2005). "Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease." Lancet**365**(9457): 410-2.
- Olanow, C. W. (2002). "Surgical therapy for Parkinson's disease." Eur J Neurol**9 Suppl 3**: 31-9.
- Paisan-Ruiz, C., S. Jain, ve ark. (2004). "Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease." Neuron**44**(4): 595-600.
- Paisan-Ruiz, C., P. Nath, ve ark. (2008). "Comprehensive analysis of LRRK2 in publicly available Parkinson's disease cases and neurologically normal controls." Hum Mutat**29**(4): 485-90.
- Pan, R. ve P. Xiao (2016). "Quantitative haplotyping of PCR products by nonsynchronous pyrosequencing with di-base addition." Anal Bioanal Chem**408**(29): 8263-8271.
- Parkinson, J. (2002). "An essay on the shaking palsy. 1817." J Neuropsychiatry Clin Neurosci**14**(2): 223-36; discussion 222.
- Patra, B., A. J. Parsian, ve ark. (2009). "LRRK2 gene G2019S mutation and SNPs [haplotypes] in subtypes of Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord**15**(3): 175-80.
- Pirkevi, C., S. Lesage, ve ark. (2009). "A LRRK2 G2019S mutation carrier from Turkey shares the Japanese haplotype." Neurogenetics**10**(3): 271-3.
- Polymeropoulos, M. H., J. J. Higgins, ve ark. (1996). "Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23." Science**274**(5290): 1197-9.
- Puschmann, A. (2013). "Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations." Parkinsonism Relat Disord**19**(4): 407-15.
- Ramirez, A., A. Heimbach, ve ark. (2006). "Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase." Nat Genet**38**(10): 1184-91.
- Requejo-Aguilar, R., I. Lopez-Fabuel, ve ark. (2015). "DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally up-regulating Pink1." Biochem J**467**(2): 303-10.
- Rideout, H. J. ve L. Stefanis (2014). "The neurobiology of LRRK2 and its role in the pathogenesis of Parkinson's disease." Neurochem Res**39**(3): 576-92.
- Ross, O. A., A. I. Soto-Ortolaza, ve ark. (2011). "Association of LRRK2 exonic variants with susceptibility to Parkinson's disease: a case-control study." Lancet Neurol**10**(10): 898-908.
- Ross, O. A., G. J. Wilhoite, ve ark. (2010). "LRRK2 variation and Parkinson's disease in African Americans." Mov Disord**25**(12): 1973-6.
- Sancho, R. M., B. M. Law, ve ark. (2009). "Mutations in the LRRK2 Roc-COR tandem domain link Parkinson's disease to Wnt signalling pathways." Hum Mol Genet**18**(20): 3955-68.
- Satake, W., Y. Nakabayashi, ve ark. (2009). "Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease." Nat Genet**41**(12): 1303-7.

- Schapira, A. H. (2002). "Dopamine agonists and neuroprotection in Parkinson's disease." *Eur J Neurol***9 Suppl 3**: 7-14.
- Schapira, A. H. (2006). "The importance of LRRK2 mutations in Parkinson disease." *Arch Neurol***63**(9): 1225-8.
- Schulte, C. ve T. Gasser (2011). "Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression." *Appl Clin Genet***4**: 67-80.
- Serdaroglu, P., H. Hanagasi, ve ark. (2005). "Parkin expression in muscle from three patients with autosomal recessive Parkinson's disease carrying parkin mutation." *Acta Myol***24**(1): 2-5.
- Sheerin, U. M., G. Charlesworth, ve ark. (2012). "Screening for VPS35 mutations in Parkinson's disease." *Neurobiol Aging***33**(4): 838 e1-5.
- Shimura, H., N. Hattori, ve ark. (2000). "Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase." *Nat Genet***25**(3): 302-5.
- Shojaee, S., F. Sina, ve ark. (2008). "Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays." *Am J Hum Genet***82**(6): 1375-84.
- Simon-Sanchez, J., C. Schulte, ve ark. (2009). "Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease." *Nat Genet***41**(12): 1308-12.
- Singleton, A. B., M. Farrer, ve ark. (2003). "alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease." *Science***302**(5646): 841.
- Singleton, A. B., M. J. Farrer, ve ark. (2013). "The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications." *Mov Disord***28**(1): 14-23.
- Soto-Ortolaza, A. I., M. G. Heckman, ve ark. (2013). "GWAS risk factors in Parkinson's disease: LRRK2 coding variation and genetic interaction with PARK16." *Am J Neurodegener Dis***2**(4): 287-99.
- Spatola, M. ve C. Wider (2014). "Genetics of Parkinson's disease: the yield." *Parkinsonism Relat Disord***20 Suppl 1**: S35-8.
- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, ve ark. (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies." *Nature***388**(6645): 839-40.
- Stamey, W. ve J. Jankovic (2007). "The other Babinski sign in hemifacial spasm." *Neurology***69**(4): 402-4.
- Tan, E. K. (2007). "The role of common genetic risk variants in Parkinson disease." *Clin Genet***72**(5): 387-93.
- Taylor, J. P., I. F. Mata, ve ark. (2006). "LRRK2: a common pathway for parkinsonism, pathogenesis and prevention?" *Trends Mol Med***12**(2): 76-82.
- Thevenet, J., R. Pescini Gobert, ve ark. (2011). "Regulation of LRRK2 expression points to a functional role in human monocyte maturation." *PLoS One***6**(6): e21519.
- Thomas, B. ve M. F. Beal (2007). "Parkinson's disease." *Hum Mol Genet***16 Spec No. 2**: R183-94.
- Utter, A. A. ve M. A. Basso (2008). "The basal ganglia: an overview of circuits and function." *Neurosci Biobehav Rev***32**(3): 333-42.
- Venda, L. L., S. J. Cragg, ve ark. (2010). "alpha-Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease." *Trends Neurosci***33**(12): 559-68.
- Wakabayashi, K., K. Tanji, ve ark. (2007). "The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates." *Neuropathology***27**(5): 494-506.
- Wirdefeldt, K., H. O. Adami, ve ark. (2011). "Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence." *Eur J Epidemiol***26 Suppl 1**: S1-58.

- Zhao, Y., P. Ho, ve ark. (2011). "LRRK2 variant associated with Alzheimer's disease." Neurobiol Aging**32**(11): 1990-3.
- Zhou, Z. D., S. P. Xie, ve ark. (2015). "F-box protein 7 mutations promote protein aggregation in mitochondria and inhibit mitophagy." Hum Mol Genet**24**(22): 6314-30.
- Zimprich, A., S. Biskup, ve ark. (2004). "Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology." Neuron**44**(4): 601-7.



FORMLAR

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

- 1) Davet edildiğiniz çalışma “LRRK2 geni polimorfizmlerinin Parkinson Hastalığı ile ilişkisinin araştırılması” adlı bir araştırma projesidir. Bu çalışma bir moleküler genetik araştırmasıdır. Bu nedenle sizden alınacak örnekler ile genetik yapınız incelenecektir.
- 2) Çalışmanın Amacı: Çalışmada Parkinson hastalığı ile ilişkili olduğu bilinen LRRK2 geni polimorfizmlerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu çalışma, Parkinson hastalığı ile ilişkili genlerin ortaya çıkartılması ve hastalığın patolojik mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.
- 3) Bu çalışmada hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki örnek grup oluşturulacaktır. Bu gruplar klinik teşhisleri konulan 132 Parkinson hastası ve bu yaş grubuyla paralellik gösteren 133 sağlıklı kontrolden oluşacaktır. Hasta ve kontrol gruplarının LRRK2 polimorfizmleri belirlenip istatistiksel olarak karşılaştırılacaktır.
- 4) Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz çalışma için sizden bir defaya mahsus olarak kan alınacaktır. Alınan kan örneğinden DNA izolasyonunu takiben LRRK2 polimorfizmleri Gerçek Zamanlı PZR yöntemiyle tespit edilecektir. Kan alma işlemi size herhangi bir risk getirmeyecektir.
- 5) Bu çalışma İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Nöroloji Anabilim Dalı’ndan alınan kan örnekleriyle İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Nörogenetik Laboratuvarında gerçekleştirilecektir.
- 6) Size bu çalışmada herhangi bir madde verilmeyecektir.
- 7) Araştırmaya katılımınız isteğe bağlıdır. İstedığınız zaman herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilirsiniz. Aynı şekilde araştırmacı tarafından gerek görüldüğünde araştırmadan çıkartılabilirsiniz.
- 8) Bu çalışmanın size ve ailenize bir yarar getirip getirmeyeceğini şimdiden söylemek mümkün değildir. Size bu konuda söz verilemez.
- 9) Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecektir. Bunun yanı sıra herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Bağlı olduğunuz Sosyal Güvenlik Kurumu’ndan (SGK) herhangi bir ücret alınmayacaktır.
- 10) Sizinle ilgili elde edilecek tüm klinik ve genetik bulgular gizli kalacak ve kimseyle paylaşılmayacaktır. Araştırma sonuçlarının yayımlanmasında dahi kimlik bilgileriniz kimseyle paylaşılmayacaktır. Etik Kurul, Bakanlık ve diğer ilgili sağlık otoriteleri tıbbi kayıtlarınıza doğrudan erişimde bulunabilecek ancak çalışmada bu bilgiler gizli tutulacaktır.

11)Araştırma konusuyla ilgili ve araştırmaya katılmaya devam etme isteğinizi etkileyecek yeni bilgiler edinildiğinde gönüllü veya yasal temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir.

12)Toplanan örnekler yurtdışına analiz amacıyla gönderilmeyecektir.

13)Çalışma aşamasında ve çalışma sonlandırıldıktan sonra tedaviniz kesintisiz olarak devam edecektir.

14)Kabul edilmesi halinde siz ve/veya yakınlarınız bilgilendirilmiş ve onayları alınmış olacaktır.

“Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama, aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

“LRRK2 geni polimorfizmlerinin Parkinson Hastalığı ile ilişkisinin araştırılması” adlı araştırma kapsamında alınan biyolojik örneklerimin,

Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.

Bu çalışmada ve ileride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Okudum

Gönüllünün

Adı / Soyadı :

İmzası :

Tarih :

Tel :

Araştırmacı

Adı / Soyadı :

İmzası :

Tarih :

Tel :

Gerekilyorsa Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin

Adı / Soyadı :

İmzası :

Tel :

Gekilyorsa Yasal Temsilcinin

Adı / Soyadı :

Tarih :

Tel :

Arařtırmayla ilgili bilgi verecek Hekim

Prof. Dr. Sibel Ertan

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakóltesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Nöroloji
Anabilim Dalı

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI



Sayı : 83045809/604.01/ 02 - 284575

Konu:

Istanbul .../.../.....

09 Eylül 2015

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığına

İlgi: 19.08.2015 tarih, 66018902-302.14.06-262057 sayılı yazınıza:

Anabilim Dalınız öğretim üyesi **Prof.Dr.Selma YILMAZER**'in danışmanlığında Yüksek Lisans Öğrencisi **Esin CANDAS**'ın yürütücülüğünde **Prof.Dr.Sibel ERTAN**'ın yardımcılığında "LRRK2 Geni Polimorfizmlerinin Parkinson Hastalığı ile İlişkisinin Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri **01 Eylül 2015** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim



Prof.Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Klinik Araştırmalar Etik
Kurulu Başkanı

Eki:

1 dosya

Not: Yanıtlarımızda yazımızın gün ve sayısının belirtilmesi rica olunur.
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34098 Cerrahpaşa / İSTANBUL
Telefon 0 (212) 414 32 52 Dahili : 22300 Faks: 0 (212) 632 00 40 e-posta: ciftetik@istanbul.edu.tr